



Định lượng alkaloid toàn phần và đánh giá tác dụng ức chế sản sinh NO trên tế bào RAW 264.7 của loài thạch cân thảo (*Pilea boniana* Gagnep.) thu hái tại Cao Bằng

QUANTIFYING TOTAL ALCALOID AND EVALUATING THE NO PRODUCTION INHIBITORY EFFECT IN RAW 264.7 CELLS OF *PILEA BONIANA* GAGNEP. HARVESTED IN CAO BANG

Lương Thị Lan¹, Trần Thị Thu Hiền¹

Lê Thị Kim Vân², Nguyễn Duy Thuần¹

¹Học viện Y - Dược học cổ truyền Việt Nam, ²Viện Dược liệu

TÓM TẮT

Mục tiêu: Định lượng được alkaloid toàn phần và đánh giá hoạt tính kháng viêm qua mô hình ức chế sản sinh NO trên tế bào RAW 264.7 của loài *Pilea boniana* Gagnep.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu: Tiến hành xác định hàm lượng alkaloid toàn phần trong mẫu Thạch cân thảo bằng phương pháp cân và đánh giá hoạt tính kháng viêm qua mô hình ức chế sản sinh NO trên tế bào RAW 264.7 được kích thích bởi lipopolisaccharid.

Kết quả: Đã tiến hành định lượng alkaloid toàn phần bằng phương pháp cân, theo đó hàm lượng alkaloid thu được là $1,04 \pm 2,32\%$. Hoạt tính kháng viêm của cao tổng và cao alkaloid toàn phần được đánh giá thông qua khả năng ức chế sản sinh NO trên tế bào RAW 264.7 với giá trị IC_{50} dao động 1,27-2,68 $\mu\text{g/ml}$.

Kết luận: Hàm lượng alkaloid toàn phần tương đối cao và hoạt tính ức chế sản sinh NO trên tế bào RAW 264.7 của mẫu nghiên cứu khá mạnh, đặc biệt là ở cao alkaloid toàn phần với IC_{50} là $1,27 \pm 0,09 \mu\text{g/ml}$.

Từ khóa: *Pilea boniana* Gagnep., alkaloid, chống viêm.

SUMMARY

Objectives: To quantify total alkaloids and evaluate anti-inflammatory activity via the NO production inhibitors on RAW 264.7 cells of *Pilea boniana* Gagnep.

Subjects and Methods: Quantifying total alkaloid content in the *Pilea boniana* Gagnep. by weighing method and evaluating anti-inflammatory activity through the NO production inhibitor model on RAW 264.7 cells are stimulated by lipopolisaccharid.

Results: The total alkaloid was quantified by the weighing method, according to which the alkaloid content obtained was $1.04 \pm 2.32\%$. The anti-inflammatory activity of the whole and alkaloid extract was evaluated through the ability to inhibit NO production in RAW 264.7 cells showing the IC_{50} value ranging from 1.27 to 2.68 $\mu\text{g/ml}$.

Conclusions: The total alkaloid content is relatively high and the production inhibitors in RAW 264.7 cells of the sample is quite strong, especially in total alkaloid dry extract with IC_{50} of $1.27 \pm 0.09 \mu\text{g/ml}$.

Keyword: *Pilea boniana* Gagnep., alkaloid, anti-inflammatory.

Tác giả liên hệ: Lương Thị Lan

Số điện thoại: 0333561585

Email: luongthilan1005@gmail.com

Mã DOI: <https://doi.org/10.60117/vjmap.v55i2.284>

Ngày nhận bài: 20/07/2023

Ngày phản biện: 21/12/2023

Ngày chấp nhận đăng: 29/07/2024



ĐẶT VẤN ĐỀ

Viêm là phản ứng của cơ thể để bảo vệ cơ thể chống lại yếu tố gây bệnh nhưng nếu phản ứng mạnh quá sẽ gây ra tổn thương, hoại tử và rối loạn nhiều chức năng của các cơ quan [1]. Hiện nay trên thị trường có nhiều thuốc chống viêm nguồn gốc tân dược, tuy nhiên chúng có nhiều tác dụng không mong muốn, đặc biệt khi phải dùng dài ngày. Do vậy, sử dụng thuốc chống viêm có nguồn gốc thiên nhiên đang rất được quan tâm.

Thạch căn thảo (*Pilea boniana* Gagnep.) được đồng bào dân tộc tỉnh Cao Bằng dùng với tác dụng giảm đau, chống viêm trong điều trị các bệnh trị gân cốt buốt đau, sưng đau do chấn thương, mụn nhọt. Ngoài ra, ở vùng Vân Nam, Trung Quốc còn được dùng để trị viêm thận thũng, bí tiểu tiện. Người dân vùng Quảng Châu, Trung Quốc dùng loài này để trị ỉa chảy, lỵ và dùng ngoài trị chấn thương [1]. Tuy nhiên, các công bố thành phần hóa học cũng như tác dụng sinh học của loài này vẫn còn rất hạn chế. Đặc biệt ở Việt Nam, cho đến nay chưa có bất kì nghiên cứu nào về loài này được công bố. Nhóm nghiên cứu tiến hành nghiên cứu thành phần hóa học trong loài, qua nghiên cứu sơ bộ, có thể xác định sự có mặt của nhóm hợp chất alkaloid. Vì vậy nhóm nghiên cứu tiến hành định lượng alkaloid trong mẫu nghiên cứu và đánh giá tác dụng chống viêm *in vitro* có thông qua mô hình ức chế sản sinh NO trên dòng tế bào RAW 264.7 để làm rõ tác dụng chống viêm trên lâm sàng của đồng bào dân tộc tỉnh Cao Bằng.

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Đối tượng nghiên cứu

Mẫu cây có đủ các bộ phận sinh sản thu hái tại Cao Bằng vào tháng 2 năm 2023, được giám định tên khoa học là *Pilea boniana* Gagnep., họ Gai (Urticaceae) bởi các chuyên gia và lưu mẫu tại Trung tâm Tài nguyên Dược liệu – Viện Dược liệu (Số hiệu tiêu bản: DV-181222) và Bảo tàng Thiên nhiên Việt Nam - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (Số hiệu tiêu bản: ĐVT 786).

Nguyên liệu và thiết bị

- Bộ phận trên mặt đất của loài Thạch căn thảo thu hái tại Cao Bằng vào 2/2023 được phơi, sấy khô, nghiền bột nửa mịn, bảo quản trong túi kín có hút ẩm, tránh ánh sáng ở nơi khô ráo, thoáng mát (nhiệt độ 25°C và hàm ẩm dưới 65%).

- Dòng tế bào RAW 264.7 do GS. TS. Domenico Delfino, Đại học Perugia, Italia cung cấp.

- Hóa chất: ethanol, ether dầu hỏa, chloroform, toluen, aceton, acid formic, amoinac, thuốc thử Dragendorff, thuốc thử Mayer, thuốc thử Bouchardat, thuốc thử Griess, môi trường nuôi cấy tế bào DMEM, lipopolysaccharid từ *Escherichia-coli* (LPS), N^G-Methyl-L-arginine acetat (L-NMMA), NaNO₂, dimethyl sulphoxid, 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid.

- Thiết bị: hệ thống sắc ký lớp mỏng hiệu năng cao Camag, máy cô quay chân không BUCHI, bản mỏng silica gel GF₂₅₄ của hãng Merck, máy siêu âm, bếp cách thủy, máy ly tâm lạnh Hermle Z323K, máy Elisa Plate Reader.

Thời gian và địa điểm nghiên cứu

- Thời gian nghiên cứu: Từ tháng 10/2022 đến tháng 7/2023

- Địa điểm nghiên cứu: Học viện Y-Dược học cổ truyền Việt Nam, Viện Công nghệ sinh học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Phương pháp nghiên cứu

Định lượng alkaloid toàn phần:

- Nhóm nghiên cứu tiến hành chiết xuất và định lượng alkaloid toàn phần bằng phương pháp cân theo tài liệu [2],[3].

- Tiến hành: Cân khoảng 10g bột dược liệu chiết siêu âm với EtOH 70% + HCl 2% (tỷ lệ 100:3) ở nhiệt độ 55°C trong 1h×4 lần, tỷ lệ dược liệu/dung môi là 1/20. Lọc, gộp các dịch chiết và cất thu hồi dung môi dưới áp suất giảm. Phân tán cao toàn phần với 60ml nước nóng, lọc rồi lắc với 20ml ether dầu hỏa, lấy lớp dưới. Kiểm hóa dịch nước acid bằng NH₄OH đặc đến pH 9-10. Lắc với 60ml chloroform (3 lần×20ml). Gộp các dịch chiết, lọc qua giấy lọc có Na₂SO₄ và cất thu hồi dung môi dưới áp suất giảm. Sấy ở nhiệt độ



80°C đến khối lượng không đổi. Định tính lại bằng thuốc thử chung của alcaloid (Dragendoff, Mayer, Bouchardat) và sắc lý lớp mỏng hiệu năng cao (HPTLC).

Tác dụng chống viêm in vitro:

Nguyên tắc: Lipopolysaccharid (LPS) là nội độc tố của vi khuẩn được tìm thấy trong màng ngoài của vi khuẩn Gram âm, đóng vai trò là tác nhân gây viêm. Các tế bào RAW 264.7 được tiến hành kích thích phản ứng viêm bằng LPS sẽ khiến đại thực bào RAW 264.7 giải phóng ra nhiều chất trung gian hóa học, trong đó có NO. Lượng NO giải phóng vào môi trường được định lượng bằng thuốc thử Griess [1], [5].

Chuẩn bị mẫu:

- Cao tổng (CT): 30g bột dược liệu chiết siêu âm với dung môi EtOH 70% ở nhiệt độ 55°C trong 1h x 4 lần với tỷ lệ dược liệu/ dung môi là 1/20. Lọc lấy dịch chiết, gộp các dịch chiết và cất thu hồi dung môi dưới áp suất giảm. Sấy cao ở 80°C đến khối lượng không đổi thu được 1,61949g cao CT.

- Cao alcaloid toàn phần (CP): 30g bột dược liệu chiết xuất tương tự quy trình định lượng alcaloid thu được 0,55586g cao CP.

Tiến hành:

- Dòng tế bào RAW264.7 được nuôi cấy trong môi trường DMEM đưa vào đĩa 96 giếng với nồng độ 2x10⁵ TB/giếng và nuôi trong tủ ấm ở 37°C và 5% CO₂ trong 24 giờ. Tiếp theo, môi trường nuôi cấy được loại bỏ, thay bằng môi trường DMEM không có FBS trong 3 giờ. Tế bào được ủ mẫu nghiên cứu ở nồng độ 100; 20; 4; 2; 1; 0,8; 0,5 µg/ml trong 2 giờ, một số giếng không được ủ mẫu

$$CS\% \text{ tế bào sống} = \frac{OD(\text{mẫu thử}) - OD(\text{trắng})}{OD(\text{DMSO}) - OD(\text{trắng})}$$

mà chỉ sử dụng dung dịch pha mẫu được coi là đối chứng âm và đối chứng dương được sử dụng là L-NMMA ở các nồng độ 100, 20, 4 và 0,8 µg/ml. Sau 2h, kích thích sản sinh NO bằng LPS (10 µg/ml) trong 24h. Định lượng nồng độ NO giải phóng ra bằng cách thêm vào môi trường ủ mẫu thuốc thử Griess, ủ ở nhiệt độ phòng trong 10 phút sau đó đo quang ở bước sóng 540 nm. Hàm lượng nitrite của từng mẫu thí nghiệm được xác định nhờ vào đường cong hàm lượng chuẩn NaNO₂ và được so sánh % với mẫu chứng âm (LPS).

- Tế bào còn lại sau thử nghiệm NO được ủ với 10 µl MTT trong 24h. Sau đó 24h loại môi trường, tinh thể formazan được hòa tan bằng 50 µL DMSO và giá trị OD đo ở bước sóng 540 nm bằng máy quang phổ.

Phương pháp đánh giá kết quả:

Định lượng alcaloid toàn phần:

- Hàm lượng alcaloid toàn phần trong mẫu nghiên cứu được tính theo công thức:

$$H\% = \frac{\sum m_{LP}}{m(100-a)^*} \times 10^4$$

Trong đó:

H là hàm lượng alcaloid toàn phần có trong dược liệu (%)

LP cao phân đoạn giàu alcaloid (g).

m là khối lượng dược liệu (g).

a là độ ẩm dược liệu (%).

Đánh giá khả năng ức chế NO:

- Tác dụng của mẫu thử có ý nghĩa khi tế bào vẫn sống sót (lớn hơn 80%) nhưng lượng NO sinh ra giảm. Lượng tế bào sống sót sẽ được tính theo công thức:

Trong đó:

CS phần trăm sống sót của tế bào.

OD là độ hấp thụ ánh sáng.

- Khả năng ức chế sản sinh NO của mẫu được xác định nhờ công thức:

$$\% \text{ ức chế} = 100\% - \frac{\text{hàm lượng NO (mẫu thử)}}{\text{hàm lượng NO (LPS)}} \times 100$$

Phương pháp xử lý và phân tích số liệu

- Xác định hàm lượng alcaloid toàn phần được thực hiện 3 mẫu trong ngày và lặp lại trong 3 ngày. Kết quả được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel 2019.

- Đánh giá tác dụng ức chế được lặp lại 3 lần để đảm bảo tính chính xác. Giá trị IC₅₀ (nồng độ ức chế 50% sự hình thành NO) sẽ được xác định nhờ vào phần mềm máy tính TableCurve 2Dv4.



Đạo đức trong nghiên cứu

Nghiên cứu invitro đảm bảo yếu tố đạo đức trong nghiên cứu.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Định lượng alkaloid toàn phần

Định tính bằng phản ứng hóa học:

Cao chiết cho phản ứng dương tính mạnh với các thuốc thử chung của alkaloid (Dragendoff, Mayer, Bouchardat).

Định tính bằng sắc ký lớp mỏng:

Sau khi phun thuốc thử Dragendoff lên bản mỏng, có sự xuất hiện của các vết màu đỏ cam trên nền vàng.

Từ kết quả định tính kết luận sự có mặt của alkaloid trong cao alkaloid toàn phần bằng sắc ký lớp mỏng và thuốc thử hóa học đặc trưng; hình ảnh định tính bằng phản ứng hóa học và sắc kí đồ được thể hiện ở hình 1 và 2.

Định lượng alkaloid bằng phương pháp cân:

Tiến hành định lượng alkaloid toàn phần mẫu nghiên cứu theo quy trình định lượng trên.

Bảng 1. Kết quả hàm lượng alkaloid toàn phần

STT	Khối lượng dược liệu (g)	Khối lượng cao toàn phần (g)	Hàm lượng alkaloid toàn phần (%)
1	10,00127	0,09203	1,03
2	10,00099	0,09485	1,06
3	10,00031	0,09442	1,06
4	10,00028	0,08914	1,00
5	10,00065	0,09383	1,05
6	10,00083	0,09159	1,03
Trung bình			1,04 ± 2,32

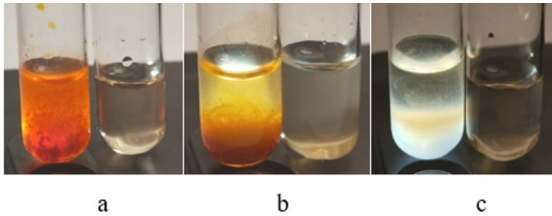
Đánh giá tác dụng chống viêm in vitro

Nhóm nghiên cứu tiến hành đánh giá khả năng ức chế sản sinh NO trên dòng tế bào RAW 264.7 của cao CT và cao CP, thu được giá trị IC50 ở CT là 2,70 ± 0,23µg/mL và cao CP là 1,27 ± 0,09µg/ml. Kết quả cho thấy cả 2 mẫu đã thể hiện hoạt tính ức chế NO khá mạnh, mạnh hơn đối chứng dương L-NMMA với giá trị IC50 7,14 ± 0,81 µg/mL.

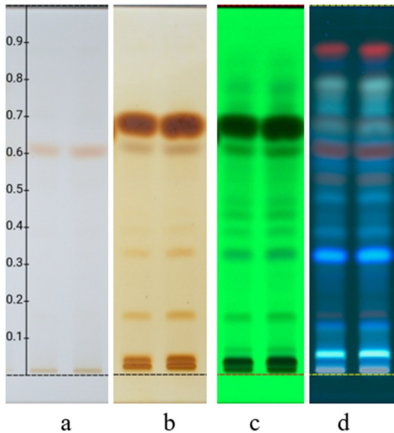
Bên cạnh đó, các mẫu nghiên cứu đã thể hiện tác dụng gây độc tế bào RAW 264.7 theo phương pháp MTT. Ở nồng độ 100 µg/mL, % tế bào sống ở cao CT là 44 ± 0,14% và cao CP là 14 ± 0,05%.

BÀN LUẬN

Qua tham khảo tài liệu, nhóm nghiên cứu đã tiến hành xây dựng phương pháp chiết xuất alkaloid toàn phần trong Thạch cân thảo bằng cồn acid. Trong môi trường acid, các alkaloid trong dược liệu sẽ chuyển sang dạng muối và tan trong dung môi chiết xuất. Cất thu hồi dung môi dưới áp suất giảm, dùng ether dầu hỏa rửa dịch chiết đậm đặc còn lại. Trong môi trường acid, ether dầu hỏa thường hòa tan một số tạp chất chứ không hòa tan các alkaloid. Sau khi tách lớp ether dầu hỏa, kiểm hóa dung dịch nước rồi chiết lấy alkaloid base được giải phóng ra bằng chloroform. Cất thu hồi dung môi hữu cơ rồi bốc hơi tới khô sẽ thu được cao alkaloid. Đây là phương pháp đơn giản, nhanh chóng, dễ thực



Hình 1. Kết quả định tính bằng phản ứng hóa học (a- Dragendoff, b-Mayer, c-Bouchardat)



Hình 2. Sắc ký đồ SKLM cao chiết alkaloid toàn phần (a- ánh sáng thường, b- ánh sáng thường sau khi phun thuốc thử Dragendoff, c- bước sóng 254nm, d- bước sóng 366nm)



hiện trong phòng thí nghiệm. Hơn nữa, dung môi EtOH giá thành tương đối rẻ, dễ kiếm, lại là “dung môi xanh” cho chiết xuất, thân thiện với môi trường. Vì vậy, nhóm nghiên cứu đã lựa chọn EtOH 70% + HCl 2% là dung môi để chiết xuất.

Nhóm nghiên cứu lựa chọn định lượng alkaloid toàn phần trong dược liệu bằng phương pháp cân. Đây là phương pháp đơn giản, dễ thực hiện trong điều kiện phòng thí nghiệm, không đòi hỏi trang thiết bị đặc biệt và áp dụng cho hỗn hợp nhiều alkaloid và alkaloid chưa xác định rõ cấu trúc hóa học. Tuy nhiên khi thực hiện bằng phương pháp này phải chiết được alkaloid tinh khiết (đã loại được những tạp chất kèm theo) bằng dung môi thích hợp, do vậy phương pháp này kém chính xác, thường có sai số thừa vì các tạp chất còn lẫn với cặn alkaloid. Kết quả định lượng cho thấy hàm lượng alkaloid là $1,04 \pm 2,32\%$. Như vậy có thể sơ bộ kết luận hàm lượng alkaloid trong cây tương đối cao [3]. Sau khi xây dựng quy trình định lượng, phương pháp đã được thẩm định theo quy trình độ chính xác đạt theo yêu cầu AOAC [6] với $RSD \leq 2,7\%$.

Xuất phát từ kinh nghiệm dân gian, Thạch cân thảo được để giảm sưng, đau trong điều trị các bệnh gân cốt buốt đau, sưng đau do chấn thương, mụn nhọt. Do vậy, đề tài đã đặt vấn đề sàng lọc tác dụng chống viêm *in vitro* qua mô hình ức chế giải phóng NO trên dòng tế bào RAW 264.7. Phương pháp thử nghiệm tác dụng chống viêm *in vitro* mà đề tài sử dụng có ưu điểm là độ nhạy cao, đặc hiệu, thuận tiện và hiệu quả trong việc sàng lọc các hợp chất có hoạt tính kháng viêm. Đây cũng là phương pháp được sử dụng phổ biến trên thế giới trong nghiên cứu sàng lọc hợp chất kháng viêm [7],[8].

Kết quả thử nghiệm chống viêm *in vitro* của cao CT và cao CP đã thể hiện khả năng ức chế mạnh sản sinh NO khá mạnh trên tế bào RAW 264.7 (kích thích bằng LPS). Trong đó, CP cho thấy tác dụng ức chế sản sinh NO tốt hơn. Điều đó có thể do các thành phần có hoạt tính ức chế NO chủ yếu có mặt trong cao giàu alkaloid. Do đó, để tìm kiếm các hoạt chất có tiềm năng chống viêm có thể lựa chọn cao giàu alkaloid để tiến hành nghiên cứu chiết xuất và phân lập.

Kết quả này đã chứng minh cho tác dụng chống viêm trên lâm sàng của đồng bào dân tộc tỉnh Cao Bằng. Bên cạnh đó, kết quả thử nghiệm cũng cho thấy cao CT

và cao CP có tác dụng gây độc cho tế bào RAW 264.7, từ đây có thể định hướng nghiên cứu tác dụng gây độc cho tế bào ở phân đoạn chiết xuất từ loài này.

KẾT LUẬN

Đề tài đã triển khai và thu được các kết quả chính là:

- Đã xác định được hàm lượng alkaloid toàn phần trong mẫu Thạch cân thảo (*Pilea boniana* Gagnep.) thu hái tại Cao Bằng là $1,04 \pm 2,32\%$.

- Hoạt tính ức chế sản sinh NO trên tế bào RAW 264.7 của mẫu nghiên cứu khá mạnh, đặc biệt là ở cao CP với IC_{50} là $1,27 \pm 0,09 \mu\text{g/mL}$.

Đây cũng là lần đầu tiên thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của loài *Pilea boniana* Gagnep. được công bố.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Đỗ Trung Đàm.** *Thuốc giảm đau chống viêm và chống viêm và các phương pháp nghiên cứu tác dụng dược lý*, 2018, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
- Nguyễn Khắc Khôi và Dương Thị Hoàn.** *Đặc điểm và phân bố của các loài cây thuốc họ gai (Urticaceae) ở Việt Nam*, Hội nghị khoa học toàn quốc về sinh thái và tài nguyên sinh vật lần thứ 2, 2007.
- Phạm Thanh Kỳ.** *Dược liệu học*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, 2007, tập 2.
- Bộ Y tế.** *Dược điển Việt Nam 5*, Hà Nội, 2018, tập 2.
- Cheenpracha S., Park E.-J., Rostama B.** et al. Inhibition of Nitric Oxide (NO) Production in Lipopolysaccharide (LPS)-Activated Murine Macrophage RAW 264.7 Cells by the Norsessterterpene Peroxide, Epimuquibilin A. *Marine Drugs*, 2010, 8(3), pp.429–437.
- AOAC International.** *AOAC official methods of analysis*, Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements., 2016.
- Facchin B.M., Dos Reis G.O., Vieira G.N. et al.** Inflammatory biomarkers on an LPS-induced RAW 264.7 cell model: a systematic review and meta-analysis. *Inflammation Research*, 2022, 71(7–8), pp.741–758.
- Merly L. và Smith S.L.** Murine RAW 264.7 cell line as an immune target: are we missing something? *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 2017, 39(2), pp.55–58.