

Thành phần hóa học và hoạt tính gây độc tế bào của lá cây Vót dạng côm cháy *Viburnum sambucinum* (Caprifoliaceae)

Nguyễn Thanh Trà^{1*}, Trương Bích Ngân², Đoàn Thị Mai Hương², Đỗ Thị Thảo³,
Marc Litaudon⁴, Nguyễn Văn Hùng², Châu Văn Minh², Phạm Văn Cường²

¹Viện Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

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

³Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

⁴Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên, 91190 Gif-sur-Yvette Cedex, Cộng hòa Pháp

Đến Toà soạn 29-7-2016; Chấp nhận đăng 25-10-2016

Abstract

Viburnum sambucinum is a small woody tree belongs to the genus *Viburnum* (Caprifoliaceae), mainly distributed in Vietnam, Lao and Cambodia. Extensive studies of the genus *Viburnum* have led to the identification of many compounds, such as diterpenes, triterpenes, iridoids, monoterpenes, sesquiterpenes, flavonoids, lignans, etc. In previous study, we reported 6 terpenoids isolated from the leaves of *Viburnum sambucinum*. In this study, we describe the isolation and structural characterizations of four compounds hupehenol D (**1**), hupehenol A (**2**), 12 β -hydroxy-3,15-dioxo-20,21,22-23,24,25,26,27-octanordammanran (**3**), luteolin (**4**) and *in vitro* cytotoxic activities of ten compounds (**1-10**) from the leaves of *Viburnum sambucinum*. Compound **1** and **3** exhibited significant cytotoxic activity against 4 cancer cell lines with IC₅₀ value 4.71 \pm 0.03-5.35 \pm 0.04 μ M. The compounds **2**, **4**, **6**, **7** and **9** displayed week cytotoxicity with IC₅₀ values ranging from 9.31 \pm 0.12 to 82.06 \pm 0.94 μ M.

Keywords. *Viburnum sambucinum*, Caprifoliaceae, nordammarane, cytotoxicity activity.

1. MỞ ĐẦU

Ung thư là một trong những nguyên nhân hàng đầu gây tử vong ở người trên toàn thế giới. Có tới hàng triệu người mỗi năm được chẩn đoán bị ung thư và dẫn đến tử vong. Hiệp hội Ung thư quốc gia Mỹ (American Cancer Society) dự đoán 27 triệu bệnh nhân mắc mới và 17,5 triệu ca tử vong do ung thư trên toàn cầu vào năm 2050 [1]. Vì vậy, việc nghiên cứu phát triển các thuốc chữa bệnh ung thư đang thu hút sự quan tâm rất lớn của nhiều nhà khoa học. Trong đó, thực vật có tác dụng làm thuốc hiện đang là yếu tố hứa hẹn cho công cuộc phát triển thuốc điều trị ung thư.

Chi Vót *Viburnum* (Caprifoliaceae) bao gồm khoảng 200 loài, phân bố rộng rãi khắp Nam Mỹ, Trung Quốc, Đông Nam Á [2]. Ở Việt Nam có khoảng 12 loài trong đó có Vót dạng côm cháy *Viburnum sambucinum* [3]. Nhiều loài thuộc chi Vót được sử dụng như thuốc thảo dược chữa các bệnh ho, hen suyễn, tiêu chảy, viêm khớp dạng thấp, sưng phù, lợi tiểu, chống co thắt và an thần [4]. Kết quả nghiên cứu về thành phần hóa học của chi *Viburnum* cho thấy các loài thuộc chi này chứa lớp chất iridoid,

vibsan diterpene, triterpen, flavonoid, lignan, coumarin... [5-7]. Trước đây chúng tôi đã công bố về việc phân lập 6 hợp chất terpenoid từ lá cây Vót dạng côm cháy [8]. Trong bài báo này, chúng tôi công bố kết quả phân lập, xác định cấu trúc của 3 hợp chất triterpenoid khung nordammarane (**1-3**), 1 hợp chất flavonoid (**4**) và đánh giá khả năng gây độc tế bào ung thư của 10 hợp chất (**1-10**) từ lá cây Vót dạng côm cháy *Viburnum sambucinum*.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Thiết bị và nguyên liệu

Điểm nóng chảy được đo trên máy MEL-TEM 3.0. Phổ cộng hưởng từ hạt nhân NMR được ghi trên máy Bruker Avance 400 MHz và 500 MHz với TMS là chất chuẩn nội. Phổ khối lượng (ESI-MS) được đo trên máy sắc ký lỏng ghép khối phổ với đầu dò MSD (LC/MSD Agilent series 1100), sử dụng đầu dò DAD. Sắc ký lớp mỏng (TLC) được thực hiện trên bản mỏng silica gel Merck 60 F₂₅₄. Sắc ký cột được tiến hành với silica gel cỡ hạt 40-

63 μm và sephadex LH-20 (Aldrich).

Mẫu thực vật: Lá cây Vót dạng com cháy được thu hái tại Sa Pa, Lào Cai vào tháng 7 năm 2006. Mẫu tiêu bản kí hiệu VN1681 được lưu giữ tại Phòng Tiêu bản, Viện Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Tên khoa học được Tiến sĩ Nguyễn Quốc Bình, Bảo tàng Thiên nhiên Việt Nam, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam định tên.

Các dòng tế bào ung thư thực nghiệm: Các dòng tế bào ung thư của người được cung cấp bởi Bảo tàng giống chuẩn Hoa Kỳ (ATCC) bao gồm: ung thư biểu mô biểu bì miệng KB (CCL-17TM), ung thư phổi LU-1 (HTB-57TM), ung thư gan Hep G2 (HB-8065TM), ung thư vú MCF-7 (HTB-22TM) được chuẩn hóa và nuôi cấy thường quy tại phòng Hóa sinh ứng dụng - Viện Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

2.2. Phân lập các hợp chất từ lá cây Vót dạng com cháy

Mẫu lá cây sau khi phơi khô, nghiền nhỏ được ngâm chiết lần lượt với các dung môi *n*-hexan, etylaxetat và metanol trong 24 h/3 lần ở nhiệt độ phòng. Sau khi cất loại dung môi dưới áp suất giảm thu được các cặn chiết *n*-hexan (39 g), cặn etylaxetat (65 g) và cặn metanol (129 g).

Tiến hành sắc ký cột silica gel cặn EtOAc (65 g) với hệ dung môi *n*-hexan/EtOAc gradient (100:0-0:100), thu được 12 phân đoạn chính, kí hiệu F1-F12. Từ phân đoạn F2 (0,9 g), sau khi tinh chế bằng cột silica gel với hệ dung môi *n*-hexan/EtOAc gradient, thu được 5 phân đoạn nhỏ kí hiệu F2.1-F2.5. Tinh chế tiếp phân đoạn F2.5 (300 mg) trên cột Sephadex LH-20 với hệ dung môi (metanol/diclometan 8/2) và cột silica gel (*n*-hexan/axeton gradient) thu được hợp chất **5** (11 mg) và hợp chất **10** (15 mg). Phân đoạn F3 (2,1 g) được tinh chế trên cột silica gel với hệ dung môi *n*-hexan/axeton gradient (95:5-0:100) thu được 3 phân đoạn nhỏ F3.1-F3.3. Hợp chất **9** (7 mg) thu được từ phân đoạn nhỏ F3.1 sau khi kết tinh trong *n*-hexan. Phân đoạn F3.3 (130 mg) được phân tách trên cột silica gel (*n*-hexan/axeton 93:7-0:100) rồi kết tinh trong acetone thu được hợp chất **7** (8 mg). Phân đoạn F4 (1,75 g) được tinh chế trên cột silica gel sử dụng hệ dung môi *n*-hexan/EtOAc gradient (100:0-0:100) thu được 3 phân đoạn nhỏ F4.1-F4.3. Tiếp tục tinh chế F4.3 bằng cột silica gel (diclometan/axeton 98:1-0:100) thu được hợp chất **8** (5 mg) và **6** (7 mg). Phân đoạn F10 (7,5 g) được phân tách trên cột silica gel với hệ dung môi diclometan/metanol gradient (0-70 %) thu được 5 phân đoạn nhỏ F10.1-F10.5. Phân đoạn

F10.3 (1,0 g) được tinh chế bằng cột silica gel với hệ dung môi CH₂Cl₂/MeOH, sau đó tinh chế trên bản mỏng điều chế (*n*-hexan/EtOAc 6/4) thu được hợp chất **3** (8 mg). Phân đoạn F10.4 (2,5 g) được phân tách bằng cột Sephadex (MeOH/CH₂Cl₂ 9/1) và cột silica gel (CH₂Cl₂/axeton) và bản mỏng điều chế (CH₂Cl₂/EtOAc 8/2) thu được hợp chất **1** (10 mg) và hợp chất **2** (7 mg). Phân đoạn F11(3,5 g) được tinh chế trên cột silica gel với hệ dung môi diclometan/EtOAc gradient (0-100 %) thu được 4 phân đoạn nhỏ F11.1-F11.4. Kết tinh phân đoạn F11.1- F11.2 trong acetone thu được chất **4** (8 mg).

Hupehenol D (1)

Chất rắn màu trắng, đnc: 121-122 °C; $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ -95,8 (*c* 0,14; CHCl₃); HRESI-MS (*m/z*): 347,2597 [M+H]⁺ và 329,2480 [M-H₂O+H]⁺; (IR): cacbonyl (ν_{max} 1698 cm⁻¹, 1657 cm⁻¹); -OH (ν_{max} 3461). ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ_{H} (ppm) 0,77 (1H, m, H-5); 0,78 (3H, s, CH₃); 0,87 (3H, s, CH₃), 0,98 (3H,s, CH₃); 1,01 (1H, m, H_a-1); 1,05 (3H, s, CH₃); 1,18 (3H, s, CH₃); 1,22 (1H, m, H-11a); 1,48 (1H, m, H-7); 1,50 (1H, m, H_a-6); 1,50 (1H, dd, *J* = 3,0; 13,0Hz, H-9); 1,59 (1H, m, H_a-2); 1,62 (1H, m, H_b-6); 1,63 (1H, m, H_b-2); 1,67 (1H, m, H_b-1); 2,0 (1H, ddd, *J* = 4,0; 4,0; 12,0 Hz, H_b-11); 2,23 (1H, m, H-7); 2,99 (1H, ddd, *J* = 1,5; 3,0; 11,0 Hz, H-13); 3,19 (1H, dd, *J* = 4,5; 11,5 Hz, H-3); 3,90 (1H, ddd, *J* = 4,0; 11,0; 12,0 Hz, H-12); 5,95 (1H, dd, *J* = 3,0; 5,7 Hz, H-16); 7,71 (1H, dd, *J* = 1,5; 5,7 Hz, H-17). ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ_{C} (ppm) 38,9 (C-1); 27,2 (C-2); 78,7 (C-3); 39,0 (C-4); 56,0 (C-5); 17,9 (C-6); 33,6 (C-7); 39,0 (C-8); 51,0 (C-9); 37,6 (C-10); 33,3 (C-11); 67,4 (C-12); 53,8 (C-13); 59,5 (C-14); 212,4 (C-15); 132,2 (C-16); 159,3 (C-17); 19,7 (C-18); 15,9 (C-19); 28,0 (C-28); 15,3 (C-29); 20,7 (C-30).

Hupehenol A (2)

Chất rắn màu trắng, đnc: 179-180 °C; $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ -6,2 (*c* 0,43; CHCl₃). HRESI-MS (*m/z*): 361,2757 [M-H₂O+H]⁺; (IR): cacbonyl (ν_{max} 1725 cm⁻¹), -OH (ν_{max} 3443 cm⁻¹). ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ_{H} (ppm) 0,74 (1H, dd, *J* = 2,5, 11,5 Hz, H-5); 0,77 (3H, s, CH₃); 0,85 (3H, s, CH₃); 0,97 (3H,s, CH₃); 0,98 (3H,s, CH₃); 1,01 (1H, m, H_a-1); 1,21 (3H, s, CH₃); 1,25 (1H, m, H_a-11); 1,33 (1H, dd, *J* = 2,5; 13,0 Hz, H-9); 1,44 (1H, m, H_a-6); 1,48 (1H, m, H_a-7); 1,58 (1H, m, H_a-2); 1,61 (1H, m, H_b-6); 1,63 (1H, m, H_b-2); 1,67 (1H, m, H_b-1); 2,0 (1H, ddd, *J* = 4,0; 4,0; 12,0 Hz, H_b-11); 2,12 (1H, m, H_b-7); 2,19 (1H, dd, *J* = 6,3; 11,0 Hz, H-13); 2,23 (1H, dd, *J* = 6,5; 19,5 Hz, H-16); 3,19 (1H, dd, *J* = 5,0; 11,5 Hz, H-3); 3,32 (3H, s, OMe); 4,02 (1H, ddd, *J* = 5,0; 11,0; 11,0 Hz, H-12); 4,11 (1H, dd, *J* = 6,3; 6,5 Hz, H-

17). ^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl_3): δ_{C} (ppm) 39,0 (C-1); 27,3 (C-2); 78,7 (C-3); 38,9 (C-4); 55,7 (C-5); 17,9 (C-6); 33,3 (C-7); 39,8 (C-8); 51,6 (C-9); 37,5 (C-10); 31,2 (C-11); 66,6 (C-12); 51,1 (C-13); 56,2 (C-14); 218,8 (C-15); 43,5 (C-16); 75,0 (C-17); 18,7 (C-18); 16,0 (C-19); 28,0 (C-28); 15,3 (C-29); 15,2 (C-30); 57,1 (OMe).

12 β -hydroxy-3,15-dioxo-20,21,22-23,24,25,26,27-octanordammanran (3)

Chất rắn màu trắng, $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ -100 (*c* 0,13; CHCl_3); HRESI-MS (*m/z*): 345,2423 $[\text{M}+\text{H}]^+$; (IR): cacbonyl (ν_{max} 1698 cm^{-1} , 1657 cm^{-1}); -OH (ν_{max} 3461, 2980 cm^{-1}). ^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3): δ_{H} (ppm) 0,96 (3H, s, CH_3); 1,05 (3H, s, CH_3); 1,09 (3H, s, CH_3), 1,09 (3H, s, CH_3); 1,18 (3H, s, CH_3); 1,19 (3H, s, CH_3); 1,30 (1H, m, $\text{H}_{\text{a-11}}$); 1,41 (1H, dd, $J = 3,0$; 12,0 Hz, H-5); 1,49 (1H, m, $\text{H}_{\text{a-1}}$); 1,49 (1H, m, $\text{H}_{\text{a-7}}$); 2,28 (1H, ddd, $J = 3,0$; 3,0; 13,0 Hz, $\text{H}_{\text{b-7}}$); 1,58 (1H, m, H-6); 1,60 (1H, m, H-9); 1,91 (1H, ddd, $J = 4,5$; 8,0; 13,0 Hz, $\text{H}_{\text{b-1}}$); 2,01 (1H, ddd, $J = 4,3$; 4,3; 12,5 Hz, $\text{H}_{\text{b-11}}$); 2,50 (1H, m, H-2); 3,02 (1H, ddd, $J = 1,5$; 3,0; 10,0, H-13); 3,93 ddd, $J = 4,3$; 10,0; 11,0 Hz, H-12); 5,97 (1H, dd, $J = 3,0$; 5,7 Hz, H-16); 7,73 (1H, dd, $J = 1,5$, 5,7 Hz, H-17). ^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl_3): δ_{C} (ppm) 39,7 (C-1); 33,9 (C-2); 217,4 (C-3); 47,4 (C-4); 55,3 (C-5); 19,3 (C-6); 32,8 (C-7); 38,7 (C-8); 50,4 (C-9); 37,3 (C-10); 33,6 (C-11); 67,2 (C-12); 53,8 (C-13); 59,3 (C-14); 212,0 (C-15); 132,2 (C-16); 159,2 (C-17); 19,2 (C-18); 15,7 (C-19); 26,7(C-28); 20,9 (C-29); 20,5 (C-30).

Luteolin (4)

Chất rắn màu vàng, đnc 210-211 °C. ESI-MS (*m/z*): 285 $[\text{M}-\text{H}]^-$. ^1H -NMR (500 MHz, CD_3OD): δ (ppm) 6,22 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-6); 6,42 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-8); 6,56 (1H, s, H-3); 6,92 (1H, d, $J = 8,5$ Hz, H-5'); 7,40 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-2'); 7,41 (1H, dd, $J = 2,0$; 8,5 Hz, H-6').

2.3. Phương pháp gây độc tế bào

Hoạt tính gây độc tế bào được thực hiện dựa trên phương pháp nhuộm màu tế bào bằng thuốc thử tetrazolium (MTT) [9, 10]. Đây là phương pháp đánh giá khả năng sống sót của tế bào thông qua sự đổi màu của MTT. Ở tế bào sống, enzym trong ty thể chuyển hóa MTT thành sản phẩm formazan có màu tím. Các dòng tế bào ung thư được nuôi cấy bằng môi trường DMEM có bổ sung thêm 10 % huyết thanh phôi bò (FBS) và các thành phần cần thiết khác ở điều kiện tiêu chuẩn (5 % CO_2 , 37 °C). Tế bào ở nồng độ 3×10^4 được bổ sung thêm chất thử được pha loãng ở các nồng độ khác nhau được nuôi

ở đĩa 96 giếng, gọi là giếng thí nghiệm (test). Tế bào không bổ sung chất thử được gọi là giếng đối chứng (control). Giếng chỉ có môi trường được gọi là giếng trắng (blank). Các giếng thí nghiệm và đối chứng được lặp lại 3 lần. Chất tham khảo là Ellipticine. Tế bào thử nghiệm được nuôi cấy trong 72 giờ. Kết quả thí nghiệm được xác định bằng giá trị OD (mật độ quang) được đo bằng máy quang phổ (Genious Tecan microplate reader) ở bước sóng 540 nm. Giá trị IC_{50} được xác định thông qua phần trăm ức chế và phần mềm máy tính Rawdata.

$$\% \text{ức chế} = 100\% - \left(\frac{\text{OD}_{\text{control}} - \text{OD}_{\text{test}}}{\text{OD}_{\text{control}} - \text{OD}_{\text{blank}}} \right) \times 100$$

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả xác định cấu trúc hóa học của 4 hợp chất (1-4) từ lá cây Vót dạng cơm cháy

Hợp chất **1** được phân lập dưới dạng chất rắn màu trắng, nóng chảy ở nhiệt độ 121-122 °C, độ quay cực $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ - 95,8 (*c* 0,14; CHCl_3). Phổ hồng ngoại (IR) của hợp chất **1** có các dải hấp thụ đặc trưng cho dao động của các nhóm chức cacbonyl (ν_{max} 1698, 1657 cm^{-1}) và nhóm OH (ν_{max} 3461 cm^{-1}). Phổ khối phân giải cao HRESI-MS của hợp chất **1** xuất hiện pic ion phân tử proton hóa ở *m/z* 347,2597 $[\text{M}+\text{H}]^+$ cho phép xác định công thức phân tử của **1** là $\text{C}_{22}\text{H}_{34}\text{O}_3$ và cho biết phân tử có 6 liên kết đôi tương đương. Phổ ^1H NMR của **1** cho thấy tín hiệu của 5 nhóm methyl singlet ở δ_{H} 1,05 (CH_3 -18), 0,87 (CH_3 -19), 0,98 (CH_3 -28), 0,78 (CH_3 -29) và 1,18 (CH_3 -30), 2 proton oxymethine ở δ_{H} 3,19 (H-3) và 3,90 (H-12), 2 proton olefinic ở δ_{H} 5,95 (H-16) và 7,71 (H-17) và một số tín hiệu proton chồng lấp tại vùng aliphatic. Phân tích phổ ^{13}C NMR và DEPT ghi nhận tín hiệu của 22 cacbon bao gồm 5 nhóm methyl, 5 nhóm metylen, 5 nhóm methin (trong đó có 2 nhóm được xác định liên kết với oxi), 4 cacbon sp^3 bậc 4, 2 cacbon olefinic và 1 nhóm keton. Các mảnh cấu trúc phân tử được thiết lập nhờ phân tích phổ COSY. Các mảnh cấu trúc này sau đó được kết nối bằng phân tích dữ liệu phổ HMBC. Theo đó, tương tác của proton của 2 nhóm methyl CH_3 -28 và CH_3 -29 với cacbon C-3, C-4 và C-5, tương tác của proton CH_3 -19 với cacbon C-1, C-5 và C-10 cho phép xác định sự có mặt của vòng A. Tương tự, tương tác HMBC giữa C-9 với CH_3 -18 và CH_3 -19, C-7 và C-14 với CH_3 -18 và giữa C-13 với CH_3 -30 cho phép xác định các vòng B và C. Cuối cùng tương tác HMBC của cacbon ketone C-15 với CH_3 -30 và H-16 xác nhận sự có mặt của vòng D. Cấu hình tương đối của **1** được xác định nhờ phân tích hằng số tương tác và phân tích phổ NOESY. H-3 cho 1 hằng số tương tác lớn ($J = 11,5$ Hz) và 1 hằng số tương tác nhỏ ($J =$

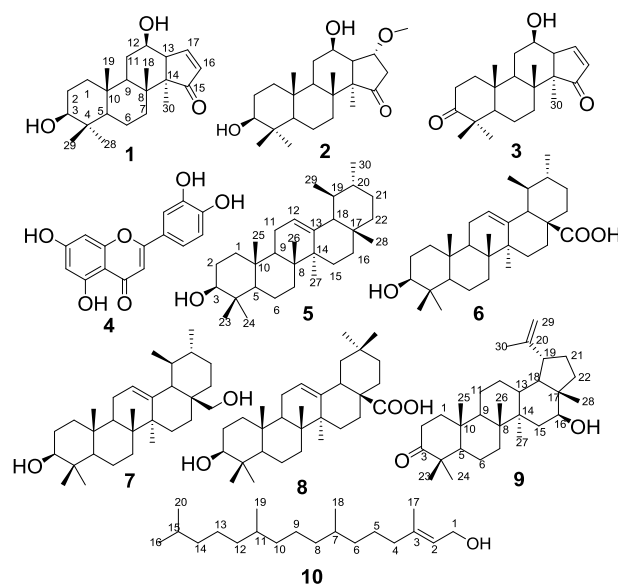
4,5 Hz). Như vậy H-3 chiếm giữ vị trí axial. Tương tự, H-12 thể hiện 2 hằng số tương tác lớn ($J = 11,0$ và $12,0$ Hz) và 1 hằng số tương tác nhỏ ($J = 4,0$ Hz). Từ đó, có thể xác định H-12 và H-13 có mối tương quan *trans*-diaxial. Trên phổ NOESY, xuất hiện tương tác của H-5 với H-3 và H-9, tương tác NOE của CH₃-18 với CH₃-19 và H-13, và tương tác giữa H-12 với CH₃-30. Các phân tích này cho thấy các vòng A, B, C và D đều tiếp giáp nhau theo dạng *trans* (*trans*-fused junction). Ngoài ra các vòng A, B và C đều có cấu dạng ghế. Như vậy, bằng cách kết hợp phân tích các dữ liệu phổ, cấu trúc của **1** được xác định là 3 β ,12 β -dihydroxy-15-oxo-16-en-20,21,22,23,24,25,26,27-octanordammarane (hupehenol D), hợp chất này đã được Chen và cộng sự phân lập lần đầu tiên từ loài *Virbunum hupehense* [11].

Hợp chất **2** được phân lập dưới dạng chất rắn màu trắng. Phân tích dữ liệu phổ NMR cho thấy hợp chất này có cùng khung cấu trúc với **1**. So sánh phổ 1D NMR với hợp chất **1** cho thấy trên phổ của chất **2** mất đi tín hiệu của nối đôi giữa 2 nhóm methine, thay vào đó là sự xuất hiện của 1 nhóm metylen, 1 nhóm oxymethine và 1 nhóm methoxy. Nhóm methoxy được xác định gắn tại vị trí C-17 được xác định qua tương tác của H-17 (δ_H 4,11) với C-13 (δ_C 51,5), C-14 (δ_C 56,2), C-15 (δ_C 218,8) và C-16 (δ_C 45,3) và tương tác giữa proton của nhóm methoxy (δ_H 3,32) với C-17 (δ_C 75,0) trên phổ HMBC. Cấu hình tương đối của **2** được xác định dựa trên phân tích hằng số tương tác proton và phổ NOESY. Ngoại trừ cấu hình C-17, cấu hình của các trung tâm bất đối còn lại đều tương tự như hợp chất **1**. Trên phổ NOESY, H-17 tương tác mạnh với H-13 (δ_H 2,19) và H_a-16 (δ_H 2,23). Ngoài ra CH₃-30 cho tương tác không gian với H_b-16 (δ_H 2,59). Từ phân tích này cho thấy H-17 nằm cùng phía với H-13. Từ các dữ liệu phổ và so sánh với tài liệu tham khảo cho phép xác định hợp chất **2** là hupehenol A [11]. Hợp chất này đã được phân lập lần đầu tiên từ loài *Virburnum hupehense* [11].

Phổ khối phân giải cao HRESI-MS của hợp chất **3** xuất hiện pic ion phân tử proton hóa ở m/z 345,2423 [M+H]⁺. Hợp chất **3** cho các tín hiệu phổ 1D NMR gần tương tự như của hợp chất **1**. Điểm khác biệt của **3** so với **1** là xuất hiện tín hiệu ketone (δ_C 217,4) trong cấu trúc của **3** thay vì tín hiệu của nhóm oxymethine ở vị trí C-3 của **1**. Các tín hiệu còn lại đều được ghi nhận tương tự như đối với hợp chất **1**. Điều này cho phép dự đoán hợp chất **3** là dẫn xuất oxi hóa tại C-3 của **1**. Giả thiết này được khẳng định bằng phân tích phổ 2D NMR. Cấu hình tương đối của **3** cũng được xác định bằng phân tích hằng số tương tác proton và phổ

NOESY. Kết hợp các dữ liệu phổ MS, NMR và so sánh với tài liệu tham khảo [12] cho phép xác định hợp chất **3** là 12 β -hydroxy-3,15-dioxo-20,21,22-23,24,25,26,27-octanordammanran. Hợp chất này đã được Cao và cộng sự phân lập từ loài *Dysoxylum hainanense* [12].

Hợp chất **4** được phân lập dưới dạng chất rắn màu vàng. Phổ khối ESI-MS cho pic ion giả phân tử ở m/z 285,1 [M-H]⁻. Trên phổ ¹H-NMR của hợp chất **1** cho tín hiệu của 3 proton tương tác dạng ABX ở δ_H 7,40 (1H, d, $J = 2,0$ Hz), 7,41 (1H, dd, $J = 8,5; 2,0$ Hz), 6,92 (1H, d, $J = 8,5$ Hz), 2 proton vòng thơm ở vị trí *meta* tại δ_H 6,23 (1H, d, $J = 2,0$ Hz), 6,46 (1H, d, $J = 2,0$ Hz) và tín hiệu của một proton singlet ở δ_H 6,56. So sánh với tài liệu tham khảo [13] và bản mỏng TLC của hợp chất luteolin tại phòng thí nghiệm chúng tôi xác định được hợp chất **4** là luteolin.



Hình 1: Cấu trúc hóa học của các hợp chất **1-10** phân lập từ lá cây Vót dạng com cháy

3.2. Kết quả thử hoạt tính gây độc tế bào của 10 hợp chất phân lập từ lá cây Vót dạng com cháy

Mười hợp chất phân lập từ lá cây Vót dạng com cháy (**1-10**) được đánh giá khả năng gây độc tế bào ung thư trên 4 dòng tế bào ung thư thực nghiệm theo phương pháp MTT được mô tả ở phần 2.3. Kết quả cho thấy 7 hợp chất (**1, 2, 3, 4, 6, 7** và **9**) thể hiện khả năng gây độc trên cả 4 dòng tế bào ở các mức độ khác nhau, trong đó hợp chất **1** và **3** có hoạt tính mạnh nhất với giá trị IC₅₀ nằm trong khoảng $4,71 \pm 0,03$ - $5,35 \pm 0,04$ μ M trên cả 4 dòng tế bào thử nghiệm. Các hợp chất hupehenol A (**2**), luteolin (**4**), axit ursolic (**6**), 3 β ,28-dihydroxy-urs-12-ene (**7**) và 16 β -hydroxylup-20(29)-ene-3-one (**9**) có mức hoạt tính trung bình hoặc hoạt tính yếu trên cả 4 dòng tế bào

với giá trị IC_{50} từ $9,31 \pm 0,12$ - $82,06 \pm 0,94$ μM . Hoạt tính của các hợp chất này cũng đã được khẳng định bởi nhiều công trình khoa học trước đó [14-16]. Ellipticine được dùng làm chất tham khảo có hoạt tính đồng đều trên 4 dòng tế bào thực nghiệm với IC_{50} $1,46 \pm 0,08$ - $2,60 \pm 0,12$ μM .

Trong số 3 hợp chất triterpenoid nordammarane (**1**, **2** và **3**), 2 hợp chất có hoạt tính cao nhất là **1** và **3** đều có nối đôi tại vị trí C-16/C-17. Đồng thời, cấu trúc của **1** khác biệt với **3** ở vị trí C-3. Hoạt tính ức chế tế bào ung thư của **1** tương đương **3**. Như vậy, việc oxi hóa nhóm hydroxy tại C-3 của **1** tạo thành nhóm ketone trong **3** không ảnh hưởng đến hoạt tính của 2 hợp chất này. Trong khi đó, hợp chất **2** cùng khung nordammarane với nối đôi tại vị trí C-16/C-

17 đã bị no hóa và có nhóm metoxy tại C-17 thể hiện hoạt tính yếu hơn nhiều so với **1** và **3**. Như vậy, có thể thấy nối đôi tại 16/C-17 của vòng D đóng vai trò quan trọng đối với hoạt tính ức chế tế bào ung thư của dãy chất này.

Các hợp chất triterpenoid thuộc khung nordammarane là lớp chất ít gặp trong tự nhiên. Kết quả phân lập và hoạt tính sinh học mà chúng tôi thu được phù hợp với một số công trình mới công bố trước đó. Năm 2013 Wang và cộng sự cũng phân lập được một số triterpenoid nordammarane có hoạt tính gây độc tế bào mạnh từ loài *Viburnum mongolicum* với giá trị IC_{50} 9,4-19,1 μM trên nhiều dòng tế bào ung thư thực nghiệm [14].

Bảng 1: Hoạt tính gây độc tế bào của các hợp chất phân lập từ lá cây Vót dạng com cháy trên 4 dòng tế bào ung thư thực nghiệm sau 72 giờ nuôi cấy. $IC_{50} \pm SD$; n = 3; SD: độ lệch chuẩn

TT	Tên chất	Giá trị IC_{50} (μM)			
		KB	Lu	HepG2	MCF7
1	Hupehenol D (1)	5,23±0,07	5,28±0,07	5,16±0,09	5,08±0,10
2	Hupehenol A (2)	78,06±0,29	80,79±0,24	82,06±0,94	79,76±0,26
3	12 β -hydroxy-3,15-dioxo-20,21,22-23,24,25,26,27-octanordammanran (3)	5,08±0,14	5,17±0,08	5,35±0,04	4,71±0,03
4	Luteolin (4)	45,35±0,55	40,87±0,55	47,30±1,03	44,33±0,38
5	α -amyrin(5)	>100	>100	>100	>100
6	Axit ursolic (6)	31,84±0,52	11,54±0,26	40,22±0,41	9,31±0,12
7	3 β ,28-dihydroxy-urs-12-ene (7)	46,94±0,54	49,17±0,76	45,79±0,95	47,66±0,82
8	Axit oleanolic (8)	>100	>100	>100	>100
9	16 β -hydroxylup-20(29)-ene-3-one (9)	47,84±0,19	51,43±0,26	48,60±0,26	50,97±0,43
10	Trans 2-phyten-1-ol (10)	>100	>100	>100	>100
	Ellipticine	2,35±0,16	1,46±0,08	2,60±0,12	1,50±0,12

4. KẾT LUẬN

Từ căn chiết EtOAc lá cây Vót dạng com cháy chúng tôi đã phân lập và thử hoạt tính gây độc tế bào của 10 hợp chất. Kết quả thử hoạt tính gây độc tế bào cho thấy hợp chất **1** và **3** có hoạt tính mạnh trên cả 4 dòng tế bào ung thư thử nghiệm. Đây là 2 hợp chất triterpenoid nordammarane ít gặp trong tự nhiên. Các hợp chất phân lập từ căn ethyl acetate của lá cây Vót dạng com cháy phần lớn là lớp chất triterpenoid bao gồm các khung nordammarane, ursane, oleanane.... Lớp chất này phân bố rộng rãi trong giới thực vật và có cấu trúc hóa học khá phức tạp. Chính cấu trúc đặc biệt của bộ khung triterpenoid đã quy định tính đa dạng về hóa học và dẫn đến nhiều dẫn xuất mới có hoạt tính dược lý, đặc biệt là khả năng chống ung thư [16, 17].

Lời cảm ơn. Công trình này được hỗ trợ kinh phí từ dự án hợp tác khoa học Việt-Pháp và đề tài NCCS mã số HSB16-CS09. Tác giả xin bày tỏ lòng cảm ơn tới Thạc sĩ Đặng Vũ Lương đã đo phổ NMR và Tiến sĩ Nguyễn Quốc Bình đã thu hái và định tên mẫu thực vật.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Mondal S., Bandyopadhyay S., Ghosh MK, Mukhopadhyay S., Roy S., Mandal C. *Natural Products: Promising Resources for Cancer Drug Discovery*, Anticancer Agents Med. Chem., **12(1)**, 49-75 (2012).
2. Lobstein A., Haan-Archipoff G., Englert J., Kuhry J. G., Anton R. *Chemotaxonomical investigation in the genus Viburnum*, Phytochemistry, **50**, 1175-1180 (1999).

3. Nguyễn Tiên Bân. *Danh lục các loài thực vật*, Nxb. Nông nghiệp, **3**, 18-20 (2005).
4. Xiao-Yu Wang, Hai-Ming Shi, Xiao-Bo Li. *Chemical Constituents of Plants from the Genus viburnum*, Chemistry and Biodiversity, **7**, 567-593 (2010).
5. Xuan-Qin Chen, Yan LI, Juan HE, Xiao Cheng, Kou Wang Ming-Ming Lfdi, Zheng-Hong Pan, Li-Yan Peng, Qin-Shi Zhao. *Triterpenoids and Diterpenoids from Viburnum chingii*, Chem. Pharm. Bull, **59(4)**, 496-498 (2011).
6. Y. Fukuyama, Y. Minoshima, Y. Kishimoto, IS. Chen, H. Takahashi, T. Esumi. *Cytotoxic iridoid aldehydes from Taiwanese Viburnum luzonicum*. Chem. Pharm. Bull, **53(1)**, 125-127 (2005).
7. M. Kubo, Y. Kishimoto, K. Harada, H. Hioki, Y. Fukuyama. *NGF-potentiating vibsane-type diterpenoids from Viburnum sieboldii*, Bioorg. Med. Chem. Lett, **20(8)**, 2566-71 (2010).
8. Nguyen Thanh Tra, Truong Bich Ngan, Doan Thi Mai Huong, Vu Van Nam, Do Thi Thao, Marc Litaudon, Nguyen Van Hung, Chau Van Minh, Pham Van Cuong. *Terpenoids from leaves of Viburnum sambucinum Reinw. Ex. Blume (Caprifoliaceae) in Vietnam*, Tạp chí Hóa học, **53(2e)**, 158-161 (2015).
9. Mosmann T. *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays*, J. Immunol. Methods, **65**, 55-63 (1983).
10. Soek Sin Teh, Gwendoline Cheng Lian Ee, Siau Hui Mah, Yang Mooi Lim, Mawardi Rahman. *Mesua beccariana (Clusiaceae), A Source of Potential Anti-cancer Lead Compounds in Drug Discovery*, Molecules, **17**, 10791-10800 (2012).
11. Chen XQ, Shao LD, Pal M, Shen Y, Cheng X, Xu G, Peng LY, Wang K, Pan ZH, Li MM, Leng Y, He J and Zhao QS. *Hupehenols A-E, Selective 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 (β -HSD1) inhibitors from Viburnum hupehense*, Journal of Natural Products, **78**, 330-334 (2015).
12. Cao P, Liang G, Gao X, Wang X, Li Z. *Three new nor-dammarane triterpenoids from Dysoxylum hainanense with particular cytotoxicity against glioma cell line*, Archives of Pharmacal Research, **36(3)**, 322-326 (2013).
13. Ki Hyun Kim, Sang Wook Chang, Shi Yong Ryu, Sang Un Choi, Kang Ro Lee. *Phytochemical constituents of Nelumbo nucifera*, Natural product sciences, **15(2)**, 90-95 (2009).
14. Wang X, Wang W. *Cytotoxic and Radical Scavenging NorDammarane Triterpenoids from Viburnum mongolicum*, Molecules, **18**, 1405-1417 (2013).
15. Batra P, Sharma AK. *Anti-cancer potential of flavonoids: recent trends and future perspectives*, 3 Biotech, **3(6)**, 439-459 (2013).
16. Zhang W, Men X, Lei P. *Review on anti-tumor effect of triterpene acid compounds*, Journal of Cancer Research and Therapeutics, **10(5)**, 14-19 (2014).
17. Barbara Bednarczyk Cwynar. *An Overview on the Chemistry and Biochemistry of Triterpenoids*, Mini-Reviews in Organic Chemistry, **11(3)**, 251-252 (2016).

Liên hệ: Nguyễn Thanh Trà

Phòng Hóa sinh ứng dụng, Viện Hóa học
Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam
Số 18, Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội
E-mail: nguyenthanhtravast@gmail.com.