

năng khứu giác và cải thiện hành vi trầm cảm gây bởi ZnSO₄ cấp tính nên cần thiết phải có những nghiên cứu sâu hơn để chứng minh cơ chế liên quan.

5. Kết luận

Từ những kết quả trong nghiên cứu này, chúng tôi đưa ra kết luận như sau: cao chiết lá chè đắng (liều 270 và 540 mg/kg) có tác dụng cải thiện tổn thương khứu giác trên chuột bị tổn thương khứu giác gây bởi ZnSO₄ thông qua các tiêu chí bao gồm cải thiện chức năng

khứu giác bằng thử nghiệm tìm kiếm mùi, chống trầm cảm bằng thử nghiệm treo đuôi chuột và cải thiện tổn thương biểu mô khứu giác bằng phương pháp đo độ dày lớp biểu mô khứu giác.

Lời cảm ơn: Kết quả thu được trong nghiên cứu này là sản phẩm của đề tài cấp cơ sở Viện Dược liệu: “Xây dựng mô hình tổn thương thùy khứu giác bằng ZnSO₄ định hướng nghiên cứu dược liệu có tác dụng hỗ trợ điều trị virus Corona”.

Tài liệu tham khảo

1. Nordin S., Brämerson A. (2008), Complaints of olfactory disorders: epidemiology, assessment and clinical implications, *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 8(1), 10-15.
2. Yang J., Pinto J. M. (2016), The Epidemiology of Olfactory Disorders, *Current Otorhinolaryngology Reports*, 4(2), 130-141.
3. Saniasiaya J., Islam M. A., Abdullah B. (2021), Prevalence of Olfactory Dysfunction in Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): A Meta-analysis of 27, 492 Patients, *The Laryngoscope*, 131(4), 865-878.
4. Nguyễn Tiến Bản, Nguyễn Khắc Khởi (1999), Tên khoa học của cây chè đắng ở Việt Nam, *Tạp chí Sinh học*, 1-3.
5. Nguyễn Văn Đậu, Lê Ngọc Thức (2006), Đóng góp vào việc nghiên cứu hoá thực vật cây chè đắng (*Ilex kaushue* S.Y. Hu (Aquifoliaceae)), *Tạp chí khoa học ĐHQHN, KHTN CN*, T.XXII, 1.
6. Li L., Xu L. J., Ma G. Z., Dong Y. M., Peng Y., Xiao P. G. (2013), The large-leaved Kudingcha (*Ilex latifolia* Thunb and *Ilex kudingcha* C.J. Tseng): a traditional Chinese tea with plentiful secondary metabolites and potential biological activities, *Journal of Natural Medicines*, 67(3), 425-437.
7. Pham T. N. H., Phi T. X., Le T. X., Nguyen M. K., Nguyen T. L., Matsumoto K., Yamaguchi M., Folk W. R. (2018), Anti-dementia Effects of *Ilex kudingcha* Leaves on Olfactory Bulbectomy-Induced Memory Impairment in Mice, *Journal of Medicinal Materials*, 23(5), 301-308.
8. Morales-Medina J. C., Iannitti T., Freeman A., Caldwell H. K. (2017), The olfactory bulbectomized rat as a model of depression: The hippocampal pathway, *Behavioural Brain Research*, 317, 562-575.
9. Ahn S., Choi M., Kim H., Yang E. J., Mahmood U., Kang S. I., Shin H. W., Kim D. W., Kim H. S. (2018), Transient Anosmia Induces Depressive-like and Anxiolytic-like Behavior and Reduces Amygdalar Corticotropin-Releasing Hormone in a ZnSO₄-Induced Mouse Model, *Chemical Senses*, 43(4), 213-221.
10. Ahn S., Shin H. W., Mahmood U., Khalmuratova R., Jeon S. Y., Jin H. R., Choi J. S., Kim H. S., Kim D. W. (2016), Chronic anosmia induces depressive behavior and reduced anxiety via dysregulation of glucocorticoid receptor and corticotropin-releasing hormone in a mouse model, *Rhinology*, 54(1), 80-87.
11. Phạm Thị Nguyệt Hằng, Trần Nguyên Hồng, Nguyễn Thị Phụng, Lê Thị Xoan, Nguyễn Minh Khởi, Đỗ Thị Hà, Hà Văn Oanh, Masamitsu Yamaguchi, William R. Folk, Kinzo Matsumoto (2020), Tác dụng cải thiện hội chứng tự kỷ của lá chè đắng trên mô hình chuột nhất tự kỷ gây bởi natri valproate, *Tạp chí Dược liệu*, 25(1), 50-55.
12. Kim J. Y., Jeong H. Y., Lee H. K., Yoo J. K., Bae K., Seong Y. H. (2011), Protective effect of *Ilex latifolia*, a major component of “kudingcha”, against transient focal ischemia-induced neuronal damage in rats, *Journal of Ethnopharmacology*, 133(2), 558-564.
13. Noda T., Shiga H., Yamada K., Harita M., Nakamura Y., Ishikura T., Kumai M., Kawakami Z., Kaneko A., Hattai T., Sakata-Haga H., Shimada H., Miwa T. (2019), Effects of tokishakuyakusan on regeneration of murine olfactory neurons *in vivo* and *in vitro*, *Chemical Senses*, 44(5), 327-338.

Tạp chí Dược liệu, tập 29, số 1/2024 (Trang 22 - 28)

CÁC DẪN XUẤT FLAVONOID, BENZYL, PHENYLPROPANOID GLYCOSID TỪ LOÀI *BARRINGTONIA MACROCARPA* VÀ TÁC DỤNG GÂY ĐỘC TẾ BÀO UNG THƯ *IN VITRO*

Phạm Thị Châm¹, Lê Thị Viên¹, Dương Thu Trang¹, Trần Thị Hồng Hạnh¹, Trần Hồng Quang¹, Hà Văn Oanh², Nguyễn Phương Thảo¹, Nguyễn Xuân Cường^{1,*}, Nguyễn Hoài Nam¹

¹Viện Hoá sinh biển, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VAST);

²Trường Đại học Dược Hà Nội

*Email: cuongnx@imbc.vast.vn

(Nhận bài ngày 19 tháng 7 năm 2023)

Tóm tắt

Sử dụng các phương pháp sắc ký kết hợp, ba hợp chất flavonoid glycosid là quercetin 3-O-methyl ether-7-O-β-D-glucopyranosid (1), kaempferol 3-O-methyl ether-7-O-β-D-glucopyranosid (2), quercetin 3-O-methyl ether-4'-O-β-D-glucopyranosid (3), một hợp chất benzyl glycosid là benzyl O-β-D-apiofuranosyl-(1→2)-β-D-glucopyranosid (4) và một hợp chất phenylpropanoid glycosid là dihydrosyringin (5) đã được phân lập từ cặn chiết methanol của cây Chiết trái to - *Barringtonia macrocarpa*. Cấu trúc hóa học của các hợp chất được xác định thông qua phân tích số liệu phổ cộng hưởng từ hạt nhân một chiều (¹H và ¹³C NMR) và hai chiều (HSQC và HMBC) kết hợp so sánh với các số liệu phổ đã được công bố. Ngoài ra, các hợp chất 2 và 4 thể hiện hoạt tính gây độc tế bào yếu trên ba dòng tế bào ung thư người được thử nghiệm là HepG2, LNCaP và MCF7 với giá trị IC₅₀ trong khoảng 82,89 ± 1,85 đến 99,73 ± 3,42 μM.

Từ khóa: *Barringtonia macrocarpa*, Lecythidaceae, Flavonoid glycosid, Benzyl glycosid, Phenylpropanoid glycosid.

Summary

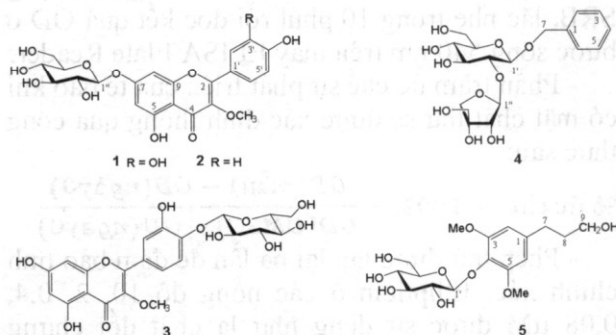
Flavonoid, Benzyl, and Phenylpropanoid Glycosides from *Barringtonia macrocarpa* and their *in vitro* Cytotoxic Effects Against Human Cancer Cell Lines

Using combined chromatographic experiments, three flavonoid glycosides as quercetin 3-*O*-methyl ether-7-*O*- β -D-glucopyranoside (1), kaempferol 3-*O*-methyl ether-7-*O*- β -D-glucopyranoside (3), one benzyl glycoside as benzyl *O*- β -D-apiofuranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-glucopyranoside (4), and one phenylpropanoid glycoside as dihydrosyringin (5) were isolated from the methanolic extract of *Barringtonia macrocarpa*. The chemical structures of the isolated compounds were elucidated on the basis of analysis of the 1D (^1H and ^{13}C NMR) and 2D (HSQC and HMBC) NMR spectroscopic data in comparison with those published. In addition, compounds 2 and 4 exhibited weak cytotoxic activity against three human cancer cell lines, HepG2, LNCaP, and MCF7 with IC_{50} values ranging from 82.89 ± 1.85 to $99.73 \pm 3.42 \mu\text{M}$.

Keywords: *Barringtonia macrocarpa*, Lecythidaceae, Flavonoid glycoside, Benzyl glycoside, Phenylpropanoid glycoside.

1. Đặt vấn đề

Các loài *Barringtonia* là cây gỗ hoặc bụi, thuộc họ Lộc vừng - Lecythidaceae. Các nghiên cứu trên thế giới về thành phần hoá học của các loài thuộc chi này cho thấy sự có mặt của các hợp chất triterpen [1],[2],[3],[4],[5],[6], neo-clerodan diterpen [7], flavonoid [8] và ceramid [5]. Ở Việt Nam, hiện có 13 loài (*B. acutangula*, *B. angusta*, *B. asiatica*, *B. conoidea*, *B. eberhardtii*, *B. edaphocarpa*, *B. macrocarpa*, *B. macrostachya*, *B. micrantha*, *B. musiformis*, *B. pauciflora*, *B. racemosa* và *B. cf. schmidtii*) và một thứ (*B. acutangula* ssp. *spicata*) thuộc chi này đã được ghi nhận [9]. Tiếp nối các nghiên cứu của chúng tôi về thành phần hoá học của các loài thuộc chi *Barringtonia* mọc ở Việt Nam [10],[11], gần đây chúng tôi đã công bố một hợp chất isoryanodan diterpen và hai dẫn xuất isoryanodan diterpen glucosid từ loài *B. macrocarpa* [12]. Trong công trình này chúng tôi tiếp tục công bố sự phân lập và xác định cấu trúc hoá học của ba hợp chất flavonoid glycosid, một hợp chất benzyl glycosid và một hợp chất phenylpropanoid glycosid (Hình 1) từ loài này và đánh giá hoạt tính gây độc tế bào *in vitro* của chúng trên ba dòng tế bào ung thư người là HepG2 (gan), LNCaP (tuyến tiền liệt) và MCF7 (vú).



Hình 1. Cấu trúc hóa học của các hợp chất 1-5

2. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Mẫu thực vật

Mẫu cành và lá cây Chiếu trái to - *Barringtonia macrocarpa* Hassk. được thu hái tại Vườn Quốc gia Bạch Mã, Thừa Thiên Huế vào tháng 7 năm 2021. Tên loài được TS. Nguyễn Thế Cường, Viện Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam giám định. Mẫu tiêu bản (Ký hiệu: BM01) được lưu giữ tại Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật.

2.2. Thiết bị và hóa chất

Phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) được đo trên máy Bruker AVANCE NEO 600 FT-NMR spectrometer với chất chuẩn nội là TMS. Sắc ký cột (CC) sử dụng *silica gel* (Kieselgel 60, 70-230 mesh và 230-400 mesh, Merck), *silica gel* pha đảo RP-18 (ODS-A, 12 nm S-150 mm, YMC Co., Ltd.), Sephadex LH-20 (Sigma) và Diaion HP-20 (Supelco). Sắc ký lớp mỏng (TLC) sử dụng bản mỏng tráng sẵn *silica gel* 60 F₂₅₄ (Merck) và RP-18 F₂₅₄ (Merck). Vết chất được phát hiện bằng cách phun đều thuốc thử H_2SO_4 10% và hơi nóng từ từ đến khi hiện màu.

2.3. Phân lập các hợp chất

Mẫu cành và lá *B. macrocarpa* sau khi thu hái về được rửa sạch, sấy khô dưới nhiệt độ 50°C sau đó xay nhỏ thành bột mịn. Bột này (9,5 kg) được đem chiết 3 lần với methanol có dùng siêu âm, dịch chiết sau đó được cô quay dưới áp suất giảm thu được cặn chiết methanol (M, 235 g). Cặn chiết methanol được hòa vào nước, sau đó chiết phân lớp lần lượt với các dung môi là dicloromethan và ethyl acetat thu được các cặn chiết dicloromethan (D, 30 g), ethyl acetat (E, 19,6 g), dịch nước (đã được cô quay để loại một phần nước) và một phần cặn không tan. Lốp nước được lọc bỏ phần cặn không tan và được đưa lên cột Diaion HP-20 sử dụng với gradient hệ dung môi từ 100% nước $\rightarrow$ methanol-nước 30:70 $\rightarrow$ methanol-nước 70:30 $\rightarrow$ 100% methanol thu được các phân đoạn W1-W4.

Phân đoạn W3 (40 g) được đưa lên cột sắc ký *silica gel* chạy gradient với hệ dung môi CH_2Cl_2 -MeOH, tăng dần độ phân cực (CH_2Cl_2 -MeOH từ

20:1 đến 1:1), thu được các phân đoạn W3A-W3E. Phân đoạn W3C (12 g) được phân tách tiếp bằng cột sắc ký *silica gel* pha đảo sử dụng với gradient hệ dung môi MeOH-H₂O, tăng dần độ phân cực (MeOH-H₂O từ 1:4 đến 1:1), thu được bảy phân đoạn từ W3C1-W3C7. Phân tách W3C3 (2 g) bằng cột sắc ký *silica gel* hệ dung môi CH₂Cl₂-MeOH-H₂O (6:1:0,1) thu được các phân đoạn W3C3A-W3C3E. Phân tách tiếp W3C3B (350 mg) trên cột sắc ký Sephadex LH-20 sử dụng hệ dung môi MeOH-H₂O (1:1) thu được ba phân đoạn W3C3B1-W3C3B3. Tinh chế W3C3B3 (100 mg) trên cột sắc ký *silica gel* hệ dung môi EtOAc-MeOH-H₂O (8:1:0,1) thu được hợp chất **5** (4,0 mg). Phân tách W3C3C (180 mg) trên cột sắc ký Sephadex LH-20 sử dụng hệ dung môi MeOH-H₂O (1:1) thu được phân đoạn W3C3C2. Tiếp tục phân tách phân đoạn W3C3C2 trên cột sắc ký *silica gel* hệ dung môi CH₂Cl₂-acetone-H₂O (1:2:0,1), sau đó sử dụng cột sắc ký *silica gel* pha đảo phân tách tiếp thu được hợp chất **4** (3,0 mg).

Phân đoạn W3C5 (1,5 g) được phân tách trên cột sắc ký Sephadex LH-20 sử dụng hệ dung môi MeOH-H₂O (1:1) thu được phân đoạn W3C5B. Phân tách W3C5B (350 mg) trên cột sắc ký *silica gel* hệ dung môi EtOAc-MeOH-H₂O (6:1:0,1) thu được hợp chất **2** (6,0 mg). Phân tách phân đoạn W3C6 (3 g) trên cột sắc ký *silica gel* hệ dung môi CH₂Cl₂-MeOH-H₂O (6:1:0,1) thu được các phân đoạn W3C6A-W3C6C. Phân tách phân đoạn W3C6B (200 mg) trên cột sắc ký Sephadex LH-20 sử dụng hệ dung môi MeOH-H₂O (1:1) thu được hợp chất **3** (2,5 mg). Phân tách phân đoạn W3C6C (300 mg) trên cột sắc ký Sephadex LH-20 sử dụng hệ dung môi MeOH-H₂O (1:1) thu được W3C6C1 (150 mg) và W3C6C2 (30 mg). Cuối cùng, tinh chế W3C6C2 (30 mg) trên cột sắc ký *silica gel* hệ dung môi CH₂Cl₂-MeOH-H₂O (6:1:0,1) thu được hợp chất **1** (3,0 mg).

Quercetin 3-O-methyl ether-7-O-β-D-glucopyranosid (1): Chất bột màu vàng nhạt, công thức phân tử C₂₂H₂₂O₁₂; ¹H (600 MHz, CD₃OD) và ¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD) xem Bảng 1.

Kaempferol 3-O-methyl ether-7-O-β-D-glucopyranosid (2): Chất bột màu vàng nhạt, công thức phân tử C₂₂H₂₂O₁₁; ¹H (600 MHz, DMSO-d₆) và ¹³C NMR (150 MHz, DMSO-d₆) xem Bảng 1.

Quercetin 3-O-methyl ether-4'-O-β-D-glucopyranosid (3): Chất bột màu vàng nhạt, công thức phân tử C₂₂H₂₂O₁₂; ¹H (600 MHz, CD₃OD) và ¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD) xem Bảng 1.

Benzyl O-β-D-apiofuranosyl-(1→2)-β-D-glucopyranosid (4): Chất bột màu vàng nhạt, công thức phân tử C₁₈H₂₆O₁₀; ¹H (600 MHz, CD₃OD) và ¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD) xem Bảng 2.

Dihydrosyringin (5): Chất bột màu trắng, công thức phân tử C₁₇H₂₆O₉; ¹H (600 MHz, CD₃OD) và ¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD) xem Bảng 2.

2.4. Phương pháp thử hoạt tính sinh học

Thử nghiệm SRB (Sulforhodamin B) [13] được sử dụng để đánh giá hoạt tính gây độc tế bào *in vitro* của các hợp chất **1-5** trên 3 dòng tế bào ung thư người là HepG2, LNCaP và MCF7. Chi tiết các bước tiến hành đã được mô tả trong tài liệu [14], cụ thể như sau:

- 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. Tiến hành đưa 190 μL tế bào vào đĩa 96 giếng để thử nghiệm.

- Mẫu thử được hòa tan trong DMSO 100% để có nồng độ ban đầu là 20 mM. Tiến hành pha loãng mẫu trên đĩa 96 giếng bằng môi trường nuôi cấy tế bào (không có FBS) thành bốn dãy nồng độ từ cao xuống thấp: 100, 20, 4 và 0,8 μM. Chất thử đã pha loãng ở các nồng độ (10 μL) được đưa vào các giếng của đĩa 96 giếng đã chuẩn bị tế bào ở trên. Giếng không có chất thử nhưng có tế bào ung thư (190 μL) + DMSO 1% (10 μL) sẽ được sử dụng làm đối chứng ngày 0. Sau 1 giờ, giếng đối chứng ngày 0 tế bào sẽ được cố định bằng trichloroacetic acid (TCA) 20%.

- Ủ trong tủ ấm 72 giờ. Sau 72 giờ, tế bào được cố định bằng TCA trong 1 giờ, được nhuộm bằng SRB trong 30 phút ở 37°C, rửa 3 lần bằng acetic acid rồi để khô ở nhiệt độ phòng.

- Thêm 10 mM đệm Tris để hòa tan lượng SRB, lắc nhẹ trong 10 phút rồi đọc kết quả OD ở bước sóng 540 nm trên máy ELISA Plate Reader.

- Phần trăm ức chế sự phát triển của tế bào khi có mặt chất thử sẽ được xác định thông qua công thức sau:

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

- Phép thử được lặp lại ba lần để đảm bảo tính chính xác. Ellipticin ở các nồng độ 10, 2, 0,4, 0,08 μM được sử dụng như là chất đối chứng tham khảo.

- DMSO 1% luôn được sử dụng như đối chứng âm (nồng độ cuối cùng trong giếng thử là 0,05%). Giá trị IC₅₀ sẽ được xác định nhờ vào phần mềm TableCurve 2Dv4.

3. Kết quả và thảo luận

Hợp chất **1** phân lập được dưới dạng chất bột màu vàng nhạt. Ngoài ra, vết chất trên TLC hiện màu vàng với thuốc thử H_2SO_4 10% cho phép dự đoán đây là một flavonoid. Trên phổ 1H NMR xuất hiện các tín hiệu đặc trưng của hai proton thuộc vòng thơm tương tác *meta* [δ_H 6,51 (1H, d, $J = 1,8$ Hz, H-6) và 6,78 (1H, br s, H-8)], 3 proton thuộc vòng thơm tương tác hệ ABX [δ_H 7,66 (1H, br s, H-2'), 6,93 (1H, d, $J = 8,4$ Hz, H-5') và 7,59 (1H, dd, $J = 1,8, 8,4$ Hz, H-6')] và một nhóm methoxy [δ_H 3,82 (3H, s, 3-OCH₃)]. Trên phổ 1H và ^{13}C NMR còn xuất hiện các tín hiệu đặc trưng của một gốc đường glucopyranose tại δ_C 101,68 (CH, C-1''), 74,74 (CH, C-2''), 77,88 (CH, C-3''), 71,30 (CH, C-4''), 78,40 (CH,

C-5''), 62,49 (CH₂, C-6'')/ δ_H 5,08 (1H, d, $J = 7,2$ Hz, H-1'') [15]. So sánh chi tiết cho thấy số liệu phổ ^{13}C NMR của **1** phù hợp với các số liệu phổ tương ứng của quercetin-3-*O*-methyl ether-7-*O*- β -D-glucopyranosid [15] (Bảng 1). Proton nhóm methoxy tại δ_H 3,82 có tương tác xa HMBC với C-3 tại δ_C 139,84 (Hình 2), cho phép xác định vị trí liên kết của nhóm methoxy tại C-3. Đơn vị đường glucose được xác định gắn vào C-7 dựa trên tương tác xa HMBC giữa proton anomer H-1'' (δ_H 5,08) và C-7 (δ_C 164,75). Các proton H-2' (δ_H 7,66) và H-6' (δ_H 7,59) có tương tác HMBC với C-2 (δ_C 158,59) chứng minh vị trí liên kết của vòng B tại C-2. Như vậy, hợp chất **1** được xác định là quercetin 3-*O*-methyl ether-7-*O*- β -D-glucopyranosid [15].

Bảng 1. Số liệu phổ 1H (600 MHz) và ^{13}C NMR (150 MHz) của các hợp chất **1-3**

C	δ_C^a	1		2		3	
		δ_C^b	δ_H^b dạng pic ($J = \text{Hz}$)	δ_C^c	δ_H^b dạng pic ($J = \text{Hz}$)	δ_C^b	δ_H^b dạng pic ($J = \text{Hz}$)
2	157,7	158,59	-	156,16	-	157,12	-
3	139,5	139,84	-	137,83	-	140,17	-
4	179,7	180,21	-	178,07	-	180,05	-
5	162,4	162,80	-	160,84	-	163,50	-
6	100,3	100,77	6,51 d (1,8)	99,17	6,44 d (2,4)	100,02	6,22 d (2,4)
7	164,3	164,75	-	162,87	-	166,50	-
8	95,5	95,80	6,78 br s	94,55	6,80 d (2,4)	94,86	6,42 d (2,4)
9	157,5	157,97	-	155,94	-	158,60	-
10	107,3	107,66	-	105,82	-	105,92	-
1'	122,2	122,78	-	120,34	-	126,54	-
2'	116,1	116,60	7,66 br s	130,20	7,96 d (8,4)	117,12	7,65 d (2,4)
3'	146,3	146,51	-	115,65	6,95 d (8,4)	148,18	-
4'	150,1	150,16	-	160,37	-	149,11	-
5'	116,2	116,46	6,93 d (8,4)	115,65	6,95 d (8,4)	117,75	7,34 d (8,4)
6'	122,3	122,52	7,59 dd (1,8, 8,4)	130,20	7,96 d (8,4)	121,93	7,61 dd (2,4, 8,4)
OMe	60,2	60,50	3,82 s	59,66	3,80 s	60,68	3,82 s
Glc							
1''	101,4	101,68	5,08 d (7,2)	99,84	5,06 d (7,8)	103,33	4,96 d (7,2)
2''	74,4	74,74	3,52 m	73,06	3,25 m	74,82	3,57 dd (7,2, 9,0)
3''	77,6	77,88	3,52 m	76,39	3,30 m	77,60	3,53 t (9,0)
4''	71,0	71,30	3,43 t (9,0)	69,52	3,18 t (9,0)	71,34	3,45 t (9,0)
5''	78,0	78,40	3,56 m	77,12	3,44 m	78,47	3,51 m
6''	62,3	62,49	3,73 dd (6,0, 12,0) 3,95 dd (2,4, 12,0)	60,57	3,71 br d (12,0) 3,48 m	62,46	3,95 dd (2,4, 12,0) 3,75 dd (5,4, 12,0)

^a δ_C của quercetin 3-*O*-methyl ether-7-*O*- β -D-glucopyranosid trong CD₃OD [15], ^bđo trong CD₃OD và ^cđo trong DMSO-*d*₆.

Các số liệu phổ 1H và ^{13}C NMR của **2** tương tự như các số liệu phổ của **1**, ngoại trừ sự xuất hiện hai tín hiệu đối xứng của bốn proton thuộc vòng thơm tương tác hệ AA'BB' tại δ_H 7,96 (2H, d, $J = 8,4$ Hz, H-2' và H-6') và 6,95 (2H, d, $J = 8,4$ Hz, H-3' và H-5') ở hợp chất **2** thay cho các tín hiệu của ba proton thuộc vòng thơm tương tác hệ ABX ở hợp chất **1**, cho thấy cấu trúc vòng B của hợp chất **2** có dạng khung kaempferol. Tương tác HMBC nhận được giữa các proton H-2'/H-6' (δ_H 7,96) với C-2 (δ_C 156,16) chứng minh vị trí liên kết của vòng B tại C-2. Từ các phân tích đã

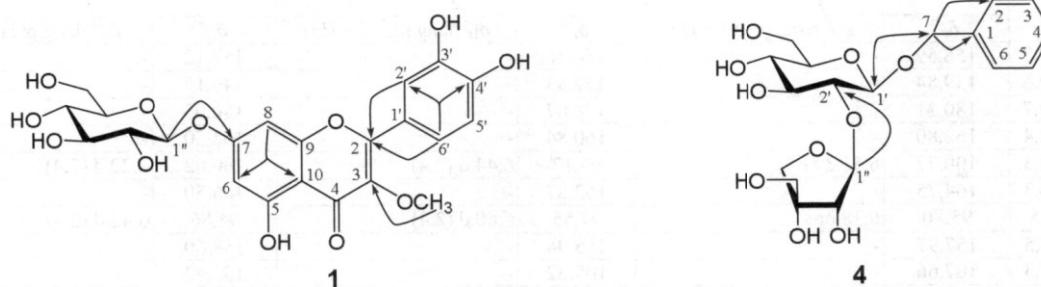
nêu, hợp chất **2** được xác định là kaempferol 3-*O*-methyl ether-7-*O*- β -D-glucopyranosid [16].

Các số liệu phổ 1H và ^{13}C NMR của **3** cũng tương tự như các số liệu phổ của **1**, tuy nhiên có một số thay đổi đáng kể về số liệu phổ ở vị trí anomer của đơn vị đường và một số tín hiệu thuộc vòng A giữa hai hợp chất (Bảng 1). Điều này cho thấy hai hợp chất chỉ khác nhau ở vị trí liên kết của đơn vị đường glucopyranose. Tương tác xa nhận được giữa H-6' (δ_H 7,61) và H-1'' (δ_H 4,96) với C-4' (δ_C 149,11) chứng minh vị trí liên kết của đơn vị đường glucose tại C-4'. Như vậy,

hợp chất **3** được xác định là quercetin 3-*O*-methyl ether-4'-*O*- β -D-glucopyranosid [17].

Trên phổ ^1H NMR phần aglycon của **4** chỉ xuất hiện các tín hiệu của một vòng thơm thế một vị trí [δ_{H} 7,43 (2H, dd, $J = 1,2, 7,8$ Hz, H-2 và H-6), 7,35 (2H, dt, $J = 1,2, 7,8$ Hz, H-3 và H-5) và 7,29 (1H, tt, $J = 1,2, 7,8$ Hz, H-4)] và một nhóm oxymethylen [δ_{H} 4,65 và 4,93 (mỗi tín hiệu 1H, d, $J = 12,0$ Hz, H-7)]. Ngoài ra, trên phổ phổ ^1H và ^{13}C NMR còn xuất hiện các tín hiệu đặc trưng của một gốc đường glucopyranose tại δ_{C} 102,19 (CH, C-1'), 78,96 (CH, C-2'), 78,61 (CH, C-3'), 71,73 (CH, C-4'), 77,89 (CH, C-5'), 62,80 (CH₂, C-6')/ δ_{H} 4,44 (1H, d, $J = 7,8$ Hz, H-1'), 3,44 (1H, dd, $J = 7,8, 9,0$ Hz, H-2'), 3,49 (1H, t, $J = 9,0$ Hz, H-3'), 3,33 (1H, t, $J = 9,0$ Hz, H-4'), 3,27 (1H, m, H-5'), 3,71 (1H, dd, $J = 6,0, 12,0$ Hz, H-6'a), 3,91

(1H, dd, $J = 1,8, 12,0$ Hz, H-6'b) và một gốc đường apiofuranose tại δ_{C} 110,68 (CH, C-1''), 77,95 (CH, C-2''), 80,62 (C, C-3''), 75,30 (CH₂, C-4''), 66,03 (CH₂, C-5'')/ δ_{H} 5,40 (1H, d, $J = 1,2$ Hz, H-1''), 3,97 (1H, d, $J = 1,2$ Hz, H-2''), 3,66 (1H, d, $J = 9,6$ Hz, H-4''a), 3,95 (1H, d, $J = 9,6$ Hz, H-4''b), 3,52 (1H, d, $J = 12,0$ Hz, H-5''a), 3,59 (1H, d, $J = 12,0$ Hz, H-5''b) [19]. Tương tác HMBC giữa H-1'' (δ_{H} 5,40) và C-2' (δ_{C} 78,96) chứng minh vị trí gắn của gốc đường apiose tại C-2' của gốc đường glucose. Ngoài ra, tương tác HMBC của H-1' (δ_{H} 4,44) với C-7 (δ_{C} 71,82) và H-7 (δ_{H} 4,65 và 4,93) với C-1 (δ_{C} 138,99), C-2 (δ_{C} 129,32), C-1' (δ_{C} 102,19) chứng minh vị trí gắn của chuỗi đường tại C-7 (Hình 2). Như vậy, hợp chất **4** được xác định là benzyl *O*- β -D-apiofuranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-glucopyranosid [18].



Hình 2. Các tương tác HMBC (H $\rightarrow$ C) chính của các hợp chất **1** và **4**

Trên phổ ^1H và ^{13}C NMR của **5** cũng xuất hiện các tín hiệu đặc trưng của một gốc đường glucopyranose tại δ_{C} 105,69 (CH, C-1'), 75,76 (CH, C-2'), 77,83 (CH, C-3'), 71,36 (CH, C-4'), 78,33 (CH, C-5'), 62,63 (CH₂, C-6')/ δ_{H} 4,83 (1H, d, $J = 7,8$ Hz, H-1'). Ngoài ra, phổ ^1H NMR của phần aglycon xuất hiện các tín hiệu của hai proton vòng thơm dạng singlet và đối xứng [δ_{H} 6,57 (2H, s, H-2 và H-6)], hai nhóm methoxy đối xứng [δ_{H} 3,86 (6H, s)], hai nhóm methylen [δ_{H} 2,66 (2H, t, $J = 6,6$ Hz, H-7) và 1,85 (2H, m,

H-8)] và một nhóm oxymethylen [δ_{H} 3,60 (2H, t, $J = 6,6$ Hz, H-9)]. So sánh số liệu phổ ^{13}C NMR của **5** với các số liệu đã được công bố của dihydrosyngin nhận được sự phù hợp ở các vị trí tương ứng [20] (Bảng 2). Ngoài ra, trên phổ HMBC xuất hiện các tương tác của H-2/H-6 (δ_{H} 6,57) với C-7 (δ_{C} 33,37), các proton methoxy (δ_{H} 3,86) với C-3/C-5 (δ_{C} 154,11), H-8 (δ_{H} 1,85) với C-1 (δ_{C} 140,47), H-9 (δ_{H} 3,60) với C-7 (δ_{C} 33,37) và proton anomer H-1' (δ_{H} 4,83) với C-4 (δ_{C} 134,56) cho phép khẳng định hợp chất này chính là dihydrosyngin [20].

Bảng 2. Số liệu phổ ^1H (600 MHz) và ^{13}C NMR (150 MHz) của các hợp chất **4** và **5** đo trong CD₃OD

C	$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{b}}$	4		$\delta_{\text{C}}^{\text{c}}$	5	
			δ_{C}	δ_{H} dạng pic ($J = \text{Hz}$)		δ_{C}	δ_{H} dạng pic ($J = \text{Hz}$)
1	137,9		138,99	-	138,7	140,47	-
2, 6	127,6		129,32	7,43 dd (1,2, 7,8)	106,8	107,50	6,57 s
3, 5	128,1		129,29	7,35 dt (1,2, 7,8)	153,2	154,11	-
4	127,3		128,72	7,29 tt (1,2, 7,8)	133,8	134,56	-
7	69,5		71,82	4,65 d (12,0)/4,93 d (12,0)	32,8	33,37	2,66 t (7,8)
8					35,2	35,41	1,85 m
9					61,1	62,16	3,60 t (6,6)
OMe					56,3	57,02	3,86 s
Glc							
1'	100,4	101,9	102,19	4,44 d (7,8)	104,9	105,69	4,83 d (7,8)
2'	77,1	79,3	78,96	3,44 dd (7,8, 9,0)	75,7	75,76	3,49 dd (7,8, 9,0)

C	δ_C^a	δ_C^b	4		δ_C^c	5	
			δ_C	δ_H dạng pic ($J = \text{Hz}$)		δ_C	δ_H dạng pic ($J = \text{Hz}$)
3'	76,1	78,4	78,61	3,49 t (9,0)	78,3	77,83	3,43 m
4'	70,3	71,8	71,73	3,33 t (9,0)	71,2	71,36	3,43 m
5'	76,8	78,0	77,89	3,27 m	78,0	78,33	3,23 m
6'	61,0	62,8	62,80	3,71 dd (6,0, 12,0) 3,91 dd (1,8, 12,0)	62,9	62,63	3,69 dd (4,8, 12,0) 3,81 dd (2,4, 12,0)
Api							
1''	108,8	110,9	110,68	5,40 d (1,2)			
2''	76,7	77,7	77,95	3,97 d (1,2)			
3''	79,1	80,6	80,62	-			
4''	73,2	75,3	75,30	3,66 d (9,6)/3,95 d (9,6)			
5''	64,2	66,0	66,03	3,52 d (12,0)/3,59 d (12,0)			

^a δ_C của benzyl O- β -D-apiofuranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-glucopyranosid [18], ^b δ_C phân đường của ficusid D [19] và ^c δ_C của dihydrosyringin [20].

Các hợp chất 1-5 được đánh giá hoạt tính gây độc tế bào trên 3 dòng tế bào ung thư người là, MCF7, LNCaP và HepG2 sử dụng phương pháp SRB [13]. Kết quả thu được cho thấy, kaempferol 3-O-methyl ether-7-O- β -D-glucopyranosid (2) (IC_{50} tương ứng là $99,73 \pm 3,42$, $82,89 \pm 1,85$ và $97,89 \pm 2,32 \mu\text{M}$) và benzyl O- β -D-apiofuranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-glucopyranosid (4) (IC_{50} tương ứng là $97,21 \pm 1,35$, $91,09 \pm 1,46$ và $93,08 \pm 2,03 \mu\text{M}$) thể hiện hoạt tính yếu trên ba dòng tế bào ung thư được thử nghiệm, so với chất đối chứng dương ellipticin với IC_{50} tương ứng là $1,83 \pm 0,20$, $1,54 \pm 0,12$ và $1,70 \pm 0,12 \mu\text{M}$. Các hợp chất còn lại không thể hiện hoạt tính với giá trị $IC_{50} > 100 \mu\text{M}$.

4. Kết luận

Từ cành và lá *B. macrocarpa* ba hợp chất flavonoid glycosid là quercetin-3-O-methylether-7-O- β -D-glucopyranosid (1), kaempferol 3-O-methyl ether-7-O- β -D-glucopyranosid (2),

quercetin 3-O-methyl ether-4'-O- β -D-glucopyranosid (3), một hợp chất benzyl glycosid là benzyl O- β -D-apiofuranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-glucopyranosid (4) và một hợp chất phenylpropanoid glycosid là dihydrosyringin (5) đã được phân lập sử dụng các phương pháp sắc ký kết hợp. Cấu trúc hoá học của các hợp chất được xác định bằng các phương pháp phổ cộng hưởng từ hạt nhân một chiều (^1H NMR và ^{13}C NMR) và hai chiều (HSQC và HMBC). Đây là lần đầu tiên các hợp chất này được công bố từ loài *B. macrocarpa*. Hai hợp chất 2 và 4 thể hiện hoạt tính gây độc tế bào yếu trên 3 dòng tế bào ung thư người được thử nghiệm là HepG2, LNCaP và MCF7 với giá trị IC_{50} trong khoảng $82,89 \pm 1,85$ đến $99,73 \pm 3,42 \mu\text{M}$.

Lời cảm ơn: Công trình này được hoàn thành với sự tài trợ kinh phí của Quỹ Phát triển khoa học và công nghệ Quốc gia - NAFOSTED (Đề tài mã số: 104.01-2020.02).

Tài liệu tham khảo

1. Pal B. C., Chaudhuri T., Yoshikawa K., Arihara S. (1994), Saponins from *Barringtonia acutangula*. *Phytochemistry*, 35, 1315-1318.
2. Herlt A. J., Mander L. N., Pongoh E., Rumampuk R. J., Tarigan P. (2002), Two major saponins from seeds of *Barringtonia asiatica*: putative antifeedants toward *Epilachna* sp. larvae, *Journal of Natural Products*, 65, 115-120.
3. Mills C., Carroll A. R., Quinn R. J. (2005), Acutangulosides A-F, monodesmosidic saponins from the bark of *Barringtonia acutangula*, *Journal of Natural Products*, 68, 311-318.
4. Gowri P. M., Radhakrishnan S. V., Basha S. J., Sarma A. V., Rao J. M. (2009), Oleanane-type isomeric triterpenoids from *Barringtonia racemosa*, *Journal of Natural Products*, 72, 791-795.
5. Ponnappalli M. G., Dangeti N., Sura M. B., Kothapalli H., Akella V. S. S., Shaik J. B. (2017), Self gelating isoracemosol A, new racemosaceramide A, and racemosol E from *Barringtonia racemosa*, *Natural Product Research*, 31, 63-69.
6. Ragasa C. Y., Espineli D. L., Shen C. C. (2012), A new triterpene from *Barringtonia asiatica*, *Natural Product Research*, 26, 1869-1875.
7. Hasan C. M., Khan S., Jabbar A., Rashid M. A. (2000), Nasimaluns A and B: neo-clerodane diterpenoids from *Barringtonia racemosa*, *Journal of Natural Products*, 63, 410-411.
8. Samanta S. K., Bhattacharya K., Mandal C., Pal B. C. (2010), Identification and quantification of the active component quercetin 3-O-rutinoside from *Barringtonia racemosa*, targets mitochondrial apoptotic pathway in acute lymphoblastic leukemia, *Journal of Asian Natural Product Research*, 12, 639-648.
9. Trần Thị Phương Anh, Nguyễn Tiên Bản, Lê Kim Biên và cs, Danh lục Các loài Thực vật Việt Nam, NXB Nông nghiệp, 2003, 936-938.
10. Van Q. T. T., Vien L. T., Hanh T. T. H., Huong P. T. T., Cuong N. T., Thao N. P., Thuan N. H., Dang N. H., Thanh N. V., Cuong N. X., Nam N. H., Kiem P. V., Minh C. V. (2020), Acylated flavonoid glycosides from *Barringtonia racemosa*, *Natural Product Research*, 34, 1276-1281.
11. Vien L. T., Van Q. T. T., Hanh T. T. H., Huong P. T. T., Thuy N. T. K., Cuong N. T., Dang N. H., Thanh N. V., Cuong N. X., Nam N. H., Kiem P. V., Minh C. V. (2017), Flavonoid glycosides from *Barringtonia acutangula*, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 27, 3776-3781.
12. Huong P. T. M., Cham P. T., Vien L. T., Hanh T. T. H., Cuong N. T., Luong D. V., Quang T. H., Cuong N. X., Nam N. H., Minh C. V. (2023), Isoryanodane diterpene derivatives from *Barringtonia macrocarpa*, *Natural Product Research*, Doi: 10.1080/14786419.2023.2217467.
13. Monks A., Scudiero D., Skehan P., Shoemaker R., Paull K., Vistica D., Hose C.,

Langley J., Cronise P., Vaigro-Wolff A., Gray-Goodrich M., Campbell H., Mayo J., Boyd M. (1991), Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines, *Journal of the National Cancer Institute*, 83, 757-766. 14. Cuong N. X., Vien L. T., Hanh T. T., Thao N. P., Thao D. T., Thanh N. V., Nam N. H., Thung do C., Kiem P. V., Minh C. V. (2015), Cytotoxic triterpene saponins from *Cercodemas anceps*, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 25, 3151-3156. 15. Krenn L., Miron A., Pemp E., Petr U., Kopp B. (2003), Flavonoids from *Achillea nobilis* L. *Zeitschrift für Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*, 58, 11-16. 16. Laggoun S., Boutagane N., Kabouche A., Kabouche Z., Ait-Kaki Z., Ait-Kaki B. (2008), Components and antimicrobial activity of *Lamium amplexicaule* from Algeria, *Chemistry of Natural Compounds*, 44, 363-364. 17. Iwashina T., Ootani S., Hayashi K. (1984), Neochilenin, a new glycoside of 3-O-methylquercetin, and other flavonols in the tepals of *Neochilenia*, *Neoporteria* and *Parodia* species (Cactaceae), *The Botanical Magazine*, 97, 23-30. 18. Yukinori M., Tsuyoshi T. (1995), Studies on the constituents of *Scutellaria* species XVII: Phenol glycosides of the root of *Scutellaria baicalensis* Georgi (2), *Natural Medicines*, 49, 350-353. 19. Ye X., Tian W., Wang G., Zhang X., Zhou M., Zeng D., Liu X., Yao X., Zhang Y., Chen H. (2020), Phenolic glycosides from the roots of *Ficus hirta* Vahl. and their antineuroinflammatory activities, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68, 4196-4204. 20. Wu Q., Bang M. H., Cho J. G., Lee D. Y., Lee K. T., Chung H. G., Choi M. S., Jeong T. S., Ahn E. M., Kim G. S., Baek N. I. (2013), Phenolic compounds from the roots of *Brassica rapa* ssp. *campestris*, *Chemistry of Natural Compounds*, 49, 852-856.

Tạp chí Dược liệu, tập 29, số 1/2024 (Trang 28 - 35)

NGHIÊN CỨU QUY TRÌNH CHIẾT XUẤT CAO GIÀU HỢP CHẤT LIGNAN TỪ QUẢ NGŨ VỊ TỬ THU TẠI VÙNG NÚI NGỌC LINH, VIỆT NAM

Lê Xuân Duy¹, Đỗ Quang Thái¹, Đỗ Thị Thùy Linh¹, Nguyễn Minh Khởi¹,
Nguyễn Thị Thu¹, Nguyễn Thị Nụ¹, Ninh Quang Nhã², Nguyễn Thị Hà Ly^{1,*}

¹Viện Dược liệu (NIMM); ²Trường Đại học Dược Hà Nội

*Email: nguyenthihaly.chem@gmail.com

(Nhận bài ngày 12 tháng 6 năm 2023)

Tóm tắt

Nghiên cứu này được thực hiện nhằm khảo sát, đánh giá ảnh hưởng của phương pháp chiết xuất cũng như một số điều kiện công nghệ đến quá trình chiết xuất nhằm thu được cao chiết giàu hợp chất lignan từ quả ngũ vị tử (*Schisandra sphenanthera*) thu tại vùng núi Ngọc Linh, Việt Nam. Các yếu tố được khảo sát gồm có dung môi chiết, kích thước dược liệu, tỷ lệ khối lượng dược liệu/thể tích dung môi, số lần chiết và thời gian chiết. Ngoài ra, một số phương pháp tinh chế, làm giàu lignan trong cao ngũ vị tử cũng được khảo sát. Tiêu chí dùng để đánh giá và lựa chọn điều kiện chiết xuất là hàm lượng lignan tổng số (tính theo tổng 3 hợp chất schisandrin, gomisin B và schisandrin A) bằng phương pháp HPLC-DAD. Kết quả nghiên cứu cho thấy phương pháp chiết nóng ở 60°C là phù hợp nhất để chiết xuất ngũ vị tử. Các điều kiện công nghệ chiết xuất phù hợp nhất cả về yếu tố kỹ thuật và kinh tế gồm: dung môi chiết là ethanol 80%, kích thước nguyên liệu 1 - 3 mm, chiết 2 lần, mỗi lần 1 giờ, với tỷ lệ nguyên liệu/dung môi lần lượt là 1/8 và 1/5 (g/mL) và tổng thời gian chiết là 2 giờ. Quá trình tinh chế làm giàu hợp chất lignan được thực hiện bằng phương pháp chiết phân bố lỏng - lỏng từ pha nước và dung môi ethyl acetat với tỷ lệ 1/1 (v/v), chiết phân bố 3 lần. Ở quy mô 5 g dược liệu, cao chiết thu được có hàm lượng lignan trung bình đạt 6,39%, hiệu suất thu hồi lignan của cả quy trình đạt 84,47%. Ở quy mô 2 kg dược liệu/mẻ, cao chiết thu được có hàm lượng lignan đạt 6,24%, hiệu suất thu hồi lignan của cả quy trình đạt 68,93%.

Từ khóa: Ngũ vị tử, Núi Ngọc Linh, Chiết xuất, Lignan.

Summary

The Extraction Procedure of a Lignan-Rich Extract from the Fruits of *Schisandra sphenanthera* Rehd. et Wils. (Schisandraceae) Collected in Ngọc Linh Mountain, Vietnam

In this study, we evaluated some conditions affecting the extraction of lignans from the fruits of *Schisandra sphenanthera* collected in the Ngọc Linh mountains, Vietnam. The investigated factors included extraction method, extraction solvent, medicinal plant size, material mass/solvent volume ratio, extraction time, and number of extraction times. Additionally, several methods of refining and enriching lignans in the *Schisandra sphenanthera* extract were also investigated. The criteria used to evaluate and select extraction conditions was the total lignan content (calculated according to the total of three lignans schisandrin, gomisin B, and schisandrin A) by the HPLC-DAD method. The best results included using hot extraction at 60°C, extraction solvent of 80% ethanol, material size of 1 - 3 mm, extraction two times and 1 hour each time, with material/solvent ratios of 1/8 and 1/5 (g/mL), and a total extraction time of 2 hours. The process of refining and enriching the lignan component was carried out using a liquid-liquid distribution with ethyl acetate solvent from the aqueous phase at a ratio of 1:1 (v/v), extracted three times. The obtained extract after refining had a lignan content of 6.39%, and the lignan recovery efficiency of the whole process was 84.47% in the laboratory scale (5 g). In the 2 kg scale extraction procedure, the obtained extract had a lignan content of 6.24% and the lignan recovery efficiency was 68.93%.

Keywords: *Schisandra sphenanthera*, Ngọc Linh mountain, Extraction, Lignans.

1. Đặt vấn đề

Gan là cơ quan đảm nhận nhiều chức năng quan trọng của cơ thể, giúp bảo vệ cơ thể và loại bỏ các chất độc trong cơ thể. Khi tế bào gan bị tổn thương sẽ làm suy giảm chức năng gan, dẫn đến nhiều loại bệnh khác nhau như sỏi mật, đái tháo

đường, gout, mỡ máu, béo phì..., vì vậy cần thiết nghiên cứu các thuốc có tác dụng bảo vệ gan [1]. Việt Nam là nước có nguồn dược liệu rất phong phú, trong đó có một số dược liệu được dùng để chữa các bệnh về gan như: Cà gai leo, diệp hạ châu, ngũ vị tử...[2],[3]. Dược liệu ngũ vị tử đã