

**NGHIÊN CỨU HOẠT TÍNH ỨC CHẾ ENZYM  $\alpha$ -AMYLASE VÀ  
 $\alpha$ -GLUCOSIDASE CỦA MỘT SỐ FLAVONOIT TỪ CÂY CÚC HOA VÀNG**  
STUDY ON  $\alpha$ -AMYLASE AND  $\alpha$ -GLUCOSIDASE INHIBITORY ACTIVITIES OF SOME  
FLAVONOIDS FROM CHRYSANTHEMUM INDICUM L.

**Lê Huyền Trân<sup>1</sup>, Trần Thu Hương<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Minh Thu<sup>1</sup>, Nguyễn Tiến Đạt<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Trường Đại học Bách khoa Hà Nội

<sup>2</sup>Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Đến Tòa soạn 08-10-2012, chấp nhận đăng 25-12-2013

### TÓM TẮT

Một flavone và một flavone glucoside đã được phân lập từ lá của cây Cúc hoa vàng (*Chrysanthemum indicum* L.). Bằng các phương pháp phổ bao gồm phổ khối lượng phun mù điện từ (ESI-MS) và phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR), cấu trúc của chúng được nhận dạng là acacetin (1) và acacetin 7-O- $\beta$ -D-glucopyranoside (2). Hợp chất 2 thể hiện hoạt tính ức chế  $\alpha$ -glucosidase và  $\alpha$ -amylase với  $IC_{50}$  tương ứng là 1,17 và 0,88 mg/ml.

Từ khóa: *Chrysanthemum indicum*, acacetin, acacetin 7-O- $\beta$ -D-glucopyranoside,  $\alpha$ -glucosidase,  $\alpha$ -amylase

### ABSTRACT

A flavone and a flavone glucoside were isolated from the leaves of *Chrysanthemum indicum* L. By means of spectroscopic methods including electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) and nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR), their structures were identified as acacetin (1) and acacetin 7-O- $\beta$ -D-glucopyranoside (2). Compound 2 showed inhibitory activities against  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase with the  $IC_{50}$  of 1.17 and 0.88 mg/ml, respectively.

Keywords: *Chrysanthemum indicum*, acacetin, acacetin 7-O- $\beta$ -D-glucopyranoside,  $\alpha$ -glucosidase,  $\alpha$ -amylase.

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cúc hoa vàng có tên khoa học là *Chrysanthemum indicum* L., thuộc họ Cúc (Asteraceae). Theo Đông y, Cúc hoa vàng có vị đắng, cay, tính ôn, đi vào 3 kinh phế, can, thận, có tác dụng tán phong thấp, thanh đầu, mục, giáng hoa, giai độc; dùng để chữa phong mã sinh hoa mắt, nhức đầu, đau mắt đỏ, nhiều nước mắt, cao huyết áp, sốt [1]. Các nghiên cứu về thành phần hóa học của Cúc hoa vàng cho thấy, được liệu chứa axit caffeic, luteolin, kaempferol [2]; các flavonoid, terpenoid, các hợp chất phenolic [3], tinh dầu với thành phần chủ yếu là 1,8-cineol, camphor, borneol, bornyl axetat [4]. Một số nghiên cứu đã cho thấy dịch chiết Cúc hoa vàng có một số hoạt tính sinh học đáng chú ý như kháng viêm, điều hòa miễn dịch, chống khối u, khả năng gây độc đối với một số dòng tế bào ung thư phổi, đại tràng, tuyến tiền liệt [2, 6]. Ngoài ra, phần tinh dầu thể hiện hoạt tính kháng khuẩn

rất tốt [4]. Theo nghiên cứu của Tanko Y. và cộng sự, dịch chiết metanol từ Cúc hoa vàng có ảnh hưởng đáng kể đến hoạt tính hạ đường huyết *in vivo* trên động vật thí nghiệm là chuột Wistar [5]. Trong khuôn khổ nghiên cứu thành phần hoá học của các dược liệu Việt Nam, chúng tôi thông báo về việc phân lập, xác định cấu trúc hóa học và thử hoạt tính ức chế các enzym  $\alpha$ -glucosidase và  $\alpha$ -amylase của hai hợp chất flavonoid phân lập được từ lá cây Cúc hoa vàng Việt Nam.

## 2. THỰC NGHIỆM

### 2.1. Thiết bị và hóa chất

Điểm nóng chảy được xác định bằng máy đo điểm nóng chảy Mel-Temp 3.0 (Thermo Scientific). Phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) ghi bằng máy Bruker AM500 FT-NMR spectrometer với chất chuẩn nội là tetramethylsilane. Phổ khối lượng phun mù điện

từ (ESI-MS) đo trên hệ máy AGILENT 1200 series LC-MSD Ion Trap.

## 2.2. Mẫu thực vật

Mẫu lá cây Cúc hoa vàng thu hái tại Phú Thọ vào tháng 4/2012 và được TS. Trần Huy Thái, Viện Sinh Thái tài nguyên Sinh vật giám định tên khoa học. Mẫu tiêu bản được lưu giữ tại trường Viện Sinh Thái tài nguyên Sinh vật.

## 2.3. Chiết và phân lập chất

Lá cây Cúc hoa vàng đã phơi khô và xay nhỏ (2,0 kg) được ngâm chiết với metanol (4 L x 3 lần) trong bể siêu âm ở nhiệt độ 40-50°C, mỗi lần 60 phút. Dịch chiết được cất loại dung môi dưới áp suất giảm thu được dịch cao chiết metanol 145 g. Cao chiết metanol được hoà với nước (1 lít) rồi chiết phân đoạn lần lượt với hexan (1L x 3) và ethyl axetat (1L x 3) thu được các cao chiết hexan (64 g), ethyl axetat (8,2 g) và phần dịch nước tương ứng. Phần dịch nước được lọc qua cột dianion và rửa giải bằng hệ dung môi metanol:nước (0→100% metanol) thu được 3 phân đoạn ký hiệu A1-A3. Tiến hành sắc ký cột silica gel đối với phân đoạn A3 (7,8 g) rửa giải bằng hệ dung môi gradient cloroform:metanol (100:1 v/v → 100% metanol) thu được 3 phân đoạn ký hiệu B1-B3. Phân đoạn B1 được tinh chế qua cột silica gel với hệ dung môi rửa giải cloroform:metanol:nước (5:1:0,1; v/v) thu được hợp chất 2 (10,5 mg). Cao chiết ethyl axetat được tiến hành sắc kí cột silica gel với dung môi rửa giải gradient cloroform:axeton (100:1 v/v → 100% axeton) thu được 5 phân đoạn kí hiệu E1-E5. Hợp chất 1 (11,8 mg) thu được khi tinh chế E2 qua cột silica gel với hệ dung môi rửa giải hexan:cloroform:axeton (2:1:0,5; v/v).

**Acacetin (1):** chất bột màu vàng nhạt, m.p. 261-263°C. <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 3,85 (3H, s, 4'-OCH<sub>3</sub>), 6,20 (1H, d, *J* = 2,0 Hz, H-8), 6,50 (1H, d, *J* = 2,0 Hz, H-6), 6,84 (1H, s, H-3), 7,10 (2H, d, *J* = 9,0 Hz, H-3', H-5'), 8,04 (2H, d, *J* = 9,0 Hz, H-2', H-6'), 12,91 (1H, s, 5-OH). <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): xem Bảng 1. ESI-MS *m/z* 285,1 [M + H]<sup>+</sup>.

**Acacetin 7-O-β-D-glucopyranoside (2):** chất bột màu vàng nhạt. m.p. > 300°C. <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 3,85 (3H, br s, OMe), 5,07 (1H, d, *J* = 6,5 Hz, H-1''), 6,45 (1H, d, *J* = 2,0 Hz, H-6), 6,85 (1H, d, *J* = 2,0 Hz, H-8), 6,94 (1H, s, H-3), 7,12 (2H, d, *J* = 9,0 Hz, H-3', H-5').

8,05 (2H, d, *J* = 9,0 Hz, H-2', H-6'), 12,91 (1H, s, 5-OH). <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): xem Bảng 1. ESI-MS *m/z* 447,4 [M + H]<sup>+</sup>.

## 2.4. Đánh giá hoạt tính α-glucosidase

Hoạt tính ức chế α-glucosidase được thực hiện dựa vào phản ứng thủy phân *p*-nitrophenyl-α-D-glucopyranoside thành đường glucose và *p*-nitrophenol dưới tác dụng của chất xúc tác α-glucosidase trong sự có mặt hoặc không có mặt hoạt chất nghiên cứu [7]. Mật độ quang (OD) của *p*-nitrophenol sinh ra sau phản ứng được đo trên máy ELISA ở bước sóng 405 nm. Kết quả được tính theo công thức sau:

$$\% \text{ ức chế} = (\text{OD}_{\text{mẫu}} / \text{OD}_{\text{đường}}) \times 100$$

Trong đó:

OD<sub>đường</sub> là giá trị mật độ quang của hỗn hợp phản ứng không có mẫu thử.

OD<sub>mẫu</sub> là giá trị mật độ quang của hỗn hợp phản ứng có mẫu thử.

## 2.5. Đánh giá hoạt tính α-amylase

Hoạt tính ức chế α-amylase được thực hiện dựa vào phản ứng khử tinh bột của enzyme α-amylase trong sự có mặt hoặc không có mặt hoạt chất nghiên cứu [8]. Lượng tinh bột còn lại sau phản ứng được định lượng bằng dung dịch iot trên máy đo ELISA ở bước sóng 650 nm. Kết quả được tính theo công thức sau:

$$\% \text{ ức chế} = \left[ \frac{(\text{OD}_{\text{mẫu}} - \text{OD}_{\text{am}})}{(\text{OD}_{\text{đường}} - \text{OD}_{\text{am}})} \right] \times 100$$

Trong đó:

OD<sub>mẫu</sub> là giá trị mật độ quang của hỗn hợp tinh bột có ù với enzyme và mẫu.

OD<sub>am</sub> là giá trị mật độ quang của hỗn hợp tinh bột ù với enzyme và không có mẫu.

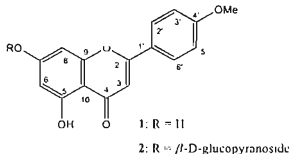
OD<sub>đường</sub> là giá trị mật độ quang của hỗn hợp tinh bột không có enzyme và mẫu.

## 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### Xác định cấu trúc của các hợp chất 1-2

Hợp chất 1 thu được dưới dạng bột, màu vàng nhạt. Phổ khối lượng ESI-MS xuất hiện pic ion phân tử tại *m/z* 285,1 [M+H]<sup>+</sup> chứng tỏ hợp chất 1 có khối lượng phân tử M=284 ứng với công thức phân tử C<sub>16</sub>H<sub>12</sub>O<sub>5</sub>. Phổ <sup>1</sup>H-NMR XUẤT

hiện tín hiệu của 7 proton thuộc vòng thơm trong đó có một hệ proton dạng  $A_2B_2$  tại  $\delta$  7,10 (2H, d,  $J = 9,0$  Hz, H-3', 5'), 8,04 (2H, d,  $J = 9,0$  Hz, H-2', 6'), một cặp proton dạng *meta* tại  $\delta$  6,20 (1H, d,  $J = 2,0$  Hz, H-8), 6,50 (1H, d,  $J = 2,0$  Hz, H-6) và một proton ở dạng singlet tại  $\delta$  6,84 (1H, s, H-3). Ngoài ra, trên phổ proton còn xuất hiện tín hiệu của một nhóm oximetyl tại  $\delta$  3,85 (3H, s, 4'-OCH<sub>3</sub>). Xem xét các tín hiệu xuất hiện trên phổ <sup>1</sup>H-NMR có thể nhận thấy hợp chất 1 có dạng khung flavon với các tín hiệu đặc trưng của vòng thơm, trong đó hệ vòng thơm dạng  $A_2B_2$  thuộc vòng B, cặp proton thế dạng *meta* được xác định là của H-6 và H-8 của vòng A. Vị trí số 5 của vòng A thế bởi một nhóm hydroxyl, điều này được khẳng định bởi sự xuất hiện tín hiệu của nhóm OH tại  $\delta$  12,91. Sự dịch chuyển về phía trường thấp của tín hiệu này là do việc tạo liên kết hydro nội phân tử giữa nhóm hydroxyl (5-OH) với nhóm cacbonyl (C=O) tại vị trí số 4 và tín hiệu singlet tại  $\delta$  6,81 được xác định là tại vị trí H-3 của vòng C thuộc khung flavon.



Hình 1. Cấu trúc hoá học của các hợp chất 1-2 phân lập từ Cúc hoa vàng

Phổ <sup>13</sup>C-NMR và DEPT của 1 cho thấy tín hiệu của 16 nguyên tử cacbon trong đó giá trị  $\delta$  55,5 khẳng định sự có mặt của một nhóm metoxi. 15 tín hiệu còn lại là hoàn toàn phù hợp cho hợp chất có khung flavon với nhóm cacbonyl tại  $\delta$  181,7 (C-4). Hai tín hiệu tại  $\delta$  114,5 và 128,2 có cường độ pic cao gấp đôi chứng tỏ vòng B có sự đối xứng hoàn toàn. Các tín hiệu tại  $\delta$  98,8 và 93,9 rất đặc trưng cho hai vị trí C-6, C-8 của khung flavon khi các vị trí C-5 và C-7 đều bị hydroxyl hóa. So sánh các giá trị phổ NMR của hợp chất 1 với các giá trị phổ tương ứng của chất acacetin đã công bố cho thấy có sự phù hợp hoàn toàn [9]. Từ đó có thể khẳng định hợp chất 1 là acacetin.

Hợp chất 2 thu được dưới dạng chất bột màu vàng. Phổ khối lượng ESI-MS có vạch tín hiệu [M-H]<sup>-</sup> tại  $m/z$  447,4 chứng tỏ 2 có khối lượng phân tử  $M=446$ . Các phổ <sup>1</sup>H và <sup>13</sup>C NMR của hợp chất 2 tương tự như các phổ tương ứng của 1 cho phép xác định hai hợp chất có cấu trúc tương tự nhau (Bảng 1).

Bảng 1. Số liệu phổ <sup>13</sup>C-NMR của hợp chất 1-2 phân lập từ lá cây Cúc hoa vàng

| Vị trí           | 1     | 2     |
|------------------|-------|-------|
| 2                | 163,2 | 163,8 |
| 3                | 103,5 | 103,7 |
| 4                | 181,7 | 181,9 |
| 5                | 161,4 | 161,0 |
| 6                | 98,8  | 99,5  |
| 7                | 164,2 | 163,8 |
| 8                | 93,9  | 94,9  |
| 9                | 157,3 | 156,9 |
| 10               | 103,7 | 105,3 |
| 1'               | 122,8 | 122,6 |
| 2'               | 128,2 | 128,4 |
| 3'               | 114,5 | 114,6 |
| 4'               | 162,2 | 162,4 |
| 5'               | 114,5 | 114,6 |
| 6'               | 128,2 | 128,4 |
| OCH <sub>3</sub> | 55,5  | 55,5  |
| 1''              | -     | 99,7  |
| 2''              | -     | 73,0  |
| 3''              | -     | 77,1  |
| 4''              | -     | 69,5  |
| 5''              | -     | 76,4  |
| 6''              | -     | 60,6  |

Điểm khác biệt dễ nhận thấy nhất là sự xuất hiện thêm các tín hiệu của một gốc đường  $\beta$ -D-glucose với tín hiệu proton anomeric tại 5,07 (1H, d,  $J = 6,5$  Hz, H-1'') và tín hiệu độ dịch chuyển hoá học <sup>13</sup>C tại 99,7 (C-1''), 73,0 (C-2''), 77,1 (C-3''), 69,5 (C-4''), 76,4 (C-5''), 60,6 (C-6''). Độ dịch chuyển hoá học của C-7 của hợp chất 2 ( $\delta$  163,8) dịch chuyển về phía trường cao hơn so với hợp chất 1 ( $\delta$  164,2) chứng tỏ gốc đường đính vào vị trí C-7. Như vậy, cấu trúc của hợp chất 2 được xác định là acacetin 7-O- $\beta$ -D-glucopyranoside [10].

**Đánh giá hoạt tính ức chế các enzyme  $\alpha$ -glucosidase và  $\alpha$ -amylase**

Kết quả thử hoạt tính ức chế các enzyme  $\alpha$ -glucosidase và  $\alpha$ -amylase của hai hợp chất

flavonoid phân lập từ lá cây Cúc hoa vàng được chi ra ở Bảng 2.

Bảng 2 Kết quả thử hoạt tính ức chế enzyme  $\alpha$ -glucosidase và  $\alpha$ -amylase của các hợp chất 1-2

| Chất     | Hoạt tính ức chế IC <sub>50</sub> ( $\mu$ g/ml) |                   |
|----------|---|-------------------|
|          | $\alpha$ -glucosidase                           | $\alpha$ -amylase |
| 1        | –   | –                 |
| 2        | 1,17  | 0,88              |
| Acarbose | 1,64  | 1,02              |

Bảng 2 cho thấy hợp chất 1 không có tác dụng ức chế các enzyme  $\alpha$ -glucosidase và  $\alpha$ -amylase, trong khi hợp chất 2 thể hiện hoạt tính khá tốt (với các giá trị IC<sub>50</sub> tương ứng là 1,17 và 0,88  $\mu$ g/ml) so với chất đối chứng dương là acarbose. So sánh sự khác nhau về cấu trúc hoá học của hai chất 1 và 2 có thể nhận định rằng việc gắn thêm nhóm đường vào cấu trúc của khung flavone làm tăng hoạt tính ức chế  $\alpha$ -glucosidase và  $\alpha$ -amylase.

#### 4. KẾT LUẬN

Từ bộ phận lá của cây Cúc hoa vàng (*Chrysanthemum indicum* L.) Việt Nam hai hợp chất flavonoid thiên nhiên đã được phân lập là acacetin và acacetin 7-O- $\beta$ -D-glucopyranoside. Cấu trúc của chúng được xác định dựa vào các dữ liệu phổ cộng hưởng từ hạt nhân NMR và phổ khối lượng phun mù điện từ ESI-MS. Hợp chất acacetin 7-O- $\beta$ -D-glucopyranoside thể hiện tác dụng ức chế enzyme  $\alpha$ -glucosidase và  $\alpha$ -amylase với giá trị IC<sub>50</sub> tương ứng là 1,17 and 0,88 mg/ml. Như vậy, việc sử dụng Cúc hoa vàng trong điều trị bệnh tiểu đường là có cơ sở khoa học và tác dụng hạ đường huyết của Cúc hoa vàng có thể là nhờ vào khả năng ức chế các enzyme  $\alpha$ -glucosidase và  $\alpha$ -amylase của nhóm hợp chất flavonoid có trong cây.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Đỗ Tất Lợi, Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam, Nhà xuất bản y học, Hà Nội, 604-605 (2004).
2. K. Tsuji-Naito, H. Sacki, M. Hamano, Food Chem. 116, 854-859 (2009).
3. A. Yuan, Z. Li, X. Li, S. Yi, S. Wang, K. Shi, J. Bian, J. Nanjing Med. Univ. 23, 284-288 (2009).
4. Zhu S., Yang Y., Yu H., Ying Y., Zou G., J. Ethnopharmacol., 96, 151-158 (2005).
5. Tanko Y., Jimoh A.G., Mohammed A.D.T. A. and Musa K.Y., J. Nat. Prod. Plant Resour., 1 (2), pp. 1-7 (2011).
6. W. Cheng, J. Li, T. You, C. Hu., J. Ethnopharmacol., 101, 334-337 (2005).
7. Ryu H.W., Lee B.W., Marcus J.C.L., Jung S., Ryu Y.B., Lee W.S., Park K.H., J. Agric. Food Chem., 58, 202-208 (2010).
8. Kusano R, Ogawa S, Matsuo Y, Tanaka T, Yazaki Y, Kouno I., J. Nat. Prod., 74, 119-128 (2011)
9. Agrawal PK. Carbon-13 NMR of flavonoids, Elsevier-Amsterdam; 1989.
10. H. Itokawa, K. Suto and K. Takeya. Chem. Pharm. Bull., 29, 1777-1779 (1981).

Địa chỉ liên hệ: Lê Huyền Trâm - Tel. (+84) 912 783 355, E-mail: huyentrâm@gmail.com  
 Trường Đại học Bách khoa Hà Nội,  
 Số 1, Đại Cồ Việt, Hà Nội, Việt Nam.