

SÀNG LỌC TÁC DỤNG ỨC CHẾ XANTHIN OXIDASE *IN VITRO* CỦA MỘT SỐ DƯỢC LIỆU Ở MIỀN TRUNG VIỆT NAM

Nguyễn Đình Quỳnh Phú, Phạm Thị Hiền Thu, Nguyễn Thị Hoài

Khoa Dược - Trường Đại học Y Dược, Đại học Huế

Tóm tắt

Đặt vấn đề: Sàng lọc tác dụng ức chế xanthin oxidase *in vitro* của 12 mẫu dược liệu được sử dụng theo kinh nghiệm dân gian để điều trị Gout hoặc các tác dụng liên quan như tác dụng chống oxy hóa, kháng viêm và giảm đau. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** Các mẫu dược liệu được chiết siêu âm với dung môi methanol và cô quay thu hồi dung môi dưới áp suất giảm thu được cao dược liệu. Các cao toàn phần này được đánh giá khả năng ức chế xanthin oxidase *in vitro* tại 3 nồng độ là 100, 50 và 10 μ g/ml dựa trên phương pháp đánh giá nồng độ acid uric tạo thành thông qua phương pháp đo quang của Tadataka Noro. **Kết quả:** Ở nồng độ 100 μ g/ml có 11 mẫu thể hiện hoạt tính ức chế xanthin oxidase, ở nồng độ 50 μ g/ml có 8 mẫu có hoạt tính ức chế xanthin oxidase và ở nồng độ 10 μ g/ml chỉ có 2 mẫu có hoạt tính ức chế xanthin oxidase. Hai mẫu có tác dụng ức chế xanthin oxidase trên 50% là cây Lá bỏng và Bình bát. **Kết luận:** Cao toàn phần Lá bỏng (*Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Kurz. - Crassulaceae) và Bình bát (*Annona glabra* L. - Annonaceae) có khả năng ức chế xanthin oxidase với giá trị IC₅₀ lần lượt là 59,42 và 70,92 μ g/ml.

Từ khóa: Cây thuốc Việt Nam, Ức chế xanthin oxidase, Gout.

Abstract

SCREENING ON XANTHINE OXIDASE INHIBITORY ACTIVITY OF SOME VIETNAM MEDICINAL PLANTS

Nguyen Dinh Quynh Phu, Pham Thi Hien Thu, Nguyen Thi Hoai

Faculty of Pharmacy, Hue University of Medicine and Pharmacy, Hue University

Background: Xanthine oxidase inhibitory activity was assayed from twelve species used for the treatment of gout and related activity such as antioxidant, anti-inflammatory and analgesic activity by indigenous people of Vietnam. **Materials and method:** The leaves of these plants were extracted with methanol solvent and then to test the xanthine oxidase inhibitory activity *in vitro* through the modified Tadataka Noro's spectrophotometric method. **Results:** Of the 36 extracts assayed, 11 extracts demonstrated xanthine oxidase inhibitory activity at 100 μ g/ml, 8 extracts demonstrated xanthine oxidase inhibitory activity at 50 μ g/ml and 2 extracts demonstrated xanthine oxidase inhibitory activity at 10 μ g/ml. The methanol extracts of *Bryophyllum pinnatum* and *Annona glabra* showed an inhibition greater than 50%. **Conclusion:** The methanol extracts of *Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Kurz. (Crassulaceae) and *Annona glabra* L. (Annonaceae) presented xanthine oxidase inhibitory activity with IC₅₀ values of 59.42 and 70.92 μ g/ml, respectively.

Keywords: Vietnamese medicinal plants, Xanthine oxidase inhibitory activity, Gout.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ VÀ MỤC TIÊU

Gout là bệnh lý rối loạn chuyển hóa và gây ra những đợt viêm khớp cấp tái phát do sự lắng đọng của các tinh thể muối urat trong các khớp, nếu không điều trị kịp thời sẽ gây ra nhiều biến chứng nguy hiểm cho người bệnh. Hiện nay, tỷ lệ mắc bệnh Gout ngày càng gia tăng nhanh chóng ở nhiều nước trên thế giới và trở thành sức ép cho hệ thống chăm sóc sức khỏe trong cộng đồng [6]. Sàng lọc tác dụng

dược lý của dịch chiết dược liệu là hướng tiếp cận và phát triển thuốc mới đang thu hút sự quan tâm của nhiều nhà khoa học. Xanthin oxidase là enzym đóng vai trò quan trọng trong con đường tạo thành acid uric và ức chế enzym này là một trong những đích tác dụng dược lý quan trọng của các thuốc được sử dụng để điều trị Gout. Một số công bố về tác dụng ức chế xanthin oxidase *in vitro* của các dược liệu ở Việt Nam đã góp phần cho thấy tiềm năng phát triển

thuốc điều trị Gout từ nguồn dược liệu ở nước ta [1], [2]. Vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện để sàng lọc tác dụng hạ acid uric thông qua việc đánh giá tác dụng ức chế xanthin oxidase *in vitro* của các dược liệu được thu hái ở miền Trung Việt Nam.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Nguyên liệu là lá của 12 dược liệu được thu hái tại tỉnh Quảng Trị và Thừa Thiên Huế, đã và đang dùng để phòng và chữa các bệnh liên quan đến tác dụng chống oxy hóa, chống viêm và giảm đau. Tên khoa học của các mẫu cây nghiên cứu đã được ThS. Lê Tuấn Anh - Trung tâm Khoa học Công nghệ Quảng Trị, Viện Nghiên cứu Khoa học Miền Trung giám định. Các mẫu nghiên cứu sau khi thu hái được phơi sấy khô, xay thô và chiết siêu âm với methanol ở 40°C trong vòng 2 giờ, lặp lại 3 lần. Lọc các dịch chiết methanol thu được qua bông, gộp dịch lọc và cất loại dung môi dưới áp suất giảm thu được các cao toàn phần.

2.2. Máy móc, thiết bị và hóa chất

2.2.1. Máy móc, thiết bị, dụng cụ

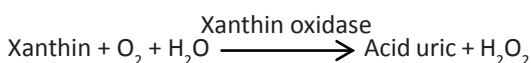
- Máy đo quang UV-Vis Jasco V630.
- Bể chiết siêu âm Elmasonic S100H.
- Máy cô quay Yamato.
- Micropipet đầu một kênh và đa kênh với nhiều thể tích khác nhau.

2.2.2. Hóa chất, dung môi

- Thuốc đối chiếu: Allopurinol (Sigma Aldrich).
- Cơ chất: Xanthin (Sigma Aldrich), enzym: Xanthin oxidase (SUI, Sigma Aldrich).
- Dung môi pha mẫu: Dimethylsulfoxid (Merck).
- Dung môi chiết xuất: Methanol (Merck).
- Hóa chất pha đệm: Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 , HCl và NaOH (Merck).

2.3. Phương pháp nghiên cứu

Nguyên tắc: Dựa trên phương pháp của Tadaka Noro và cộng sự (1983) có điều chỉnh để phù hợp với điều kiện phòng thí nghiệm [7], [8]. Nguyên tắc định lượng dựa trên phản ứng sau:



Hoạt độ xanthin oxidase được xác định thông qua lượng acid uric tạo thành được đo ở bước sóng 290nm ở 25°C.

Cách tiến hành:

- **Chiết xuất tạo cao toàn phần:** 12 mẫu nghiên cứu được chiết xuất tạo cao toàn phần theo quy trình sau: Cân 5,0g bột thô, cho vào bình nón có nút mài và chiết siêu âm với 20ml methanol ở 40°C trong

vòng 2 giờ, lặp lại 3 lần. Lọc các dịch chiết methanol thu được qua bông, gộp dịch lọc và cô quay thu hồi dung môi dưới áp suất giảm thu được các cao toàn phần tương ứng.

- **Chuẩn bị mẫu thử:** cao toàn phần của từng mẫu nghiên cứu được hòa tan trong dung môi dimethyl sulfoxid (DMSO) để được dung dịch gốc ở nồng độ 7mg/1ml. Sau đó dung dịch gốc này được pha loãng bằng dung dịch đệm thành các nồng độ thích hợp để thực hiện các phản ứng với enzym.

- **Tiến hành thí nghiệm:** Hỗn hợp phản ứng được tiến hành trong ống nghiệm gồm: 1ml dung dịch cần thử, 2,9ml dung dịch đệm phosphat (pH = 7,5) và 100 μ l dung dịch xanthin oxidase 0,01U/ml (được pha trong dung dịch đệm phosphat, pH = 7,5) được ủ ở 25°C trong 15 phút. Sau đó thêm tiếp 2ml xanthin 150mM, ủ ở 25°C trong 30 phút. Dùng phản ứng bằng cách thêm 1ml acid hydrochloric 1N. Hỗn hợp phản ứng sau cùng được đem đo độ hấp thụ bằng máy đo quang phổ ở bước sóng 290nm. Song song với mỗi mẫu chứng, mẫu đối chiếu, mẫu thử có một mẫu trắng của chứng, mẫu trắng của đối chiếu và mẫu trắng của thử.

Các mẫu trắng của mẫu thử, mẫu chứng, mẫu đối chiếu được tiến hành tương tự như mẫu thử, mẫu chứng và mẫu đối chiếu nhưng thay đổi trình tự cho enzym vào ống nghiệm (enzym được cho vào sau khi thêm acid hydrochloric 1N). Thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

Đánh giá ảnh hưởng của các cao toàn phần lên hoạt độ xanthin oxidase *in vitro*:

- **Tính % ức chế:**

$$\% \text{ ức chế} = \frac{(A-B) - (C-D)}{(A-B)} \times 100$$

Trong đó:

A: mật độ quang đo được của mẫu chứng (mẫu không có dịch chiết của các mẫu thử).

B: mật độ quang đo được của mẫu trắng của mẫu chứng (enzym được cho vào sau khi thêm acid hydrochloric 1N).

C: mật độ quang đo được của mẫu thử (mẫu có dịch chiết ở các nồng độ khác nhau).

D: mật độ quang đo được của mẫu trắng của mẫu thử (enzym được cho vào sau khi thêm acid hydrochloric 1N).

Allopurinol được sử dụng là thuốc đối chiếu và được thử ở các nồng độ 5; 2,5; 1; 0,5 và 0,1 μ g/ml.

- **Xác định giá trị IC_{50} của dược liệu tiềm năng:**

Tác dụng ức chế xanthin oxidase của các dược liệu có tiềm năng được đánh giá theo trị số IC_{50} - là giá trị nồng độ (tính toán theo lý thuyết) tại đó mẫu thử ức chế 50% sự tạo thành acid uric trong hỗn hợp

phản ứng so với mẫu chứng.

Phương pháp xử lý số liệu

Các số liệu nghiên cứu được xử lý dựa vào phần mềm Excel. Giá trị % ức chế được biểu diễn dưới dạng $X \pm SD$ (X: giá trị trung bình, SD: độ lệch chuẩn). Giá trị IC_{50} được tính toán dựa vào đồ thị và phương trình biểu diễn nồng độ và giá trị ức chế enzym xanthin oxidase của các cao toàn phần dược liệu tiềm năng.

3. KẾT QUẢ

3.1. Kết quả đánh giá tác dụng ức chế xanthin oxidase *in vitro* của các cao toàn phần dược liệu

Sau khi thu hái và xử lý nguyên liệu thu được, 12 mẫu dược liệu được chiết siêu âm với dung môi methanol thu được dịch chiết toàn phần, tiến hành cô quay thu hồi dung môi thu được cao methanol toàn phần. Các cao toàn phần này được đánh giá tác dụng ức chế xanthin oxidase ở 3 nồng độ 100, 50 và 10 $\mu\text{g/ml}$. Kết quả được trình bày ở Bảng 1.

Bảng 1. Khả năng ức chế xanthin oxidase *in vitro* của các cao toàn phần ở ba nồng độ khác nhau

STT	Tên Việt Nam	Tên khoa học	% ức chế		
			10 $\mu\text{g/ml}$	50 $\mu\text{g/ml}$	100 $\mu\text{g/ml}$
1	Hồng bì đại	<i>Clausena excavata</i> - Rutaceae	—	—	$5,9 \pm 0,5$
2	Dây hương	<i>Erythralium scandens</i> - Erythraliaceae	—	$27,6 \pm 0,4$	$43,1 \pm 0,3$
3	Tô liên	<i>Torenia benthamiana</i> - Scrophulariaceae	—	$5,6 \pm 0,2$	$10,7 \pm 0,5$
4	Đoạn thiết nấp	<i>Schismatoglottis calyptata</i> - Araceae	—	$13,7 \pm 0,3$	$34,2 \pm 0,4$
5	Bình bát	<i>Annona glabra</i> - Annonaceae	$13,6 \pm 1,0$	$42,3 \pm 0,7$	$62,7 \pm 0,9$
6	Thường xuân	<i>Hedera helix</i> - Araliaceae	—	—	—
7	Cóc kền sét	<i>Derris ferruginea</i> - Fabaceae	—	—	$12,6 \pm 0,4$
8		<i>Olex imbricata</i> - Olacaceae	—	$18,3 \pm 0,6$	$40,8 \pm 0,1$
9	Rau răm	<i>Polygonum multiflorum</i> - Polygonaceae	—	$19,1 \pm 0,3$	$44,7 \pm 0,1$
10	Kim phượng	<i>Caesalpinia pulcherrima</i> - Fabaceae	—	$7,5 \pm 0,3$	$33,0 \pm 0,9$
11	Lá bỏng	<i>Bryophyllum pinnatum</i> - Crassulaceae	$20,3 \pm 0,3$	$48,9 \pm 1,0$	$77,5 \pm 0,9$
12	Diếp cá	<i>Houttuynia cordata</i> - Saururaceae	—	—	$6,6 \pm 0,4$

Ghi chú: —: không xác định

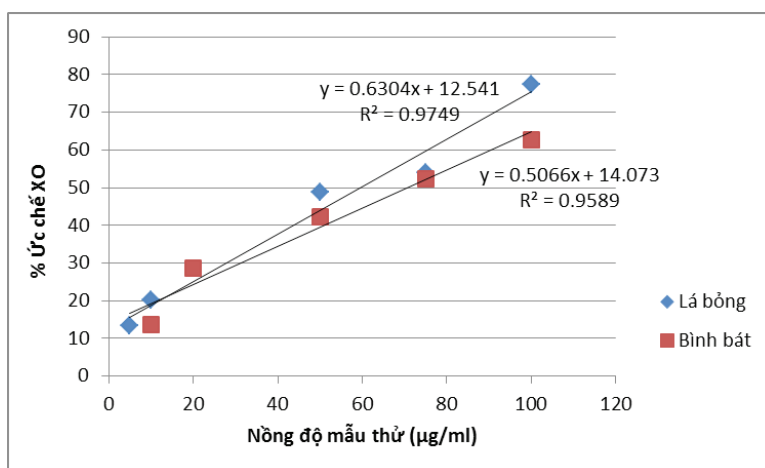
Dựa vào kết quả ở Bảng 1 cho thấy: tại nồng độ 100 $\mu\text{g/ml}$, có 11 mẫu thể hiện tác dụng ức chế xanthin oxidase; tại nồng độ 50 $\mu\text{g/ml}$ có 8 mẫu có tác dụng và tại nồng độ 10 $\mu\text{g/ml}$ chỉ có 2 mẫu có khả năng ức chế xanthin oxidase. Hai mẫu có khả năng ức chế xanthin oxidase *in vitro* trên 50% là cây Lá bỏng và Bình bát nên được lựa chọn tiếp tục nghiên cứu để xác định giá trị IC_{50} .

3.2. Kết quả xác định giá trị IC_{50} của các dược liệu tiềm năng

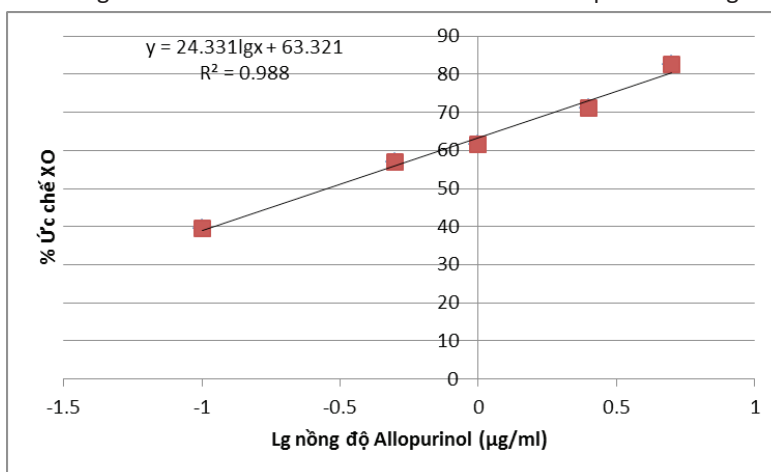
Sau khi đánh giá sơ bộ khả năng ức chế xanthin oxidase *in vitro*, 2 mẫu có tác dụng ức chế xanthin oxidase *in vitro* mạnh nhất là cây Lá bỏng (*Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Kurz. - Crassulaceae) và cây Bình bát (*Annona glabra* L. - Annonaceae). Các mẫu này được thiết lập dãy nồng độ khảo sát để xác định giá trị

IC₅₀. Đồ thị thể hiện khả năng ức chế enzyme xanthin oxidase *in vitro* của cao toàn phần Lá bỏng, Bình bát

và thuốc đối chiếu Allopurinol ở các nồng độ khác nhau được thể hiện ở Hình 1 và Hình 2.



Hình 1. Khả năng ức chế xanthin oxidase *in vitro* của cao toàn phần Lá bỏng và Bình bát



Hình 2. Khả năng ức chế xanthin oxidase *in vitro* của Allopurinol

Dựa vào đồ thị thiết lập được, tiến hành xác định giá trị IC₅₀ của cao toàn phần cây Lá bỏng và Bình bát. Kết quả được trình bày trong Bảng 2.

Bảng 2. Giá trị IC₅₀ của cao toàn phần Lá bỏng và Bình bát

STT	Tên Việt Nam	Tên khoa học	IC ₅₀ (µg/ml)
1	Lá bỏng	<i>Bryophyllum pinnatum</i> (Lam.) Kurz – Crassulaceae	59,42
2	Bình bát	<i>Annona glabra</i> L. – Annonaceae	70,92
3	Allopurinol		0,28

4. BÀN LUẬN

Khả năng ức chế enzyme xanthin oxidase *in vitro* của cao toàn phần methanol từ 12 dược liệu được thu hái tại tỉnh Thừa Thiên Huế và Quảng Trị đã được xác định. Trong nghiên cứu này, hai dược liệu thể hiện hoạt tính ức chế enzyme xanthin oxidase khá tốt là cây Lá bỏng và Bình bát với giá trị IC₅₀ lần lượt là 59,42 và 70,92µg/ml. Đây là thông báo đầu tiên

về khả năng ức chế enzyme xanthin oxidase của hai loài Lá bỏng và Bình bát. Một số nghiên cứu về có tác dụng chống oxy hóa, giảm đau và kháng viêm của dược liệu Lá bỏng đã được công bố [3], [4]. Các nhà khoa học cũng đã báo cáo về tác dụng giảm đau và gây độc tế bào của cây Bình bát [5], [9]. Đây là tiền đề để tiếp tục nghiên cứu sâu hơn về hai dược liệu này. Mặc dù giá trị IC₅₀ của cao toàn phần Lá bỏng

và Bình bát cao gấp nhiều lần so với thuốc đối chiếu là chất chuẩn tinh khiết Allopurinol nhưng kết quả của đề tài đã góp phần định hướng nguồn dược liệu tiềm năng để làm cơ sở khoa học cho việc xúc tiến các nghiên cứu xa hơn nhằm tìm kiếm các hợp chất có tác dụng phòng và hỗ trợ điều trị bệnh Gout thông qua con đường ức chế xanthin oxidase.

5. KẾT LUẬN

Đã sàng lọc tác dụng ức chế xanthin oxidase *in vitro* của 12 dược liệu: tại nồng độ 100µg/ml có 11

mẫu có tác dụng ức chế, tại nồng độ 50µg/ml có 8 mẫu có tác dụng ức chế và tại nồng độ 10µg/ml chỉ có 2 mẫu thể hiện tác dụng ức chế xanthin oxidase *in vitro*.

Đã xác định được giá trị IC_{50} của 2 dược liệu có tiềm năng ức chế xanthin oxidase *in vitro* là cây Lá bỏng và Bình bát với giá trị IC_{50} lần lượt là 59,42 và 70,92µg/ml.

Lời cảm ơn: Các tác giả trân trọng cảm ơn Quỹ nghiên cứu khoa học của Trường Đại học Y Dược - Đại học Huế đã hỗ trợ kinh phí thực hiện công trình này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Hoàng Thị Thanh Thảo, Nguyễn Thùy Dương, Nguyễn Hoàng Anh, Phạm Đức Vịnh, Nguyễn Thị Hoài, Nguyễn Quỳnh Chi (2013), "Sàng lọc các cây thuốc Việt Nam có tác dụng ức chế xanthin oxidase *in vitro*", *Tạp chí Dược liệu*, tập 18, số 6, 361-367.
2. Nguyễn Thị Kim Thu, Đặng Kim Thu, Bùi Thanh Tùng (2017), "Đánh giá tác dụng ức chế enzym xanthin oxidase *in vitro* của lá và vỏ rễ cây Dâu tằm (*Morus alba* L.)", *Tạp chí Dược học*, số 491, 8-11.
3. Abhishek Sharma *et al.* (2014), "In vitro antibacterial and antioxidant activity of *Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Kurz.", *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6(1), 558-560.
4. Anjoo Kamboj, Ajay Kumar Saluja (2009), "*Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Kurz.: Phytochemical and pharmacological profile: A review", *Pharmacognosy Review*, 3(6), 364-374.
5. Biba V. S. *et al.* (2014), "Anticancer, antioxidant and antimicrobial activity of Annonaceae family", *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3(3), 1595-1604.
6. Eggebeen AT (2007), "Gout: an update", *Am Fam Physician.*, 76(6), 801-808.
7. Muthuswamy Umamaheswari *et al.* (2007), "Xanthine oxidase inhibitory activity of some Indian medicinal plants", *Journal of Ethnopharmacology*, 109, 547-551.
8. Noro T *et al.* (1983), "Inhibitors of xanthine oxidase from flowers and buds of *Daphne genkwa*", *Chem. Pharm. Bull.*, 31, 3984-3987.
9. Siebra *et al.* (2009), "Anti-inflammatory potential of *Annona glabra*, Annonaceae", *Rev. Bras. Farmacogn.*, 19(1a), 82-88.