

CARPAINONE: ALKALOID MỚI TỪ LÁ CÂY ĐU ĐỦ

Hồ Thị Hà¹, Đỗ Thị Hoa Viên¹, Lê Quang Hòa¹, Phạm Văn Cường²,
Đoàn Thị Mai Hương^{2,*}, Nguyễn Thùy Linh², Châu Văn Minh²

¹Trường Đại học Bách khoa Hà Nội

²Viện Hóa sinh biển, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

*Email: doanhuong7@yahoo.com

Đến Toà soạn: 18/3/2014; Chấp nhận đăng: 18/7/2014

TÓM TẮT

Cây Đu đủ (*Carica papaya* L.) thuộc họ Caricaceae là loại cây có nhiều tác dụng tốt cho sức khoẻ. Dịch chiết của lá Đu đủ thể hiện hoạt tính chống ung thư, chống oxy hóa, kháng vi sinh vật kiểm định và có tác dụng chống viêm, điều hòa miễn dịch. Trong khuôn khổ bài báo này, chúng tôi trình bày việc phân lập và xác định cấu trúc hóa học, đồng thời đánh giá hoạt tính gây độc tế bào, kháng khuẩn và chống oxy hóa của hợp chất alkaloid mới được đặt tên là Carpainone (1) từ lá cây Đu đủ

Từ khoá: *Carica papaya* L, Caricaceae, Carpainone.

1. MỞ ĐẦU

Cây Đu đủ có tên khoa học là *Carica papaya* L. Ở nước ta, cây Đu đủ được trồng khắp nơi, đây là loại cây có nhiều tác dụng tốt cho sức khoẻ. Quả Đu đủ chín là món ăn bổ dưỡng, có tác dụng nhuận tràng và lợi tiểu nhẹ. Nhựa mù quả xanh có tác dụng trừ giun và chống đông máu. Hạt cũng có tác dụng trừ giun, ngoài ra còn có các tác dụng khác như hạ sốt, lợi trung tiện, điều kinh và gây sảy. Rễ cây có tác dụng hạ sốt, tiêu đờm và giải độc. Lá Đu đủ dùng tiêu mụn nhọt, nước của lá dùng rửa vết loét, vết thương, sát trùng [1].

Kết quả nghiên cứu của các nhà khoa học trên thế giới cho thấy, dịch chiết lá cây Đu đủ thể hiện hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định đối với cả chủng Gram (-) và Gram (+) [2,3]. Ngoài ra còn có tác dụng kháng viêm, chống oxy hóa [4, 5]. Dịch chiết lá Đu đủ đã được chứng minh lá có hoạt tính chống ung thư và tác dụng điều hòa miễn dịch [6]. Các nghiên cứu trước đây đã chỉ ra rằng trong dịch chiết lá cây này có chứa các hợp chất thuộc lớp chất alkaloid, flavonoid... [7]. Trước đây, chúng tôi đã phân lập và xác định cấu trúc của 5 hợp chất từ lá cây Đu đủ [8]. Trong bài báo này, chúng tôi trình bày việc phân lập và xác định cấu trúc hóa học, đồng thời đánh giá hoạt tính gây độc tế bào, kháng khuẩn và chống oxy hóa của hợp chất mới là Carpainone (1) từ lá cây Đu đủ.

2. THỰC NGHIỆM VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Thiết bị và nguyên liệu

Phổ cộng hưởng từ hạt nhân NMR được ghi trên máy Bruker Avance 500 MHz với TMS là chất chuẩn nội. Sắc kí lớp mỏng (TLC) được thực hiện trên bản mỏng silica gel Merk 60 F₂₅₄. Sắc kí cột được tiến hành với silica gel cỡ hạt 40 – 63 μm và sephadex LH-20. Phổ khối phân giải cao HR-MS được thực hiện trên máy MAT 95S Finnigan-Thermo. Tủ ẩm CO₂ INNOVA CO-170, tủ cấy sinh học an toàn cấp II, máy li tâm Universal 320R, kính hiển vi ngược Zeiss, tủ lạnh sâu -25 °C, -80 °C, buồng đếm tế bào của Fisher, máy quang phổ Genios Tecan được sử dụng để thử hoạt tính sinh học.

Lá cây Đu đủ được trung tâm giống cây ăn quả - Đại học Nông nghiệp I Hà Nội cung cấp. Cây được trồng tại Nam Hồng – Đông Anh – Hà Nội. Lá thu hái vào tháng 10 năm 2012.

Các dòng tế bào ung thư KB, HL-60, LU-1, MCF-7 và tế bào lành tinh 3T3, cũng như các chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Staphylococcus aureus* (ATCC 13709), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442), *Lactobacillus fermentum* (Lp B14), *Enterococcus faecium* (B 650) và nấm men *Candida albicans* (ATCC 10231) được cung cấp bởi ATCC.

2.2. Xử lí mẫu thực vật và chiết tách

Mẫu lá cây Đu đủ sau khi phơi khô, xay nhỏ (20 kg) được ngâm chiết với dung môi MeOH (3 lần \times 70 L \times 24 giờ), sau đó cất loại dung môi dưới áp suất giảm cho đến khi còn 3 L dịch rồi thêm nước (5 L) và chiết lần lượt với n-hexan (3 lần \times 5 L) và CH₂Cl₂ (6 lần \times 5 L). Sau khi cất loại dung môi dưới áp suất giảm thu được 1009,2 g cặn chiết hexan và 101,9 g cặn chiết CH₂Cl₂.

Cặn CH₂Cl₂ được tinh chế trên cột silica gel với hệ dung môi CH₂Cl₂/MeOH gradient thu được 13 phân đoạn chính kí hiệu từ F1- F13. Từ phân đoạn F8 (3,26 g), sau khi tinh chế bằng cột silica gel với hệ dung môi n-hexan/EtOAc gradient thu được 5 phân đoạn nhỏ kí hiệu là F8.1-F8.5. Phân đoạn F8.3 (267,5 mg) được tinh chế trên cột sephadex với dung môi MeOH cho 5 phân đoạn kí hiệu từ F8.3.1-F8.3.5. Tinh chế phân đoạn F8.3.2 (23 mg) trên cột silica gel hệ dung môi n-hexan/EtOAc gradient thu được chất 1 (6,7 mg).

Carpainone (1): Chất rắn màu trắng. ESI-MS: m/z 274 [M+Na]⁺; HRESI-MS: m/z 274,1411 [M+Na]⁺ tương ứng với công thức là C₁₄H₂₁NNaO₃ (theo tính toán lí thuyết [M+Na]⁺ có m/z = 274,1419); ¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD): δ (ppm): 1,37 (6H, m, CH₂-4' + CH₂-5' + CH₂-6'); 1,06 (2H, quint, J = 7,5 Hz, CH₂-7'); 1,69 (2H, quint, J = 7,5 Hz, CH₂-3'); 2,28 (2H, t, J = 7,5 Hz, CH₂-8'); 2,30 (3H, s, CH₃); 2,71 (2H, t, J = 7,5 Hz, CH₂-2'); 5,97 (1H, d, J = 3,5 Hz, H-4); 6,92 (1H, d, J = 3,5 Hz, H-5). ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 12,8 (CH₃); 26,1 (C-7'); 27,1 (C-3'); 30,1 (C-6'); 30,2 (C-5'); 30,3 (C-4'); 35,1 (C-8'); 38,4 (C-2'); 110,3 (C-4); 119,7 (C-5); 132,2 (C-2); 138,6 (C-3); 177,0 (C-9'); 192,1 (C-1').

2.3. Thử hoạt tính sinh học

2.3.1. Hoạt tính gây độc tế bào

Thử hoạt tính gây độc tế bào trên các dòng tế bào ung thư ở nồng độ 0,8 $\mu\text{g/ml}$ đến 100 $\mu\text{g/ml}$ với số thí nghiệm lặp lại N = 3. Địa thử nghiệm bao gồm: tế bào + môi trường nuôi cấy + chất thử, được ủ trong tủ ẩm CO₂, ở nhiệt độ 37 °C trong 3 - 5 ngày để tế bào tiếp tục phát triển. Sau đó tế bào được cố định vào đáy giếng bằng TCA 20 % trong 30 phút ở 4 °C và nhuộm bằng SRB 0,4

% (w/v) trong 1 giờ ở 37 °C. Sau đó lượng SRB dư được gạn bỏ và các giếng thí nghiệm được rửa 3 lần bằng axit axetic 1 % và để khô trong không khí ở nhiệt độ phòng. Cuối cùng sử dụng unbuffered Tris base để hoà tan lượng SRB đã bám và nhuộm các phân tử protein, lắc nhẹ trong 10 phút. Hàm lượng màu của chất nhuộm SRB được xác định qua phổ hấp thụ ở bước sóng 515 nm. Dữ liệu sau đó được phân tích bằng Excel và giá trị IC₅₀ (nồng độ ức chế 50 %) được xác định bằng phần mềm Table Curve. Ellipticine được sử dụng làm chất đối chứng dương [9, 10].

2.3.2. Hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định

Các mẫu thử nghiệm được tiến hành pha loãng thành dãy nồng độ từ cao xuống thấp. Nồng độ chất thử lần lượt là 128 µg/ml, 32 µg/ml, 8 µg/ml, 2 µg/ml và 0,5 µg/ml. Dung dịch vi khuẩn và nấm với nồng độ 5×10⁵ CFU/ml được ủ cùng chất thử ở 37 °C trong 24 giờ. Đọc và xử lý kết quả bằng máy quang phổ TECAN ở bước sóng 595 nm và phần mềm raw data trên máy tính. Các chất ampicillin, streptomycin, amphotericin B được sử dụng như đối chứng dương [11, 12].

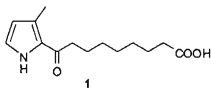
2.3.2. Hoạt tính quét gốc tự do DPPH

1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) là gốc tự do được dùng để sàng lọc tác dụng chống oxy hóa của các chất nghiên cứu. Hoạt tính chống oxy hóa thể hiện qua việc làm giảm màu DPPH của chất thử, được xác định bằng phép đo độ hấp thụ quang ở bước sóng λ = 517 nm trên máy quang phổ Genios Tecan (Áo). Pha dung dịch DPPH có nồng độ 1 mM trong metanol. Chất thử được pha trong DMSO tạo một dãy các nồng độ 128 µg/ml, 32 µg/ml, 8 µg/ml, 2 µg/ml và 0,5 µg/ml. Để thời gian phản ứng 30 phút ở 37 °C, đọc kết quả là độ hấp thụ ở bước sóng 517 nm.

$$\text{Giá trị SC\% (\% quét gốc tự do)} = (\text{OD}_{\text{trắng}} - \text{OD}_{\text{mẫu thử}}) / \text{OD}_{\text{trắng}} (\%)$$

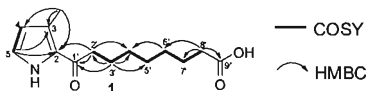
trong đó: OD_{trắng} là độ hấp thụ của giếng chỉ có DPPH, OD_{mẫu thử} là độ hấp thụ của giếng có DPPH và mẫu thử. EC₅₀ (Nồng độ có hiệu quả 50 %) được tính theo đồ thị tương quan giữa giá trị SC với các nồng độ khác nhau của chất thử tính bằng phần mềm Excel.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN



Chất 1 thu được dưới dạng chất rắn màu trắng. Nhiệt độ nóng chảy 135 – 137 °C. Phổ ESI-MS của chất 1 cho pic ion giả phân tử ở m/z 274 [M+Na]⁺. Phổ khối phân giải cao HR-ESI-MS positive cho pic ion giả phân tử [M+Na]⁺ ở m/z 274,1411 tương ứng với công thức phân tử là C₁₄H₂₁NNaO₃ (theo tính toán lí thuyết [M+Na]⁺ có m/z = 274,1419). Phổ ¹³C-NMR và DEPT cho phép xác định chất 1 có 14 nguyên tử cacbon trong phân tử tương ứng với 1 nhóm keton ở δ_c 192,1 (C-1'), 1 nhóm cacboxylic ở δ_c 177,0 (C-9'), 1 nhóm methyl tại δ_c 12,8 (CH₃), 2 nhóm metin sp² ở δ_c 110, 3 (C-4) và 119,7 (C-5), 7 nhóm metylen sp³ ở δ_c 26,1 (C-7'), 27,1 (C-3'), 30,1 (C-6'), 30,2 (C-5'), 30,3 (C-4'), 35,1 (C-8'), 38,4 (C-2') và 2 cacbon bậc 4 sp² ở δ_c 132,2 (C-2) và 138,6 (C-3). Phân tích phổ COSY cho phép xác định 2 chuỗi tương tác spin-spin: tương tác giữa các proton H-4 và H-5; chuỗi tương tác của các proton từ CH₂-2' đến CH₂-8' (được biểu diễn bằng các liên kết đậm trên Hình 1). Việc gắn kết các mảnh phân tử được thực hiện như

phân tích phổ HMBC. Trên phổ HMBC tương tác giữa cacbonyl C-9' với proton CH₂-8' cho thấy nhóm cacboxylic liên kết với C-8'. Tương tự, tương tác HMBC của cacbonyl C-1' với proton CH₂-2' và CH₂-3' cho phép xác định liên kết C-1'- C2'. Sự có mặt của vòng 3-methyl-pyrrol được xác định thông qua tương tác giữa proton của nhóm CH₃ với C-2, C-3 và C-4 cũng như tương tác của C-2 với H-5 trên phổ HMBC. Cuối cùng, tương tác HMBC của C-2 với proton CH₂-2' cho thấy C-1' liên kết với vòng pyrrol tại vị trí C-2. Phân tích chi tiết dữ liệu phổ ¹H-NMR, ¹³C-NMR, COSY, HSQC, HMBC cấu trúc hóa học của hợp chất **1** là axit 9-(3-methyl-pyrrol-2-yl)-9-oxononanoic. Đây là một hợp chất mới và được đặt tên là carpainone.



Hình 1. Một số tương tác chính trên phổ HMBC và COSY của **1**.

Hợp chất carpainone (**1**) đã được thử hoạt tính gây độc tế bào trên 04 dòng tế bào ung thư là KB, HL-60, LU-1, MCF7 và 01 dòng tế bào lành tính NIH3T3. Kết quả cho thấy hợp chất này không thể hiện hoạt tính đối với 04 dòng tế bào ung thư và không độc đối với dòng tế bào lành tính NIH3T3 ở nồng độ 100 µg/ml (Bảng 1).

Bảng 1. Kết quả thử hoạt tính gây độc tế bào của hợp chất **1**.

Chất thử	IC ₅₀ (µg/ml)				
	KB	HL-60	LU-1	MCF7	3T3
Carpainone (1)	>100	>100	>100	>100	>100
Ellipticine (đối chứng dương)	0,86	0,74	0,73	0,84	0,73

Khảo sát hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định trên một số chủng Gram (+), Gram (-) và nấm, tuy nhiên hợp chất này không thể hiện hoạt tính trên các chủng vi sinh vật thử nghiệm (Bảng 2).

Bảng 2. Kết quả thử hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định của chất **1**.

Chất thử	Nồng độ ức chế 50% sự phát triển của vi sinh vật và nấm kiểm định - IC ₅₀ (µg/ml)						
	Gram (+)			Gram (-)			Nấm
	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>L. fermentum</i>	<i>S. enterica</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albican</i>
Carpainone (1)	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128
Ampicilin	1,0	1,05	1,02	NT	1,2	NT	NT
Streptomycin	NT	NT	NT	12,5	NT	12	NT
Amphotericin B	NT	NT	NT	NT	NT	NT	0,8

Ghi chú: NT: không thử.

Khả năng bắt gốc tự do DPPH của hợp chất carpainone (1) cũng đã được khảo sát. Tuy nhiên hợp chất này cũng không thể hiện hoạt tính kể cả khi được thử nghiệm ở nồng độ 128 $\mu\text{g/ml}$ (Bảng 3).

Bảng 3. Kết quả thử hoạt tính chống oxy hóa của chất 1.

STT	Chất thử	EC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)
1	Carpainone (1)	>128
2	Resveratrol (đối chứng dương)	8,3

4. KẾT LUẬN

Hợp chất mới carpainone (1) được phân lập từ cặn chiết CH_2Cl_2 của lá Đu đủ (*Carica papaya* L.). Cấu trúc hóa học của hợp chất này đã được xác định bằng các phương pháp phổ MS và NMR 1D và 2D. Hợp chất này được thử hoạt tính gây độc tế bào trên một số dòng tế bào ung thư, hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định và hoạt tính chống oxy hóa nhưng rất tiếc là hợp chất không thể hiện hoạt tính trong các thử nghiệm được thực hiện.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Đỗ Huy Bích, Đặng Quang Chung - Cây thuốc và động vật làm thuốc ở VN, Nxb Khoa học Kỹ thuật, Hà Nội, 2006, tr. 824-827.
2. Nirosha N. and Mangalanayaki R. - Antibacterial activity of leaves and stem extract of *Carica papaya* L., International Journal of Advances in Pharmacy, Biology and Chemistry 2 (3) (2013) 473.
3. Rahman S., Imran M., Muhammad N., Hassan N., Chisthi A.K., Khan A.F., Sadozai K. S. and Khan S. M. - Antibacterial screening of leaves and stem of *Carica papaya*, Journal of Medicinal Plants Research 5 (20) (2011) 5167.
4. Bamidele V. O., Olubori M. A., Adeoye A. F. and Ayodele O. S. - Anti-inflammatory activities of ethanolic extract of *Carica papaya* leaves, Inflammopharmacology 16 (2008) 168.
5. Maisarah A. M., Nurul A. B., Asmah R. and Fauziah O. - Antioxidant analysis of different parts of *Carica papaya*, International Food Research Journal 20 (3) (2013) 1043.
6. Noriko O., Nam H. D., Emi K., Akira K., Satoshi I., Chikao M. - Aqueous extract of *Carica papaya* leaves exhibits anti-tumor activity and immunomodulatory effects, Journal of Ethnopharmacology 127 (2010) 760.
7. Nguyen T. T., Shaw P. N., Parat M. O., Hewavitharana A. K. - Anticancer activity of *Carica papaya*: a review, Mol. Nutr. Food Res. 57 (2013) 153.
8. Hồ Thị Hà, Lê Quang Hòa, Phạm Văn Cường, Đoàn Thị Mai Hương, Nguyễn Thùy Linh, Châu Văn Minh, Đỗ Thị Hoa Viên - Bước đầu nghiên cứu thành phần hóa học lá cây Đu đủ *Carica papaya* họ Đu đủ (caricaceae), Tạp chí Hóa học 51 (6ABC) (2013) 59.

9. Monks D. S., Skehan P., Shoemaker R., Paull K., Vistica D., Hose C., Langley J., Cronise P., Campbell H., Mayo J., Boyd M. - Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines, *Journal of National Cancer Institute* 83 (11) (1991) 757.
10. Scudiero D. A., Shoemaker R. H., Paull K. D., Monks A., Tierney S., Nofziger T. H., Currens M. J., Seniff D., Boyd M. R. - Evaluation of a soluble Tetrazolium/Formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines, *Cancer Research* 48 (1988) 4827.
11. Hadacek, F., Greger, H. Test of antifungal natural products methodologies, comparability of result and assay of choice, *Phytochem. Anal.* 90 (2000) 137.
12. Pual C., Louis M., Jean-Bosco S., Arnold J. V., Dirk V. B.- Bioassay for antibacterial and antifungal activities, Laboratory for Microbiology, Parasitology and Hygien, Faculty of Pharmaceutical, Biomedical and Veterinary Sciences, University of Antwerp, Belgium, 2005, pp. 1-13.

ABSTRACT

CARPAINONE: NEW ALKALOID FROM THE LEAVES OF *CARICA PAPAYA* L.

Ho Thi Ha¹, Do Thi Hoa Vien¹, Le Quang Hoa¹, Pham Van Cuong²,
Doan Thi Mai Huong^{2,*}, Nguyen Thuy Linh², Chau Van Minh²

¹*Hanoi University of Science and Technology*

²*Institute of Marine Biochemistry, Vietnam Academy of Science and Technology*

*Email: doanhuong7@yahoo.com

Carica papaya L. is well known for its nutritional and medicinal properties throughout the world. The medicinal properties of Papaya include anti-tumor, anti-bacterial and free radical scavenging activities. From the leaves of the papaya tree a new alkaloid carpainone (1) was isolated by chromatographic methods. Its structure was elucidated by HR-MS, 1D- and 2D-NMR spectroscopic methods.

Keywords: *Carica papaya*, Caricaceae, alkaloid, carpainone.