

NGHIÊN CỨU QUI TRÌNH CÔNG NGHỆ CHIẾT TÁCH, XÁC ĐỊNH CẤU TRÚC VÀ HOẠT TÍNH SINH HỌC CỦA MỘT SỐ THÀNH PHẦN TRONG CÂY CHAY BẮC BỘ (*ARTOCARPUS TONKINENSIS* A. Chev. Ex Gagnep.)

NGUYỄN THẾ ANH, HỒ NGỌC ANH,
TRỊNH THỊ THÙY, TRẦN VĂN SUNG

Viện Hóa học

TRẦN MINH HỘI

Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật

Cây Chay bắc bộ (*Artocarpus tonkinensis* A. Chev. Gagnep., họ Dâu tằm (Moraceae) là một cây gỗ to, cao đến 15m, thân nhẵn, mọc thẳng, phân cành nhiều. Lá mọc so le, xếp thành hai hàng, mặt trên nhẵn bóng, mặt dưới có lông ngắn màu hung trên các đường gân, phiến hình trái xoan hay bầu dục, dài 7-12cm, rộng 3-7cm, đầu nhọn, góc tròn, gân nổi rõ. Hoa đơn tính cùng gốc. Quả phức gần tròn, cuống ngắn màu vàng, thịt mềm, màu hồng, vị chua. Hạt to, chứa nhiều nhựa dính. Hoa tháng 3-4; quả 7-9. Cây mọc tự nhiên trong rừng thứ sinh ở một số tỉnh phía Bắc (Hà Giang, Bắc Giang, Thanh Hóa, Nghệ An...) và được trồng trong vườn nhà để lấy quả làm gia vị chế biến thực phẩm, rễ dùng để ăn trâu. Quả có vị chua, tính bình, có tác dụng cầm máu và thanh nhiệt, trị phổi nóng, ho ra máu, chảy máu mũi, đau họng chỉ cần lấy 5-7 quả chay ép lấy nước uống. Quả chín dùng ăn tươi, nấu canh chua và có tác dụng khai vị giúp tiêu hóa tốt. Theo kinh nghiệm dân gian lá, rễ chay sắc uống có thể chữa được đau lưng, mỏi gối và đặc biệt là bệnh liệt. Ngoài ra, lá chay còn có tác dụng chữa các bệnh có nguyên nhân tự miễn, chống thải mảnh da ghép. Hạt chay có chứa lectin. Từ lá chay, Nguyễn Đăng Dũng và cộng sự đã phân lập và xác định được cấu trúc của ampelopsin. Nhóm nghiên cứu của Trần Văn Sung đã công bố kết quả phân lập và xác định cấu trúc một số chất triterpen, phenolic, flavonoid và auronol glucosid mới. Đặc biệt là đã nghiên cứu, phân lập và xác định cấu trúc một benzopyran mới và đặt tên là artotonkin, hai hợp chất khung auronol glucosid ký hiệu là TAT2 & TAT6 có tác dụng ức chế miễn dịch.

• I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng nghiên cứu: Mẫu cây Chay bắc bộ đã được thu hái vào tháng 7/2008 tại thôn Vật Phụ, xã Vật Lại, huyện Ba Vì, Hà Nội. Tiêu bản được lưu giữ tại Viện Dược liệu, 3B Quang Trung - Hà Nội.

2. Các phương pháp thử hoạt tính

* **Hoạt tính chống oxy hóa:** Phương pháp thử hoạt tính chống oxy hóa được thực hiện với enzym *Peroxydaza* máu người theo phương pháp của E. C. Xavron. *Peroxydaza* là một nhóm các enzym oxy hoá khử, có mặt trong nhiều bạch cầu hạt trong máu, làm xúc tác cho phản ứng oxy hoá các chất hữu cơ khi có hydroperoxid hay các peroxid khác.

Chất cho điện tử (Dạng khử) + H_2O_2 $\xrightarrow{\text{Peroxydaza}}$ Chất cho điện tử đã bị oxy hoá + H_2O . Phản ứng oxy hoá xảy ra trong cơ thể làm sinh ra các gốc tự do nội sinh có hại cho cơ thể và gây ra rất nhiều bệnh khác nhau, trong đó có bệnh ung thư.

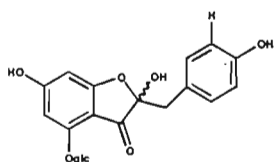
* **Hoạt tính chống ung thư:** Tiến hành thử hoạt tính chống ung thư bằng việc thử nghiệm khả năng gây độc tế bào ung thư. Các dòng tế bào ung thư ở người được cung cấp bởi ATCC (Bảo tàng Giống chuẩn Hoa Kỳ) gồm: KB - ung thư biểu mô (CCL - 17TM) là dòng luôn luôn được sử dụng trong các phép thử độ độc tế bào; HepG2 - ung thư gan (HB - 8065TM) và MCF7 - ung thư vú (HTB - 22TM). Phương pháp thử độ độc tế bào in vitro được Viện Ung thư Quốc

gia Hoa Kỳ (NCI) xác nhận là phép thử độ độc tế bào chuẩn nhằm sàng lọc, phát hiện các chất có khả năng kìm hãm sự phát triển hoặc diệt tế bào ung thư ở điều kiện in vitro.

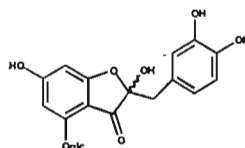
* **Hoạt tính ức chế miễn dịch:** Phương pháp thử hoạt tính ức chế miễn dịch được sử dụng là phương pháp kích thích chuyển dạng lympho bào (transform stimulation test), nuôi cấy lympho hỗn hợp (mixed lymphocyte reaction). Khả năng ức chế chuyển dạng lympho bào (T) của chất thử được tính theo công thức sau: $I = 100\% - (\text{cpm nuôi cấy có PHA} + \text{dung dịch chất thử}) / \text{cpm nuôi cấy có PHA} \times 100\%$. Trong đó PH: Chất kích thích chuyển dạng không đặc hiệu (phytohemagglutinin).

II. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

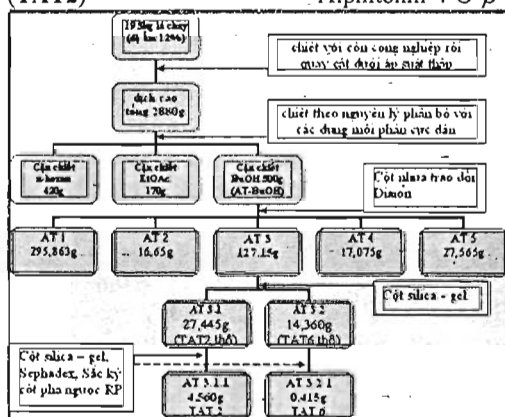
1. Quy trình chiết tách: Mẫu lá chay (thu hái vào tháng 7/2008 tại thôn Vật Phụ, xã Vật Lại, huyện Ba Vì, Hà Nội) 19,5kg được sấy khô ở 40°C, sau đó chiết với cồn công nghiệp và cất loại dung môi dưới áp suất giảm để thu dịch cao tổng (2880g hiệu suất là 15% so với mẫu lá khô). Từ dịch cao tổng chiết phân lớp lần lượt với n-hexan, EtOAc và n-butanol/H₂O (chiết 4 lần với tỷ lệ 1/1). Cất loại dung môi dưới áp suất thấp thu được các cặn dịch chiết tương ứng là: n-hexan = 420g; EtOAc = 170g; n-butanol = 500g. Từ dịch cặn n-butanol được phân tách bằng các cột (Diaion; Silicagel; Sephadex; Sắc ký cột pha ngược RP) với các hệ dung môi khác nhau, đã thu được hai chất có tên là maesopsin-4-O-β-D-Glc - **TAT2** và alphonin-4-O-β-D-Glc - **TAT6** (Sơ đồ 1)



Maesopsin-4-O-β-D-Glc (TAT2)



Alphonin-4-O-β-D-Glc (TAT6)



Sơ đồ 1. Quy trình công nghệ chiết, tách các lớp chất từ lá chay

2. Hoạt tính sinh học

+ **Hoạt tính chống oxy hóa:** Ba cặn dịch chiết (n-hexan, EtOAc, n-BuOH), sau khi đem thử hoạt tính chống oxy hóa chúng tôi thu được kết quả ở bảng 1. Kết quả thử cho ra khả năng ức chế oxy hoá được tính theo thang nồng độ pha loãng dần để xác định nồng độ ức chế 50%. Khả năng chống oxy hóa của cặn dịch cao EtOAc ($IC_{50}=30,55 \mu\text{g/ml}$) là lớn nhất, sau đến BuOH ($IC_{50}=43,79 \mu\text{g/ml}$), cuối là n-hexan ($IC_{50}=95,16 \mu\text{g/ml}$).

+ **Thử hoạt tính chống ung thư (thử khả năng gây độc tế bào):** Ba dịch cặn cao n-hexan, EtOAc và n-BuOH, cho kết quả (bảng 2) thử hoạt tính gây độc tế bào ung thư như sau:

Bảng 1

Kết quả thử hoạt tính chống oxy hóa

STT	Ký hiệu mẫu	IC ₅₀ (μg/ml)
1	Cận chiết n-hexan	95,16
2	Cận chiết EtOAc	30,55
3	Cận chiết n-BuOH	43,79
4	Curcumin	3,67

Ghi chú: Curcumin = chất đối chứng.

Chất thử được sử dụng thử độc tế bào in vitro nhằm sàng lọc và phát hiện các chất có khả năng kìm hãm, ức chế sự phát triển hoặc diệt tế bào ung thư. Khả năng ức chế xảy ra được tích theo thang nồng độ pha loãng để xác định nồng độ ức chế 50%. Như vậy từ ba dịch cận cao đem thử thì dịch cận cao EtOAc có khả năng ức chế đối với dòng tế bào ung thư HepG₂ - ung thư gan (với IC₅₀=17,06 μg/ml), còn lại hai dòng tế bào MCF₇ - ung thư vú và KB - ung thư biểu mô thì đều âm tính. Dịch cận cao n-hexan và n-BuOH thì đều không có khả năng ức chế đối với ba dòng tế bào ung thư nêu trên.

Bảng 2

Kết quả thử khả năng gây độc tế bào ung thư

STT	Ký hiệu mẫu	Tên dòng tế bào		
		MCF ₇ IC ₅₀ (μg/ml)	HepG ₂ IC ₅₀ (μg/ml)	KB IC ₅₀ (μg/ml)
1	Cận chiết n-hexan	48,09	21,94	32,22
2	Cận chiết EtOAc	25,31	17,06	24,26
3	Cận chiết n-BuOH	>128	>128	>128
3	Elipticine	0,31-0,62	0,31-0,62	0,31-0,62

Ghi chú: Elipticine = chất đối chứng.

+ **Hoạt tính ức chế miễn dịch:** Bảng 3 trình bày kết quả thử hoạt tính ức chế miễn dịch bằng phương pháp chuyển dạng lympho bào.

Bảng 3

Kết quả thử khả năng ức chế chuyển dạng lympho bào của hai chất auronol glucosid tách từ lá chay

Chất	Nồng độ (mg/ml)	% Ức chế							
		1	2	3	4	5	6	7	8
		1,25	0,625	0,312	0,156	0,078	0,039	0,019	0,009
TAT2		99,6	99,5	99,3	99,0	56,5	18,7	4,4	3,5
TAT6		99,3	92,9	82,9	23,0	21,3	19,5	15,9	0
Cyc. A		99,1	99,2	99,8	96,7	87,9	78,0	72,7	72,0

Ghi chú: Cyc. A – Chất đối chứng.

Kết quả thử cho thấy chất maesopsin-4-O-β-D-glucopyranosid (TAT2) và alphononin-4-O-β-D-glucopyranosid (TAT6) tách được từ cây chay có hoạt tính ức chế miễn dịch khi so sánh với chất cyclosporin A, một thuốc ức chế miễn dịch đang được bán trên thị trường với giá cao. So với cyclosporin A, thử hai chất TAT2 và TAT6 có tác dụng yếu hơn nhưng ít hủy hoại tế bào hơn. Các kết quả nghiên cứu này là rất lý thú, nó góp phần giải thích tác dụng chữa bệnh của dịch chiết lá cây chay đã được sử dụng trong dân gian và được dùng trong điều trị thử nghiệm lâm sàng cho các bệnh có nguyên nhân tự miễn.

III. KẾT LUẬN

Đã nghiên cứu hoàn thiện quy trình chiết, tách lượng lớn các hợp chất auronol glucosid từ lá chay (*Artocarpus tonkinensis* A. Chev. ex Gagnep.) theo định hướng tách chất có hoạt tính ức chế miễn dịch. Hiệu suất cao, dung môi chiết dễ kiếm, tiết kiệm thời gian, ít tổn kém, ít độc hại và phù hợp với điều kiện ở Việt Nam. Phân lập được hai hợp chất auronol glucosid là maesopsin-4-O- β -D-glucopyranosid (TAT2) và alphononin-4-O- β -D-glucopyranosid (TAT6) để phục vụ cho việc nghiên cứu hoạt tính sinh học, hướng tới việc sử dụng chúng làm thuốc ức chế và điều hoà miễn dịch.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Đỗ Huy Bích, Đặng Quang Chung, Bùi Xuân Chương, Nguyễn Thượng Dong, Đỗ Trung Đàm, Phạm Văn Hiền, Vũ Ngọc Lộ, Phạm Duy Mai, Phạm Kim Mẫn, Đoàn Thị Nhu, Nguyễn Tập, Trần Toàn, 2004: Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam, tập 1, 373 - 375. NXB. Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
2. Nguyễn Đăng Dũng, Trịnh Hiền Trung, Phạm Hoàng Ngọc, Trần Lưu Văn Hiền, 2002: Tạp chí Dược liệu, 7(5): 137 - 140.
3. Nguyễn Thị Vinh Hà, 1997: Nghiên cứu tác dụng của chế phẩm đông y I trên một số thông số miễn dịch chuột nhắt trắng. Luận án PTS khoa học Y - Dược Hà Nội.
4. Ivanov I. I. Korovkin B. Ph. idr., 1996: Wedenhie Vklinitex Kniu enzymologiiu Med, Leningrad. 115-190.
5. Khang N.Q., J. Lectins, 1988: Biology, Biochemistry, 6: 341.
6. Khang N. Q., A. D. Strosberg, D. J. Hochebe., 1998: Purification and characterization of the *Artocarpus tonkinensis* lectin, Lectins - Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry, Vol. 6, 314.
7. Trinh Phuong Lien, H. Ripperger, Tran Van Sung and G. Adam, 1998: Die Pharmazie, 53(5): 353.
8. Thuy T. T., C. Kamperdick, P. T. Ninh, T. P. Lien, T. T. P. Thao, T. V. Sung, 2004: Die Pharmazie, 59: 297-300.
9. Vu Tan Trao et al. 1988: Ann. Inst. Pasteur Immunol., 139(2): 121-133.

STUDY OF PROCESS FOR ISOLATION, PURIFICATION, STRUCTURE ELUCIDATION AND BIOACTIVITIES OF SOME COMPOUNDS FROM *ARTOCARPUS TONKINENSIS* A. Chev. Ex Gagnep.

NGUYEN THE ANH, HO NGOC ANH

TRINH THI THUY, TRAN VAN SUNG, TRAN MINH HOI

SUMMARY

The study of the process for isolation, purification, structure elucidation, and bioactivities of some compounds from the leaves of Northern "Chay" (*Artocarpus tonkinensis* A.Chev. ex Gagnep., Moraceae) was carried out. The study explored anti-oxygenase and anti-cancer activities of three extracts n-hexane (EtOAc; BuOH) and tested immunosuppressive activity by lymphocyte transformation test. Bioactivity-guided-fractionation of the n-butanol extract from the leaves of *Artocarpus tonkinensis* A.Chev. ex Gagnep. led to the isolation of two auronol glucosides named maesopsin 4-O- β -D-glucopyranoside and the new alphononin-4-O- β -D-glucopyranoside. Their structures were determined on the basis of MS and NMR spectroscopic data.