

NGHIÊN CỨU SÀNG LỌC HOẠT TÍNH CHỐNG OXY HÓA, KHÁNG VI SINH KIỂM ĐỊNH VÀ GÂY ĐỘC TẾ BÀO CỦA LOÀI BÚP LỆ CHÙM TO

(*Buddleja Macrostachya* Benth.)

Trương Thị Thu Hiền¹; Nguyễn Phương Hiền²

Trần Đức Hữu²; Đỗ Phương Hoàng³; Phạm Thị Phương Thanh³

Hà Văn Quang¹; Hoàng Xuân Cường¹

TÓM TẮT

Mục tiêu: nghiên cứu sàng lọc hoạt tính chống oxy hóa, kháng vi sinh vật kiểm định và gây độc tế bào của loài Búp lệ chùm to (*Buddleja macrostachya* Benth.). **Đối tượng và phương pháp:** từ mẫu Búp lệ chùm to thu hái ở Sa Pa, Lào Cai, tiến hành chiết lỏng-lỏng thu được cao chiết metanol tổng, các cao chiết phân đoạn (*n*-hexan, diclometan, etylacetat) và phân đoạn nước. Từ đó, tiến hành nghiên cứu sàng lọc hoạt tính chống oxy hóa, hoạt tính kháng sinh vật kiểm định và hoạt tính gây độc tế bào theo các phương pháp tiêu chuẩn. **Kết quả và kết luận:** đã xác định được phân đoạn nước có hoạt tính chống oxy hóa (13,48 µg/ml) và hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định Gram (+) chủng *Enterococcus faecium* (20,65 µg/ml), *Staphylococcus aureus* (21,49 µg/ml) tốt nhất; phân đoạn diclometan và etylacetat có hoạt tính gây độc tế bào ung thư trên cả bốn dòng tế bào KB, HepG2, MCF7, LU-1 lần lượt là 21,35, 18,24, 16,37, 39,85 và 19,03, 23,24, 19,37, 40,53 µg/ml, trong đó phân đoạn etylacetat thể hiện hoạt tính gây độc tế bào tốt nhất.

* Từ khóa: Búp lệ chùm to; *Buddleja macrostachya* Benth; Hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định; Hoạt tính gây độc tế bào; *In vitro*.

Study of Antioxidant, Antibiotic and Cytotoxicity Activities of *Buddleja Macrostachya* Benth

Summary

Objectives: To study antioxidant, anti-iotic and cytotoxicity activities of *Buddleja macrostachya* Benth. **Subjects and methods:** The *Buddleja macrostachya* Benth. were collected in Sapa, Laocai province, Vietnam and extrated by liquid-liquid extraction to obtain the total methanol extract. The methanol extract partitioned with *n*-hexane, dichloromethane, ethylacetate to give the *n*-hexane, dichloromethane, ethylacetate fraction, and water - soluble fractions. From there, conduct research to antioxidant activity, antibiotic activity and cytotoxic activity according to standard methods. **Results and conclusion:** The results showed that, water-soluble fractions were antioxidant activity by DPPH with SC_{50} values of 13.48 µg/mL and antimicrobial activities

1. Học viện Quân y

2. Học viện Y Dược học Cổ truyền Việt Nam

3. Bệnh viện Quân y 103

Người phản hồi (corresponding): Trương Thị Thu Hiền (truonghientruong@gmail.com)

Ngày nhận bài: 25/02/2019; **Ngày phản biện đánh giá bài báo:** 22/03/2019

Ngày bài báo được đăng: 10/04/2019

Gram (+) were determined with IC_{50} values of *Enterococcus faecium* was 20.65 $\mu\text{g/mL}$ and *Staphylococcus aureus* 21.49 $\mu\text{g/mL}$. The dichloromethane and ethylacetate fraction were cancer cytotoxic activities on four cell lines KB, HepG2, MCF7, and LU-1 with IC_{50} values of 21.35, 18.24, 16.37, 39.85 and 19.03, 23.24, 19.37, 40.53 $\mu\text{g/mL}$, respectively, in which the ethylacetate fraction represents the best cytotoxic activity.

* Keywords: *Buddleja macrostachya* Benth; Antioxidant activity; Antibiotic activity; Cytotoxicity activity; In vitro.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Búp lẹ chùm to hay Bọ chó bông to (*Buddleja macrostachya* Benth.) thuộc họ Bọ chó (Buddlejaceae), phân bố chủ yếu ở Lào Cai, Cao Bằng, Lạng Sơn. Trên thế giới, loài này được ghi nhận ở Ấn Độ, Trung Quốc [1, 2]. Đây là một loại cây mọc hoang, đã được người dân thu hái về sắc uống để điều trị một số bệnh như vàng da, viêm gan, viêm kết mạc và giác mạc... một số ít còn được dùng để điều trị cho bệnh nhân bị ung thư.

Hiện nay, một số loài thuộc chi *Buddleja* đã và đang được các nhà khoa học trên thế giới quan tâm nghiên cứu do có nhiều tác dụng trong việc bảo vệ sức khỏe con người [3, 4, 5]. Tuy nhiên, rất ít công trình nghiên cứu về thành phần hoá học và hoạt tính sinh học của loài Búp lẹ chùm to được công bố. Để phát hiện và lý giải tác dụng dược lý của loài dược liệu này, đóng góp vào kho tàng tài nguyên hóa dược và định hướng nghiên cứu tác dụng dược lý, phục vụ cho những nghiên cứu ứng dụng tiếp theo, nghiên cứu này tiến hành: *Đánh giá một số hoạt tính sinh học (hoạt tính kháng sinh, hoạt tính chống oxy hóa và hoạt tính gây độc một số tế bào*

ung thư) in vitro từ cao chiết methanol tổng và các phân đoạn chiết của loài Búp lẹ chùm to.

ĐỐI TƯỢNG, VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng, vật liệu nghiên cứu.

* *Mẫu thực vật:*

Mẫu Búp lẹ chùm to (*Buddleja macrostachya* Benth.) thu hái ở Sa Pa, tỉnh Lào Cai được TS. Bùi Văn Thanh (Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam) xác định tên khoa học và lưu mẫu.

* *Hóa chất:*

Kháng sinh kiểm định: ampicilin; tetracylin; nystatin (Hãng Sigma Aldrich, Mỹ). Môi trường nuôi cấy vi sinh vật: Saboraud Dextrose Broth đối với nấm men; Trypcase Soya Broth đối với vi khuẩn. Môi trường thí nghiệm: Eugon Broth đối với vi khuẩn và Mycophil đối với nấm. 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH); axit ascorbic; sulforhodamine B; axit trichloroacetic; elippticine (Hãng Sigma Aldrich, Mỹ) và các hóa chất thông thường khác loại tinh khiết phân tích.

2. Phương pháp nghiên cứu.

* Phương pháp chiết xuất:

Mẫu cành và lá loài Búp lẹ chùm to sau khi thu hái được rửa sạch, loại bỏ tạp cơ học, băm nhỏ, sấy khô ở nhiệt độ $< 60^{\circ}\text{C}$, nghiền thành bột (1,8 kg), sau đó chiết trong dung môi methanol có sử dụng kết hợp thiết bị siêu âm (50°C , 3 giờ, 3 lần) để rút ngắn thời gian chiết. Dịch chiết thu được lọc qua giấy lọc, gom lại và cất loại dung môi ở áp suất giảm thu được 130 g cao chiết.

Hòa tan một phần cao chiết methanol tổng (100 g) vào 1 lít nước cất, tiến hành chiết phân bố lần lượt với các dung môi có độ phân cực tăng dần: *n*-hexan, diclometan, etylacetat. Cất loại dung môi dưới áp suất giảm thu được các cao chiết tương ứng và phần dịch nước. Cao chiết các phân đoạn sau khi loại hết dung môi bảo quản ở 4°C đến khi sử dụng.

* Các phương pháp thử hoạt tính sinh học:

- Phương pháp đánh giá hoạt tính chống oxy hóa *in vitro*:

Hoạt tính chống oxy hóa *in vitro* được thử nghiệm theo phương pháp trung hòa gốc tự do DPPH của Yuvaraj P và CS (2013) [6].

Trộn mẫu thử và DPPH trên phiên 96 giếng, gồm các loại mẫu sau: dãy thí nghiệm: 10 μl mẫu + 190 μl DPPH trong etanol để thu được dãy nồng độ: 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25 $\mu\text{g/ml}$; dãy mẫu trắng (Blank): 10 μl mẫu + 190 μl etanol. Mẫu đối chứng âm tính: 10 μl DMSO 10%

+ 190 μl DPPH trong etanol. Mẫu đối chứng dương tính: 10 μl ascorbic axit + 190 μl DPPH trong etanol. Phiến được bọc kín để tránh ánh sáng, ủ trong tủ ấm 37°C trong 2 giờ. Đọc kết quả trên máy Elisa bước sóng 515 nm. Xác định giá trị SC_{50} (nồng độ trung hòa được 50% gốc tự do DPPH) của mẫu bằng phần mềm TableCurve 2D v5.01. Hợp chất có hoạt tính chống oxy hóa càng mạnh, giá trị SC_{50} càng thấp.

- Phương pháp thử hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định *in vitro*:

Phép thử hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định và nấm tiến hành theo phương pháp pha loãng đa nồng độ [7]. Các chủng vi sinh vật kiểm định gồm:

Vi khuẩn Gram (+): *Enterococcus faecium* (B650); *Staphylococcus aureus* (ATCC 13709).

Vi khuẩn Gram (-): *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442); *Escherichia coli* (ATCC 25922).

Nấm men: *Candida albicans* (ATCC 10231).

Cách tiến hành: pha loãng mẫu thử trong DMSO và nước cất vô khuẩn thành một dãy nồng độ thích hợp theo yêu cầu của phương pháp thử là 128 $\mu\text{g/ml}$; 32 $\mu\text{g/ml}$; 8 $\mu\text{g/ml}$; 2 $\mu\text{g/ml}$; 0,5 $\mu\text{g/ml}$. Mẫu vi khuẩn hoặc nấm nồng độ 5.10^5 CFU/ml pha trước khi thử. Mẫu đối chứng (+): pha kháng sinh trong nước cất theo nồng độ 10 $\mu\text{g/ml}$. Mẫu đối chứng (-): chất thử được thay thế bằng nước cất.

Mẫu nấm được duy trì trong môi trường dinh dưỡng. Các chủng kiểm định được hoạt hoá trước khi tiến hành thử nghiệm trong môi trường dinh dưỡng (24 giờ đối với vi khuẩn, 48 giờ đối với nấm), pha loãng tới nồng độ 0,5 đơn vị Mc Fland.

Cho 10 µl dung dịch mẫu thử theo các nồng độ đã pha ở trên vào phiếu vi lượng 96 giếng. Sau đó, thêm vào mỗi giếng đã có mẫu sẵn 190 µl vi sinh vật đã hoạt hoá. Mẫu đối chứng dương gồm 10 µl dung dịch kháng sinh và 190 µl vi sinh vật kiểm định đã hoạt hoá. Mẫu đối chứng âm gồm: 10 µl nước cất vô khuẩn và 190 µl vi sinh vật kiểm định đã hoạt hoá. Để các mẫu trong tủ ấm 37°C/24 giờ đối với vi khuẩn và 30°C/48 giờ đối với nấm. Tính toán giá trị IC₅₀ dựa trên số liệu đo độ đục tế bào bằng máy quang phổ TECAN bước sóng λ = 492 nm và phần mềm Raw data.

- Phương pháp đánh giá hoạt tính gây độc tế bào *in vitro*:

Phương pháp thử độ độc tế bào *in vitro* được Viện Ung thư Quốc gia Hoa Kỳ (National Cancer Institute - NCI) xác nhận là phép thử độ độc tế bào chuẩn nhằm sàng lọc, phát hiện các chất có khả năng kìm hãm sự phát triển hoặc diệt tế bào ung thư ở điều kiện *in vitro* theo phương pháp của Monks (1991) [8].

Các dòng tế bào ung thư ở người được ATCC cung cấp gồm: KB (*Human epidermic carcinoma* - ung thư biểu mô) là dòng luôn được sử dụng trong các phép thử độ độc tế bào; HepG2 (*Hepatocellular carcinoma* - ung thư gan);

LU-1 (*Human lung carcinoma* - ung thư phổi) và MCF-7 (*Human breast carcinoma* - ung thư vú).

Cách tiến hành: pha chất thử trong DMSO 10%, sau đó đưa vào các giếng của khay 96 giếng để có dải nồng độ 0,8; 4; 20 và 100 µg/ml. Chất đối chứng dương: ellipticine được pha ở các nồng độ 10 µg/ml; 2 µg/ml; 0,4 µg/ml; 0,08 µg/ml. Chất đối chứng âm: DMSO 10%. Các dòng tế bào ung thư nuôi cấy dưới dạng đơn lớp trong môi trường nuôi cấy DMEM (Dulbecco's modified eagle medium) cùng với 2 mM L-glutamine, 1 mM natri pyruvate và huyết thanh phôi bò 10%. Tế bào được cấy chuyển sau 3 - 5 ngày với tỷ lệ 1:3 và nuôi trong tủ ấm CO₂ ở điều kiện 37°C, 5% CO₂. Sử dụng máy ELISA (Bio-Rad) đọc kết quả về hàm lượng màu của chất nhuộm sulforhodamine B ở bước sóng 515 nm. Phép thử lặp lại 3 lần để đảm bảo tính chính xác.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN

1. Kết quả thử nghiệm hoạt tính chống oxy hóa *in vitro*.

Theo các công bố, một số loài thuộc chi *Buddleja* có hoạt tính chống oxy hóa tương đối cao [3, 4, 5, 9], nhưng đến nay chưa có nghiên cứu nào về loài Búp lẹ chùm to. Do đó, chúng tôi tiến hành thử hoạt tính chống oxy hóa *in vitro* từ cao chiết methanol tổng và cao chiết các phân đoạn của loài này nhằm sàng lọc để định hướng những nghiên cứu tiếp theo.

Bảng 1: Kết quả thử nghiệm hoạt tính chống oxy hoá *in vitro*.

% trung hòa gốc tự do của DPPH (%)						
Nồng độ mẫu thử (µg/ml)	Cao chiết methanol tổng	Cao chiết phân đoạn				Axít ascorbic
		<i>n</i> -hexan	Diclométan	Etylacetat	Nước	
200	82,82	3,37	43,12	89,18	88,65	90,45
100	81,49	2,67	30,45	88,81	87,72	88,08
50	62,57	1,04	15,35	87,48	87,33	83,46
25	30,00	0,35	2,87	64,70	79,90	45,15
12,5	7,97	0,15	0,25	34,70	42,18	21,88
6,25	8,56	-0,25	-0,50	17,52	14,46	11,63
SC ₅₀ (µg/ml)	45,84 ± 4,77	-	-	14,87 ± 1,41	13,48 ± 0,17	6,85 ± 0,73

(axít ascorbic: Chất đối chứng dương tính; -: Không thể hiện hoạt tính)

Kết quả cho thấy hai mẫu cao chiết *n*-hexan và diclométan không thể hiện hoạt tính chống oxy hoá ở nồng độ nghiên cứu.

Ba mẫu còn lại gồm: cao chiết methanol tổng, cao chiết phân đoạn etylacetat và phân đoạn nước có hoạt tính chống oxy hóa thông qua trung hòa gốc tự do của DPPH với SC₅₀ lần lượt là 45,84; 14,87 và 13,48 µg/ml. Đặc biệt, cao chiết phân đoạn nước của loài Búp lẹ chùm to có hoạt tính chống oxy hóa mạnh nhất trong bốn phân đoạn, thể hiện ở nồng độ có hiệu quả trung hòa gốc tự do DPPH với giá trị SC₅₀ là 13,48 µg/ml, gần tương đương so với chất chuẩn dương axít ascorbic. Do đó có thể tiến tới nghiên cứu sâu hơn để tìm ra các hợp chất có hoạt tính chống oxy của loài Búp lẹ chùm to trong phân đoạn chiết nước.

2. Kết quả thử nghiệm hoạt tính kháng sinh vật kiểm định *in vitro*.

Bảng 2: Kết quả thử nghiệm hoạt tính kháng sinh vật kiểm định *in vitro*.

Chủng vi sinh vật	Tên mẫu	IC ₅₀ (µg/ml)				
		Cao chiết methanol	Cao chiết phân đoạn			
			<i>n</i> -hexan	Diclométan	Etylacetat	Nước
Gram (+)	<i>E. faecium</i>	53,65	80,14	98,15	54,23	20,65
	<i>S. aureus</i>	45,49	60,97	88,80	44,17	21,49
Gram (-)	<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	-	-
	<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-
Nấm	<i>C. albicans</i>	-	-	-	-	-

(-: Kết quả âm tính)

Kết quả thử hoạt tính kháng sinh vật kiểm định cho thấy cao chiết methanol tổng và cao chiết các phân đoạn của loài Búp lẹ chùm to không thể hiện hoạt tính kháng các chủng vi khuẩn Gram (-) và chủng nấm kiểm định, nhưng đều có hoạt tính kháng các vi sinh vật Gram (+) là *E. faecium* (B650); *S. aureus* (ATCC 13709).

Hoạt tính kháng các vi sinh vật Gram (+) với giá trị IC_{50} trong khoảng 20,65 - 98,15 $\mu\text{g/ml}$. Trong đó, phân đoạn nước có hoạt tính mạnh nhất, thể hiện giá trị IC_{50} lần lượt là 20,65 và 21,49 $\mu\text{g/ml}$. Kết quả này chứng minh tác dụng kháng viêm của loài Búp lẹ chùm to đã được dùng trong y học cổ truyền; góp phần định hướng cho việc sử dụng và khai thác như một kháng sinh thực vật chữa các bệnh do vi khuẩn Gram (+) gây ra.

3. Kết quả thử nghiệm hoạt tính gây độc tế bào *in vitro*.

Bảng 3: Kết quả thử nghiệm hoạt tính gây độc tế bào.

Dòng tế bào KB - ung thư biểu mô (%)						
Nồng độ ($\mu\text{g/ml}$)	Cao chiết methanol tổng	Cao chiết phân đoạn				Ellipticine
		<i>n</i> -Hexan	Diclometan	Etylacetat	Nước	
100	15,64	21,04	73,13	75,34	24,05	95,83
20	9,15	8,32	48,49	52,34	18,25	86,37
4	3,27	3,30	30,35	31,05	8,82	48,49
0,8	2,56	1,40	18,65	19,38	2,76	29,36
IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	-	-	$21,35 \pm 2,83$	$19,03 \pm 1,78$	-	$0,33 \pm 0,07$
Dòng tế bào HepG2 (ung thư gan) (%)						
100	15,68	21,04	78,34	72,23	24,05	93,91
20	8,25	8,32	57,36	49,15	18,25	84,96
4	2,29	3,30	38,43	31,65	8,82	46,94
0,8	1,97	1,40	14,18	10,55	2,76	25,84
IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	-	-	$18,24 \pm 1,63$	$23,24 \pm 1,57$	-	$0,38 \pm 0,09$
Dòng tế bào MCF7 - ung thư vú (%)						
100	26,76	20,59	81,15	76,23	49,71	87,31
20	2,35	12,50	67,27	59,36	9,05	75,72
4	3,82	7,06	33,71	29,62	4,09	50,92
0,8	0,37	0,74	19,13	12,55	2,77	21,36
IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	-	-	$16,37 \pm 1,71$	$19,37 \pm 1,89$	-	$0,34 \pm 0,04$

Dòng tế bào LU-1 - ung thư phổi (%)						
100	11,52	52,24	65,27	62,23	20,29	92,62
20	8,09	14,51	52,31	49,15	13,19	77,08
4	4,66	11,87	32,57	31,65	9,73	51,37
0,8	1,32	3,25	12,41	9,55	2,37	24,93
IC ₅₀ (µg/ml)	-	-	39,85 ± 3,72	40,53 ± 4,03	-	0,33 ± 0,06

(-: Không thể hiện hoạt tính; ellipticine: Chất đối chứng dương tính, thử nghiệm ở nồng độ 10; 2; 0,4 và 0,08 µg/ml)

Trong nghiên cứu này, hoạt tính gây độc tế bào *in vitro* từ cao chiết methanol tổng và các cao chiết phân đoạn của loài Búp lẹ chùm to được thử trên bốn dòng tế bào ung thư: KB, HepG2, MCF7, LU-1. Từ kết quả cho thấy ba mẫu cao chiết tổng methanol, cao chiết phân đoạn n-hexan và phân đoạn nước không thể hiện hoạt tính gây độc tế bào trên cả bốn dòng tế bào thử nghiệm ở các nồng độ nghiên cứu.

Hai mẫu cao chiết phân đoạn diclometan và etylaxetat thể hiện hoạt tính gây độc tế bào trên cả bốn dòng tế bào nghiên cứu, thông qua % ức chế sự phát triển của tế bào ung thư KB, HepG2, MCF7, LU1 với các giá trị IC₅₀ lần lượt là 21,35; 18,24; 16,37; 39,85 µg/ml đối với cao chiết phân đoạn diclometan và 19,93; 23,24; 19,37; 40,53 µg/ml đối với cao chiết etylaxetat so với chất đối chứng dương là ellipticine (IC₅₀: 0,33 µg/ml). Đặc biệt, cao chiết phân đoạn diclometan của loài Búp lẹ chùm to thể hiện hoạt tính gây độc tế bào ung thư biểu mô mạnh nhất trong số bốn phân đoạn chiết và cao chiết methanol tổng. Vì vậy, nghiên cứu này giúp định hướng nghiên cứu phân lập các chất tinh khiết tách ra từ phân đoạn này nhằm

sàng lọc, tìm kiếm được hoạt chất thể hiện hoạt tính gây độc tế bào tốt nhất của loài dược liệu này.

KẾT LUẬN

Từ kết quả nghiên cứu cho thấy, cao chiết methanol tổng, phân đoạn etylaxetat và phân đoạn nước có hoạt tính chống oxy hóa thông qua trung hòa gốc tự do của DPPH với SC₅₀ lần lượt 45,84; 14,87 và 13,48 µg/ml. Đặc biệt, cao chiết phân đoạn nước của loài Búp lẹ chùm to có hoạt tính chống oxy hóa mạnh nhất trong bốn phân đoạn.

Cao chiết methanol tổng và các phân đoạn của loài Búp lẹ chùm to không thể hiện hoạt tính kháng các chủng vi khuẩn Gram (-) và chủng nấm kiểm định, nhưng đều có hoạt tính kháng hai chủng vi sinh vật Gram (+) kiểm định với IC₅₀ trong khoảng 20,65 - 98,15 µg/ml. Trong đó, phân đoạn nước có hoạt tính mạnh nhất, với IC₅₀ của *Enterococcus faecium* là 20,65 µg/ml và *Staphylococcus aureus* là 21,49 µg/ml.

Cao chiết diclometan và etylaxetat thể hiện hoạt tính gây độc tế bào trên cả bốn dòng tế bào nghiên cứu thông qua

phần trăm ức chế phát triển các dòng tế bào KB, HepG2, MCF7, LU1 với IC₅₀ lần lượt là 21,35; 18,24; 16,37; 39,85 µg/ml và 19,93; 23,24; 19,37; 40,53 µg/ml.

Kết quả này là cơ sở cho việc định hướng nghiên cứu phân lập các thành phần hóa học có hoạt tính sinh học hữu ích trong loài Búp lẹ chùm to, phục vụ nghiên cứu ứng dụng tiếp theo.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Võ Văn Chi. Từ điển cây thuốc Việt Nam (bộ mới). Tập 1. NXB Y học. Hà Nội. 2012.
2. Phạm Hoàng Hộ. Cây cỏ Việt Nam. Tập 2. NXB Trẻ TP. HCM. 1999.
3. Piao M.S, Kim M.R, Lee D.G, Park Y.K, Hahm K.S, Moon Y.H, Woo E.R. Antioxidative constituents from *Buddleia officinalis*. Arch Pharm Res. 2003, 26 (6), pp.453-457.
4. Ahmad I, Ahmad N, Wang F. Antioxidant phenylpropanoid glycosides from *Buddleja davidii*. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry. 2009, 24 (4), pp.993-997.
5. Pan Y, He C, Wang H, Ji X, Wang K, Liu P. Antioxidant activity of microwave-assisted extract of *Buddleia officinalis* and its major active component. Food Chemistry. 2010, 121 (2), pp.497-502.
6. Yuvaraj P, Subramoniam A, Louis T. Attenuation of expression of cytokines, oxidative stress and inflammation by hepatoprotective phenolic acids from *Thespesia populnea* Soland ex Correa stem bark. Annals of Phytomedicine. 2013, 2 (2), pp.47-56.
7. Cos P, L Maes, J.B Sindambiwe, A.J Vlietinck, D.V Berghe. Bioassay for antibacterial and antifungal activities. University of Antwerp, Belgium. 2005.
8. Monks A, Scudiero D, Skehan P. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. Journal of the National Cancer Institute. 1991, 83, pp.757-766.
9. Houghton P. J, Hikino H. Antihepatotoxic activity of extracts and constituents of *Buddleja* species. Planta Med. 1989, 5, pp.123-126.