

EVALUATION OF THE ANTICANCER ACTIVITY OF *POUZOLZIA PENTANDRA* EXTRACTS AND ISOLATED COMPOUNDS

Nguyen Anh Hung¹, Nguyen Quang Hop¹, Ha Thi Minh Tam¹, Vu Thi Giang², Do Tien Lam^{2,3},
Nguyen Thi Hue³, Vu Thanh Dat³, Nguyen Ngoc Linh⁴, Vu Thi Thu Le^{5*}

¹Hanoi Pedagogical University 2, ²Graduate University of Science and Technology - VAST

³Institute of Natural Products Chemistry – VAST, ⁴Thanh Do University, ⁵TNU - University of Agriculture and Forestry

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Received: 20/9/2023	From the extraction of <i>n</i> -hexane fraction from the <i>Pouzolzia pentandra</i> plant using chromatographic methods, combined with recrystallization in suitable solvents, compounds were isolated: β -sitosterol (1), β -sitosterol-3-O- β -D-glucopyranoside (5), (20S)-20-hydroxydammar-24-en-3-one (4), quercetin (3), and kaempferol (2). Their chemical structures were determined through one- and two-dimensional nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. The remaining fractions were further isolated and their chemical structures were determined. The results of biological activity tests on cancer cell lines HepG2, PC3, and A539 indicated that the extracts and pure compounds exhibited activity at different levels. Among them, compound 4 showed the best cytotoxic activity against liver cancer cell line (HEP-G2) with IC ₅₀ value of 14.65 μ g/mL. This research has supplemented and enriched the chemical composition and biological activities of plants in the genus <i>Pouzolzia</i> in general and the species <i>Pouzolzia pentandra</i> in particular.
Revised: 28/9/2023	
Published: 16/10/2023	
KEYWORDS	
<i>Pouzolzia pentandra</i>	
HepG2	
PC3	
A539	
Kaempferol	
Quercetin	

ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH GÂY ĐỘC TẾ BÀO UNG THƯ CỦA CAO CHIẾT VÀ HỢP CHẤT PHÂN LẬP TỪ CÂY THUỐC VÒI (*POUZOLZIA PENTANDRA*)

Nguyễn Anh Hưng¹, Nguyễn Quang Hợp¹, Hà Thị Minh Tâm¹, Vũ Thị Giang², Đỗ Tiến Lâm^{2,3},
Nguyễn Thị Huệ³, Vũ Thành Đạt³, Nguyễn Ngọc Linh⁴, Vũ Thị Thu Lê^{5*}

¹Trường Đại học Sư phạm Hà Nội 2, ²Học viện Khoa học và Công nghệ - VAST

³Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên – VAST, ⁴Trường Đại học Thành Đô,

⁵Trường Đại học Nông lâm – ĐH Thái Nguyên

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
Ngày nhận bài: 20/9/2023	Từ dịch chiết căn chiết <i>n</i> -hexan của cây thuốc vôi (<i>Pouzolzia pentandra</i>) bằng các phương pháp sắc ký, kết hợp với phương pháp tinh chế kết tinh lại trong dung môi thích hợp, 6 hợp chất: β -sitosterol (1), β -sitosterol-3-O- β -D-glucopyranoside (5), (20S)-20-hydroxydammar-24-en-3-one (4), quercetin (3) và kaempferol (2). Cấu trúc hóa học của chúng được xác định bằng phổ cộng hưởng từ hạt nhân một chiều và hai chiều. Các phân đoạn còn lại được tiếp tục phân lập và xác định cấu trúc hóa học. Kết quả thử nghiệm hoạt tính sinh học trên các dòng tế bào ung thư HepG2, PC3, A539 cho biết các căn chiết và chất sạch thể hiện hoạt tính ở các mức độ khác nhau. Trong đó, hợp chất 4 đã biểu hiện hoạt tính gây độc tế bào với dòng tế bào ung thư gan (HEP-G2) tốt nhất với giá trị IC ₅₀ 14,65 μ g/ml. Nghiên cứu này đã bổ sung và làm phong phú thêm về thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của các thực vật chi <i>Pouzolzia</i> nói chung và loài <i>Pouzolzia pentandra</i> nói riêng.
Ngày hoàn thiện: 28/9/2023	
Ngày đăng: 16/10/2023	
TỪ KHÓA	
<i>Pouzolzia pentandra</i>	
HepG2	
PC3	
A539	
Kaempferol	
Quercetin	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.8782>

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

1. Tổng quan

1.1. Chi Bộ mắt (Pouzolzia)

Chi *Pouzolzia* là một chi thực vật có hoa trong họ Urticaceae, phân bố tập trung ở vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới [1, [2]. Trên thế giới chi *Pouzolzia* có khoảng hơn 50 loài nhưng ở Việt Nam chỉ khoảng 6 loài [1], [3].

Là thực vật thân thảo, nhỏ, cành mềm và thân có lông mịn bao phủ. Lá 3 cạnh, mọc so le hay đối nhau, nguyên; lá kèm bên tự do, khô xác hoặc sần sùi. Cụm hoa xim ở nách lá, không cuống. Hoa đực có cuống, lá bắc; hoa cái không cuống đến cuống ngắn. Đài hoa (3-)4-5 thùy ở hoa đực; thùy hình van, nhọn, lõm hoặc uốn cong đột ngột và xếp nếp ngang bên ngoài; hoa hình ống, có 2-4 răng ở mô và miệng hẹp ở hoa cái. Nhị hoa nhiều như thùy đài hoa. Bầu nhụy không có đài hoa; kiểu đầu cuối, dạng sợi, có nhung mao bên và đầu nhụy, rụng lá. Quả bé hình trứng, được bao bọc bởi đài hoa hầu như không thay đổi hoặc hiếm khi có cánh hoặc có gân [4].

Các thực vật chi *Pouzolzia* là nguồn dược liệu quý được sử dụng rộng rãi trong y học cổ truyền như *Pouzolzia zeylanica* trị cảm, viêm họng và ruột, nhiễm trùng đường tiết niệu, đau răng, nấm da đầu, trị đỉnh nhọt, viêm mủ da; *Pouzolzia sanguinea* trị lưng gối đau phong thấp và gãy xương, chữa ho và sỏi, thiếu máu; *Pouzolzia elegans* trị đòn ngã tổn thương [3].

Các loài thuộc chi *Pouzolzia* có thành phần hóa học chính là các hợp chất thuộc nhóm flavonoid, triterpenoid, steroid, lignan, rotenoid. Ngoài ra, hoạt tính sinh học của các thực vật chi *Pouzolzia* rất phong phú như kháng khuẩn, kháng nấm, kháng viêm, hạ đường huyết, chống oxy hóa và gây độc tế bào [5]-[15].

1.2. Cây Thuốc vòi (Pouzolzia pentandra) [4]

Pouzolzia pentandra, một loài cây lâu năm, thể hiện sự độc đáo và hấp dẫn trong thực vật. Với khả năng mọc thẳng đến khi rụng, cây có thể cao tới 1 m. Điều thú vị là ở sự tương phản giữa thân thảo mọc thưa thớt và thân cây hình trụ hình dạng bên dưới, nhấn mạnh bởi góc cạnh ở phía trên. Lá cây mọc xen kẽ bên dưới và dần nhỏ đi ở phần trên. Điều này tạo ra một sự sắp xếp thú vị cho cây, khiến cho cây *Pouzolzia pentandra* trở nên độc đáo trong cả hình dáng và cấu trúc.

Phiến lá của cây có hình dạng từ mũi mác hoặc thẳng đến hình thuôn dài, với chiều dài dao động từ 2 đến 10 cm và chiều rộng từ 0,5 đến 2 cm. Hoa mọc thưa ở nách lá phía trên, với màu trắng lục hoặc lục phớt hồng. Cây có hoa cái không có cuống, còn hoa đực có cuống dài 2.5-3.5 mm. Đài hoa đực bao gồm 5 thùy, thùy ngắn và nhọn.

Tính đến hiện tại, nghiên cứu về loài *Pouzolzia pentandra* vẫn chưa đề cập đến thành phần hóa học và chưa có nhiều về hoạt tính sinh học của cây. Nghiên cứu này có thể mang đến thông tin quý báu về những hợp chất có tiềm năng ứng dụng trong lĩnh vực y học hiện đại, đồng thời khám phá những bí mật của loài cây này và khả năng hỗ trợ sức khỏe con người.

2. Đối tượng, phương pháp nghiên cứu và thực nghiệm

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Phần trên mặt đất của cây thu hái tại huyện Nho Quan, tỉnh Ninh Bình vào tháng 08 năm 2022, được TS. Nguyễn Quốc Bình, Bảo tàng Thiên nhiên Việt Nam - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam giám định tên khoa học là *Pouzolzia pentandra*, họ Urticaceae. Mẫu tiêu bản của cây được lưu trữ tại Viện Hóa học các Hợp chất Thiên nhiên, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp chiết xuất

Sau khi thu hái, mẫu thuốc vòi được thái nhỏ và sau đó phơi khô trong bóng mát. Tiếp theo, mẫu được sấy ở nhiệt độ 60°C cho đến khi khối lượng không thay đổi ổn định. Sau đó, mẫu được nghiền nhỏ để tiếp tục quá trình xử lý. Mẫu được ngâm trong methanol bằng thiết bị siêu âm, quá

trình này được thực hiện 3 lần ở nhiệt độ phòng. Dịch tổng sau quá trình chiết được cất để loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm và nhiệt độ dưới 50°C, tạo ra cặn cô methanol. Cặn cô methanol này sau đó được sử dụng làm nguyên liệu để tiến hành quá trình phân lập và tinh chế các hoạt chất.

2.2.2. Phương pháp phân tích, phân lập hợp chất

Các phương pháp sắc ký khác nhau được sử dụng để phân lập các cao chiết từ cây bao gồm sắc ký lớp mỏng (TLC), sắc ký cột thường (CC) với sử dụng pha tĩnh là silica gel (Merck), sắc ký cột pha đảo với pha tĩnh là YMC RP 18 (Merck), và sắc ký ray phân tử với pha tĩnh là sephadex LH-20 (Merck).

Trong phương pháp sắc ký lớp mỏng, việc sử dụng bản mỏng tráng sẵn bao gồm DC-Alufolien 60 F254 (0,25 mm; Merck) và RP-18 F254S (0,25 mm; Merck).

Phương pháp sắc ký cột thường sử dụng pha tĩnh là silica gel 60 có kích thước hạt từ 0,040 - 0,063 mm (230 - 400 mesh) của Merck. Trong khi đó, phương pháp sắc ký cột ray phân tử sử dụng pha tĩnh là sephadex LH-20.

Trong phương pháp sắc ký cột pha đảo, loại YMC RP-18 được sử dụng với kích thước hạt là 30-50 μm (Fujisilica Chemical Ltd.). Các phương pháp này được áp dụng để phân lập và tinh chế các cao chiết của cây, giúp xác định và nắm bắt chính xác các thành phần hóa học có trong cây.

2.2.3. Phương pháp xác định cấu trúc hợp chất

Các phương pháp hiện đại được áp dụng để xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất dựa trên sự sử dụng của các thiết bị tiên tiến. Cụ thể, các thiết bị và phương pháp bao gồm:

Phổ khối lượng (MS): Sử dụng phổ khối (phun mù điện tử) ESI-MS được thực hiện trên máy Agilent 1200 TRAP. Đồng thời, phổ khối lượng phân giải cao HR-ESI-MS được thực hiện trên máy FT-ICR-Mass spectrophotometer tại Viện Hóa học - VAST. Đây là phương pháp mạnh mẽ để xác định khối lượng phân tử và hợp chất có trong mẫu.

Phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR): Các phân tích NMR được thực hiện trên máy Bruker avance 500 MHz tại Viện Hoá học - VAST. Chất chuẩn nội được sử dụng là TMS. Các kỹ thuật phổ cộng hưởng từ hạt nhân được áp dụng bao gồm:

Phổ cộng hưởng từ hạt nhân một chiều: $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ và DEPT.

Phổ cộng hưởng từ hạt nhân hai chiều: HSQC, HMBC và các phương pháp tương tự.

Dung môi được sử dụng trong quá trình này bao gồm DMSO- d_6 , CD_3OD và CDCl_3 , nhằm tạo điều kiện tối ưu để thực hiện các phân tích NMR một cách chính xác và hiệu quả. Các phương pháp và thiết bị này đóng vai trò quan trọng trong việc phân tích và xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất, đồng thời mang lại thông tin cụ thể về thành phần và cấu tạo của chúng.

2.2.4. Phương pháp thử nghiệm hoạt tính gây độc tế bào

Thử nghiệm hoạt tính gây độc tế bào được tiến hành tại Phòng Sinh học thực nghiệm - Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên, VAST.

Các dòng tế bào được sử dụng trong thử nghiệm bao gồm:

Hep-G2 (Hepatocellular carcinoma - ung thư gan)

A549 (Human lung adenocarcinoma epithelial cells - ung thư phổi)

PC-3 (Human Prostate Adenocarcinoma - ung thư tuyến tiền liệt)

Các tế bào được nuôi cấy trong điều kiện 37°C, CO_2 5% trong môi trường phù hợp bao gồm DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium, Sigma-Aldrich, USA) hoặc RPMI 1640 (ThermoFisher, Waltham, CHLB Đức). Các môi trường này đều được bổ sung L-glutamine 2 mM, kháng sinh (Penicillin + Streptomycin sulfate) và huyết thanh bê 5-10%. Tế bào sau đó được chuyển lên phiến vi lượng 96 giếng với mật độ 1.5×10^5 tế bào/giếng. Quá trình ủ tế bào với mẫu thử được thực hiện với dải nồng độ từ 100 đến 6.25 $\mu\text{g/mL}$, và mỗi nồng độ được thử nghiệm 3 lần. Chất chuẩn dương tính (+) bao gồm Ellipticine hoặc Paclitaxel (Taxol) trong DMSO. Sản phẩm chuyển hóa dạng tinh thể formazan sau đó được

hòa tan trong dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich), và mật độ quang được đo tại $\lambda = 540/720$ nm bằng thiết bị Infinite F50 (Tecan, Männedorf, Thụy Sĩ).

Các mẫu có hoạt tính gây độc tế bào với ức chế $\geq 50\%$ sự sống sót được xác định giá trị IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$ hoặc μM), tức là nồng độ của mẫu thử mà tại đó tế bào còn sống sót 50%. Giá trị này được tính toán bằng phần mềm TableCurve AISN Software (Jandel Scientific, San Rafael, CA).

2.3. Thực nghiệm

2.3.1. Thu nhận các cặn chiết từ loài *Pouzolzia pentandra*

Mẫu sấy khô ở nhiệt độ 60°C đến khối lượng không đổi được 3000 g, đem nghiền nhỏ và ngâm chiết 3 lần với MeOH trong thiết bị siêu âm ở nhiệt độ phòng. Dịch tổng thu được cất kiệt dung môi dưới áp suất giảm, nhiệt độ $< 50^\circ\text{C}$ thu được cặn MeOH (90 g). Cặn MeOH được thêm nước và chiết lần lượt với các dung môi có độ phân cực tăng dần *n*-hexan, EtOAc, sau đó cất kiệt dung môi dưới áp suất giảm thu được các cặn tương ứng.

2.3.1. Phân lập và tinh chế các hợp chất từ loài *Pouzolzia pentandra*

Dựa trên khảo sát trên bản mỏng, nhóm hợp chất chính của hai cặn chiết *n*-hexane và etyl acetate có sự phân chia không rõ ràng nên dồn chúng lại với nhau. Ký hiệu chung là *n*-hexane PPH (45g).

Cặn chiết *n*-hexane PPH (45 g) được tiến hành tách thô trên sắc ký cột silica gel pha thường với hệ dung môi rửa giải HE 0 \rightarrow 100% (tỷ lệ Etyl axetat tăng từ 0 \rightarrow 100%; tỉ lệ *n*-hexane giảm từ 100% \rightarrow 0%) thu được 7 phân đoạn (PPH1 \rightarrow PPH7). Kiểm tra các phân đoạn thu được bằng sắc ký lớp mỏng (SKLM) và hiện màu bằng thuốc thử vanilin - H_2SO_4 5%, sau đó các phân đoạn giống nhau được gộp lại rồi đuổi kiệt dung môi.

Phân đoạn PPH1 (1,0 g) được phân tách lại trên cột silica gel pha thường với hệ dung môi rửa giải *n*-hexane: ethylacetate (100:0 đến 99:1) thu được 3 phân đoạn nhỏ (PPH1.1 đến PPH1.3). Phân đoạn PPH1.1 được kết tinh lại trong acetone thu được hợp chất 1 (30,0 mg)

Phân đoạn PPH4 (0,6 g) được phân tách trên sắc ký cột silica gel pha thường với hệ dung môi *n*-hexane-EtOAc (50:1 \rightarrow 20:1). Phân đoạn PPH4.2 được kết tinh lại trong acetone thu được hợp chất 2 (10,5 mg).

Phân đoạn PPH5 (1,1 g) phân tách trên sắc ký cột silica gel pha thường với hệ dung môi *n*-hexane-EtOAc (30:1 \rightarrow 5:1), phân đoạn thu được tiếp tục tách lại trên sắc ký cột silica gel pha thường với hệ dung môi *n*-hexane-EtOAc (20:1 \rightarrow 10:1), sau đó kết tinh lại trong dung môi acetone thu được hợp chất 3 (9,5mg).

Phân đoạn PPH6 (0,8 g) phân tách trên sắc ký cột silica gel pha thường với hệ dung môi $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (99:1 \rightarrow 20:1). Phân đoạn PPH6.1 được kết tinh lại trong metanol thu được hợp chất 4 (8,8 mg).

Phân đoạn PPH7 (0,9g) được kết tinh lại trong dung môi metanol thu được hợp chất 5 (13,0 mg).

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Các hợp chất steroid

3.1.1. Hợp chất β -sitosterol (1)

Trong các phổ ^1H - và ^{13}C -NMR đã chỉ ra sự có mặt của một nhóm hydroxyl (δ_{H} tại 3,53 ppm (proton của CH liên kết với OH), δ_{C} tại 71,7 ppm và một nối đôi δ_{H} tại 5,35 ppm (1H, d, $J=5\text{Hz}$) tín hiệu của proton liên kết với C-6 ở vị trí một nối đôi, $\delta_{\text{C}-5}$ tại 140,70 ppm, s và $\delta_{\text{C}-6}$ tại 121,7 ppm, d) [16].

3.1.2. Hợp chất β -sitosterol-3-O- β -D-glucopyranoside (5)

Phổ ^1H -NMR của 5 có các tín hiệu của các proton như δ_{H} 3,57 (H-3); 5,34 (H-6); 0,65 (H-18); 0,93 (H-19); 0,80 (H-28). Ngoài ra còn có các tín hiệu proton đặc trưng của một phân tử glucose với H anomer tại δ_{H} 4,41 ppm và bốn nhóm CH-O và một nhóm CH_2O trong vùng 3,23-3,90 ppm.

Phổ ^{13}C -NMR của **5** cho biết có tổng số 35 nguyên tử carbon, trong đó có 5 nhóm CH-O, 1 nhóm CH₂O trong vùng δ_{C} 61,1-78,9 ppm, 2 carbon olefin tại δ_{C} 140,6 ppm (C-5) và 121,3 (C-6); 1 carbon anomer δ_{C} 100,9 ppm (C-1') [17].

3.1.3. Hợp chất (20S)-20-hydroxydammar-24-en-3-one (4)

Trên phổ ^1H -NMR cho biết tín hiệu của 8 nhóm methyl tại δ_{H} 0.89 (3H, s, H-30), 0.95 (3H, s, H-19), 1.00 (3H, s, H-18), 1.04 (3H, s, H-28), 1.08 (3H, s, H-29), 1.15 (3H, s, H-21), 1.63 (3H, s, H-26), 1.69 (3H, s, H-27). Trên phổ ^1H -NMR xuất hiện tín hiệu đặc trưng của liên kết đôi tại δ_{H} 5.12 (1H, ddd, $J = 10.5, 5.5, 1.0$ Hz, H-24) tương ứng với các nguyên tử carbon tại δ_{C} 124.7 (C-24). Những dữ liệu này cho thấy **6** thuộc khung sterol có một liên kết đôi ở mạch nhánh trong cấu trúc.

Phổ ^{13}C -NMR và DEPT của **4** có 30 tín hiệu carbon, bao gồm 8 nhóm methyl, 10 nhóm methylene, 5 nhóm methine, 7 carbon bậc 4. Trong đó, xuất hiện tín hiệu của carbon carbonyl đặc trưng tại δ_{C} 218.1 (C-3) và tín hiệu carbon của hai liên kết đôi trong vùng trường thấp tại δ_{C} 124,7 (C-24) và 131,7 (C-25).

Phổ HMBC của **4** cho thấy mối tương quan giữa proton H-24 (δ_{H} 5,12) với các nguyên tử C-22, C-23, C-26 và C-27; giữa các proton H-17 (δ_{H} 1,76) với carbon C-20, C-13, C-15 và C-16. Tương tác giữa proton H-18 (δ_{H} 1,00) với carbon C-8 (δ_{C} 50,0); H-19 (δ_{H} 0,95) với carbon C-10 (δ_{C} 19,7); H-21 (δ_{H} 1,15) với carbon C-20 (δ_{C} 75,4); H-26 (δ_{H} 1,63) và H-27 (δ_{H} 1,69) với carbon C-25 (δ_{C} 131,7); H-28 (δ_{H} 1,04) và H-29 (δ_{H} 1,08) với carbon C-4 (δ_{C} 47,4), C-3 (δ_{C} 218,1) và C-5 (δ_{C} 55,4); H-30 (δ_{H} 0,89) với carbon C-14 (δ_{C} 50,3) và C-8 (δ_{C} 50,0) khẳng định các nhóm methyl 18-CH₃, 19-CH₃, 21-CH₃, 26-CH₃, 27-CH₃, 28-CH₃, 29-CH₃, 30-CH₃ đính vào các vị trí C-8, C-10, C-20, C-25, C-25, C-4, C-4 và C-14 tương ứng [18].

3.2. Các hợp chất flavonoid

3.2.1. Hợp chất quercetin (3)

Phổ ^1H -NMR cho biết các tín hiệu đặc trưng cho proton thơm ở độ dịch chuyển nằm trong vùng 7,67 (1H, d, $J = 2,5$ Hz, H-2'), 7,54 (1H, dd, $J = 2,0$ và 8,5 Hz, H-6'), 6,87 (1H, d, $J = 8,5$ Hz, H-5'), 6,40 (1H, d, $J = 1,5$ Hz, H-8), 6,18 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-6). Ngoài ra là tín hiệu đặc trưng cho nhóm hydroxyl ở trong vùng 12,48 (1H, s, 5-OH), 10,79 (1H, s, 7-OH), 9,59 (1H, s), 9,36 và 9,30.

Phổ ^{13}C -NMR cho biết có tổng số 15 carbon, trong đó có đặc trưng của nhóm C=O nằm trong độ dịch chuyển 175,8 ppm, ngoài ra là tín hiệu của carbon liên hợp ở trong vùng 115-160 ppm [9].

3.2.2. Hợp chất kaempferol (2)

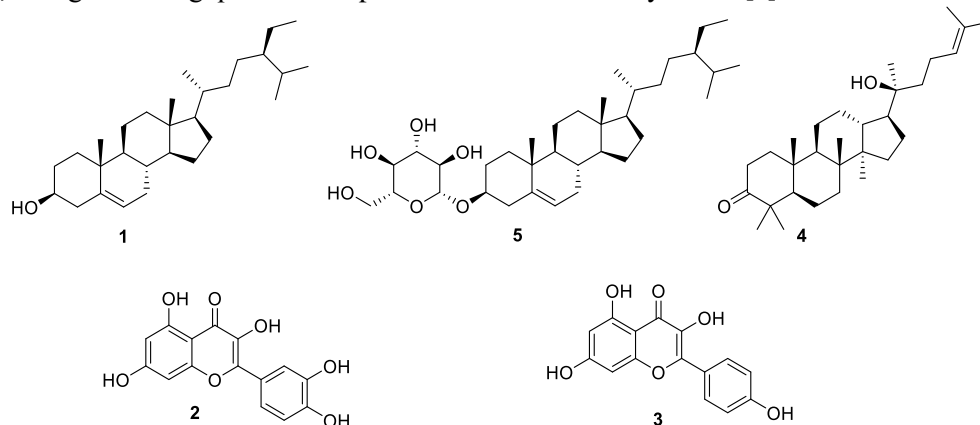
Phổ ^1H -NMR của **2** cho biết các tín hiệu của proton vòng thơm, gồm có tín hiệu của 2 proton dưới dạng doublet ở vùng trường thấp thể ở vị trí meta tại δ_{H} 6,44 (1H, d, $J = 1,5$ Hz, H-8) và 6,19 (1H, d, $J = 1,5$ Hz, H-6); 2 tín hiệu proton cường độ cao hơn dưới dạng doublet có tương tác thể ortho tại δ_{H} 8,05 (2H, d, $J = 7,0$ Hz, H-2'/H-6') và 6,93 (2H, d, $J = 7,5$ Hz, H-3'/H-5').

Phổ ^{13}C -NMR của **2** quan sát được 13 tín hiệu của 15 carbon, trong đó 2 tín hiệu tại δ_{C} 129,5 (C-2'/C-6') và 115,5 (C-3'/C-5') có cường độ carbon gấp đôi, 1 nhóm carbonyl (C=O) tại 175,9 (C-4), các tín hiệu carbon vòng thơm tại δ_{C} 163,9 (C-7); 160,7 (C-5); 156,2 (C-9); 129,5 (C-2'/C-6'); 121,7 (C-1'); 115,5 (C-3'/C-5'); 103,1 (C-10); 98,2 (C-6); 93,5 (C-8) và 2 carbon olefin gắn với oxy tại δ_{C} 146,9 (C-2); 135,7 (C-3). Từ dữ liệu phổ ^1H -NMR, ^{13}C -NMR và DEPT chứng tỏ đây là một hợp chất flavonoid khung flavone.

Phổ DEPT kết hợp ^{13}C -NMR cho thấy hợp chất **2** có 6 nhóm -CH= và 9 nhóm C tứ cấp. Phổ HMBC cho biết tương tác chính giữa H-2',6' (δ_{H} 8,05) với C-1' (δ_{C} 121,7), C-3',6' (δ_{C} 115,5); tương tác giữa H-3',5' (δ_{H} 6,93) với C-2',6' (δ_{C} 129,5) và C-4' (δ_{C} 177,3 ppm), H-5' tương tác xa với C-4' (δ_{C} 159,2) và C-2',6' (δ_{C} 129,5); H-6 với C-5 (δ_{C} 160,7) và C-7 (δ_{C} 163,9) và H-8 (δ_{H} 6,44) với C-7 (δ_{C} 163,9) và C-9 (δ_{C} 156,2).

Tín hiệu dưới dạng singlet tại δ_{H} 12,47 (1H, s, 5-OH) đặc trưng cho nhóm -OH phải gắn vào C-5 khung flavone. Trên phổ HMBC còn quan sát được tín hiệu proton của nhóm hydroxyl tương quan với

carbon tại δ_C 162,3, δ_C 104,1, δ_C 99,2 và δ_C 159,2 tương ứng vị trí C-5, C-7 và C-3 và C-4'. Proton H-6 (δ_H 6,19) ghép meta với proton δ_H 6,44, nên proton này chỉ có thể là H-8. Hai proton H-6 và H-8 cùng tương quan với carbon δ_C 163,9 (C-7) trên phổ HMBC, xác nhận carbon này phải là C-7. Carbon δ_C 156,2 cũng cho tương quan với proton H-8 nên carbon này là C-9 [9].



Hình 1. Các hợp chất phân lập được từ loài *Pouzolzia pentandra*

3.3. Đánh giá hoạt tính gây độc tế bào ung thư

Kết quả thử hoạt tính gây độc trên các dòng tế bào ung thư gan (Hep-G2), phổi (A549) và tuyến tiền liệt (PC-3) được thể hiện như bảng 1.

Bảng 1. Kết quả thử nghiệm hoạt tính gây độc các dòng tế bào ung thư

TT	Ký hiệu mẫu	Tế bào HepG2		Tế bào PC3		Tế bào A549	
		Tỷ lệ ức chế tế bào (%)	IC ₅₀ (µg/ml)	Tỷ lệ ức chế tế bào (%)	IC ₅₀ (µg/ml)	Tỷ lệ ức chế tế bào (%)	IC ₅₀ (µg/ml)
1	PP	86,81 ± 0,9	56,13	76,95 ± 2,5	44,91	78,01 ± 0,4	48,79
2	PPH	91,32 ± 2,4	52,52	81,33 ± 1,8	64,46	92,22 ± 2,1	47,23
3	PPW	65,02 ± 0,9	66,7	77,48 ± 0,6	61,18	55,63 ± 2,7	80,88
4	2	54,49 ± 1,2	94,53	46,64 ± 2,1	>100	22,15 ± 2,4	>100
5	3	42,25 ± 2,4	>100	43,29 ± 2,6	>100	30,11 ± 3,5	>100
6	4	99,16 ± 0,1	14,65	96,34 ± 0,4	23,87	92,45 ± 4,4	56,21
7	5	97,16 ± 0,5	19,54	90,34 ± 0,8	25,43	91,34 ± 1,4	40,32
	Paclitaxel 50 nM	54,2 ± 1,8	47,2 nM	64,09 ± 2,4	40,74 nM	59,54 ± 3,6	43,23 nM

Đã tiến hành đánh giá hoạt tính gây độc trên các dòng tế bào ung thư gan (HEP-G2), tiền liệt tuyến (PC3), và phổi (A549) bằng cách sử dụng các mẫu cao chiết và hợp chất phân lập từ loài Thuốc vôi (*Pouzolzia pentandra*). Kết quả cho thấy rằng, tất cả các mẫu đã thể hiện hoạt tính gây độc tế bào ở các mức độ khác nhau. Đối với dòng tế bào ung thư gan (HEP-G2), cao chiết PPH và hợp chất 4 đã biểu hiện hoạt tính gây độc tế bào ở mức độ trung bình, với giá trị IC₅₀ lần lượt là 52,52 µg/ml và 14,65 µg/ml. Cao chiết PP và hợp chất 4 thể hiện hoạt tính gây độc tế bào ở mức độ tầm trung với IC₅₀ 44,91 µg/ml và 23,87 µg/ml tương ứng. Thể hiện hoạt tính gây độc tế bào ở mức độ vừa phải với giá trị IC₅₀ lần lượt là 47,23 µg/ml và 40,32 µg/ml của cao chiết PPH và hợp chất 5 đã được đánh giá đối với dòng tế bào ung thư phổi A549. Kết quả nghiên cứu này đã làm rõ sự khác nhau trong hoạt tính gây độc các dòng tế bào ung thư của các mẫu từ loài Thuốc vôi (*Pouzolzia pentandra*).

4. Kết luận

Nghiên cứu đã thu thập được mẫu Thuốc vôi (*Pouzolzia pentandra*) tại Ninh Bình và tiến hành phân lập và xác định cấu trúc 5 hợp chất gồm 3 steroid và 2 flavonoid từ cao chiết của loài Thuốc vôi (*Pouzolzia pentandra*).

Đồng thời, nghiên cứu đã tiến hành đánh giá hoạt tính gây độc trên các dòng tế bào ung thư gan (HEP-G2), tiền liệt tuyến (PC3), và phổi (A549) bằng cách sử dụng các mẫu cao chiết và hợp chất phân lập từ loài Thuộc vôi (*Pouzolzia pentandra*).

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: B2022-SP2-07.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] X.-M. Chen and Z.-H. Li, "Effect of FPZ, a total flavonoids ointment topical application from *Pouzolzia zeylanica* var. *microphylla*, on mice skin infections", *Brazilian Journal of Pharmacology*, vol. 28, no. 3, pp. 732-737, 2018.
- [2] M. Q. Ahsan, M. T. Alam, M. M. U. Chowdhury, M. T. Nasim, and S. M. S. Islam, "In Vitro and In Vivo Evaluation of Pharmacological Activites of *Pouzolzia sanguinea*," *Journal of Bio-Science*, vol. 29, no. 2, 2021, doi: 10.3329/jbs.v29i2.54952.
- [3] V. C. Vo, *Dictionary of Vietnamese medicinal plants I*. Medical Publishing House, pp. 189-192, 2011.
- [4] A. Ghafoor, *Urticaceae*, Flora of Pakistan, 1981, p.137.
- [5] S. Abu, M. A. Sattar, *et al.*, "A prenylated isoflavone from *Pouzolzia zeylanica*: its in vitro antimicrobial activity and cytotoxic evaluation," *Oriental Journal of Chemistry*, vol. 19, no. 1, pp. 35-40, 2003.
- [6] F. Ming and Y. Y. Niu, "Study on the chemical constituents in *Pouzolzia zeylanica*, *Zhongyaoca*," *Journal of Chinese medicinal materials*, vol. 35, no. 11, pp. 1778-1781, 2012.
- [7] C. Sangsuwon, W. Jiratchariyakul, Y. U-pratya, and T. Kummalue, "Antiproliferative Effect and the Isolated Compounds of *Pouzolzia indica*," *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2013, pp. 1-8, 2013, doi: 10.1155/2013/342352.
- [8] W. Lujun and X. Zhelong, "Chemical Constituents of *Pouzolzia zeylanica* with PPAR γ and PPAR β Activities," *Chemistry of Natural Compounds*, vol. 51, no. 6, pp. 1157-1159, 2015.
- [9] S. Brazendranath and R. S. M. Abu, "Phytochemical and Biological Activity Studies on *Pouzolzia zeylanica* (Linn.) Benn.," *National University Journal of Science*, vol. 1, no. 1, pp. 51-58, 2014.
- [10] I. S. Sarma and B. Dinda, "A new friedelane triterpene ester from *Pouzolzia indica*," *Indian Journal of Chemistry*, vol. 52B, 2013, doi: 10.1002/CHIN.201420193.
- [11] Z.-H. Chen, H. Zhang, S.-H. Tao, Z. Luo, and C.-Q. Zhong, "Norlignans from *Pouzolzia zeylanica* var. *microphylla* and their nitric oxide inhibitory activity," *Journal of Asian Natural Products Research*, vol. 17, no. 10, pp. 959-966, 2015.
- [12] T. H. N. Le, T. Q. Phan, T. T. Trinh, T. T. Nguyen, T. H. A. Nguyen, T. T. X. Do, X. N. Nguyen, H. T. Bui, and V. K. Phan, "New Neolignan and Dihydrostilbene Derivatives from *Pouzolzia sanguinea* Inhibit NO Production in LPS-Activated BV2 Cells," *Natural Product Communications*, vol. 15, no. 8, pp. 1-6, 2020.
- [13] M. Mohammed, A. R. Maxwell, R. Ramsewak, and W. F. Reynolds, "Norlignans from *Pouzolzia occidentalis*," *Phytochemistry Letters*, vol. 3, no. 1, pp. 29-32, 2010.
- [14] T. H. N. Le, T. M. H. Pham, T. A. Nguyen, H. T. Bui, X. N. Nguyen, V. D. Vu, H. H. Nguyen, Y. Seo, S. H. Kim, and V. K. Phan, "Two new norlignans from the aerial parts of *Pouzolzia sanguinea* (Blume) Merr.," *Natural Product Research*, vol. 5, pp. 1-8, 2020.
- [15] T. T. Le, "Chemical composition of the fish sauce plant (*Pouzolzia zeylanica*)," Master's thesis report in chemistry, Ho Chi Minh University of Natural Sciences, 2007.
- [16] V. A. Nyigo, X. Peter, F. Mabiki, H. M. Malebo, R. H. Mdegela, and G. Fouche, "Isolation and identification of euphol and β -sitosterol from the dichloromethane extracts of *Synadenium glaucescens*," *The Journal of Phytopharmacology*, vol. 5, no. 3, pp. 100-104, 2016.
- [17] S. Mouffok, H. Haba, C. Lavaud, C. Long, and M. Benkhaled, "Chemical constituents of *Centaurea omphalotricha* Coss. & Durieu ex Batt. & Trab.," *Records of Natural Products*, vol. 6, 2018, Art. no. 292.
- [18] I. E. Smirnovaa, H. Do Thi Thub, O. B. Kazakovaa, G. A. Tolstikova, O. S. Kukovinetsa, A. N. Lobova, and K. Yu, "SuponitskiiOzonolysis of Dipterocarpol and Its Derivatives". *Russian Journal of Organic Chemistry*, vol. 48, no. 10, pp. 1370-1376, 2012.