



THE *IN VITRO* CYTOTOXICITY ACTIVITIES OF THE EXTRACTS FROM *CALLICARPA MACROPHYLLA* VAHL IN THAI NGUYEN PROVINCE

Vu Thi Thu Le¹, Pham Thi Hong Minh², Nguyen Thuong Tuan¹, Dao Viet Hung¹, Hoang Thi Bich², Do Tien Lam^{2*}

¹Thai Nguyen University of Agriculture and Forestry, Vietnam

²Institute of Natural Products Chemistry, Vietnam

*Email address: dotienlam198@gmail.com

<http://doi.org/10.51453/2354-1431/2021/553>

Article info

Received:
30/3/2021
Accepted:
3/5/2021

Keywords:

Callicarpa macrophylla Vahl, *Callicarpa*, Lu-1, Hep-G2 and MCF-7.

Abstract

Callicarpa macrophylla Vahl. has widely been used in traditional medicine for the treatment such as gastrointestinal hemorrhage, coughing up blood, vomiting blood, nosebleeds, swollen and painful fall, rheumatism, bone pain, etc. The crude extract of the stem, leaves and fruits of *Callicarpa macrophylla* Vahl have exhibited demonstrated cytotoxicity against three human cancer cell lines (Lu-1, Hep-G2 và MCF-7) was tested by SRB assay with CS (%) values ranging from $30,23 \pm 1,5$ to $90,22 \pm 0,15\%$. Inside, The methanol extract of the leaves of *Callicarpa macrophylla* Vahl have showed relatively potent cytotoxicity with CS (%) values ranging from $30,23 \pm 1,5$ to $47,84 \pm 2,1\%$. The *n*-hexane fraction (**L.CM.H**) of the leaves of *Callicarpa macrophylla* Vahl have exhibited potent against three human cancer cell lines (Lu-1, Hep-G2 và MCF-7) than ethyl acetate fraction (**L.CM.E**) and methanol fraction (**L.CM.M**) with CS (%) values ranging from $12,49 \pm 1,4$ to $20,18 \pm 0,8\%$.



HOẠT TÍNH GÂY ĐỘC TẾ BÀO *IN VITRO* CỦA CÁC CẶN CHIẾT LOÀI TỪ CHÂU LÁ TO (*CALLICARPA MACROPHYLLA* VAHL.) Ở THÁI NGUYÊN

Vũ Thị Thu Lê¹, Phạm Thị Hồng Minh², Nguyễn Thương Tuấn¹, Đào Việt Hùng¹, Hoàng Thị Bích², Đỗ Tiến Lâm^{2*}

¹Trường Đại học Nông Lâm Thái Nguyên, Việt Nam

²Viện Hóa học các Hợp chất thiên nhiên, Việt Nam

*Địa chỉ email: dotienlam198@gmail.com

<http://doi.org/10.51453/2354-1431/2021/553>

Thông tin bài viết

Ngày nhận bài:

30/3/2021

Ngày duyệt đăng:

3/5/2021

Từ khóa:

Callicarpa macrophylla Vahl, *Callicarpa*, Lu-1, Hep-G2 và MCF-7.

Tóm tắt

Cây Từ châu lá to (*Callicarpa macrophylla* Vahl) được sử dụng rộng rãi trong y học cổ truyền để chữa các bệnh như xuất huyết tiêu hóa, ho ra máu, nôn ra máu, chảy máu cam, đờn ngã sưng đau, thấp khớp, đau nhức xương... Cặn chiết tổng của thân, lá và quả của cây Từ châu lá to thể hiện hoạt tính gây độc *in vitro* trên ba dòng tế bào ung thư ở người (phối: Lu-1, gan: Hep-G2 và vú: MCF-7) bằng phương pháp SRB với giá trị CS (%) trong khoảng từ 30,23 ± 1,5 đến 90,22 ± 0,15%. Trong đó, cặn chiết methanol tổng của lá cây Từ châu lá to (*Callicarpa macrophylla* Vahl) thể hiện hoạt tính gây độc tế bào tốt với giá trị CS (%) trong khoảng từ 30,23 ± 1,5 đến 47,84 ± 2,1%. Phân đoạn *n*-hexane (**L.CM.H**) của lá Từ châu lá to biểu hiện hoạt tính gây độc tế bào tốt hơn so với các phân đoạn ethyl acetate (**L.CM.E**) và methanol (**L.CM.M**) với giá trị CS (%) từ 12,49 ± 1,4 đến 20,18 ± 0,8%.

I. MỞ ĐẦU

Chi *Callicarpa* L. (Chi Tu hú, Nàng nàng hay Từ châu) có khoảng 140 loài, thuộc họ Verbenaceae, bao gồm các cây thân gỗ nhỏ và cây bụi, hay gặp phổ biến ở các vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới, chủ yếu là ở các nước thuộc châu Á, một số loài cũng gặp ở vùng xích đạo châu Mỹ và Australia [2]. Ở Việt Nam, Theo tác giả Võ Văn Chi, chi *Callicarpa* có 14 loài [3,4], tác giả Phạm Hoàng Hộ thống kê chi *Callicarpa* có 26 loài [5], còn theo các nhà thực vật học thuộc Viện Sinh thái và tài nguyên sinh vật đã thống kê được 21 loài [6]. Được phân bố rải rác trong khắp cả nước ở Phía Bắc như Tuyên Quang, Lạng Sơn, Sơn La, Bắc Cạn, Phú Thọ, Bắc Giang, Ba Vì, Thái Nguyên, một số vùng miền

trung như Nghệ An, Huế, Đà Nẵng, Khánh Hòa, Kon Tum, Đắk Lắk, Gia Lai, Ở phía Nam có Bình Dương, Đồng Nai [6].

Có nhiều loài cây thuộc chi *Callicarpa* được sử dụng trong y học dân gian nhiều dân tộc, ở các nước châu Á, Australia và Mỹ. Khoảng 20 loài thực vật chi *Callicarpa* được công bố về tác dụng và được sử dụng trong y học dân gian. Trong đó, một số loài biết đến hay được sử dụng trong y học cổ truyền của Trung Quốc và Nam Á trong việc điều trị bệnh viêm gan, bệnh thấp khớp, sốt, nhức đầu, khó tiêu và các bệnh khác. Một số loài *Callicarpa* đã được công bố được sử dụng chống lại ung thư

(ví dụ, rễ cây *Callicarpa americana* để điều trị bệnh ung thư da và vỏ cây *Callicarpa rubella* để điều trị khối u của ruột già). Các dịch chiết thu được từ 14 loài trong chi *Callicarpa* đã được đánh giá tác dụng sinh học gồm khả năng kháng khuẩn, kháng nấm, chống côn trùng sinh trưởng, gây độc tế bào và các hoạt động phytotoxic. Ngoài các acid amin, benzenoid, carbohydrate đơn giản, lipid, diterpene, flavonoid, phenylpropanoid, phytosterol, sesquiterpene, và triterpene đã được phát hiện, phân lập từ chi *Callicarpa* [3].

Trong y học hiện đại, những kết quả nghiên cứu và thử nghiệm hoạt tính sinh học một số loài thực vật *Callicarpa* đã chứng minh rằng chúng chứa nhiều hoạt chất có tác dụng sinh học quý như hoạt tính kháng viêm, cầm máu, bảo vệ thần kinh, chống lão, giảm đau, kháng khuẩn, chống oxy hóa và chống ung thư... góp phần làm sáng tỏ việc sử dụng các thực vật chi này trong dân gian và cho thấy nó cung cấp một lượng lớn các chất chuyển hóa thứ cấp có hoạt tính sinh học [2,3].

Loài *Callicarpa macrophylla* Vahl ở Việt Nam, thuộc chi *Callicarpa* được nhân dân sử dụng thuốc chữa bệnh trong dân gian, có tiềm năng lớn về các hoạt chất sinh học mà trong nước vẫn chưa được nghiên cứu đầy đủ. Nghiên cứu này tập trung vào hoạt tính gây độc *in vitro* trên các dòng tế bào ung thư người: phổi (Lu-1), gan (Hep-G2) và vú (MCF-7) của các căn chiết thu được từ loài *Callicarpa macrophylla* Vahl theo phương pháp SRB.

II. THỰC NGHIỆM

1. Nguyên liệu

Lá, thân cành và quả loài Tử châu lá to thu tại huyện Đại Từ, tỉnh Thái Nguyên vào tháng 10 năm 2017 và được TS. Nguyễn Quốc Bình (Bảo tàng thiên nhiên Việt Nam - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam) xác định tên khoa học *Callicarpa macrophylla* Vahl, số tiêu bản CA20171002.HN lưu tại Bảo tàng Thiên nhiên Việt Nam.

2. Phương pháp xử lý và chiết mẫu

Các mẫu thực vật sau khi thu hái đều được xử lý theo phương pháp chung như sau:

Các mẫu thực vật sau khi thu hái được thái nhỏ, phơi trong bóng mát, sấy khô ở nhiệt độ 60 °C đến khối lượng không đổi, sau đó đem nghiền nhỏ. Mẫu được ngâm chiết 3 lần methanol (ethanol) trong

thiết bị siêu âm ở nhiệt độ phòng. Dịch tổng thu được cất kiệt dung môi dưới áp suất giảm, nhiệt độ < 50 °C thu được cặn cô methanol (ethanol). Cặn cô methanol (ethanol) được thêm nước và chiết lần lượt với các dung môi có độ phân cực tăng dần *n*-hexane và ethyl acetate. Sau khi đuổi dung môi thu được cặn *n*-hexane, cặn ethyl acetate và cặn nước tương ứng.

3. Phương pháp đánh giá hoạt tính gây độc tế bào *in vitro* theo phương pháp SRB

3.1. Nguyên liệu

Theo phương pháp của Skehan & cs. (1990) [7] và Likhiwitayawuid & cs. (1993) [8] đã được áp dụng tại Viện nghiên cứu ung thư Quốc gia của Mỹ (NCI) và trường đại học Dược, đại học Tổng hợp Illinois, Chicago, Mỹ.

Dòng tế bào:

Dòng Hep-G2 (Human hepatocellular carcinoma – Ung thư gan)

Dòng Lu-1 (Human lung adenocarcinoma – Ung thư biểu mô phổi)

Dòng MCF-7 (Human breast adenocarcinoma – Ung thư vú)

Môi trường và các dụng cụ, hóa chất:

Môi trường DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) hoặc MEME (Minimum Essential Medium with Eagle's salt) có bổ sung L-Glutamine, Sodium piruvat, NaHCO₃, PSF (Penicillin - Streptomycin sulfate - Fungizone); NAA (Non-Essential Amino Acids); 10% BCS (Bovine Calf Serum), Tripsin-EDTA 0,05%; DMSO (Dimethyl Sulfoxide); TCA (Trichloro Acetic acid); Tris Base; PBS (Phosphate Buffered Saline); SRB (Sulfo Rhodamine B); Acid acetic.

Các dụng cụ dùng 1 lần: Bình nuôi cấy tế bào, phiếu vi lượng 96 giếng, pipet pasteur, các đầu tít cho micropipet...

Chất chuẩn chứng dương tính: Ellipticine pha trong DMSO.

3.2. Phương pháp tiến hành

Phép thử tiến hành xác định hàm lượng protein tế bào tổng số dựa vào mật độ quang học (OD – Optical Density) đo được khi thành phần protein của tế bào được nhuộm bằng Sulforhodamine B (SRB). Giá trị OD máy đo được tỉ lệ thuận với

lượng SRB gắn với phân tử protein, do đó lượng tế bào càng nhiều (lượng protein càng nhiều) thì giá trị OD càng lớn. Phép thử được thực hiện trong điều kiện cụ thể như sau: Chất thử (10 µl) pha trong DMSO 10% được đưa vào các giếng của khay 96 giếng để có nồng độ sàng lọc là 100 µg/ml. Chất thử có hoạt tính được xác định IC₅₀ nhờ dải nồng độ 100 µg/ml; 20 µg/ml; 4 µg/ml; 0,8 µg/ml. Trypsin hóa tế bào thí nghiệm để làm rời tế bào và đếm trong buồng đếm để điều chỉnh mật độ cho phù hợp với thí nghiệm. Thêm vào các giếng thí nghiệm lượng tế bào phù hợp (trong 190 µl môi trường) và để chúng phát triển trong vòng từ 3-5 ngày. Một khay 96 giếng khác không có chất thử nhưng có tế bào ung thư (190 µl) sẽ được sử dụng làm đối chứng ngày 0. Sau 1 giờ, đĩa đối chứng ngày 0 sẽ được cố định tế bào bằng Trichloroacetic acid – TCA. Sau giai đoạn phát triển trong tủ ấm CO₂, tế bào được cố định vào đáy giếng bằng TCA trong 30 phút, được nhuộm bằng SRB trong 1 giờ ở 37 °C. Đồ bỏ SRB và các giếng thí nghiệm được rửa 3 lần bằng 5% acetic acid rồi để khô trong không khí ở nhiệt độ phòng. Cuối cùng, sử dụng 10 µM dung dịch base Tris để hòa tan lượng SRB đã bám và nhuộm các phân tử protein, đưa lên máy lắc đĩa lắc nhẹ trong 10 phút và sử dụng máy ELISA Plate Reader (Bio-Rad) để đọc kết quả về hàm lượng màu của chất nhuộm SRB qua phổ hấp phụ ở bước sóng 515nm. Các phép thử được lặp lại 3 lần để đảm bảo tính chính xác. Ellipticine (Sigma) luôn được sử dụng như là chất đối chứng dương và được thử nghiệm ở các nồng độ: 10 µg/ml, 2 µg/ml, 0,4 µg/ml và 0,08 µg/ml. DMSO 10% luôn được sử dụng như đối chứng âm.

3.3. Tính kết quả

Kết quả được đọc trên máy ELISA ở bước sóng 495-515 nm.

Giá trị CS (Cell Survival): là khả năng sống sót của tế bào ở nồng độ nào đó của chất thử tính theo % so với đối chứng. Dựa trên kết quả đo được của chúng OD (ngày 0), DMSO 10% và so sánh với giá trị OD khi trộn mẫu để tìm giá trị CS (%) theo công thức:

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

Giá trị CS (%) sau khi tính theo công thức trên, được đưa vào tính toán Excel để tìm ra % trung bình ± độ lệch tiêu chuẩn của phép thử được lặp lại 3 lần theo công thức của Ducan như sau: Độ lệch

$$\text{tiêu chuẩn } \sigma = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{(n-1)}}$$

Các thử nghiệm được thực hiện tại Viện Hóa học các Hợp chất thiên nhiên, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

III. Kết quả nghiên cứu

3.1. Thu nhận các cặn chiết

Lá cây Tử châu lá to: Mẫu sấy khô ở nhiệt độ 60 °C đến khối lượng không đổi được 3500 g, đem nghiền nhỏ và ngâm chiết 5 lần với MeOH trong thiết bị siêu âm ở nhiệt độ phòng. Dịch tổng thu được cất kiệt dung môi dưới áp suất giảm, nhiệt độ < 50 °C thu được cặn cô MeOH (**L.CM**, 195g). Cặn cô MeOH được thêm nước và chiết lần lượt với các dung môi có độ phân cực tăng dần *n*-hexane, EtOAc sau đó cất kiệt dung môi thu được các cặn tương ứng: *n*-hexane (**CMH**: 45 g), ethyl acetate (**CME**: 25 g) và nước (**CMW**: 110 g).

Thân cành cây Tử châu lá to: được sấy khô, xay nhỏ thu được bột mẫu khô (4,5 kg). Bột mẫu khô được ngâm chiết với etanol. Quá trình chiết được thực hiện gián đoạn ở nhiệt độ 40 °C trong thiết bị chiết siêu âm gia nhiệt 4 lần, mỗi lần khoảng 4-5 giờ. Dịch chiết được gom lại, lọc qua giấy lọc và cất loại dung môi dưới áp suất giảm thu được cặn chiết tổng của thân cành cây Tử châu lá to (**T.CM**, 230 g).

Quả cây Tử châu lá to: được sấy khô, xay nhỏ thu được bột mẫu khô (0,12 kg). Bột mẫu khô được ngâm chiết với etanol. Quá trình chiết được thực hiện gián đoạn ở nhiệt độ 40 °C trong thiết bị chiết siêu âm gia nhiệt 4 lần, mỗi lần khoảng 4-5 giờ. Dịch chiết được gom lại, lọc qua giấy lọc và cất loại dung môi dưới áp suất giảm thu được cặn chiết tổng của quả cây Tử châu lá to (**Q.CM**, 9 g).

Kết quả xử lý và chiết các mẫu thực vật, tạo các cặn chiết tổng và các cặn dịch chiết phân đoạn *n*-hexan, etyl axetat và metanol của cây Tử châu lá to (*Callicarpa macrophylla* Vahl) được tóm tắt như bảng 1:

Bảng 1. Kết quả xử lý và chiết các mẫu Từ châu lá to (*Callicarpa macrophylla* Vahl)

Danh sách mẫu thu thập					Khối lượng phân đoạn (g)		
Ký hiệu mẫu	Bộ phận mẫu	Khối lượng tươi (kg)	Khối lượng khô (kg)	Khối lượng căn tổng (g)	Hexan	EtOAc	EtOH
<i>C. macrophylla</i>	Lá	15	3,5	190	45	25	110
	Quả	0,5	0,12	19			
	Thân cành	25	4,5	230			

3.2. Đánh giá hoạt tính gây độc tế bào *in vitro* của cao chiết từ loài Từ châu lá to

Hoạt tính gây độc tế bào *in vitro* của căn chiết methanol từ lá, quả và thân cành của cây Từ châu lá to (*C. macrophylla*) được thử nghiệm trên 3 dòng tế bào ung thư (Lu-1, Hep-G2 và MCF-7) theo

phương pháp SRB. Tiếp đó, các dòng tế bào ung thư bị ức chế mạnh nhất bởi căn chiết methanol sẽ được lựa chọn để sàng lọc hoạt tính của các căn chiết phân đoạn *n*-hexane, EtOAc và nước. Các mẫu được đánh giá hoạt tính gây độc tế bào trên ba dòng tế bào ung thư. Kết quả thể hiện trong bảng 2.

Bảng 2. Hoạt tính gây độc tế bào *in vitro* của các căn chiết cây Từ châu lá to

TT	Ký hiệu mẫu	Nồng độ đầu (µg/ml)	Giá trị CS (%) của 3 dòng tế bào		
			Hep-G2	LU-1	MCF-7
	DMSO	-	100	100	100
	Chứng (+)	5	1,34 ± 0,8	2,66 ± 0,9	1,21 ± 0,7
1	Q.CM	40	60,02 ± 2,3	47,31 ± 1,5	38,86 ± 2,3
2	T.CM	40	64,66 ± 2,2	55,64 ± 2,8	90,22 ± 0,2
3	L.CM	40	47,84 ± 2,1	39,40 ± 2,2	30,23 ± 1,5

(Q : quả, T : thân cành, L : lá, CC: *C. candicans*, CM: *C. macrophylla*)

Kết quả cho thấy căn chiết tổng methanol (ethnanol) từ lá, quả, thân loài Từ châu lá to thể hiện hoạt tính ức chế tốt trên 3 dòng tế bào ung thư thử nghiệm với các giá trị CS (%) trong khoảng từ 30,23 ± 1,5 đến 90,22 ± 0,15%. Đặc biệt căn chiết methanol của lá cây Từ châu lá to (**L.CM**) có tác dụng ức chế tốt với giá trị CS (%) là 47,84 ± 2,1 (đối với dòng tế bào ung thư Hep-G2); 39,40 ± 2,2 (đối với dòng tế bào ung thư Lu-1) và 30,23 ± 1,5 (đối với dòng tế bào ung thư MCF-7).

Qua kết quả sàng lọc sơ bộ hoạt tính gây độc tế bào ung thư đối với 03 dòng tế bào ung thư Hep-G2, Lu-1 và MCF-7 cho thấy lá cây Từ châu lá to có tác dụng mạnh hơn quả và thân cành của chúng. Do vậy, các nghiên cứu về hoạt tính và thành phần

hóa học tiếp theo ưu tiên tập trung vào lá cây Từ châu lá to.

Tiếp tục thử hoạt tính của các căn chiết phân đoạn *n*-hexane, EtOAc và methanol của lá cây Từ châu lá to đối với dòng tế bào ung thư Hep-G2, Lu-1 và MCF-7, kết quả thử nghiệm được thể hiện ở bảng 3. Ngoại trừ căn chiết phân đoạn methanol hầu như không thể hiện hoạt tính, cả 2 căn chiết phân đoạn còn lại của lá loài này đều có tác dụng ở các mức độ khác nhau, trong đó phân đoạn *n*-hexane (**L.CM.H**) thể hiện hoạt tính mạnh nhất với các giá trị CS (%) thấp với giá trị CS (%) từ 12,49 ± 1,4 đến 20,18 ± 0,8%. Kết quả này được giải thích là do sự hiện diện của các nhóm chất có hoạt tính gây độc tế bào mạnh như terpenoid và flavonoid trong các phân đoạn có độ phân cực yếu và trung bình.

Bảng 3. Hoạt tính gây độc tế bào của các cặn chiết phân đoạn từ lá cây Tử châu lá to

TT	Ký hiệu mẫu	Nồng độ đầu ($\mu\text{g/ml}$)	Giá trị CS (%) của 3 dòng tế bào		
			Hep-G2	LU-1	MCF-7
	DMSO	-	100	100	100
	Chứng (+)	5	1,34 \pm 0,8	2,66 \pm 0,9	1,21 \pm 0,71
1	L.CM.H	40	20,18 \pm 0,8	12,49 \pm 1,4	11,61 \pm 2,11
2	L.CM.E	40	98,03 \pm 0,9	18,20 \pm 1,3	40,43 \pm 2,79
3	L.CM.M	40	100	100	91,29 \pm 0,32

(L: lá, H: n-hexane, E: ethyl acetate, M: methanol, CM: C. macrophylla)

KẾT LUẬN

Cặn chiết tổng methanol (ethnanol) từ lá, quả, thân loài Tử châu lá to thể hiện hoạt tính ức chế tốt trên 3 dòng tế bào ung thư thử nghiệm với các giá trị CS (%) trong khoảng từ $30,23 \pm 1,5$ đến $90,22 \pm 0,15\%$. Cặn chiết methanol của lá cây Tử châu lá to (**L.CM**) có tác dụng ức chế tốt với giá trị CS (%) từ $30,23 \pm 1,5$ đến $47,84 \pm 2,1\%$.

Các cặn chiết phân đoạn n-hexane, EtOAc và methanol của lá cây Tử châu lá to đối với dòng tế bào ung thư Hep-G2, Lu-1 và MCF-7, ngoại trừ cặn chiết phân đoạn methanol hầu như không thể hiện hoạt tính, cả 2 cặn chiết phân đoạn còn lại của lá loài này đều có tác dụng ở các mức độ khác nhau, trong đó phân đoạn n-hexane (**L.CM.H**) thể hiện hoạt tính mạnh nhất với giá trị CS (%) từ $12,49 \pm 1,4$ đến $20,18 \pm 0,8\%$.

REFERENCES

[1] Phuong, V.X. (2007). *Science and technics publishing house Flora of Vietnam Verbenaceae*. Scientific & Technical Publishing, Hanoi, 6, 284, Vietnam.

[2] Jones William. P., Kinghorn A.D. (2008). *Biologically active natural products of the genus Callicarpa*. Current bioactive compounds 4(1): 15-32.

[3] Yanhua, T., Lianna, S., Meili, Guo., Wansheng, C. (2013). *The medicinal uses of Callicarpa L. in traditional Chinese medicine: An ethnopharmacological, phytochemical and pharmacological review*. Journal of ethnopharmacology, 146(2): 465-481.

[4] Chi, V.V. (2012). *Dictionary on Vietnamese Medicinal Plants*. Publishers of Medical, Ho Chi Minh City, 2, 198, Vietnam.

[5] Ho, P.H. (2000). *Vietnamese plants*. Tre Publishing House. Ho Chi Minh City, 213-216, Vietnam.

[6] Ban, N.T. (2003). *Checklist of Plant Species of Vietnam*. Agriculture Publishing House, Hanoi, 2, 284-286, Vietnam.

[7] Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J.T., Bokesch, H., Kenney, S., Boyd, M.R. (1990). *New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer-Drug Screening*. Journal of National Cancer Institute 82(13): 1107-1112.

[8] Likhitwitayawuid, K., Angerhofer, C.K., Cordell, G.A., Pezzuto, J.M., Ruangrunsi, N. (1993). *Cytotoxic and antimalarial bisbenzylisoquinoline alkaloids from Stephania erecta*. Journal of Natural Products. 56(1): 30-38.