

# NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN HÓA HỌC VÀ HOẠT TÍNH SINH HỌC CÂY DỊ HÙNG HOA TO

STUDY ON CHEMICAL CONSTITUENTS AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF *HETEROSTEMMA GRANDIFLORUM* COST.

Khiếu Thị Tâm<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Thùy Linh<sup>2</sup>,  
Lê Thị Hồng Nhung<sup>3</sup>, Nguyễn Thanh Tâm<sup>2</sup>, Nguyễn Thị Hoàng Anh<sup>2,\*</sup>

## TÓM TẮT

Dị hùng hoa to (*Heterostemma grandiflorum* Cost.) là một loài thực vật có hoa trong họ Thiên lý (Asclepiadaceae), phân bố nhiều ở Hòa Bình, Hà Nội, Hà Nam,.... Cho đến nay, theo tra cứu tư liệu của chúng tôi, chưa có công bố khoa học nào về thành phần hóa học và hoạt tính sinh học loài này. Đây là công bố đầu tiên kết quả nghiên cứu thành phần hóa học và hoạt tính gây độc tế bào loài *H. grandiflorum* thu hái tại Mê Linh, Hà Nội. Từ các cặn chiết dichlometan, butanol cành và lá *H. grandiflorum* đã phân lập được 4 hợp chất. Cấu trúc của chúng được xác định bằng các phương pháp phổ cộng hưởng từ hạt nhân một chiều và hai chiều, kết hợp so sánh với số liệu đã công bố. Chúng là  $\alpha$ -amyrin acetat, neoilexonol acetat, apigenin-7-O- $\beta$ -D-glycosid và  $\beta$ -sitosterol glucosid.

**Từ khóa:** *Heterostemma grandiflorum*, cytotoxic activity.

## ABSTRACT

*Heterostemma grandiflorum* Cost. is a flowering plant of Asclepiadaceae family, distributed in Hoa Binh, Ha Noi, Ha Nam,.... provinces. Our literature searches showed that this species was not chemically as well as biologically studied until now. This is the first report about phytochemistry and cytotoxicity results of *H. grandiflorum* collected in Me Linh, Ha Noi. From dichloromethane, butanol extracts of *H. grandiflorum*'s twigs and leaves 4 compounds have been isolated. Their structures were elucidated by the 1D and 2D NMR spectroscopy and comparison with published data. They include  $\alpha$ -amyrin acetate, neoilexonol acetate, apigenin-7-O- $\beta$ -D-glycoside and  $\beta$ -sitosterol glucoside.

**Keywords:** *Heterostemma grandiflorum*, cytotoxic activity.

<sup>1</sup>Trường Đại học Khoa học, Đại học Thái Nguyên

<sup>2</sup>Viện Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

<sup>3</sup>Trường Đại học Công nghiệp Hà Nội

\*Email: hoanganhvh@gmail.com

Ngày nhận bài: 20/8/2020

Ngày nhận bài sửa sau phản biện: 25/11/2020

Ngày chấp nhận đăng: 23/12/2020

## 1. GIỚI THIỆU

Chi *Heterostemma* thuộc họ Thiên lý (Asclepiadaceae) được mô tả lần đầu vào năm 1912 và có nguồn gốc từ Ấn Độ. Theo tác giả Phạm Hoàng Hộ ở Việt Nam có 7 loài *Heterostemma*, bao gồm *H. grandiflorum*, *H. balansae*, *H. acuminatum*, *H. lutea*, *H. oblongifolium*, *H. suberosum*, *H.*

*villosum*. Chúng được phân bố ở nhiều vùng trong cả nước như Hòa Bình, Hà Nội, Đồng Nai, Sài Gòn,...[1]. Theo tra cứu tư liệu của chúng tôi thì trên thế giới cho đến nay mới có hai loài *H. brownii* và *H. alatum* được nghiên cứu thành phần hóa học [2]. Hai loài này được sử dụng trong y học dân gian Đài Loan, *H. brownii* dùng để chữa khối u [3] còn *H. alatum* có tác dụng tiêu đờm, giải độc [4]. Nhiều hợp chất thuộc các khung steroid, acid béo, flavonoid, flavonoid glycosid, adenin, uridin, purinium và pyrimidin đã được tìm thấy trong hai loài nghiên cứu [3, 4]. Trong đó, một loạt các purinium mới (heteromin A - E; I) và pyrimidin mới (heteromin F - H) đã được phát hiện. Một số hợp chất heteromin thể hiện hoạt tính gây độc đáng kể với các tế bào ung thư, đặc biệt phải kể đến heteromin A và B được công bố có hoạt tính gây độc với các dòng tế bào ung thư biểu mô thực quản, gan, hạch và bạch cầu, heteromine D ức chế mạnh dòng tế bào HL-60 với giá trị IC<sub>50</sub> là 4,04nmol/mL [3, 4]. Các kết quả trên là động lực để nhóm nghiên cứu tiến hành tìm hiểu thành phần hóa học và hoạt tính gây độc tế bào loài *H. grandiflorum*, thu hái tại Mê Linh, Hà Nội nhằm tìm kiếm các chất có hoạt tính tốt từ nguồn tài nguyên thực vật của nước ta. Đây là công bố đầu tiên về thành phần hóa học, hoạt tính gây độc tế bào của loài này. Từ các cặn chiết dichlometan, butanol lá và cành cây Dị hùng hoa to đã phân lập được 4 chất. Cấu trúc của chúng được xác định bằng các phương pháp phổ cộng hưởng từ hạt nhân một chiều và hai chiều, kết hợp so sánh với số liệu đã công bố. Các hợp chất đó là  $\alpha$ -amyrin acetat (1), neoilexonol acetat (2), apigenin-7-O- $\beta$ -D-glycosid (3) và  $\beta$ -sitosterol glucosid (4).

## 2. THỰC NGHIỆM

### 2.1. Phương pháp và thiết bị

Phổ cộng hưởng từ hạt nhân NMR được ghi trên máy: Bruker Avance 500, Germany. Phổ khối ESI-MS được đo trên máy LC-MSD-Trip-SL, Varian, USA. Sắc ký lớp mỏng được tiến hành trên bản mỏng silica gel G60F<sub>254</sub> (Merck). Sắc ký cột sử dụng chất hấp phụ là silica gel pha thường cỡ hạt là 0,043 - 0,063mm (Merck) và Sephadex LH-20 (Merck). Phát hiện chất bằng đèn tử ngoại ở hai bước sóng là 254 và 368nm, kết hợp phun thuốc thử vanillin 1% trong H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> đặc và hơi nóng ở 110°C.

## 2.2. Mẫu thực vật

Cành và lá cây Dị hùng hoa to (*Heterostemma grandiflorum*) được thu hái tại Mê Linh, Hà Nội vào tháng 10 năm 2019. Mẫu tiêu bản (VHH.ML.10.2019.1) được lưu giữ tại Viện Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Tên khoa học được TS. Nguyễn Thế Cường, Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật, VAST Nội xác định.

## 2.3. Chiết xuất và phân lập chất

Bột khô, xay nhỏ cành và lá *H. grandiflorum* (5,0kg) được chiết với hỗn hợp MeOH:H<sub>2</sub>O (95:5) (bốn lần) ở nhiệt độ phòng. Dịch chiết methanol được cất loại dung môi dưới áp suất giảm. Phần nước còn lại được chiết phân lớp lần lượt với *n*-hexan, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> và *n*-BuOH. Dung môi hữu cơ được cất loại bằng máy quay cất chân không thu được các cận chiết *n*-hexan (34,0g), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (23,0g) và *n*-BuOH (27,0g).

Cận chiết CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (23,0g) được đưa lên cột silica gel, giải hấp gradient với hệ dung môi *n*-hexan:EtOAc (từ 100:0 đến 50:50) thu được 16 phân đoạn (D1-D16). Phân đoạn D2 (1,0g) được tiếp tục tinh chế bằng cột silica gel với hệ dung môi *n*-hexan:EtOAc gradient (từ 100:0 đến 50:50) thu được chất **1** (250mg). Phân đoạn D8 (0,5g) được tinh chế qua cột silica gel, giải hấp bằng hệ *n*-hexan:EtOAc gradient (từ 95:5 đến 80:20) nhận được 4 phân đoạn (D8.1 - D8.4). Hợp chất **2** (20mg) thu được khi tinh chế phân đoạn D8.2 (70mg) bằng cột silica gel, dung môi *n*-hexan:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (80:20).

Cận chiết *n*-BuOH (27,0g) được đưa lên cột silica gel, giải hấp gradient với hệ dung môi CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O (từ 100:0:0 đến 50:50:5) thu được 12 phân đoạn (B1-B12). Phân đoạn B3 (1,5g) được tinh chế qua cột silica gel, hệ dung môi CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH gradient từ 95:5 đến 90:10 thu được 5 phân đoạn (B3.1-B3.5). Hợp chất **3** (32mg) nhận được khi làm sạch phân đoạn B3.4 (250mg) bằng cột silica gel, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH (92:8). Phân đoạn B9 (0,85g) được tinh chế bằng sắc ký cột silica gel, hệ dung môi CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O (3,5:1,5:0,1) thu được 3 phân đoạn (B9.1-B9.3). Phân đoạn B9.3 được cho qua cột Sephadex, MeOH thu được hợp chất **4** (28mg).

**$\alpha$ -amyrin acetat (1):** ESI-MS:  $m/z = 469$  [M+H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta_H$  4,51 dd,  $J = 8,0$  và  $10,0$  Hz (H-3); 5,13 t,  $J = 3,5$  Hz (H-12); 2,05 s (OAc); 0,92 s (H<sub>3</sub>-23); 0,88 s (H<sub>3</sub>-24); 0,98 s (H<sub>3</sub>-25); 1,01 s (H<sub>3</sub>-26); 1,07 s (H<sub>3</sub>-27); 0,86 s (H<sub>3</sub>-28); 0,80 s (H<sub>3</sub>-29); 0,87 s (H<sub>3</sub>-30).

**Neoilexonol acetat (2):** ESI-MS:  $m/z = 483$  [M+H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta_H$  4,52 dd,  $J = 4,5$  và  $12,0$  Hz (H-3); 5,54 s (H-12); 2,05 s (OAc).

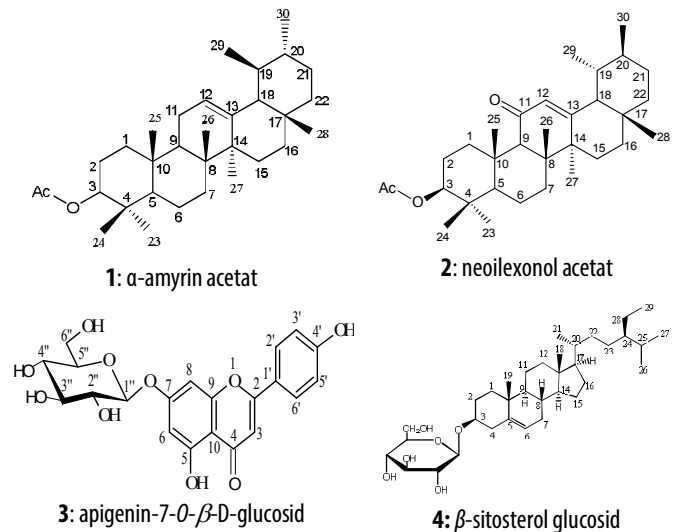
**Apigenin-7-O- $\beta$ -D-glucosid (3):** ESI-MS:  $m/z = 433$  [M+H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO):  $\delta_H$  6,83 s (H-3); 6,51 brs (H-6); 6,66 brs (H-8); 7,89 d,  $J = 8,0$  Hz (H-2', H-6'); 6,95 d,  $J = 8,0$  Hz (H-3', H-5'); 5,03 d,  $J = 7,0$  (H-1'').

**$\beta$ -sitosterol glucosid (4):** <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO):  $\delta_H$  3,11 (m, H-3); 5,33 (br s, H-6); 0,67 (br s, H<sub>3</sub>-18); 0,99 (br s, H<sub>3</sub>-19); 0,92 (d,  $J = 6,5$  Hz, H<sub>3</sub>-21); 0,80 (d,  $J = 6,8$ , H<sub>3</sub>-26); 0,81 (d,  $J = 6,8$ , H<sub>3</sub>-27); 0,90 (t,  $J = 6,5$ , H<sub>3</sub>-29).

## 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Bằng phương pháp sắc ký cột dùng chất hấp phụ là silica gel và các hệ dung môi thích hợp, 4 hợp chất đã được phân lập từ cận chiết CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, *n*-BuOH cành và lá cây *H. grandiflorum*.

Chúng bao gồm hai triterpen (**1**, **2**), một flavonoid glucosid (**3**) và một steroid glucosid (**4**).



Hình 1. Công thức các chất phân lập từ *H. grandiflorum*

Phổ <sup>1</sup>H và <sup>13</sup>C NMR của chất **1** và **2** cho các tín hiệu đặc trưng của triterpen với 8 nhóm methyl, trong đó có 6 singlet methyl và 2 doublet methyl; 9 nhóm methylen (chất **1**) và 8 nhóm methylen (chất **2**) trong vùng từ 20 đến 60ppm; một nhóm methin có gắn với oxy ở  $\delta_H$  4,50,  $\delta_C$  81,0 trong phổ của chất **1** và  $\delta_H$  4,52,  $\delta_C$  80,7 trong phổ chất **2**. Bên cạnh đó, sự có mặt của nối đôi ở vị trí C-12, thể hiện qua tín hiệu  $\delta_H$  5,13 và  $\delta_C$  124,3, 139,6 đối với chất **1** và  $\delta_H$  5,54 và  $\delta_C$  130,4, 164,9 đối với chất **2**. Nhóm hydroxy ở C-3 của hai chất đều bị axetyl hóa, chứng minh qua sự dịch chuyển về phía trường thấp của nhóm oxy-methin cũng như sự có mặt của nhóm axetyl ở  $\delta_H$  2,05 và  $\delta_C$  21,5, 171,5 (chất **1**)  $\delta_H$  2,05 và  $\delta_C$  21,1, 171,0 (chất **2**). Các số liệu phổ của chất **1** hoàn toàn phù hợp với  $\alpha$ -amyrin acetat trong tài liệu [5].

Sự khác biệt của chất **2** so với **1** thể hiện trên phổ <sup>13</sup>C NMR của **2** ở tín hiệu nhóm carbonyl ( $\delta_C$  199,7), sự dịch chuyển về trường thấp của C-12 ( $\delta_C$  130,4) và C-13 ( $\delta_C$  164,9) do hệ nối đôi liên hợp với nhóm C=O ở C-11. Cấu trúc của chất **2** được xác định là neoilexonol acetat khi so sánh với số liệu phổ trong tài liệu [6].  $\alpha$ -amyrin acetat và  $\beta$ -amyrin phân lập từ loài *Alstonia boonei* (Apocyanaceae) đã được Okoye và cộng sự chứng minh có hoạt tính kháng viêm khá tốt [5].

Phổ <sup>1</sup>H và <sup>13</sup>C NMR của chất **3** cho thấy đó là một flavonoid glucosid với các tín hiệu rất đặc trưng của phân aglycon, một flavonoid với hai tín hiệu singlet từ ở  $\delta_H$  6,51 và 6,66 của hai proton vòng A, một tín hiệu singlet ở  $\delta_H$  6,83 của proton H-3 vòng C, cùng với 2 doublet của 2 cặp proton của vòng B thể ở vị trí 1,4 ( $\delta_H$  7,89 d,  $J = 8,0$ Hz; 6,95 d,  $J = 8,0$ Hz). Phần đường cho tín hiệu của một đơn vị glucose, bao gồm một nhóm anomer ở  $\delta_H$  5,03 d,  $J = 7,0$  Hz và  $\delta_C$  99,9 cùng với tín hiệu của 4 nhóm oxy-methin và 1 nhóm

oxy-methylen. Các số liệu phân tích trên đây hoàn toàn đồng nhất với số liệu của apigenin-7-O- $\beta$ -D-glucosid công bố trong tài liệu [7].

Chất **4** được xác định là  $\beta$ -sitosterol glucosid khi so sánh trên bản mỏng với chất chuẩn cũng như số liệu phổ  $^1\text{H}$  NMR với số liệu đã công bố [8].

Ba chất (**1-3**) được thử hoạt tính gây độc tế bào trên bốn dòng tế bào ung thư ở người, bao gồm ung thư biểu mô KB, ung thư gan Hep G2, ung thư phổi LU-1, ung thư vú MCF-7. Phép thử được thực hiện dựa trên phương pháp MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium) được mô tả lần đầu tiên bởi tác giả Tim Mosman [9]. Đây là phương pháp đánh giá khả năng sống sót của tế bào qua khả năng khử MTT (màu vàng) thành một phức hợp formazan (màu tím) bởi hoạt động của enzym dehydrogenase trong ty thể. Sản phẩm formazan được hòa tan bằng DMSO và đo mật quang (OD) ở bước sóng 540nm. Giá trị thể hiện hoạt tính là  $\text{IC}_{50}$  là nồng độ chất thử ức chế 50% sự phát triển của tế bào. Kết quả cho thấy chất **1** và **2** không thể hiện hoạt tính, chất **3** có khả năng ức chế yếu chỉ với dòng HepG2 ( $\text{IC}_{50} = 102,75 \pm 0,50$ , chất đối chứng dương Ellipticine  $\text{IC}_{50} = 0,42 \pm 0,03$ ).

Bảng 1. Số liệu phổ  $^{13}\text{C}$  NMR của các chất **1-3** (125MHz, **1** và **2** đo trong MeOD và **3** đo trong DMSO)

| C  | 1     | 2     | C   | 3     |
|----|-------|-------|-----|-------|
| 1  | 38,5  | 38,9  | 2   | 163,4 |
| 2  | 23,4  | 23,6  | 3   | 103,5 |
| 3  | 81,0  | 80,7  | 4   | 182,5 |
| 4  | 37,7  | 38,1  | 5   | 157,4 |
| 5  | 55,3  | 55,0  | 6   | 100,3 |
| 6  | 18,3  | 18,5  | 7   | 164,7 |
| 7  | 32,9  | 32,8  | 8   | 95,3  |
| 8  | 40,1  | 40,9  | 9   | 161,9 |
| 9  | 47,7  | 61,5  | 10  | 105,8 |
| 10 | 36,8  | 36,8  | 1'  | 121,4 |
| 11 | 23,6  | 199,7 | 2'  | 129,1 |
| 12 | 124,3 | 130,4 | 3'  | 116,5 |
| 13 | 139,6 | 164,9 | 4'  | 161,6 |
| 14 | 42,1  | 43,6  | 5'  | 116,5 |
| 15 | 28,1  | 28,8  | 6'  | 129,1 |
| 16 | 26,6  | 27,2  | 1'' | 99,9  |
| 17 | 33,8  | 45,1  | 2'' | 73,5  |
| 18 | 59,0  | 59,0  | 3'' | 77,6  |
| 19 | 39,6  | 39,2  | 4'' | 69,9  |
| 20 | 39,7  | 39,3  | 5'' | 76,9  |
| 21 | 31,3  | 33,9  | 6'' | 63,5  |
| 22 | 41,6  | 30,9  |     |       |
| 23 | 28,1  | 28,1  |     |       |
| 24 | 16,7  | 16,7  |     |       |
| 25 | 15,7  | 16,5  |     |       |
| 26 | 17,5  | 20,5  |     |       |
| 27 | 23,2  | 27,5  |     |       |

|                    |       |       |  |  |
|--------------------|-------|-------|--|--|
| 28                 | 28,7  | 28,1  |  |  |
| 29                 | 16,9  | 17,5  |  |  |
| 30                 | 21,4  | 21,3  |  |  |
| CH <sub>3</sub> CO | 171,0 | 171,0 |  |  |
| CH <sub>3</sub> CO | 21,3  | 21,1  |  |  |

#### 4. KẾT LUẬN

Đây là công bố đầu tiên về kết quả nghiên cứu ban đầu thành phần hóa học và hoạt tính gây độc tế bào các chất phân lập được từ loài Dị hùng hoa to (*Heterostemma grandiflorum* Cost.) thu hái tại Mê Linh, Hà Nội. Bốn hợp chất đã được phân lập và xác định cấu trúc từ cặn chiết dichloromethan, butanol của loài *H. grandiflorum*, bao gồm  $\alpha$ -amyrin acetat, neoilexonol acetat, apigenin-7-O- $\beta$ -D-glycosid và  $\beta$ -sitosterol glucosid.

#### LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Chương trình hỗ trợ hoạt động nghiên cứu khoa học cho nghiên cứu viên cao cấp (mã số NVCC06.11/20-20) của Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Phạm Hoàng Hộ, 1999. *Cây cỏ Việt Nam*, Tập 2. Nhà xuất bản Trẻ.
- [2]. Dictionary of Natural Product on DVD. 2018.
- [3]. Lin, Y-L., Huang, R-L., 1997. *Two New Puriniums and Three New Pyrimidines from Heterostemma brownii*. J. Nat. Prod., 60, 982-985.
- [4]. Fu Wen-Wei, Tan Chang-Heng, Zhuang Peng-Yu, Yang Shu-Min, Luo Hong-Feng, Tan Jun-Jie, Liu P., Zhu Da-Yuan, 2011. *Purinium derivatives with antitumor activities from Heterostemma alatum Wight*. Heterocycles 83 (6), 1405-1408.
- [5]. Okoye N. N., Ajaghaku D. L., Okeke H. N., Ilodigwe E. E., Nworu C. S., Okoye F. B. C., 2014. *Beta-amyrin and alpha-amyrin acetate isolated from the stem bark of Alstonia boonei display profound anti-inflammatory activity*. Pharmaceutical Biology 52 (11), 1478-1486.
- [6]. Ogawa S., Wakatsuki Y., Makino M., Fujimoto Y., Yasukawa K., Kikuchi T., Ukiya M., Akihisa T., Iida T., 2010. *Oxyfunctionalization of unactivated C-H bonds in triterpenoids with tert-butylhydroperoxide catalyzed by meso-5,10,15,20-tetramesitylporphyrinate osmium(II) carbonyl complex*. Chemistry and Physics of Lipids 163, 165-171.
- [7]. Peng Hong-Yun, Zhang Xue-Hong, Xu Jin-Zhong, 2016. *Apigenin-7-O- $\beta$ -D-glycoside isolation from the highly copper-tolerant plant Elsholtzia splendens*. J Zhejiang Univ-Sci B (Biomed & Biotechnol) 17(6), 447-454.
- [8]. Nguyễn Thị Tuyết Nhung, Võ Thị Bạch Huệ, 2020. *Phân lập một số hợp chất tự nhiên từ thân hành Trinh nữ Hoàng cung (Crinum latifolium L., Amaryllidaceae)*. Tạp chí Khoa học Lạc Hồng, 9, 10-13.
- [9]. Mosmann, T. 1983. *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay*. Journal of immunological methods 65, 55-63.

#### AUTHORS INFORMATION

Khieu Thi Tam<sup>1</sup>, Nguyen Thi Thuy Linh<sup>2</sup>, Le Hong Nhung<sup>3</sup>,  
Nguyen Thanh Tam<sup>2</sup>, Nguyen Thi Hoang Anh<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Thai Nguyen University of Sciences

<sup>2</sup>Institute of Chemistry, VAST

<sup>3</sup>Hanoi University of Industry