

ĐIỀU CHẾ QUERCETIN TỪ HOA HÒE *Sophora japonica* L., VÀ THỬ HOẠT TÍNH CHỐNG UNG BƯỚU

Trần Kim Qui, Trần Lê Quan, Nguyễn Trung Nhân
Khoa Hóa, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên - ĐHQG-HCM
(Bài nhận ngày 12 tháng 06 năm 2003)

TÓM TẮT: Quercetin là một dược liệu quý dùng để trị các bệnh rối loạn tim mạch nhưng gần đây chúng tôi phát hiện nó có khả năng trị bệnh ung bướu. Bài này mô tả phương pháp điều chế quercetin từ hoa hòe, xác định cấu trúc bằng phổ nghiệm và thử hoạt tính chống ung bướu trên hai dòng tế bào ác tính, ung thư liên kết HT-1080 và ung thư ruột kết 26-L5 (in vitro).

Quercetin tức 3,3',4',5,7-pentahydroxyflavon có tác dụng nâng cao tính bền của thành mạch máu và thường được sử dụng để chữa các bệnh tăng huyết áp và rối loạn tim mạch. Ngoài ra nó còn có tính kháng khuẩn kháng tụ cầu [1]. Gần đây trong chương trình hợp tác nghiên cứu khoa học với Phòng Hóa hợp chất Tự nhiên Trường Đại học Y Dược Toyama Nhật Bản, chúng tôi lại phát hiện nó có khả năng ức chế tế bào ung thư.

Quercetin thường được điều chế từ phản ứng ngưng tụ của anhidrid veratric với ω -metoxyphloroacetophenon, sau đó chuyển các nhóm metoxy thành hydroxy với HI. Hiệu suất chung của phản ứng không cao, khoảng 28% [2].

Do tính chất quan trọng của quercetin, chúng tôi đã điều chế quercetin từ hoa hòe *Sophora japonica* L., nguồn nguyên liệu rất dồi dào của nước ta, qua các giai đoạn ly trích rutin từ hoa hòe và sau đó thủy giải trong môi trường acid cho ra quercetin.

Ly trích rutin từ hoa hòe

Cây hoa hòe gọi là hòe mễ mọc hoang khắp nơi ở nước ta, và cũng được trồng để làm thuốc, nhiều nhất ở tỉnh Thái Bình. Mẩu hoa hòe được thu hái ở huyện Lâm Hà, Lâm Đồng, sấy khô ở nhiệt độ 70°C đến ẩm độ 5,12% và xay nhuyễn.

Bột hoa hòe được ly trích kiệt với dung môi, lọc đo dịch trích, khử chất béo trong dịch trích với CCl_4 , sau đó đuổi dung môi, thu được rutin thô. Kết tinh lại rutin thô trong etanol cho ra rutin tinh dạng hình kim màu vàng Đđ 193-194°C (lt 194°C). Sắc ký bản mỏng trong hệ dung môi B-W-A (4:5:1), hiện màu với FeCl_3 /etanol, rutin hiện ra vết tròn màu vàng $R_f = 0,48$ (lý thuyết 0,49).

Sử dụng các dung môi khác nhau như etanol, metanol, acetic acid, nước để trích rutin chúng tôi nhận thấy dung dịch acetic acid 1% trong nước cho hiệu suất rutin cao nhất 25,40%.

Phổ UV đo trên máy Secoman S.750 cho các mũi hấp thụ:

λ_{CD} (nm): 257 (A=1,195); 260 (A=0,992)

Phổ IR đo trên máy Shimadzu IR-470 (KBr) cho các mũi đặc trưng sau:

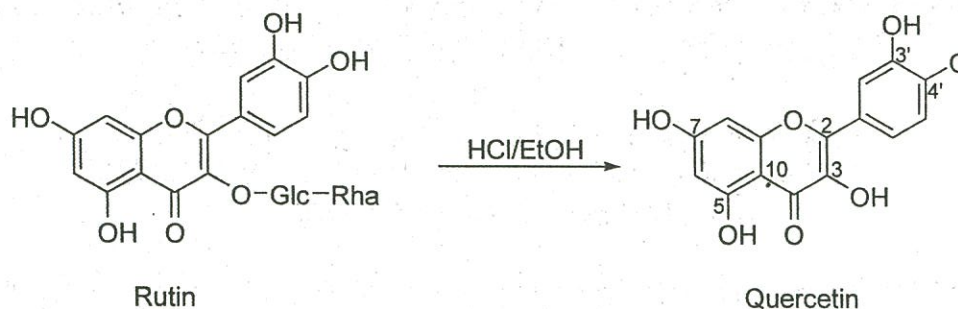
ν (cm^{-1}): 3390 (OH); 3005 (C-H); 1643 (C=O tiếp cách); 1592, 1495 (C=C nhân thơm).

Phổ UV và IR trùng với phổ chuẩn của rutin.

Điều chế quercetin:

Quercetin được điều chế do phản ứng thủy giải rutin với HCl/EtOH ở nhiệt độ 80°C trong 1 giờ.

Sau phản ứng thu hồi một phần etanol và làm lạnh, quercetin kết tinh lại trong etanol có dạng tinh thể màu vàng sậm, Đđ 313°C (lt 313°C). Sắc ký bản mỏng trong hệ dung môi B-W-A (4:5:1), hiện màu với dung dịch FeCl_3 /etanol, cho hiện một vết duy nhất $R_f = 0,79$. Hiệu suất phản ứng 79,11%.



Hình 1. Sơ đồ phản ứng điều chế quercetin

Phổ UV: λ_{CD} (nm) = 257 ($\log \epsilon = 2,74$); 276 ($\log \epsilon = 2,75$)

Phổ IR: ν (cm^{-1}): 3265 (OH); 2905 (C-H); 1651 (C=O); 1601, 1503 (C=C nhân thơm).

Phổ UV và IR trùng với phổ chuẩn của quercetin.

Phân tích nguyên tố:

Kết quả (%)	C 59,43	H 3,32	O 36,84
Tính theo $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$	59,61	3,34	37,06

Phổ NMR đo trên máy Bruker-200AC có tần số 200MHz đối với phổ ^1H và 50MHz đối với ^{13}C , với dung môi CDCl_3 , cho kết quả sau.

Vị trí	Độ dịch chuyển hóa học (δ , ppm)		Hằng số ghép $J_{\text{H-H}}$ (Hz)
	^1H	^{13}C	
2		146,9	
3		135,9	
4		175,9	
5		160,9	
6	6,18	98,3	$J_{6-8} = 2,2$
7		164,0	
8	6,40	93,5	$J_{6-8} = 2,2$
9		156,3	
10		103,2	
1'		120,1	
2'	7,67	115,7	$J_{2'-6'} = 2,2$
3'		145,2	
4'		147,8	
5'	6,88	115,2	$J_{5'-6'} = 8,5$
6'	7,54	122,1	$J_{2'-6'} = 2,2; J_{5'-6'} = 8,5$

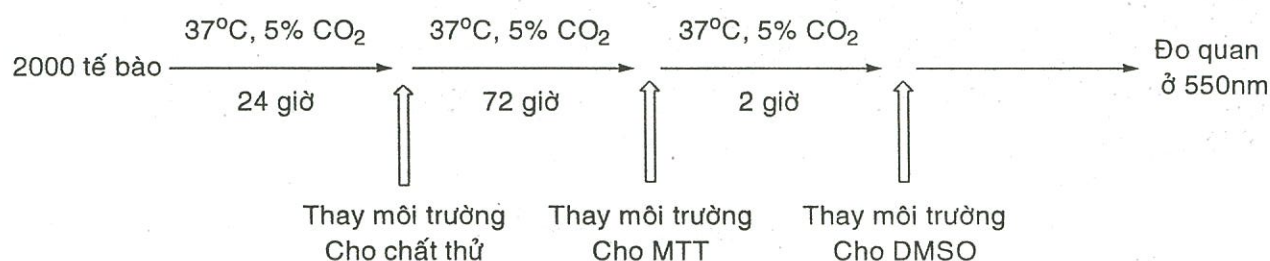
Kết quả trên cho thấy sản phẩm thu được là quercetin.

Thử nghiệm độc tính tế bào của rutin và quercetin:

Độc tính tế bào của rutin và quercetin được thử trên hai dòng tế bào ung thư, HT-1080, một loại tế bào u xơ ác tính trên mô liên kết (fibrosarcoma) và 26-L5, tế bào ung thư ruột kết (murine colon 26-L5 carcinoma) bằng phương pháp MTT. Cả hai dòng tế bào nói trên đều là những dòng tế bào mạnh, dễ di căn và kháng thuốc [3].

Tế bào HT-1080 được nuôi cấy trong môi trường EMEM và 26-L5 trong môi trường RPMI. Các môi trường này được bổ sung 10% FCS (fetal calf serum, huyết thanh bào thai bò), 0.1% NaHCO₃ và 2mM glutamine.

Khả năng phát triển của tế bào khi có và không có mẫu thử được thực hiện với ba nồng độ 100, 10 và 1 µg/ml theo qui trình sau.



Hình 2. Qui trình thử nghiệm độc tính tế bào.

Độc tính tế bào được thể hiện bằng giá trị IC₅₀, là nồng độ chất thử gây nên sự ức chế của tế bào 50%.

Độ hấp thu quang được đo trên máy Perkin-Elmer Immuno Mini NJ-2300 Plate reader.

Kết quả IC₅₀ cuối cùng được biểu diễn trong bảng sau.

Chất thử	HT-1080	26-L5
Quercetin	8,2µg/ml	5,3µg/ml
Rutin	> 100µg/ml	>100µg/ml
Doxorubicin	0,034µg/ml	0,015µg/ml

Doxorubicin là một chất có hoạt tính rất mạnh, được dùng như chất chuẩn để so sánh hoạt tính của các chất cần thử.

Giá trị IC₅₀ càng nhỏ thì hoạt tính càng mạnh. Thông thường đối với một hoạt chất, hoạt tính được đánh giá như sau:

- IC₅₀ > 100 µg/ml : coi như yếu hoặc không có hoạt tính
- IC₅₀ từ 10-100 µg/ml : hoạt tính vừa
- IC₅₀ từ 1-10 µg/ml : hoạt tính mạnh
- IC₅₀ < 1 µg/ml : hoạt tính rất mạnh

Giải thích kết quả:

Mặc dù cả rutin và quercetin đều có hoạt tính chống ung thư trên chuột, nhưng trong thí nghiệm trên mô hình tế bào (in vitro) này thì rutin hầu như không có hoạt tính trên cả hai dòng tế bào. Ngược lại quercetin lại có hoạt tính mạnh trên cả hai dòng tế bào. Kết quả này cũng phù hợp với công bố của một số tác giả khác là quercetin có hoạt tính ức chế sự phát triển của một số tế bào ung thư như ung thư bàng đái, ung thư vú nhưng rutin thì không. Có thể giải thích điều này là do rutin là một chất phân cực và kích thước lớn nên không thấm qua màng tế bào, trong khi đó quercetin ít phân cực hơn nên thấm qua thành tế bào một cách dễ dàng.

Trên mô hình thử nghiệm trên động vật (in vivo), quercetin và rutin đều có hoạt tính chống ung thư ruột trên chuột mặc dù tác dụng của rutin yếu hơn, như thế là vì khi rutin và quercetin được đưa vào khẩu phần ăn của chuột, men β-glucosidase có trong ruột thủy giải rutin thành quercetin và được hấp thụ qua thành ruột. Lúc đó quercetin tác dụng lên tế bào ung thư. Do đó rutin không có hoạt tính in vitro mà chỉ có hoạt tính in vivo.

QUERCETIN FROM *Sophora japonica* L. FLOWERS AND ITS ANTIPROLIFERATIVE ACTIVITY

Tran Kim Qui, Tran Le Quan, Nguyen Trung Nhan

ABSTRACT: Quercetin is a precious medicine used to treat cardiovascular trouble but recently recognized by its antiproliferative activity. This paper describes the preparation of quercetin from *Sophora japonica* flowers, the structure determination by spectral analysis and its antiproliferative activity against murine colon 26-L5 carcinoma and human HT-1080 fibrosarcoma.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Đỗ Tất Lợi, *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, NXB Khoa học Kỹ thuật, Hà Nội, 222-225, 315-316 (1995).
- [2]. I. L. Finar, *Organic Chemistry*, 2, Longmans, Green and Co., L.td., 404-405, 658-673, 679-682 (1959).
- [3]. L. V. Rubinstein et al., *J. Natl. Cancer Inst.* 82, 1113-1118 (1990).