

TỐI ƯU HÓA ĐIỀU KIỆN TÁCH CHIẾT ALKALOID SỬ DỤNG ENZYME HỖ TRỢ VÀ KHẢO SÁT HOẠT TÍNH KHÁNG OXY HÓA, GÂY ĐỘC TẾ BÀO UNG THƯ CỦA CAO CHIẾT TỪ VỎ THÂN CÂY GÁO VÀNG NINH BÌNH (*Nauclea orientalis* L.)

Phạm Minh Tân*, Mai Trần Bảo Trâm, Trần Thị Dung

Khoa Khoa học ứng dụng, Đại học Tôn Đức Thắng

TÓM TẮT

Gáo vàng (*Nauclea orientalis* L.) là loại cây bản địa có nhiều dược tính giá trị, đặc biệt trong vỏ thân chứa nhiều alkaloid, là hợp chất sinh học với nhiều hoạt tính hữu dụng. Nghiên cứu này xác định giá trị của các yếu tố ảnh hưởng đến hàm lượng alkaloid tách chiết và tối ưu hóa bằng phương pháp đáp ứng bề mặt RSM (Response Surface Methodology) với thiết kế Box-Behnken Design (BBD). Kết quả thu nhận được trên vỏ thân Gáo vàng với sự hỗ trợ của enzyme pectinase (nồng độ 8 U/mL) là tỷ lệ nguyên liệu: dung môi 1:20,96 g/mL, nhiệt độ tách chiết 72,12 °C và thời gian tách chiết 81,82 phút, đạt hàm lượng alkaloid cao nhất là $74,25 \pm 0,04$ (mg AE/g cao chiết). Cao chiết phân đoạn ethyl acetate dựa theo khả năng bắt gốc tự do DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) cho hoạt tính kháng oxy hóa tốt nhất với giá trị IC_{50} là $36,79 \pm 1,17$ μ g/mL, thấp hơn vitamin C 1,91 lần. Hoạt tính gây độc tế bào ung thư gan HepG2 của cao chiết ở nồng độ 900 μ g/mL cho tỷ lệ ức chế cao nhất là 39,94% thực hiện theo phương pháp MTT (3 - [4,5 - dimethylthiazol - 2 - yl] - 2,5 - diphenyl tetrazolium bromide). Nhờ tác dụng sinh học của chiết xuất alkaloid từ vỏ thân qua khảo sát hoạt tính *in vitro*, Gáo vàng Ninh Bình đáp ứng tiềm năng phát triển nguồn dược liệu quý trong y học tương lai.

Từ khóa: Alkaloid, enzyme hỗ trợ, Gáo vàng, gây độc tế bào, kháng oxy hóa.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây Gáo vàng (*Nauclea orientalis* L.) thuộc họ Rubiaceae, một loại cây gỗ lớn nhanh, mọc hoang ở những vùng ẩm thấp, ven sông suối, được tìm thấy nhiều tại tỉnh Ninh Bình và rải rác ở miền Tây nam bộ, là dược liệu quý của Việt Nam. Một số bộ phận của cây Gáo vàng như lá, thân và rễ được dùng làm thuốc chữa bệnh. Trên thế giới, Gáo vàng phân bố tương đối hạn hẹp ở vùng Nam Á, Đông Nam Á, New Guinea và Australia. Theo kết quả phân tích hóa sinh, nhiều hợp chất thực vật quan trọng đã được thu nhận trên chi Gáo (*Nauclea*) như phenolic, alkaloid, triterpene, steroid, saponin và tannin (Putri *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2022). Nghiên cứu trước đây đã cho thấy các hoạt tính sinh học tiềm năng của chi Gáo là tác dụng loại bỏ các gốc tự do (Raghavamma *et al.*, 2011; Ayeleso *et al.*, 2014), ức chế tế bào ung thư tăng trưởng (Sichaem *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2015), kháng viêm (Liu *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2018), kháng khuẩn (He *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2018), kháng virus (Liu *et al.*, 2019; Mai *et al.*, 2021). Riêng đối với Gáo vàng, khảo sát ghi nhận hàm lượng hợp chất phenolic cao trong vỏ thân có ý nghĩa tương quan đến hoạt tính kháng oxy hóa (Attanayaka *et al.*, 2016). Chiết xuất từ vỏ thân Gáo vàng làm giảm stress oxy hóa gây rối loạn chức năng cơ tim (Sandamali *et al.*, 2022). Alkaloid tách chiết từ rễ Gáo vàng có tác dụng chống ngưng tập tiểu cầu ở người trong quá trình đông máu (Chaikham *et al.*, 2017). Đáng chú ý là indole alkaloids từ thân và lá Gáo vàng ức chế đáng kể một số dòng tế bào ung thư ở người (Liu *et al.*, 2019).

Trong các chất chuyển hóa thứ cấp được biết đến ở thực vật, alkaloid chiếm khoảng 20% và có vai trò thiết yếu trong y học (Kaur, Arora, 2015). Về mặt điều trị, các alkaloid đặc biệt là chất gây mê, bảo vệ tim mạch và chống viêm (Heinrich *et al.*, 2021). Alkaloid được xem là hợp chất thực vật ý nghĩa và hiệu quả nhất trong điều kiện trị liệu (Eze *et al.*, 2014). Trong những năm gần đây, từ việc xem xét mở rộng nguồn dược liệu, người ta ngày càng chú ý đến thành phần và hoạt tính sinh học của chi Gáo. Alkaloid, hợp chất thứ cấp chính được tìm thấy trong vỏ thân của Gáo vàng, là thành phần tác động chính đem lại nhiều giá trị dược lý, được xác định trong nghiên cứu này qua các khảo sát về tối ưu hóa điều kiện tách chiết. Đồng thời, sử dụng enzyme hỗ trợ giúp phá hủy thành tế bào, tăng diện tích bề mặt tiếp xúc của nguyên liệu với dung môi, tạo sự thâm nhập và thúc đẩy giải phóng các hợp chất nội bào (Lubek-Nguyen *et al.*, 2022). Nghiên cứu thực hiện phương pháp tối ưu hóa đáp ứng bề mặt RSM (Response Surface Methodology) để thiết kế thí nghiệm, sau đó phân tích thống kê và hồi quy thông qua phương trình mô hình nhằm xác định hiệu quả điều kiện tách chiết (Said, Amin, 2015). Thêm vào đó, khả năng kháng oxy hóa được khảo sát với các cao chiết phân đoạn và hoạt tính gây độc được thử nghiệm *in vitro* trên dòng tế bào ung thư gan HepG2.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Vỏ thân cây Gáo vàng nguồn gốc từ tỉnh Ninh Bình (Việt Nam) được phơi khô đạt độ ẩm $9,82 \pm 0,08\%$, sau đó xay mịn và bảo quản ở 30°C . Enzyme cellulase và pectinase do công ty Novaco Pharmaceuticals (Việt Nam) cung cấp. Các hóa chất được mua từ hãng Sigma-Aldrich (Singapore).

Phương pháp nghiên cứu

Thí nghiệm đơn yếu tố về điều kiện tách chiết alkaloid

Khảo sát ảnh hưởng của loại enzyme (cellulase, pectinase, cellulase + pectinase và đối chứng), nồng độ enzyme (2, 4, 6, 8, 10 U/mL), loại dung môi (ethanol, methanol, ethyl acetate, hexane, nước cất), nồng độ dung môi (40, 50, 60, 70, 80%), tỷ lệ nguyên liệu:dung môi (1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30 mg/L), thời gian tách chiết (40, 60, 80, 100, 120 phút), nhiệt độ tách chiết (40, 50, 60, 70, 80 °C) đến hàm lượng alkaloid của vỏ thân cây Gáo vàng, Các thí nghiệm thực hiện tuần tự, bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên, mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần.

Định lượng alkaloid toàn phần

Cao chiết được hòa tan vào HCl 2N và lọc. Hút 1 mL dung dịch này vào phễu chiết và rửa 3 lần với 10 mL chloroform. pH của dung dịch được điều chỉnh tới trung tính với 0,1 N NaOH. Sau đó, thêm 5 mL đệm phosphate và 5 mL dung dịch bromocresol green. Dung dịch đệm phosphate (pH=7,4) được chuẩn bị bằng cách hiệu chỉnh pH của sodium phosphate 2 M (71,6 g Na_2HPO_4 trong 1 L nước cất) tới pH=4,7 bằng acid citric 0,2 M (42,02 g acid citric trong 1 L nước cất). Hỗn hợp được lắc và chiết lần lượt với 1, 2, 3 và 4 mL chloroform. Sau đó, đo độ hấp thụ ở bước sóng 470 nm. Mẫu trắng làm tương tự nhưng không có cao chiết. Các alkaloid phản ứng với bromocresol green tạo thành phức màu vàng. Đo độ hấp thụ của phức này ở bước sóng 470 nm và dựa vào đường chuẩn atropine tính ra hàm lượng alkaloid toàn phần có trong mẫu phân tích (Ajanal *et al.*, 2012). Hàm lượng alkaloid tổng được tính theo mg đương lượng atropine (mg AE)/g cao chiết. Atropine được sử dụng làm chất chuẩn với nồng độ từ 0 – 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Tối ưu hóa điều kiện tách chiết alkaloid bằng phương pháp RSM-BBD

Tiến hành thiết kế thí nghiệm theo mô hình BBD gồm 3 biến độc lập (3 yếu tố) là X_1 , X_2 , X_3 với X_1 là tỷ lệ nguyên liệu : dung môi (theo kết quả thí nghiệm) (g/mL), X_2 là nhiệt độ chiết ($^{\circ}\text{C}$) và X_3 là thời gian chiết (phút). Mỗi yếu tố được nghiên cứu ở 3 mức -1, 0 và +1. Mô hình có 15 nghiệm thức với 15 tổ hợp điều kiện chiết xuất khác nhau về các thông số khảo sát của 3 yếu tố thí nghiệm. Thực hiện các nghiệm thức, phân tích biến lượng và tương quan bằng phần mềm Minitab 21 với độ tin cậy 95% để thiết lập mô hình thực nghiệm và dự đoán điều kiện tách chiết tối ưu nhằm đạt hàm lượng alkaloid tối đa. Hàm đáp ứng được chọn là hàm lượng alkaloid được chiết xuất từ vỏ thân cây Gáo vàng (Y, mg/g cao chiết). Phân tích hồi quy đa biến theo phương trình bậc hai.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2$$

(β_0 : Hệ số tự do; β_1 , β_2 , β_3 : Các hệ số bậc 1; β_{11} , β_{22} , β_{33} : Các hệ số bậc 2; β_{12} , β_{13} , β_{23} : Hệ số tương tác của các cặp yếu tố)

Hoạt tính kháng oxy hóa của cao phân đoạn

Điều chế cao phân đoạn: Cao ethanol tiếp tục được tiến hành chiết lỏng – lỏng với các dung môi có độ phân cực tăng dần lần lượt là n-hexan, chloroform, ethyl acetate và nước. Hoạt tính kháng oxy hóa *in vitro* của các cao phân đoạn được xác định theo phương pháp khử gốc tự do DPPH của Raghavamma và đồng tác giả (2011). Tất cả cao chiết (nồng độ 10-50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) được thêm vào 2 mL dung dịch DPPH (nồng độ 100 μM pha trong methanol). Ủ trong điều kiện tối thời gian 30 phút ở 37°C . Thực hiện tương tự với vitamin C (nồng độ 5-25 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Sau đó tiến hành đo mật độ quang OD ở bước sóng 517 nm. Tính giá trị ức chế gốc tự do DPPH (%).

Xây dựng đường chuẩn: $y = ax+b$ cho mẫu cao chiết và vitamin C với các giá trị phần trăm ức chế DPPH ở các nồng độ khác nhau. Sau cùng, tính và so sánh giá trị IC_{50} (nồng độ ức chế 50% gốc tự do DPPH) của các cao chiết phân đoạn và vitamin C.

Hoạt tính gây độc tế bào ung thư gan HepG2

Phương pháp MTT thử nghiệm độ độc tế bào: đánh giá khả năng sống sót của tế bào HepG2 qua khả năng khử MTT (màu vàng) thành phức hợp formazan (màu tím) bởi hoạt động của enzyme dehydrogenase trong tế bào sống. Lượng tinh thể formazan được tạo ra trong thử nghiệm nhiều hay ít sẽ phản ánh hoạt tính ức chế tế bào của cao chiết mạnh hay yếu. Số lượng tinh thể formazan tạo thành được đánh giá bằng phương pháp đo mật độ quang (OD) ở bước sóng 540 nm.

Nuôi cấy và xử lý tế bào: Tế bào HepG2 được nuôi cấy trong môi trường RPMI (Roswell Park Memorial Institute Medium), bổ sung 10% FBS (Fetal Bovine Serum), 100 IU/mL penicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin, ủ ở 37°C , 5%

CO₂. Khí tế bào đạt độ phủ 80 - 90%, hút bỏ môi trường và rửa với PBS (Phosphate Buffered Saline) 1 X. Bổ sung Trypsin – EDTA, ủ ở 37 °C trong 3 – 5 phút cho tới khi tế bào tách khỏi bề mặt đĩa nuôi cấy. Bổ sung một lượng môi trường bằng lượng Trypsin – EDTA, thu dịch và ly tâm 250 g trong 5 phút, loại bỏ dịch nổi và hòa phần tế bào vào môi trường mới. Tế bào sau đó được đếm số lượng, chia vào đĩa nuôi cấy 96 giếng để kiểm tra hoạt tính gây độc của mẫu thử thông qua test MTT.

Tế bào *HepG2* được nuôi cấy trong đĩa 96 giếng với mật độ $3,7 \times 10^4$ tế bào/giếng. Sau 24 giờ ủ ở 37 °C, 5% CO₂, tiến hành loại bỏ môi trường cũ và bổ sung môi trường mới có chứa mẫu thử đã chuẩn bị ở các nồng độ khác nhau 500, 600, 700, 800, 900 µg/mL (100 µL/giếng). Các nhóm đối chứng gồm có control (mẫu không xử lý) và chứng dương (mẫu xử lý với Cisplatin thương mại, nồng độ 4 ppm).

Mẫu tiếp tục được ủ trong 24 giờ ở điều kiện 37 °C, 5% CO₂. Sau đó, tiến hành loại bỏ môi trường nuôi cấy, bổ sung 100 µL môi trường nuôi cấy mới có chứa MTT (0,5 mg/mL) vào mỗi giếng. Ủ tránh sáng trong 3 giờ ở 37 °C, 5% CO₂. Loại bỏ môi trường chứa MTT, bổ sung 100 µL DMSO và lắc nhẹ trong 15 phút, nhiệt độ phòng. Đo OD ở bước sóng 540 nm. Kết quả đánh giá hoạt tính cao chiết ảnh hưởng đến tế bào nuôi cấy bằng sự nguyên vẹn về hình thái tế bào khi quan sát dưới kính hiển vi soi ngược và sự tăng sinh của tế bào bằng kết quả đo OD lượng tinh thể formazan của phản ứng MTT.

Phương pháp xử lý số liệu

Kết quả thu được thể hiện ở dạng trung bình ± độ lệch chuẩn. Sử dụng Minitab 21 để thiết kế thí nghiệm RSM-BBD, phân tích thống kê ANOVA và trắc nghiệm phân hạng sự khác biệt ý nghĩa LSD ở $p \leq 0.05$. Tính toán và vẽ biểu đồ bằng Excel 2019. Mô hình 3D được vẽ bằng Origin Pro 9.0.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Ảnh hưởng của các đơn yếu tố đến hàm lượng alkaloid

Các yếu tố về loại enzyme, nồng độ enzyme, tỷ lệ nguyên liệu:dung môi, thời gian tách chiết và nhiệt độ tách chiết ảnh hưởng đến hàm lượng alkaloid từ vỏ thân Gáo vàng được thực hiện.

Chiết xuất có sự hỗ trợ của enzyme liên quan đến việc sử dụng các enzyme thủy phân để phân hủy thành tế bào giúp cho sự khuếch tán của dung môi vào vật liệu thực vật, dẫn đến các chất biến dưỡng được phóng thích dễ dàng hơn (Lubek-Nguyen *et al.*, 2022). Hàm lượng alkaloid thu nhận được từ vỏ thân Gáo vàng khi sử dụng enzyme pectinase ở nồng độ 2 U/mL đạt kết quả $26,52 \pm 0,06$ mg/g cao chiết, khác biệt này có ý nghĩa thống kê so với đối chứng và nghiệm thức sử dụng cellulase hoặc pectinase + cellulase. Thêm vào đó, nếu pectinase được tăng nồng độ là 8 U/mL, hàm lượng alkaloid đạt được cao nhất là $38,53 \pm 0,08$ mg/g cao chiết. Nghiên cứu tương tự cho thấy pectinase phá vỡ thành tế bào, tạo hiệu quả tốt nhất trong ly trích anthocyanin từ khoai lang tím (*Ipomea batata*) so với các enzyme sử dụng là protease, amylase và cellulase (Sirven, 2015). Enzyme pectinase ở nồng độ 1% (v/w) hỗ trợ tách chiết thảo dược *Aster scaber*, đạt được hàm lượng polysaccharide cao nhất là 3,8% so với amylase, cellulase (Song *et al.*, 2018). Trên lá Rosemary (*Rosmarinus officinalis*), sử dụng protease và pectinase làm tăng hơn 18% hàm lượng hợp chất phenolic ly trích so với cellulase và hemicellulase (Pontillo *et al.*, 2021).

Trong các loại dung môi khảo sát, ethanol là loại dung môi phổ biến trong chiết tách alkaloid do tương đối ít độc hại và hòa tan hiệu quả alkaloid trong phạm vi rộng, ethanol cho kết quả thu được hàm lượng alkaloid cao nhất đạt $31,88 \pm 0,04$ (mg AE/ g cao chiết) từ vỏ thân Gáo vàng. Khảo nghiệm về nồng độ của dung môi này, nghiệm thức 70% đạt hàm lượng alkaloid $68,61 \pm 0,05$ (mg AE/ g cao chiết), khác biệt có ý nghĩa so với các nồng độ khác. Một số kết quả khảo sát cho thấy cao chiết ethanol của lá cây Gáo vàng có hàm lượng phenols cao nhất (Raghavamma *et al.*, 2011), cao chiết ethanol của vỏ rễ cây Gáo lá (*Nauclea latifolia*) cho hàm lượng alkaloid cao hơn vỏ thân (Egbung *et al.*, 2013), hiệu suất cũng như hàm lượng flavonoid đạt cao nhất khi chiết tách vỏ thân cây Gáo trắng (*Neolamarckia cadamba*) với dung môi ethanol 70% (Yadav *et al.*, 2022).

Tỷ lệ nguyên liệu:dung môi là yếu tố làm ảnh hưởng tới hàm lượng alkaloid được tách chiết từ vỏ thân cây Gáo vàng. Với tỷ lệ là 1:20 (g/mL), kết quả tách chiết cao nhất cho hàm lượng alkaloid đạt $72,67 \pm 0,01$ (mg AE/ g cao chiết). Qua khảo sát về thời gian và nhiệt độ tách chiết, kết quả hàm lượng alkaloid được ghi nhận đạt $74,55 \pm 0,02$ (mg AE/ g cao chiết) trong thời gian 80 phút ở nhiệt độ 70 °C. So với kết quả nghiên cứu trước đây về ly trích alkaloid cho thấy, trên thân rễ cây *Coptis chinensis*, hàm lượng alkaloid thu nhận được đạt 140,49 (mg AE/ g cao chiết), với dung môi ethanol 50%, tỷ lệ nguyên liệu: dung môi 1:35 (w/v) trong điều kiện nhiệt độ 80°C và thời gian 60 phút (Teng *et al.*, 2012).

Các khảo sát trên đưa tới kết quả hàm lượng alkaloid từ vỏ thân cây Gáo vàng Ninh Bình đạt được cao nhất (74,55 mg/g) trong điều kiện tách chiết với dung môi ethanol 70%, tỷ lệ nguyên liệu:dung môi 1:20 (g/mL), thời gian 80 phút và nhiệt độ 70 °C, cùng sự hỗ trợ của enzyme pectinase ở nồng độ 8 U/mL.

Tối ưu hóa điều kiện tách chiết alkaloid

Dựa trên kết quả về điều kiện tách chiết của các thí nghiệm trên, 3 yếu tố về tỷ lệ nguyên liệu: dung môi, thời gian và nhiệt độ tách chiết được chọn là những biến số chính để đạt hàm lượng alkaloid tối đa từ thân rễ cây Gáo vàng. Nhằm xác định sự kết hợp tốt nhất của các điều kiện tách chiết, thiết kế tối ưu hóa được thực hiện. Ma trận thí nghiệm được xử lý và thiết lập bằng phần mềm Minitab 21 theo mô hình RSM – BBD với 3 yếu tố được mã hóa ở 3 mức là -1, 0, +1. Bảng 1 trình bày các giá trị mã hóa của 3 yếu tố sử dụng trong thí nghiệm. Với 15 thí nghiệm được tiến hành theo ma trận BBD, kết quả hàm lượng alkaloid dự đoán và thực nghiệm được trình bày trong Bảng 2. Phương trình hồi quy biểu diễn ảnh hưởng giữa các yếu tố với các biến mã hóa được thiết lập như sau:

$$Y = 74,1237 + 0,08413 X_1 + 0,02625 X_2 + 0,02512 X_3 - 0,2461 X_1X_1 - 0,0853 X_2X_2 - 0,0666 X_3X_3 + 0,0598 X_1X_2 - 0,0380 X_1X_3 - 0,0228 X_2X_3$$

Trong đó, Y: Hàm lượng alkaloid (mg AE/g cao chiết), X₁: Tỷ lệ nguyên liệu và dung môi (g/mL), X₂: Nhiệt độ tách chiết (°C), X₃: Thời gian tách chiết (giờ)

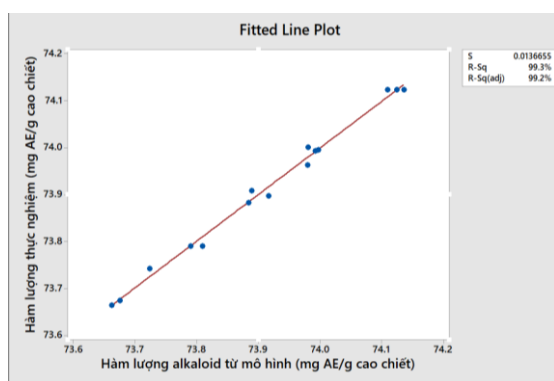
Bảng 1. Phạm vi và mức biến đổi của các đơn yếu tố

Yếu tố	Ký hiệu	Mức biến mã		
		-1	0	1
Tỷ lệ nguyên liệu: dung môi (g/mL)	X ₁	1:15	1:20	1:25
Nhiệt độ tách chiết (°C)	X ₂	60	70	80
Thời gian tách chiết (phút)	X ₃	60	80	100

Bảng 2. Kết quả thực nghiệm và dự đoán từ mô hình RSM-BBD

Thí nghiệm	Yếu tố						Hàm lượng alkaloid (mg AE/g cao chiết)	
	X ₁	X ₂	X ₃	Tỷ lệ NL:DM (g/mL)	Nhiệt độ tách chiết (°C)	Thời gian tách chiết (phút)	Kết quả thực nghiệm	Kết quả dự đoán từ mô hình
1	-1	0	-1	1:15	70	60	73,662	73,664
2	-1	1	0	1:15	80	80	73,675	73,675
3	0	0	0	1:20	70	80	74,136	74,124
4	-1	-1	0	1:15	60	80	73,724	73,742
5	1	1	0	1:25	80	80	7,980	73,962
6	0	1	1	1:20	80	100	73,981	74,000
7	0	0	0	1:20	70	80	74,110	74,124
8	1	0	1	1:25	70	100	73,884	73,882
9	0	-1	1	1:20	60	100	73,992	73,993
10	0	-1	-1	1:20	60	60	73,917	73,898
11	0	0	0	1:20	70	80	74,125	74,124
12	-1	0	1	1:15	70	100	73,809	73,790
13	1	-1	0	1:25	60	80	73,790	73,790
14	0	1	-1	1:20	80	60	73,997	73,996
15	1	0	-1	1:25	60	60	73,889	73,908

Kết quả phân tích biến lượng ANOVA của mô hình đáp ứng RSM được trình bày ở Bảng 3. Giá trị P-value <0,05 của mô hình được thiết lập chứng minh mô hình có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95%. Thêm vào đó, sự phù hợp của mô hình được đánh giá bởi hệ số R² (R-sq) cho thấy sự tương quan cao giữa giá trị dự đoán và thực nghiệm (Hình 1). Theo Bảng 4, R² đạt 99,28% chứng tỏ mức độ đáp ứng phù hợp của số liệu thu nhận được từ thực nghiệm so với mô hình, tương tự với giá trị hiệu chỉnh R-sq(adj) là 97,22% gần với R². Hơn nữa, giá trị dự đoán có mối tương quan cao do trị số R-sq(pred) cao (89,83%), giải thích mô hình cho kết quả chính xác tương ứng trong thực nghiệm.



Hình 1. Sự tương quan giữa hàm lượng alkaloid của vỏ thân cây Gáo vàng theo thực nghiệm và dự đoán từ mô hình RSM-BBD

Giá trị P-value <0,05 của các yếu tố khảo sát chứng tỏ sự thay đổi của X_1 (tỷ lệ nguyên liệu:dung môi), X_2 (nhiệt độ) và X_3 (thời gian) có ảnh hưởng đến hàm lượng alkaloid tách chiết từ vỏ thân cây Gáo vàng, khác biệt này có ý nghĩa về mặt thống kê. Thêm vào đó, tác động của 2 cặp yếu tố khảo sát là $X_1 \times X_2$ (tỷ lệ nguyên liệu:dung môi và nhiệt độ tách chiết) và $X_1 \times X_3$ (tỷ lệ nguyên liệu:dung môi và thời gian tách chiết) được phân tích và đánh giá với giá trị P-value <0,05 chứng tỏ sự tương tác kết hợp của 2 cặp yếu tố này ảnh hưởng đến hàm lượng alkaloid với khác biệt thống kê có ý nghĩa. Riêng cặp yếu tố $X_2 \times X_3$ (thời gian và nhiệt độ tách chiết) với P-value = 0,095 cho thấy tác động kết hợp của cặp yếu tố này không đem lại ảnh hưởng khác biệt đến hàm lượng alkaloid.

Ảnh hưởng kết hợp của các cặp yếu tố khảo sát (khi yếu tố còn lại được giữ cố định) được minh họa ở Hình 3. Với X_1 và X_2 , hàm lượng alkaloid tăng khi tỷ lệ nguyên liệu:ethanol và nhiệt độ tăng nhưng sau đó giảm dần, tuy nhiên yếu tố nhiệt độ cho sự suy giảm hàm lượng alkaloid chậm hơn. Hàm lượng alkaloid cao nhất nhất ở tỷ lệ nguyên liệu: ethanol khoảng 1:20 (g/mL) và thấp nhất khoảng 1:30 (g/mL) với nhiệt độ tách chiết nhất định. Hàm lượng alkaloid tăng theo nhiệt độ tách chiết cao nhất ở khoảng 70 °C và thấp nhất ở 40 °C với tỷ lệ nguyên liệu: ethanol nhất định (Hình 2a).

Bảng 3. Kết quả phân tích phương sai của mô hình hồi quy

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model	9	0,336153	0,037350	76,38	0,000*
Linear	3	0,067179	0,022393	45,79	0,000*
X1	1	0,056616	0,056616	115,78	0,000*
X2	1	0,005513	0,005513	11,27	0,020*
X3	1	0,005050	0,005050	10,33	0,024*
Square	3	0,246847	0,082282	168,27	0,000*
X1*X1	1	0,223595	0,223595	457,27	0,000*
X2*X2	1	0,026887	0,026887	54,98	0,001*
X3*X3	1	0,016369	0,016369	33,48	0,002*
2-Way Interaction	3	0,022126	0,007375	15,08	0,006*
X1*X2	1	0,014280	0,014280	29,20	0,003*
X1*X3	1	0,005776	0,005776	11,81	0,018*
X2*X3	1	0,002070	0,002070	4,23	0,095
Error	5	0,002445	0,000489		
Lack-of-Fit	3	0,002104	0,000701	4,12	0,202
Pure Error	2	0,000341	0,000170		
Total	14	0,338598			

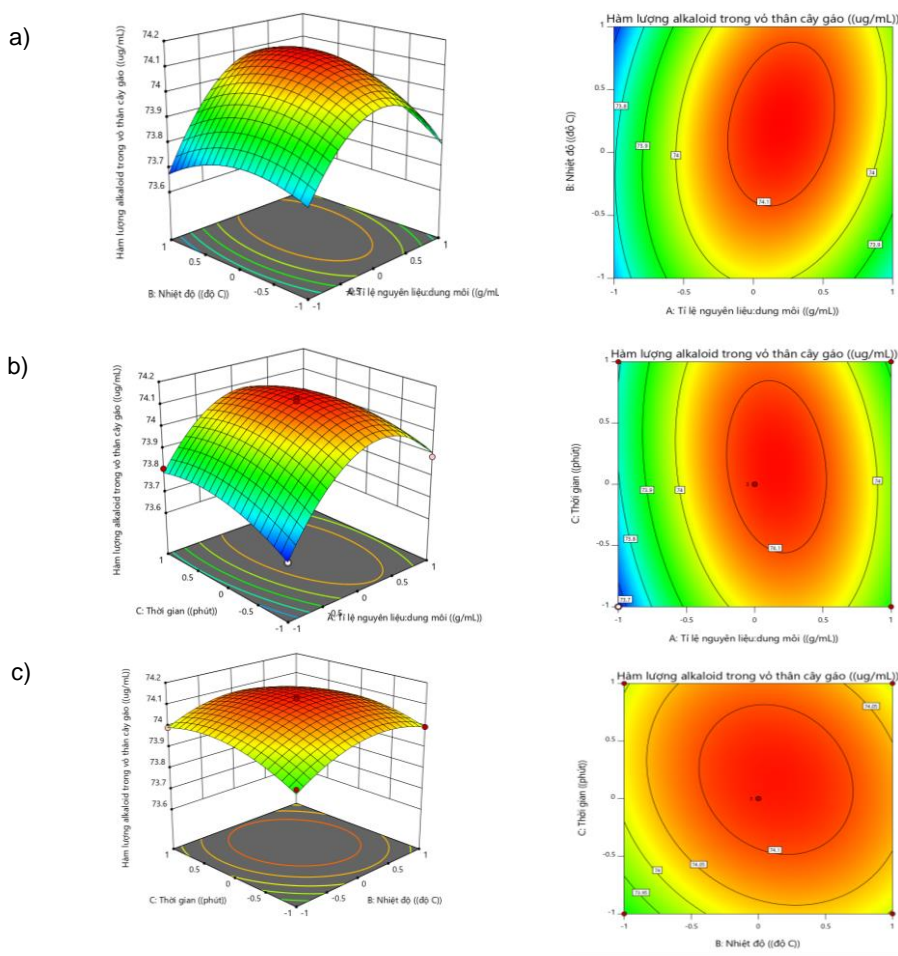
*: Các giá trị p < 0,05 cho biết các yếu tố ảnh hưởng có ý nghĩa thống kê.

Bảng 4. Các giá trị về hệ số tương quan R² trong mô hình hồi quy

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0,022	99,28%	97,22%	89,83%

Tương tự với X₁ và X₃, tỷ lệ nguyên liệu: dung môi và thời gian tăng làm tăng hàm lượng alkaloid và suy giảm sau đó, tuy nhiên yếu tố thời gian không tạo được hiệu quả gia tăng cao. Khi thời gian tách chiết khác nhau, hàm lượng alkaloid thấp nhất là ở khoảng thời gian tách chiết 120 phút và bắt đầu tăng dần đến giá trị lớn nhất ở khoảng 80 phút và sau đó giảm dần. Với ảnh hưởng của thời gian tách chiết, hàm lượng alkaloid tăng từ tỷ lệ nguyên liệu: ethanol 1:10 (g/mL) và đạt cực đại ở khoảng tỷ lệ 1:20 (g/mL) rồi bắt đầu giảm dần. Hàm lượng alkaloid thấp nhất ở tỷ lệ nguyên liệu: ethanol khoảng 1:30 (g/mL) và thời gian tách chiết 60 phút. Với X₂ và X₃, mức độ ảnh hưởng kết hợp của cặp yếu tố này là không đáng kể do có cùng ảnh hưởng tương đương tới hàm lượng alkaloid. Khi tăng đồng thời hoặc riêng lẻ từng yếu tố trong khoảng 70 °C và thời gian tách chiết từ 80 phút, thì hàm lượng alkaloid cũng gần như bằng nhau (Hình 2c).

Sau cùng, theo dự đoán từ mô hình, giá trị cực đại của Y là 74,14 (mg AE/g cao chiết) khi giá trị của biến X₁ là 0,1919, X₂ là 0,2121 và X₃ là 0,0909 (Hình 3). Điều này tương ứng với hàm lượng alkaloid tách chiết từ cây Gáo vàng Ninh Bình được tối ưu khi tỷ lệ nguyên liệu:dung môi là 1:20,96 (g/mL), nhiệt độ tách chiết là 72,12 °C và thời gian tách chiết là 81,82 (phút).



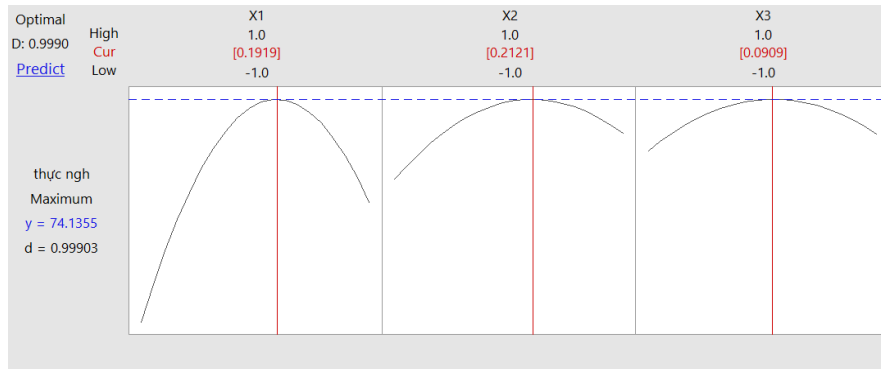
Hình 2. Tác động tương tác giữa các yếu tố theo mô hình RSM-BBD về hàm lượng alkaloid trong vỏ thân cây Gáo vàng

a) Nhiệt độ và tỷ lệ nguyên liệu: dung môi, b) Thời gian và tỷ lệ nguyên liệu: dung môi, c) Thời gian và nhiệt độ

Kiểm chứng mô hình thiết kế thí nghiệm tối ưu hóa

Tiến hành thí nghiệm với các điều kiện được tối ưu từ đó đánh giá mức độ chính xác của mô hình. Kết quả đạt được từ thực nghiệm kiểm chứng cho hàm lượng alkaloid là 74,25 ± 0,04 (mg AE/g cao chiết), so với giá trị tiên đoán là 74,13 (mg AE/g cao chiết). Như vậy, kết quả kiểm chứng có giá trị tương đương với mô hình, không có sự khác biệt ý nghĩa. Điều này có nghĩa là mô hình thiết lập có thể được áp dụng để mô tả sự liên quan giữa hàm

lượng alkaloid và các điều kiện tách chiết từ vỏ thân cây Gáo vàng. Đáng ghi nhận, hàm lượng alkaloid này cao hơn đáng kể so với 30,9 mg/g của lá *Carica papaya* (Devi *et al.*, 2020), 22,3 mg/g của củ *Stephania cambodica* (Dary *et al.*, 2018), 14,86 mg/g của lá *Grewia tiliaefolia* (Devia *et al.*, 2021), 7,48 mg/g của vỏ quả *Annona muricata* (Aguilar-Hernández *et al.*, 2020), chứng tỏ rằng vỏ thân cây Gáo vàng Ninh Bình là nguồn alkaloid tiềm năng.



Hình 3. Giá trị tối ưu của các yếu tố dự đoán từ mô hình RSM-BBD về hàm lượng alkaloid trong vỏ thân cây Gáo vàng

Kết quả hoạt tính kháng oxy hóa của các cao phân đoạn

Các cao phân đoạn được điều chế từ cao tổng ethanol với các dung môi có độ phân cực tăng dần: n-hexane, chloroform, ethyl acetate, nước. Khả năng kháng oxy hóa của các cao phân đoạn được đánh giá bằng phương pháp bắt gốc tự do DPPH thể hiện qua giá trị IC₅₀ theo Bảng 5. Nhìn chung, các cao chiết có giá trị IC₅₀ thấp, hoạt tính kháng oxy hóa theo thứ tự từ cao tới thấp là vitamin C > cao ethyl acetate > cao ethanol > cao chloroform > cao n – hexane > cao nước. Theo số liệu cho thấy, cao phân đoạn ethyl acetate từ vỏ thân cây Gáo vàng có khả năng kháng oxy hóa, tuy thấp hơn vitamin C (IC₅₀=19,27±1,34 µg/mL), nhưng cao nhất so với cao tổng và các cao phân đoạn khác trong hoạt động trung hòa gốc tự do DPPH với IC₅₀=36,79±1,17 µg/mL. Cao tổng ethanol cũng chứng tỏ khả năng bắt gốc tự do cao với IC₅₀ 59,85±0,96 so với cao n – hexane, cao chloroform và cao nước. Ghi nhận thêm khi so sánh với cao chiết ethanol từ lá cây Gáo vàng có hoạt tính kháng oxy hóa DPPH là IC₅₀ 61,23±6,41 µg/mL (Raghavamma *et al.*, 2011), cao phân đoạn ethyl acetate của thân lá *Ruta chalepensis* với IC₅₀ 54,98 ± 0,54 µg/mL (Gali, Bedjou, 2019), cao phân đoạn ethyl acetate của vỏ thân *Aidia genipiflora* với IC₅₀ 121,5±1,2 µg/mL (Anokwah *et al.*, 2022), cho thấy hiệu quả kháng oxy hóa của vỏ thân cây Gáo vàng Ninh Bình là cao hơn, đem lại giá trị ứng dụng tiềm năng trong y học.

Bảng 5. Giá trị IC 50 của cao tổng và cao phân đoạn vỏ thân cây Gáo vàng

Mẫu	Giá trị IC ₅₀
Cao tổng	59,85 ^d ± 0,96
Cao n – hexane	78,49 ^b ± 0,95
Cao chloroform	64,59 ^c ± 0,99
Cao ethyl acetate	36,79 ^e ± 1,17
Cao nước	96,32 ^a ± 1,43
Vitamin C	19,27 ^g ± 1,34

Chú thích: Trong cùng một cột các chữ cái theo sau các giá trị trung bình giống nhau thì không có sự khác biệt có ý nghĩa (p < 0,05).

Đánh giá hoạt tính ức chế tế bào bằng phương pháp MTT

Cao chiết vỏ thân cây Gáo vàng thể hiện tác động ức chế sự tăng trưởng của tế bào ung thư gan *HepG2*. Theo Bảng 6, sau 24 giờ, ở nồng độ 700-900 µg/mL, cao chiết làm giảm mạnh tế bào sống, gây ức chế được 35,64 - 39,94% tế bào *HepG2*, gần tương đương với chứng dương cisplatin ức chế 41,63% ở nồng độ 4 ppm. Tỷ lệ ức chế tăng trưởng tế bào đạt thấp hơn từ 24,38 – 27,48% được ghi nhận ở các nồng độ cao chiết 500-600 µg/mL. Ở giếng đối chứng không xử lý, các tế bào *HepG2* có sự tăng sinh so với ban đầu, tỷ lệ tế bào sống là 100%. Ở các giếng bổ sung cao chiết với nồng độ 700-900 µg/mL, nhiều tế bào *HepG2* co lại, không còn giữ hình dạng như ban đầu và hầu như không tăng sinh, tỷ lệ tế bào *HepG2* sống chỉ còn 60,06±6,58 - 64,36±9,87%, nồng độ cao chiết cao làm cho tỷ lệ tế bào *HepG2* sống được thấp hơn. Điều này gần như tương đương khi so sánh với giếng chứa cisplatin, tỷ lệ tế bào ung thư gan *HepG2* còn tồn tại là 58,37±8,56%. Do vậy, kết quả này đã chứng tỏ giá trị truyền thống của cây Gáo vàng trong hỗ trợ điều trị bệnh ung thư.

Theo các nghiên cứu trước, Shichaem và đồng tác giả (2010) đã tìm thấy 2 hợp chất alkaloid đồng phân trong rễ cây Gáo vàng đem lại hoạt tính gây độc tế bào ung thư biểu mô KB và tế bào Hela. Liu và đồng tác giả (2017)

cho biết trong 8 nhóm hợp chất alkaloid được phân lập từ thân và lá cây Gáo vàng, có 4 nhóm được đánh giá hiệu quả ý nghĩa đem lại khả năng kháng 5 dòng tế bào ung thư ở người (HL-60, SMMC-7721, A-549, MCF-7 và SW48) so với đối chứng cisplatin. Wang và đồng tác giả (2015) đã xác định 2 nhóm hợp chất alkaloid tách chiết từ vỏ thân cây Gáo cam (*N. officinalis*) có tác dụng ức chế trung bình 3 dòng tế bào ung thư ở người (HT29, SGC7901 và PLC/PRF/5) so với đối chứng cisplatin. Razali và đồng tác giả (2021) đã chứng minh rằng chiết xuất ethanol của lá cây Gáo trắng (*Neolamarckia cadamba*) có tác dụng chống tế bào ung thư vú MCF-7 ở người thông qua việc gây ra quá trình chết theo chu trình tế bào.

Bảng 6. Ức chế tăng trưởng tế bào ung thư gan HepG2 của cao chiết vỏ thân Gáo vàng ở các nồng độ khác nhau

Mẫu	Nồng độ (µg/mL)	OD ₅₄₀			Trung bình	Tỷ lệ tế bào sống (%)			Trung bình
		Lần 1	Lần 2	Lần 3		Lần 1	Lần 2	Lần 3	
Đối chứng không xử lý	-	1,18	1,25	1,38	1,27±0,10	93,47	99,12	107,41	100,00±7,01
	900	0,73	0,69	0,85	0,76±0,08	57,98	54,77	67,43	60,06±6,58
	800	0,83	0,71	0,75	0,76±0,06	65,59	56,38	59,14	60,37±4,73
Cao chiết vỏ thân cây Gáo vàng Ninh Bình	700	0,68	0,85	0,92	0,81±0,13	53,46	66,95	72,68	64,36±9,87
	600	1,03	0,87	0,96	0,96±0,08	81,87	68,85	76,22	75,62±6,49
	500	1,06	1,01	1,05	1,04±0,03	84,25	80,13	83,18	82,52±2,14
Đối chứng dương (Cisplatin)	4 ppm	0,79	0,61	0,81	0,74±0,11	62,73	48,51	63,85	58,37±8,56

KẾT LUẬN

Kết quả kiểm chứng mô hình tối ưu hóa bằng phương pháp đáp ứng bề mặt RSM-BBD, hàm lượng alkaloid tách chiết từ vỏ thân cây Gáo vàng có giá trị tương đương với thực nghiệm, không có sự khác biệt ý nghĩa. Cao phân đoạn ethyl acetate từ vỏ thân cây Gáo vàng có khả năng kháng oxy hóa chống lại gốc DPPH cao nhất với giá trị IC₅₀ là 36,79 µg/mL, thấp hơn vitamin C 1,91 lần. Đáng lưu ý là cao chiết vỏ thân cây Gáo vàng gây độc dòng tế bào ung thư gan HepG2 với tỷ lệ đạt 35,64-39,94% tại nồng độ 800-900 µg/mL. Kết quả thu được định hướng cho việc nghiên cứu và phát triển sử dụng vỏ thân cây Gáo vàng Ninh Bình trong y học.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Chaikhram S, Buatana J, Meethangdee M, Luang-apiroon J, Sopin N, Jantabut K, Kloypan C and Surapinit S (2017). Alkaloids from *Nauclea orientalis* Inhibited *in vitro* ADP and Thrombin Induced Human Platelet Aggregation. University of Phayao, Thailand. *Thammasat Int J Sci Tech*, 22: 2.
- Heinrich M, Mah J, Amirkia V (2021). Alkaloids Used as Medicines: Structural Phytochemistry Meets Biodiversity—An Update and Forward Look. *Molecules*, 26: 1836.
- Kaur R, Arora S (2015). Alkaloids—Important Therapeutic Secondary Metabolites of Plant Origin. *J Crit Rev*, 2:1–8.
- Lubek-Nguyen A, Ziemichód W, Olech M (2022). Application of Enzyme-Assisted Extraction for the Recovery of Natural Bioactive Compounds for Nutraceutical and Pharmaceutical Applications. *Appl Sci*, 12: 3232.
- Liu C, Yang S, Wang K, Bao X, Liu Y, Zhou S, Liu H, Qiu Y, Wang T, Yu H (2019). Alkaloids from Traditional Chinese Medicine against hepatocellular carcinoma. *Biomed Pharmacother*, 120: 109543.
- Raghavamma S, Rao N, Rao K, Rao G (2011). *In Vitro* antioxidant potential of crude extract from leaves of *Nauclea orientalis* Linn. *J Pharm Res*, 4 (5): 1548-1549.
- Said K & Amin M (2015). Overview on the response surface methodology (RSM) in extraction processes. *J Appl Eng Sci*, 2(1): 8-17.
- Sandamali J, Hewawasam R, Jayatilaka K, Mudduwa L (2022). *Nauclea orientalis* (L.) bark extract protects rat cardiomyocytes from doxorubicin-induced oxidative stress, inflammation, apoptosis, and DNA fragmentation. University of Ruhuna, Sri Lanka. *Oxid Med Cell Longev*, 2022: 19.
- Sichaem J, Surapinit S, Siripong P, Khumkratok S, Jong-Aramruang J, Tip-pyang S (2010). Two new cytotoxic isomeric indole alkaloids from the roots of *Nauclea orientalis*. *Fitoterapia*, 81: 830–833.
- Sichaem J, Worawalai W, Tip-pyang S (2012). Chemical constituents from the roots of *Nauclea orientalis*. *Chem Nat Compd*, 48(5): 827–830.
- Sirven MA (2015). Effect of Enzyme-Assisted Extraction of Anthocyanins from Purple Sweet Potato on Total Soluble Solids and Yield of Pigment. PhD dissertation. Department of Nutrition and Food Science, Texas A&M University, US.
- Zhang Z, ElSohly HN, Jacob MR, Pasco DS, Walker LA, Clark AM (2001). New indole alkaloids from the bark of *Nauclea orientalis*. *J Nat Prod*, 64: 1001–5.
- Zhu F, Wang J, Yin R, Song J, Li X, Jia X (2014). Review on chemical constituents of genus *Nauclea*. *China J Tradit Chin Med Pharm*, 29(09): 2877–80.

OPTIMIZATION OF THE ENZYME-ASSISTED EXTRACTION OF ALKALOID CONTENT AND ANTIOXIDANT, CYTOTOXIC ACTIVITIES FROM *Nauclea orientalis* STEM BARK EXTRACT

Minh Tan Pham^{*}, Tran Bao Tram Mai, Thị Dung Tran

Faculty of Applied Sciences, Ton Duc Thang University

SUMMARY

Nauclea orientalis L. is a native plant with many valuable medicinal properties, due to biological compounds which have useful activities, especially in its stem bark containing alkaloid. This study determined the maximum value of the factors affecting the extracted alkaloid content on the basis of single-factor experiments and optimized under the Response Surface Methodology (RSM) with a Box-Behnken Design (BBD). The results showed that the optimal conditions for enzyme-assisted (8 U/mL pectinase) alkaloid extraction from *N. orientalis* stem bark was the ratio of raw material: solvent 1:20.96 (g/mL), temperature extraction 72.12 (°C) and time extraction 81.82 (min) to achieve the highest alkaloid content of 74.25 ± 0.04 (mg AE/g), which was well matched with the predicted yield. The ethyl acetate of stem bark fraction exhibited the remarkable 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DDPH) radical scavenging capacity with $IC_{50} 36.79 \pm 1.17$ μ g/mL, only 1.91 times lower than vitamin C. The cytotoxic activity of *HepG2* on liver cancer by 3 - [4,5 - dimethylthiazol - 2 - yl] - 2,5 - diphenyl tetrazolium bromide (MTT) method with the highest inhibitory ability obtained 39.94% at the concentration of 900 μ g/mL extract. Due to the biological effects of alkaloid extract from stem bark through *in vitro* activity investigation, Ninh Binh *N. orientalis* will have good potential for medicinal development in future.

Keywords: Alkaloid, cytotoxic activity, enzyme-assisted extraction, *Nauclea orientalis*, scavenging capacity.

^{*} Author for correspondence: Tel: 0963717643; Email: phamminhtan@tdtu.edu.vn