

NGHIÊN CỨU HOẠT CHẤT SINH HỌC TỪ CÂY KIM NGÂN (*LONICERA JAPONICA* THUNB., CAPRIFOLIACEAE) CỦA VIỆT NAM

Phan Minh Giang, Nguyễn Tuấn Minh, Nguyễn Thị Minh Hằng, Phan Tổng Sơn

Khoa Hóa học, Trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

SUMMARY

*β -Sitosterol, stigmasterol, 10-nonacosanol, 3 β -hydroxyurs-12-en-30-oic acid, chrysin 7-O- β -glucoside, tricetin, apigenin, 4-O-methyl ether of apigenin (acacetin), quercetin, 3-O-methyl ether of quercetin, caffeic acid, chlorogenic acid and methyl ester of chlorogenic acid were isolated from the medicinal plant *Lonicera japonica* Thunb. growing in Vietnam. The chemical structures of the obtained compounds were determined on the basis of spectral analyses (IR, UV, MS, NMR). Chrysin 7-O- β -glucoside showed antimicrobial activities against *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* and *Fusarium oxysporum*.*

PHẦN MỞ ĐẦU

Kim ngân (*Lonicera japonica* Thunb., Caprifoliaceae) là một loại dây mọc leo. Hoa lúc đầu màu trắng, sau chuyển sang màu vàng, cùng một lúc trên cây có hoa mới nở màu trắng như bạc, lại có hoa nở đã lâu màu vàng như vàng, cho nên có tên là kim ngân. Kim ngân mọc hoang tại nhiều tỉnh nước ta. Do cây kim ngân có lá xanh tốt quanh năm, đến tháng 4-5 lại cho hoa đẹp và thơm, nên có thể trồng làm cảnh và lấy bóng mát; một số nơi cũng trồng để làm thuốc [1].

Nước sắc kim ngân có tác dụng kháng khuẩn, tác dụng trên chuyển hóa chất béo, thêm đường huyết và chống choáng phản vệ, không có độc tính. Ta dùng hoa hay cành lá kim ngân phơi hay sấy khô để làm thuốc. Kim ngân là một vị thuốc kinh nghiệm trong nhân dân, dùng chữa mụn nhọt, mày đay, lở ngứa, nhiệt độc, lên đậu, lên sởi, lỵ, ho do phế nhiệt; người ta còn dùng kim ngân trị dị ứng và chữa thấp khớp [1,2].

Các công trình nghiên cứu hóa thực vật cây *L. japonica* mọc ở Châu Âu, Nhật Bản, Trung Quốc và Triều Tiên đã dẫn đến sự phân lập một số flavonoid, iridoit glucozit, tritepenoid glycozit và tannin; ngoài ra các thành phần dễ bay hơi của hoa kim ngân cũng đã được khảo sát [3].

Mặc dù là một cây thuốc được sử dụng phổ biến trong nhân dân, cho đến nay cây kim ngân ở Việt Nam còn rất ít được nghiên cứu về mặt hóa thực vật. Bài này nêu một số kết quả nghiên cứu của chúng tôi về thành phần hoá học và hoạt tính sinh học của cây kim ngân (*L. japonica* L.) mọc ở Việt Nam.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Thiết bị và phương pháp

Các điểm nóng chảy được đo bằng dụng cụ Electrothermal model 9100 và không được hiệu chỉnh. Các phổ NMR được ghi với thiết bị Bruker Avance 500 (500 MHz cho ^1H NMR và 125 MHz cho ^{13}C NMR). Các phổ IR được ghi trên thiết bị Nicolet Impact 410 FT-IR với viên nén KBr, các phổ UV trên quang phổ kế GBC 2855. Các phổ EIMS (70 eV) được ghi trên thiết bị HP 5898B. Các phổ TOF MS được ghi trên khối phổ kế API QStar Pulsari.

Sắc ký cột (CC và FC) được tiến hành trên silica gel (Merck, 15-40 μm và 40-63 μm) và polyamide 6S (Riedel de Haen). Lipophilic Sephadex LH-20 (Sigma-Aldrich) được dùng cho sắc ký loại trừ theo kích thước. Sắc ký lớp mỏng (TLC) được tiến hành trên bản mỏng tráng sẵn silica gel DC Alufolien 60 F₂₅₄ (Merck), vết chất được phát hiện bằng đèn UV ở bước sóng 254 nm và phun thuốc thử vanilin/conc. H₂SO₄ 1%.

Nguyên liệu thực vật

Hoa, lá và cành con của cây kim ngân (*L. japonica* Thunb.) được thu hái ở ngoại thành Hà Nội vào tháng 5 năm 2002. Mẫu thực vật đã được giám định bởi TS Trần Ngọc Ninh, Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Sau khi hong khô trong râm, mẫu thực vật được sấy ở 40^o C cho đến khô, rồi xay thành bột mịn.

Điều chế các phần chiết

Bột khô của hoa (0,9 kg), lá (0,6 kg) và cành con (0,2 kg) của cây kim ngân được ngâm chiết riêng rẽ ở nhiệt độ phòng với etanol 96%. Các dịch chiết etanol được cô bót dung môi dưới áp suất giảm, rồi pha loãng với nước. Các dịch chiết nước được phân bố lần lượt với n-hexan, etyl axetat (EtOAc), và n-butanol (n-BuOH) cho các phần chiết tương ứng: từ hoa: n-hexan (Lf1, 42,9 g), EtOAc (Lf2, 56,0 g), và n-BuOH (Lf3, 5,0 g); từ lá: n-hexan (Ll1, 1,8 g), EtOAc (Ll2, 13,0 g), và n-BuOH (Ll3, 5,0 g); từ cành con: n-hexan (Lt1, 0,1 g), EtOAc (Lt2, 2,5 g), và n-BuOH (Lt3, 4,0 g).

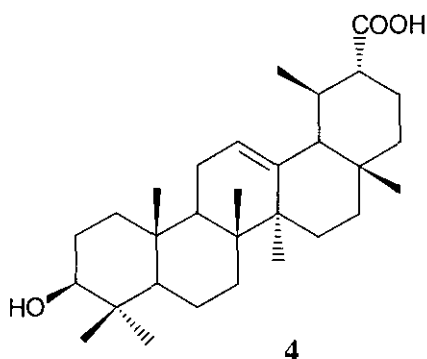
Phân lập và xác định cấu trúc các hợp chất

Tiến hành sàng lọc hóa thực vật nhờ các phản ứng thử đặc trưng [4] đã cho thấy sự có mặt sterol trong các phần chiết n-hexan, flavonoit và tritecpen saponin trong tất cả các phần chiết EtOAc và n-BuOH.

Từ phần chiết Lf2, bằng cách chạy sắc ký cột (CC và FC) nhiều lần trên silica gel với n-hexan-EtOAc hoặc CHCl₃-MeOH làm dung môi rửa giải chúng tôi đã phân lập được một hỗn hợp của β -sitosterol (1) và stigmasterol (2) với tỷ lệ 4:1, và 10-nonacosanol (3). Các hợp chất này đã được nhận biết nhờ so sánh các phổ MS, IR, ^1H và ^{13}C NMR của chúng với các phổ trong tài liệu tham khảo [5,6].

Cũng nhờ phương pháp sắc ký cột trên silica gel, rửa giải bằng n-hexan-EtOAc, chúng tôi đã thu được từ phần chiết Lf1 một hỗn hợp của β -sitosterol (1) và stigmasterol

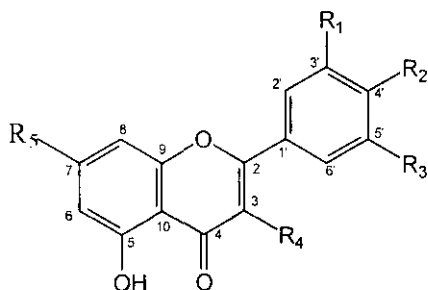
(2), và axit 3 β -hydroxyurs-12-en-30-oic là một tritecpenoit năm vòng (4, tinh thể hình kim không màu, dnc 244-250°C).



Công thức phân tử $C_{30}H_{48}O_3$ của hợp chất 4 được rút ra từ phổ TOF MS. Phổ IR cho thấy sự có mặt của một nhóm hydroxyl của axit cacboxylic (ν_{\max} 2500-3600 cm^{-1}), và một nhóm cacbonyl (ν_{\max} 1690 cm^{-1}). Trên phổ 1H NMR xuất hiện các tín hiệu của bảy nhóm methyl, trong số đó có sáu nhóm methyl bậc ba (6x3H, 6s) và một nhóm methyl bậc hai (δ_H 0.88, 3H, d, $J = 6.4$ Hz), một proton vinylic (δ_H 5.26, 1H, t, $J = 3.5$ Hz). Sự có mặt của một *equatorial* cabinol methin proton ở C-3 (δ_H 3.20, 1H, d, $J = 4.4$ Hz, 11.0 Hz) đã cho thấy cấu hình β của nhóm hydroxyl ở C-3. Sự có mặt của nhóm cacboxyl được suy ra từ phổ TOF MS. So sánh các dữ kiện 1H NMR của 4 với các dữ kiện đã được công bố cho α -amyrin [5], methyl dulcioat [7], và axit dulcioic [8,9] đã dẫn đến cấu trúc của 4 là axit 3 β -hydroxyurs-12-en-30-oic [10]. Việc phân lập được một axit tritecpenic năm vòng với khung ursan ở dạng tự do là một kết quả khác thường, vì các công trình nghiên cứu về *L. japonica* cho đến nay chỉ tìm thấy các tritecpen glycozit với khung olean.

Cây kim ngân đã chứng tỏ là một loài cây giàu flavonoit. Từ phần chiết Lf2, bằng sắc ký lỏng trung áp (MPLC) trên silica gel rồi kết tinh lại trong metanol nóng chúng tôi đã phân lập được glucozit 6. Các phổ IR và UV đã gợi ra cấu trúc flavon của hợp chất 6. Công thức phân tử $C_{21}H_{20}O_9$ của 6 được xác định bởi phổ TOF MS và các phổ ^{13}C NMR và DEPT. Các mảnh với các đỉnh ion ở m/z 255 (trên TOF MS) và 254 (trên EIMS) gợi ra sự mất đi một hexozơ (162 đơn vị khối lượng) từ ion tựa phân tử ở m/z 417. Phổ 1H NMR và các tương tác giữa các proton trên phổ 1H - 1H COSY của 6 [δ 6.47 (1H, d, $J = 1.9$ Hz, H-8), 6.97 (1H, d, $J = 1.9$ Hz, H-6), 7.04 (1H, sbr, H-3), 7.60 (3H, m, H-3', H-5', H-4'), 8.08 (2H, d, $J = 7$ Hz, H-2', H-6')] đã cho thấy 5,7-dihydroxyflavon (chrysin, 5) là aglycon của hợp chất 6; điều này rất phù hợp với các chuyển dịch hóa học trên phổ ^{13}C NMR của 6 khi được so sánh với phổ của chrysin [11]. Trên phổ EIMS các đỉnh ion ở m/z 226, 152 (retro-Diels-Alder (RDA), con đường 1, A_1^+), 102 (RDA, con đường 1, B_1^+), 105 (RDA, con đường 2, B_2^+), 92, 77 phù hợp với 5,7-dihydroxyflavon [12]. Trên các phổ ^{13}C NMR và DEPT ta nhận biết được các tín hiệu của phần glucosyl [δ 61.2 (t, C-6"), 70.1 (d, C-4"), 73.7 (d, C-2"), 76.9 (d, C-5"), 77.7 (d, C-3"), 100.3 (d, C-1")]. Proton anomeric của glucozơ xuất hiện ở δ 5.08 dưới dạng một doublet với hằng số tương tác $J = 6.9$ Hz, chỉ ra liên kết β của đơn vị glucozơ vào aglycon. Sự sắp xếp chuỗi proton trong phân tử đường được xác định bởi việc giải phổ 1H - 1H COSY. Bản chất của phần đường cũng đã được xác nhận bởi sự thủy phân 6 cho D-glucozơ, chất này đã được nhận biết bằng TLC. Các dữ kiện này đã chứng minh 6 là chrysin 7-O- β -glucozit (aequinoctin)[3].

Việc phân tách tiếp phân đoạn **Lf2** đã đạt hiệu quả cao nhờ sử dụng phương pháp sắc ký cột trên silica gel, tiếp đó tinh chế chín nhóm phân đoạn nhận được bằng sắc ký cột trên silica gel, polyamide 6S và Sephadex LH-20, kết quả đã phân lập được các flavon tricrin (**7**)[11], apigenin (**8**)[11] và 4'-O-metyl ete của apigenin (acacetin, **9**)[11]; hai flavonol quercetin (**10**)[11,13] và 3'-O-metyl ete của quercetin (**11**); và ba polyphenol khác là axit cafeic (**12**), axit clorogenic (**13**) [14] và metyl clorogenat (**14**). Cấu trúc của các hợp chất này cũng đã được xác định nhờ phân tích các dữ kiện phổ (MS, IR, ^1H NMR và ^{13}C NMR) của chúng cũng như so sánh các dữ kiện phổ nhận được với phổ của các chất nêu trong các tài liệu tham khảo.



5	$R_1=H$	$R_2=H$	$R_3=H$	$R_4=H$	$R_5=OH$
6	$R_1=H$	$R_2=H$	$R_3=H$	$R_4=H$	$R_5=OGlc$
7	$R_1=OCH_3$	$R_2=OH$	$R_3=OCH_3$	$R_4=H$	$R_5=OH$
8	$R_1=H$	$R_2=OH$	$R_3=H$	$R_4=H$	$R_5=OH$
9	$R_1=H$	$R_2=OCH_3$	$R_3=H$	$R_4=H$	$R_5=OH$
10	$R_1=OH$	$R_2=OH$	$R_3=H$	$R_4=OH$	$R_5=OH$
11	$R_1=OCH_3$	$R_2=OH$	$R_3=H$	$R_4=OH$	$R_5=OH$

Như vậy chúng tôi đã phân lập và xác định cấu trúc của 13 hợp chất từ cây kim ngân mọc ở Việt Nam, trong số đó 8 chất (**3**, **4**, **6**, **7**, **8**, **9**, **11** và **12**) lần đầu tiên được tìm thấy ở loài *L. japonica* Thunb..

Thử hoạt tính độc hại tế bào

Đã thử hoạt tính độc hại tế bào *in vitro* của các phân đoạn **Lf1**, **Lf2**, **Lf3**, **Ll1**, **Ll2**, **Ll3** và các hợp chất **3** và **6** đối với các dòng tế bào ung thư người Hep-G2, RD, F1 và dòng tế bào ung thư VR theo phương pháp được sử dụng bởi U.S. National Cancer Institute [15]. Kết quả cho thấy phân đoạn **Ll2** có hoạt tính đối với Hep-G2 ($IC_{50} = 20,3 \mu\text{g/ml}$), RD ($IC_{50} = 15,2 \mu\text{g/ml}$) và F1 ($IC_{50} = 4,86 \mu\text{g/ml}$).

Thử hoạt tính kháng vi sinh vật

Đã thử tác dụng kháng khuẩn và kháng nấm *in vitro* của các phân chiết **Lf1**, **Lf2**, **Lf3**, **Ll1**, **Ll2**, **Ll3**, **Lt1**, **Lt2**, **Lt3** và các hợp chất **3** và **6** đối với *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*, và *Candida albicans* theo phương pháp của Vanden Bergher and Vlietink [16]. Phân đoạn **Lf2** thể hiện tác dụng ức chế rõ rệt đối với *P. aeruginosa*, và hợp chất **6** có tác dụng ức chế *B. subtilis*, *E. coli* và *F. oxysporum*.

KẾT LUẬN

Đã phân lập được β -Sitosterol, stigmasterol, 10-nonacosanol, axit 3β -hydroxyurs-12-en-30-oic, chrysin 7-O- β -glucozit, tricetin, apigenin, 4'-O-metyl ete của apigenin (acacetin), quercetin, 3'-O-metyl ete của quercetin, axit cafeic, axit chlorogenic và metyl este của axit chlorogenic từ loài cây thuốc *Lonicera japonica* Thunb. mọc ở Việt Nam. Cấu trúc của các hợp chất nhận được đã được xác định nhờ các phương pháp phổ (IR, UV, MS, NMR). Chrysin 7-O- β -glucozit thể hiện tác dụng ức chế đối với *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* và *Fusarium oxysporum*.

Công trình này được hoàn thành với sự hỗ trợ của Chương trình Nghiên cứu cơ bản trong lĩnh vực Khoa học tự nhiên và International Foundation for Science (IFS).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Đỗ Tất Lợi, *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, tr. 91-94, Nhà Xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội (1991).
2. Võ Văn Chi, *Từ điển cây thuốc Việt Nam*, tr. 632-633, Nhà Xuất bản Y học, Hà Nội và Thành phố Hồ Chí Minh (1997).
3. Phan Minh Giang, Nguyễn Tuấn Minh, Phan Tổng Sơn, *Tạp chí Hóa học*, T. 40, số 3, tr. 103-107 (2002).
4. J. B. Harborne, *Phytochemical Methods*, Chapman & Hall, London (1973).
5. L. J. Goad and T. Akihisa, *Analysis of Sterols*, p. 378 và 412, Blackie Academic & Professional, London (1997).
6. A. B. Caldicott and G. Eglinton, *Phytochemistry*, Vol. 14, 1799 (1975).
7. S. B. Mahato, M. C. Das and N. P. Sahu, *Phytochemistry*, Vol. 20, p. 171-173 (1981).
8. Y. Takaishi, N. Wariishi, H. Tateishi, K. Kawazoe, K. Nakano, Y. Ono, H. Tokuda, H. Nishino and A. Iwashima, *Phytochemistry*, Vol. 45, p. 969-974 (1997).
9. T. K. Razdan, V. Kachroo, S. Harkar and G. L. Koul, *Phytochemistry*, Vol. 38, p. 991-992 (1982).
10. Phan Minh Giang, Phan Tổng Sơn, *Tạp chí Hóa học*, T. 41, số 1, tr. 108-109 (2003).
11. P. K. Agrawal, R. S. Thakur, M. C. Bansal, *Carbon 13 NMR of Flavonoids*, Elsevier Science, Amsterdam (1989).
12. D. G. I. Kingston, *Tetrahedron*, Vol. 27, 2691 (1971).
13. K. H. Son, J. O. Park, K. C. Chung, H. W. Chang, H. P. Kim, J. S. Kim and S. S. Kang, *Arch. Pharm. Res.*, 15, 365-370 (1992).
14. L. Y. Peng, S. X. Mei, B. Jiang, H. Zhou, H. D. Sun, *Fitoterapia*, 71, 713-715 (2000).
15. K. Likhiwitayawuid, C. K. Angerhofer, G. A. Cordell, J. M. Pezzuto, *J. Nat. Prod.*, Vol. 56, 30 (1993).
16. D. A. Vanden Bergher, A. J. Vlietink, *Methods in plant biochemistry*, Vol. 6, 47-68 (1991).