

# Khảo sát khả năng kháng oxy hóa và kháng tế bào ung thư gan HepG2 của cây Trang To (*Ixora duffii*)

- Phan Kim Định
- Đái Thị Xuân Trang  
Trường Đại học Cần Thơ  
Email: dtxtrang@ctu.edu.vn

(Bài nhận ngày 03 tháng 05 năm 2017, nhận đăng ngày 03 tháng 11 năm 2017)

## TÓM TẮT

Ở Việt Nam, cây Trang To (*Ixora duffii*) phân bố phổ biến. Trong y học dân gian, hoa cây Trang To được sử dụng điều trị rất nhiều bệnh, nhưng chưa có nhiều nghiên cứu để chứng minh cơ sở khoa học rõ ràng. Mục tiêu của nghiên cứu này khảo sát khả năng kháng oxy hóa *in vitro*, và kháng tế bào ung thư gan HepG2 cũng như xác định sơ bộ thành phần hóa học có khả năng kháng oxy hóa từ cây Trang To. Hiệu quả kháng oxy hóa của cao methanol hoa và lá cây Trang To được xác định dựa trên khả năng trung hòa gốc tự do DPPH. Kết quả cho thấy hoa và lá cây Trang To có khả năng trung hòa gốc tự do DPPH tương ứng với hiệu suất  $81,41 \pm 1,21$  % và  $80,46 \pm 0,80$  % ở nồng độ cao methanol là 100  $\mu\text{g/mL}$ . Hoa và lá cây Trang To có khả năng trung hòa gốc tự do DPPH đều thấp hơn vitamin C, lần lượt là 1,28 và

1,22 lần. Khả năng kháng oxy hóa dựa trên khả năng khử gốc tự do  $\text{Fe}^{3+}$  (khử sắt) cho thấy hoa có hiệu quả cao hơn lá. Tuy khả năng khử sắt của hoa cao hơn lá, nhưng cả hai đều thấp hơn chất chuẩn BHA lần lượt là 4,78 và 6,76 lần. Cao methanol hoa cây Trang To có khả năng ức chế tế bào ung thư gan HepG2 tương đương 56 % ở nồng độ cao là 500  $\mu\text{g/mL}$ . Thành phần hóa học trong hoa và lá Trang To gồm alkaloid, flavonoid, anthraquinone, terpenoid, quinone, glycoside, coumarin và phenol. Riêng hợp chất tanin và saponin chỉ có ở hoa mà không phát hiện ở lá. Hàm lượng polyphenol tổng (TPC) ở hoa cây Trang To ( $762,37 \pm 62,58$  mg GAE/g) cao hơn ở lá ( $360,85 \pm 10,09$  mg GAE/g) là 2,1 lần. Hàm lượng flavonoid toàn phần (TFC) của hoa Trang To ( $679,55 \pm 35,69$  mg QE/g) và lá ( $676,35 \pm 14,52$  mg QE/g) tương đương nhau.

**Từ khóa:** DPPH, flavonoid, *Ixora duffii*, kháng oxy hóa, khử sắt, polyphenol

## MỞ ĐẦU

Stress oxy hóa là sự mất cân bằng giữa việc tạo ra quá nhiều gốc oxy hóa tự do (Reactive oxygen species, ROS) và hệ thống kháng oxy hóa của cơ thể. Nhiều bệnh hiểm nghèo như xơ vữa động mạch, thoái hóa thần kinh, viêm khớp, bệnh ung thư và nhiều bệnh khác đã được chứng minh có liên quan đến stress oxy hóa [1–5]. Trong việc điều trị các bệnh này, liệu pháp bổ sung chất kháng oxy hóa đã gặt hái được nhiều thành công [6]. Các hợp chất flavonoid và polyphenol ở nhiều loài

thực vật đã được chứng minh có khả năng kháng oxy hóa [7].

Họ Cà phê (Rubiaceae) là họ thực vật lớn với khoảng 611 chi và 13.150 loài. Các loài thực vật thuộc họ Cà Phê đã được nghiên cứu nhiều về thành phần hóa học và có khả năng tạo ra các sản phẩm chuyển hóa có hoạt tính sinh học với tiềm năng dược học quan trọng [8, 9]. Nhiều công trình nghiên cứu trên thế giới liên quan đến chi *Ixora*, đặc biệt là cây Trang Sơn (*Ixora coccinea* L.) đã

được chứng minh những hoạt động dược lý quan trọng. Hợp chất bảo vệ gan (Hepatoprotector) trong cây Trang Sơn đã được xác định [10]. Bên cạnh đó, cây Trang Sơn còn có khả năng kéo dài đáng kể tuổi thọ và duy trì nồng độ urine máu của chuột được điều trị bằng chất chống ung thư cisplatin [11]. Không những thế, cây Trang Sơn còn có tác dụng tốt trên một số mô hình thử nghiệm *in vitro* hướng tới tác dụng trên tế bào ung thư [12]. Riêng loài Trang To (*Ixora duffii*) cũng thuộc chi *Ixora* nhưng vẫn chưa có nghiên cứu cụ thể nào về thành phần hóa học, khả năng kháng oxy hóa và gây độc tế bào ung thư của loài cây này. Vì vậy, mục tiêu nghiên cứu của đề tài này là khảo sát thành phần hóa học và khả năng kháng oxy hóa của cây Trang To (*Ixora duffii*) thuộc họ Cà phê (Rubiaceae) để bổ sung cơ sở khoa học về nguồn dược liệu có triển vọng tạo ra các sản phẩm phòng ngừa và điều trị một số bệnh mãn tính ở người.

## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Vật liệu

Lá và hoa của cây Trang To (*Ixora duffii*) thu hái ở huyện Bình Tân và huyện Vũng Liêm, Vĩnh Long.

### Điều chế cao methanol lá và hoa cây Trang To

Mẫu lá và hoa Trang To sau khi thu về được rửa sạch và sấy khô ở nhiệt độ từ 40–45 °C. Mẫu sau khi khô được xay nhuyễn thành mẫu bột nguyên liệu. Bột nguyên liệu được cho vào trong túi vải và ngâm dầm trong methanol. Mẫu được ngâm nhiều lần, mỗi lần ngâm khoảng 24 giờ, dịch chiết từ các lần ngâm được gom lại, cô quay đuổi dung môi. Tiếp tục chiết nhiều lần cho đến khi chiết kiệt các chất trong mẫu ngâm thu được cao methanol tổng của lá và hoa cây Trang To.

### Khảo sát hoạt động kháng oxy hóa của cao methanol lá và hoa cây Trang To *in vitro*

*Khảo sát hiệu quả trung hòa gốc tự do DPPH*

Khả năng kháng oxy hóa của các cao methanol lá và hoa cây Trang To được xác định nhờ phương pháp trung hòa gốc tự do DPPH [13] có hiệu chỉnh được tóm tắt như sau: Hỗn hợp phản ứng gồm 200  $\mu$ L DPPH ( $6 \times 10^{-4}$ M) và 200  $\mu$ L dung dịch mẫu thử là cao methanol lá và hoa Trang To ở các nồng độ: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 và 100  $\mu$ g/mL. Hỗn hợp phản ứng được ủ trong tối ở nhiệt độ phòng trong thời gian 60 phút. Sau đó, độ hấp thụ quang phổ của DPPH được đo ở bước sóng 517 nm. Khả năng kháng oxy hóa được xác định dựa vào giá trị  $EC_{50}$  (Effective concentration of 50 %). Giá trị  $EC_{50}$  được tính dựa trên phương trình tuyến tính của từng loại cao khảo sát. Chất đối chứng dương được sử dụng là vitamin C ở các nồng độ khảo sát 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36 và 40  $\mu$ g/mL.

### *Khảo sát hiệu quả kháng oxy hóa của cây Trang To dựa trên hoạt động khử sắt*

Hoạt tính kháng oxy hóa của cao methanol lá và hoa cây Trang To được xác định dựa trên khả năng khử  $Fe^{3+}$  trong phức  $Fe(CN_6)^{3-}$  thành  $Fe^{2+}$  trong phức  $Fe(CN_6)^{4-}$  khi có mặt của chất kháng oxy hóa, sau đó phức  $Fe(CN_6)^{4-}$  tiếp tục phản ứng với  $Fe^{3+}$  trong  $FeCl_3$  để tạo thành phức  $Fe[Fe(CN_6)]$  có màu xanh được đo ở bước sóng 700 nm. Khả năng khử sắt của cao chiết và BHA được thực hiện theo phương pháp của Oyaizu [14]: Hỗn hợp phản ứng lần lượt gồm 0,5 mL cao methanol lá hoặc hoa cây Trang To ở các nồng độ khảo sát (100, 200, 300, 400, 500, 600 và 700  $\mu$ g/mL), 0,5 mL đệm phosphate 0,2 M pH 6,6 và 0,5 mL  $K_3Fe(CN)_6$  1 %. Sau khi hỗn hợp phản ứng được ủ ở 50 °C trong 20 phút, thêm 0,5 mL  $CCl_3COOH$  10 % rồi ly tâm 3000 vòng/ phút trong 10 phút. Phần dịch sau khi ly tâm được rút 0,5 mL cho vào 0,5 mL nước và 0,1 mL  $FeCl_3$  0,1 %, lắc đều. Độ hấp thụ quang phổ của hỗn hợp phản ứng được đo ở bước sóng 700 nm. Butylated hydroxyanisole (BHA) được sử dụng như chất đối chứng dương và được khảo sát ở các nồng độ 10, 20, 40, 60, 80 và 100  $\mu$ g/mL.

### **Khảo sát khả năng kháng tế bào ung thư gan HepG2 của cao methanol hoa Trang To**

Tế bào HepG2 được nuôi trong môi trường DMEM (Dulbecco's Modification of Eagle's Medium) khoảng từ 3 đến 4 ngày. Gieo (seed) tế bào vào đĩa 96 giếng với nồng độ  $2 \times 10^4$  tế bào/mL (mỗi giếng chứa 100  $\mu$ L dung dịch môi trường và có tế bào) ủ 24 giờ trong điều kiện 37 °C và 5 % CO<sub>2</sub>. Sau đó, loại bỏ môi trường nuôi cấy, tế bào được rửa bằng PBS. Tế bào sau khi đã rửa với PBS được thêm vào 100  $\mu$ L môi trường mới có chứa cao methanol hoa Trang To ở các nồng độ khảo sát (100, 250 và 500  $\mu$ g/mL). Trong thí nghiệm này, DMSO 0,25 % và silymarin với nồng độ là 500  $\mu$ g/mL được sử dụng như là nghiệm thức đối chứng. Mẫu được ủ tiếp trong 24 giờ. Môi trường nuôi cấy được loại bỏ và được thêm vào 110  $\mu$ L môi trường DMEM có WST-8 với tỷ lệ là 10:1. Ủ trong khoảng 2 giờ với điều kiện 37 °C và 5 % CO<sub>2</sub>. Số tế bào sống sẽ được xác định bằng cách đo mật độ quang ở bước sóng 450 nm [15, 16].

### **Định tính thành phần hóa học của lá và hoa cây Trang To**

Thành phần hóa học của cao methanol lá và hoa cây Trang To gồm: alkaloid, flavonoid, anthraquinone, terpenoid, quinone, glycoside, coumarin, phenol, tanin, triterpenoid, saponin được định tính sơ bộ bằng các phương pháp định tính các nhóm hợp chất tự nhiên [17].

### **Định lượng polyphenol tổng và flavonoid toàn phần trong cao chiết**

*Định lượng polyphenol toàn phần bằng thuốc thử Folin-Ciocalteu*

Hàm lượng polyphenol được xác định theo phương pháp của Singleton [18] có hiệu chỉnh. Hỗn hợp phản ứng gồm 250  $\mu$ L cao methanol trong 250  $\mu$ L nước và 250  $\mu$ L thuốc thử Folin-Ciocalteu, lắc đều. Sau đó, thêm vào 250  $\mu$ L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 10 % rồi ủ 30 phút ở 40 °C trong bể điều nhiệt. Độ hấp thụ quang phổ của hỗn hợp phản ứng

được đo ở bước sóng 765 nm. Gallic acid được sử dụng như chất đối chứng dương để xây dựng phương trình đường chuẩn. Hàm lượng polyphenol trong cao methanol lá và hoa cây Trang To được xác định dựa trên phương trình đường chuẩn gallic acid.

### *Phương pháp định lượng flavonoid*

Hàm lượng flavonoid toàn phần được xác định bằng phương pháp so màu AlCl<sub>3</sub> của Bag [19] có hiệu chỉnh. Hỗn hợp phản ứng gồm 1 mL cao chiết ở nồng độ khảo sát pha trong 1 mL nước rồi lắc đều. Sau đó, hỗn hợp phản ứng được thêm vào 200  $\mu$ L NaNO<sub>2</sub> 5 % để yên 5 phút tiếp tục thêm 200  $\mu$ L AlCl<sub>3</sub> 10 %, lắc đều. Hỗn hợp phản ứng sau khi ủ 6 phút được thêm 2 mL NaOH 1M. Cuối cùng hỗn hợp phản ứng được thêm nước cho đủ 5 mL. Hỗn hợp phản ứng được đo độ hấp thụ quang phổ ở bước sóng 510 nm. Quercetin được sử dụng như chất đối chứng dương. Hàm lượng flavonoid toàn phần trong các cao methanol lá và hoa cây Trang To được xác định dựa vào phương trình đường chuẩn quercetin.

### **Thống kê phân tích số liệu**

Số liệu được phân tích thống kê số liệu theo chương trình Minitab 16.0.

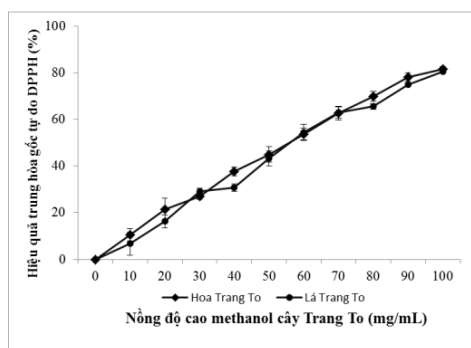
### **KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

#### **Hiệu quả kháng oxy hóa của cây Trang To *in vitro***

*Hiệu quả trung hòa gốc tự do DPPH của cây Trang To*

Hiệu quả kháng oxy hóa của cao methanol cây Trang To được xác định dựa vào hiệu suất trung hòa gốc tự do DPPH. Hiệu suất trung hòa gốc tự do DPPH được tính dựa trên tỷ lệ giảm độ hấp thụ quang phổ của DPPH khi có và không có cao methanol cây Trang To (Hình 1). Khả năng trung hòa gốc tự do DPPH của cây Trang To còn được xác định dựa vào giá trị EC<sub>50</sub> (Effective concentration of 50 %, khả năng trung hòa 50 %

gốc tự do) và so sánh với chất chuẩn vitamin C (Bảng 1).



**Hình 1.** Hiệu quả trung hòa gốc tự do DPPH của cao methanol hoa và lá cây Trang To

Kết quả trình bày ở Hình 1 cho thấy, khả năng trung hòa gốc tự do DPPH tỷ lệ thuận với nồng độ

cao hoa và lá cây Trang To, nồng độ của cao methanol càng cao thì khả năng trung hòa gốc tự do càng lớn và ngược lại. Một cách tổng thể, hiệu quả trung hòa gốc tự do DPPH của cao methanol hoa cây Trang To cao hơn lá cây Trang To ở nhiều nồng độ khảo sát. Hiệu suất trung hòa gốc tự do DPPH của cao methanol hoa và lá cây Trang To ở nồng độ 100 µg/mL đạt hiệu suất tương ứng là  $81,41 \pm 1,21\%$  và  $80,46 \pm 0,80\%$ .

Khả năng kháng oxy hóa cũng như hiệu quả trung hòa gốc tự do của vitamin C, cao methanol chiết từ lá và hoa cây Trang To được so sánh dựa vào giá trị  $EC_{50}$ . Giá trị  $EC_{50}$  của các loại cao được tính dựa vào phương trình hồi quy tuyến tính của từng cao và trình bày trong Bảng 1.

**Bảng 1.** Giá trị  $EC_{50}$  (µg/mL) của vitamin C và cao chiết cây Trang To

Cao chiết	Phương trình hồi quy	Giá trị $EC_{50}$ (µg/mL)
Vitamin C	$y = 0,9846x + 4,1977$ (R = 98,14%)	$46,52 \pm 0,68^c$
Hoa Trang To	$y = 0,8267x + 2,9955$ (R = 99,46%)	$56,88 \pm 1,56^b$
Lá Trang To	$y = 0,8319x + 0,5744$ (R = 99,01%)	$59,41 \pm 1,56^a$

Ghi chú: Các giá trị có mẫu tự theo sau trong cùng một cột giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 5%.

Hiệu quả kháng oxy hóa của hoa ( $EC_{50} = 56,88$  µg/mL) và lá ( $EC_{50} = 59,41$  µg/mL) Trang To thấp hơn vitamin C ( $EC_{50} = 46,52$  µg/mL) lần lượt là 1,22 và 1,28 lần. Một số kết quả nghiên cứu khác cho thấy cao chiết methanol hoa cây Trang Son (*Ixora coccinea* L.) có hiệu quả trung hòa gốc tự do  $EC_{50}$  ở nồng độ 100,53 µg/mL [20]. Một nghiên cứu khác trên lá và thân cây Trang Son cho thấy hiệu quả làm sạch gốc tự do  $EC_{50}$  của cao methanol từ lá là 109,95 µg/mL, thân là 272,42 µg/mL [21]. Từ đây cho thấy, khả năng kháng oxy hóa của hoa và lá cây Trang To mặc dù thấp hơn vitamin C nhưng so với các nghiên cứu khác là cao hơn.

*Hiệu quả kháng oxy hóa dựa trên khả năng khử sắt của cây Trang To*

Hiệu quả kháng oxy hóa của cây Trang To dựa trên khả năng khử sắt được tính tương đương

µg/mL BHA dựa vào phương trình đường chuẩn BHA:  $y = 0,011x + 0,144$  ( $R^2 = 99,3\%$ ). Kết quả được trình bày trong Bảng 2.

Kết quả trình bày ở Bảng 2 cho thấy, khả năng khử sắt tỷ lệ thuận với nồng độ cao chiết, hàm lượng chất kháng oxy hóa trong cao methanol hoa Trang To tăng từ  $26,37 \pm 0,86$  µg/mL đến  $101,94 \pm 2,70$  µg/mL tương ứng với nồng độ cao methanol hoa Trang To tăng từ 100 µg/mL đến 700 µg/mL. Hàm lượng chất kháng oxy hóa trong cao methanol lá Trang To tương đương µg/mL BHA tăng từ 15,81 µg/mL đến 100,05 µg/mL ở nồng độ từ 100 µg/mL đến 700 µg/mL. Cao methanol hoa Trang To có khả năng kháng oxy hóa có phần trội hơn cao methanol lá Trang To ở tất cả nồng độ khảo sát.

**Bảng 2.** Hàm lượng chất kháng oxy hóa có trong lá và hoa cây Trang To

Nồng độ cao chiết (µg/mL)	Hàm lượng chất kháng oxy hóa tương đương µg/mL BHA	
	Hoa Trang	Lá Trang
0	-	-
100	26,37±0,86 <sup>g</sup>	15,81±0,18 <sup>g</sup>
200	31,06±0,93 <sup>f</sup>	27,39±1,03 <sup>f</sup>
300	51,91±1,18 <sup>e</sup>	43,49±0,45 <sup>e</sup>
400	56,85±0,51 <sup>d</sup>	54,68±0,52 <sup>d</sup>
500	69,59±4,77 <sup>c</sup>	62,84±1,16 <sup>c</sup>
600	82,53±0,55 <sup>b</sup>	71,03±1,11 <sup>b</sup>
700	101,94±2,70 <sup>a</sup>	100,05±2,04 <sup>a</sup>

Ghi chú: Các giá trị có mẫu tự theo sau trong cùng một cột giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 5%. (-) là không xác định.

Hiệu quả kháng oxy hóa của cao methanol lá và hoa cây Trang To theo phương pháp khử sắt ở các nồng độ khác nhau được so sánh với chất chuẩn BHA bằng cách sử dụng nồng độ mà tại đó chất chuẩn hay cao chiết (µg/mL) có giá trị OD = 0,5 (OD<sub>0,5</sub>), và giá trị OD<sub>0,5</sub> này được xem như

EC<sub>50</sub> [22] được trình bày trong Bảng 3. Khả năng kháng oxy hóa của cao methanol hoa (EC<sub>50</sub>=154,8 µg/mL) cao hơn lá (EC<sub>50</sub>= 218,87 µg/mL) và thấp hơn khả năng kháng oxy hóa của BHA (EC<sub>50</sub>=30,19 µg/mL) lần lượt là 4,78 và 6,76 lần.

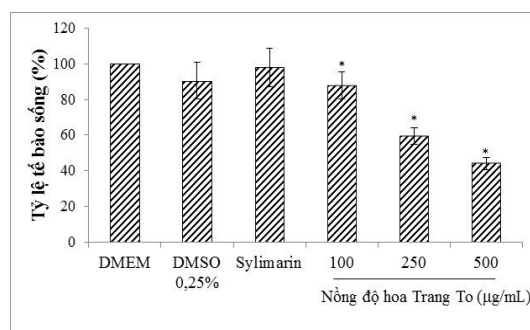
**Bảng 3.** Nồng độ đạt giá trị OD<sub>0,5</sub> (µg/mL) của BHA và cao methanol lá và hoa cây Trang To

Cao chiết	Phương trình hồi quy	Giá trị EC <sub>50</sub> (µg/mL)
BHA	$y = 0,0118x + 0,1448$ (R = 99,35%)	30,19±0,13 <sup>c</sup>
Hoa Trang To	$y = 0,0015x + 0,2678$ (R = 97,87%)	154,8±3,26 <sup>b</sup>
Lá Trang To	$y = 0,0015x + 0,1717$ (R = 96,79%)	218,87±1,46 <sup>a</sup>

Ghi chú: Các giá trị có mẫu tự theo sau trong cùng một cột giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 5%.

### Hiệu quả kháng tế bào ung thư gan HepG2 của cao methanol hoa Trang To

Sau khi khảo sát hoạt tính kháng oxy hóa *in vitro* của lá và hoa cây Trang To, kết quả cho thấy hiệu quả kháng oxy hóa của hoa cao hơn lá, nên chúng tôi chọn hoa để khảo sát khả năng kháng tế bào ung thư gan HepG2. Thí nghiệm khảo sát khả năng gây độc của các cao methanol hoa Trang To thực hiện trên dòng tế bào sống bằng phương pháp xác định mật số tế bào sống bằng phương pháp MTT sử dụng WST-8. Thí nghiệm được lặp lại 5 lần với nghiệm thức có tế bào và môi trường nuôi cấy DMEM là nghiệm thức đối chứng. Kết quả phần trăm tế bào sống được trình bày ở Hình 2.



**Hình 2.** Hiệu quả kháng tế bào ung thư gan HepG2 của cao methanol hoa cây Trang To

Ký hiệu (\*) khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5% so với nghiệm thức đối chứng DMEM;

DMSO 0,25% (DMEM + DMSO 0,25%), sylimarin thuốc bảo vệ gan được sử dụng như đối chứng dương.

Kết quả thí nghiệm trên cho thấy, tỷ lệ phần trăm tế bào sống ở nghiệm thức tế bào được nuôi cấy trong môi trường DMEM có DMSO 0,25% có sự khác biệt không có ý nghĩa so với nghiệm thức đối chứng môi trường bình thường DMEM. Kết quả này cho thấy DMSO ở nồng độ 0,25% không có độc tính đối với dòng tế bào HepG2 phù hợp với kết quả nghiên cứu của Ozerkan [23], nên có thể sử dụng dung môi DMSO để pha các cao chiết methanol.

Theo kết quả thí nghiệm, phần trăm tế bào sống ở các nồng độ cao methanol hoa cây Trang To giảm khác biệt có ý nghĩa thống kê ở các nồng độ cao methanol khảo sát. Tỷ lệ sống của dòng tế bào HepG2 giảm tỷ lệ thuận với nồng độ cao methanol hoa. Tỷ lệ sống sót giảm dần từ 87,8±7,48 % ở nồng độ cao hoa cây Trang To là 100 µg/mL xuống 59,56±4,69 % ở nồng độ cao 250 µg/mL và 44,02±3,52 % ở nồng độ cao 500 µg/mL. Từ kết quả thí nghiệm cho thấy hoa cây Trang To có độc tính đối với tế bào HepG2.

Dòng tế bào HepG2 là một dòng tế bào ung thư và được sử dụng trong các nghiên cứu về khả năng kháng oxy hóa và chống ung thư *in vitro* của các hợp chất phenol được phân lập từ cây Củ Cải Đường [24]. Tế bào HepG2 cũng được dùng trong nghiên cứu về chức năng của MicroRNA p53, trong nghiên cứu này HepG2 được xử lý với Doxorubicin [25]. Cao chiết methanol hoa cây Trang To có độc tính trên dòng tế bào HepG2 nên có tiềm năng kháng lại tế bào ung thư gan.

#### Thành phần hóa học cao chiết

Kết quả định tính sơ bộ thành phần hóa học có trong cao methanol được chiết từ lá và hoa của cây Trang To (*Ixora duffii*) cho thấy sự hiện diện của các thành phần có hoạt tính sinh học khác nhau như: flavonoid, phenol, alkaloid, tannin, saponin, triterpenoid, glycoside, coumarin, quinone,

terpenoid, anthraquinone được trình bày trong Bảng 4.

**Bảng 4.** Thành phần hóa học có trong cao chiết methanol hoa và lá cây Trang To (*Ixora duffii*)

Hợp chất	Hoa Trang	Lá Trang
Tanin	++	-
Saponin	++	-
Flavonoid	+++	+
Alkaloid	+++	++++
Triterpenoid	-	+++
Glycoside	++	+++
Phenol	+++	++
Coumarin	++	+
Quinone	+++	+
Terpenoid	++	+
Anthraquinone	+++	+

+ Có hiện diện; - không hiện diện

Kết quả Bảng 4 cho thấy, các thành phần hóa học gồm flavonoid, phenol, alkaloid, coumarin, quinone, terpenoid, anthraquinone hiện diện ở hoa trội hơn so với lá Trang To. Kết quả cũng cho thấy hợp chất tannin, saponin chỉ có trong hoa mà không phát hiện ở lá Trang To. Ngược lại, triterpenoid thì chỉ có ở lá Trang To. Các hợp chất phenol và flavonoid được chứng minh là có liên quan đến hoạt động kháng oxy hóa trong hệ thống sinh học [26]. Nhiều triterpenoid tự nhiên có hoạt tính kháng viêm tốt được phân lập từ nhiều loại cây khác nhau [27, 28]. Một số hợp chất được tìm thấy trong hoa cây Trang Sơn (*Ixora coccinea* L.) thuộc chi *Ixora* như phenol, phytosterol, terpenoid, carbohydrate, terpenoid, coumarin và steroid [29]. Ngược lại, các nhóm chất như flavonoid, quinone, protein và sterol không có ở cây Trang Sơn [20]. Như vậy, kết quả nghiên cứu của chúng tôi chứng minh rằng cao methanol được chiết từ lá và hoa cây Trang To (*Ixora duffii*) cũng chứa nhiều hợp chất sinh học đầy tiềm năng ứng dụng.

### Định lượng thành phần hóa học polyphenol tổng và flavonoid toàn phần trong cao chiết

Hàm lượng polyphenol tổng (TPC) với chất chuẩn là gallic acid trong dãy nồng độ từ 2 đến 10  $\mu\text{g/mL}$  có phương trình hồi quy tuyến tính  $y = 0,0831x + 0,1118$  ( $R^2 = 0,9838$ ). Hàm lượng

flavonoid toàn phần (TFC) từ chất chuẩn quercetin trong dãy nồng độ từ 20 đến 120  $\mu\text{g/mL}$  với phương trình hồi quy tuyến tính  $y = 0,0052x - 0,0087$  ( $R^2 = 98,9\%$ ). Trên cơ sở các đường chuẩn này, kết quả hàm lượng polyphenol tổng và flavonoid toàn phần được xác định và trình bày ở Bảng 5.

**Bảng 5.** Hàm lượng phenol tổng và flavonoid toàn phần của cao methanol lá và hoa cây Trang To

Phương pháp định lượng	Cao chiết	
	Hoa Trang	Lá Trang
TPC (mg GAE/g)	762,37 $\pm$ 62,58 <sup>a</sup>	360,85 $\pm$ 10,09 <sup>b</sup>
TFC (mg QE/g)	679,55 $\pm$ 35,69 <sup>a</sup>	676,35 $\pm$ 14,52 <sup>a</sup>

Ghi chú: Các giá trị có mẫu tự theo sau trong cùng một hàng giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 5%

Theo kết quả được trình bày trong Bảng 5, hàm lượng polyphenol tổng của cao methanol hoa Trang To (762,37 $\pm$ 62,58 mgGAE/g) cao hơn so với cao methanol lá Trang To (360,85 $\pm$ 10,09 mgGAE/g) gấp 2,11 lần và khác biệt có ý nghĩa với độ tin cậy 95%. Hàm lượng flavonoid toàn phần trong hoa Trang To (679,55 $\pm$ 35,69mg QE/g) tương đương ở lá Trang To (676,35 $\pm$ 14,52mg QE/g).

Theo kết quả nghiên cứu vào năm 2011, lá cây *Ixora parviflora* có thành phần polyphenol tổng định lượng được là 26,2  $\mu\text{gGAE/mg}$  và thành phần flavonoid toàn phần xác định được là 54,2  $\mu\text{gQE/mg}$  [30]. Nghiên cứu trên lá cây Trang Sơn (*Ixora coccinea* L.) nồng độ polyphenol tổng là 77,8  $\mu\text{gGAE/mg}$  [31]. Một nghiên cứu khác cho thấy cao methanol được chiết từ hoa, lá, và thân cây Trang Sơn có thành phần polyphenol tổng lần lượt là 210,55; 180,56 và 100,31  $\mu\text{gGAE/mg}$  [32]. Như vậy, các cao chiết trong nghiên cứu này cũng chứa lượng polyphenol tổng và flavonoid toàn phần cao hơn so với các thành phần này trong cây Trang Sơn đã nghiên cứu trước đó.

Từ các kết quả nghiên cứu trình bày trên cho thấy lá và hoa cây Trang To có khả năng kháng oxy hóa khá tốt, đặc biệt là hoa cây Trang To. Kết quả phân tích hai thành phần được chứng minh có khả năng kháng oxy hóa là polyphenol và

flavonoid ở lá và hoa cây Trang To đều rất cao so với các nghiên cứu trước về hai thành phần này. Điều này cho thấy, cây Trang To có nhiều triển vọng ứng dụng trong lĩnh vực dược liệu về hợp chất kháng oxy hóa ngoại sinh trong việc hỗ trợ điều trị các bệnh có nguyên nhân từ stress oxy hóa.

### KẾT LUẬN

Hiệu quả kháng oxy hóa của hoa cây Trang To ( $\text{EC}_{50}$ =56,86  $\mu\text{g/mL}$  và  $\text{EC}_{50}$ =154,80  $\mu\text{g/mL}$ ) cao hơn lá ( $\text{EC}_{50}$ =59,41  $\mu\text{g/mL}$  và  $\text{EC}_{50}$ =218,87  $\mu\text{g/mL}$ ). Hiệu quả kháng oxy hóa của hoa và lá cây Trang To đều thấp hơn chất chuẩn vitamin C (1,28 và 1,22 lần) và BHA (4,78 và 6,76 lần).

Hoa cây Trang To có khả năng kháng lại tế bào ung thư gan HepG2, khoảng 56 % tế bào bị loại bỏ ở nồng độ 500  $\mu\text{g/mL}$  cao methanol hoa Trang To.

Thành phần hóa học của lá và hoa cây Trang To được xác định gồm alkaloid, flavonoid, anthraquinone, terpenoid, quinone, glycoside, coumarin, phenol, tanin, triterpenoid và saponin.

Hàm lượng polyphenol tổng (TPC) ở hoa cây Trang To (762,37 $\pm$ 62,58 mg GAE/g) cao hơn ở lá (360,85 $\pm$ 10,09 mg GAE/g) là 2,1 lần. Hàm lượng flavonoid toàn phần (TFC) của hoa Trang To (679,55 $\pm$ 35,69 mg QE/g) và lá (676,35 $\pm$ 14,52 mg QE/g) tương đương nhau.

# Study on the antioxidant and anti-cancer activities in HEPG2 cells of *Ixora duffii*

- Phan Kim Dinh
- Dai Thi Xuan Trang  
Can Tho University

## ABSTRACT

*Ixora duffii* is an important traditional medicinal plant in Vietnam. In this study its antioxidant property was investigated by diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) radical and  $Fe^{3+}$  reducing assay and cytotoxic activity was evaluated against HepG2 cell line by MTT assay. The results showed that the methanolic extract of *Ixora duffii* flowers had DPPH radical scavenging activities similar to that of leaves extract. At the concentration of 100  $\mu\text{g/mL}$ , the extracts of flowers and leaves scavenged about 80% DPPH radical. The DPPH scavenging activity of *Ixora duffii* was lower than that of vitamin C approximately 2 times. The activity of  $Fe^{3+}$  reducing of flowers was higher than that of leaves, with  $EC_{50}$  values of 162.03 and 218.87  $\mu\text{g/mL}$ , respectively. Results were compared with the

**Keywords:** antioxidant, DPPH, flavonoid, ferric reducing, *Ixora duffii*, polyphenol

standard butylated hydroxyanisole (BHA) that was lower than 4.78 times in flowers and 6.76 times in leaves. The methanolic extract of *Ixora duffii* displayed significantly dose dependent in reducing the growth of HepG2, with 56% growth inhibitory concentration in a dose of 500  $\mu\text{g/mL}$ . The qualitative analysis of phytochemical compounds showed the presence of alkaloids, flavonoids, anthraquinones, terpenoids, quinones, glycoside, coumarins and phenols in the leaves and flower extracts of *Ixora duffii*. Compounds of tanins and saponins were only present in flowers of *Ixora duffii*. Total phenolic content were found in flowers (762.37 mg GAE/g) that was higher than the one in leaves (360.85 mg GAE/g). Flower and leaf extracts exhibited a similar total flavonoid content of 679.55 mg QE/g and 676.35 mg QE/g, respectively.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. S. Karbach, P. Wenzel, A. Waisman, T. Munzel, A. Daiber, eNOS uncoupling in cardiovascular diseases-the role of oxidative stress and inflammation, *Curr. Pharm. Des.*, 20, 3579–3594 (2014).
- [2]. T. Munzel, T. Gori, R.M. Bruno, S. Taddei, Is oxidative stress a therapeutic target in cardiovascular disease, *Eur. Heart J.*, 31, 2741–2748 (2010).
- [3]. K.K. Griendling, G.A. FitzGerald, Oxidative stress and cardiovascular injury: Part II: animal and human studies, *Circulation*, 108, 2034–2040 (2003).
- [4]. I.P. Nezis, H. Stenmark, p62 at the interface of autophagy, oxidative stress signaling, and cancer, *Antioxid.Redox Signal*, 17, 786–793 (2012).
- [5]. H. Ischiropoulos, J.S. Beckman, Oxidative stress and nitration in neurodegeneration: cause, effect, or association, *J. Clin. Investig.*, 111, 163–169 (2003).
- [6]. M.E. Buyukokuroglu, M. Oktay, O.I. Kufrevioglu, *In vitro* antioxidant properties of dantrolene sodium, *Pharmacol. Res.*, 44, 491–95 (2001).
- [7]. S. Srivastava, G.P. Choudhary, Pharmacognostic and pharmacological study of *Fumaria vaillantii* Loisel: A review. *J. Pharmacogn. Phytochem.*, 3, 194–197 (2014).



- [8]. A.A. Salim, Y.W. Chin, A.D. Kinghorn, Drug discovery from Plants. In Ramawat, K.G., Merrill, J.M. (Eds.). Bioactive molecules and medicinal Plants, Springer, Berlin, (2008).
- [9]. A. Elumalai, C. Eswaraiah, Y. Venkatesh, B. Shiva kumar, C. Narendar, Phytochemical and pharmacological profile of *Ixora coccinea* Linn, *Int. J. of Pharm. & Life Sci.* (IJPLS), 3, 3, 1563–1567 (2012).
- [10]. M.S. Baliga, P. J. Kurian, *Ixora*: Traditional uses, phytochemistry and pharmacology, 18, 1, 72–79 (2012).
- [11]. P.G. Latha, K.R. Panikkar, Chemoprotective effect of *Ixora coccinea* L. flowers on cisplatin induced toxicity in mice, 15, 4, 364–366 (2007).
- [12]. N.V. Thu, N.K.Q. Cừ, T. Hùng, Báo cáo nghiệm thu đề tài cấp bộ 1996 – 1998, Trường đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh (1998).
- [13]. A. Prakash, F. Rigelhof, E. Miller, Antioxidant activity. Analytical progress Medallion Laboratories, 1–4 (2000).
- [14]. M. Oyaizu, Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine, *Jap. J. Nutr.*, 44, 307–315 (1986).
- [15]. S.C. Jeong, S.M. Kim, Y.T. Joeng, C.H. Song, Hepatoprotective effect of water extract from *Chrysanthemum indicum* L. flower, *Chinese Medicine*, 8:7 (2013).
- [16]. N.K.A. Tukappa, R.L. Londonkar, H.B. Nayaka, C.B.S. Kumar. Cytotoxicity and hepatoprotective attributes of methanolic extract of *Rumex vesicarius* L, *Biological Research*, 48:19 (2015).
- [17]. Nguyễn Kim Phi Phụng, Phương pháp cô lập hợp chất hữu cơ, Nhà xuất bản Đại học Quốc gia Tp. Hồ Chí Minh. Tp. HCM (2007).
- [18]. V.L. Singleton, R. Orthofer, R.M. Lamuela–Raventos, Analysis of total phenol and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent, *Method Enzymol*, 299, 152–78 (1999).
- [19]. G.C. Bag, P.G. Devi, T. Bhaigyabati, Assessment of total flavonoid content and antioxidant activity of methanolic rhizome extract of three *Hedychium* species of Manipur valley, *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.*, 30, 1, 28, 154–159 (2015).
- [20]. M.R. Saha, A. Alam, R. Akter, R. Jahangir, *In vitro* free radical scavenging activity of *Ixora coccinea* L, *Bangladesh J Pharmacol*, 3, 90–96 (2008).
- [21]. A. Torey, S. Sasidharan, L.Y. Latha, S. Sudhakaran, S. Ramanathan, Antioxidant activity and total phenolic content of methanol extracts of *Ixora coccinea*, *Pharmaceutical Biology*, 48, 10, 1119–1123 (2010).
- [22]. M.R. Moein, S. Moein, S. Ahmadizadeh, Radical scavenging and reducing power of *Salvia mirzayani* subfractions, *Molecules*, 13, 2804–2813 (2008).
- [23]. D. Ozerkan, N. Ozsoy, E. Yılmaz, Vitamin D and melatonin protect the cell's viability and ameliorate the CCl<sub>4</sub> induced cytotoxicity in HepG2 and Hep3B hepatoma cell lines, *Cytoechnology*, 67, 995–1002 (2015).
- [24]. C. Mingshun, H. Meng, Y. Zhao, F. Chen, S. Yu, Antioxidant and *in vitro* anticancer activities of phenolics isolated from sugar beet molasses, *BMC Complementary and Medicine*, 15, 313 (2015).
- [25]. Y. Yang, W. Liu, R. Ding, L. Xiong, R. Dou, Y. Dang, Z. Gou, Comprehensive Expression profiling and functional network analysis of p53-Regulated microRNAs in HepG2 cells treated with doxorubicin, *Public Library of Science*, 1, 2, 149–227 (2016).
- [26]. H.C. Chang, G.J. Huang, D.C. Agrawal, C.L. Kuo, C.R. Wu, H.S. Tsay, Antioxidant activities and polyphenol contents of six folk

- medicinal ferns used as “Gusuibu”, *Botanical Studies*, 48, 397–406 (2007).
- [27]. M.A. Fernandez, B. Heras, M.D. Garcia, M.T. Saenz, A. Villar, New insights into the mechanism of action of the anti-inflammatory triterpene lupeol, *J Pharm Pharmacol.*, 53, 1533–1539 (2001).
- [28]. H. Ismaili, S. Sosa, D. Brkic, S. Fkih-Tetouani, A. Iidrissi, D. Touati, R.P. Aquino, A. Tubaro, Topical anti-inflammatory activity of extracts and compounds from *Thymus broussonettii*, *J Pharm. Pharmacol.*, 54, 1137–1140 (2002).
- [29]. A.R. Florence, J. Joselin, S. Sukumaran, S. Jeeva, Screening of phytochemical constituents from certain flower extracts. *International Journal of Pharmacy Review & Research*, 4, 3, 152–159 (2014).
- [30]. K.C. Wen, H.H. Chiu, P.C. Fan, C.W. Chen, S.M. Wu, J.H. Chang, H.M. Chiang, Antioxidant activity of *Ixora parviflora* in a cell/cell-free system and in UV-exposed human fibroblasts, *Molecules*, 16, 5735–5752 (2011).
- [31]. P. Shyam, P.K. Suresh, Comparative analysis of three leaf extracts of *Ixora coccinea* Linn. for their protective and anti-oxidant potentials and correlation with analytical data, *Int. J. Pharm. Bio. Sci.*, 4, 4, 937–949 (2013).
- [32]. F. Wahab, K. Subramaniam, S. Suriyamoorthy, S.P. Subburaj, Phytochemical analysis and antagonistic activity of *Ixora macrothyrsaon* multidrug resistant bacteria, *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 1312–1316 (2012).