

## HOẠT TÍNH *IN VITRO* CỦA DỊCH CHIẾT METHANOL MỘT SỐ GIỐNG *PIPER METHYSTICUM* ĐỐI VỚI THỤ THỂ CHỌN LỌC CỦA HỆ THẦN KINH TRUNG ƯƠNG NGƯỜI ĐƯỢC TỔNG HỢP NHỜ HỆ THỐNG VIRUS SEMLIKI FOREST

Đình Đoàn Long<sup>1</sup>, Lê Huy Hàm<sup>1</sup>, Đỗ Năng Vịnh<sup>1</sup>, Trần Duy Quý<sup>1</sup>, Urs Simmen<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Viện Di truyền Nông nghiệp, Từ Liêm, Hà Nội, Việt Nam

<sup>2</sup>Công ty F. Hoffmann-La Roche, Basel, Thụy Sĩ

(Nhận bài ngày 23 tháng 5 năm 2001)

### Summary

#### In vitro Activities of Methanol Extracts from Kava Cultivars on Virus Binding to CNS receptors

*Methanolic extracts of the leaf and root of Hawaiian kava (Piper methysticum Forst.) cultivars, Mahakea, Nene, Purple Moi and PNG, were tested on binding affinities to CNS receptors including GABA<sub>A</sub> (GABA and benzodiazepin binding site), dopamine D<sub>2</sub>, opioid ( $\mu$  and  $\delta$ ), serotonin (5-HT<sub>6</sub> and 5-HT<sub>7</sub>) and histamin (H<sub>1</sub> and H<sub>2</sub>). HPLC analysis was carried out in order to determine the amount of the main kavalactons kavain, 7,8-dihydrokavain, methysticin, 7,8-dihydromethysticin, yangonin and 5,6-demethoxyyangonin. The most potent binding inhibition was observed for leaf extracts to GABA<sub>A</sub> receptors with IC<sub>50</sub> values of approximately 3  $\mu$ g/ml, whereas root extracts were less active with IC<sub>50</sub> values ranging from 5  $\mu$ g/ml (Nene) to 87  $\mu$ g/ml (Mahakea). Since the leaf extracts generally contained lower amounts of kavalactons than the root extracts, there might exist additional substances responsible for these activities. Leaf extracts also inhibited binding to dopamine D<sub>2</sub>, opioid ( $\mu$  and  $\delta$ ) and histamin (H<sub>1</sub> and H<sub>2</sub>) receptors more potently than the corresponding root extracts with IC<sub>50</sub> values ranging from 1 to 100  $\mu$ g/ml vs.  $\geq$  100  $\mu$ g/l, respectively. Significant differences in the potential of binding inhibition were also observed between cultivars. Binding to serotonin (5-HT<sub>6</sub> and 5-HT<sub>7</sub>) and benzodiazepin receptors was only weakly inhibited by both root and leaf extracts of all four cultivars.*

*In conclusion, our investigation indicates that the GABA<sub>A</sub>, dopamine D<sub>2</sub>, opioid ( $\mu$  and  $\delta$ ) and histamin (H<sub>1</sub> and H<sub>2</sub>) receptors might be involved in the pharmacological action of kava extracts. Since the cultivars contained similar amounts of kavalactons, while their pharmacological activities differed markedly, other constituents may play a role in the observed activities. Additionally, leaves generally exhibited more potent binding inhibition than roots, therefore leaf of *P. methysticum* might be an interesting objective for further pharmacological studies.*

*Keywords:* Piper methysticum, root and leaf extracts, cultivars, human CNS recombinant receptors.

*Các chữ viết tắt và ký hiệu:* BHK = baby hamster kidney (thận chuột ham-x-tơ), CHO = Chinese hamster ovary (buồng trứng chuột Trung quốc), CNS = central nervous system (hệ thần kinh trung ương), DMY = 5,6-demethoxyyangonin, DHM = 7,8-dihydromethysticin, DHK = 7,8-dihydrokavain, GABA =  $\gamma$ -amino butyric acid, <sup>3</sup>H-LSD = <sup>3</sup>H-lysergic acid diethylamide, RP - HPLC: Reversed-phase high performance liquid chromatography (sắc ký lỏng cao áp đảo pha), IC<sub>50</sub> = 50% inhibitory concentration (nồng độ ức chế 50 %), SFV = Semliki Forest Virus (virus Semliki Forest).

### Mở đầu

Kava (*Piper methysticum* Forster) là một loài cây thuốc có giá trị kinh tế cao của vùng nhiệt đới, đến nay chỉ phân bố ở miền nam Thái bình dương

(Hawaii, Polynesia, Micronesia và Papua New-Guinea). Trong thực tế, loài cây này là một tài sản quý và thành phần quan trọng của hàng trăm bài thuốc dân gian được sử dụng rộng rãi qua nhiều thế kỷ trên các đảo thuộc vùng nam Thái

bình dương. Trong những năm gần đây, kava là một trong số ít cây thuốc của vùng nhiệt đới đã thu hút được sự quan tâm nghiên cứu của nhiều phòng thí nghiệm và các công ty hoá dược trên thế giới, đặc biệt là Mỹ và một số nước Tây Âu như Đức, Pháp, Áo, và Thụy Sĩ. Hàng chục công trình nghiên cứu được lý và lâm sàng đã chứng minh các đặc tính dược lý quý báu của kava, bao gồm các tác dụng an thần giải lo, giảm co cơ, chống co giật, gây tê tại chỗ, giảm đau, kích thích ngủ và chống thiếu máu cục bộ. Ngày nay, kava và các hoạt chất của nó là nguồn nguyên liệu của hàng trăm sản phẩm về dược đang được bán và sử dụng rộng rãi ở Mỹ và châu Âu. Cho đến nay, sáu hợp chất thuộc nhóm lacton đặc trưng của loài cây thuốc này được coi là các hợp chất có hoạt tính sinh học chính, gồm kavain, 7,8-dihydro-kavain (DIK), methysticin, 7,8-dihydro-methysticin (DHM), yangonin, 5,6-demethoxyyangonin (DMY) [1, 2].

Tuy vậy, các hợp chất kavalacton này thường không phân bố đồng đều trong các phần khác nhau của cây (thân, rễ, lá), và các giống khác nhau cũng thường có thành phần kavalacton khác nhau [1, 4]. Trong khi đó, hiệu quả dược lý thường được quan sát thấy có khác nhau giữa các giống [1]. Do đó, đã có giả thiết cho rằng hiệu lực khác nhau của các giống chính là do thành phần kavalacton khác nhau của chúng. Cho đến nay, phần rễ của loài cây thuốc này là bộ phận được sử dụng chủ yếu [1, 2]. Rễ thường chứa tổng hàm lượng các kavalacton cao hơn lá. Tuy vậy, một số nghiên cứu cho thấy DHM và DMK là hai hợp chất kavalacton có hoạt lực giảm đau và chống co giật mạnh hơn cả, lại phân bố chủ yếu ở lá [4, 5].

Về mặt dược lý, nhiều công trình nghiên cứu đã được tiến hành nhằm giải thích cơ chế dược học phân tử của các dịch chiết kava. Kavain có hoạt tính tương tác đặc hiệu trên kênh phụ thuộc điện thế  $\text{Na}^+$  [6]. Hoạt tính này có thể giải thích cho tác dụng gây tê tại chỗ, chống co giật và chống thiếu máu cục bộ [7, 8]. Tuy vậy, cho đến nay vẫn chưa có các dẫn chứng để giải thích cho cơ chế của các tác dụng dược lý khác, như an thần giảm lo, giảm co cơ, và gây ngủ. Các thụ thể (receptor) của hệ thần kinh trung ương rất có thể là các mục tiêu sinh học có liên quan đến các hoạt động sinh lý trên đây. Việc nghiên cứu trước đây về tương tác giữa các dịch chiết kava và một số thụ thể của hệ thần kinh trung ương đã không thu được kết quả mong đợi. Kretzschmar (1995) công bố rằng kavain không có hoạt tính tương tác với ví

trị bám của verapamil trên kênh  $\text{Ca}^{2+}$ , cũng không có hoạt tính tương tác với các receptor adrenergic ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ), serotonin 5-HT<sub>3</sub>, các receptor cholinergic ( $M_1$ ,  $M_3$ ), hệ GABA (GABA<sub>A</sub>, GABAuptake), hệ glicineric cũng như với các receptor họ opioid [13].

Mục đích nghiên cứu của chúng tôi nhằm làm sáng tỏ receptor nào của hệ thần kinh trung ương có liên quan đến các hoạt tính sinh học của các dịch chiết kava và tìm hiểu mối tương quan giữa hoạt tính sinh học *in vitro* với thành phần các hợp chất kavalacton. Với mục đích đó, chúng tôi đã sử dụng phương pháp "ức chế chất gắn phóng xạ đặc hiệu" (receptor radioligand binding assay) trên một số thụ thể của hệ thần kinh trung ương, gồm benzodiazepin, GABA<sub>A</sub>, dopamine D<sub>2</sub>, serotonin (5-HT<sub>6</sub> và 5-HT<sub>7</sub>), opioid ( $\mu$  và  $\delta$ ) và histamin ( $H_1$  và  $H_2$ ) với các dịch chiết từ lá và rễ của các giống kava khác nhau. Phương pháp sắc ký lỏng cao áp đảo pha (Reversed-phase High Performance Chromatography) được sử dụng để xác định thành phần kavalacton.

#### Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

##### *Vật liệu thực vật và xác định thành phần kavalacton của các dịch chiết*

Bốn giống kava, gồm *Mahakea*, *Nene*, *Purple Moi* và *PNG* được xác định và nhập từ trại giống Wainani (Hawaii). Các mẫu lá và rễ được thu từ cây 3 năm tuổi. Để chuẩn bị các dịch chiết methanol, lá và rễ được thu và sấy khô trong tủ sấy thông khí ở nhiệt độ 35°C trong 48 giờ, sau đó, nghiền nhỏ thành hạt có kích thước nhỏ hơn 0.1 mm và chiết xuất 2 lần với methanol trong bể siêu âm, mỗi lần 15 phút. Dung môi được bay hơi đến khô và phần cặn được hoà tan trong methanol đến nồng độ cuối cùng là 50 µg/ml. Các dịch chiết được bảo quản ở -20°C đến khi sử dụng cho phân tích HPLC và các phép thử trên các thụ thể.

Nồng độ cuối cùng của methanol trong các phép thử với các thụ thể không vượt quá 2%, do đó, hầu như không có ảnh hưởng đến kết quả phép thử (< 5%).

##### *Phân tích thành phần kavalacton của các dịch chiết Piper methysticum*

Việc phân tích HPLC sáu kavalacton chủ yếu được thực hiện theo phương pháp của Ross và cs. (1998) [14] trên cột Spherisorb - 5 ODS (5 µm, 250 x 4.6 mm) sử dụng hệ thống sắc ký lỏng cao áp Jasco nối với một diod array detector (Jasco

MD - 910). Các mẫu được phân tích trên pha lỏng gồm 22 % acetonitril, 18 % methanol và 60 % H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (50 mM) với tốc độ dòng 0.8 ml/phút ở 60°C trong vòng 50 phút. Các mẫu dịch chiết kava chuẩn (của hãng Addipharma GmbH, Harmburg, Đức. EKP 001 96; Ch. B 602140) được sử dụng làm đối chứng. Việc xác định thành phần kavalacton trong các dịch chiết được thực hiện thông qua việc so sánh thời gian qua cột (retention time) và diện tích pic (peak area) giữa các dịch chiết mẫu và dịch chiết tiêu chuẩn. Yangonin và DMY được đo ở bước sóng 360 nm, trong khi bốn kavalacton còn lại được đo ở bước sóng 240 nm. Mỗi mẫu được chiết xuất và phân tích HPLC 3 lần độc lập. Số liệu trình bày trong báo cáo này là giá trị trung bình ± dung sai tiêu chuẩn.

#### Chuẩn bị các thụ thể

Tổng hợp các receptor nhờ hệ thống virus Semliki Forest (SFV):

Các thụ thể của hệ thần kinh trung ương người được tổng hợp thông qua hệ thống SFV theo một quy trình được mô tả chi tiết trước đây [15]. Ở đây, chúng tôi mô tả vắn tắt như sau: các phân tử cADN chứa các gen quy định tổng hợp các thụ thể tương ứng được nhân lên (cloning) bằng véc tơ pSFV1 / pSFV2. Để sản xuất nhanh các hạt virus mang gen tái tổ hợp, các phân tử mRNA tương ứng được phiên mã nhờ enzym SP6 ARN polymerase từ các plasmid mang gen (cADN) thụ thể tái tổ hợp, sau đó virus được lây nhiễm vào các tế bào BHK (thận chuột Baby Hamster). Sau 24 giờ, các virus mang gen tổng hợp thụ thể tái tổ hợp được thu và rửa

theo quy trình của Lundstrom và cs. (1994) [16].

Để tổng hợp nhanh các thụ thể, các hạt virus mang cADN tái tổ hợp được lây nhiễm vào các tế bào CHO (buồng trứng chuột Chinese Hamster). Các tế bào CHO sau 16 - 48 giờ được thu và rửa qua trong dung dịch đệm 5 mM HEPES, pH 7.4, 2 mM EDTA và ngâm trong dung dịch này trong vòng 20 phút ở 4°C. Các tế bào sau đó được chuyển vào các ống ly tâm 10 ml, ly tâm ở 40.000 g trong vòng 15 phút và khuấy tán lại trong dung dịch đệm 50 mM Tris / HCl, pH 7.4, 1 mM EGTA và 5 mM MgCl<sub>2</sub> dưới máy khuấy tán Polytron. Sau khi ly tâm lại ở 40.000 g trong vòng 15 phút, phần lắng chứa các phân tử thụ thể tương ứng được thu lấy và bảo quản ở nhiệt độ - 80°C cho đến khi sử dụng cho các phép thử sinh học.

#### Xác định nồng độ protein:

Nồng độ protein tổng số trong các mẫu chuẩn bị thụ thể thu được trong quá trình mô tả ở trên được xác định bằng phương pháp BCA của Smith và cs. (1985) [17].

Xác định hoạt tính *in vitro* của các dịch chiết thực vật với các thụ thể:

Các phép thử sinh học nhằm xác định hoạt lực ức chế bám thụ thể của các dịch chiết kava trên cơ sở cạnh tranh với các chất gắn đặc hiệu được lặp lại 3 lần cho mỗi nồng độ thí nghiệm trong 500 µl hỗn hợp phản ứng. Cho mỗi dịch chiết trên từng thụ thể, phép thử sinh học được nhắc lại 3 lần dưới các điều kiện tóm tắt ở bảng 1.

**Bảng 1.** Các thụ thể, các chất gắn phóng xạ đặc hiệu và các điều kiện thực hiện phép thử sinh học trên các thụ thể

Thụ thể	Hàm lượng protein (µg)	Chất gắn phóng xạ đặc hiệu và nguồn gốc	Nồng độ chất gắn phóng xạ (nM)
<i>Opioid</i>			
µ	15 - 20	<sup>3</sup> H-Naloxon (NEN)	3.6
δ	15 - 20	<sup>3</sup> H-Deltorphin (Amersham)	0.28
Serotonin			
5-HT <sub>6</sub>	15 - 20	<sup>3</sup> H-LSD (NEN)	1.2
5-HT <sub>7</sub>	15 - 20	<sup>3</sup> H-LSD	1.2
Histamin			
H1	15 - 20	<sup>3</sup> H-Pyridilamin (Amersham)	1.6
H2	15 - 20	<sup>3</sup> H-Tiotidin (NEN)	2.5
GABA <sub>A</sub>	15 - 20	<sup>3</sup> H-Muscimol (NEN)	2.0
Benzodiazepin	200	<sup>3</sup> H-Flumazenil (Amersham)	1.0
Dopamin D <sub>2</sub>	120	<sup>3</sup> H-Spiperon (Amersham)	0.2

Phản ứng cạnh tranh bám thụ thể (giữa dịch chiết thực vật và chất gắn đặc hiệu được đánh dấu phóng xạ) được dừng lại nhờ việc lọc nhanh hỗn hợp phản ứng qua màng GF / C trong điều kiện chân không và rửa 3 lần với 5 ml dung dịch đệm Tris / HCl (pH 7.4, 4°C). Hoạt độ phóng xạ trên màng được xác định nhờ thiết bị đo phóng xạ nhấp nháy (Tri - carb 2100 TR, công ty Packard Bioscience). Hoạt lực cạnh tranh bám thụ thể của các dịch chiết thực vật được biểu diễn thông qua nồng độ ức chế bám 50 % chất gắn đặc hiệu (IC<sub>50</sub>). Các thông số thực nghiệm về khả năng cạnh tranh bám thụ thể đặc hiệu của các dịch chiết thực vật ở các nồng độ khác nhau được sử dụng để xây dựng đường cong ức chế nhằm thực hiện phép hồi quy và xác định giá trị IC<sub>50</sub> bằng chương trình phần mềm thống kê sinh học SigmaPlot 5.0 Giá trị IC<sub>50</sub> trình bày trong báo cáo này là giá trị trung bình ± sai số tiêu chuẩn (standard error of the means).

### Kết quả

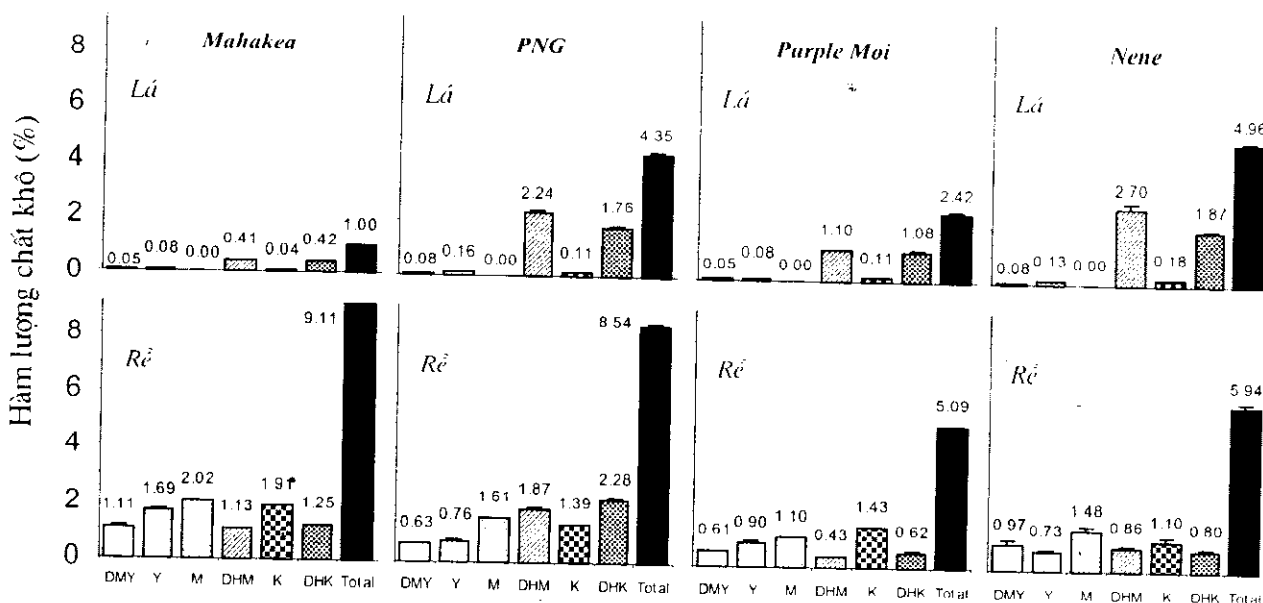
#### Phân tích thành phần kavalacton bằng kỹ thuật HPLC

Thành phần kavalacton trong các dịch chiết lá và rễ thuộc bốn giống kava sử dụng trong thí nghiệm (*Mahakea*, *Purple Moi*, *PNG* và *Nene*) được trình bày trên hình 1.

Trong các dịch chiết lá của cả bốn giống, DHK và DHM là hai kavalacton chủ yếu chiếm trên 70 % tổng hàm lượng các kavalacton. Trong khi đó ở rễ, hàm lượng của sáu kavalacton này tương đương nhau, trong đó mỗi hợp chất chiếm từ 10 đến 20 %. Trong rễ, kavain chiếm từ 1,1 % (*Nene*) đến 1,9 % (*Mahakea*) lượng chất khô. Hợp chất này chỉ phát hiện ở hàm lượng rất thấp trong các dịch chiết lá (ít hơn 0.2 %). Methysticin tìm thấy trong rễ với các nồng độ tương tự như kavain, nghĩa là từ 1 đến 2 %, trong khi hoàn toàn không xuất hiện ở rễ. Trừ giống *Mahakea*, các lá của ba giống còn lại nhìn chung chứa DHK và DHM ở hàm lượng cao hơn rõ rệt so với rễ. Hàm lượng kavalacton tổng số trong các dịch chiết lá của *Purple Moi*, *PNG* và *Nene* tương ứng là 2,42; 4,35 và 4,96 %. Trong các dịch chiết rễ, hàm lượng kavalacton tổng số chiếm từ 5,09 ± 0,02 % (*Purple Moi*) đến 9,12 ± 0,07 % (*Mahakea*).

#### Tương tác giữa các dịch chiết lá và rễ kava với các thụ thể của hệ thần kinh trung ương người

Bảng 2 tóm tắt các giá trị IC<sub>50</sub> thu được từ các phép thử sinh học tương tác *in vitro* giữa dịch chiết lá và rễ của bốn giống kava trên các thụ thể của hệ thần kinh trung ương. Khả năng tương tác mạnh nhất nhận được giữa các dịch chiết lá và các thụ



**Hình 1.** Xác định thành phần hoá học của dịch chiết rễ và lá các giống kava *Mahakea*, *PNG*, *Purple Moi* và *Nene* bằng sắc ký lỏng cao áp. DHK: 7,8-dihydrokavain, DHM: 7,8-dihydromethysticin, DMY: 5,6-demetoxyyangonin, K: kavain, M: methysticin, Y: yangonin

**Bảng 2.** Ảnh hưởng của các dịch chiết *Piper methysticum* Forst. đến khả năng bám của các chất gắn phóng xạ đặc hiệu tới các thụ thể của hệ thần kinh trung ương

Mẫu thử	Giá trị $IC_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )								
	Benzodiazepin	Dopamin $D_2$	GABA <sub>A</sub>	Opioid		Histamin		Serotonin	
				$\mu$	$\delta$	H1	H2	5-HT <sub>6</sub>	5-HT <sub>7</sub>
Dịch chiết rễ Mahakea	860 ± 60	850 ± 22	87 ± 17	592 ± 34	185 ± 61	850 ± 37	806 ± 53	>1000	492 ± 13
Dịch chiết lá Mahakea	510 ± 35	68 ± 4	4 ± 1	19 ± 5	240 ± 30	36 ± 7	4 ± 1	>1000	127 ± 32
Dịch chiết rễ PNG	556 ± 88	101 ± 32	83 ± 15	256 ± 69	168 ± 16	603 ± 64	630 ± 59	>1000	472 ± 13
Dịch chiết lá PNG	710 ± 36	36 ± 18	1 ± 0.5	74 ± 11	161 ± 39	206 ± 33	215 ± 23	>1000	338 ± 17
Dịch chiết rễ Purple Moi	900 ± 97	374 ± 61	23 ± 4	980 ± 79	340 ± 32	>1000	>1000	>1000	700 ± 34
Dịch chiết lá Purple Moi	860 ± 89	43 ± 16	6 ± 2	263 ± 42	71 ± 23	404 ± 91	240 ± 17	>1000	395 ± 18
Dịch chiết rễ Nene	830 ± 89	380 ± 82	5 ± 2	424 ± 16	390 ± 33	>1000	>1000	>1000	905 ± 65
Dịch chiết lá Nene	490 ± 68	37 ± 8	3 ± 1	228 ± 22	134 ± 28	337 ± 23	374 ± 80	>1000	326 ± 38

\*Giá trị được biểu diễn trên đây là giá trị trung bình của ba lần lặp lại ± sai số tiêu chuẩn.

thể GABA<sub>A</sub> với các giá trị IC<sub>50</sub> xấp xỉ 3 µg / ml. Các dịch chiết rễ ức chế các chất gắn đặc hiệu trên những thụ thể này yếu hơn với các giá trị IC<sub>50</sub> dao động trong khoảng 5 µg / ml (*Nene*) đến 87 µg / ml (*Mahakea*).

Khả năng bám của các chất gắn đặc hiệu trên các thụ thể dopamin D<sub>2</sub>, opioid (µ và δ) và histamin (H<sub>1</sub> và H<sub>2</sub>) cũng bị ức chế bởi các dịch chiết lá mạnh hơn so với các dịch chiết rễ. Trên các thụ thể này, các dịch chiết lá của cả 4 giống biểu hiện khả năng tương tác mạnh với các giá trị IC<sub>50</sub> nằm trong khoảng 1 đến 100 µg / ml, trong khi hoạt tính bám các thụ thể này của các dịch chiết rễ tương đối yếu (các giá trị IC<sub>50</sub> nằm trong khoảng 100 µg / ml đến 1000 µg / ml).

Đáng chú ý là khả năng tương tác trên các thụ thể khác nhau đáng kể giữa các dịch chiết thu được từ các giống khác nhau. Trên thụ thể histamin H<sub>1</sub> và H<sub>2</sub>, hoạt tính mạnh nhất quan sát thấy đối với dịch chiết lá *Mahakea* và hoạt tính thấp nhất thu được đối với dịch chiết lá *Purple Moi* và *Nene*. Trên thụ thể opioid, các dịch chiết cho năng lực tương tác khác nhau trên thụ thể dạng µ và δ. Trên thụ thể µ-opioid, hoạt tính mạnh nhất tìm thấy cho dịch chiết lá *Mahakea* (IC<sub>50</sub> = 19 ± 5 µg / ml), trong khi trên thụ thể δ-opioid hoạt tính mạnh nhất quan sát thấy đối với dịch chiết lá *PNG* (IC<sub>50</sub> = 71 ± 23 µg / ml).

Khả năng bám của các chất đặc hiệu trên thụ thể benzodiazepin và serotonin (5-HT<sub>6</sub> và 5-HT<sub>7</sub>) chỉ bị ức chế rất yếu bởi tất cả các dịch chiết lá và rễ của kava. Trên thụ thể benzodiazepin, các nồng độ thấp hơn 100 µg/ml của các dịch chiết lá và rễ đều không biểu hiện sự tương tác đáng kể. Trừ dịch chiết lá *Mahakea* (IC<sub>50</sub> = 127 µg/ml), các dịch chiết của các giống kava khác chỉ ức chế 50% bám của <sup>3</sup>H - LSD trên thụ thể 5 - HT<sub>7</sub> ở nồng độ cao hơn 300 µg / ml. Trên các thụ thể 5 - HT<sub>6</sub>, tất cả các dịch chiết lá và rễ kava đều không có hoạt tính rõ rệt ở các nồng độ thấp hơn 1000 µg / ml.

### Thảo luận

Kết quả phân tích HPLC các dịch chiết của lá và rễ kava thu được từ bốn giống *Mahakea*, *PNG*, *Purple Moi* và *Nene* đã cho thấy sự khác biệt rõ rệt về định tính và định lượng của thành phần các kavalacton. Kết quả nghiên cứu này phù hợp với một số kết quả phân tích được công bố trước đây [4]. Ở các giống kava thu thập tại Fiji, Smith và cs (1984) nhận thấy kavain và DMY phân bố chủ

yếu ở rễ, trong khi DHM và DHK là các kavalacton chính lại phân bố ở lá. Trong nghiên cứu với các giống kava thu thập được ở Hawaii, chúng tôi thấy một sự phân bố tương tự của bốn kavalacton này. Ở rễ, DMY và kavain chiếm khoảng 10 đến 20 % tổng số kavalacton, trong khi hai hợp chất này chỉ tìm thấy ở rễ với nồng độ vết. Ở lá, DHM và DHK chiếm hơn 70 % hàm lượng tổng số của các kavalacton. Tuy vậy, Smith và cs không tìm thấy sự phân bố khác biệt rõ rệt của yangonin giữa rễ và lá. Kết quả phân tích HPLC của chúng tôi cho thấy yangonin phân bố chủ yếu ở rễ (chiếm khoảng 10 đến 20 % tổng số kavalacton) và chỉ xuất hiện ở hàm lượng rất nhỏ trong lá (ít hơn 6 %). Methysticin chỉ phát hiện thấy ở rễ.

Hàm lượng thấp hơn đáng kể của các kavalacton, đặc biệt là DHM và DHK trong dịch chiết lá *Mahakea* so sánh với *Nene*, *PNG* và *Purple Moi* có thể liên quan đến tuổi và điều kiện sinh trưởng của cây lấy mẫu, bên cạnh các nhân tố di truyền.

Các giống kava khác nhau rõ rệt về thành phần các kavalacton đã được sử dụng trong các nghiên cứu này về khả năng tương tác với các thụ thể trong hệ thần kinh trung ương gồm benzodiazepin, GABA<sub>A</sub>, opioid, serotonin, dopamin và histamin. Các thụ thể này trong hệ thần kinh trung ương đã được biết rõ có vai trò quan trọng trong các hoạt động sinh lý tâm thần [9, 18], và có thể là mục tiêu dược lý cho thành phần của một số loài cây thuốc có tác dụng an thần [15, 19]. Vì các hoạt tính dược lý nổi bật nhất của các dịch chiết kava là tác dụng an thần giảm ho, chống co giật, giảm đau và kích thích ngủ, các thụ thể này có thể là các mục tiêu dược lý của các hoạt chất của kava. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy các dịch chiết lá và rễ của kava chỉ có tương tác yếu với vị trí bám benzodiazepin trên thụ thể GABA<sub>A</sub>. Kết quả này nhìn chung thống nhất với một số nghiên cứu trước đây [10, 11]. Các dịch chiết lá và rễ của cả 4 giống kava hầu như không ức chế bám của chất gắn đặc hiệu lên các thụ thể 5-HT<sub>6</sub> và 5-HT<sub>7</sub>. Hoạt tính ức chế bám mạnh nhất của các dịch chiết kava là trên thụ thể GABA<sub>A</sub>, vị trí bám của GABA. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy các dịch chiết kava, đặc biệt là các dịch chiết lá, ức chế khả năng bám đặc hiệu của <sup>3</sup>H-Muscimol lên thụ thể GABA<sub>A</sub> với tiềm lực mạnh (các giá trị IC<sub>50</sub> được xác định nằm trong khoảng 1 đến 100 µg / ml). Tuy vậy, chúng tôi không thấy có sự tương quan giữa hoạt lực bám thụ thể

của các dịch chiết và nồng độ của các kavalacton, điều này có nghĩa là trong dịch chiết của cây kava còn chứa các hợp chất khác chưa biết về cấu trúc hoá học có hoạt tính sinh học với khả năng tương tác trên thụ thể này.

Hoạt lực ức chế yếu của các dịch chiết rễ kava trên các thụ thể dopamin  $D_2$ , opioid ( $\mu$  và  $\delta$ ), cũng như trên thụ thể histamin ( $H_1$  và  $H_2$ ) ( $IC_{50} > 100 \mu\text{g} / \text{ml}$ ) có thể chỉ ra rằng các thụ thể này có lẽ chỉ giữ vai trò thứ yếu trong các hoạt tính dược học của các dịch chiết rễ kava. Một lần nữa chúng tôi không thấy có sự tương quan giữa hoạt tính sinh học của các dịch chiết kava và hàm lượng kavalacton của chúng. Do các dịch chiết lá của kava nhìn chung có hoạt tính mạnh hơn các dịch chiết rễ, trong khi nồng độ kavalacton tổng số trong các dịch chiết rễ thường cao hơn, điều này cho thấy có thể còn tồn tại các hợp chất có hoạt tính sinh học khác. Một sự biến động lớn về hoạt lực tương tác *in vitro* với các thụ thể được tìm thấy giữa dịch chiết có nguồn gốc từ các giống khác nhau, đặc biệt trên các thụ thể opioid và histamin. Quan sát này của chúng tôi phù hợp với nhiều nhận xét cho rằng dịch chiết từ các giống kava cho các hiệu lực dược lý khác nhau [1].

Trong nghiên cứu này, chúng tôi nhận thấy hàm lượng kavalacton trong lá của kava là đáng kể. Chẳng hạn hàm lượng kavalacton tổng số trong các dịch chiết lá của hai giống PNG và Nene tương ứng là 4,35 và 4,96 % so với 8,54 và 5,94 % của các dịch chiết rễ. Mặc dù đã có một số ý kiến trước

đây cho rằng có thể sử dụng lá kava trong các mục đích dược phẩm cũng như trong việc tách chiết các hợp chất kavalacton (đặc biệt là DHK và DHM) [20], cho đến nay người ta còn chưa chú ý đáng kể đến nguồn dược liệu này. Về hoạt tính sinh học *in vitro* cao của các dịch chiết lá kava so với các dịch chiết rễ, chúng tôi nhận thấy trong các phép thử sinh học này có thể lá của kava là nguồn dược liệu tiềm năng mới.

Tóm lại, các số liệu phân tích HPLC và phép thử sinh học trên các thụ thể của hệ thần kinh trung ương trong báo cáo này chỉ ra rằng các thụ thể GABA<sub>A</sub>, dopamin  $D_2$ , opioid ( $\mu$  và  $\delta$ ) và histamin ( $H_1$  và  $H_2$ ) có thể là mục tiêu dược lý của các thành phần trong dịch chiết lá của kava, mặc dù các hoạt tính này có thể không liên quan đến các hợp chất kavalacton. Vì vậy, lá của loài cây này có thể là một đối tượng nghiên cứu thú vị cho các nghiên cứu dược lý tiếp theo. Các thụ thể GABA<sub>A</sub> có thể giữ một vai trò quan trọng trong các hoạt tính dược lý của các dịch chiết rễ kava tổng số. Các thụ thể benzodiazepin, dopamin  $D_2$ , opioid ( $\mu$  và  $\delta$ ), histamin ( $H_1$  và  $H_2$ ) và serotonin (5-HT<sub>6</sub> và 5-HT<sub>7</sub>) có thể không phải là các vị trí dược lý trọng yếu của các thành phần trong dịch chiết rễ của kava. Sự biểu hiện tiềm năng tương tác khác nhau của dịch chiết các giống kava khác nhau với các thụ thể của hệ thần kinh trung ương là vấn đề cần tiếp tục nghiên cứu chi tiết nhằm xác định nhân tố quyết định hoạt tính sinh học khác nhau của các dịch chiết này.

### Tài liệu tham khảo

- 1). Lebot V, Merlin M, and Lindstrom L. Kava: the pacific elixir. Healing Arts Press 1997; 2). Singh YN. *J. Herbal Gram* 1997, 39: 33 - 55; 3). Hürzl J, Juretzek W, Schneider G, Stahl-Biskup E, Piper. In: Honsel R, Keller K, Rimpler H, Schneider G, editors. Hager's handbuch der pharmazeutischen praxis. Springer-Verlag. 1994, Vol. 6.: 191 - 220; 4). Smith RM. *Phytochemistry* 1983, Vol. 22: 1055 - 1056; 5). Mayer HJ, Kretschmar R. *Klinische Wochenschrift* 1966, 4: 902 - 903; 6). Gleitz J, Beile A, Peters T. *Neuropharmacology* 1995, 34: 1133 - 1138; 7). Gleitz J, Beile A, Wilkens P, Ameri A, Peters T. *Planta Medica* 1997, 63: 27 - 30; 8). Taylor CP, Meldrum BS. *J. Trends in Pharmacological Sciences* 1995, Vol. 16: 309 - 316; 9). Bloom FE. Neurotransmission and the central nervous system. In Hardman JG and Limbird LE, editors. *The pharmacological basis of therapeutics*. MacGraw-Hill Health Professions Division 1996, 9<sup>th</sup> edition.: 267 - 293; 10). Jussofie A, Schmitz A, Hiemke C. *Psychopharmacology* 1994, 116: 469 - 474; 11). Davis LP, Drew CA, Duffield P, Johnston AR, Jamieson DD. *Pharmacology and Toxicology* 1992, 71: 120-126; 12). Boonen G, Høberlein H. *Planta Medica* 1998, 64: 504-506; 13). Kretschmar R. Pharmakologische Untersuchungen zur zentralnervösen Wirkung und zum Wirkungsmechanismus der Kava-Droge (*Piper methysticum* Forst) und ihrer kristallinen Inhaltsstoffe. In Rietbrock N, editor. *Phytopharmaka in Forschung und klinischer Anwendung*. Loew. 1995: 29-38; 14). Ross S, de Freese L, Melzer M and Kolhmann R. Kava-lactone determination by a new RP-HPLC separation enabling high performance of sample analysis in aqueous solutions. *Proceeding of the 46<sup>th</sup> Annual Congress of the Society for Medicinal Plant Research (GA)*. Vienna 1998: 31. August - 4. September. Poster F21; 15). Simmen U, Burkard W, Berger K, Schaffner W, Lundstrom K. *Journal of receptor and transduction research* 1999, 19: 59 - 74; 16). Lundstrom K, Mills A, Buell G, Allet E, Adami N and Lijestrom P. *European Biochemistry* 1994, 224: 917 - 921; 17). Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gertner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ and Klenk DC. *Analytical Biochemistry* 1985, 150: 76 - 85; 18). Mansour A, Chalmers DT, Fox CA, Meador-Woodruff JII, Watson SJ. Biochemical anatomy: insights into the cell biology and pharmacology of neurotransmitter systems

in the brain. In: Schatzberg AF, Nemeroff CB, editors. The American Psychiatric Press Textbook of Psychopharmacology. The American Psychiatric Press Inc., 1995: 45 - 63; 19). Cavadas C, Araujo I, Cotrim MD, Amaral T, Cunha AP, Macedo T, Ribeiro CF. *Arzneim. Forsch. Drug Res* 1995, 45: 753-755; 20). Nichols M. *J. Health Supplement Retailer* July 1996: 44.

*Tap chí Dược liệu, tập 7, số 2/2002 (trang 54-56)*

## MONOAMINE OXIDASE INHIBITORY ACTIVITY OF CHEMICAL CONSTITUENTS FROM *NOTOPTERYGIUM INCISUM*

Nguyen Hai Nam

College of Pharmacy, Chungnam National University, Taejon 305-764, Korea

(Nhận bài ngày 10 tháng 3 năm 2000)

### Summary

Six constituents isolated from *Notopterygium incisum* including three furanocoumarins, i.e., bergamottin, isoimperatorin, notopterol, a polyacetylenic (falcarindiol), a phenylpropanoid (methyl caffeic ester) and a triterpenoid (pregnenolone) were evaluated for monoamine oxidase (MAO) inhibitory activity. Among the isolated compounds, the three coumarins exhibit strong to moderate inhibitory activity on MAO with  $IC_{50}$  values of 6.15 ~ 11.38  $\mu$ M. Noteworthy, the methyl caffeic ester also exerts a significant activity with  $IC_{50}$  value of 13.92  $\mu$ M.

Key words: *Notopterygium incisum*, Umbeliferae, Monoamine Oxidase Inhibitor, Furanocoumarin, Falcarindiol, Cinnamate.

### Introduction

Monoamine oxidase (MAO; EC 1.4.3.4) is an enzyme that catalyzes the oxidation process of endogenous neurotransmitter monoamines and various exogenous physiological amines. Inhibition of MAO has been proposed to be effective in the treatment of depression [1]. Therefore, great interests and efforts have been made in the search for MAO inhibitors from natural sources, especially from plants and microbes. As a result, a number of MAO inhibitors have been identified, including alkaloids [2], xanthenes [3], azaphilones [4] and coumarins [5].

In the continuity of our search for MAO inhibitors from natural sources, we have screened 58 medicinal plants for MAO inhibitory activity [6]. Among screened plants, *Notopterygium incisum* showed a particularly strong inhibitory activity on MAO. From this plant we had isolated six constituents including three furanocoumarins, e.g. bergamottin, isoimperatorin, notopterol and one polyacetylenic compound (falcarindiol) together with one phenylpropanoid (methyl caffeic ester) and one triterpenoid (pregnenolone) [7]. This paper reports the MAO inhibitory activity of the isolated constituents from the title plant.

### Materials, Instrumentals and Methods

#### Reagents and Instruments

Unless otherwise stated, all materials, chemicals and solvents were of reagent grade and obtained from commercial sources. Melting points were determined on an Electrothermal melting point apparatus and are uncorrected. Kynuramine, clorgyline and 4-hydroxyquinoline were purchased from Sigma Co. (St. Louis, MO, United States). Optical density was read using ELISA reader (Spectra Max 250, USA).

#### MAO Inhibitory Assay

Rat liver mitochondrial monoamine oxidase was prepared by Zeller's method [8]. MAO activity was assayed according to the Kraml's method [9] with slight modification using kynuramine as a substrate as described previously [6]. To determine the  $IC_{50}$  value (the concentration of a sample that causes 50% reduction in MAO activity), a sample was further assayed at various concentration and the  $IC_{50}$  value ( $\mu$ M) was calculated using Probits method [10].

#### Plant Materials

The plant material (rhizoma) was purchased from an oriental herbarium in Hanoi, Vietnam. Voucher specimens have been deposited in our laboratory at the College of Pharmacy, Chungnam National University, Taejon, Korea.

#### Isolation of Compounds