

HỢP CHẤT STEROID VÀ FLAVONE TỪ THÂN RỄ THIÊN NIÊN KIẾN LÁ LỚN (*Homalomena pendula*)

Nguyễn Khánh Thùy Linh¹, Trần Ngân Thi¹, Nguyễn Thị Ngọc Trâm¹, Lê Văn Hậu¹,
Hoàng Thị Như Hạnh², Nguyễn Thị Hoài¹, Hồ Việt Đức^{1*}

¹ Trường Đại học Y Dược, Đại học Huế, 6 Ngô Quyền, Huế, Việt Nam

² Trường Đại học Nông lâm, Đại học Huế, 102 Phùng Hưng, Huế, Việt Nam

* Tác giả liên hệ Hồ Việt Đức <hvietduc@hueuni.edu.vn>

(Ngày nhận bài: 24-11-2021; Ngày chấp nhận đăng: 20-06-2022)

Tóm tắt. Hợp chất flavone, tangeretin (1), và ba hợp chất steroid: ergosterol peroxide (2), sitoindoside I (3) và stigmasterol (4) đã được phân lập từ thân rễ của cây thiên niên kiện lá lớn (*Homalomena pendula*). Cấu trúc hóa học của chúng được xác định dựa trên phân tích dữ liệu phổ cộng hưởng từ hạt nhân (1D và 2D NMR) và so sánh với các tài liệu đã công bố. Các hợp chất (1-3) được phân lập lần đầu tiên từ chi *Homalomena*. Cao chiết n-hexane và ethyl acetate của cây này có hoạt tính ức chế sản sinh NO trên đại thực bào RAW 264.7 kích thích bằng lipopolysaccharide với các giá trị IC₅₀ là 46,80 và 75,52 µg·mL⁻¹.

Từ khóa: *Homalomena pendula*, tangeretin, ergosterol peroxide, sitoindoside I

Steroids and flavone from the rhizomes of *Homalomena pendula*

Nguyen Khanh Thuy Linh¹, Tran Ngan Thi¹, Nguyen Thi Ngoc Tram¹, Le Van Hau¹,
Hoang Thi Nhu Hanh², Nguyen Thi Hoai¹, Ho Viet Duc^{1*}

¹ University of Medicine and Pharmacy, Hue University, 6 Ngo Quyen St., Hue, Vietnam

² University of Agriculture and Forestry, Hue University, 102 Phung Hung St., Hue, Vietnam

* Correspondence to Ho Viet Duc <hvietduc@hueuni.edu.vn>

(Received: 24 November 2021; Accepted: 20 June 2022)

Abstract. Phytochemical investigation of the rhizomes of *Homalomena pendula* resulted in the isolation of one flavone and three steroids. These compounds were determined as tangeretin (1), ergosterol peroxide (2), sitoindoside I (3), and stigmasterol (4) on the basis of 1D and 2D NMR data and in comparison with the available data in the literature. Compounds 1-3 were found for the first time from the genus *Homamomena*. The n-hexane and ethyl acetate extracts show NO production inhibitory activity in RAW 264.7 macrophage cells with IC₅₀ values of 46.8 and 75.52 µg·mL⁻¹.

Keywords: *Homalomena pendula*, tangeretin, ergosterol peroxide, sitoindoside I

1 Đặt vấn đề

Chi Thiên niên kiện (*Homalomena*) là một chi lớn của họ Ráy (Araceae), có khoảng 140 loài, phân bố chủ yếu ở khu vực Đông Nam Á, Nam Thái Bình Dương và Nam Mỹ [1, 2]. Thành phần hoá học của chi *Homalomena* khá đa dạng với các nhóm hợp chất có hoạt tính sinh học như sesquiterpene, phenol và lignan. Một số loài *Homalomena* đã được sử dụng trong y học cổ truyền và y học dân tộc của nhiều nước, đặc biệt là các nước châu Á, để điều trị vết thương, tiêu chảy, ho, đau bụng, rối loạn dạ dày và hệ thần kinh trung ương [3, 4]. Ở Việt Nam, từ lâu người dân đã biết dùng rễ Thiên niên kiện (*H. occulta*) để điều trị đau dạ dày và viêm khớp dạng thấp, cũng như làm thuốc chống viêm và thuốc bổ [5, 6]. Thiên niên kiện được sử dụng riêng lẻ hoặc kết hợp với các loại thuốc khác để giảm các triệu chứng đau nhức [7, 8]. Các nghiên cứu dược lý hiện đại cho thấy dịch chiết và các hợp chất phân lập từ các loài *Homalomena* có hoạt tính kháng khuẩn, chống oxy hoá, gây độc tế bào ung thư, chống viêm, v.v. [9-11]. Với số lượng loài phong phú, chi *Homalomena* có tiềm năng to lớn cho nghiên cứu tìm kiếm các hoạt chất mới có tác dụng chữa bệnh.

Ở Việt Nam, năm loài *Homalomena* đã được ghi nhận, phân bố chủ yếu ở nơi ẩm, dưới tán rừng, ven suối [12] với nhiều loài đặc hữu, mới được phát hiện và công bố gần đây [13]. Tuy nhiên, hiện nay các công bố về thành phần hoá học và hoạt tính sinh học của các hợp chất của chi này còn rất hạn chế, chủ yếu tập trung vào loài *H. occulta*. Thiên niên kiện lá lớn có tên khoa học là *Homalomena pendula* (Blume) Bakh.f., tên đồng nghĩa là *Homalomena gigantea* Engl. [2]. Quy trình chiết xuất, phân lập và xác định cấu trúc của tangeretin (1), ergosterol peroxide (2), sitoindoside I (3) và stigmasterol (4) từ thân rễ thiên niên kiện lá lớn lần đầu tiên được trình bày trong nghiên cứu này. Hoạt tính kháng viêm *in vitro* thông qua khả năng

ức chế sản sinh NO của các cao chiết và chất phân lập cũng được mô tả.

2 Đối tượng và phương pháp

2.1 Đối tượng

Mẫu cây thiên niên kiện lá lớn được thu hái ở xã Gung Ré, huyện Di Linh, tỉnh Lâm Đồng, vào tháng Một năm 2021. Mẫu được Bảo tàng Thiên nhiên Việt Nam – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam – xác định tên khoa học. Mẫu tiêu bản được lưu giữ tại Khoa Dược, Trường Đại học Y – Dược, Đại học Huế.

2.2 Phương pháp

Chiết xuất và phân lập

Quá trình chiết xuất được tiến hành bằng phương pháp ngâm bột nguyên liệu với methanol (MeOH) ở nhiệt độ phòng và cô đặc thành cao. Cao MeOH toàn phần được phân tán trong nước và chiết phân bố lần lượt với các dung môi hữu cơ với độ phân cực tăng dần để tạo các cao phân đoạn tương ứng.

Các hợp chất được phân lập bằng sắc ký cột trên chất hấp phụ pha thường (silica gel 240-430 mesh, Merck, Đức) hoặc pha đảo (ODS-60-14/63, Fujisilisa, Nhật). Sắc ký lọc gel được tiến hành trên sephadex LH-20 (Dowex 50WX2-100, Sigma-Aldrich, USA). Định hướng và theo dõi quá trình phân lập bằng sắc ký bản mỏng (DC-Alufolien 60 F₂₅₄ và RP₁₈ F₂₅₄, Merck). Các hợp chất được phát hiện bằng đèn tử ngoại ở bước sóng 254 và 365 nm hoặc dùng thuốc thử H₂SO₄ 10% (pha trong ethanol) phun đều lên bản mỏng rồi sấy ở nhiệt độ cao trong vài phút cho đến khi hiện màu.

Xác định cấu trúc

Cấu trúc của các hợp chất được xác định dựa vào phương pháp phổ cộng hưởng từ hạt nhân ¹H NMR, ¹³C NMR và HSQC. Phổ cộng hưởng từ hạt

nhân được ghi trên máy Bruker Avance Neo 600, Bruker AM500 FT-NMR Spectrometers (Bruker, Massachusetts, USA) với TMS là chất chuẩn nội.

Đánh giá hoạt tính ức chế sản sinh NO

Nuôi cấy tế bào: Dòng tế bào RAW264.7 được nuôi cấy trong môi trường DMEM với thành phần kèm theo gồm 2 mM L-glutamine, 10 mM HEPES và 1 mM sodium pyruvate, ngoài ra bổ sung 10% fetal bovine serum – FBS (GIBCO). Tế bào được cấy chuyển sau 3–5 ngày với tỉ lệ (1:3) và nuôi trong tủ ấm CO₂ ở 37 °C và 5% CO₂ [14].

Xác định khả năng ức chế sản sinh NO của tế bào macrophage RAW 264.7: Tế bào RAW 264.7 được đưa vào đĩa 96 giếng ở nồng độ 2×10^5 tế bào/giếng và nuôi trong tủ ấm ở 37 °C và 5% CO₂ trong 24 h. Tiếp theo, môi trường nuôi cấy được loại bỏ, thay bằng môi trường DMEM không có FBS và nuôi trong 3 h. Mẫu tế bào sau đó được ủ và nghiên cứu ở các nồng độ khác nhau trong 2 h trước khi được kích thích sản sinh yếu tố NO bằng LPS ($10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) trong 24 h. Một số giếng không có mẫu mà chỉ sử dụng dung dịch pha mẫu làm đối chứng âm. Đối chứng dương là N^G-Methyl-L-arginine acetate (L-NMMA) (Sigma) ở các nồng độ 100, 20, 4 và 0,8 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Nitrite (NO₂⁻), được xem là chỉ thị cho việc tạo NO, được xác định nhờ bộ Griess Reagent System (Promega Cooperation, WI, USA). Cụ thể, 100 μL môi trường nuôi tế bào (ủ mẫu) được chuyển sang đĩa 96 giếng mới và được thêm vào 100 μL Griess reagent: 50 μL of 1% (w/v) sulfanilamide trong 5% (v/v) acid phosphoric và 50 μL 0,1% (w/v) N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride pha trong nước. Hỗn hợp này được ủ tiếp ở nhiệt độ phòng trong 10 phút và hàm lượng nitrite được xác định bằng máy microplate reader ở bước sóng 540 nm. Môi trường DMEM không chứa FBS được sử dụng như giếng trắng (blank). Hàm lượng nitrite của từng mẫu thí nghiệm được xác định nhờ vào đường cong hàm lượng chuẩn NaNO₂ và được so sánh hàm lượng

với đối chứng âm (LPS). Khả năng ức chế sản sinh NO của mẫu được xác định theo công thức:

$$\% \text{ ức chế} = 100\% - [\text{hàm lượng NO}_{\text{mẫu}}/\text{hàm lượng NO}_{\text{LPS}}] \times 100$$

Phép thử được lặp lại ba lần để đảm bảo tính chính xác. Giá trị IC₅₀ (nồng độ ức chế 50% sự hình thành NO) được xác định nhờ vào phần mềm máy tính TableCurve 2Dv4 [15-18]

Xác định khả năng gây độc tế bào bằng MTT:

Chất thử (10 μL) được đưa vào các giếng của khay 96 giếng để có nồng độ tương tự nồng độ của thí nghiệm NO. Sau khi điều chỉnh để có mật độ tế bào phù hợp, hút 190 μL tế bào vào các giếng đã có chất thử. Trên cùng một đĩa thử, bố trí một số giếng để làm đối chứng không có mẫu thử, chỉ có dung môi pha mẫu là DMSO 1% (nồng độ cuối cùng trong giếng là 0,5%). Để đĩa nuôi cấy vào trong tủ ấm ở 37 °C, 5% CO₂ và nuôi trong 24 h. Sau 24 h, cho 10 μL MTT (nồng độ cuối cùng là $5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) vào mỗi giếng. Sau 24 h, loại bỏ môi trường, tinh thể formazan được hòa tan bằng 50 μL DMSO 100% và giá trị OD đo ở bước sóng 540 nm bằng máy quang phổ [19]. Lượng tế bào sống sót được tính theo công thức:

$$\% \text{ tế bào sống} = \frac{\text{OD}(\text{mẫu}) - \text{OD}(\text{blank})}{\text{OD}(\text{DMSO}) - \text{OD}(\text{blank})}$$

2.3 Chiết xuất, phân lập và chuyển hóa hóa học

Thân rễ của cây Thiên niên kiện lá lớn được rửa sạch, phơi sấy khô và xay thành bột thô (2 kg) và được ngâm chiết bằng MeOH ($3 \times 10 \text{ L}$), cất loại dung môi dưới áp suất giảm thu được cao chiết toàn phần (ký hiệu M, 151 g). Cao chiết này được hoà tan vào 2 L nước cất, sau đó chiết phân bố với n-hexane ($3 \times 2 \text{ L}$) và ethyl acetate (EtOAc) ($3 \times 2 \text{ L}$). Cất loại dung môi dưới áp suất giảm thu được các cao chiết tương ứng: n-hexane (ký hiệu H, 38,9 g), EtOAc (ký hiệu E, 21,6 g) và cặn nước (ký hiệu W, 23,6 g).

Cao chiết n-hexane được tách thô thành bốn phân đoạn, H1–H4, bằng cột silica gel pha thường, rửa giải gradient nồng độ n-hexane/acetone (100:0–0:100, v/v). Phân đoạn H3 (17,9 g) tiếp tục được phân tách bằng cột silica gel pha thường, rửa giải gradient nồng độ n-hexane/acetone (40:1, 25:1, 20:1, 15:1 và 10:1, v/v) thu được chín phân đoạn, H3.1–H3.9. Phân đoạn H3.9 (1,5 g) được tinh chế trên cột sephadex LH-20, rửa giải bằng MeOH thu được năm phân đoạn, H3.9.1–H3.9.5. Phân đoạn H3.9.2 (72,8 mg) được kết tinh trong acetone và thu được hợp chất **3** (10 mg). Phần còn lại được tiếp tục triển khai trên cột sắc ký pha đảo với hệ dung môi pha động MeOH/H₂O (2,5:1, v/v) và thu được hợp chất **1** (5 mg). Phân tách phân đoạn H3.4 (1,4 g) bằng cột sắc ký pha đảo, rửa giải bằng hệ dung môi acetone/MeOH/H₂O (1:1:0,2, v/v) và thu được hợp chất **2** (2,7 mg). Phân đoạn H3.3 (3,3 g) được tinh chế bằng phương pháp kết tinh và thu được hợp chất **4** (315 mg).

Methanol phân hợp chất 3: Hợp chất **3** (1 mg) được hòa tan trong 0,2 mL toluene. Sau đó bổ sung thêm 1,5 mL MeOH và 0,3 mL HCl 8% (pha trong MeOH). Hỗn hợp được ủ qua đêm ở 45 °C. Sau khi làm lạnh đến nhiệt độ phòng, thêm 1 mL n-hexane và 1 mL nước để chiết lấy dẫn xuất methyl ester (FAME) tạo thành. Dẫn xuất FAME được phân tích bằng phương pháp GC-MS.

Phân tích GC-MS của các FAME: Dẫn xuất FAME được phân tích trên máy Shimadzu QP2010 Plus [cột Equity®-5 (Supelco) (0,25 mm × 30 m)] cùng với đầu dò khối phổ MS QP2010 Plus. Chế độ ion hóa va đập điện tử (EI) được sử dụng với năng lượng 70 eV. Khí mang là He tinh khiết 99,99999% với tốc độ dòng 1,5 mL/phút. Mẫu được bơm tự động với thể tích 1 µL. Nhiệt độ buồng tiêm, giao diện MS và buồng ion hóa lần lượt là 220, 280 và 230 °C. Điện thế đầu dò là 0,82 kV và dải quét là 15–350 amu. Chương trình nhiệt độ lò GC: nhiệt độ đầu 80 °C (giữ đẳng nhiệt trong 2 phút), tăng 10 °C/phút đến 180 °C (giữ đẳng nhiệt trong 2 phút),

tăng 2 °C/phút đến 220 °C (giữ đẳng nhiệt trong 5 phút), tăng 5 °C/phút đến 240 °C (giữ đẳng nhiệt trong 5 phút). Việc nhận dạng các hợp chất được thực hiện bằng cách so sánh dữ kiện phổ EI-MS của chúng với giá trị tương ứng đã được liệt kê trong các thư viện NIST 11, WILEY 7.

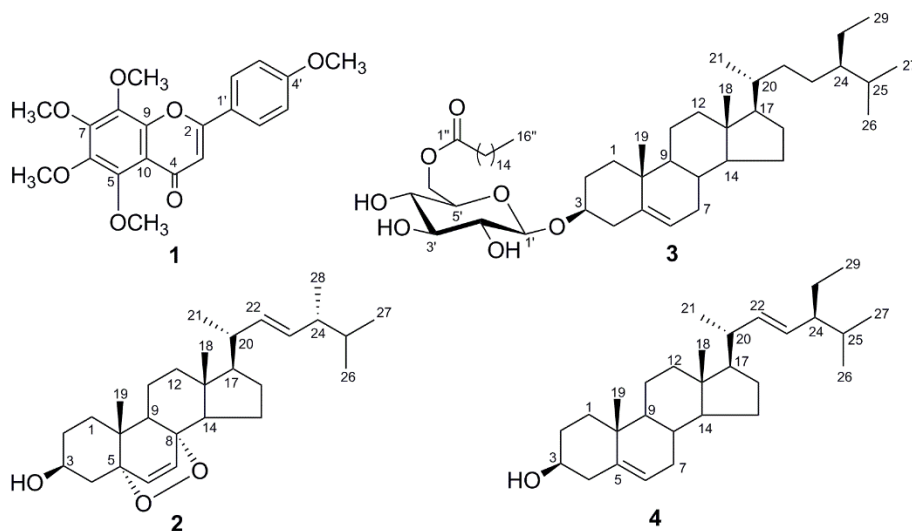
3 Kết quả và thảo luận

Hợp chất **1** được tách ra ở dạng bột, màu vàng chanh. Phổ ¹H NMR cho các tín hiệu cộng hưởng của bốn proton thuộc vòng benzene thế *para* tại δ_H 7,88 (d, 2H, *J* = 9,0 Hz), 7,03 (d, 2H, *J* = 9,0 Hz). Ngoài ra, tín hiệu của một proton olefin cũng được ghi nhận tại δ_H 6,63 (s, 1H). Tín hiệu cộng hưởng rất mạnh của năm nhóm methoxy gắn nhân thơm được quan sát tại δ_H 4,10 (s, 3H), 4,02 (s, 3H), 3,95 (s, 6H) và 3,89 (s, 3H) (Bảng 1). Phổ ¹³C NMR cho tín hiệu cộng hưởng của năm nhóm methoxy [δ_C 62,3, 62,1, 61,9, 61,7 và 55,5] cùng 15 tín hiệu đặc trưng cho khung flavone [δ_C 177,4, 162,4, 161,3, 151,4, 148,4, 147,8, 144,1, 138,1, 127,8 (2C), 123,9, 114,6 (3C) và 106,7]. Trong đó, tín hiệu tại δ_C 177,4 cho thấy sự có mặt của nhóm carbonyl. Dữ liệu phổ trên cho thấy **1** là một flavone chứa năm nhóm methoxy với vòng B thế 1,4. Kết hợp so sánh với chất tham khảo ở tài liệu [20], hợp chất **1** được xác định là 5,6,7,8,4'-pentamethoxyflavone, còn được gọi là tangeretin (Hình 1).

Hợp chất **2** được tách ở dạng bột trắng. Phổ ¹H NMR cho tín hiệu đặc trưng của bốn proton olefin tại δ_H 5,12–6,51; một nhóm carbinol tại δ_H 3,97 (m, 1H, H-3); bốn nhóm methyl bậc hai tại δ_H 0,81 (d, 3H, *J* = 7,0 Hz, H₃-26), 0,83 (d, 3H, *J* = 7,0 Hz, H₃-27), 0,91 (d, 3H, *J* = 6,5 Hz, H₃-28), và 1,00 (d, 3H, *J* = 6,5 Hz, H₃-21); hai nhóm methyl bậc ba tại δ_H 0,82 (s, 3H, H₃-18) và 0,88 (s, 3H, H₃-19). Các tín hiệu tại δ_H 5,15 (dd, 1H, *J* = 15,5, 8,5 Hz, H-22) và 5,24 (dd, 1H, *J* = 15,5, 7,5 Hz, H-23) đặc trưng cho liên kết đôi có cấu hình (*E*) trong khi tín hiệu tại δ_H 6,24 (d, 1H, *J* = 8,5 Hz, H-6) và 6,50 (d, 1H, *J* = 8,5 Hz, H-7) được gán cho liên kết đôi với cấu hình (*Z*).

Phổ ^{13}C NMR và HSQC cho tín hiệu của 28 carbon gồm 6 nhóm methyl (δ_{C} 20,9, 20,0, 19,6, 18,2, 17,6 và 12,9), 7 nhóm methylene (δ_{C} 39,4, 37,0, 34,7, 30,2, 28,6, 23,4 và 20,7), 11 nhóm methine (δ_{C} 135,4, 135,2, 132,4, 130,8, 66,5, 56,3, 51,7, 51,1, 42,8, 39,7 và 33,1) và 4 carbon bậc bốn (δ_{C} 82,2, 79,4, 44,6, 37,0). Trong đó, các tín hiệu tại δ_{C} 135,4, 135,2, 132,4 và

130,8 thuộc về liên kết đôi. Tín hiệu của ba carbon mang oxy được quan sát tại δ_{C} 82,2, 79,4 và 66,5. Các dữ kiện phổ ^1H NMR và ^{13}C NMR cho thấy hợp chất **2** là một steroid khung ergostane. Kết hợp so sánh với chất tham khảo ở tài liệu [21], hợp chất **2** được xác định là ergosterol peroxide.



Hình 1. Cấu trúc hóa học của các hợp chất (1–4) từ cây thiên nhiên kiện lá lớn

Hợp chất **3** được tách ra ở dạng dầu không màu. Phổ ^1H NMR cho các tín hiệu đặc trưng của khung steroid gồm một proton olefin [δ_{H} 5,37 (m, 1H, H-6)], hai nhóm methyl bậc ba [δ_{H} 0,68 (s, H₃-18) và 1,01 (s, H₃-19)], ba nhóm methyl bậc hai [δ_{H} 0,82 (d, $J = 7,2$ Hz, H₃-27), 0,85 (d, $J = 7,2$ Hz, H₃-26) và 0,92 (d, $J = 6,0$ Hz, H₃-21)] và một nhóm methyl bậc một [δ_{H} 0,85 (t, $J = 7,2$ Hz, H₃-29)]. Ngoài ra, phổ ^1H NMR còn cho tín hiệu cộng hưởng của proton anomer của hợp phần β -monosaccharide tại δ_{H} 4,38 (d, 1H, $J = 7,8$ Hz, H-1') và các tín hiệu của hợp phần acid béo bão hòa [δ_{H} 2,35 (t, 2H, $J = 7,2$ Hz), 1,25 (m) và 0,88 (t, 3H, $J = 6,6$ Hz, H₃-16'')]. Phổ ^{13}C NMR cho tín hiệu của một carbon carbonyl [δ_{C} 174,7 (C-1'')], hai carbon olefin [δ_{C} 140,3 (C-5) và 122,2 (C-6)], sáu carbon của hợp phần β -glucopyranosyl [δ_{C} 101,2 (C-1'), 76,0 (C-3'), 74,0 (C-5'), 73,6 (C-2'), 70,1 (C-4') và 63,2 (C-6')], một carbon oxymethine [δ_{C} 79,6 (C-3)] và nhiều carbon sp^3 của khung steroid và acid béo (δ_{C} 11,9-56,8) (Bảng 2). Các kết quả phân tích trên cho phép dự đoán hợp chất **3** là một ester của

acid béo với steroid glucoside. Đặc biệt, sự chuyển dịch mạnh về phía trường thấp của proton oxymethylene H-6' (δ_{H} 4,48, 4,27) so với proton anomer (δ_{H} 4,38) cho thấy rằng vị trí ester hóa xảy ra tại C-6'. Tiếp đó, hợp phần acid béo được xác định là palmitoyl với thời gian lưu của dẫn xuất methyl ester tương ứng là 21,1 phút trên sắc ký đồ GC-MS. So sánh với tài liệu tham khảo [22], chúng tôi khẳng định **3** là β -sitosteryl-3- β -glucopyranoside-6'-O-palmitate (còn gọi là sitoindoside I).

Hợp chất **4** được phân lập dưới dạng bột màu trắng. Phổ ^1H NMR của **4** cho tín hiệu đặc trưng của một proton olefin tại δ_{H} 5,35 (brd, $J = 4,0$ Hz, H-6), hai proton *trans* olefin tại δ_{H} 5,16 (dd, $J = 15,0, 8,5$ Hz, H-22) và 5,02 (dd, $J = 15,0, 8,5$ Hz, H-23) và một proton thuộc nhóm oxymethine tại 3,52 (m, H-3). Ở vùng trường cao, tín hiệu của hai nhóm methyl bậc ba [δ_{H} 0,68 (s, H₃-18) và 1,01 (s, H₃-19)], ba nhóm methyl bậc hai [δ_{H} 0,80 (d, $J = 7,0$ Hz, H₃-

27), 0,84 (d, $J = 7,0$ Hz, H₃-26) và 0,92 (d, $J = 6,0$ Hz, H₃-21)] và một nhóm methyl bậc một [δ_{H} 0,85 (t, $J = 7,5$ Hz, H₃-29)] cũng được ghi nhận. Các dữ kiện phổ trên cho thấy hợp chất **4** là một sterol. Tiếp tục

đối chiếu với dữ kiện phổ NMR của chất tham khảo ở tài liệu [23], chúng tôi xác định hợp chất **4** là stigmasterol.

Bảng 1. Số liệu phổ NMR (đo trong CDCl₃) của các hợp chất **1, 2** và chất tham khảo [δ (ppm), J (Hz)]

C	1			C	2		
	$\delta_{\text{C}}^{\text{f}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{b}}$		$\delta_{\text{C}}^{\text{g}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{b}}$
2	162,2	162,4 s	–	1	35,1	34,7 t	1,95*, 1,69 dd (3,5, 13,5)
3	106,7	106,7 d	6,63 s	2	30,5	30,2 t	1,85*, 1,53*
4	177,3	177,4 s	–	3	66,8	66,5 d	3,97 m
5	144,0	144,1 s	–	4	37,3	37,0 t	2,11 dd (2,0, 5,0, 14,0), 1,92 dd (12,0, 14,0)
6	138,1	138,1 s	–	5	83,1	82,2 s	–
7	151,3	151,4 s	–	6	135,8	135,4 d	6,24 d (8,5)
8	148,4	148,4 s	–	7	131,1	130,8 d	6,50 d (8,5)
9	147,7	147,8 s	–	8	79,8	79,4 s	–
10	114,8	114,6 s	–	9	51,4	51,1 d	1,50*
1'	123,8	123,9 s	–	10	37,3	37,0 s	–
2'	127,8	127,8 d	7,88 d (9,0)	11	23,8	23,4 t	1,50*, 1,24*
3'	114,4	114,6 d	7,03 d (9,0)	12	39,7	39,4 t	1,96*, 1,23*
4'	161,1	161,3 s	–	13	44,9	44,6 s	–
5'	114,6	114,6 d	7,03 d (9,0)	14	52,1	51,7 d	1,55*
6'	127,6	127,8 d	7,88 d (9,0)	15	21,0	20,7 t	1,60 m, 1,40
5-OCH ₃	62,3 Δ	62,3 Δ q	4,10 \wedge s	16	29,1	28,6 t	1,75 m, 1,34 m
6-OCH ₃	62,1 Δ	62,1 Δ q	4,02 \wedge s	17	56,6	56,3 d	1,22*
7-OCH ₃	61,9 Δ	61,9 Δ q	3,95 \wedge s	18	13,3	12,9 q	0,82 s
8-OCH ₃	61,7 Δ	61,7 Δ q	3,95 \wedge s	19	18,6	18,2 q	0,88 s
4'-OCH ₃	55,5	55,5 q	3,89 s	20	40,1	39,7 d	2,02 m
				21	21,3	20,9 q	1,00 d (6,5)
				22	135,6	135,2 d	5,15 dd (15,5, 8,5)
				23	132,4	132,4 d	5,24 dd (15,5, 7,5)
				24	43,1	42,8 d	1,85*
				25	33,4	33,1 d	1,45 m
				26	20,0	19,6 q	0,81 d (7,0)
				27	20,3	20,0 q	0,83 d (7,0)
				28	18,0	17,6 q	0,91 d (6,5)

^f δ_{C} của tangeretin [20], ^g δ_{C} của ergosterol peroxide [21], ^a125 MHz, ^b500 MHz, Δ , \wedge tín hiệu có thể hoán đổi cho nhau trong cùng cột, * tín hiệu chập.

Bảng 2. Số liệu phổ NMR (đo trong CDCl₃) của hợp chất **3** và chất tham khảo [δ (ppm), J (Hz)]

C	δ_c^f	δ_c^a	δ_H^b	C	δ_c^f	δ_c^a	δ_H^b
1	37,3	37,3		22	34,0	34,0	
2	29,2–29,7	29,2–29,7		23	26,1	26,2	
3	79,6	79,6	3,34–3,58 m	24	45,9	45,9	
4	38,9	38,9		25	29,2	29,2	
5	140,3	140,3	–	26	19,0	19,0	0,82 d (7,2)
6	122,2	122,2	5,37 m	27	19,8	19,8	0,84 d (7,2)
7	31,9	31,9		28	23,1	23,1	
8	31,9	32,0		29	12,0	12,0	0,85 t (7,2)
9	50,2	50,2		1'	101,2	101,2	4,38 d (7,8)
10	36,7	36,8	–	2'	73,6	73,6	
11	21,1	21,1		3'	76,0	76,0	
12	39,8	39,8		4'	70,1	70,1	3,34–3,58 m
13	42,3	42,4	–	5'	74,0	74,0	
14	56,8	56,8		6'	63,2	63,2	4,48 dd (12,0, 4,8); 4,27 d (12,6)
15	24,3	24,3		1''	174,7	174,7	–
16	28,3	28,3		2''	34,2	34,3	2,35 t (7,2)
17	56,1	56,1		3''	25,0	25,0	
18	11,9	11,9	0,68 s	4''– 13''	29,2–29,7	29,2–29,7	
19	19,4	19,4	1,01 s	14''	31,9	32,0	
20	36,1	36,2		15''	22,7	22,7	
21	18,8	18,8	0,92 d (6,0)	16''	14,1	14,1	0,88 t (6,6)

^f δ_c của sitoindoside I [22], ^a150MHz, ^b600MHz.

Hoạt tính ức chế sản sinh NO của các cao chiết và chất phân lập từ cây thiên nhiên kiện lá lớn được thử nghiệm bằng phương pháp Griess và độc tính của chúng được đánh giá thông qua phép thử MTT. Ở nồng độ 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (đối với cao chiết nước) hoặc 100 μM (đối với chất **2**), % tế bào sống là 71,19 và 70,17%. Điều này chứng tỏ các mẫu này có độc tính đáng kể với tế bào RAW 264.7. Các mẫu còn lại (cao chiết MeOH, n-hexane, EtOAc và các hợp chất **1**, **3**) có độc tính thấp với % tế bào sống \approx 80% ở nồng độ trên [24–26]. Kết quả ở Bảng 3 cho thấy cao chiết n-hexane có khả năng ức chế sản sinh NO mạnh nhất ($\text{IC}_{50} = 46,8 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) và sau đó là cao chiết EtOAc ($\text{IC}_{50} = 75,52 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Các cao chiết còn lại không thể hiện hoạt tính. Điều này cho thấy các thành phần kém phân cực hoặc phân cực

trung bình trong cao chiết của cây thiên nhiên kiện lá lớn quyết định khả năng ức chế sản sinh NO của loài này. Trong các hợp chất phân lập được, tangeretin (**1**) có tác dụng ức chế sản sinh NO yếu với giá trị IC_{50} là 94,32 μM . Trong khi đó, các hợp chất ergosterol peroxide (**2**) và sitoindoside I (**3**) không có hoạt tính ở nồng độ thử nghiệm. Stigmasterol (**4**) không được thử nghiệm trong nghiên cứu này vì đây là một phytosterol rất phổ biến trong thực vật. Hơn nữa, hợp chất này có hoạt tính ức chế yếu đối với sự sản sinh NO trên các đại thực bào RAW 264.7 [27]. Stigmasterol cũng đã được chứng minh có khả năng ức chế một số chất trung gian tiền viêm và thoái hoá chất nền thường liên quan đến sự thoái hoá sụn do viêm khớp gây ra, một phần thông qua việc ức chế con đường NF-kappa B [28].

Bảng 3. Hoạt tính ức chế sản sinh NO của các cao chiết và chất phân lập từ thân rễ thiên niên kiện lá lớn

Nồng độ*	Cao chiết				1	2	3	L-NMMA (Đối chứng dương)
	MeOH	n-Hexane	EtOAc	Nước				
100	32,69	67,31	57,69	42,31	53,74	21,84	34,69	95,47
20	17,12	35,96	23,08	12,69	6,39	11,03	8,93	70,42
4	9,42	11,92	13,46	5,77	2,03	5,75	1,49	23,16
0,8	1,92	2,31	-0,38	-1,15	-2,50	-1,72	-1,96	11,58
IC₅₀ ± SD	> 100	46,80 ± 2,09	75,52 ± 3,90	>100	94,32 ± 2, 97	>100	>100	10,72 ± 1,85

*Đơn vị $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ cho các cao chiết và L-NMMA, μM cho các chất 1-3.

4 Kết luận

Chúng tôi đã phân lập và xác định cấu trúc của bốn hợp chất gồm một flavone (tangeretin) và ba hợp chất steroid (ergosterol peroxide, sitoindoside I và stigmasterol) từ thân rễ của cây Thiên niên kiện lá lớn (*Homalomena pendula*) thu hái tại Lâm Đồng. Đây là công bố đầu tiên về sự tồn tại của tangeretin, ergosterol peroxide và sitoindoside I trong thành phần hóa học của chi *Homalomena*. Đồng thời, cao chiết n-hexane và ethyl acetate được điều chế từ thân rễ cây thiên niên kiện lá lớn có tác dụng ức chế đáng kể với sự sản sinh NO do lipopolysaccharide gây ra. Do vậy, các nghiên cứu về thành phần hoá học và hoạt tính các cao chiết này sẽ được tiếp tục trong thời gian tới nhằm phát hiện các tác nhân kháng viêm mới.

Thông tin tài trợ

Công trình được thực hiện với sự tài trợ kinh phí của Bộ Giáo dục và Đào tạo trong đề tài mã số CT-2021-01-DHH-07.

Tài liệu tham khảo

- Ye J, Yin P, Xiao MT. New aromatic compounds from the rhizomes of *Homalomena occulta*. *Phytochemistry Lett.* 2017;21:57-60.
- The Plant List . Species in *Homalomena* [Internet]; 2013. Available from: www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Araceae/Homalomena/
- Wong KC, Hamid A, Eldeen IM, Asmawi MZ, Baharuddin S, Abdillahi HS, et al. A new sesquiterpenoid from the rhizomes of *Homalomena sagittifolia*. *Nat Prod Res.* 2012; 26(9):850-858.
- Zhao F, Sun C, Ma L, Wang YN, Wang YF, Sun JF, et al. New sesquiterpenes from the rhizomes of *Homalomena occulta*. *Fitoterapia.* 2016;109:113-118.
- Chi VV. Từ điển cây thuốc Việt Nam. Hà Nội: NXB Y học Hà Nội; 2012.
- Viện dược liệu. Danh lục cây thuốc Việt Nam. Hà Nội: NXB Khoa học và Kỹ thuật; 2016.
- Viện dược liệu. Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam, tập 1. Hà Nội: NXB Khoa học và kỹ thuật; 2007.
- Viện dược liệu. Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam, tập 2. Hà Nội: NXB Khoa học và kỹ thuật; 2007.
- Ban NK, Ngọc NT, Hương Giang V, Linh TM, Lien LQ, Hanh TTH, et al. Sesquiterpenoids from *Homalomena pierreana* Engl. *Vietnam Journal of Science and Technology.* 2015;53(3):305-310.

10. Wong KC, Lim TB, Ali DMH. Essential oil of *Homalomena sagittifolia* Jungh. Flavour and fragrance Journal. 2006;21(5):786-788.
11. Sánchez LA, Olmedo D, López-Pérez JL, Williams TD, Gupta MP. Two new alkylresorcinols from *Homalomena wendlandii* and their cytotoxic activity. Natural Product Communications. 2012; 7(8):1043-1046.
12. Dư NV. Nghiên cứu phân loại họ Ráy (Araceae) ở Việt Nam [dissertation]. Hà Nội: Viện Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật; 2006.
13. Bogner J, Nguyen VD. A new *Homalomena* species (Araceae) from Vietnam. Willdenowia. 2008;38(2): 527-531.
14. Lio H, Banbury L, Liang H, Wang X, Lu X, Hu L, et al. Effect of Honghua (Flos Carthami) on nitric oxide production in RAW 264.7 cells and α -glucosidase activity. Journal of Traditional Chinese Medicine. 2014;34(3):362-368.
15. Combet S, Balligand JL, Lameire N, Goffin E, Devuyst O. A specific method for measurement of nitric oxide synthase enzymatic activity in peritoneal biopsies. Kidney International. 2000; 57(1):332-338.
16. Tsai PJ, Tsai TH, Yu CH, Ho SC. Comparison of NO scavenging and NO-suppressing activities of different herbal teas with those of green tea. Food Chemistry. 2007;103(1):181-187.
17. Bernardes NR, Heggdorne Araújo M, Borges IFJC, Almeida FM, Amaral EP, Lasunskaja EB. Nitric oxide production, inhibitory, antioxidant and antimycobacterial activities of the fruits extract and flavonoid content of *Schinus terebinthifolius*. Revista Brasileira de Farmacognosia. 2014;24(6):644-650.
18. Cheenpracha S, Park EJ, Rostama B, Pezzuto JM, Chang LC. Inhibition of nitric oxide (NO) production in lipopolysaccharide (LPS)-activated murine macrophage RAW 264.7 cells by the norsesquiterpene peroxide. Epimuqubilin A. Marine Drugs. 2010;8(3):429-437.
19. Altmann KH, Gertsch J. Anticancer drugs from nature-natural products as a unique source of new microtubule-stabilizing agents. Natural Product Reports. 2007;24(2):327-357.
20. Chen J, Montanari AM, Widmer WW. Two new polymethoxylated flavones, a class of compounds with potential anticancer activity, isolated from cold pressed dancy tangerine peel oil solids. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 1997;45(2):364-368.
21. Kim DS, Baek NI, Oh SR, Jung KY, Lee IS, Kim JH, et al. Anticomplementary activity of ergosterol peroxide from *Naematoloma fasciculare* and reassignment of NMR data. Archives Pharmacal Research. 1997;20(3):201-205.
22. Thang PT, Dung NA, Giap TH, Oanh VTK, Hang NTM, Huong TT, et al. Preliminary study on the chemical constituents of the leaves of *Macaranga balansae* Gagnep. Vietnam Journal of Chemistry. 2018;56(5):632-636.
23. Forgo P, Kövér KE. Gradient enhanced selective experiments in the ^1H NMR chemical shift assignment of the skeleton and side-chain resonances of stigmasterol, a phytosterol derivative. Steroids. 2004;69(1):43-50.
24. Ng RFL, Abidin NZ, Shuib AS, Ali DAI. Inhibition of nitric oxide production by *Solanum melongena* and *Solanum macrocarpon* on RAW 264.7 cells. Frontiers in Life Science. 2015;8(3):241-248.
25. Wahyuni FS, Ali DAI, Lajis NH, Dachriyanus. Anti-inflammatory activity of isolated compounds from the stem bark of *Garcinia cowa* Roxb. Pharmacog J. 2017;9(1):55-57.
26. Albaayit SFA, Al-Khafaji ASK, Alnaimy HS. *In vitro* macrophage nitric oxide and interleukin-1 beta suppression by *Moringa peregrina* seed. Turk J Pharm Sci. 2019;16(3):362-365.
27. Yuan L, Zhang F, Shen M, Jia S, Xie J. Phytosterols suppress phagocytosis and inhibit inflammatory mediators via ERK pathway on LPS-triggered inflammatory responses in RAW264.7 macrophages and the correlation with their structure. Foods. 2019; 8(11):582.
28. Gabay O, Sanchez C, Salvat C, Chevy F, Breton M, Nourissat G, et al. Stigmasterol: a phytosterol with potential anti-osteoarthritic properties. Osteoarthritis Cartilage. 2010;18(1):106-116.