

CHEMICAL COMPOSITION AND *IN VITRO* ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY OF *POUZOLZIA ZEYLANICA* IN VIETNAM

Nguyen Anh Hung¹, Nguyen Quang Hop¹, Ha Thi Minh Tam¹, Quan Cam Thuy³,
Quach Van Linh^{3,4}, Nguyen Ngoc Linh⁵, Vu Thi Thu Le^{2*}

¹Hanoi Pedagogical University 2, ²TNU - University of Agriculture and Forestry

³Viet Tri University of Industry, ⁴Centre for Disease control of Bac Giang province, ⁵Thanh Do University

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Received: 23/9/2023	The <i>Pouzolzia zeylanica</i> commonly found in tropical regions of South Asia, Southeast Asia, and other warm regions around the world. The main chemical components belong to the triterpenoid, flavonoids and lignans, which proven to have extremely diverse biological activities such as anti-inflammatory, strengthening blood vessel walls, anti-toxic, reducing liver damage, anti-oxidation, anti-virus and cancer. From the stem and leaves of <i>Pouzolzia zeylanica</i> , three compounds have been isolated and determined: Naringenin (1), bauerenol (2) and vitexin (3). The results of testing the <i>in vitro</i> anti-inflammatory activity of the fractions and isolated compounds obtained from <i>Pouzolzia zeylanica</i> was evaluated through the inhibition of LPS-triggered NO production on RAW 264.7 macrophages, the results showed total residue (PZ) at a concentration of 100 µg/ml has the ability to strongly inhibit NO production and is not toxic to cells with an IC ₅₀ of 15.24 µg/ml. The <i>n</i> -hexane (PZH) fraction exhibited good anti-inflammatory activity with an IC ₅₀ of 12.08 µg/ml. Compound vitexin (3) has the ability to strongly inhibit NO production and is not toxic to cells with an IC ₅₀ of 20.85 µM. The above results guide further research on chemical composition and anti-inflammatory activity in the future.
Revised: 24/10/2023	
Published: 25/10/2023	
KEYWORDS	
<i>Pouzolzia zeylanica</i>	
Vitexin	
Naringenin	
Bauerenol	
Anti-inflammatory	

THÀNH PHẦN HÓA HỌC VÀ HOẠT TÍNH KHÁNG VIÊM *IN VITRO* CỦA LOÀI BỘ MẮM (*POUZOLZIA ZEYLANICA*) Ở VIỆT NAM

Nguyễn Anh Hưng¹, Nguyễn Quang Hợp¹, Hà Thị Minh Tâm¹, Quan Cẩm Thúy³,
Quách Văn Linh^{3,4}, Nguyễn Ngọc Linh⁵, Vũ Thị Thu Lê^{2*}

¹Trường Đại học Sư phạm Hà Nội 2, ²Trường Đại học Nông lâm – ĐH Thái Nguyên

³Trường Đại học Công nghiệp Việt Trì, ⁴Trung tâm kiểm soát bệnh tật Bắc Giang, ⁵Trường Đại học Thành Đô

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
Ngày nhận bài: 23/9/2023	Cây Bộ mắm có tên khoa học là <i>Pouzolzia zeylanica</i> , thường phân bố ở vùng nhiệt đới các nước Nam Á, Đông Nam châu Á và những vùng nước ẩm trên thế giới. Thành phần hóa học chủ yếu thuộc nhóm triterpenoid, flavonoid và lignan. Nhóm chất này đã được chứng minh có hoạt tính sinh học phong phú đa dạng như kháng viêm, làm bền thành mạch, chống độc, làm giảm thương tổn gan, chống oxy hóa, virus và ung thư... Từ thân lá cây Bộ mắm (<i>Pouzolzia zeylanica</i>) đã phân lập và xác định cấu trúc hóa học 3 hợp chất: Naringenin (1), bauerenol (2) và vitexin (3). Kết quả thử hoạt tính kháng viêm <i>in vitro</i> của các căn chiết thu nhận từ các thực vật chỉ <i>Pouzolzia</i> được đánh giá thông qua sự ức chế sản sinh ra NO kích hoạt bởi LPS trên đại thực bào RAW 264.7. Kết quả cho thấy căn tổng (PZ) ở nồng độ 100 µg/ml có khả năng ức chế sản sinh NO mạnh và không gây độc cho tế bào với IC ₅₀ là 15,24 µg/ml. Phân đoạn <i>n</i> -hexan (PZH) biểu hiện hoạt tính kháng viêm tốt với IC ₅₀ là 12,08 µg/ml. Hợp chất vitexin (3) có khả năng ức chế sản sinh NO mạnh và không gây độc cho tế bào với IC ₅₀ là 20,85 µM. Các kết quả trên định hướng cho nghiên cứu sâu hơn về thành phần hóa học và hoạt tính kháng viêm trong tương lai.
Ngày hoàn thiện: 24/10/2023	
Ngày đăng: 25/10/2023	
TỪ KHÓA	
<i>Pouzolzia zeylanica</i>	
Vitexin	
Naringenin	
Bauerenol	
Kháng viêm	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.8806>

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

1. Giới thiệu

Viêm là các phản ứng sinh học của toàn bộ cơ thể chống lại tác nhân bên ngoài (vi sinh vật, tác nhân hóa học, vật lý, cơ học) hoặc của tác nhân bên trong (hoại tử do thiếu máu cục bộ, bệnh tự miễn...). Các biểu hiện viêm thường thấy như sưng, nóng, đỏ và đau, do các mạch máu giãn nở, đưa nhiều máu và các tế bào bạch cầu đến nơi tổn thương. Các yếu tố tham gia quá trình viêm như: đại thực bào (là tế bào bạch cầu sản xuất 5 loại cytokine chính là: IL-1, IL6, IL-12, IL-18 và TNF- α), yếu tố nhân kappa B (NF- κ B) (là một yếu tố sao mã thiết yếu kiểm soát quá trình biểu hiện gen mã hoá của các cytokine tiền viêm) và đặc biệt là nitric oxide. Nitric oxide (NO) là một trung gian tiền viêm (pro-inflammatory), một phân tử tín hiệu đóng một vai trò quan trọng trong quá trình sinh bệnh của viêm. NO liên quan đến đáp ứng miễn dịch bởi các đại thực bào kích hoạt cytokine. Nó mang lại hiệu quả chống viêm trong điều kiện sinh lý bình thường. Nhưng khi NO ở nồng độ cao gây ra chứng viêm quá mức trong các tình huống bất thường. Do đó, ức chế NO là sự tiến bộ quan trọng trong việc điều trị các bệnh viêm. Viêm đóng vai trò bảo vệ và nhìn chung có lợi cho cơ thể nhưng khi phản ứng viêm quá mức dẫn đến tình trạng viêm nhiễm như viêm gan, viêm ruột thừa, viêm đại tràng, viêm niêm mạc dạ dày, viêm não, viêm thận, viêm phổi,... [1], [2].

Hiện nay, viêm đang được điều trị bằng thuốc kháng viêm steroid và không steroid nhưng đều có tác dụng phụ không mong muốn trên nhiều cơ quan, đặc biệt là gan và thận. Đây chính là những cơ quan có chức năng chuyển hóa và thải trừ các loại thuốc này sau khi đã hết tác dụng dược lý, và hai cơ quan này thường bị ảnh hưởng nhiều nhất dẫn đến việc chức năng của hai cơ quan này bị suy giảm đi [2], [3]. Vì vậy, nhu cầu tìm kiếm những hợp chất kháng viêm mới là cấp thiết. Xu hướng hiện nay sử dụng các dược liệu thiên nhiên để hỗ trợ và điều trị nhiều loại bệnh đang được khuyến khích ưu tiên sử dụng bởi tính hiệu quả và an toàn, đây chính là định hướng trong phát triển các sản phẩm chất lượng từ dược liệu.

Chi *Pouzolzia* thuộc họ Gai (Urticaceae), có 37 loài, thường phân bố ở vùng nhiệt đới các nước Nam Á, Đông Nam châu Á và những vùng nước ẩm trên thế giới. Ở Việt Nam, theo thống kê của tác giả Phạm Hoàng Hộ, ở Việt Nam chi *Pouzolzia* có 6 loài [4]-[6]: *Pouzolzia zeylanica* (L.) Benn (Bọ mắm): Loại cây cỏ có cành mềm, thân có lông, phân bố ở ruộng, ven rừng, nơi ẩm, phân bố khắp cả nước. Nhân dân hay sử dụng bằng cây tươi giã nhỏ cho vào vại mắm bảo quản chống giòi bọ. Ngoài ra, theo kinh nghiệm dân gian, cây này còn được dùng trong điều trị các bệnh như cảm ho, hoặc ho lâu ngày, viêm họng, bệnh về phổi, viêm ruột, nhiễm trùng đường tiết niệu, bí tiểu tiện, đau răng, nấm da cứng. Cây có tác dụng dùng ngoài da trị đinh nhọt, viêm mụn da, viêm vú, đẹn giập. Ở Ấn Độ, cây dùng trị giang mai, bệnh lậu và nọc độc rắn [7]. Trong y học hiện đại, cây có tác dụng kháng khuẩn, kháng viêm, hạ đường huyết, chống oxy hóa, gây độc tế bào [8]-[10]. *Pouzolzia auriculata* Wight (Thuốc vòi tai): Cây cỏ cao 30-50 cm, thân có 4 cạnh; phân bố ở miền Nam, Việt Nam. *Pouzolzia elegans* (Thuốc vòi thanh): Cây bụi nhỡ cao tới 1,5 m, phân cành nhiều, cành non có lông mịn dày; mọc trong rừng ẩm, ở độ cao 1500 m, phân bố ở Sapa - Lào Cai. *Pouzolzia sanguinea* (Blume) Merr (Bọ mắm rừng, Nhót nháo): Cây nhỡ mọc cao 2-3 m hay hơn, thân và cành mảnh; mọc ven rừng, nơi sáng, ven các suối, ở độ cao đến 1500 m. Cây phân bố ở miền Bắc, miền Trung Việt Nam, được sử dụng làm thuốc chữa ho lâu ngày, lợi tiểu, trị sỏi và phụ nữ sau đẻ thiếu máu. *Pouzolzia pentandra* Benn (Thuốc vòi ngũ hùng): Cây cỏ cao 60-80 cm, thân có 5 cạnh, to 1-5 mm, không lông. Cây mọc tự nhiên dựa theo bờ nước, nơi ẩm, ở độ cao 900-1200 m, phân bố ở Ninh Bình, Thanh Hóa. Loài *Pouzolzia hirta* Hassk (Thuốc vòi lông): Cây cỏ nhám, thân tròn, gần như không lông; mọc hoang ở nơi ẩm, gần ruộng, rạch chưa được nghiên cứu [5]-[7].

Mặt khác, thành phần hóa học chính của các loài thuộc chi *Pouzolzia* là các hợp chất chủ yếu thuộc nhóm triterpenoid (khoảng 15 hợp chất), flavonoid (10 hợp chất), ngoài ra còn có các thành phần khác như phenolic, rotenoid,... Nhóm flavonoid và triterpenoid đã được chứng minh có hoạt tính sinh học phong phú đa dạng như kháng viêm, làm bền thành mạch, chống độc, làm giảm

thương tổn gan, chống oxi hoá, virus và ung thư... [8]-[10]. Điều đó cho biết một số thực vật chi *Pouzolzia* có thể được sử dụng để tạo chế phẩm có tác dụng kháng viêm tốt.

Với những thông tin tìm hiểu có được sự có mặt các loài thực vật nêu trên, bài báo theo định hướng nghiên cứu thành phần hóa học và hoạt tính kháng viêm *in vitro* của loài Bọ mắm (*Pouzolzia zeylanica*) ở Việt Nam nhằm tìm ra các cao chiết và hoạt chất có hoạt tính tốt từ được liệu địa phương phục vụ công tác chăm sóc sức khoẻ và cũng như phát triển kinh tế đất nước.

2. Phương pháp nghiên cứu và thực nghiệm

2.1. Mẫu thực vật

Mẫu thân lá cây thu hái tại Đại Từ, Thái Nguyên vào tháng 6 năm 2022, được Tiến sĩ Nguyễn Quốc Bình, Bảo tàng Thiên nhiên Việt Nam xác định tên khoa học là *Pouzolzia zeylanica* (L.) Benn., họ Urticaceae. Tiêu bản mẫu được lưu trữ tại Bảo tàng Thiên nhiên Việt Nam, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

2.2. Chiết xuất dịch chiết ethanol toàn phần và các cận chiết phân đoạn

Mẫu thân lá cây Bọ mắm khô (2,5 kg), được nghiền nhỏ và chiết với ethanol (3x5 lít) trong thiết bị siêu âm, ở nhiệt độ phòng, cất loại dung môi bằng áp suất giảm thu được 160 g cận chiết ethanol (**PZ**). Cận này được hòa vào nước cất và tiến hành chiết phân bố với *n*-hexan, ethyl acetate thu được các cận chiết tương ứng: cận *n*-hexan ký hiệu là **PZH** (45 g), cận ethyl acetate ký hiệu là **PZE** (30 g) và cận nước ký hiệu là **PZW** (84 g).

2.3. Phương pháp chiết tách và xác định cấu trúc các hợp chất

Việc phân tích, phân tách các phần dịch chiết của cây được thực hiện bằng các phương pháp sắc ký khác nhau như sắc ký lớp mỏng (TLC), sắc ký cột thường (CC) với pha tĩnh là silica gel (Merck).

Sắc ký lớp mỏng (TLC): Dùng để khảo sát thành phần được thực hiện trên bản mỏng tráng sẵn DC-Alufoilen 60 F254 (0,25 mm; Merck) và RP-18 F254S (0,25 mm; Merck). Phát hiện chất bằng đèn tử ngoại ở hai bước sóng 254 nm và 365 nm hoặc dùng thuốc thử là dung dịch vanilin - H₂SO₄ 5% trong metanol.

Sắc ký cột (CC): Sắc ký cột thường với pha tĩnh là silica gel 60, cỡ hạt 0,040 - 0,063 mm (230 - 400 mesh) của Merck, dung môi rửa giải chủ yếu là loại phân tích, công nghiệp.

Các chất phân lập được ở dạng tinh khiết là đối tượng để khảo sát các đặc trưng vật lý: màu sắc, dạng thù hình, R_f, điểm nóng chảy,... Khi các chất đủ sạch sẽ tiến hành ghi các phổ khối lượng (MS), phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) một chiều: proton (¹H-NMR), cacbon-13 (¹³C-NMR), phổ DEPT và phổ cộng hưởng từ hạt nhân hai chiều: HSQC và HMBC với các kỹ thuật khác nhau tùy theo đối tượng cụ thể.

Phương pháp xác định cấu trúc hóa học các hợp chất được sử dụng các thiết bị hiện đại. Các thiết bị và phương pháp sử dụng gồm:

Phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR): Đo 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. Các kỹ thuật phổ cộng hưởng từ hạt nhân được sử dụng:

Phổ cộng hưởng từ hạt nhân một chiều: ¹H-NMR, ¹³C-NMR và DEPT.

Phổ cộng hưởng từ hạt nhân hai chiều: HSQC, HMBC.

Dung môi được sử dụng bao gồm các dung môi DMSO-d₆, CD₃OD và CDCl₃. Lựa chọn dung môi đo phụ thuộc vào bản chất của từng mẫu, theo nguyên tắc dung môi phải hòa tan hoàn toàn mẫu đo.

2.4. Phân lập các hợp chất từ cây Bọ mắm

Cận chiết ethyl acetate **PZE** (28 g) được tiến hành tách thô trên sắc ký cột silica gel pha thường với hệ dung môi rửa giải *n*-hexan, *n*-hexan/ethyl acetat (tỷ lệ EtOAc tăng từ 0→100%), CHCl₃/MeOH (tỷ lệ MeOH tăng từ 0→100%) thu được 4 phân đoạn là **PZH2** (3,1 g), **PZH3** (4,5

g), **PZE1** (2,3 g) **PZE2** (5,0 g). Tiếp tục phân tách, tinh chế các phân đoạn trên bằng sắc ký cột silica gel pha thường đã phân lập được 3 chất sạch sau: Từ phân đoạn **PZH3**, sau khi phân lập và kết tinh lại trong acetone thu được vitexin (12,1 mg, **1**), từ phân đoạn **PZE1** thu được baurenol (15,3 mg: **2**) và từ phân đoạn **PZE2** thu được vitexin (9,5 mg: **3**)

Naringenin (1): Bột vô định hình, màu vàng; ^1H NMR (CD_3OD , 600 MHz) và ^{13}C NMR (CD_3OD , 150 MHz).

^1H -NMR (600MHz, CDCl_3 , TMS, δ ppm): 5,42 (dd, $J = 12,6$ và $3,0$ Hz, H-2); 3,22 (dd, $J = 16,8$ và $12,6$ Hz, H-3a); 2,67 (dd, $J = 16,8$ và $3,0$ Hz, H-3b); 5,89 (s, H-6 và H-8); (1H, dd, $J = 4,5$ Hz và $11,5$ Hz, H-3); 7,30 (d, $J = 8,4$ Hz, H-2' và H-6'); 6,80 (d, $J = 8,4$ Hz, H-3' và H-5').

^{13}C -NMR (150MHz, CDCl_3 , TMS, δ ppm): 78,5 (C-2); 42,0 (C-3); 196,3 (C-4); 163,6 (C-5); 95,9 (C-6); 166,8 (C-7); 95,9 (C-8); 163,0 (C-9); 101,8 (C-10); 128,9 (C-1'); 128,3 (C-2' và C-6'); 115,2 (C-3' và C-5') ; 157,8 (C-4').

Baurenol (2): Bột vô định hình, màu trắng; ^1H NMR (CD_3OD , 600 MHz) và ^{13}C NMR (CD_3OD , 150 MHz).

^1H -NMR (600MHz, CDCl_3 , TMS, δ ppm): 5,23 (1H, d, $J = 6,0$ Hz, H-7); 3,20 (1H, dd, $J = 4,5$ Hz và $11,5$ Hz, H-3); 1,03 (3H, s, H-26); 0,98 (3H, s, H-27); 0,88 (3H, s, H-29); 0,83 (3H, d, $J = 6,5$ Hz, H-29); 0,81 (3H, s, H-24); 0,80 (3H, s, H-30); 0,76 (3H, s, H-25); 0,75 (3H, s, H-27).

^{13}C -NMR (150MHz, CDCl_3 , TMS, δ ppm): 36,03 (C-1); 27,7 (C-2); 78,9 (C-3); 39,6 (C-4); 52,3 (C-5); 21,4 (C-6); 114,3 (C-7); 148,9 (C-8); 52,1 (C-9); 38,2 (C-10); 20,2 (C-11); 28,2 (C-12); 39,1 (C-13); 42,8 (C-14); 29,7 (C-15); 35,9 (C-16); 36,8 (C-17); 59,6 (C-18); 30,7 (C-19); 41,0 (C-20); 27,8 (C-21); 36,0 (C-22); 28,2 (C-23); 15,6 (C-24); 15,3 (C-25); 22,1 (C-26); 14,0 (C-27); 23,0 (C-28); 22,1 (C-29); 17,0 (C-30).

Vitexin (3): Bột vô định hình, màu vàng; ^1H NMR (CD_3OD , 600 MHz) và ^{13}C NMR (CD_3OD , 150 MHz).

^1H -NMR (600MHz, CDCl_3 , TMS, δ ppm): 6,63 (1H, s, H-3); 6,30 (1H, s, H-6); 8,01 (2H, d, $J = 6,5$ Hz, H-2' và H-6'); 6,97 (2H, d, $J = 7,5$ Hz, H-3' và H-5'); 5,01 (1H, d, $J = 8,5$ Hz, H-1''); 4,14 (1H, t, $J = 8,5$ Hz, H-2''); 3,47 (1H, m, H-3''); 3,56 (1H, m, H-4''); 3,67 (1H, m, H-5''); 3,98 (1H, d, $J = 10,5$ Hz, H-6''a) ; 3,82 (1H, dd, $J = 4,5$ và $10,0$ Hz, H-6''b)

^{13}C -NMR (150MHz, CDCl_3 , TMS, δ ppm): 164,3 (C-2); 103,8 (C-3); 184,0 (C-4); 158,0 (C-5); 99,4 (C-6); 162,7 (C-7); 105,5 (C-8); 156,0 (C-9); 105,8 (C-10); 123,6 (C-1'); 130,2 (C-2' và C-6'); 117,1 (C-3' và C-5'); 162,5 (C-4') ; 75,2 (C-1''); 72,8 (C-2''); 80,3 (C-3''); 72,3 (C-4''); 83,0 (C-5''); 63,1 (C-6'').

2.5. Phương pháp đánh giá hoạt tính kháng viêm thông qua ức chế sản sinh NO

Được thử nghiệm tại Phòng Sinh học thực nghiệm – Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên, VAST.

Thử nghiệm hoạt tính kháng viêm *in vitro*: Hoạt tính kháng viêm *in vitro* thông qua khả năng ức chế sản sinh NO trên đại thực bào RAW 264.7 (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA). Nuôi cấy tế bào RAW 264.7 theo phương pháp của Fumio Amano và cộng sự. Xác định hoạt tính kháng viêm trên dòng tế bào RAW 264.7 theo phương pháp phân tích Griess của Verena M. Dirsch và cộng sự.

Cách tiến hành cụ thể như sau: Tế bào RAW 264.7 (đại thực bào chuột) được nuôi cấy 48 giờ trong môi trường nuôi cấy Dulbecco cải tiến (DMEM-Dulbecco's Modified Eagle Medium) ở 37°C , 5% CO_2 , 10% huyết thanh phôi bò (FBS-Fetal Bovine Serum). Sau đó dịch tế bào được chuyển lên giếng phiên 96 với mật độ $2,5 \times 10^5$ tế bào/giếng. Tế bào được kích thích với 2 μl mẫu đối chứng (-) LPS (0,1 mg/ml) trong 24 giờ và bổ sung thuốc hoặc chất thử ở các nồng độ khác nhau. Cardamonin được sử dụng làm mẫu đối chứng (+). Dịch huyền phù của tế bào được ủ với thuốc thử Griess và NaNO_2 ở các nồng độ khác nhau để xây dựng đường chuẩn. Đo hỗn hợp phản ứng ở bước sóng $\lambda = 570$ nm. Hàm lượng NO càng cao thì mật độ quang càng lớn và được xác định dựa vào đường chuẩn NaNO_2 , so sánh % với mẫu đối chứng (-) LPS.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Kết quả xác định cấu trúc các hợp chất

3.1.1. Naringenin (1)

Phổ ^1H -NMR của hợp chất **1** quan sát được tín hiệu của 2 proton thơm meta tại δ_{H} 5,86 (2H, s, H-6 và H-8) ở vùng từ trường thấp; 4 proton thơm ortho tại δ_{H} 6,78 (2H, d, $J = 8,5$ Hz, H-3' và H-5') và δ_{H} 7,31 (2H, d, $J = 8,5$ Hz; H-2' và H-6'). Điều này cho thấy cấu trúc của hợp chất **1** có một vòng thơm hai nhóm thế và một vòng thơm bốn nhóm thế. Ngoài ra, ở vùng từ trường thấp còn có tín hiệu đặc trưng của 1 nhóm hydroxyl kiềm nổi tại δ_{H} 12,14 (1H, s, 5-OH)]. Mặt khác, ở vùng từ trường cao có sự xuất hiện tín hiệu của 2 proton của nhóm methylene tại δ_{H} 2,86 (1H, dd, $J = 17,0$ Hz và 3,0 Hz, H-3a)] và δ_{H} 3,24 (1H, dd, $J = 17,0$ Hz và 13,0 Hz, H-3b), cùng với 1 proton của nhóm oxymethine tại δ_{H} 5,42 (1H, dd, $J = 13,0$ Hz và 3,0 Hz; H-2). Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất **1** cho thấy có tín hiệu của 15 carbon. Trong đó có 1 carbon carbonyl của nhóm ketone [δ_{C} 196,1; C-4]; 4 carbon thơm mang nhóm thế nối với oxygen tại C-4' (δ_{C} 157,7), C-5 (δ_{C} 162,9), C-9 (δ_{C} 163,5) và C-7 (δ_{C} 167,1); 2 carbon thơm mang nhóm thế tại C-10 (δ_{C} 101,6), C-1' (δ_{C} 128,9); 6 carbon methine thơm tại δ_{C} 95,1 (C-8), δ_{C} 95,9 (C-6), δ_{C} 115,2 (C-3' và C-5'), δ_{C} 128,2 (C-2' và C-6'); 1 carbon methylene tại δ_{C} 41,9 (C-3); 1 carbon oxymethine tại δ_{C} 78,3 (C-2). So sánh dữ liệu phổ NMR của hợp chất **1** với hợp chất naringenin cho thấy có sự tương hợp [11]. Vậy hợp chất **1** là naringenin.

3.1.2. Vitexin (3)

Hợp chất **3** dạng bột, màu vàng (8,5 mg). Phổ ^1H -NMR của **3** cho biết 2 tín hiệu của 4 proton hệ vòng thơm AA'BB' dưới dạng doublet của vòng B tại δ_{H} 8,01 (2H, d, $J = 6,5$ Hz, H-2',6') và 6,97 (2H, d, $J = 7,5$ Hz, H-3',5'), tín hiệu của 2 proton dưới dạng singlet tại 6,63 (1H, s, H-6) và 6,30 (1H, s, H-3) của phần flavone aglycone, tín hiệu đặc trưng của proton anomeric của phân tử đường gắn trực tiếp vào carbon flavone aglycone tại δ_{H} 5,01 (1H, d, $J = 8,5$ Hz, H-1"). Ngoài ra, Phổ ^1H -NMR cũng xuất hiện các tín hiệu đặc trưng khác của phân tử đường tại δ_{H} 3,4 - 4,2 ppm.

Phổ ^{13}C -NMR kết hợp với phân tích dữ liệu phổ của **3** quan sát được tín hiệu của 19 carbon không tương đương, gồm 1 nhóm methylene tại δ_{C} 63,1 (C-6"), 9 nhóm methine tại δ_{C} 130,2 (C-2',6"); 117,1 (C-3',5"), 103,8 (C-3), 99,4 (C-6), 75,2 (C-1"); 72,8 (C-2"); 80,3 (C-3"); 72,3 (C-4") và 83,0 (C-5"), 8 carbon bậc 4 tại δ_{C} 164,3 (C-2); 158,0 (C-5); 162,7 (C-7); 105,5 (C-8); 156,0 (C-9); 105,8 (C-10); 123,6 (C-1'); 162,5 (C-4') và 1 nhóm carbonyl tại δ_{C} 184,0 (C-4). **3** có tín hiệu đặc trưng của một phân tử đường C-glucopyranosyl tại δ_{C} 75,2 (C-1"); 72,8 (C-2"); 80,3 (C-3"); 72,3 (C-4"); 83,0 (C-5"); 63,1 (C-6") với hằng số ghép lớn $J_{\text{H-1''/H-2''}} = 8,5$ Hz.

Phổ HMBC của **3** cho biết tương tác giữa H-3 (δ_{H} 6,30) với C-1' (δ_{C} 123,6), C-2 (δ_{C} 164,3), C-4 (δ_{C} 184,0) và C-10 (δ_{C} 105,8); giữa H-6 (δ_{H} 6,63) với C-5 (δ_{C} 158,0), C-7 (δ_{C} 162,7) và C-10 (δ_{C} 105,8) khẳng định hai proton ở vị trí lần lượt tại C-3 và C-6. Tương tác giữa H-1" (δ_{H} 5,01) với C-8 (δ_{C} 105,5) xác nhận phần đường liên kết với flavone aglycone tại C-8.

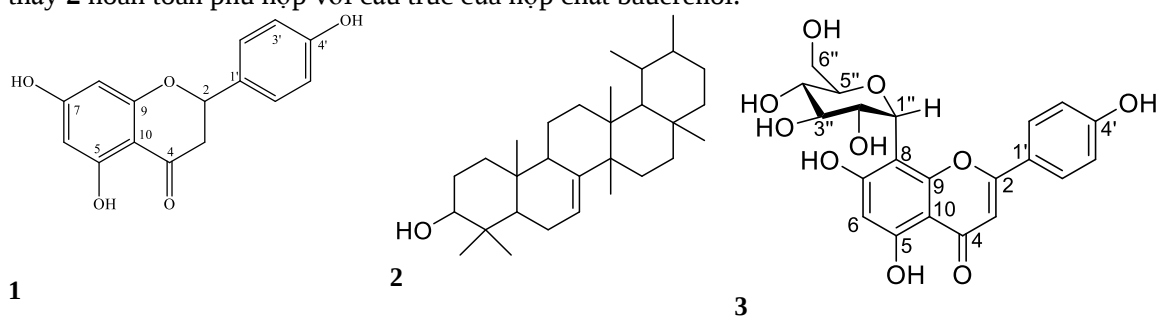
Phân tích các dữ liệu phổ NMR của **3**, kết hợp với so sánh dữ liệu phổ của hợp chất tham khảo [12], có thể khẳng định hợp chất **3** có tên gọi là vitexin, có cấu trúc hóa học và tương tác HMBC (H $\rightarrow$ C) chính như hình 1.

3.1.3. Bauerenol (2)

Phổ ^1H -NMR cho biết có 8 tín hiệu của nhóm CH_3 trong độ dịch chuyển hoá học δ_{H} (0,75ppm – 1,03ppm). Tín hiệu của proton CH liên kết với nhóm OH tại δ_{H} (1H, dd, $J = 4,5$ và 11,5 Hz, H-3). Tín hiệu proton tại δ_{H} 2,03 ppm (1H, m, H-18) thuộc nhóm CH có tương tác với nhóm CH_3 là đặc trưng cho các tritecpen thuộc kiểu khung ursan. Tín hiệu của proton tại δ_{H} 5,23ppm (1H, d, $J = 6,0$ Hz, H-7) đặc trưng cho CH nối đôi với cacbon tương ứng tại δ_{C} 114,3 ppm (C-7). Tất cả những dữ liệu trên cho thấy hợp chất **2** là tritecpen thuộc khung ursan.

Kết hợp các dữ liệu phổ ^{13}C -NMR và DEPT cho biết trong phân tử có 30 nguyên tử cacbon, những số liệu này đã cho phép khẳng định chất **2** là một tritecpenoit. Trong đó có 8 nhóm CH_3 , 9 nhóm CH_2 , 7 nhóm CH và 6 cacbon bậc 4, có 1 cacbon đặc trưng cho CH liên kết đôi. Trên phổ ^{13}C -NMR quan sát thấy đặc trưng của nhóm CH tại δ_{C} 114,3 ppm, tín hiệu của nhóm CH liên kết với OH tại δ_{C} 78,9 ppm (C-3) với proton tương ứng tại δ_{H} 3,20 ppm (1H, dd, $J=4,5$ và 11,5 Hz).

Phân tích các dữ kiện phổ HSQC kết hợp với phổ HMBC và tài liệu của P. S. Kumar [13] cho thấy **2** hoàn toàn phù hợp với cấu trúc của hợp chất bauerenol.



Hình 1. Cấu trúc hóa học của các hợp chất 1-3

3.2. Thử nghiệm hoạt tính ức chế sản sinh nitric oxide trên tế bào RAW 264.7

Thử hoạt tính kháng viêm *in vitro* của các cặn chiết thu nhận từ bộ mầm được đánh giá thông qua sự ức chế sinh ra NO kích thích bởi LPS trên đại thực bào RAW 264.7. Kết quả thử hoạt tính kháng viêm của các cặn chiết được trình bày tại bảng 1.

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

Tên mẫu	Tỷ lệ ức chế sản sinh NO (%)	Tỷ lệ tế bào sống sót (%)	IC ₅₀
Đối chứng (-)	100,00 ± 0,8	102,32 ± 0,5	
Đối chứng (+)	46,54 ± 0,9	85,34 ± 0,6	
[Cardamonin]	88,02 ± 1,1	70,34 ± 0,31	2,35 μM
LPS	0,00 ± 0,4	-	
Cặn PZ	78,23 ± 0,4	80,23 ± 0,5	15,24 μg/ml
Cặn PZH	80,43 ± 1,2	62,4 ± 0,6	12,08 μg/ml
Cặn PZE	66,43 ± 0,9	77,43 ± 1,2	38,43 μg/ml
Cặn PZW	37,63 ± 1,0	69,34 ± 0,9	>100,00 μg/ml
1	33,78 ± 1,1	77,35 ± 0,8	-
2	65,34 ± 0,4	79,32 ± 1,3	33,24 μM
3	73,89 ± 1,0	82,90 ± 0,2	20,85 μM

Kết quả ở bảng 1 cho thấy, các cặn chiết đều thể hiện hoạt tính ức chế đại thực bào RAW 264.7 sản sinh NO ở các khoảng nồng độ khảo sát ($p < 0,05$) với LPS đối chứng (-), đối chứng (+) là cardamonin 0,3 μM. Cặn tổng **PZ** ở nồng độ 100 μg/ml có khả năng ức chế sản sinh NO mạnh và không gây độc cho cho tế bào với IC₅₀ là 15,24 μg/ml. Cặn **PZH** biểu hiện hoạt tính kháng viêm tốt với IC₅₀ là 12,08 μg/ml. Như vậy, hoạt tính kháng viêm của cây bộ mầm tập trung chủ yếu ở phân đoạn ít phân cực. Hợp chất vitexin có khả năng ức chế sản sinh NO mạnh và không gây độc cho cho tế bào với IC₅₀ là 20,85 μM, sau đó đến hợp chất bauerenol với IC₅₀ là 33,24 μM, hợp chất naringenin không thể hiện hoạt tính.

4. Kết luận

Từ thân lá cây Bộ mầm (*Pouzolzia zeylanica*) đã phân lập và xác định cấu trúc hóa học 3 hợp chất: Naringenin (**1**), bauerenol (**2**) và vitexin (**3**). Cấu trúc hóa học của các hợp chất đều được khẳng định bằng phổ cộng hưởng từ hạt nhân một chiều và hai chiều, kết hợp so sánh với dữ liệu phổ NMR của các hợp chất đã công bố. Cặn tổng **PZ** thể hiện hoạt tính ức chế sản sinh NO trên

đại thực bào RAW 264.7 mạnh và không gây độc cho tế bào với IC_{50} là 15,24 $\mu\text{g/ml}$. Cặn **PZH** biểu hiện hoạt tính kháng viêm tốt với IC_{50} là 12,08 $\mu\text{g/ml}$. Hợp chất vitexin có khả năng ức chế sản sinh NO mạnh và không gây độc cho tế bào với IC_{50} là 20,85 μM .

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] H. P. Kim, K. H. Son, H. W. Chang, and S. S. Kang, "Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms," *Journal of Pharmacological Sciences*, vol. 96, pp. 229-245, 2004.
- [2] A. R. Amin, M. Attur, and S. B. Abramson, "Nitric oxide synthase and cyclooxygenases: distribution, regulation, and intervention in arthritis," *Curr Opin Rheumatol*, vol. 11, pp. 202-209, 1999.
- [3] J. N. Sharma, A. Al Omran, and S. S. Parvathy, "Role of nitric oxide in inflammatory diseases," *Inflammopharmacology*, vol. 15, pp. 252-259, 2007.
- [4] D. M. La, M. H. Tran, D. H. Duong, H. T. Tran, and K. B. Ninh, *Vietnam plant resources - Plants containing biologically active compounds I*. Agriculture Publishing House, 2009, pp. 2-15.
- [5] T. C. Le, *Some basic characteristics of Vietnam's flora*. Science and Technology Publishing House, 1999, p. 307.
- [6] H. H. Pham, *Vietnamese plants II*. Ho Chi Minh City Youth Publishing House, 2000, pp. 602-603.
- [7] V. C. Vo, *Dictionary of Vietnamese medicinal plants I*. Medical Publishing House, 2011, pp. 189-192.
- [8] D. Saha et al., "Antifungal Activity of ethanol extract of *Pouzolzia zeylanica* (L.) Benn," *International Journal of Pharmaceutical Teaching & Practices*, vol. 3, no. 1, p. 272, 2012.
- [9] C. Yanfen, L. I. Kaiying et al., "Therapeutic Effect and Mechanism of *Pouzolzia zeylanica* on Skin Ulcers in Rats [J]," *Traditional Chinese Drug Research and Clinical Pharmacology*, vol. 3, 2013, Art. no. 011.
- [10] X.-M. Chen, Z.-H. Li et al., "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.
- [11] A. R. S. Ibrahim, A. M. Galal, M. S. Ahmed, and G. S. Mossa, "Demethylation and sulfation of 7-methoxylated flavanones by *Cunninghamella elegans*," *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, vol. 51, pp. 203-206, 2003.
- [12] J. Gupta and A. Gupta, "Isolation and characterization of flavonoid glycoside from leaves of *Abrus precatorius*," *International Journal of Chemical Studies*, vol. 4, no. 1, pp. 14-17, 2016.
- [13] P. S. Kumar, "Bauerenol, a triterpenoid from Indian *Suregada angustifolia*: Induces reactive oxygen species-mediated P38MAPK activation and apoptosis in human hepatocellular carcinoma (HepG2) cells," *Tumor Biology*, vol. 39, no. 4, 2017, doi: 10.1177/1010428317698387.