

Nghiên cứu phân lập và khảo sát hoạt tính sinh học của các sesquiterpenoid từ thân rễ nghệ xanh (*Curcuma aff. aeruginosa* Roxb.)

Phan Minh Giang, Nguyễn Thị Tuệ

Đào Quốc Hùng, Phan Tổng Sơn

Phòng thí nghiệm Hoá học các hợp chất thiên nhiên,

Khoa Hóa học, Trường Đại học Khoa học tự nhiên,

Đại học Quốc gia Hà Nội

Đặt vấn đề

Nghệ xanh (*Curcuma aff. aeruginosa* Roxb., Zingiberaceae) là loại cây thảo cao từ 1-2 m. Về mặt thực vật học cây nghệ xanh tương tự như cây nghệ ten đồng (*Curcuma aeruginosa* Roxb., Zingiberaceae) [1]. Tuy nhiên, điểm khác biệt giữa nghệ xanh và nghệ ten đồng là lát cắt của thân rễ nghệ xanh thẫm hơn của nghệ ten đồng, hơi ngả sang màu xanh mực Cửu Long. Hiện nay cây được trồng ở Hà Nội, Vĩnh Phúc và Hải Phòng để thu thân rễ làm thuốc chữa các bệnh như đau bụng và ăn uống không tiêu.

Các nghiên cứu đầu tiên về thành phần hoá học đã xác định được sự tập trung các sesquiterpenoid trong thân rễ nghệ xanh với curdion và zederon có thể là các thành phần chính [2]. Curdion được thông báo là có hoạt tính bảo vệ gan [3]. Các nghiên cứu này cho thấy triển vọng mở rộng các nghiên cứu hoá học một cách có hệ thống về các thành phần sesquiterpenoid từ thân rễ nghệ xanh cũng như các hoạt tính sinh học của chúng. Điều này đặt yêu cầu phát triển một phương pháp sắc kí thích hợp để phân lập các sesquiterpenoid từ thân rễ nghệ xanh, đặc biệt là các thành phần chính như curdion và zederon ở lượng lớn để cho các chuyển hoá hoá học và nghiên cứu về hoạt tính sinh học. Các hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm, chống oxy hóa và gây độc tế bào của curdion và zederon cũng đã được khảo sát và thông báo trong nghiên cứu này.

Điều kiện và phương pháp nghiên cứu

Nguyên liệu

Thân rễ nghệ xanh (*Curcuma aff. aeruginosa* Roxb.) được thu thập ở Phú Thụy, Gia Lâm, Hà Nội vào tháng 2 năm 2004. Mẫu thực vật đã được TS. Trần Ngọc Ninh, Viện Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam, giám định.

Chiết xuất

20 kg thân rễ nghệ xanh tươi được rửa sạch, thái lát mỏng, phơi khô trong bóng râm, sấy ở 45-50°C, rồi xay thành bột mịn, thu được 5 kg bột khô. Bột thân rễ nghệ xanh khô được ngâm chiết trong methanol 6 lần ở nhiệt độ phòng, mỗi lần trong 3 ngày. Sau khi lọc bỏ bã, dịch chiết methanol được cất loại dung môi dưới áp suất giảm xuống còn 1/10 thể tích, rồi pha loãng với nước cất. Dịch methanol-nước được chiết chọn lọc với n-hexan, ethyl acetat và n-butanol, các dịch chiết được làm khan bằng Na₂SO₄, sau đó được cất loại dung môi cho các phần chiết tương ứng là phần chiết n-hexan (157 g, hiệu suất 3,14% so với lượng nguyên liệu khô), ethyl acetat (30 g, 0,6%) và n-butanol (7 g, 0,14%).

Phương pháp phân tích và khảo sát cấu trúc các hợp chất

Sắc kí lớp mỏng được thực hiện trên bản mỏng tráng sẵn Merck Alufolien DC 60 F₂₅₄. Các vết chất được phát hiện bằng cách phun thuốc thử vanilin/H₂SO₄ 1% sau đó hơi nóng và bằng đèn tử ngoại ở bước sóng 254 nm. Sắc kí cột (CC) được thực hiện dưới trọng lực của dung môi với chất hấp phụ là silica gel Merck (cỡ hạt 63-200 μm).

Phổ hồng ngoại (IR) được đo trên máy Impact-410-Nicolet FT-IR. Phổ khối lượng va chạm điện tử (EI-MS) được đo trên máy HP-5989 B MS. Phổ cộng hưởng từ proton (¹H-NMR) và cacbon 13 (¹³C-NMR) được ghi trên máy Bruker AV 500. Sắc kí khí-khối phổ kế liên hợp (GC-MS) được thực hiện trên GC HP 5890 II, cột mao quản HP-5 (30 m x 0,25 mm đường kính trong; lớp phim dày 0,25 μm) liên hợp với MSD 5989B, chương trình nhiệt độ 45°C-150°C, 10°C/phút, dừng 1 phút, sau đó 150°C-250°C, 6°C/phút, dừng 15 phút. Nhiệt độ injector: 250°C. Nhiệt độ detector: 280°C. Khí mang: He.

Phân lập các sesquiterpenoid từ phần chiết n-hexan 83 g phần chiết n-hexan được tiến hành

● Nghiên cứu - Kỹ thuật

phân tách bằng CC trên silica gel, rửa giải gradient với n-hexan và các hệ dung môi n-hexan-ethyl acetat (19:1, 9:1, 4:1, 2:1 và 1:1). Các phân đoạn được khảo sát bằng TLC và được gộp lại thành 8 phân đoạn gộp. Từ 5 g phân đoạn gộp thứ 2 (45,4 g), bằng CC trên silica gel với hệ dung môi n-hexan-ethyl acetat, 25:1, và kết tinh lại trong n-hexan, cho 300 mg curdion (1). Từ 10 g phân đoạn gộp thứ 4 (14,1 g), bằng CC trên silica gel với hệ dung môi n-hexan-ethyl acetat (13:1 và 9:1) và kết tinh lại trong n-hexan cho 1,65 g zederon (2) và 40 mg β -sitosterol.

Curdion: Tinh thể hình tấm, màu trắng, điểm nóng chảy 60-62°C, $R_f = 0,38$ (TLC, silica gel, hệ dung môi n-hexan-ethyl acetat, 9:1). Các phổ IR, EI-MS, ^1H - và ^{13}C -NMR (CDCl_3) phù hợp với các dữ kiện đã được công bố cho curdion [7].

Zederon: Tinh thể hình khối, màu trắng, điểm nóng chảy 140-142°C. $R_f = 0,5$ (TLC, silica gel, hệ dung môi n-hexan-EtOAc, 9:1). Các phổ IR, EI-MS, ^1H - và ^{13}C NMR (CDCl_3) phù hợp với các dữ kiện đã được công bố cho zederon [8].

β -Sitosterol: Tinh thể hình kim, màu trắng, điểm nóng chảy 134-136°C. $R_f = 0,43$ (TLC, silica gel, hệ dung môi n-hexan-ethyl acetat, 9:1). Các phổ IR, EI-MS, ^1H - và ^{13}C -NMR (CDCl_3) phù hợp với của mẫu chuẩn.

Phương pháp thử hoạt tính sinh học

Thử hoạt tính kháng khuẩn và kháng nấm

Hoạt tính kháng khuẩn và kháng nấm được sàng lọc trên nấm vi lượng 96 giếng. Các mẫu thử cho kết quả dương tính được đánh giá nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) trên nấm vi lượng 96 giếng với các kháng sinh kiểm định bao gồm ampicillin, tetracyclin và nystatin [4].

Thử hoạt tính chống oxy hoá in vitro

Hoạt tính chống oxy hoá được đánh giá bởi phương pháp độn gốc 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) trong dung dịch ethanol bão hoà [5].

Thử tác dụng gây độc tế bào

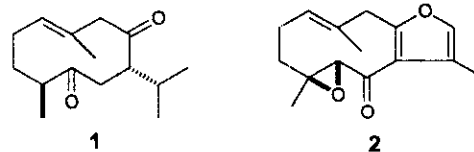
Tác dụng gây độc tế bào được thử theo phương pháp đang được thực hiện tại Viện nghiên cứu ung thư Quốc gia Hoa Kỳ (NCI) [6] với 3 dòng tế bào ung thư người là Hep-G2 (ung thư gan), FI (ung thư màng tử cung) và RD (ung thư màng tim).

Kết quả và thảo luận

Bột khô thân rễ nghệ xanh (*C. aff. aeruginosa*) được ngâm chiết với MeOH ở nhiệt độ phòng. Các phân chiết chứa các hợp chất trong thân rễ nghệ xanh được thu nhận bằng cách phân bố phân chiết methanol thu được giữa nước và các dung môi có độ phân cực tăng dần. Bằng phương pháp chiết

chọn lọc này các phần chiết n-hexan (hiệu suất 3,14% so với lượng nguyên liệu khô ban đầu), ethyl acetat (0,6%) và n-butanol (0,14%) đã được điều chế. Phần chiết n-hexan được phân tách bằng CC, rửa giải lần lượt với n-hexan và n-hexan-EtOAc (gradient, 19:1, 9:1, 4:1, 2:1 và 1:1). Tám phân đoạn gộp được gộp lại trên cơ sở thể tích của các hệ dung môi rửa giải kết hợp với các khảo sát bằng TLC. Từ phân đoạn gộp 2 chứa chủ yếu là curzerenon (GC-MS: 23,6%) và curdion (29,4%) curdion (1) đã được phân lập sắc kí với hiệu suất 0,1% (so với lượng thân rễ khô). Các thành phần khác được nhận dạng bằng GC-MS của phân đoạn gộp 2 là các sesquiterpenoid β -elemen (GC-MS: 0,6%), γ -elemen (0,1%), α -humulen (0,3%), furanodien (2,4%), globulol (1%), germacron (10,1%), và các dẫn xuất hydrocarbon 2-undecanon (0,3%), methyl ester của acid hexadecanoic (0,5%) và methyl ester của acid 9,12-octadecadienoic (0,5%). Zederon (2) được phân lập sắc kí từ phân đoạn gộp 4 với hiệu suất 0,05% (so với lượng thân rễ khô). Các phân đoạn gộp 5, 6, 7 và 8 tương ứng với các hệ dung môi rửa giải n-hexan-EtOAc, 4:1, 2:1 và 1:1, đã cho sau các phân lập sắc kí 9 sesquiterpenoid khác, trong đó có 3 sesquiterpenoid lần đầu tiên được phân lập từ thiên nhiên [9]. Cả curdion và zederon đều thuộc về các sesquiterpenoid có khung germacran, chúng có các cấu hình lập thể đã được xác định [10] và còn ít được nghiên cứu về các hoạt tính sinh học.

Hình 1: Cấu trúc của curdion (1) và zederon (2)



Các khảo sát hoạt tính kháng khuẩn và kháng nấm (bảng 1) cho thấy sự kháng các vi nấm như *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum* và *Candida albicans* của các phần chiết n-hexan, ethyl acetat và n-butanol. Trong các chủng vi khuẩn được thử nghiệm, chỉ có hoạt tính kháng *Staphylococcus aureus* của các phần chiết ethyl acetat và n-butanol là đáng lưu ý. Việc các thành phần chính được phân lập curdion và zederon thể hiện các hoạt tính kháng mạnh hơn đáng kể (MIC) các vi nấm *A. niger* và *C. albicans* so với của phần chiết n-hexan là nằm trong một mối tương quan thú vị. Khả năng kháng vi khuẩn *S. aureus* của curdion (MIC = 50 $\mu\text{g/ml}$) là một phát hiện đáng quan tâm cho các nghiên cứu tiếp theo, vì *S. aureus* là nguyên nhân phổ biến của các sự nhiễm khuẩn trong các bệnh nhân được điều

● Nghiên cứu - Kỹ thuật

trị. Các nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của curdion và zederon cho phép các hợp chất này được liệt vào

số các hợp chất kháng khuẩn và kháng nấm.

Bảng 1: Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) các chủng vi sinh vật của các phần chiết từ thân rễ nghệ xanh, curdion và zederon

| STT | Chủng vi sinh vật | Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC, µg/ml) | | | | |
|-----|--------------------------------|---------------------------------------|-------------------------|----------------------|---------|---------|
| | | Phần chiết n-hexan | Phần chiết ethyl acetat | Phần chiết n-butanol | Curdion | Zederon |
| 1 | <i>Escherichia coli</i> | - | - | - | - | - |
| 2 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | - | - | - | - | - |
| 3 | <i>Bacillus subtilis</i> | - | - | - | - | - |
| 4 | <i>Staphylococcus aureus</i> | - | 200 | 50 | 50 | - |
| 5 | <i>Aspergillus niger</i> | 100 | - | - | 50 | - |
| 6 | <i>Fusarium oxysporum</i> | 25 | 50 | 50 | 25 | 25 |
| 7 | <i>Candida albicans</i> | 200 | 200 | - | - | 50 |
| 8 | <i>Sacharomyces cerevisiae</i> | - | - | - | - | - |

- : không có tác dụng kháng vi sinh vật kiểm định

Curdion và zederon cũng được khảo sát hoạt tính chống oxy hóa theo phương pháp DPPH. Trong phương pháp này các gốc tự do tương đối bền DPPH được sử dụng để đánh giá khả năng dọn gốc tự do của hai sesquiterpenoid có nguồn gốc thiên nhiên này. Các kết quả thử nghiệm (bảng 2) cho thấy cả hai hợp chất này có thể không thể hiện các hoạt tính chống oxy hoá theo cơ chế phản ứng trực tiếp với các tiểu phần chứa oxy hoạt động.

Bảng 2: Tác dụng chống oxy hoá trên hệ DPPH của curdion và zederon

| STT | Mẫu thử | Nồng độ mẫu | SC (%) | Kết quả |
|-----|-------------------|-------------|-------------|------------|
| 1 | Mẫu đối chứng (+) | 50 µg/ml | 86,21 ± 0,5 | Dương tính |
| 2 | Mẫu đối chứng (-) | 5% | 0 ± 0 | Âm tính |
| 3 | Curdion | 50 µg/ml | 1,77 ± 0,3 | Âm tính |
| 4 | Zederon | 50 µg/ml | 12,06 ± 0,7 | Âm tính |

SC: Scavenging Capacity- Khả năng dọn gốc tự do tạo bởi 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

Trong thử nghiệm khả năng gây độc tế bào (bảng 3) curdion và zederon đều không thể hiện các hoạt tính với 3 dòng tế bào ung thư người là Hep-G2, F1 và RD.

Bảng 3: Tác dụng gây độc tế bào của curdion và zederon

| STT | Mẫu thử | Dòng tế bào/tế bào sống sót (%) | | |
|-----|-------------------|---------------------------------|-------------|------------|
| | | Hep-G ₂ | F1 | RD |
| 1 | Curdion | 91 ± 0,6 | 98,7 ± 0,7 | 87,6 ± 0,5 |
| 2 | Zederon | 91,2 ± 0,07 | 86,9 ± 0,09 | 99,1 ± 1,7 |
| 3 | Mẫu đối chứng (+) | 3,2 ± 0,09 | 2,1 ± 0,5 | 1,5 ± 0,02 |

Kết luận

1. Một phương pháp phân lập sắc kí thích hợp đã được phát triển để nghiên cứu một cách hệ thống các thành phần sesquiterpenoid trong phần chiết n-hexan từ thân rễ nghệ xanh (*Curcuma aff. aeruginosa* Roxb., Zingiberaceae). Bằng phương pháp này các thành phần sesquiterpenoid chính là curdion và zederon cũng đã được phân lập với lượng lớn, các hiệu suất phân lập tương ứng là 0,1% và 0,05% so với lượng nguyên liệu khô ban đầu.

2. Các nghiên cứu hoạt tính sinh học cho thấy curdion có khả năng kháng vi nấm *Aspergillus niger* (MIC 50 = µg/ml) và vi khuẩn *Staphylococcus aureus* (MIC 50 = µg/ml) trong khi zederon lại thể hiện hoạt tính kháng *Candida albicans* (MIC 50 µg/ml). Cả hai hợp chất này đều ức chế *Fusarium oxysporum* (MIC 25 µg/ml).

3. Curdion và zederon đều không thể hiện hoạt tính dọn gốc tự do cũng như các hoạt tính gây độc tế bào với 3 dòng tế bào ung thư người là Hep-G₂, F1 và RD.

Summary

Study of the isolation and biological activities of sesquiterpenoids from *Curcuma aff. aeruginosa* Roxb., Zingiberaceae

A systematic study of the sesquiterpenoid constituents of the *n*-hexane extract from the rhizomes of *Curcuma aff. aeruginosa* Roxb. (Zingiberaceae) was developed on the basis of a suitable chromatographic isolation procedure. By this method the main constituents curdione and zederone were isolated in a larger scale in the yields of 0.1% and 0.05% on the basis of the dry weight of the rhizomes. Curdione strongly inhibited *Aspergillus niger* (MIC 50 µg/ml), *Fusarium oxysporum* (MIC 25 µg/ml), and *Staphylococcus aureus* (MIC 50 µg/ml), while zederone was demonstrated to inhibit *Candida albicans* (MIC 50 µg/ml) and *Fusarium oxysporum* (MIC 25 µg/ml). They did not show the scavenging activity in the DPPH assay and cytotoxic activity against the human cancer cell lines Hep-G₂, FI, and RD.

Công trình này được hoàn thành với sự hỗ trợ của Đề tài cấp Đại học Quốc gia Hà Nội năm 2006

(QT-06-19) và International Foundation for Science (Stockholm).

Tài liệu tham khảo

1. Võ Văn Chí, *Từ điển cây thuốc Việt Nam*, Nhà xuất bản Y học, Thành phố Hồ Chí Minh, 1997, 837-838.
2. Phan Minh Giang, Văn Ngọc Hương, Phan Tống Sơn, *Tạp chí Hóa học*, 1998, 36, 67-72.
3. Matsuda H., Ninomiya K., Morikawa T., Yoshikawa M., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1998, 8, 339-344.
4. Vanden Berghe D. A., Vlietinck A. J., in *Methods in plant biochemistry*, Academic Press, London, 1991, Vol. 6, 47-69.
5. Koleva I. I., van Beek T. A., Linssen J. P. H., de Groot A., Evstatieva L. N., *Phytochem. Anal.*, 2002, 13, 8-17.
6. Litkhitwitayawuid K., Angerhofer C. K., Cordell G. A., Pezzuto J. M., *J. Nat. Prod.*, 1993, 56, 30-38.
7. Shibuya H., Hamamoto Y., Cai Y., Kitagawa I., *Chem. Pharm. Bull.*, 1987, 35, 924-927.
8. Inayama S., Gao J. F., Harimaya K., Iitaka Y., Guo Y. T., Kawamata T., *Chem. Pharm. Bull.*, 33, 1985, 1323-1326.
9. Phan M. G., Phan T. S., Matsunami K., Otsuka H., số liệu chưa công bố, 2006.

Góp phần nghiên cứu chế biến, thành phần hóa học và tác dụng dược lý của Táo ta

Trần Thị Oanh, Phạm Xuân Sinh

Thái Thị Thanh Thủy

Trường ĐH Dược Hà Nội

13 Lê Thánh Tông, Q. Hoàn Kiếm, Hà Nội

Đặt vấn đề

Quả táo ta là một loại quả được sử dụng rất nhiều để làm thực phẩm, nhưng sử dụng như một vị thuốc thì ít người biết đến, tài liệu nghiên cứu về vị thuốc này chưa nhiều và chưa có tài liệu nghiên cứu một cách đầy đủ. Để góp phần nghiên cứu việc chế biến táo ta, chúng tôi tiến hành chế biến táo nhục (thịt quả) bằng một số phương pháp khác nhau từ đó nghiên cứu về hiệu suất chế biến, thành phần hóa học chính của các mẫu chế phẩm và thăm dò một số tác dụng dược lý.

Theo các tài liệu công bố [1,3], táo ta thuộc loài *Zizyphus* song về thứ thì các tài liệu có công bố khác nhau, hoặc là *Zizyphus jujupa* Lamk. hoặc là

Zizyphus mauritiana Lamk. Theo các nhà nghiên cứu nông nghiệp nước ta, táo trồng ở vùng Hải Dương, Hưng Yên hiện nay chủ yếu là loài táo lai (*Ziz. mauritiana* Lamk)

Trong táo nhục (vỏ quả giữa) có các thành phần hóa học như: acid hữu cơ, acid amin, các nguyên tố vi lượng, đường, hydratcarbon, chất béo, protid, vitamin C, P [5].

Trong Đông y táo nhục được dùng để chữa bệnh về thận, lao, thiếu máu, ho hen, cảm máu, tăng trương lực cơ, lợi tiểu...Hiện nay Xí nghiệp dược phẩm TW 3 dùng táo nhục là một trong các nguyên liệu để sản xuất thuốc hoàn bổ thận âm...