

CHEMICAL COMPOSITION AND *IN VITRO* ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY OF COMPOUNDS ISOLATED FROM *PHYLLANTHUS EMBLICA* L. FRUITS IN VIETNAM

Vu Thi Thu Le*, Tran Thi Thuy Duong

TNU - University of Agriculture and Forestry

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Received: 14/3/2025	<i>Phyllanthus emblica</i> L., belonging to the genus <i>Phyllanthus</i> of the family Euphorbiaceae, was found and distributed in some countries such as India, Malaysia, Thailand, China. In Vietnam, this species is commonly distributed in some provinces such as Cao Bang, Lang Son, Hoa Binh. In Vietnam, <i>Phyllanthus emblica</i> L. fruit is used to treat diarrhea, sore throat, inflammation, and fever. The study on <i>Phyllanthus emblica</i> L. fruit in our country is still quite limited and incomplete. In this study, from <i>Phyllanthus emblica</i> L. fruit collected in Hoa Binh, Vietnam, the research isolated and determined the structure of 5 compounds including: Quercetin (1), chlorogenic acid (2), gallic acid (3), protocatechuic acid (4) and kaempferol 3-O- β -D-glucopyranosid (5). The results of biological activity evaluation showed that all five compounds exhibited anti-inflammatory activity <i>in vitro</i> . The two compounds gallic acid (3) and protocatechuic acid (4) exhibited the strongest activity with the ability to inhibit NO production on RAW 264.7 macrophages of 79.44 ± 0.23 (%) and 77.55 ± 0.37 (%) respectively; IC ₅₀ values were 25.36 μ g/mL and 27.37 μ g/mL respectively. The results of this study show the potential of using tamarind fruit in developing products to support the treatment of inflammatory diseases to help care for community health.
Revised: 27/3/2025	
Published: 28/3/2025	
KEYWORDS	
<i>Phyllanthus emblica</i> L.	
Chemical compositions	
<i>In vitro</i> anti-inflammatory activity	
<i>Phyllanthus</i>	
Isolated	

THÀNH PHẦN HOÁ HỌC VÀ HOẠT TÍNH KHÁNG VIÊM *IN VITRO* CỦA CÁC HỢP CHẤT PHÂN LẬP TỪ QUẢ ME RỪNG (*PHYLLANTHUS EMBLICA* L.) Ở VIỆT NAM

Vũ Thị Thu Lê*, Trần Thị Thùy Dương

Trường Đại học Nông Lâm – ĐH Thái Nguyên

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
Ngày nhận bài: 14/3/2025	Me rừng (<i>Phyllanthus emblica</i> L.) thuộc chi <i>Phyllanthus</i> của họ Euphorbiaceae được phát hiện phân bố tại một số quốc gia như Ấn Độ, Malaysia, Thái Lan, Trung Quốc. Ở Việt Nam me rừng phân bố phổ biến tại một số tỉnh như Cao Bằng, Lạng Sơn, Hoà Bình. Ở nước ta, quả me rừng được dùng điều trị tiêu chảy, đau họng, viêm, hạ sốt. Các nghiên cứu về quả me rừng ở nước ta còn khá ít và chưa đầy đủ. Trong nghiên cứu này, từ quả me rừng thu hái tại Hoà Bình, Việt Nam đã phân lập và xác định cấu trúc 5 hợp chất bao gồm: Quercetin (1), acid chlorogenic (2), acid gallic (3), acid protocatechuic (4) và kaempferol 3-O- β -D-glucopyranosid (5). Hợp chất Acid protocatechuic (4) lần đầu tiên được phân lập từ quả me rừng. Kết quả đánh giá hoạt tính sinh học cho thấy cả 5 hợp chất này đều thể hiện hoạt tính kháng viêm <i>in vitro</i> . Hai hợp chất acid gallic (3), acid protocatechuic (4) thể hiện hoạt tính mạnh nhất với khả năng ức chế sản sinh NO trên đại thực bào RAW 264.7 lần lượt là $79,44 \pm 0,23$ (%) và $77,55 \pm 0,37$ (%); giá trị IC ₅₀ lần lượt là 25,36 μ g/mL và 27,37 μ g/mL. Kết quả nghiên cứu này cho thấy tiềm năng sử dụng quả me rừng trong việc phát triển sản phẩm hỗ trợ điều trị các bệnh lý viêm nhiễm giúp chăm sóc sức khỏe cộng đồng.
Ngày hoàn thiện: 27/3/2025	
Ngày đăng: 28/3/2025	
TỪ KHÓA	
Me rừng	
Thành phần hoá học	
Hoạt tính kháng viêm <i>in vitro</i>	
<i>Phyllanthus</i>	
Phân lập	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.12307>

* Corresponding author. Email: vuthithule@tuaf.edu.vn

1. Giới thiệu

Cây me rừng (*Phyllanthus emblica* L.) thuộc chi *Phyllanthus* của họ Euphorbiaceae; đã được nghiên cứu nhiều trên thế giới về cả thành phần hóa học và hoạt tính sinh học [1]. Quả me rừng là một loại thảo dược quan trọng được sử dụng trong y học truyền thống ở Ấn Độ, Malaysia, Thái Lan, Trung Quốc và Việt Nam. Quả me rừng đã được sử dụng trong y học Ayurveda (Ấn Độ) như một loại thuốc tiềm năng để điều trị các rối loạn về gan [2]. Ở nước ta, quả me rừng được dùng điều trị tiêu chảy, đau họng, viêm, hạ sốt, bí tiểu và táo bón [1]. Các nghiên cứu gần đây về quả me rừng cũng cho thấy chiết xuất ethanol của nó có hoạt tính bảo vệ gan [3], [4] và có hiệu quả trong việc giảm tác dụng độc hại của các tác nhân gây độc cho gan như ethanol, paracetamol, carbon tetrachloride, kim loại nặng... [5].

Thành phần hóa học của quả me rừng chủ yếu là hợp chất polyphenol (flavonoid, tanin) và acid hữu cơ [1], [6]. Trong số đó phải kể đến một số hợp chất có tác dụng dược lý đáng chú ý như phyllaemblicin B, phyllaemblicin C, emblicanin A, emblicanin B và acid gallic [7]. Năm 2013, nhóm tác giả thuộc Đại học Baghdad đã công bố tác dụng kháng khuẩn chống lại tụ cầu vàng *Staphylococcus aureus*, trực khuẩn mủ xanh *Pseudomonas aeruginosa*, trực khuẩn gây bệnh đường hô hấp *Klebsiella* của acid gallic, acid ellagic, quercetin, acid chebulinic và acid chebulagic [8]. Tác giả Nguyễn Mạnh Cường và cộng sự năm 2022 cũng đã xác định được 9 hợp chất trong quả me rừng gồm mucic acid 3-O-gallate, mucic acid 2-O-gallate, mucic acid 1,4-lactone 3-O-gallate, glucogallin, mucic acid 1,4-lactone 2-O-gallate, gallic acid, mucic acid dimethyl ester 3-O-gallate, mucic acid 1,4-lactone 1-ethyl ester 2-Ogallate và quercetin [9].

Ở Việt Nam, me rừng phân bố tương đối phổ biến ở các tỉnh vùng núi thấp và trung du như Cao Bằng, Lạng Sơn, Hoà Bình, Quảng Ninh, Thanh Hóa [1]. Tuy nhiên cho đến nay số lượng nghiên cứu về thành phần hóa học quả me rừng còn khá hạn chế và chưa đầy đủ. Hiện nay ở nước ta chưa có nghiên cứu thăm dò về tác dụng kháng viêm của quả me rừng và các thành phần hoá học phân lập từ quả me rừng. Do đó, nghiên cứu này nhằm mục đích bổ sung cơ sở dữ liệu về thành phần hoá học quả me rừng ở Việt Nam cũng như thăm dò, đánh giá hoạt tính kháng viêm *in vitro* quả me rừng. Kết quả nghiên cứu giúp làm rõ hơn giá trị sử dụng trong y học cổ truyền cũng như cho thấy tiềm năng khai thác quả me rừng để tạo ra các sản phẩm giúp phòng và điều trị các bệnh viêm nhiễm phục vụ chăm sóc sức khỏe cộng đồng.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Mẫu Quả me rừng (*Phyllanthus emblica* L.) được thu hái tại Mai Châu, Hoà Bình vào tháng 9/2024. Mẫu được xác định tên khoa học bởi TS. Phạm Quốc Bình, Bảo tàng Thiên nhiên Việt Nam -Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam giám định tên khoa học là (*Phyllanthus emblica* L.) Mẫu tiêu bản được lưu trữ tại Bảo tàng Thiên nhiên Việt Nam. Mẫu quả Me rừng sau khi thu hái được làm sạch, sấy khô đến hàm ẩm nhỏ hơn 12% ở nhiệt độ 60 oC, xay thành bột và bảo quản trong các túi hút chân không ở nhiệt độ 18-20 °C.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp phân lập hợp chất

- Phương pháp sắc ký lớp mỏng (TLC): Khảo sát định tính thành phần hoá học, sử dụng bản mỏng tráng sẵn DC-Alufoilen 60 F254 dày 0,25 mm; Merck và RP-18 F254S dày 0,25 mm; Merck). Phát hiện hợp chất bằng đèn tử ngoại ở hai bước sóng 254 nm và 365 nm hoặc hiện màu bằng thuốc thử H₂SO₄ 5% trong methanol và hơi nóng bằng máy sấy.

- Phương pháp sắc ký cột (CC): Sử dụng cột sắc ký pha thường với silica gel cỡ hạt 230 – 400 mesh (Merck – Đức) và sắc ký cột pha đảo RP-18 cỡ hạt 30 - 50 µm (YMC – Nhật Bản). Dung

môi rửa giải sử dụng dung môi công nghiệp đã được chưng cất lại như *n*-hexane, ethyl acetate, dichloromethan, methanol, nước.

2.2.2. Phương pháp xác định cấu trúc hoá học

- Phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR): Sử dụng phổ cộng hưởng hạt nhân 1 chiều (^1H -NMR, ^{13}C -NMR, DEPT) và phổ cộng hưởng từ hạt nhân 2 chiều (HMBC, HSQC).
- Đo phổ NMR trên máy Bruker avance 500 MHz (Chất chuẩn nội là TMS), tại Viện Hoá học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

2.2.3. Đánh giá hoạt tính kháng viêm in vitro thông qua ức chế sản sinh NO

Phương pháp đánh giá hoạt tính kháng viêm thông qua sự ức chế sinh ra NO được kích thích bởi LPS trên đại thực bào RAW 264.7 theo phương pháp MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) [10].

Tế bào RAW264.7 được nuôi cấy 48 giờ trong môi trường nuôi cấy DMEM (*Dulbeccos Modified Eagles Medium*) ở 37 °C, 5% CO₂, 10% FBS. Sau đó dịch tế bào được chuyển lên giếng phiên 96 với mật độ 2,5 x 10⁵ tế bào/giếng. Tế bào được kích thích với 2 µL LPS (0,1 mg/mL) trong 24 giờ và bổ sung thuốc/chất thử các nồng độ khác nhau. Cardamonin được sử dụng làm đối chứng (+). Dịch huyền phù của tế bào được ủ với thuốc thử Griess, NaNO₂ ở các nồng độ khác nhau để xây dựng đường chuẩn. Đo hỗn hợp phản ứng ở $\lambda = 570 \text{ nm}$.

Tỷ lệ ức chế sản sinh NO (%) được xác định theo công thức:

$$\%UC = ([\text{XTB}]_{\text{mẫu}} - [\text{XTB}]_{\text{LPS}}) / ([\text{XTB}]_{\text{ĐC}} - [\text{XTB}]_{\text{LPS}}) \times 100 \quad (1)$$

Trong đó: [XTB] là nồng độ NO trung bình tính dựa trên đường chuẩn NaNO₂.

Phần tế bào còn lại sau khi đã sử dụng để đánh giá các hoạt tính in vitro được bổ sung dung dịch MTT (0,5 mg/mL trong PBS), ủ 4 giờ trong tủ ấm 5% CO₂ ở 37°C. Sản phẩm chuyển hóa dạng tinh thể formazan được hòa tan trong dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich) và đo mật độ quang ở $\lambda = 540 \text{ nm}$ trên thiết bị Infinite F50 (Tecan, Männedorf, Thụy Sĩ).

Tỷ lệ sống sót của tế bào CS% (Cell survival) tính theo % so với đối chứng:

$$\text{Tỷ lệ ức chế tế bào (\%)} = [(OD[\text{mẫu}]/OD[\text{đối chứng (-)}]) \times 100] \pm \sigma \quad (1)$$

2.3. Chiết xuất, phân lập các hợp chất từ quả me rừng

Bột khô được liệu quả me rừng (3 kg) được chiết nóng với ethanol 96% ở nhiệt độ 60°C (3 lần, mỗi lần 3 giờ). Các dịch chiết được gộp lại và cất loại ethanol dưới áp suất giảm thu được cặn chiết tổng (1054 g). Cặn chiết này được phân bố lại lần lượt trong các dung môi có độ phân cực tăng dần: *n*-hexane, ethyl acetate, *n*-butanol và nước. Cất thu hồi dung môi dưới áp suất giảm thu được các phần cao chiết tương ứng: cao *n*-hexan (MRH: 13,50 g), cao ethyl acetate (MRE: 548,5 g), cao *n*-butanol (MRB: 108,2 g) và cao nước (MRW: 382,9 g), các cao chiết thu được, được lưu mẫu, dùng thử hoạt tính sinh học cho các nghiên cứu thành phần hóa học tiếp theo.

Cao chiết ethyl acetate MRE (400,5 g) được phân tách bằng sắc ký cột trên *silica gel* (63-200 µm). Rửa giải với hệ dung môi gradient dichloromethan - methanol (99:1, 50:1, 30:1, 10:1, 5:1, 2:1, 1:1, v/v), cất loại dung môi thu được 7 phân đoạn MRE1 → MRE7. Phân đoạn MRE2 (22,15 g) được tinh chế trên *silica gel* cỡ hạt 40-63 µm, rửa giải bằng hệ dung môi gradient dichloromethan - methanol (9:1, 8:1, 4:1, 2:1, 1:1, v/v) thu được 5 phân đoạn từ MRE2.1 → MRE2.5. Phân đoạn MRE2.3 tiếp tục được tinh chế với cột *silica gel* cỡ hạt 40-63 µm với hệ dung môi rửa giải dichloromethan-aceton (5:1, v/v) thu được chất **1** (23 mg).

Phân đoạn MRE3 (18,26 g) tiếp tục được tinh chế với cột *silica gel* cỡ hạt 40-63 µm và rửa giải với hệ dung môi dichloromethan-methanol (7:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, v/v) thu được 7 phân đoạn từ MRE3.1 → MRE3.7. Phân đoạn MRE3.2 tiếp tục được tinh chế với cột *silica gel* pha đảo RP-18 với hệ dung môi rửa giải MeOH - H₂O (2:1, v/v) thu được chất **5** (17 mg).

Cao chiết nước MRW (380,00 g) được hòa trong 1000 mL nước, tiến hành siêu âm rồi lọc lấy dịch lọc. Dịch lọc thu được tiếp tục được đưa qua cột Dianion HP-20, sau đó rửa giải lần lượt với

các dung môi nước, ethanol 25%, ethanol 50%, ethanol 75% và ethanol 96% (v/v). Thu hồi dung môi dưới áp suất giảm thu được 5 phân đoạn MRW1, MRW2, MRW3, MRW4 và MRW5.

Phân đoạn MRW2 (35,2 g) được tiếp tục tiến hành sắc ký cột với *silica gel* và rửa giải với hỗn hợp dung môi dicloromethan - methanol - nước tỉ lệ 4:1:0,1 (v/v/v) thu được 3 phân đoạn MRW2.1 → MRW2.3. Phân đoạn MRW2.1 (10,22 g) tiếp tục được sắc ký cột pha đảo RP-18 với hệ dung môi methanol - nước tỉ lệ 1:1,5 (v/v) thu được hợp chất 2 (16 mg). Phân đoạn MRW2.3 (9,25 g) tiếp tục được sắc ký cột pha đảo RP-18 với hệ dung môi methanol - nước tỉ lệ 1:1 (v/v) thu được hợp chất 3 (24 mg).

Phân đoạn MRW3 (6,85 g) được tiếp tục tiến hành sắc ký cột pha đảo RP-18, rửa giải bằng hệ dung môi methanol : nước tỉ lệ 1:1 thu được 3 phân đoạn MRW3.1 → MRW3.3. Phân đoạn MRW3.1 (3,31 g) tiếp tục sắc ký cột pha đảo với hệ dung môi methanol - nước tỉ lệ 2:1 (v/v) thu được hợp chất 4 (19 mg).

Hợp chất 1 (Quercetin) [11]:

+ $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, aceton- d_6), δ_{H} (ppm): 6,26 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-6), 6,51 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-8), 7,82 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-2'), 6,99 (1H, d, $J = 8,5$ Hz, H-5'), 6,26 (1H, dd, $J = 8,5; 2,0$ Hz, H-6').

+ $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, aceton- d_6), δ_{C} (ppm): 146,9 (C-2), 136,7 (C-3), 176,5 (C-4), 162,3 (C-5), 99,1 (C-6), 164,9 (C-7), 94,4 (C-8), 157,7 (C-9), 104,1 (C-10), 123,7 (C-1'), 115,7 (C-2'), 145,8 (C-3'), 148,3 (C-4'), 116,2 (C-5'), 121,4 (C-6').

Hợp chất 2 (Acid chlorogenic) [12]:

+ $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, aceton- d_6), δ_{H} (ppm): 2,25 (1H, brd, H-2b), 2,02 (1H, brd, H-2a), 5,38 (1H, m, H-3), 3,78 (1H, dd, $J = 3,0; 9,0$ Hz, H-4), 4,23 (1H, quartet, H-5), 2,15 (1H, brd, H-6b), 2,05 (1H, brd, H-6a), 7,15 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-2'), 7,03 (1H, dd, $J = 2,0; 8,0$ Hz, H-5'), 6,87 (1H, d, $J = 8,5$ Hz, H-6'), 7,53 (1H, d, $J = 16,0$ Hz, H-7'), 6,25 (1H, d, $J = 16,0$ Hz, H-8').

+ $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, aceton- d_6), δ_{C} (ppm): 76,2 (C-1), 39,1 (C-2), 71,3 (C-3), 73,5 (C-4), 71,6 (C-5), 37,9 (C-6), 175,1 (C-7), 127,6 (C-1'), 115,2 (C-2'), 145,8 (C-3'), 148,7 (C-4'), 116,4 (C-5'), 122,5 (C-6'), 146,3 (C-7'), 115,9 (C-8'), 167,1 (C-9').

Hợp chất 3 (Acid gallic) [13]:

+ $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, CD_3OD), δ_{H} (ppm): 7,08 (2H, s, H-2 & H-6).

+ $^{13}\text{C-NMR}$ (125MHz, CD_3OD), δ_{C} (ppm): 121,9 (C-1), 110,3 (C-2 & C-6), 146,4 (C-3 & C-5), 139,6 (C-4), 170,4 (C-7).

Hợp chất 4 (Acid protocatechuic) [14]:

+ $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD), δ (ppm): 7,53 (1H, d, $J=2,0$ Hz, H-2), 6,82 (1H, d, $J= 8,0$ Hz, H-5), 7,47 (1H, d, $J= 8,0$ Hz, H-6).

+ $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CD_3OD), δ (ppm): 122,0 (C-1), 114,5 (C-2), 144,4 (C-3), 149,8 (C-4), 116,6 (C-5), 122,8 (C-6), 175,7 (C-7).

Hợp chất 5 (Kaempferol 3-O- β -D-glucopyranosid) [15]:

+ $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD), δ_{H} (ppm): 6,15 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-6), 6,34 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-8), 7,99 (2H, d, $J = 9,0$ Hz, H-2', H-6'), 6,84 (2H, d, $J = 9,0$ Hz, H-3' & H-5'); *glc*: 5,19 (1H, d, $J = 7,5$ Hz, H-1"), 3,40 (1H, dd, $J = 7,5; 9,0$ Hz, H-2"), 3,37 (1H, t, $J = 9,0$ Hz, H-3"), 3,29 (1H, m, H-4"), 3,16 (1H, m, H-5"), 3,65 (1H, dd, $J = 2,5; 12,5$ Hz, H-6"a), 3,49 (1H, dd, $J = 5,5; 12,5$ Hz, H-6"b).

+ $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CD_3OD), δ_{C} (ppm): 158,5 (C-2), 135,5 (C-3), 179,5 (C-4), 163,0 (C-5), 99,9 (C-6), 165,9 (C-7), 94,8 (C-8), 159,1 (C-9), 105,7 (C-10), 122,1 (C-1'), 132,3 (C-2', C-6'), 116,1 (C-3', C-5'), 161,5 (C-4'); *glc*: 104,2 (C-1"), 75,7 (C-2"), 78,0 (C-3"), 71,4 (C-4"), 78,4 (C-5"), 62,6 (C-6").

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Xác định cấu trúc các hợp chất phân lập được

3.1.1. Hợp chất 1 (Quercetin)

Hợp chất 1 thu được ở dạng tinh thể hình kim màu vàng. Phân tích phổ $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ và DEPT của chất 1 cho các tín hiệu đặc trưng của một flavonol. Phổ $^1\text{H-NMR}$ xuất hiện tín hiệu của 5 proton vòng thơm trong đó 3 tín hiệu tương tác ABX ở δ_{H} 7,82 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-2'), 7,69 (1H, dd, $J = 2,0$; 8,5 Hz, H-6'), 6,99 (1H, d, $J = 8,5$ Hz, H-5') thuộc về vòng thơm B, hai tín hiệu proton tương tác meta ở δ_{H} 6,51 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-8) và 6,26 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-6) thuộc về vòng thơm A.

Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ và DEPT chỉ ra chất 1 gồm 15C với 5 nhóm CH đặc trưng cho các CH nhân thơm ở δ_{C} 99,1 (C-6), 94,4 (C-8), 115,7 (C-2'), 116,2 (C-5') và 121,4 (C-6'), 10 carbon không liên kết với hydro trong đó tín hiệu δ_{C} 176,5 đặc trưng cho nhóm carbonyl, bốn tín hiệu có độ chuyển dịch δ_{C} 145,8, 148,3, 162,3, 164,9 đặc trưng cho dạng liên kết của nhân thơm với nhóm OH của các carbon C-3', C-4', C-5, C-7. Ngoài ra, tín hiệu của carbon ở δ_{C} 136,7 (C-3) đặc trưng cho carbon của nối đôi liên kết với một nhóm hydroxyl.

Dựa vào dữ kiện phổ và so sánh với tài liệu đã được công bố, hợp chất 1 được xác định là 3,3',4',5,7-pentahydroxyflavon hay quercetin [11].

3.1.2. Hợp chất 2 (Acid chlorogenic)

Hợp chất 2 thu được dưới dạng bột vô định hình, màu trắng. Phổ $^1\text{H-NMR}$ của 2 cho các tín hiệu proton của một vòng benzen thế 1,3,4 ở δ_{H} 7,15 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-2'), 7,03 (1H, dd, $J = 2,0$; 8,0 Hz, H-5'), 6,87 (1H, d, $J = 8,5$ Hz, H-6'). Cặp tín hiệu proton δ_{H} 7,53 (1H, d, H-7'), 6,25 (1H, d, H-8') với hằng số ghép cặp $J = 16,0$ Hz chứng tỏ sự có mặt của một liên kết đôi với cấu hình *trans*. Ngoài ra trên phổ $^1\text{H-NMR}$ còn xuất hiện tín hiệu của ba proton liên kết với carbon cạnh dị tố (CH-O) ở δ_{H} 5,38 (1H, m, H-3), 3,78 (1H, dd, $J = 3,0$; 9,0 Hz, H-4), 4,23 (1H, quartet, H-5) và tín hiệu của một cặp proton methylen ở δ_{H} 2,25 (1H, brd, H-2b), 2,02 (1H, brd, H-2a).

Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ của 2 xuất hiện tín hiệu của 16 nguyên tử carbon bao gồm hai nguyên tử carbon carbonyl với δ_{C} 175,1 (C-7), 167,1 (C-9'); hai carbon olefin và sáu carbon thơm δ_{C} 127,6 (C-1'), 115,2 (C-2'), 145,8 (C-3'), 148,7 (C-4'), 116,4 (C-5'), 122,5 (C-6'), 146,3 (C-7'), 115,9 (C-8'), bốn carbon CH-O- ở 76,2 (C-1), 71,3 (C-3), 73,5 (C-4), 71,6 (C-5) và hai carbon methylen 37,9 (C-6), 39,1 (C-2).

Từ các dữ kiện phổ trên gợi ý cấu trúc của 2 là một dẫn xuất của acid caffeic, kết hợp tham khảo tài liệu, hợp chất 2 được khẳng định là acid chlorogenic [12].

3.1.3. Hợp chất 3 (Acid gallic)

Hợp chất 3 thu được ở dạng tinh thể hình kim màu trắng. Phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất 3 cho tín hiệu singlet ở δ_{H} 7,08 (2H, s, H-2 & H-6) là cặp proton ở vị trí para của vòng thơm. Điều này cũng gợi ý hợp chất 3 có chứa 1 vòng thơm bị thế ở 4 vị trí đối xứng nhau đôi qua 1 trục đối xứng.

Trên phổ $^{13}\text{C-NMR}$ xuất hiện 5 tín hiệu carbon, trong đó tín hiệu ở δ_{C} 170,4 (C-7) đặc trưng cho carbon carbonyl. Tín hiệu cộng hưởng có cường độ cao hơn của 2 nhóm methine (-CH) và của 2 cặp carbon không liên kết với hydro đối xứng nhau đôi một có độ chuyển dịch hóa học lần lượt tại δ_{C} 146,4 (C-3, C-5) và 110,3 (C-2, C-6). Điều này một lần nữa khẳng định cấu trúc hóa học của hợp chất 3 gồm 4 nguyên tử carbon đối xứng nhau đôi một và có 1 nhóm carboxyl trong phân tử.

Trên cơ sở những phân tích trên cũng như so sánh với tài liệu tham khảo đã công bố [13] cho phép kết luận chất 3 phân lập được là acid gallic.

3.1.4. Hợp chất 4 (Acid protocatechuic)

Hợp chất 4 phân lập được dưới dạng chất rắn màu nâu. Trên phổ $^1\text{H-NMR}$ xuất hiện 3 tín hiệu singlet của vòng thơm tại độ chuyển dịch hóa học lần lượt là δ_{H} (ppm) 7,53 (1H, d, $J=2,0$ Hz), 7,47 (1H, d, $J= 8,0$ Hz) và 6,82 (1H, d, $J= 8,0$ Hz), điều này gợi ý hợp chất 4 là 1 phenolic đơn giản cấu trúc hóa học có chứa 1 vòng thơm bị thế ở 3 vị trí trên vòng thơm. Ba nhóm methine (-

CH) còn lại trong đó có 2 carbon ở vị trí ortho của nhau (thông qua tương tác 2 proton có hằng số tương tác $J = 8,0$ Hz) và nguyên tử carbon còn lại ở vị trí meta và para so với 2 carbon nêu trên.

Trên phổ ^{13}C -NMR của hợp chất **4** xuất hiện 7 tín hiệu cộng hưởng của 7 nguyên tử thuộc vòng thơm gồm 3 nhóm methine (-CH) của vòng thơm có độ chuyển dịch hóa học lần lượt là δ_{C} 114,5 (C-2); 116,6 (C-5); 122,8 (C-6) và 4 carbon không liên kết với hydro, trong đó 1 tín hiệu cộng hưởng của nguyên tử carbon không liên kết hydro thuộc nhóm carboxyl có độ chuyển dịch hóa học tại δ_{C} 175,7 (C-7). Ba tín hiệu cộng hưởng carbon không liên kết hydro còn lại có độ chuyển dịch hóa học lần lượt tại δ_{C} 122,0 (C-1); 144,4 (C-3) và 149,8 (C-4). Tại 2 vị trí C-3 và C-4 có độ chuyển dịch hóa học di chuyển về phía trường cao hơn chứng tỏ carbon tại 2 vị trí này liên kết trực tiếp với nguyên tử oxy, gợi ý 2 nhóm thế ở đây là 2 nhóm hydroxyl (-OH).

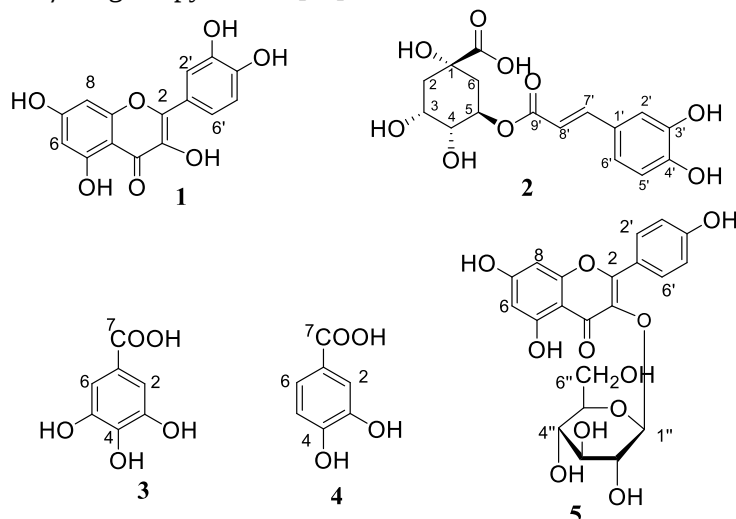
Từ dữ liệu phổ, kết hợp so sánh với tài liệu tham khảo cho phép kết luận hợp chất **4** là acid protocatechuic [14].

3.1.5. Hợp chất 5 (Kaempferol 3-O- β -D-glucopyranosid)

Hợp chất **5** thu được dưới dạng chất rắn màu vàng. Phổ ^1H -NMR của **5** cho các tín hiệu đặc trưng của dẫn xuất glycosid của kaempferol đặc trưng bởi cặp tín hiệu doublet δ_{H} 6,15 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-6), 6,34 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-8) thuộc vòng A và tín hiệu doublet của hai proton tại δ_{H} 7,99 (2H, d, $J = 9,0$ Hz, H-2' & H-6') và 6,84 (2H, d, $J = 9,0$ Hz, H-3' & H-5') thuộc vòng B. Các tín hiệu proton vùng đường nằm ở δ_{H} 3,16-5,19 với proton anome tại δ_{H} 5,19 (1H, d, H-1''), hằng số $J = 7,5$ Hz điển hình cho liên kết O- β -glycosid, hai proton oxymethylen δ_{H} 3,65 (1H, dd, $J = 2,5; 12,5$ Hz, H-6''a) và 3,49 (1H, dd, $J = 5,5; 12,5$ Hz, H-6''b) với những giá trị hằng số tương tác khá đặc trưng; bốn proton còn lại δ_{H} 3,41 - 3,48 (2H, H-2'' & H-3''), 3,31 (1H, H-4''), 3,16 (1H, m, H-5'') phù hợp với gốc đường glucose.

Phổ ^{13}C -NMR của **5** xuất hiện tín hiệu của 21 nguyên tử carbon, trong đó ngoài 6 tín hiệu của đường glucose tại δ_{C} 104,1 (C-1''), 75,7 (C-2''), 78,0 (C-3''), 71,4 (C-4''), 78,4 (C-5''), 62,7 (C-6''), 15 tín hiệu còn lại của 15 nguyên tử carbon δ_{C} 158,5 (C-2), 135,5 (C-3), 179,5 (C-4), 163,0 (C-5), 99,9 (C-6), 165,9 (C-7), 94,8 (C-8), 159,1 (C-9), 105,7 (C-10), 122,1 (C-1'), 132,3 (C-2', C-6'), 116,1 (C-3', C-5'), 161,5 (C-4') thuộc về khung kaempferol. Cặp các giá trị δ_{C} 158,5 (C-2), 135,5 (C-3), 179,5 (C-4) cho thấy phân tử đường nối với C-3 của aglycon.

Từ việc phân tích các dữ kiện phổ và so sánh với tài liệu tham khảo có thể khẳng định hợp chất **5** là Kaempferol 3-O- β -D-glucopyranosid [15].



Hình 1. Cấu trúc hoá học của hợp chất 1 – 5

3.2. Đánh giá tác dụng kháng viêm in vitro thông qua ức chế sản sinh NO

Đánh giá hoạt tính kháng viêm *in vitro* của các thành phần hoá học phân lập được từ quả me rừng được xác định thông qua sự ức chế sản sinh NO kích thích bởi LPS trên đại thực bào RAW 264.7. Kết quả thử hoạt tính kháng viêm của các căn chiết được trình bày tại Bảng 1.

Kết quả cho thấy, cả 5 hợp chất phân lập được đều thể hiện hoạt tính ức chế đại thực bào RAW 264.7 sản sinh NO ở các nồng độ khảo sát lần lượt tại 64 µg/mL và 256 µg/mL, đồng thời không gây độc tế bào đến nồng độ 256 µg/mL. Phép thử sử dụng đối chứng (+) là cardamonin 0,3 µM và 3,0 µM và đối chứng (-) là DMSO 1%. Trong 5 hợp chất thử nghiệm, hợp chất 3 và 4 thể hiện hoạt tính mạnh nhất với tỷ lệ ức chế sản sinh NO đạt lần lượt $79,44 \pm 0,23$ (%), $77,55 \pm 0,37$ (%) ở nồng độ 256 µg/mL và $68,56 \pm 0,31$ (%), $66,23 \pm 0,21$ (%) ở nồng độ 64 µg/mL, cùng với đó giá trị IC_{50} lần lượt là 25,36 µg/mL và 27,37 µg/mL; Hợp chất 5 thể hiện hoạt tính yếu nhất trong 5 hợp chất khi tỷ lệ ức chế sản sinh NO đạt $68,69 \pm 0,32$ (%) ở nồng độ 256 µg/mL và $54,16 \pm 0,27$ (%) ở nồng độ 64 µg/mL, giá trị IC_{50} đạt 41,29 µg/mL. Kết quả này gợi ý các hợp chất phenolic phân lập từ quả me rừng có tiềm năng ứng dụng để tạo sản phẩm có tác dụng chống viêm.

Bảng 1. Kết quả thử khả năng ức chế sự sản sinh NO trên tế bào RAW 264.7

Tên mẫu	Nồng độ mẫu thử	Tỷ lệ ức chế sản sinh NO (%)	Tỷ lệ tế bào sống sót (%)	IC_{50} , µg/mL
Đối chứng (-) [DMSO]	1%	$100,00 \pm 1,3$	$104,34 \pm 0,15$	
Đối chứng (+) [Cardamonin]	0,3 µM	$44,94 \pm 0,91$	$87,64 \pm 0,78$	0,68
	3,0 µM	$86,25 \pm 0,35$	$74,26 \pm 0,57$	
LPS	0,1 µg/mL	$0,00 \pm 0,5$	$100,00 \pm 0,13$	
Hợp chất 1	256 µg/mL	$73,51 \pm 0,16$	$79,63 \pm 0,19$	37,15
	64 µg/mL	$61,17 \pm 0,19$	$86,90 \pm 0,58$	
Hợp chất 2	256 µg/mL	$74,51 \pm 0,17$	$78,33 \pm 0,18$	31,24
	64 µg/mL	$63,28 \pm 0,15$	$88,98 \pm 0,36$	
Hợp chất 3	256 µg/mL	$79,44 \pm 0,23$	$80,34 \pm 0,46$	25,36
	64 µg/mL	$68,56 \pm 0,31$	$85,45 \pm 0,29$	
Hợp chất 4	256 µg/mL	$77,55 \pm 0,37$	$88,43 \pm 0,31$	27,37
	64 µg/mL	$66,23 \pm 0,21$	$93,26 \pm 0,24$	
Hợp chất 5	256 µg/mL	$68,69 \pm 0,32$	$86,78 \pm 0,45$	41,29
	64 µg/mL	$54,16 \pm 0,27$	$91,18 \pm 0,56$	

4. Kết luận

Từ cao chiết phân đoạn etyl acetat và cao chiết nước quả me rừng đã phân lập và xác định cấu trúc hoá học 5 hợp chất gồm: Quercetin (1), acid chlorogenic (2), acid gallic (3), acid protocatechuic (4) và kaempferol 3-O-β-D-glucopyranosid (5). Trong đó hợp chất Acid protocatechuic (4) lần đầu tiên được phân lập từ quả me rừng. Cấu trúc hóa học của các hợp chất được xác định bằng phổ cộng hưởng từ hạt nhân kết hợp so sánh với dữ liệu phổ của các hợp chất đã công bố. Kết quả đánh giá hoạt tính sinh học cho thấy cả 5 hợp chất phân lập được đều thể hiện hoạt tính kháng viêm *in vitro*. Hai hợp chất acid gallic (3), acid protocatechuic (4) thể hiện hoạt tính mạnh nhất với khả năng ức chế sản sinh NO trên đại thực bào RAW 264.7 lần lượt là $79,44 \pm 0,23$ (%) và $77,55 \pm 0,37$ (%) đồng thời không gây độc cho tế bào đến nồng độ 256 µg/mL. Giá trị IC_{50} của hợp chất acid gallic (3), acid protocatechuic (4) lần lượt là 25,36 µg/mL và 27,37 µg/mL. Đối chứng dương là Cardamonin có Giá trị IC_{50} là 0,68 µg/mL. Kết quả nghiên cứu này cho thấy tiềm năng sử dụng quả me rừng trong việc phát triển sản phẩm hỗ trợ điều trị bệnh viêm nhiễm giúp chăm sóc sức khoẻ con người.

Lời cảm ơn

Công trình được thực hiện nhờ sự hỗ trợ kinh phí của nhiệm vụ đề tài khoa học cấp Bộ, mã số: B2025-TNA-10.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] T. L. Do, *Vietnamese medicinal plants and herbs*. Medical Publishing House, 2012, pp. 695-696.
- [2] B. P. Gaire and L. Subedi, "Phytochemistry, pharmacology and medicinal properties of *Phyllanthus emblica* Linn.," *Chinese journal of integrative medicine*, pp. 1-8, 2014, doi: 10.1007/s11655-014-1984-2.
- [3] R. Chaphalkar, K. G. Apte, Y. Talekar, and S. K. Ojha, "Antioxidants of *Phyllanthus emblica* L. bark extract provide hepatoprotection against ethanol-induced hepatic damage: a comparison with silymarin," *Oxidative medicine and cellular longevity*, vol. 2017, no. 1, 2017, Art. no. 3876040.
- [4] N. T. Duong, N. T. Uyen, P. D. Vinh, N. T. Son, L. V. Ha, and P. T. Thuy, "Hepatoprotective Effect of Standardized Dry Extract from *Phyllanthus emblica* L. Fruits on Hepatotoxicity Model Induced by Carbon-Tetrachloride in Mice," *J. Med. Materials*, vol. 24, no. 2, pp. 108-112, 2019.
- [5] K. R. Thilakchand, R. T. Mathai, R. T. Ravi, and M. P. Baliga-Rao, "Hepatoprotective properties of the Indian gooseberry (*Emblica officinalis* Gaertn): a review," *Food & function*, vol. 4, no. 10, pp. 1431-1441, 2013.
- [6] S. S. Yadav, M. K. Singh, P. K. Singh, and V. Kumar, "Traditional knowledge to clinical trials: A review on therapeutic actions of *Emblica officinalis*," *Biomedicine & Pharmacotherapy*, vol. 93, pp. 1292-1302, 2017.
- [7] Y. J. Zhang, T. Abe, T. Tanaka, C. R. Yang, and I. Kouno, "Two new acylated flavanone glycosides from the leaves and branches of *Phyllanthus emblica*," *Chemical and pharmaceutical bulletin*, vol. 50, no. 6, pp. 841-843, 2002.
- [8] N. Abdulhamza, "Study of phytochemical composition and antibacterial activity of *Emblica officinalis* (Amla) fruit extract" *AJVS*, vol. 6, pp. 107-113, 2013.
- [9] N. M. Cuong, P. N. Khanh, T. T. Huong, V. T. Ha, N. T. Cuc, and T. D. Cuong, "Antioxidant, lipid peroxidation inhibitory activities, and hepatoprotective effect of extracts of *Phyllanthus emblica* L. fruits," *Vietnam Journal of Science and Technology*, vol. 60, no. 3, pp. 410-423, 2022.
- [10] V. M. Dirsch, H. Stuppner, and A. M. Vollmar, "The Griess assay: suitable for a bio-guided fractionation of anti-inflammatory plant extracts," *Planta Medica*, vol. 64, no. 05, pp. 423-426, 1998.
- [11] A. M. C. Meena and V. Patni, "Isolation and identification of flavonoid "quercetin" from *Citrullus colocynthis* (Linn.) Schrad," *Asian J Exp Sci*, vol. 22, no. 1, pp. 137-142, 2008.
- [12] M. L. Suarez-Quiroz, A. A. Campos, G. V. Alfaro, O. González-Ríos, P. Villeneuve, and M. C. Figueroa-Espinoza, "Isolation of green coffee chlorogenic acids using activated carbon," *Journal of Food Composition and Analysis*, vol. 33, no. 1, pp. 55-58, 2014.
- [13] J. X. Liu, D. L. Di, and Y. P. Shi, "Diversity of chemical constituents from *Saxifraga montana* H," *Journal of the Chinese Chemical Society*, vol. 55, no. 4, pp. 863-870, 2008.
- [14] S. W. Chang, K. H. Kim, I. K. Lee, S. U. Choi, S. Y. Ryu, and K. R. Lee, "Phytochemical constituents of *Bistorta manshuriensis*," *Natural Product Sciences*, vol. 15, no. 4, pp. 234-240, 2009.
- [15] J. W. Guo, J. M. Chen, L. J. Lin, and F. Xu, "Five chemical constituents of the ethyl acetate fraction from ethanol extract of semen litchi," *J Med Plants Res*, vol. 6, no. 1, pp. 168-170, 2012.