

Kết luận

Trong công trình này, chúng tôi đã phân lập được sáu hợp chất từ cây thanh ngâm (*Picria fel-terrae* Lour.) thu hái tại Cao Bằng. Bằng việc phân tích dữ liệu các thông số hóa lý và các phổ thu được, các chất đã được xác định gồm năm saponin là picfellarraenin VI, picfellarraenin IX, picfellarraenin IA, picfellarraenin IB, picfellarraenin XI và một flavonoid là apigenin. Đây là lần đầu tiên aglycon apigenin được phân lập từ cây thanh ngâm.

Tài liệu tham khảo

1. Viện Dược liệu (2004). *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam*, NXB Khoa học Kỹ thuật, Tập II, tr. 831-832.
2. Võ Văn Chí (2012). *Từ điển cây thuốc Việt Nam*, NXB Y học, Tập II, tr. 836-837.
3. Huang *et al.* (1999). "Flavonoid glucuronides from *Picria fel-terrae*", *Phytochemistry*, 1701-1703.
4. Zou *et al.* (2005). "Phenylethanoid glycosides from *Picria felterrae* Lour", *Journal of*

Intergrative Plant Biology, 47 (5), 632-636.

5. Hu *et al.* (1996). "New triterpenoid saponins from *Picria fel-terrae*", *Journal of Natural Products*, 59, 1186-1188.

6. Huang *et al.* (1998). "Complement-inhibiting curcubitacin glycosides from *Picria fel-terrae*", *Journal of Natural Products*, 61, 757-761.

7. Lin Y. J. and Chen Z. L. (1998). "New tetracyclic triterpene glycosides from *Picria fel-terrae* Lour", *Journal of Asian Natural Products Research*, 1, 21-27.

8. Zou *et al.* (2005). "A new picfellarraenone glycoside from *Picria fel-terrae*", *Acta Pharmaceutica Sinica*, 40 (1), 36-38.

9. Wang *et al.* (2006). "Two new triterpenoids from *Picria fel-terrae*", *Journal of Asian Natural Products Research*, 8 (6), 491-494.

10. Thuan N. D. *et al.* (2007). "A phenylpropanoid glycoside with antioxidant activity from *Picria fel-terrae*", *Archives of Pharmacal Research*, 30 (9), 1062-1066.

Các tanshinon phân lập từ rễ cây đản sâm (*Salvia miltiorrhiza* Bunge) di thực và trồng ở Việt Nam

Phương Thiện Thương¹, Nguyễn Thị Kim An²

Nguyễn Minh Khởi¹, Fumiaki Ito³

¹ Viện Dược liệu

² Sở Y tế tỉnh Sơn La

³ Khoa Dược, Đại học Setsunan, Nhật Bản

*E-mail: kimansoyte@gmail.com

Summary

Three compounds (1-3) were isolated from the roots of the plant *Salvia miltiorrhiza* (Bunge) cultivated in Phu Tho, Vietnam. Their structures were identified as tanshinone IIA (1), tanshinone I (2) and cryptotanshinone (3) by physicochemical properties and spectroscopic analyses. Tanshinone IIA was tested for cytotoxic activity against two lung cancer cell lines, PC9 and PC14. Experimentally, this compound exhibited significant inhibitory effect on PC9 cell line (IC₅₀ 2.7 µg/ml), but displayed very weak effect on PC14 cell line (IC₅₀ >50 µg/ml).

Keywords: *Salvia miltiorrhiza*, tanshinone, tanshinone IIA, cytotoxicity, lung cancer cell.

Đặt vấn đề

Đan sâm (*Salvia miltiorrhiza* Bunge), còn được gọi là huyết sâm, xích sâm là một loài thực vật sống lâu năm thuộc họ Hoa môi (Lamiaceae)^[1-3]. Đây là loài bản địa của Trung Quốc và được di thực vào nước ta^[3]. Trong y học cổ truyền, rễ đan sâm được sử dụng để phòng và điều trị một số chứng bệnh liên quan tới tim mạch và đột quỵ như suy tim, tim hồi hộp, đau tức ngực, thấp khớp, viêm khớp, thần kinh suy nhược, nhức đầu mắt ngủ và được dùng làm thuốc bổ. Các nghiên cứu khoa học hiện đại đã chứng minh đan sâm có tác dụng ức chế sự phát triển của xơ gan, bảo vệ các mô thận khỏi thương tổn do bệnh đái đường gây ra, chống bệnh viêm và tổn thương tụy cấp tính, tác dụng bảo vệ hệ tim mạch, và ức chế sự phát triển của các tế bào ung thư ở người và HIV^[4,5].

Gần đây, Viện Dược liệu đã di thực loài đan sâm của Trung Quốc về trồng tại một số nơi ở miền bắc Việt Nam. Tuy nhiên, chưa có nghiên cứu nào về thành phần hóa học và tác dụng của Đan Sâm được trồng ở Việt Nam. Trong bài báo này trình bày kết quả phân lập ba diterpenoid và tác dụng của chúng đối với một số dòng tế bào ung thư phổi.

Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng là vị thuốc (rễ) đan sâm (*Salvia miltiorrhiza* Bunge) được trồng và thu hoạch tại tỉnh Phú Thọ, Việt Nam. Dược liệu đan sâm được di thực từ Tứ Xuyên Trung Quốc, là sản phẩm của đề tài cấp Bộ Y tế của Viện Dược liệu "Nghiên cứu nhân giống và trồng di thực cây đan sâm Tứ Xuyên, Trung Quốc tại Việt Nam".

Dụng môi, hóa chất

Dụng môi, hóa chất dùng để chiết xuất, phân lập: *n*-hexan (Hx), dichloromethan (CH₂Cl₂), ethyl acetat (EtOAc), methanol (MeOH)... được mua của các công ty hóa chất và đạt tiêu chuẩn thí nghiệm.

Máy móc, thiết bị nghiên cứu

Sắc ký lớp mỏng (TLC) được thực hiện trên bản mỏng trắng sẵn DC-Aluofolien 60 F₂₅₄ (Merck). Vết chất được phát hiện bằng đèn điện tử ngoại (ở hai bước sóng 254 nm và 366 nm) và dùng thuốc thử là dung dịch H₂SO₄ 10%, sấy

ở nhiệt độ 120 °C đến khi hiện màu. Sắc ký cột (CC) được tiến hành với chất hấp phụ là Silica gel (Merck, cỡ hạt 0,040 – 0,063 mm).

Điềm nồng chảy được đo trên máy GALLENKAMP (Sanyo, Nhật Bản). Phổ tử ngoại (UV) được đo trên máy UV-1800 spectrometer (Shimadzu, Nhật Bản). Phổ hồng ngoại (IR) được đo trên máy GX-PerkinElmer (Mỹ). Phổ khối ion hóa phun điện (ESI-MS) được đo trên máy AGILENT 1100 LC-MSD Tram. Phổ cộng hưởng từ hạt nhân ¹H- và ¹³C-NMR được đo trên máy Bruker AM500-FT-NMR và sử dụng dung môi CDCl₃, chất nội chuẩn là tetramethylsilan (TMS).

Chiết tách và phân lập chất

Rễ đan sâm đã phơi khô (0,3 kg) được nghiền thành bột thô rồi chiết với MeOH (2 lít × 1 tuần × 3 lần) bằng phương pháp ngâm ở nhiệt độ thường. Gộp các dịch chiết MeOH và cất loại dung môi dưới áp suất giảm thu được 35,1 g cặn cao chiết. Hòa cặn cao MeOH này vào nước thành dạng hỗn dịch rồi chiết phân bố lần lượt với các dung môi có độ phân cực tăng dần là *n*-hexan (Hx) và dichloromethan (CH₂Cl₂) thu được các dịch chiết hữu cơ tương ứng. Cất loại dung môi dưới áp suất giảm thu được phân đoạn cặn cao Hx (7,3 g), cặn cao CH₂Cl₂ (9,6 g). Cặn cao CH₂Cl₂ (8 g) được cho chạy qua cột sắc ký silica gel, hệ dung môi Hx – EtOAc (10:1 đến 1:1) và cuối cùng là methanol thu được 8 phân đoạn (kí hiệu từ F1 đến F8). Phân đoạn F2 được liên tục chạy qua cột sắc ký sephadex LH20, rửa giải bằng MeOH thu được phân đoạn có chứa các diterpenoid có màu đỏ (F2.2). Phân đoạn này được chạy qua cột sắc ký silica gel, rửa giải bằng hệ dung môi Hx – CH₂Cl₂ (1:1) thu được chất số 1 (65,1 mg) và phân đoạn F2.2.2 có chứa 2 chất. Phân đoạn này được chạy qua cột sắc ký RP18, rửa giải bằng hệ dung môi MeOH – H₂O (5:1, 4:1, 3:1, 2:1) thu được chất số 2 (12,6 mg) và số 3 (4,2 mg).

Các chất số 1, 2, và 3 được đo phổ UV, IR, ISI-MS, ¹H-NMR và ¹³C-NMR để xác định công thức phân tử.

Tế bào và nuôi cấy tế bào

Các dòng tế bào ung thư phổi gồm PC9 và PC14 được cung cấp bởi Khoa Dược, Đại học Setsunan, Osaka, Nhật Bản. Tế bào được nuôi cấy trong môi trường RPMI hoặc DMEM (Dulbecco

● Nghiên cứu – Kỹ thuật

Modified Eagle's Medium) có bổ sung 10% fetal bovine serum (FBS), L-glutamin (0,2 mM/ml), penicillin/streptomycin (50 units/ml). Điều kiện nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C, không khí chứa 5% CO₂.

Thử độc tính của chất phân lập được

Thử độc tính đối với tế bào ung thư trên mô hình *in vitro* được thực hiện tại Khoa Dược, Đại học Setsunan, Nhật Bản, theo phương pháp Cell Counting Kit-8 (WST8)^[6] và giá trị IC₅₀ được tính theo phương pháp hồi quy tuyến tính Probit^[7].

Kết quả và bàn luận

Tính chất vật lý và số liệu phổ của các chất phân lập được

Chất số 1: bột vô định hình màu đỏ thẫm, nhiệt độ nóng chảy 202-204°C. Phổ UV (MeOH) λ_{max}: 224, 251, 269, 352, 458 nm. Phổ IR (KBr)

v_{max} cm⁻¹: 1152, 1280 (C=O), 1460, 1578 (C=H), 1668 (C=O), và 2935 (C-H). Phổ khối (ESI-MS): m/z = 295 [M+H]⁺; Phổ ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) và ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): xem bảng 1.

Chất số 2: bột vô định hình màu đỏ nâu, nhiệt độ nóng chảy 232-234°C. Phổ UV (MeOH) λ_{max}: 244, 323, 417 nm. Phổ IR (KBr) v_{max} cm⁻¹: 1160, 1337, 1435, 1593 (C=H), 1664 (C=O), và 2932 (C-H). Phổ khối (ESI-MS): m/z = 277 [M+H]⁺; phổ ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) và ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): xem bảng 1.

Chất số 3: bột vô định hình màu đỏ nâu, nhiệt độ nóng chảy 186-188°C. Phổ UV (MeOH) λ_{max}: 263, 356, 445 nm. Phổ khối (ESI-MS): m/z = 297 [M+H]⁺; phổ ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): xem bảng 1.

Bảng 1: Số liệu các phổ ¹H- và ¹³C-NMR của các chất 1, 2, và phổ ¹H-NMR của chất 3

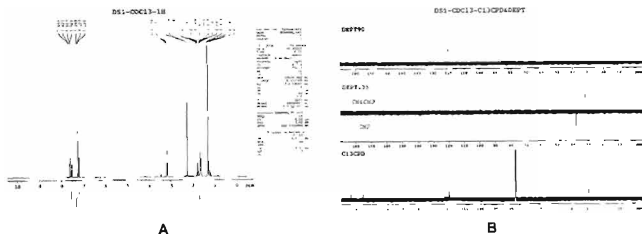
Vị trí	Chất số 1		Chất số 2		Chất số 3	
	δ _H (số H; độ bội; J = Hz)	δ _C	δ _H (số H; độ bội; J = Hz)	δ _C	δ _H (số H; độ bội; J = Hz)	
1	3,18 (2H, t, J = 6,5)	29,9	9,27 (1H, d; J = 9,0)	124,8	3,22 (2H; t; J = 6,5)	
2	1,79 (2H, m)	19,1	7,53 (1H; dd; J = 9,0 và 7,0)	130,7	1,80 (2H; m)	
3	1,66 (2H; m)	37,9	7,37 (1H; d; J = 7,0)	128,4	1,66 (2H; m)	
4	-	34,7	-	135,2	-	
5	-	150,2	-	133,7	-	
6	7,63 (1H, d, J = 8,0)	133,5	8,32 (1H; d; J = 9,0)	132,9	7,64 (1H; d; J = 8,5)	
7	7,55 (1H, d, J = 8,0)	119,9	7,83 (1H; d; J = 9,0)	118,7	7,50 (1H; d; J = 8,5)	
8	-	127,5	-	129,7	-	
9	-	126,5	-	123,2	-	
10	-	144,5	-	132,8	-	
11	-	183,7	-	183,6	-	
12	-	175,8	-	175,7	-	
13	-	121,2	-	121,8	-	
14	-	161,7	-	161,2	-	
15	-	141,3	-	142,1	3,60 (1H; m)	
16	7,22 (1H; d; J = 1,5)	120,3	7,32 (1H; d; J = 1,0)	120,5	4,89 (1H; t; J = 9,0; Ha)	
17	2,26 (d, J = 1,5)	8,8	2,31(3H; d; J = 1,0)	8,8	4,36 (1H; dd; J = 9,0 và 6,0; Hb)	
18	1,31 (s)	31,8	2,71 (3H; s)	19,8	1,31 (3H; s)	
19	1,31 (s)	31,8	-	-	1,31 (3H; s)	

Các chất được đo trong CD₃OD; Đơn vị của δ_H và δ_C là ppm; J là hằng số tương tác spin-spin giữa các proton và có đơn vị là Hz.

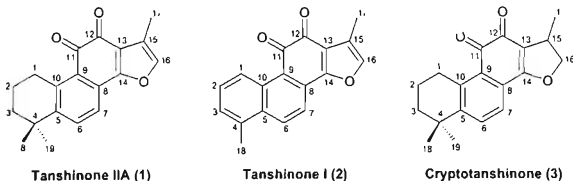
Biện luận công thức cấu tạo của các chất

Chất số 1 thu được có dạng bột màu đỏ thẫm, nhiệt độ nóng chảy 202-204°C. Phổ UV của 1 có các đỉnh hấp thụ cực đại tại 224, 251, 269, 352, 458 nm, cho thấy có liên kết đôi trong phân tử. Phổ IR của 1 có các đỉnh hấp thụ đặc trưng cho các liên kết đôi C=C (1578 cm^{-1}) và C=O (1668 cm^{-1}). Phổ khối của 1 (ESI-MS) có pic ion phân tử $m/z = 295 [M+H]^+$ tương ứng với khối lượng phân tử là 294 đơn vị carbon. Phổ $^1\text{H-NMR}$ của 1 (hình 1A) cho biết có 3 tín hiệu proton thuộc vòng thơm tại δ_{H} 7,63 (d, $J = 8,0$ Hz), 7,55 (d, $J = 8,0$ Hz), và 7,22 (d; $J = 1,5$ Hz); hai tín hiệu của ba nhóm methyl (CH_3) tại δ_{H} 2,26 (d, $J = 1,5$), 1,31 ($2 \times 3\text{H}$, s); và các proton thuộc nhóm mạch vòng tại 3,18 (t, $J = 6,5$), 1,79 (m), và 1,66 (m). Trên phổ $^{13}\text{C-NMR}$ của 1 (hình 1B) cho nhiều tín hiệu của carbon nhân thơm có δ_{C} 119,9 – 150,2 ppm,

chứng tỏ 1 có vòng thơm trong phân tử. Trên phổ $^{13}\text{C-NMR}$ còn cho biết có hai tín hiệu của carbon thuộc nhóm C=O tại δ_{C} 183,7 và 175,8 ppm, phù hợp với số liệu của phổ IR. Phổ DEPT cho thấy có hai tín hiệu methyl (CH_3), trong đó có tín hiệu tại δ_{C} 31,8 ppm tương ứng với hai nhóm methyl có δ_{H} 1,31 ($2 \times 3\text{H}$, s). Toàn bộ phổ DEPT (hình 1B) cho biết chất số 1 có mười nhóm C, ba nhóm CH, ba nhóm CH_2 và ba nhóm CH_3 , kết hợp với dữ liệu khối lượng phân tử là 294 cho thấy chất 1 có công thức là $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{O}_3$. Như vậy, các thông tin về chất số 1 ở trên là có công thức phân tử $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{O}_3$, có vòng thơm trong phân tử, có hai nhóm C=O, ba nhóm CH_3 , bột màu đỏ thẫm và có nhiệt độ nóng chảy 202-204°C, chứng tỏ chất 1 là một chất thuộc nhóm chất chính tanshinon^[4, 5]. So sánh với số liệu của các chất đã công bố trước đây^[8-10] cho biết chất số 1 là tanshinon IIA (hình 2).



Hình 1: Phổ $^1\text{H-NMR}$ (A); $^{13}\text{C-NMR}$, DEPT135 và DEPT90 (B) của chất số 1



Hình 2: Công thức hóa học của các chất 1-3

Chất số 3 thu được ở dạng bột màu đỏ nâu, có nhiệt độ nóng chảy 186-188°C. Phổ UV và $^1\text{H-NMR}$ của 3 rất giống của 1, gợi ý rằng đây là một dẫn xuất của tanshinon IIA. Điểm khác nhau

của phổ $^1\text{H-NMR}$ của 3 so với của 1 là việc có thêm các tín hiệu proton tại δ_{H} 3,60 (1H; m), 4,85 (1H; t; $J = 9,0$ Hz) và 4,36 (1H; dd; $J = 9,0$ và 6,0 Hz), trong khi không có tín hiệu của proton liên kết

đôi ở vị trí số 16. Điều này chứng tỏ liên kết đôi tại vị trí số C₁₅-C₁₆ đã được hydro, do đó chất số 3 có thể là cryptotanshinon (hình 2), phù hợp với pic ion phân tử của 3 $m/z = 297 [M+H]^+$ trên phổ khối, tương ứng với khối lượng phân tử là 296. So sánh phổ ¹H-NMR của 3 với cryptotanshinon đã trong các tài liệu đã công bố^[8-10] cho phép khẳng định chất này là cryptotanshinon.

Chất số 2 thu được ở dạng bột màu đỏ nâu, nhiệt độ nóng chảy 232-234°C, có các phổ UV và IR giống tương tự với của 1. Phổ ¹H- và ¹³C-NMR của 2 khá giống với các phổ này của 1, gợi ý rằng 2 cũng là một chất thuộc nhóm tanshinon, tuy nhiên có thêm nhiều proton [δ_H 9,27 (d; J = 9,0); 7,53 (dd; J = 9,0 và 7,0); 7,37 (d; J = 7,0)] và carbon [δ_C 124,8; 130,7; 128,4; 135,2] thuộc vòng thơm, đồng thời chỉ có hai tín hiệu của nhóm methyl CH₃. Điều này chứng tỏ 2 có vòng A là vòng thơm và có một nhóm CH₃ đính vào vị trí số 4. Do đó 2 có khả năng là tanshinon I (hình 2), một chất có khối lượng phân tử là 276, phù hợp với phổ khối (ESI-MS) có pic ion phân tử $m/z = 277 [M+H]^+$. So sánh các dữ liệu về tính chất hóa lý và phổ của 2 với các tài liệu tham khảo^[8-10] khẳng định chắc chắn 2 là tanshinon I.

Các chất 1, 2, 3 đều là thành phần hóa học chính và là những chất đặc trưng của loài *Salvia miltiorrhiza* Bunge^[3-5]. Nghiên cứu này khẳng định loài *S. miltiorrhiza* được di thực về trồng và chăm sóc tại Việt Nam cũng có những thành phần chính là các tanshinon, trong đó, tanshinon IIA là thành phần hóa học chính, phù hợp với các nghiên cứu trước đây^[3-5].

Tác dụng ức chế các tế bào ung thư của tanshinon IIA

Tanshinon IIA (1) là thành phần hóa học chính, được lựa chọn để thử độc tính trên mô hình *in-vitro* đối với hai dòng tế bào ung thư phổi PC9 và PC14 (non small lung cancer cell). Kết quả cho thấy 1 ức chế mạnh sự phát triển của tế bào PC9 với giá trị IC₅₀ là 2,7 µg/ml. Trong khi đó, 1 lại có tác dụng rất yếu đối với dòng tế bào PC14, có giá trị IC₅₀ >50 µg/ml. Điều này chứng tỏ tanshinon IIA ức chế chọn lọc đối với tế bào ung thư phổi PC9 và đây là một kết quả rất đáng chú ý cho các nghiên cứu tiếp theo.

Kết luận

Bằng kỹ thuật sắc ký, chúng tôi đã phân lập được ba chất từ rễ cây đàn sâm (*Salvia miltiorrhiza* Bunge) được di thực và trồng tại Phú Thọ, Việt Nam. Các chất được xác định là tanshinon IIA (1), tanshinon I (2), và cryptotanshinon (3) qua phân tích các tính chất lý hóa và phổ và so sánh với các dữ liệu được công bố trong các tài liệu tham khảo. Tanshinon IIA được thử độc tính trên 2 dòng tế bào ung thư phổi không phải loại nhỏ PC9 và PC14. Kết quả cho thấy có tác dụng ức chế tốt sự phát triển của tế bào PC9 (IC₅₀ 2,7 µg/ml) nhưng có tác dụng rất yếu đối với PC14 (IC₅₀ >50 µg/ml).

Tài liệu tham khảo

1. Đỗ Tất Lợi (2001), *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, NXB Y học, tr 818-820
2. Võ Văn Chi (2012), *Từ điển cây thuốc Việt Nam*, NXB Y học, tr. 869-870.
3. Viên Dược liệu (2004), *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam*, NXB Khoa học và Kỹ thuật, tr 732-738.
4. Xu Y. *et al.* (2007), "Recent advance on research and application of *Salvia miltiorrhiza*", *Asian Journal of Pharmacodynamics and Pharmacokinetics*, 7 (2), 99-130.
5. Wang B. Q. (2010), "*Salvia miltiorrhiza*: Chemical and pharmacological review of a medicinal plant", *Journal of Medicinal Plants Research*, 4 (25), 2813-2820
6. Lee J. S. *et al.* (2013), "Anticancer activity of pristimerin in epidermal growth factor receptor 2-positive SKBR3 human breast cancer cells", *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 36 (2), 316-325.
7. Wu *et al.* (1992), "Multidrug-resistant phenotype of disease-oriented panels of human tumor cell lines for anticancer drug screening", *Cancer Research*, 52, 3029-3034.
8. Onitsuka M. *et al.* (1983), "New platelet aggregation inhibitors from tan-shen; radix of *Salvia miltiorrhiza* Bunge", *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 31 (5), 1670-1675.
9. Lin Y. L. *et al.* (2003), "Acetyldanshenxinun A from *Salvia miltiorrhiza*", *Journal of Chinese Medicine*, 14 (2), 123-128.
10. Lee S. Y. *et al.* (2005), "Inhibition of osteoclast differentiation by tanshinones from the root of *Salvia miltiorrhiza* Bunge", *Archives of Pharmacol Research*, 28 (8), 909-913.