

Xây dựng phương pháp định lượng conessin và đánh giá hoạt tính gây độc tế bào, kháng viêm *in vitro* của dược liệu Mộc hoa trắng (*Holarrhena pubescens* (Buch.-Ham.) Wall. ex G. Don)

Nguyễn Việt Khấn^{1*}, Nguyễn Thị Khánh Linh², Ngô Thị Bấy², Hoàng Châu Trọng Nhân³, Trần Hưng Hiếu⁴, Cao Thanh Hà⁵

(1) Khoa Dược, Trường Đại học Y - Dược, Đại học Huế

(2) Sinh viên Khoa Dược, Trường Đại học Y - Dược, Đại học Huế

(3) Khoa Dược, Bệnh viện Trường Đại học Y - Dược Huế

(4) Nhà thuốc Hưng Hiếu

(5) Công ty Cổ phần Dịch vụ và Thương mại và Dược phẩm Phúc Tuệ Nhi

Tóm tắt

Đặt vấn đề: Dược liệu Mộc hoa trắng được ứng dụng trong y học cổ truyền cũng như các bài thuốc dân gian. Tuy nhiên, các nghiên cứu về định lượng conessin – hoạt chất chính, cùng với hoạt tính sinh học của dược liệu này còn hạn chế. Nghiên cứu này thực hiện nhằm xây dựng quy trình định lượng conessin bằng HPLC và đánh giá hoạt tính kháng ung thư và kháng viêm *in vitro* của cao chiết từ vỏ thân Mộc hoa trắng. **Đối tượng nghiên cứu:** vỏ thân Mộc hoa trắng. **Kết quả:** Phương pháp định lượng có độ đặc hiệu, tính thích hợp, độ tuyến tính, độ chính xác và độ đúng cao. Cao chiết vỏ thân có hoạt tính gây độc tế bào trên ba dòng SK-LU-1, HepG2 và SW480 với giá trị IC₅₀ từ 45,55 đến 67,70 µg/mL, ức chế sản sinh NO với giá trị IC₅₀ 90,83 µg/mL. **Kết luận:** Phương pháp HPLC được xây dựng có thể áp dụng để định lượng conessin trong mẫu Mộc hoa trắng. Cao chiết từ vỏ thân thể hiện hoạt tính kháng ung thư *in vitro* đáng kể trên ba dòng tế bào được nghiên cứu, đồng thời cho thấy khả năng kháng viêm *in vitro*. Hoạt tính kháng ung thư *in vitro* của cao chiết vỏ thân Mộc hoa trắng trên ba dòng tế bào SK-LU-1, HepG2 và SW480 được công bố lần đầu tiên.

Từ khóa: conessin, Mộc hoa trắng, gây độc tế bào, kháng viêm, *in vitro*.

Development of a quantitative method for conessine and *in vitro* evaluation of the cytotoxic and anti-inflammatory activities of *Holarrhena pubescens* (Buch.-Ham.) Wall. ex G. Don

Nguyen Viet Khan^{1*}, Nguyen Thi Khanh Linh², Ngo Thi Bay², Hoang Chau Trong Nhan³, Tran Hung Hieu⁴, Cao Thanh Ha⁵

(1) Faculty of Pharmacy, University of Medicine and Pharmacy, Hue University

(2) Student, Faculty of Pharmacy, University of Medicine and Pharmacy, Hue University

(3) Faculty of Pharmacy, University of Medicine and Pharmacy Hospital

(4) Hung Hieu Pharmacy

(5) Phuc Tue Nhi Pharmaceutical and Trading Services Joint Stock Company

Abstract

Background: *Holarrhena pubescens* has been widely used in traditional medicine and various folk remedies. However, studies on the quantification of conessin-the main active compound-and the biological activities of this medicinal plant remain limited. This study aims to develop a quantification method for conessin using high-performance liquid chromatography (HPLC) and evaluate the *in vitro* anticancer and anti-inflammatory activities of the stem bark extract of *Holarrhena pubescens*. **Materials:** Stem bark of *Holarrhena pubescens*. **Results:** The quantitative method demonstrated high specificity, suitability, linearity, precision, and accuracy. The extract exhibited cytotoxic activity against the SK-LU-1, HepG2, and SW480 cancer cell lines, with IC₅₀ values ranging from 45.55 to 67.70 µg/mL. Additionally, it demonstrated NO production inhibition, with an IC₅₀ value of 90.83 µg/mL. **Conclusions:** The developed HPLC method is applicable for the quantitative determination of conessin in *Holarrhena pubescens* samples. The stem bark extract exhibited significant *in vitro* anticancer activity against three tested cell lines and also showed anti-inflammatory potential. Notably,

*Tác giả liên hệ: Nguyễn Việt Khấn, email: nvkhan@huemed-univ.edu.vn

Ngày nhận bài: 27/2/2025; Ngày đồng ý đăng: 10/5/2025; Ngày xuất bản: 10/6/2025

this study is the first to report the *in vitro* anticancer effects of the stem bark extract of *Holarrhena pubescens* on SK-LU-1, HepG2, and SW480 cell lines.

Keywords: *conessin, Holarrhena pubescens, cytotoxicity, anti-inflammatory, in vitro.*

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Mộc hoa trắng, còn gọi là mức hoa trắng, có danh pháp khoa học *Holarrhena pubescens* (Buch.-Ham.) Wall. ex G. Don. Trước đây, loài này từng được biết đến với tên khoa học *Holarrhena antidysenterica* (Roxb. ex Flem.) A. DC. [1,2]. Cây thuộc họ Trúc đào (Apocynaceae), là một loài thực vật nhiệt đới có giá trị dược liệu cao. Mộc hoa trắng phân bố rộng rãi tại các khu vực nhiệt đới và cận nhiệt đới, đặc biệt là ở Nam Á, Đông Nam Á và châu Phi. Ở Việt Nam, loài cây này phân bố khá rộng rãi. Mộc hoa trắng từ lâu đã được sử dụng trong y học cổ truyền để điều trị nhiều loại bệnh như lỵ, tiêu chảy, bệnh da liễu, viêm đại tràng cấp và một số bệnh lý viêm nhiễm [2-4]. Hiện nay, trên thị trường dược phẩm đã có nhiều chế phẩm có nguồn gốc từ vỏ thân của dược liệu Mộc hoa trắng, được sử dụng trong điều trị các bệnh lý về đường tiêu hóa.

Thành phần hóa học chính của Mộc hoa trắng bao gồm các alkaloid sterolic, nổi bật nhất là conessin - một hợp chất có đặc tính kháng khuẩn, kháng viêm, kháng vi sinh vật và chống ung thư tiềm năng [5]. Hoạt chất này trong dược liệu Mộc hoa trắng đã được nghiên cứu về định lượng bằng phương pháp HPLC trong một số công trình khoa học [6, 7]. Các phương pháp này khá phức tạp trong việc xử lý mẫu, hay sử dụng loại cột phân tích chưa phổ biến. Ngoài ra, theo Dược điển Việt Nam V [1], chuyên luận về dược liệu Mộc hoa trắng, về định lượng, hiện chỉ dừng lại ở chỉ tiêu định lượng alkaloid toàn phần. Hơn nữa, các nghiên cứu về hoạt tính sinh học của loài này vẫn còn hạn chế. Ví dụ, theo tìm hiểu của chúng tôi, hiện chưa có nghiên cứu nào về hoạt tính gây độc tế bào của vỏ thân Mộc hoa trắng trên các dòng tế bào SK-LU-1, HepG2 và SW480 (lần lượt là các dòng tế bào ung thư phổi, ung thư gan và ung thư đại trực tràng ở người).

Vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện nhằm xây dựng và thẩm định phương pháp định lượng conessin, đồng thời đánh giá hoạt tính gây độc tế bào và kháng viêm *in vitro* của dược liệu Mộc hoa trắng.

2. ĐỐI TƯỢNG, THIẾT BỊ VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Dược liệu Mộc hoa trắng (vỏ thân) được thu mẫu ở thành phố Huế; các dòng tế bào ung thư ở người SK-LU-1, HepG2 và SW480; dòng tế bào RAW 264.7.

2.2. Hóa chất - dung môi - thiết bị

2.2.1. Định lượng conessin

- Chất chuẩn: conessin, hàm lượng 97,8% (nguyên trạng), SKS: KC.10.16-04.02, Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương.

- Dung môi: acetonitril (ACN), methanol (MeOH), H_3PO_4 , $(C_2H_5)_3N$ và nước cất hai lần đạt tiêu chuẩn tinh khiết dùng cho HPLC. Các hóa chất khác đạt tiêu chuẩn phân tích.

- Hệ thống máy HPLC - Shimadzu 20AD, Nhật Bản; máy đo pH sens ION™ PH3 HACH, Tây Ban Nha; cân phân tích Mettler Toledo, Thụy Sĩ (d=0,1 mg); máy ly tâm Z326K HermLe Labortechnik GmbH, Đức; máy lắc xoay Vortex mixer 250VM HSi, Hàn Quốc.

2.2.2. Hoạt tính gây độc tế bào

Môi trường nuôi cấy tế bào Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), L-glutamin, huyết thanh bào thai bê (fetal bovine serum, FBS) 10%, trypsin-EDTA 0,05%, natri pyruvat, natri hydrocarbonat, streptomycin, ellipticine, sulforhodamine B (SRB), dimethyl sulfoxide (DMSO), trichloroacetic acid (TCA), tris base, đệm phosphate buffered saline (PBS), acid acetic. Kính hiển vi ngược Axiovert 40 CFL, buồng đếm tế bào Fisher, máy quang phổ BioTek, tủ ấm CO_2 , bình nitơ lỏng. Các dòng tế bào ung thư SK-LU-1, Hep G2 và SW480 do GS. TS. J. M. Pezzuto (Đại học Long-Island, Hoa Kỳ) và GS. Chi-Ying Huang (Đại học quốc gia Yang Ming Chiao Tung, Đài Loan) cung cấp.

2.2.3. Hoạt tính kháng viêm *in vitro*

Dòng tế bào RAW 264.7, lipopolysaccharid (LPS) từ *Escherichia coli* của Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA), DMEM, FBS của Life Technologies, Inc., (Gaithersburg, MD, USA), natri nitrit, sulfanilamid, N-1-naphthylethylenediamin dihydrochlorid và DMSO của Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Xây dựng và thẩm định phương pháp định lượng conessin

Chuẩn bị các dung dịch

- Dung dịch chuẩn gốc: Dung dịch conessin 1000 ppm trong MeOH.

- Dung dịch mẫu: Cân chính xác khoảng 200 mg bột dược liệu (đã qua rây 0,6 mm) vào ống falcon dung tích 15 ml, thêm 3 ml MeOH, lắc xoay trong 30 giây. Mẫu được tiến hành chiết siêu âm ở 50 °C trong 30 phút. Lặp lại quy trình chiết thêm 2 lần. Các dịch chiết được gộp và định mức đến 10 ml bằng MeOH, sau đó lọc qua màng lọc 0,45 μm .

Khảo sát điều kiện sắc ký và thẩm định phương pháp

Khảo sát các điều kiện sắc ký: Khảo sát các điều kiện phân tách sắc ký trên cột pha đảo C_{18} và C_8 có chiều dài khác nhau, hạt nhồi 5 μm . Nghiên cứu các hệ dung môi pha động gồm MeOH hoặc ACN kết hợp với acid loãng hoặc dung dịch đệm ở các pH khác nhau. Đánh giá các chế độ rửa giải đẳng dòng và gradient, đồng thời tối ưu hóa tốc độ dòng, bằng đầu dò PDA tại bước sóng 200 nm, thể tích tiêm mẫu 5 μL .

Tiến hành thẩm định quy trình phân tích bao gồm: Độ đặc hiệu, tính thích hợp của hệ thống sắc ký, khoảng tuyến tính, độ chính xác, độ đúng, giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ).

2.3.2. Phương pháp đánh giá tác dụng gây độc tế bào ung thư của cao chiết vỏ thân Mộc hoa trắng

Phương pháp thử gây độc tế bào dựa theo phương pháp của Monk và cộng sự [8]. Mẫu thử được hòa tan trong DMSO 100% để tạo dung dịch gốc (20 mg/mL) và pha loãng thành bốn nồng độ khác nhau trên đĩa 96 giếng bằng môi trường không chứa FBS. Tế bào được trypsin hóa, đếm và điều chỉnh mật độ, sau đó thêm 190 μL tế bào vào mỗi giếng (trong môi trường chứa 5% FBS). Các giếng được ủ trong tủ CO_2 từ 18 - 20 giờ để tế bào phát triển ổn định, sau đó thêm 10 μL mẫu thử đã pha loãng vào. Giếng đối chứng chứa tế bào, 1% DMSO nhưng không có mẫu thử. Sau 48 giờ, tế bào được cố định bằng TCA 20% lạnh trong 1 giờ, rửa bằng nước cất, để khô, và nhuộm bằng SRB 0,4% trong 30 phút ở 37 $^{\circ}\text{C}$. Sau đó, tế bào được rửa bằng acid acetic 1%, để khô, và hòa tan SRB bằng 200 μL tris base không đệm (10 mM). Kết quả mật độ quang (OD) được đo ở bước sóng 540 nm bằng máy đọc đĩa ELISA để đánh giá hoạt tính gây độc tế bào. Phần trăm ức chế sự phát triển của tế bào khi có mặt chất thử sẽ được xác định thông qua công thức sau:

$$\% \text{ ức chế} = 100 - \frac{OD(\text{mẫu}) - OD(\text{ngày 0})}{OD(\text{DMSO}) - OD(\text{ngày 0})} \times 100$$

Ellipticine với các nồng độ 10; 2; 0,4 và 0,08 $\mu\text{g/mL}$ được dùng làm chất đối chứng tham khảo, DMSO 1% đóng vai trò đối chứng âm (nồng độ cuối cùng 0,05% trong giếng). Giá trị IC_{50} được xác định bằng phần mềm TableCurve 2Dv4. Thí nghiệm lặp lại ba lần.

2.3.3. Phương pháp đánh giá hoạt tính kháng viêm in vitro của cao chiết vỏ thân Mộc hoa trắng

Đánh giá hoạt tính kháng viêm *in vitro* được thực hiện theo phương pháp ức chế sản sinh NO [9]. Tế bào RAW264.7, sau khi được nuôi trong môi trường, được cấy vào đĩa 96 giếng với mật độ 2×10^6 tế bào/mL và ủ trong 24 giờ. Sau đó, môi trường được thay bằng DMEM không chứa FBS, và tế bào được ủ với

mẫu nghiên cứu ở các nồng độ khác nhau trong 2 giờ. Tế bào được ủ với các nồng độ mẫu nghiên cứu trong 2 giờ, rồi kích thích tạo NO bằng LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) trong 24 giờ. Các giếng không chứa mẫu thử (chỉ sử dụng dung dịch pha mẫu) được sử dụng làm đối chứng âm, trong khi dexamethasone (100, 20, 4, 0,8 μM) làm đối chứng dương. Hàm lượng nitrite (NO_2^-), đại diện cho NO, được đo bằng phản ứng với thuốc thử Griess. Môi trường nuôi tế bào sau ủ được chuyển sang đĩa mới, thêm thuốc thử Griess (50 μL sulfanilamide 1% (w/v) trong phosphoric acid 5% (v/v) và 50 μL N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride 0.1% (w/v) pha trong nước), ủ ở nhiệt độ phòng 10 phút và đo tại bước sóng 540 nm bằng máy microplate reader. Hàm lượng nitrite của từng mẫu được tính dựa trên đường chuẩn NaNO_2 và so sánh với đối chứng âm. Mức độ ức chế sự sản sinh NO của mẫu được tính bằng công thức: $\% \text{ ức chế} = 100 - [\text{hàm lượng NO}_{\text{sample}} / \text{hàm lượng NO}_{\text{LPS}}] \times 100$.

Giá trị IC_{50} (nồng độ ức chế 50% sự hình thành NO) được xác định bằng phần mềm TableCurve 2Dv4. Thí nghiệm được thực hiện lặp lại ba lần để đảm bảo độ tin cậy.

*** Phép thử sinh học xác định khả năng gây độc tế bào bằng MTT**

Phương pháp MTT được sử dụng để đánh giá sự phát triển và khả năng sống sót của tế bào dưới tác động của chất nghiên cứu, dựa trên sự chuyển hóa MTT thành formazan bởi enzyme trong tế bào sống [10]. Giá trị OD được đo ở bước sóng 540 nm bằng hệ thống BioTek Elx800. Khả năng sống sót của tế bào khi có mặt chất thử nghiệm được xác định thông qua công thức:

$$\% \text{ sống sót} = \frac{OD(\text{mẫu}) - OD(\text{blank})}{OD(\text{DMSO}) - OD(\text{blank})} \times 100$$

3. KẾT QUẢ

3.1. Xây dựng và thẩm định phương pháp định lượng conessin

3.1.1. Khảo sát và lựa chọn điều kiện sắc ký

Các điều kiện sắc ký đã được khảo sát bằng cách thử nghiệm các loại cột pha đảo khác nhau, bao gồm cột C_8 và C_{18} , kết hợp với các hệ pha động sử dụng methanol hoặc acetonitril với nước hoặc dung dịch acid formic 0,1% hoặc đệm ở các tỷ lệ khác nhau. Kết quả khảo sát cho thấy điều kiện tối ưu đạt được khi sử dụng cột InertSustain™ C_{18} (250 \times 4,6 mm, 5 μm), hệ pha động ACN: đệm (H_3PO_4 0,3% + $(\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{N}$ 0,2%) tỷ lệ 12:88 (v/v), tốc độ dòng 0,52 mL/phút, thể tích tiêm mẫu 5 μL và bước sóng phát hiện 200 nm. Trên cơ sở điều kiện này, các chỉ tiêu thẩm định phương pháp đã được tiến hành.

3.1.2. Thẩm định phương pháp Độ phù hợp của hệ thống sắc ký

Độ phù hợp của hệ thống được xác định bằng cách tiến hành tiêm 6 lần dung dịch chuẩn conessin. Các kết quả về thời gian lưu (t_R), diện tích pic (S), số đĩa lý thuyết (N), hệ số kéo đuôi (USP tail), và hệ số phân giải (R_s) được trình bày tại Bảng 1.

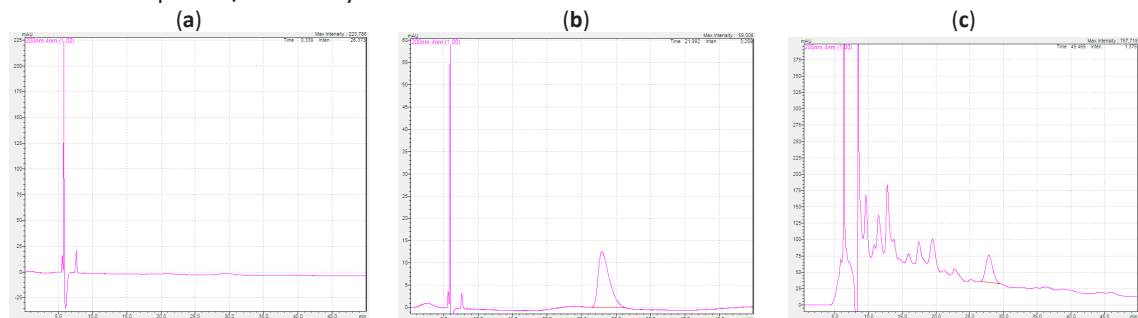
Bảng 1. Kết quả khảo sát độ phù hợp hệ thống sắc ký (n = 6)

Kết quả	t_R (phút)	S (mAu.s)	N	USP tail
Trung bình \pm SD	27,90 \pm 0,26	1262527 \pm 18875	4523 \pm 57	1,43 \pm 0,02
RSD (%)	0,93	1,50	1,26	1,40

Kết quả từ Bảng 1 cho thấy rằng hệ thống sắc ký phù hợp cho việc định lượng conessin trong mẫu dược liệu Mộc hoa trắng với RSD% của thời gian lưu (t_R) và diện tích pic < 2%, số đĩa lý thuyết (N) > 1000, và hệ số kéo đuôi (USP tail) nằm trong khoảng 0,8-1,5.

Tính chọn lọc

Các mẫu gồm: mẫu trắng (dung môi MeOH), mẫu chuẩn conessin và mẫu thử dược liệu được tiến hành phân tích. Kết quả được trình bày ở các Hình 1.



Hình 1. Sắc ký đồ của các mẫu: mẫu dung môi MeOH (a), mẫu chuẩn conessin (b), mẫu thử dược liệu (c).

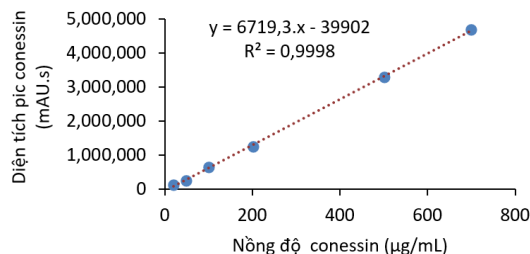
Trên sắc ký đồ của mẫu thử dược liệu xuất hiện pic tại khoảng thời gian tương ứng với thời gian lưu của conessin (27,933 phút) trên sắc ký đồ của mẫu chuẩn. Phổ UV của pic trên sắc ký đồ mẫu thử dược liệu giống với phổ UV conessin trong mẫu chuẩn. Trên sắc ký đồ của dung môi pha mẫu (MeOH) (hình 1a) không xuất hiện pic của conessin, đồng thời không có pic nhiễu, pic lạ. Như vậy, phương pháp đặc hiệu và chọn lọc với conessin.

Khoảng nồng độ tuyến tính

Phân tích 6 mẫu dung dịch chuẩn conessin từ 20 $\mu\text{g/mL}$ đến 700 $\mu\text{g/mL}$ (tương ứng khoảng từ 10% đến 400% so với nồng độ định lượng). Thiết lập mối tương quan giữa nồng độ conessin và diện tích pic conessin. Kết quả được trình bày trong Bảng 2 và Hình 2.

Bảng 2. Sự phụ thuộc giữa tỷ số diện tích pic và nồng độ conessin trong huyết tương

C ($\mu\text{g/mL}$)	20	50	100	200	500	700
Diện tích (mAu.s)	126132	276732	655448	1262536	3308251	4680778



Hình 2. Đồ thị biểu diễn sự phụ thuộc giữa diện tích pic và nồng độ conessin

Kết quả cho thấy trong khoảng nồng độ từ 20 $\mu\text{g/mL}$ đến 700 $\mu\text{g/mL}$ có sự tương quan tuyến tính chặt chẽ giữa diện tích pic và nồng độ conessin tương ứng với hệ số tương quan $R^2 = 0,9998$. Khoảng nồng độ tuyến tính rộng giúp thuận lợi cho việc phân tích hoạt chất có hàm lượng dao động lớn trong mẫu dược liệu.

Độ chính xác và độ đúng

Độ chính xác được xác định bằng cách phân tích lặp lại trên sáu mẫu thử dược liệu độc lập, thực hiện trong hai ngày khác nhau trong cùng điều kiện phân tích. Các kết quả định lượng được trình bày ở Bảng 3.

Độ đúng của phương pháp được đánh giá bằng kỹ thuật thêm chuẩn. Dựa trên kết quả phân tích hoạt chất trong mẫu thử, diện tích pic trung bình của conessin là 1.112.518 mAU.s, nồng độ dung

dịch phân tích trong vial đạt 173 ppm, và hàm lượng conessin trong mẫu dược liệu khô là 0,87%. Mẫu thử dược liệu được bổ sung conessin chuẩn ở ba mức nồng độ tương ứng 80%, 100% và 120% so với hàm lượng trong mẫu thử (n = 3 cho mỗi mức nồng độ). Sau khi phân tích các dung dịch thêm chuẩn, hàm lượng thu hồi của conessin được tính toán. Kết quả phân tích được trình bày trong Bảng 3.

Bảng 3. Kết quả thẩm định độ chính xác và độ đúng

	Độ chính xác (n=6)		Độ đúng (n=3)		
	Trong ngày	Khác ngày	+ 80%	+ 100%	+ 120%
$\bar{X} \pm SD$ (ppm)	0,87 \pm 0,01	0,86 \pm 0,01	98,02	98,33	97,41
RSD (%)	1,15	1,16	1,21	0,64	0,76

Dựa trên kết quả phân tích, độ chính xác trong ngày và khác ngày có giá trị RSD từ 1,15 - 1,16%. Độ đúng, được đánh giá thông qua tỷ lệ thu hồi tại ba mức nồng độ khác nhau, đạt từ 97,41% đến 98,33%, với giá trị RSD dao động trong khoảng 0,64% - 1,21%. Theo tiêu chuẩn của AOAC, yêu cầu về độ chính xác đối với quy trình định lượng các hợp chất có hàm lượng $\leq 10\%$ là $RSD < 1,5\%$, trong khi tỷ lệ thu hồi trung bình chấp nhận được nằm trong khoảng 95% - 102%. Như vậy, phương pháp định lượng đã đạt tiêu chí về độ chính xác và độ đúng theo yêu cầu của AOAC.

Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ)

Khảo sát phân tích các dung dịch được pha loãng

nhiều lần từ dung dịch chuẩn. Dựa vào tỷ số tín hiệu/nhiều nền (S/N) (giá trị LOD và LOQ được xác định khi $S/N=3$ và $S/N=10$ tương ứng) cho thấy: $LOD = 3,5 \mu\text{g/mL}$ và $LOQ = 10 \mu\text{g/mL}$.

3.2. Đánh giá tác dụng gây độc tế bào ung thư của Mộc hoa trắng

Đánh giá hoạt tính gây độc tế bào ung thư của cao chiết toàn phần từ vỏ thân Mộc hoa trắng (cao chiết MeOH) bằng phương pháp SRB trên ba dòng tế bào ung thư ở người, bao gồm SK-LU-1, HepG2 và SW480. Thử nghiệm được thực hiện ở các nồng độ từ 100 - 0,8 $\mu\text{g/mL}$. Ellipticine (với các nồng độ 10 - 0,08 $\mu\text{g/mL}$) được sử dụng làm đối chứng dương. Kết quả thu được được trình bày trong Bảng 4.

Bảng 4. Hoạt tính gây độc tế bào ung thư và ức chế sản sinh NO của vỏ thân Mộc hoa trắng

Mộc Hoa trắng				Ellipticine			
Nồng độ ($\mu\text{g/mL}$)	SK-LU-1	HepG2	SW480	Nồng độ ($\mu\text{g/mL}$)	SK-LU-1	HepG2	SW480
100	66,69	73,09	80,30	10	86,51	91,58	95,50
20	20,81	26,82	30,91	2	75,31	79,12	81,37
4	4,50	5,73	7,07	0,4	49,29	51,04	52,26
0,8	2,54	2,93	2,26	0,08	21,51	23,22	22,86
IC_{50}	67,70 \pm 2,57	55,15 \pm 2,71	45,55 \pm 2,38	IC_{50}	0,40 \pm 0,03	0,34 \pm 0,03	0,33 \pm 0,03

SK-LU-1: dòng tế bào ung thư phổi, HepG2: dòng tế bào ung thư gan, SW480: dòng tế bào ung thư đại trực tràng.

Ellipticine: đối chứng dương. IC_{50} : nồng độ ức chế 50%

Cao chiết toàn phần từ vỏ thân Mộc hoa trắng thể hiện hoạt tính kháng ung thư *in vitro* đáng kể trên cả ba dòng tế bào ung thư thử nghiệm, với giá trị IC_{50} nằm trong khoảng 45,55 - 67,70 $\mu\text{g/mL}$. Đặc biệt, hiệu quả mạnh nhất được ghi nhận trên dòng tế bào ung thư đại trực tràng SW480.

3.3. Đánh giá hoạt tính kháng viêm *in vitro* của Mộc hoa trắng

Hoạt tính kháng viêm *in vitro* của cao chiết toàn phần từ vỏ thân Mộc hoa trắng được đánh giá bằng phép thử ức chế sự sản sinh NO trên tế bào RAW 264.7 ở các nồng độ từ 100 - 0,8 $\mu\text{g/mL}$. Dexamethasone được sử dụng là đối chứng dương. Kết quả được thể hiện ở Bảng 5.

Bảng 5. Hoạt tính gây độc tế bào ung thư và ức chế sản sinh NO của vỏ thân Mộc hoa trắng

Nồng độ (µg/mL)	Mộc hoa trắng		Dexamethasone	
	% ức chế NO	% tế bào sống	% ức chế NO	% tế bào sống
100	54,65	93,97	85,39	92,50
20	12,68	96,06	53,92	98,56
4	4,90		42,29	
0,8	1,17		32,39	
IC ₅₀	90,83 ± 4,03	-	12,93 ± 1,33	-

Dexamethasone: đối chứng dương.

IC₅₀: nồng độ ức chế 50%

Đối với hoạt tính kháng viêm *in vitro*, kết quả nghiên cứu trên xác định rằng mẫu thử có hoạt tính ức chế sự sản sinh NO với giá trị IC₅₀ đạt 90,83 µg/mL.

4. BÀN LUẬN

4.1. Xây dựng và thẩm định phương pháp định lượng conessin

Dựa trên nghiên cứu của Manika N. và cộng sự, phương pháp siêu âm được xác định là phương pháp chiết conessin từ Mộc hoa trắng hiệu quả nhất. Kết quả cho thấy hiệu suất chiết đạt 1,06% khi sử dụng phương pháp siêu âm, cao hơn đáng kể so với các phương pháp khác như chiết hồi lưu nhiệt (0,79%), chiết lắc (0,56%) và chiết thẩm lạnh (0,32%) [11]. Ngoài ra, nhiều nghiên cứu về chiết xuất alkaloid từ dược liệu đã chỉ ra rằng nhiệt độ 50°C và thời gian 30 phút là điều kiện tối ưu phổ biến [12, 13]. Vì vậy, trong nghiên cứu này, phương pháp chiết siêu âm được lựa chọn với điều kiện 50 °C trong 30 phút nhằm đạt hiệu suất chiết xuất cao.

Theo nghiên cứu của Hà Văn Oanh và cộng sự [7], mẫu dược liệu Mộc hoa trắng được chiết bằng dichloromethan với phương pháp lắc siêu âm, rồi cô cách thủy để loại dung môi. Cẩn thu được hòa tan và định mức bằng HCl 0,1 N, sau đó lọc và tiến hành phân tích. Phương pháp này có ưu điểm là giúp giảm bớt sự có mặt của các thành phần kém phân cực trong dung dịch phân tích thông qua quá trình hòa tan cần cẩn dung môi HCl 0,1 N. Tuy nhiên, phương pháp có khá nhiều bước xử lý mẫu, có thể ảnh hưởng đến hiệu suất hòa tan của hợp chất phân tích.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng dung môi MeOH để chiết xuất conessin nhằm tối giản quy trình xử lý mẫu, nhưng vẫn chiết kiệt hoạt chất với điều kiện chiết siêu âm, nhiệt độ và thời gian như trên. Dung môi MeOH làm tăng số lượng hợp chất trong dung dịch phân tích do khả năng hòa tan đa thành phần trong mẫu dược liệu. Tuy nhiên, ưu điểm của phương pháp là giảm số lượng công đoạn trung gian, hạn chế nguy cơ hao hụt mẫu trong quá trình xử lý. Đặc biệt, nghiên cứu này góp phần phát triển phương pháp phân tích conessin trong Mộc hoa trắng từ nền mẫu phức tạp, tạo cơ sở cho các nghiên

cứu chuyên sâu hơn về chiết xuất và định lượng, bao gồm các phương pháp có tiềm năng ứng dụng trong sản xuất công nghiệp cũng như các kỹ thuật chiết xuất thân thiện với môi trường.

Về thẩm định phương pháp phân tích: Kết quả thẩm định cho thấy phương pháp phân tích đáp ứng đầy đủ các tiêu chí về tính phù hợp hệ thống và độ đặc hiệu. Đồng thời, phương pháp này có khoảng tuyến tính rộng, đảm bảo khả năng áp dụng linh hoạt trong nhiều điều kiện khác nhau. Độ chính xác cao và độ đúng đáng tin cậy của phương pháp giúp đảm bảo kết quả phân tích nhất quán và có giá trị sử dụng thực tiễn. Nhìn chung, phương pháp này đạt yêu cầu và có thể được triển khai hiệu quả trong hoạt động phân tích.

4.2. Đánh giá tác dụng gây độc tế bào ung thư của Mộc hoa trắng

Ung thư hiện vẫn là một thách thức lớn đối với nền y học hiện đại, với tỷ lệ tử vong cao và nhu cầu cấp bách về các phương pháp điều trị hiệu quả. Theo Tổ chức Y tế Thế giới (WHO, 2022), ung thư phổi là nguyên nhân gây tử vong hàng đầu do ung thư, chiếm 18,7% tổng số ca tử vong (tương đương 1,8 triệu ca), tiếp đến là ung thư đại trực tràng với 900.000 ca tử vong (9,3%) và ung thư gan với 760.000 ca tử vong (7,8%) [14]. Trước thực trạng này, các nghiên cứu về dược liệu có tiềm năng kháng ung thư đang nhận được sự quan tâm đáng kể. Đáng chú ý, Mộc hoa trắng thể hiện khả năng ức chế sự phát triển của các tế bào ung thư thuộc ba loại phổ biến hàng đầu nêu trên, mở ra triển vọng ứng dụng trong lĩnh vực phòng ngừa và hỗ trợ điều trị ung thư. Theo tìm hiểu của chúng tôi, hiện chưa có nghiên cứu trong nước và trên thế giới công bố hoạt tính kháng ung thư *in vitro* trên 3 dòng tế bào ung thư này của cao chiết toàn phần từ vỏ thân Mộc hoa trắng. Những phát hiện này tạo tiền đề cho các nghiên cứu tiếp theo nhằm khai thác hiệu quả tiềm năng dược liệu, hướng tới phát triển, bổ sung các liệu pháp điều trị ung thư có nguồn gốc từ thiên nhiên.

4.3. Đánh giá hoạt tính kháng viêm in vitro của Mộc hoa trắng

Trong các phương pháp nghiên cứu hoạt tính chống viêm *in vitro*, kỹ thuật đánh giá khả năng ức chế sản sinh NO là một trong những phương pháp được áp dụng phổ biến nhất. NO là một chất trung gian tiền viêm, đóng vai trò quan trọng trong cơ chế bệnh sinh của các phản ứng viêm. Trong điều kiện sinh lý bình thường, NO có tác dụng điều hòa miễn dịch và chống viêm. Tuy nhiên, khi được sản sinh quá mức, nó có thể dẫn đến phản ứng viêm quá mức và gây tổn thương mô. Do đó, việc kiểm soát và ức chế NO được xem là một hướng tiếp cận quan trọng trong điều trị các bệnh lý viêm [15]. Trên cơ sở này, nghiên cứu đã được thực hiện nhằm đánh giá hoạt tính kháng viêm của cao chiết Mộc hoa trắng thông qua phép thử ức chế sản sinh NO trên dòng tế bào đại thực bào RAW 264.7 bị kích thích bởi LPS.

Kết quả nghiên cứu trên xác định rằng mẫu thử có hoạt tính ức chế sự sản sinh NO với giá trị IC_{50} đạt 90,83 $\mu\text{g/mL}$. Kết quả này tương đồng với các nghiên cứu trước đó [16]. Đáng chú ý hơn, phát hiện này phù hợp với ứng dụng lâu đời của Mộc hoa trắng trong y học cổ truyền và dân gian. Vỏ thân của loài cây này từ lâu đã được sử dụng để điều trị viêm ruột, tiêu chảy do vi khuẩn và hội chứng lỵ amip, nhờ vào hoạt tính kháng khuẩn và kháng viêm. Bên cạnh đó, dược liệu

này còn được ứng dụng trong các bài thuốc trị sốt, viêm loét dạ dày - đại tràng, hỗ trợ điều trị viêm da và các bệnh viêm nhiễm khác [4]. Cơ chế ức chế sinh NO được ghi nhận trong nghiên cứu hiện tại có thể đóng vai trò trong các tác dụng này, củng cố thêm bằng chứng về hiệu quả dược lý của Mộc hoa trắng.

5. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã xây dựng thành công phương pháp HPLC để định lượng conessin trong dược liệu Mộc hoa trắng, sử dụng cột InertSustain™ C_{18} (250 \times 4,6 mm, 5 μm) với hệ pha động acetonitril và dung dịch đệm (0,3% H_3PO_4 + 0,2% triethylamin) tỷ lệ 12:88 (v/v), tốc độ dòng 0,52 mL/phút và bước sóng phát hiện 200 nm. Cao chiết vỏ thân Mộc hoa trắng cho thấy hoạt tính gây độc tế bào đáng kể trên ba dòng tế bào ung thư (SK-LU-1, HepG2 và SW480) với giá trị IC_{50} từ 45,55 đến 67,70 $\mu\text{g/mL}$, đồng thời ức chế sản sinh NO với IC_{50} là 90,83 $\mu\text{g/mL}$. Đây là nghiên cứu đầu tiên báo cáo hoạt tính kháng ung thư của cao chiết vỏ thân Mộc hoa trắng trên các dòng tế bào này, góp phần bổ sung dữ liệu khoa học và định hướng ứng dụng tiềm năng trong điều trị ung thư và bệnh viêm.

Lời cảm ơn: Đề tài nghiên cứu được hỗ trợ kinh phí của Trường Đại học Y - Dược, Đại học Huế, mã số đề tài: 14/24.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bộ Y tế. Dược điển Việt Nam V. Nhà xuất bản Y học; 2017. p.1251.
2. Chakraborty A, Brantner AH. Antibacterial steroid alkaloids from the stem bark of *Holarrhena pubescens*. Journal of Ethnopharmacology. 1999 Dec 15;68(1): 339–44.
3. Zahara K, Panda SK, Swain SS, Luyten W. Metabolic diversity and therapeutic potential of *Holarrhena pubescens*: an important ethnomedicinal plant. Biomolecules. 2020 Sep 18;10(9):1341.
4. Viện Dược liệu. Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam, tập 2. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật; 2003. p.325.
5. Srivastava R. A comprehensive review: *Holarrhena pubescens*. Pharma Innovation. 2023 Nov 1;12(11):52–66.
6. Manika N, Gupta VK, Verma RK, Darokar MP, Pandey N and Bagchi GD. Aqueous solutions of organic acids as effective solvents for levodopa extraction from *Mucuna pruriens* seeds. International journal of pharmaceutical sciences and research. 2013;22:3020-3027.
7. Hà Văn Oanh, Chủ Thị Thanh Huyền, Hồ Ngọc Kỳ, Nguyễn Thị Lan Phương, Trịnh Thị Quy, Đỗ Thị Bích Thuận. Xây dựng và thẩm định quy trình định tính, định lượng conessin trong dược liệu Mộc hoa trắng bằng phương pháp HPLC. Tạp chí Kiểm Nghiệm Thuốc. 2017;15(55):12.
8. Monks A, Scudiero D, Skehan P, Shoemaker R, Paull K, Vistica D, et al. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. JNCI: Journal of the National Cancer Institute. 1991 Jun 5;83(11):757–66.
9. Nguyen KV, Ho DV, Nguyen HM, Do TT, Phan KV, Morita H, et al. *chiro*-Inositol Derivatives from *Chisocheton paniculatus* Showing Inhibition of Nitric Oxide Production. Journal of Natural Products. 2020 Apr 24;83(4):1201–6.
10. Nguyen H, Tran L, Ho D, Kiem P, Raal A, Morita H. Three new inositol derivatives from *Chisocheton paniculatus*. Tetrahedron Letters. 2019 Jun 1;60:1841–4.
11. Manika N, Gupta VK, Verma RK, Darokar MP, Pandey N, Bagchi GD. Extraction efficacy, antibacterial potential and validation of RP-HPLC coupled with diode array detection in *holarrhena pubescens*. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research. 2013;4(8):3020-3027.
12. Li Y, Hsieh Y, Pan Z, Zhang L, Yu W, Wang B, et al. Extraction of alkaloids from *Coptidis rhizoma* via betaine-based deep eutectic solvents. ChemistrySelect. 2020 Apr

30;5(16):4973–8.

13. Takla SS, Shawky E, Hammoda HM, Darwish FA. Green techniques in comparison to conventional ones in the extraction of Amaryllidaceae alkaloids: Best solvents selection and parameters optimization. *Journal of Chromatography A*. 2018 Sep;1567:99–110.

14. Global cancer burden growing, amidst mounting need for services. 2025 Feb 21. Available from: <https://>

www.who.int/news/item/01-02-2024-global-cancer-burden-growing--amidst-mounting-need-for-services.

15. Sharma JN, Al-Omran A, Parvathy SS. Role of nitric oxide in inflammatory diseases. *Inflammopharmacology*. 2007 Dec;15(6):252–9.

16. Sharma M, Singh N. A Review on pharmacological aspects of *Holarrhena antidysenterica*. 2018 Dec 30; 7(12):488-492.