

# VỀ THÀNH PHẦN HOÁ HỌC VÀ CÁC HOẠT CHẤT CỦA CÂY KHỔ SÂM CHO LÁ (*CROTON TONKINENSIS* GAGNEP.), Ở VIỆT NAM

Phạm Hoàng Ngọc<sup>1</sup>, Lê Mai Hương<sup>2</sup>,  
Phạm Thị Hồng Minh<sup>1</sup>, Đỗ Hữu Nghị<sup>2</sup>, Chu Đình Kính<sup>1</sup>  
*1-Viện Hoá Học, Trung tâm KHTN và CNQG*  
*2-Viện Hoá HCTN, Trung tâm KHTN và CNQG*

## Summary

In the chemical investigation of bioactive compounds from *C. tonkinensis* that collected from Tamdao, Vinhphuc province, 16 bio- active constituents have been isolated and identified belong to groups:  $\Delta^5$  steroid  $C_{29}$ , triterpen, alcaloid, ent-kauran diterpenoid, flavonoid glucozid and benzoic acid. Among them, three new structure compounds: 6.2, 6.3, and 6.4 have been found for the first time (up to date). The bioassay guided chemical fractionation also has been showed that: the ent-kauran diterpen may be a promising leading structure for new derivatives of high bioactivity.

The following research work is still in the way for the last conclusions.

## 1. Đặt vấn đề

Cây Khổ sâm cho lá (*Croton tonkinensis* Gagnep., họ Euphorbiaceae) được dùng trong y học dân gian thuộc loại thực vật đặc hữu của Việt nam [1]. Dùng lá tươi nhai sống hoặc giã nát vắt lấy nước để chữa bệnh đau bụng, đi ngoài, chữa nhiễm trùng, viêm loét hành tá tràng, đau dạ dày, chữa sốt rét [2]. Ngoài hoạt tính kháng khuẩn và trị sốt rét [3] dịch chiết metanol phần trên mặt đất của *C. tonkinensis* còn gây độc tế bào [4].

Bài báo này trình bày kết quả thử nghiệm tác dụng sinh học những chất phân lập được từ các dịch chiết của *C. tonkinensis* có hoạt tính với vi sinh vật kiểm định và gây độc tế bào.

## 2. PHẦN THỰC NGHIỆM

### 2.1. Mẫu vật thử nghiệm

Một số đơn chất phân lập được từ các dịch chiết cành, lá có hoạt tính từ cây *C. tonkinensis* (bảng 1).

### 2.2. Thử hoạt tính sinh học

#### 2.2.1. Thử hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định ( antimicrobial activity)

**Bước 1:** Thử định tính theo phương pháp khuếch tán trên thạch, sử dụng khoanh giấy lọc tẩm chất thử theo nồng độ tiêu chuẩn.

Các chủng vi sinh vật gồm đại diện các nhóm:

- Vi khuẩn Gr-: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*.

- Vi khuẩn Gr+: *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*.

- Nấm mốc: *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*.

- Nấm men: *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*.

**Bước 2:** Các mẫu cho hoạt tính (+) ở bước 1 sẽ được thử tiếp bước 2 để tính nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) theo phương pháp hiện đại của Vanden Bergher và Vlietlink [5], tiến hành trên phiến vi lượng 96 giếng, kháng sinh kiểm định gồm: ampicilin, tetracylin, amphoterixin B và nystatin.

Mẫu thô có giá trị: MIC  $\leq$  200  $\mu$ g/ml được coi là dương tính.

Mẫu tinh có giá trị: MIC  $\leq$  50  $\mu$ g/ml được coi là hoạt tính.

2.2.2. Thử nghiệm độc tế bào (Cytotoxicity).

Theo phương pháp đang được sử dụng ở Viện nghiên cứu ung thư quốc gia Mỹ (NCI) [6].

Các dòng tế bào ung thư người : KB (ung thư biểu mô), FI (ung thư màng tử cung ), RD (ung thư màng tim ), VR (tiểu ung thư thận khỉ ).

Tế bào ung thư được duy trì liên tục ở các điều kiện tiêu chuẩn và sử dụng test với các chất thử đã chuẩn bị sẵn ở các nồng độ khác nhau trên phiến vi lượng 96 giếng. Phiến thử nghiệm gồm tế bào và môi trường nuôi cấy cùng với chất thử được ủ ở 37°C trong 3 ngày để tế bào tiếp tục phát triển . Sau đó tế bào được lấy ra cố định , rửa, nhuộm và hoà lại bằng dung dịch, chuẩn độ trên máy Elisa ở bước sóng 515-540 nm.

Giá trị IC<sub>50</sub> được tính trên chương trình Table curve với giá trị logarit dựa trên giá trị dãy các thang nồng độ khác nhau của chất thử và giá trị đo được.

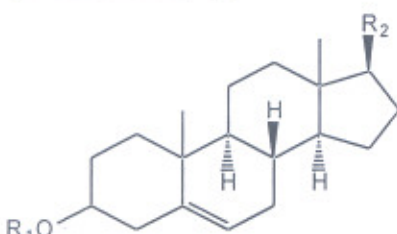
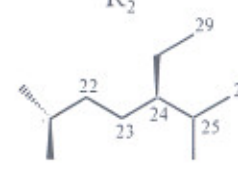
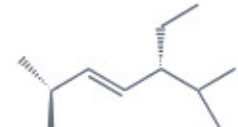
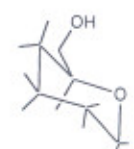
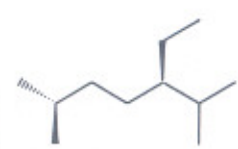
Các mẫu thô có giá trị IC<sub>50</sub> ≤ 20 µg/ml được coi là có hoạt tính.

Các mẫu tinh có giá trị IC<sub>50</sub> ≤ 5 µg/ml được coi là có hoạt tính.

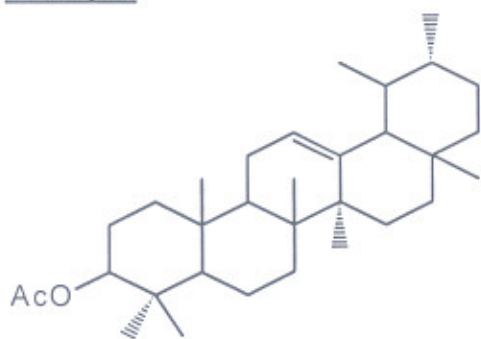
3. Thảo luận kết quả

Nghiên cứu thành phần hoá học của lá và cành cây *C. tonkinensis* mọc hoang dại ở Tam đảo, Vĩnh phúc thu hái vào mùa xuân và mùa thu, từ những phần chiết có phản ứng dương tính với vi sinh vật kiểm định và một số dòng tế bào ung thư người, chúng tôi đã phân lập và nhận dạng được 16 chất, ngoài axit benzoic là chất đơn giản, những chất còn lại thuộc vào các nhóm Δ<sup>5</sup>-sterol C<sub>29</sub>, tritecpen, ancaloit, ent-kauran ditecpenoit, và flavonoit- glucosit (bảng 1), các chất (6.2), (6.3) và (6.4) là mới [7].

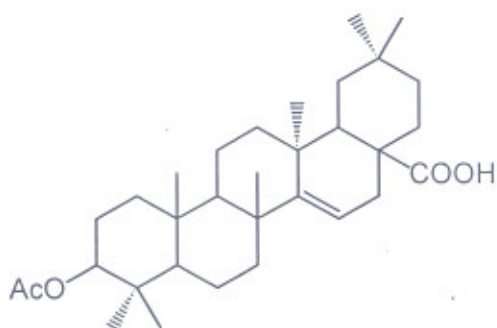
Bảng 1 : Cấu trúc hoá học các hợp chất đã phân lập và nhận dạng được từ cây *C. tonkinensis*

| <u>Δ<sup>5</sup>-STEROL C<sub>29</sub></u>   | CHẤT                            | R <sub>1</sub>  | R <sub>2</sub>   |             |
|--|---------------------------------|---|--|-------------|
|  | β-SITOSTEROL<br>(1.1)           | H   |  | 24R         |
|  | PORIFERASTEROL<br>(1.2)         | H   |  | 22E,<br>24R |
|  | β-SITOSTEROL-<br>GLUCOSID (1.3) |  |  | 24R         |

**Triterpen**

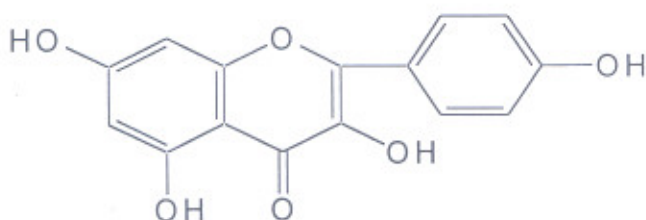


$\alpha$ -amyrin axetat (2.1)

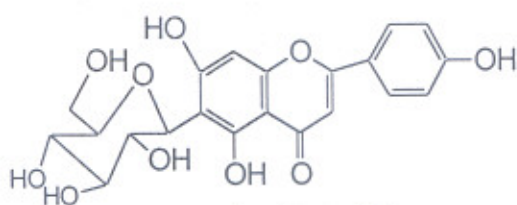


axetyl aleuritolic axit (2.2)

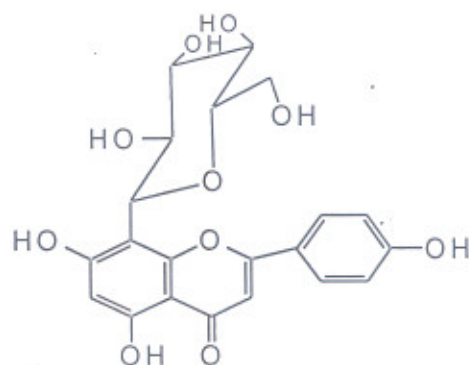
**Flavonoit**



kaempferol (3.1)

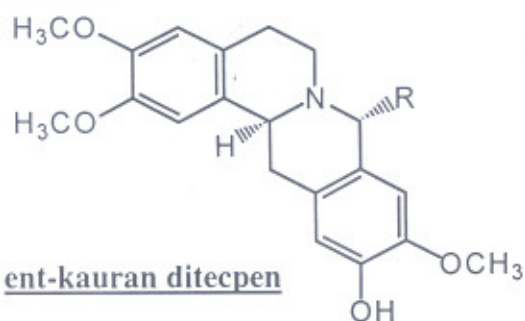


Isovitexin (4.2)



Vitexin (4.1)

**Ancaloit**

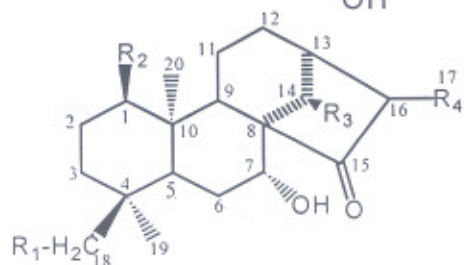


Corytenchin (5.1)

Corytenchirin (5.2)

R  
H  
CH<sub>3</sub>

**ent-kauran ditcepen**



(6.1) CH<sub>3</sub>COO

(6.2) CH<sub>3</sub>COO

(6.3) OH

(6.4) H

|                     |                     |                |                |                  |
|---------------------|---------------------|----------------|----------------|------------------|
| R <sub>1</sub>      | R <sub>2</sub>      | R <sub>3</sub> | R <sub>4</sub> |                  |
| CH <sub>3</sub> COO | H                   | H              | H              | =CH <sub>2</sub> |
| CH <sub>3</sub> COO | H                   | H              | H              | -CH <sub>3</sub> |
| OH                  | H                   | H              | H              | =CH <sub>2</sub> |
| H                   | CH <sub>3</sub> COO | OH             | OH             | =CH <sub>2</sub> |

Song hành với những kết quả ở trên, P.T.Sơn và cộng sự lần đầu tiên phân lập, nhận dạng và thử hoạt tính sinh học của ent-7 $\beta$ -hydroxy-18-axetoxycaur-16-en-15-on (6.1) từ cây *C. tonkinensis* [8], sau đó còn phân lập  $\beta$ -sitosterol, hỗn hợp  $\beta$ -sitosterol-stigmasterol tỷ lệ 6:5 [9]. P.M.Giang và cộng sự cho biết, từ dịch chiết metanol của lá cây *C. tonkinensis* đã phân lập và nhận dạng được tiliroside (3.2) là một flavonoid-glucosit este của kaempferol cùng với các ent-kauran (6.1), (6.4), ent-7 $\beta$ ,14 $\alpha$ -dihydroxycaur-16-en-15-on đã biết và một ent-kauran mới có cấu trúc ent-18-axetoxycaur-7 $\beta$ ,14 $\alpha$ -dihydroxycaur-16-en-15-on [10].

Như vậy 5 trong 6 ent-kauran nói trên là những hợp chất mới, lần đầu tiên các nhóm nghiên cứu [7, 8, 10] phân lập được từ cây *C. tonkinensis*.

Axit benzoic và các muối của nó là chất quen biết được sử dụng phổ biến như là chất bảo quản thực phẩm.  $\beta$ -sitosterol là chất rất phổ biến trong các thực vật bậc cao, người ta sử dụng nó như là tác nhân sinh nội tiết sinh dục nữ, chữa bệnh gia cường cholesterol (antihypercholesterolaemie), chữa bệnh giảm thiểu lipid (hypolipidaemie agent). Còn  $\beta$ -sitosterol-3-O- $\beta$ -D-glucopyranosid được dùng làm thuốc trị ung thư (antineoplastic agent), thuốc chữa bệnh phì đại tuyến tiền liệt (prostatic hypertrophy). Đó là những chất quen biết người ta đã biết khá rõ hoạt tính của chúng [11]. Gần đây người ta còn thấy các steroid này trong cây *C. cajucara* trị được nọc độc của rắn cắn.

Để xác định bản chất hoá học các hoạt chất, những chất còn lại đem thử hoạt tính với các vi sinh vật kiểm định và khả năng gây độc với một số dòng tế bào ung thư người. Số liệu thử nghiệm ở bảng 2 cho biết, ancaloit (5.1) và flavonoid (4.2) không có hoạt tính với những biotest đã nêu trên, 7 chất còn lại đều có hoạt tính ở mức độ khác nhau, trong đó các ent-kauran có nhiều hoạt tính mạnh và đáng lưu ý.

Trong các thử nghiệm của mình, chúng tôi quan sát thấy các tritecpen axetat (2.1) và (2.2) có tác dụng với vi khuẩn Gr(-) (*Pseudomonas aeruginosa*).

Các ancaloit (5.1) và (5.2) khác nhau về sự có mặt của một nhóm methyl ở vị trí C-8 khung berbin, nên chỉ có chất (5.2) tác dụng với cả vi khuẩn Gr(-) và Gr(+). Tương tự như vậy, vitexin (4.1) và isovitexin (4.2) là 2 flavonoid-C-glucosid có cấu trúc đồng phân, nhưng chỉ đồng phân apigenin-8-C- $\beta$ -D-glucopyranosid (4.1) có hoạt tính với nấm mốc (*Asp. niger*). Kết quả này chứng minh rằng các flavonoid của lá cây *C. tonkinensis* không phải là hoạt chất mang tính kháng khuẩn mạnh như tác giả [3] đã đề cập. Số liệu ở bảng 2 chứng tỏ rằng, các ent-kauran không những có tính kháng khuẩn mạnh, mà còn gây độc rất mạnh với một số dòng tế bào ung thư người, nhất là các ent-kauran (6.1), (6.4).

P.T.Sơn quan sát thấy tác dụng rõ rệt của ent-kauran ditecpen (6.1) với ký sinh trùng sốt rét kháng thuốc (*Plasmodium falciparum*) in vitro (cả chủng nhạy và chủng kháng cloroquin), gây độc mạnh với một số dòng tế bào ung thư người (Hep-G<sub>2</sub>, RD, FI, VR) và ức chế mạnh với một số vi khuẩn [9].

Các số liệu về hoạt tính của ent-kauran (6.1) ở bảng 2 về cơ bản rất phù hợp với kết quả nêu trong [8]. Như vậy, ent-kauran (6.1) có hoạt tính mạnh với dải tác dụng rất rộng, không những các vi khuẩn Gr(-), Gr(+), nấm mốc-đến một số dòng tế bào ung thư người, mà còn với các ký sinh trùng sốt rét kháng thuốc.

So với chất (6.1), ent-kauran (6.2) có cấu trúc tương tự, nhưng trong phân tử mất đi nhóm enon đã làm cho khoảng tác dụng thu lại rất hẹp, gần như chọn lọc vì chỉ còn hoạt tính với *Bacillus subtilis*. Còn ent-kauran (6.4) tuy có cấu trúc enon như trong (6.1), nhưng nhóm axetoxyl lại ở vị trí C-1 và xuất hiện thêm một nhóm 14 $\alpha$ -hydroxyl cũng làm cho khoảng hoạt

tính giảm đi, hoàn toàn không ức chế vi khuẩn Gr(+) và nấm mốc, còn hoạt tính với các dòng tế bào ung thư biểu mô người KB giảm 30 lần, ở dòng tế bào ung thư màng tử cung (FI) giảm 10 lần. Những thay đổi như thế cũng quan sát thấy ở một số ent-kauran tương tự. Chẳng hạn, chất ent-4 $\alpha$ ,7 $\beta$ -dihydroxy-18-axetoxycaur-16-en không có hoạt tính, nhưng khi được este hoá vào vị trí 4 và 7 đã tạo ra một số este của nó có hoạt tính anti-HIV [12].

Những kết quả nghiên cứu về thành phần hoá học và thử hoạt tính các chất phân lập được đã khẳng định tác dụng trị ký sinh trùng sốt rét và tính kháng sinh mạnh của lá Khổ sâm được quyết định bởi các ent-kauran ditecpen, đồng thời đã phát hiện tính gây độc mạnh đối với một số dòng tế bào ung thư người của các chất (6.1) và (6.4).

Chúng tôi cho rằng ent-kauran (6.1) là cấu trúc dẫn đường có triển vọng để tạo ra hàng loạt các hợp chất có hoạt tính sinh học cao và đề tài cần được tiếp tục nghiên cứu triển khai vào thực tế đời sống.

#### 4. Kết luận

1. Đã thử và phát hiện 7/9 đơn chất phân lập từ *C. tonkinensis* có hoạt tính với vi sinh vật kiểm định.
2. Phát hiện một số ent-kauran ditecpen của *C. tonkinensis* có tính kháng khuẩn và gây độc tế bào ung thư người.
3. Tính kháng khuẩn mạnh và tác dụng lên ký sinh trùng sốt rét được quyết định bởi các ent-kauran ditecpen có mặt trong cây Khổ sâm cho lá.

*Công trình được hoàn thành với sự trợ giúp kinh phí của HĐKHTN.*

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Đỗ Tất Lợi " Những cây thuốc và vị thuốc Việt nam (in lần thứ 8)". Trang 907-908, NXB Y học. Hà nội 2000.
2. Vũ Thị Phan, Đào Bội Hoàn, Vũ Thị Tuyết, Trương Văn Như. " Công trình nghiên cứu khoa học y dược". Tr. 90, NXB Y học. HN 1999.
3. Bế Thị Thuần, Trương Văn Như. *Tạp chí dược học*, T.31 (5), tr 11-12 (1991).
4. Phạm Thị Hồng Minh, Phạm Hoàng Ngọc, Lê Mai Hương, Chu Đình Kính. Abstracts ASOM X- 2000, p. 133, Dhaka, 18-28, Nov. 2000- Bangladesh
5. Vanden Begker D.A., Vietlink A.J. *Methods in plant biochemistry* 6, 47-68 (1991)
6. Likhinitayawnid K., Angerhofer C.K., Cordell G.A. Pezzuto J.M. *J. Nat. Prod.*, 56 (1), 30-38 (1993)
7. Phạm Thị Hồng Minh, Phạm Hoàng Ngọc. *Tạp chí hoá học*, T.41 (2), tr 104-109 (2003)
8. Phan Tống Sơn, Văn Ngọc Hương, Phan Minh Giang, TayLor W.C. *Tạp chí hoá học*, T.37 (4), tr 1-2, (1999).
9. Phan Tống Sơn, Lê Huyền Trâm, Phan minh Giang, *Tạp chí hoá học*, T.40, số ĐB, tr 53-57, (2002).
10. Phan Minh Giang, Juny Jooung Lee, Phan Tống Sơn, *Tạp chí hoá học*, T.41 (1), tr 1, (2003).
11. Chapman & Hall/CRC 1982-2003, From DNP on CD-ROM, Version 11.1
12. Bruno M., Rosseli S., Pibiri L., Kilgare N., Lee K.H. *J.Nat. Prod*, 65 (11), 1594-1597 (2002)