

## HOẠT TÍNH ỨC CHẾ ENZYM $\alpha$ -GLUCOSIDASE VÀ THÀNH PHẦN HÓA HỌC CỦA CÂY HUYẾT RỒNG HOA NHỎ, *Satholobus parviflorus* (Roxb.)

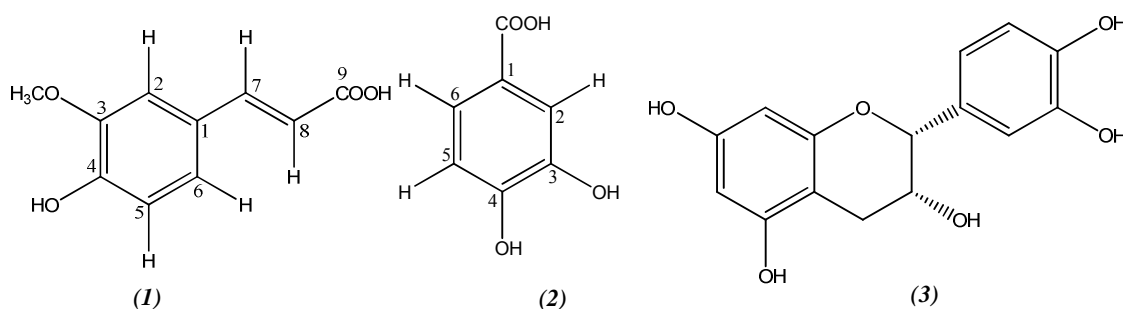
Nguyễn Thị Thanh Mai, Phan Nguyễn Hữu Trọng, Nguyễn Xuân Hải, Nguyễn Trung Nhân

Trường Đại học Khoa Học Tự Nhiên, ĐHQG-HCM

(Bài nhận ngày 05 tháng 03 năm 2011, hoàn chỉnh sửa chữa ngày 25 tháng 10 năm 2011)

**TÓM TẮT:** Trong một nghiên cứu sàng lọc hoạt tính ức chế enzym  $\alpha$ -glucosidase của gần 100 cây thuốc ở vùng Bảy Núi, An Giang, đã phát hiện cao metanol của cây huyết rồng hoa nhỏ, *Stholobus parviflorus* (Roxb.), họ đậu (*Fabaceae*), có hoạt tính ức chế enzym này rất mạnh với  $IC_{50}$  là  $0,05 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Bằng cách cô lập chất định hướng theo hoạt tính đã cô lập được ba hợp chất từ cao metanol của cây huyết rồng hoa nhỏ. Sử dụng các phương pháp phổ nghiệm hiện đại đã xác định được cấu trúc các hợp chất là acid ferulic (1), acid protocatechuic (2) và epicatechin (3) với giá trị  $IC_{50}$  lần lượt là 45,30; 23,04 và  $> 100 \mu\text{M}$ . Chất đối chứng dương là acid tannic, có giá trị  $IC_{50}$  là 0,91 nM.

**Từ khóa:** Cây huyết rồng hoa nhỏ, *Stholobus parviflorus* (Roxb.) họ đậu (*Fabaceae*),  $\alpha$ -glucosidase.



### GIỚI THIỆU

Trong cơ thể, màng tế bào ruột non tiết ra enzym  $\alpha$ -glucosidase thủy phân các oligosaccharit (đường đa) thành glucose và thẩm thấu vào máu qua màng ruột non để nuôi các tế bào của cơ thể. Khi cơ thể bị rối loạn chuyển hóa carbohydrat thì lượng đường trong máu cao, do đó sẽ dẫn đến bệnh tiểu đường. Bằng cách ức chế hoạt động của enzym  $\alpha$ -glucosidase có thể làm chậm quá trình thủy

phân của carbohydrat và làm giảm lượng đường trong máu [1].

Trong quá trình nghiên cứu sàng lọc hoạt tính ức chế enzym  $\alpha$ -glucosidase của gần 100 cây thuốc ở vùng Bảy Núi, An Giang, chúng tôi đã phát hiện cao metanol của cây huyết rồng hoa nhỏ, *Stholobus parviflorus* (Roxb.), có hoạt tính ức chế enzym này rất mạnh với  $IC_{50}$  là  $0,05 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Cây huyết rồng hoa nhỏ thuộc bộ [Fabales](#), họ [Fabaceae](#), chi [Spatholobus](#), loài

*Spatholobus parviflorus* và dân gian thường gọi là dây kim luân hay mo thùi hoa nhỏ.

## THỰC NGHIỆM

### Chuẩn bị mẫu

Cây huyết rồng hoa nhỏ được thu hái tại vùng Bảy Núi, huyện Tịnh Biên, tỉnh An Giang vào cuối tháng 8/2009. Thân dây khô được xay dạng bột rồi trích Soxhlet với dung môi metanol, thu được cao metanol. Từ cao metanol, tiến hành chiết lỏng lỏng với các dung môi eter dầu hoà, cloroform, etyl acetat và n-butanol thu được các cao phân đoạn tương ứng cùng với cao nước. Lần lượt thử hoạt tính ức chế enzym  $\alpha$ -glucosidase của các cao này, nhận thấy cao etyl acetat có hoạt tính mạnh nhất với  $IC_{50}$  là  $0,11 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Thực hiện sắc ký cột cao etyl acetat nhiều lần trên silica gel pha thường với nhiều hệ dung môi với độ phân cực khác nhau kết hợp với sắc ký bản mỏng điều chế pha thường, pha đảo, cô lập được 3 hợp chất là acid ferulic (1), acid protocatechuic (2) và epicatechin (3). Cấu trúc của các hợp chất được xác định bằng phương pháp phổ cộng hưởng từ hạt nhân một chiều và hai chiều ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , HSQC, HMBC).

### Quy trình thử hoạt tính ức chế enzym $\alpha$ -glucosidase

#### Cơ sở phương pháp

Enzym  $\alpha$ -glucosidase xúc tác cho quá trình chuyển hoá *p*-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranosid thành  $\alpha$ -D-glucose và *p*-nitrophenol có màu vàng nhạt, hấp thụ cực đại tại 401 nm [2]. Khi

có mặt chất ức chế enzym, cường độ hấp thụ của dung dịch sẽ giảm. Dựa vào độ hấp thụ của dung dịch khi có và không có mẫu thử sẽ tính được phần trăm ức chế enzym  $\alpha$ -glucosidase của mẫu. Dung đường biểu diễn giữa phần trăm ức chế và nồng độ chất ức chế, xác định giá trị  $IC_{50}$ , nồng độ của mẫu mà tại đó ức chế 50 % enzym. Mẫu có hoạt tính càng cao thì giá trị  $IC_{50}$  sẽ càng thấp.

### Hoá chất

- Dung dịch đệm phosphat 0,01M; pH = 7,0
- Dung dịch enzym 0,2 U mL<sup>-1</sup>
- Dung dịch nền *p*-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranosid 3 mM
- Dung dịch Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,1 M

### Quy trình

Mẫu được hoà tan trong đệm phosphat, thêm 100  $\mu\text{L}$  enzym, lắc đều, ủ ở 37 °C trong 5 phút, sau đó thêm 100  $\mu\text{L}$  dung dịch nền, lắc đều, ủ ở 37 °C trong 15 phút, cuối cùng thêm 1500  $\mu\text{L}$  dung dịch Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> và đo mật độ quang tại bước sóng 401 nm. Tiến hành thử hoạt tính trên các mẫu thử với nhiều nồng độ khác nhau (100, 50, 25, 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), chất đối chứng dương là acid tannic.

## KẾT QUẢ VÀ BIỆN LUẬN

### Kết quả thử hoạt tính

Kết quả thử hoạt tính ức chế enzym  $\alpha$ -glucosidase của các cao phân đoạn trình bày trong bảng 1 và của các chất cô lập được với chất đối chứng dương acid tannic trong bảng 2.

**Bảng 1.** Kết quả thử hoạt tính của các cao phân đoạn

STT	Cao	% Ức chế				IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )
		100 ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	50 ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	25 ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	10 ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	
1	Eter dầu hoả	-	89,7 $\pm$ 3,9	70,0 $\pm$ 1,6	50,0 $\pm$ 1,4	<b>10,00</b>
2	Cloroform	80,6 $\pm$ 4,2	67,0 $\pm$ 3,5	35,9 $\pm$ 4,8	14,0 $\pm$ 6,5	<b>36,31</b>
		<b>1,0</b> ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	<b>0,5</b> ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	<b>0,25</b> ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	<b>0,1</b> ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	
3	Etyl acetat	93,0 $\pm$ 1,5	85,3 $\pm$ 3,2	68,8 $\pm$ 2,7	48,1 $\pm$ 4,6	<b>0,11</b>
4	n-Butanol	59,0 $\pm$ 6,0	28,0 $\pm$ 2,2	1,00 $\pm$ 0,15	-	<b>0,85</b>
5	Nước	95,8 $\pm$ 3,4	90,3 $\pm$ 2,4	79,0 $\pm$ 7,0	49,3 $\pm$ 2,6	<b>0,10</b>

**Bảng 2.** Kết quả thử hoạt tính của các chất cô lập và chất đối chứng dương

Chất	% Ức chế				IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ )
	100 ( $\mu\text{M}$ )	50 ( $\mu\text{M}$ )	25 ( $\mu\text{M}$ )	10 ( $\mu\text{M}$ )	
Acid ferulic (1)	54,7 $\pm$ 3,6	53,5 $\pm$ 2,3	34,9 $\pm$ 2,1	51,3 $\pm$ 1,3	<b>45,30</b>
Acid protocatechuic (2)	21,2 $\pm$ 2,3	34,3 $\pm$ 1,1	55,3 $\pm$ 2,8	14,7 $\pm$ 3,5	<b>23,04</b>
Epicatachin (3)	-	-	-	-	<b>&gt; 100</b>
Acid tannic	<b>1 (nM)</b>	<b>0,5 (nM)</b>	<b>0,25 (nM)</b>	<b>0,1 (nM)</b>	<b>0,91</b>
	53,0 $\pm$ 1,4	36,0 $\pm$ 4,6	19,0 $\pm$ 1,3	13,0 $\pm$ 2,5	(nM)

### Biện luận cấu trúc

#### Cấu trúc hợp chất (1)

Hợp chất (1) thu được có dạng tinh thể hình kim không màu, tan tốt trong dung môi metanol.

Phổ <sup>1</sup>H-NMR của (1) cho thấy ở vùng trường cao có tín hiệu ở [ $\delta_{\text{H}}$  3.78, s] chứng tỏ hợp chất (1) có mang một nhóm metoxyl. Ở vùng trường thấp xuất hiện ba tín hiệu [ $\delta_{\text{H}}$  7.18, d, J = 1.5 Hz], [ $\delta_{\text{H}}$  = 7.07, dd, J = 8.5 và 1.5 Hz] và [ $\delta_{\text{H}}$  = 6.83, d, J = 8.5 Hz] cho phép dự đoán hợp chất này có một vòng benzen 1, 3, 4 tam hoán. Ngoài ra, phổ proton còn có 2 tín

hiệu [ $\delta_{\text{H}}$  7.62, d, J = 16.0 Hz] và [ $\delta_{\text{H}}$  6.33, d, J = 16,0 Hz] cho thấy đây là hai proton của hai carbon *sp*<sup>2</sup> ở vị trí *trans* với nhau.

Phổ <sup>13</sup>C-NMR của (1) cho thấy hợp chất này có mười carbon, bao gồm một carbon carbonyl [ $\delta_{\text{C}}$  171.1], năm carbon *sp*<sup>2</sup> tam cấp [ $\delta_{\text{C}}$  147.0, 124.0, 116.5, 115.9 và 111.7], hai carbon vòng thơm nối với oxygen [ $\delta_{\text{C}}$  = 150.5 và 149.4], một carbon vòng thơm tứ cấp [ $\delta_{\text{C}}$  = 127.8] và một carbon của nhóm metoxyl [ $\delta_{\text{C}}$  57.0].

So sánh dữ liệu phổ <sup>1</sup>H-NMR và <sup>13</sup>C-NMR của hợp chất (1) với acid ferulic [3] thì thấy có sự trùng khớp (Bảng 3).

**Bảng 3.** So sánh phổ của hợp chất (1) với phổ chuẩn của acid ferulic[3]

Vị trí C	Hợp chất (1)		Acid ferulic [3]	
	$\delta_H$ (ppm)	$\delta_C$ (ppm)	$\delta_H$ (ppm)	$\delta_C$ (ppm)
<b>1</b>		127.8		127.7
<b>2</b>	7.18 (1H, d, 1.5 Hz)	111.7	7.17 (1H, d, 2.0 Hz)	111.5
<b>3</b>		149.4		149.2
<b>4</b>		150.5		150.2
<b>5</b>	6.83 (1H, d, 8.5 Hz)	116.5	6.78 (1H, d, 8.2 Hz)	116.2
<b>6</b>	7.07 (1H, dd, 8.5 , 1.5 Hz)	124.0	7.05 (1H, dd, 8.2, 2.0 Hz)	123.7
<b>7</b>	7.62 (1H, d, 16.0 Hz)	147.0	7.57 (1H, d, 15.9 Hz)	146.4
<b>8</b>	6.33 (1H, d, 16.0 Hz)	115.9	6.35 (1H, d, 15.9 Hz)	116.3
<b>9</b>		171.1		171.1
<b>CH<sub>3</sub>O-</b>	3.80 (3H, s)	56.8	3.89 (3H, s)	55.90

Vậy cấu trúc của hợp chất (1) là acid ferulic.

**Cấu trúc hợp chất (2)**

Hợp chất (2) thu được có dạng tinh thể hình kim màu vàng, tan tốt trong dung môi MeOH.

Phổ <sup>1</sup>H-NMR của (2) hiện diện ba proton ở vùng trường thấp [ $\delta_H$  6.8, 1H, d, J = 8.0 Hz], [ $\delta_H$  7.42, 1H, dd, J = 8.0 và 2.0 Hz], [ $\delta_H$  7.43, dd, J = 2.0 Hz] chứng tỏ hợp chất này có chứa vòng benzen 1, 2, 3 tam hoán.

Phổ <sup>13</sup>C-NMR của (2) cho thấy hợp chất này có bảy carbon, bao gồm một carbon carbonyl [ $\delta_C$  170.3], hai carbon vòng thơm nối với oxygen [ $\delta_C$  151.6 và 146.1], một carbon vòng thơm tứ cấp [ $\delta_C$  123.1] và ba carbon nhân thơm tam cấp [ $\delta_C$  = 123.9, 117.8 và 115.8].

So sánh dữ liệu phổ <sup>1</sup>H-NMR và <sup>13</sup>C-NMR của hợp chất (2) với acid protocatechuic [4] thì thấy có sự trùng khớp (Bảng 4).

**Bảng 4.** So sánh phổ của hợp chất (2) và acid protocatechuic[4].

Vị trí C	Hợp chất (2)		Acid protocatechuic [4]	
	$\delta_H$ (ppm)	$\delta_C$ (ppm)	$\delta_H$ (ppm)	$\delta_C$ (ppm)
<b>1</b>		123.1		121.1
<b>2</b>	7.43 (1H, d, 2.0 Hz)	117,8	7.33 (1H, d, 2.0 Hz)	116.5
<b>3</b>		146.1		144.8
<b>4</b>		151.6		149.9
<b>5</b>	6.80 (1H, d, 8.0 Hz)	115.8	6.78 (1H, d, 8.2 Hz)	115.1
<b>6</b>	7.42 (1H, dd, 8.0, 2.0 Hz)	123.9	7.29 (1H, dd, 8.2, 2.0 Hz)	121.1
<b>-COOH</b>		170.3		167.2

Vây cấu trúc của hợp chất (2) là acid protocatechuic.

### Cấu trúc hợp chất (3)

Hợp chất (3) thu được có màu cam, tan trong dung môi metanol.

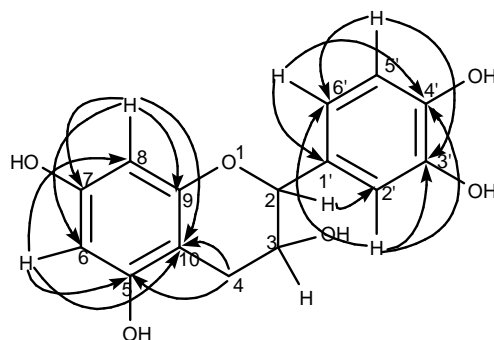
Phổ  $^1\text{H-NMR}$  của (3) cho thấy tín hiệu của hai proton ghép cặp meta [ $\delta_{\text{H}}$  5.94, 1H, d,  $J = 2.5$  Hz] và [ $\delta_{\text{H}} = 5.96$ , 1H, d,  $J = 2.5$  Hz] chứng tỏ hợp chất (3) có nhân benzen 1, 2, 3, 5 tứ hoán. Bên cạnh đó, tín hiệu của ba proton ghép cặp meta và orto [ $\delta_{\text{H}}$  6.99, 1H, d,  $J = 1.5$  Hz], [ $\delta_{\text{H}}$  6.82, 1H, d,  $J = 8.0$  Hz] và [ $\delta_{\text{H}} = 6.78$ , 1H, dd,  $J = 8.0$  Hz và  $J = 1.5$  Hz] cho thấy hợp chất (3) mang nhân benzen 1, 3, 4 tam hoán. Ngoài ra còn có tín hiệu của hai proton metilen [ $\delta_{\text{H}}$  2.75, 1H, dd,  $J = 16.5$  Hz và  $J = 3.0$  Hz], [ $\delta_{\text{H}}$  2.88, 1H, dd,  $J = 17.0$  Hz và  $J = 5.0$  Hz] và tín hiệu của hai proton gắn với carbon  $sp^3$  mang oxygen [ $\delta_{\text{H}}$  4.85, 1H, m], [ $\delta_{\text{H}}$  4.2, 1H, s].

Phổ  $^{13}\text{C-NMR}$  của (3) có mười lăm tín hiệu với bảy carbon metin, trong đó có năm carbon nằm ở trường thấp 95.9 – 119.4 ppm, cho thấy chúng là năm carbon của vòng benzen, hai tín hiệu còn lại nằm ở vị trí  $\delta_{\text{C}}$  67.5 và  $\delta_{\text{C}}$  79.9 cho thấy đây là hai carbon  $sp^3$  mang oxygen. Ngoài ra, còn có bảy carbon tứ cấp, trong đó có năm carbon nằm vùng trường thấp 132.3 – 158.0

ppm, dự đoán chúng là carbon của vòng benzen mang oxygen. Bên cạnh đó, có một tín hiệu carbon metilen  $sp^3$  ở vùng trường cao  $\delta_{\text{C}}$  29.2.

Từ các phân tích trên cho thấy cấu trúc của hợp chất (3) bao gồm mười lăm carbon phân bố trên 2 vòng benzen tứ hoán và tam hoán, đồng thời có bốn nhóm hydroxyl trên hai vòng benzen này. Ngoài ra, hợp chất (3) còn có một nhóm hydroxyl gắn với carbon chỉ phương bão hòa nằm ngoài vòng benzen. Vì vậy, cấu trúc khung sườn của (3) được đề nghị là flavanol.

Phổ HSQC và HMBC của hợp chất (3) cho thấy ở vòng benzen tứ hoán có H-8 cho tương quan HMBC lần lượt với carbon C-6, C-7, C-9 và C-10; H-6 cho tương quan HMBC với carbon C-5, C-8 và C-10, chứng tỏ các nhóm hydroxyl gắn tại vị trí C-5 và C-7. Ở vòng benzen tam hoán có H-2 tương quan HMBC với C-6' và C-2'; đồng thời các proton H-2', H-5' và H-6' lần lượt cho tương quan HMBC với cả hai hoặc một trong hai carbon mang oxygen của vòng benzen tam hoán, từ đó xác định vị trí nhóm hydroxyl gắn tại vị trí C-3' và C-4'. Các tương quan HMBC của hợp chất (3) được trình bày ở hình 1.



Hình 1. Tương quan HMBC của hợp chất (3).

So sánh dữ liệu phổ  $^1\text{H-NMR}$  và  $^{13}\text{C-NMR}$  của hợp chất (3) với epicatechin [5] thì thấy có sự trùng khớp (bảng 5).

**Bảng 5.** So sánh phổ của hợp chất (3) và epicatechin [5]

STT	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)			$\delta_{\text{C}}$ (ppm)		
	Chất (3)	Catechin	Epicatechin	Chất (3)	Catechin	Epicatechin
1						
2	4,85	4,56	4,81	79,9	83,3	80,3
3	4,20	3,97	4,17	67,5	69,2	69,7
4	2,88	2,84	2,86	29,2	28,1	29,7
	2,75	2,50	2,73			
5				157,4	157,3	157,8
6	5,94	5,85	5,91	95,9	96,7	96,8
7				158,0	158,0	158,1
8	5,96	5,92	5,94	96,5	95,9	96,3
9				157,7	158,2	158,4
10				100,1	101,2	100,5
1'				132,3	132,6	132,7
2'	6,99	6,83	6,97	115,4	115,6	115,7
3'				145,8	146,6	146,3
4'				145,9	146,6	146,2
5'	6,82	6,71	6,79	116,0	116,5	116,3
6'	6,78	6,76	6,75	119,4	120,4	119,8

Từ các lý luận trên cho thấy cấu trúc của hợp chất (3) chính là epicatechin.

### KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này đã cô lập được 3 hợp chất tinh khiết từ cây huyết rồng hoa nhỏ, trong đó có 2 hợp chất có hoạt tính ức chế enzym  $\alpha$ -glucosidase. Hiện nay, ở Việt nam huyết rồng hoa nhỏ một loại cây chưa có tài

liệu khoa học nghiên cứu thành phần hóa học cũng như hoạt tính sinh học, vì vậy trong các nghiên cứu tiếp theo sẽ tiếp tục khảo sát các phân đoạn còn lại của cao etyl acetat cũng như các cao khác để tìm thêm những hợp chất có hoạt tính ức chế enzym  $\alpha$ -glucosidase. Kết quả này góp phần cung cấp những bằng chứng khoa

học khi sử dụng cây huyết rồng hoa nhỏ trong việc chữa trị bệnh tiểu đường, cũng như điều trị các căn bệnh liên quan đến enzym  $\alpha$ -

glucosidase như béo phì, u bướu, ung thư, kháng HIV, hội chứng tích lũy glycosphingolipid lysosomal, viêm gan.

## **$\alpha$ -GLUCOSIDASE INHIBITORY ACTIVITY AND CHEMICAL CONSTITUENTS OF *Satholobus parviflorus* (Roxb.)**

**Nguyen Thi Thanh Mai, Phan Nguyen Huu Trong, Nguyen Xuan Hai, Nguyen Trung Nhan**

University of Science, VNU-HCM

**ABSTRACT:** Our preliminary screening study revealed that the methanolic extract of *Stholobus parviflorus* (Roxb.) exhibited potent  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity with an  $IC_{50}$  value of  $0.05 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Therefore, we carried out activity-guided fractionation of the MeOH extract and isolated three compounds. These compounds were determined as ferulic acid (1), protocatechuic acid (2) and epicatechin (3) by analysis of spectroscopic data. The  $IC_{50}$  values of these compounds were 45.30, 23.04 and  $> 100 \mu\text{M}$ , respectively. Acid tannic was used as a positive control with an  $IC_{50}$  value of 0.91 nM.

**Keywords:** *Stholobus parviflorus* (Roxb.),  $\alpha$ -glucosidase.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Nguyễn T. K., Diệp T. T. B., Đặng T. B. T., Lại T. P. Q., Trần Q. K., *Nội tiết học*, Đại học Y Dược thành phố Hồ Chí Minh, nhà xuất bản Y Học, **2006**.
- [2]. H.T. Nguyen, S.M. Kim, Three compounds with potent  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity purified from sea cucumber *Stichopus japonicus*, *SPISE*, 112-122, **2009**.
- [3]. Nguyen T. H. V., Nguyen T. H. A., Tran V. S., Katrin F., Ludger W., Stilbene, ferulic acid and its derivatives from the roots of *Angelica sinensis*, *Tạp chí hóa học*, 42 (4), 508-511, **2004**.
- [4]. Zijia Z., Liping L., Jeffrey M., Tao W., Zhengtao W., Antioxidant phenolic compounds from walnut kernels (*Juglans regia* L.), *Food Chem.*, 113, 160-165, **2009**.
- [5]. Ju Yeon Ban, So-Young Jeon, KiWhan Bae, Kyung-Sik Song, Yeon Seong, Catechin and epicatechin from *Smilacis chinae* rhizome protect cultured rat cortical neurons against amyloid  $\beta$  protein (25-35)-induced neurotoxicity through inhibitory of cytosolic calcium elevation, *Life Sciences*, 79, 2251-2259, **2006**.