

Hoạt tính kháng viêm và ức chế tế bào ung thư của các hợp chất phân lập từ cây tỏi đá ba tia (*Aspidistra triradiata* N. Vislobokov)

Lê Thị Bích Hiền^{1,2*}, Hồ Việt Đức¹, Trần Thị Vân Anh², Nguyễn Thị Hoài¹

(1) Khoa Dược, Trường Đại học Y Dược, Đại học Huế

(2) Khoa Dược, Đại học Y Dược thành phố Hồ Chí Minh

Tóm tắt

Đặt vấn đề: Chi *Aspidistra* sở hữu nhiều hoạt tính sinh học như kháng virus, kháng ung thư, kháng viêm. Nghiên cứu nhằm phân lập hợp chất, xác định hoạt tính kháng viêm và độc tế bào của cây *A. triradiata*.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu: Toàn cây *A. triradiata* được phân lập hợp chất bằng các phương pháp sắc kí, xác định cấu trúc bằng phổ NMR, đánh giá hoạt tính kháng viêm thông qua khả năng ức chế sự sản sinh nitric oxid, hoạt tính độc tế bào bằng phương pháp SRB. **Kết quả:** Đã phân lập 4 hợp chất gồm: (25R)-spirostane-1 β ,2 β ,3 β ,4 β ,5 β ,6 β -hexol (**1**), (25R)-17 α -hydroxy-spirost-5-en-3 β -yl α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranoside (**2**), 2-methoxy pancracin (**3**) và 2-methyl-3-(4,5,7-trihydroxy-8-hydroxymethyltetrahydro-6H-4-pyran-2-yl)-2-propenoic acid (**4**). Hợp chất **1**, **2** và **4** thể hiện hoạt tính kháng viêm ở mức độ trung bình với giá trị IC₅₀ 59,84 - 98,96 μ g/mL. Hợp chất **3** ức chế mạnh hai dòng tế bào ung thư LU-1 và KB với giá trị IC₅₀ 0,95 - 0,98 μ g/mL, hợp chất **1** có hoạt tính trung bình với giá trị IC₅₀ 47,55 - 72,32 μ g/mL. **Kết luận:** Hóa thực vật cây *A. triradiata* được làm sáng tỏ và đã phát hiện các hợp chất có hoạt tính kháng viêm và ức chế tế bào ung thư tiềm năng.

Từ khóa: kháng viêm, nitric oxid, ung thư, *Aspidistra triradiata*, phổ NMR.

Anti-inflammatory and cancer cell inhibitory activities of isolated compounds from *Aspidistra triradiata* N. Vislobokov

Le Thi Bích Hiền^{1,2*}, Ho Viet Duc¹, Tran Thi Van Anh², Nguyen Thi Hoai¹

(1) Faculty of Pharmacy, University of Medicine and Pharmacy, Hue University

(2) Faculty of Pharmacy, University of Medicine and Pharmacy at Ho Chi Minh City

Abstract

Background: The genus *Aspidistra* possesses biological activities such as antiviral, anti-cancer, anti-inflammation. The study aimed to isolate compounds, evaluate the anti-inflammatory and cytotoxic activities of *A. triradiata*. **Materials and methods:** The whole plant of *A. triradiata* was isolated by chromatographic methods, determined the structure of isolated compounds by NMR spectrum. The anti-inflammatory effect was evaluated by the inhibitory activity against nitric oxide production. The cytotoxic activity was determined by SRB method. **Results:** Four compounds were isolated from *A. triradiata*, including (25R)-spirostane-1 β ,2 β ,3 β ,4 β ,5 β ,6 β -hexol (**1**), (25R)-17 α -hydroxy-spirost-5-en-3 β -yl α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranoside (**2**), 2-methoxy pancracin (**3**) and 2-methyl-3-(4,5,7-trihydroxy-8-hydroxymethyltetrahydro-6H-4-pyran-2-yl)-2-propenoic acid (**4**). Compounds **1**, **2** and **4** exhibited moderate anti-inflammatory activities with IC₅₀ values in the range of 59.84 - 98.96 μ g/mL. Compound **3** exhibited potent cytotoxicity against the LU-1 and KB cancer cell lines with IC₅₀ values in the range of 0.95 - 0.98 μ g/mL, compound **1** showed moderate activity with IC₅₀ values ranging from 47.55 to 72.32 μ g/mL. **Conclusion:** The chemical composition of *A. triradiata* has been elucidated and some isolated compounds possessing potential anti-inflammatory and cytotoxic activities were discovered.

Keywords: anti-inflammatory, nitric oxide, cancer, *Aspidistra triradiata*, NMR spectra.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ VÀ MỤC TIÊU

Chi *Aspidistra* là một chi lớn thuộc họ Asparagaceae, bao gồm các loại thảo mộc phân bố ở vùng khí hậu từ ôn đới đến nhiệt đới và nhiệt đới

gió mùa [1]. Thống kê cho thấy chi *Aspidistra* hiện bao gồm khoảng 200 loài và khoảng gần một nửa trong số này được biết là có phân bố ở Việt Nam [2]. Các nghiên cứu về chi *Aspidistra* cho thấy chi

Địa chỉ liên hệ: Lê Thị Bích Hiền; email: ltbhien@huemed-univ.edu.vn

Ngày nhận bài: 13/3/2023; Ngày đồng ý đăng: 26/5/2023; Ngày xuất bản: 10/6/2023

này có nhiều nhóm hoạt chất như saponin, lectin, xanthone, coumarin, flavonoid [3], [4]..., đáng chú ý có hơn 90 saponin đã được phân lập [5]. Các hợp chất và các cao chiết từ chi *Aspidistra* sở hữu nhiều hoạt tính sinh học như: kháng khuẩn, kháng nấm, kháng virus, kháng ung thư, chống oxy hóa, kháng viêm [3], [6], [7]... Tỏi đá ba tia (*Aspidistra triradiata* N.Vislobokov), một loài mới thuộc chi *Aspidistra* được phát hiện ở Việt Nam năm 2015 và hiện nay chưa có nhiều nghiên cứu về hoá thực vật cũng như hoạt tính sinh học. Vì vậy, nghiên cứu được thực hiện để phân lập các hợp chất cũng như đánh giá hoạt tính kháng viêm và ức chế tế bào ung thư của

các hợp chất phân lập từ cây *A.triradiata*, nhằm làm phong phú thêm tri thức hóa thực vật của chi *Aspidistra* cũng như làm cơ sở cho các nghiên cứu ứng dụng trong tương lai.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu là toàn cây Tỏi đá ba tia với đầy đủ cơ quan sinh dưỡng và cơ quan sinh sản, được thu hái ở Huyện Hướng Hóa, Tỉnh Quảng Trị vào tháng 8 năm 2020. Tên khoa học được xác định là *Aspidistra triradiata* N. Vislobokov thuộc họ Asparagaceae.



Hình 1. Loài *Aspidistra triradiata* N. Vislobokov

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp chiết xuất, phân lập và xác định cấu trúc

Phương pháp ngâm với dung môi hữu cơ ở nhiệt độ phòng được sử dụng để tạo dịch chiết toàn phần. Các cao phân đoạn được tạo thành từ cao toàn phần bằng phương pháp chiết phân bố lỏng-lỏng. Các hợp chất tinh khiết được phân lập bằng sắc ký cột silica gel pha thường (Silica gel 60 0,040-0,063mm, Merck); silica gel pha đảo (30-50 μ m, Fuji Silysia Chemical Ltd.) và Sephadex LH-20 (Merck). Theo dõi quá trình phân lập bằng sắc ký lớp mỏng pha thường (TLC-Silica gel 60 F₂₅₄, Merck) và pha đảo (RP₁₈ F₂₅₄, Merck). Vết chất trên bản mỏng được phát hiện bằng đèn tử ngoại ở bước sóng 254 nm và 365 nm, hoặc dùng thuốc thử dung dịch H₂SO₄ 10%. Cấu trúc các hợp chất phân lập được xác định dựa trên các phương pháp phổ cộng hưởng từ hạt nhân một chiều (1D-NMR) và hai chiều (2D-NMR) đo trên máy

Bruker Avance AM500 FT-NMR tại Viện Hoá học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

2.2.2. Phương pháp đánh giá hoạt tính kháng viêm

Hoạt tính kháng viêm được đánh giá thông qua khả năng ức chế sự sản sinh nitric oxid (NO) trên tế bào RAW 264.7 [8]. 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 giờ. Sau đó, môi trường nuôi cấy được loại bỏ, thay bằng môi trường DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) không có FBS (Fetal Bovine Serum) trong 3 giờ. Tế bào được ủ mẫu nghiên cứu ở các nồng độ khác nhau trong 2 giờ sau khi được kích thích sản sinh yếu tố NO bằng LPS (Lipopolysaccharide) trong 24 giờ. Một số giếng không được ủ mẫu mà chỉ sử dụng dung dịch pha mẫu được coi là đối chứng âm. Đối chứng dương được sử dụng là N^G-Metyl-L-arginine acetate (L-NMMA). Hàm lượng nitrite (NO₂⁻) được

xem là chỉ thị cho việc tạo NO, được xác định nhờ bộ Griess Reagent System. Hàm lượng nitrite được đo ở bước sóng 540 nm. Giá trị IC_{50} (nồng độ ức chế 50% lượng tế bào) được xác định bằng phần mềm TableCurve 2Dv4.

2.2.3. Phương pháp đánh giá hoạt tính ức chế tế bào ung thư

Hoạt tính ức chế tế bào ung thư được xác định bằng phương pháp đo quang sử dụng thuốc nhuộm Sulforhodamine B (SRB) [9]. Các tế bào được nuôi cấy trong môi trường DMEM (chứa L-glutamine 2 mM, sodium bicarbonate 1,5 g/L, và FBS 10%) và được ủ ở 37°C, 5% CO_2 . Sau đó, các tế bào được phân tách bằng trypsin-EDTA 0,05%, được cấy vào đĩa 96 giếng với mật độ 4×10^4 tế bào mỗi giếng và ủ trong 12 giờ. Các mẫu thử được thêm cẩn thận vào từng giếng của đĩa 96 giếng và được tiếp tục nuôi cấy trong cùng điều kiện trong 72 giờ. Sau đó, loại bỏ môi trường nuôi cấy, các tế bào còn lại được cố định bằng Acid trichloroacetic (TCA) 20% trong 1 giờ và nhuộm bằng dung dịch SRB ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Thuốc nhuộm không liên kết được loại bỏ bằng cách rửa nhiều lần bằng Acid acetic 1%. Thêm Tris base 10 mM để hòa tan lượng SRB, lắc nhẹ trong 10 phút rồi đo độ hấp thụ ở bước sóng 515 nm trên máy ELISA Plate Reader. Ellipticine được sử dụng làm đối chứng dương và DMSO 10% được sử dụng làm mẫu trắng (DMSO là dung môi pha mẫu, ít ảnh hưởng đến phép đo độ hấp thụ). Phép thử tiến hành trên hai dòng tế bào ung thư: LU-1 (ung thư phổi người) và KB (ung thư biểu mô miệng người). Các phép thử được lặp lại 3 lần. Giá trị IC_{50} được xác định nhờ vào phần mềm máy tính TableCurve 2Dv4.

Khả năng ức chế sự sống sót của tế bào được xác định thông qua công thức:

$$\% \text{ ức chế} = 100\% - \frac{[OD(\text{chất thử}) - OD(\text{ngày 0})] \times 100}{OD(\text{đối chứng âm DMSO 10\%}) - OD(\text{ngày 0})}$$

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Chiết xuất và phân lập

Bột cây *A. triradiata* (3,3 kg) được ngâm chiết ở nhiệt độ phòng bằng methanol (MeOH) (12,5 L/lần x 3 lần), gộp các dịch chiết, cất thu hồi dung môi dưới áp suất giảm, nhiệt độ 50-55°C thu được cao toàn phần (cao MeOH) (550 g). Cao chiết này được phân tán vào nước, sau đó chiết phân đoạn lần lượt với các dung môi *n*-hexane (4 L x 3 lần), ethyl acetate (EtOAc) (4 L x 3 lần), butanol (BuOH) (4 L x 3 lần). Cất thu hồi dung môi dưới áp suất giảm thu được các cao chiết tương ứng: cao *n*-hexane (21,0 g), EtOAc

(92,0 g), BuOH (201,2 g) và cao phân đoạn nước còn lại (203,4 g).

Cao EtOAc được chiết pha rắn bằng cột silica gel pha thường, rửa giải bằng gradient nồng độ của hệ dung môi *n*-hexane-EtOAc (100:0, 40:1, 20:1, 10:1, 5:1, 1:1 và 0:100), thu được 7 phân đoạn, E1-E7. Phân đoạn E6 (16,4 g) được phân tách bằng cột silica gel pha thường với hệ CH_2Cl_2 -EtOAc-MeOH (10:2:1), thu được 12 phân đoạn, E6.1-E6.12. Hợp chất **4** (21,8 mg) được phân lập từ phân đoạn E6.5 (101,0 mg) bằng cách tinh chế trên cột Sephadex LH-20 với hệ CH_2Cl_2 -MeOH (1:1). Phân đoạn E6.11 (98,5 mg) được khai triển bằng cột silica gel pha đảo với hệ dung môi MeOH-nước (3:1) thu được hợp chất **2** (25,5 mg). Phân đoạn E6.12 (119,5 mg) được phân tách bằng cột silica gel pha đảo, rửa giải bằng hệ MeOH-nước (3,5:1), thu được hợp chất **1** (20,0 mg).

Cao BuOH được phân tách trên cột silica gel pha thường bằng hệ CH_2Cl_2 -MeOH-nước (6:1:0,1), thu được 13 phân đoạn, B1-B13. Phân đoạn B12 (3,1 g) được khai triển bằng cột silica gel pha đảo, rửa giải bằng hệ Aceton-MeOH-nước (1:1:1) thu được 3 phân đoạn, B12.1-B12.3. Phân đoạn B12.3 (645,0 mg) được tinh chế bằng cột silicagel pha thường với hệ dung môi CH_2Cl_2 -MeOH-nước (3,5:1:0,1), thu được hợp chất **3** (46,0 mg).

3.2. Xác định cấu trúc các hợp chất phân lập được

Hợp chất **1** được tách ra dưới dạng bột màu trắng. Phổ 1H NMR của **1** cho thấy tín hiệu đặc trưng của 2 nhóm methyl singlet [δ_H 0,72 (s, H_3 -18), 1,25 (s, H_3 -19)], 2 nhóm methyl doublet [δ_H 0,73 (d, J = 6,5 Hz, H_3 -27), 0,89 (d, J = 7,0 Hz, H_3 -21)]. Các dữ liệu phổ ^{13}C NMR và HSQC chỉ ra 27 tín hiệu cộng hưởng, trong đó có 4 tín hiệu đặc trưng của nhóm methyl (δ_C 17,0, 16,0, 15,1 và 14,5), 7 nhóm methylene (δ_C 65,9, 39,7, 34,3, 31,5, 30,8, 28,4 và 20,6), 12 nhóm methine (δ_C 80,1, 77,9, 74,0, 68,1, 67,9, 65,4, 61,8, 54,8, 44,0, 41,4, 29,8 và 29,0) và 4 carbon bậc bốn (δ_C 108,4, 77,2, 43,7 và 40,1). Các tương tác 1H - 1H COSY và tương tác HMBC chính giữa H_3 -18 với C-12 (δ_C 39,7)/C-13 (δ_C 40,1)/C-14 (δ_C 54,8)/C-17 (δ_C 61,8), giữa H_3 -19 với C-1 (δ_C 77,9)/C-5 (δ_C 77,2)/C-9 (δ_C 44,0)/C-10 (δ_C 43,7), giữa H-20 (δ_H 1,81, m)/ H_3 -21 với C-22 (δ_C 108,4), giữa H_3 -21 với C-17/C-20 (δ_C 41,1), và giữa H_3 -27 với C-25 (δ_C 29,8)/C-26 (δ_C 65,9); cùng với các tương tác HMBC khác giúp xác định khung spirostane của **1**.

Các tương tác HMBC giữa 1-OH (δ_H 4,40, d) với C-1 và C-10 chứng tỏ nhóm hydroxyl liên kết với C-1. Tương tác 1H - 1H COSY giữa 4-OH (δ_H 3,93, d) và H-4 (δ_H 3,70, dd) chứng tỏ có 1 nhóm hydroxyl gắn vào vị trí C-4. Tương tự như vậy, các tương tác HMBC

giữa 2-OH (δ_H 4,32, d) với C-2 (δ_C 65,4) và C-3 (δ_C 74,0), 3-OH (δ_H 4,59, d) với C-2, C-3 và C-4 (δ_C 67,9), 5-OH (δ_H 4,10, s) với C-5, C-6 (δ_C 68,1) và C-10, 6-OH (δ_H 3,91, d) với C-7 (δ_C 34,3) và C-6 chứng tỏ có 4 nhóm hydroxyl liên kết với C-2, C-3, C-5 và C-6. Đối chiếu với khung cấu trúc của hợp chất (25R)-5 β -spirostane-1 β ,2 β ,3 β ,4 β ,5 β ,6 β -hexol [10] cho phép xác định cấu hình β của các nhóm hydroxyl tại vị trí C-1, C-2, C-3, C-4, C-5 và C-6 và cấu dạng R của C-25. Vì vậy hợp chất **1** được xác định là (25R)-spirostane-1 β ,2 β ,3 β ,4 β ,5 β ,6 β -hexol [10], [11].

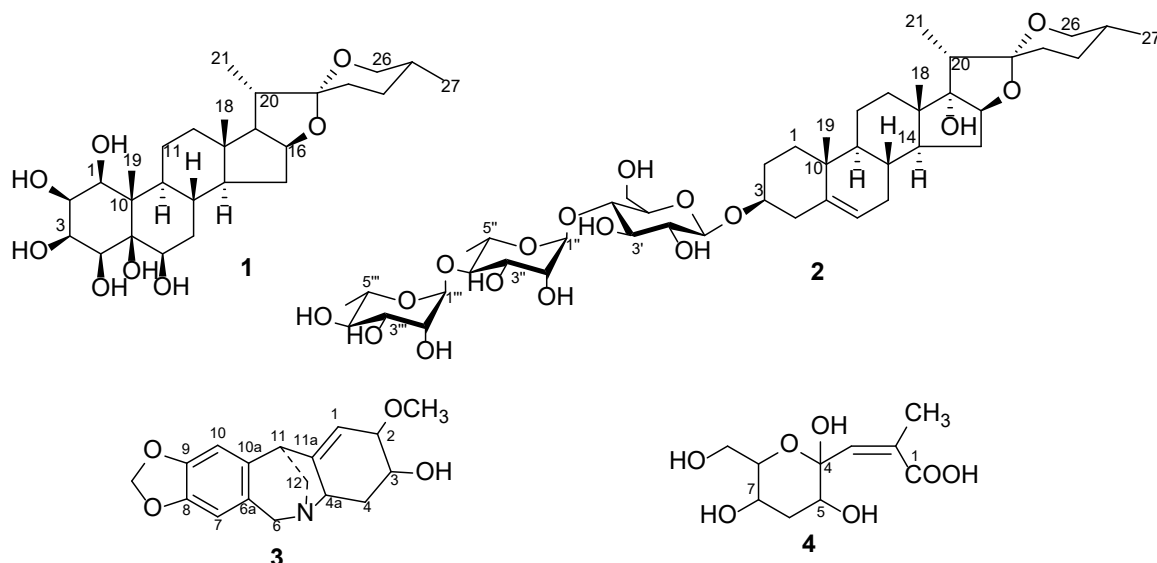
Hợp chất **2** được tách ra dưới dạng bột màu trắng. Phổ 1H NMR cho thấy tín hiệu của 2 nhóm methyl singlet [δ_H 0,91 (s, H_3 -18), 0,89 (s, H_3 -19)], 2 nhóm methyl doublet [δ_H 0,63 (d, J = 5,5 Hz, H_3 -27), 1,19 (d, J = 7,5 Hz, H_3 -21)]. Tín hiệu của 3 proton anomer [δ_H 4,92 (1H, d), 5,75 (1H, s), 6,19 (1H, s)] chỉ ra sự tồn tại của 3 đơn vị đường. Dữ liệu phổ ^{13}C NMR cho thấy tín hiệu đặc trưng của 1 carbon spirocetal (δ_C 109,7, C-22) và 1 carbon nối đôi thế 3 lần (δ_C 140,7, C-5). Các dữ liệu phổ ^{13}C NMR kết hợp với HSQC quan sát thấy 44 tín hiệu cộng hưởng, trong đó 26 tín hiệu từ C-1 đến C-27 (C-23 không quan sát thấy) đều có độ dịch chuyển hóa học tương đồng với các tín hiệu phần aglycone của hợp chất (25R)-17 α -hydroxyspirost-5-en-3 β -yl α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 5)- α -L-arabinofuranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranoside [11]. Từ các phân tích trên có thể dự đoán **2** có cấu trúc saponin steroid khung (25R)-spirost-5-ene-3 β ,17 α -diol gắn 3 đơn vị đường. Thật vậy, các tương tác 1H - 1H COSY và tương tác HMBC chính giữa H_3 -18 với C-12 (δ_C 31,8)/C-13 (δ_C 44,9)/C-14 (δ_C 52,7)/C-17 (δ_C 89,9), giữa H_3 -19 với C-1 (δ_C 37,2)/C-5 (δ_C 140,7)/C-9 (δ_C 49,9)/C-10 (δ_C 36,7), giữa H-20 (δ_H 2,23, dd)/ H_3 -21 với C-22 (δ_C 109,7), giữa H_3 -21 với C-17 (δ_C 89,9)/C-20 (δ_C 44,5), và giữa H_3 -27 với C-24 (δ_C 28,5)/C-25 (δ_C 30,1)/C-26 (δ_C 66,5); cùng với các tương tác HMBC khác của phần aglycone giúp xác định khung spirost-5-ene-3 β ,17 α -diol của **2**.

Dữ liệu phổ ^{13}C NMR chỉ ra sự tồn tại của 3 carbon anomer: C-1' (δ_C 102,0), C-1'' (δ_C 101,9), C-1''' (δ_C 102,8). Qua phân tích các phổ NMR một chiều và hai chiều cho phép xác định hợp chất **2** có sự hiện diện của 1 đơn vị β -D-glucopyranose và 2 đơn vị α -L-rhamnopyranose. Các tương tác HMBC giữa H-1' (δ_H 4,92) với C-3 (δ_C 78,2), H-1'' (δ_H 5,75) với C-4' (δ_C 77,8),

H-1''' (δ_H 6,19) với C-4'' (δ_C 80,0) giúp khẳng định liên kết của gốc O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranosyl vào C-3 của phần aglycone. Vì vậy, cấu trúc của **2** được xác định là (25R)-17 α -hydroxy-spirost-5-en-3 β -yl α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranoside [12].

Hợp chất **3** được tách ra dưới dạng bột màu trắng. 1H NMR (600 MHz, DMSO): δ_H 5,45 (s, H-1), 3,33 (H-2), 3,87 (s, H-3), 1,90 (1H, m, H-4), 1,21 (td, J = 12,0 Hz, 3,0 Hz, H-4), 3,21 (H-4a), 4,15 (1H, d, J = 16,2 Hz, H-6), 3,64 (1H, d, J = 16,8 Hz, H-6), 6,57 (s, H-7), 6,66 (s, H-10), 3,28 (H-11), 2,87 (1H, H-12), 2,82 (1H, dd, J = 11,4 Hz, 2,4 Hz, H-12), 5,91 (s, -OCH₂O-) 5,88 (s, -OCH₂O-), 3,28 (3H, s, -OCH₃); ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO): δ_C 112,6 (C-1), 78,8 (C-2), 67,1 (C-3), 32,2 (C-4), 58,0 (C-4a), 60,6 (C-6), 125,2 (C-6a), 106,7 (C-7), 146,0 (C-8), 145,2 (C-9), 107,1 (C-10), 132,7 (C-10a), 44,7 (C-11), 154,3 (C-11a), 54,9 (C-12), 100,4 (-OCH₂O-), 56,5 (-OCH₃).

Phổ 1H NMR cho thấy tín hiệu đặc trưng của 2 proton thơm tại δ_H 6,66 (1H, s), 6,57 (1H, s); 1 nhóm dioxymethylen tại δ_H 5,91 (1H, s) và 5,88 (1H, s); 1 proton olefin tại δ_H 5,45 (1H, s) và 1 nhóm methoxy tại δ_H 3,28 (3H, s). Phổ ^{13}C NMR và HSQC cho thấy 17 tín hiệu cộng hưởng gồm 1 carbon methoxy (δ_C 56,5), 1 carbon dioxymethylen (δ_C 100,4), 3 carbon methylen (δ_C 60,6, 54,9 và 32,2), 7 carbon methin (δ_C 112,6, 107,1, 106,7, 78,8, 67,1, 58,0 và 44,7) và 5 carbon bậc bốn (δ_C 154,3, 146,0, 145,2, 132,7 và 125,2). Cấu trúc vòng benzen thế 1,2,4,5 được thiết lập qua tương tác HMBC giữa H-7 (δ_H 6,57) với C-9 (δ_C 145,2)/C-10a (δ_C 132,7), giữa H-10 (δ_H 6,66) với C-8 (δ_C 146,0)/C-6a (δ_C 125,2). Vòng này liên kết với nhóm dioxymethylen thông qua tương tác HMBC giữa proton của nhóm này (δ_H 5,91, 5,88) với C-8, C-9. Trong khi đó, các tương tác HMBC từ H-4 (δ_H 1,90, 1,21)/H-6 (δ_H 4,15)/H-11 (δ_H 3,28)/H-12 (δ_H 2,87, 2,82) với C-11a (δ_C 154,3) cho phép đặt liên kết đôi tại C-11a/C-1. Tương tác HMBC giữa nhóm methoxy với C-2 (δ_C 78,8), giữa H-2 (δ_H 3,33) với C-1 (δ_C 112,6), C-11a đề nghị nhóm methoxy tại C-2. Tương tự, tương tác HMBC giữa H-2, H4 (δ_H 1,90, 1,21) đến C-3 (δ_C 67,1) chứng tỏ nhóm hydroxyl liên kết tại C-3. Từ các dữ liệu phổ trên đối chiếu với tài liệu tham khảo [13] giúp xác định hợp chất **3** là 2-methoxy pancracin.



Hình 2. Cấu trúc các hợp chất phân lập từ loài *Aspidistra triradiata*

Hợp chất **4** thu được dưới dạng bột màu trắng. ^1H NMR (500 MHz, DMSO): δ_{H} 7,68 (d, $J = 1,0$ Hz, H-3), 6,16 (dd, $J = 7,5$ Hz, 6,0 Hz, H-5), 2,06 (m, H-6), 4,23 (m, H-7), 3,75 (m, H-8), 3,57 (m, H-9), 1,77 (d, $J = 1,0$ Hz, H-10); ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO): δ_{C} 163,7 (C-1), 150,4 (C-2), 136,1 (C-3), 109,3 (C-4), 83,7 (C-5), 39,4 (C-6), 70,4 (C-7), 87,2 (C-8), 61,3 (C-9), 12,2 (C-10).

Các dữ liệu phổ ^{13}C NMR và HSQC chỉ ra tín hiệu cộng hưởng của 1 nhóm methyl (δ_{C} 12,2), 2 nhóm methylene (δ_{C} 61,3 và 39,4), 4 nhóm methine (δ_{C} 136,1, 87,2, 83,7, 70,4) và 3 carbon bậc 4 (δ_{C} 163,7, 150,4 và 109,3). Carbon bậc 4 có độ dịch chuyển hóa học δ_{C} 163,7 gợi ý về tín hiệu của carbon thuộc nhóm acid carboxylic mang liên kết đôi ở vị trí α , β . Tín hiệu của 2 carbon δ_{C} 150,4 và δ_{C} 136,1 lần lượt được gán cho C_{α} và C_{β} olefinic của nhóm acid carboxylic, trong đó C_{α} có độ dịch chuyển hóa học về vùng trường thấp là do sự tồn tại của nhóm thế methyl trên C_{α} (C-10, δ_{C} 12,2). Các dữ liệu phổ ^{13}C NMR chỉ ra tín hiệu của 2 carbon methine mang nhóm hydroxyl

(δ_{C} 83,7, 70,4) và 1 nhóm carbon methine gắn oxy (δ_{C} 87,2). Các tín hiệu bị đẩy về vùng trường thấp của các carbon mang oxy gợi ý về sự hiện diện của hệ thống vòng tetrahydropyran. Phổ ^1H NMR cũng cho thấy tín hiệu của 3 proton liên kết oxy thuộc hệ thống vòng pyran [(H-5, δ_{H} 6,16, dd), (H-7, δ_{H} 4,23, m), (H-8, δ_{H} 3,75, m)]. Hơn nữa, tín hiệu của carbon methine gắn oxy (C-8, δ_{C} 87,2) chỉ ra rằng carbon này có thể liên kết trực tiếp với nguyên tử oxy trong hệ thống vòng. Carbon methylen mang nhóm hydroxyl (C-9, δ_{C} 61,3) là carbon thế ở vị trí α của vòng tetrahydropyran. Tín hiệu carbon cộng hưởng δ_{C} 39,4 có thể gán cho carbon methylen không gắn oxy của vòng tetrahydropyran (C-6). Carbon mang nhóm hydroxyl (C-4, δ_{C} 109,3) thuộc vòng tetrahydropyran là vị trí duy nhất có thể liên kết với $\text{C}_{\alpha,\beta}$ olefinic của nhóm acid carboxylic. Kết hợp với tài liệu tham khảo [14], hợp chất **4** được xác định là 2-methyl-3-(4,5,7-trihydroxy-8-hydroxymethyltetrahydro-6H-4-pyranyl)-2-propenoic acid.

Bảng 1. Dữ liệu phổ ^1H NMR và ^{13}C NMR của hợp chất **1** và **2** (δ (ppm), J (Hz))

STT	1			2		
	$\delta_{\text{C}}^{\text{b}}$ (125 MHz)	$\delta_{\text{C}}^{\text{#},\text{c}}$ (125 MHz)	$\delta_{\text{H}}^{\text{b}}$ (500 MHz)	$\delta_{\text{C}}^{\text{c}}$ (125 MHz)	$\delta_{\text{C}}^{\text{@},\text{c}}$ (125 MHz)	$\delta_{\text{H}}^{\text{c}}$ (600 MHz)
1	77,9	79,6	3,52 d (7,0)	37,2	37,5	0,89 ^a ; 1,64 ^a
2	65,4	67,2	3,55 ^a	29,9	30,2	1,64 ^a ; 2,03 ^a
3	74,0	75,5	3,86 ^a	78,2	78,2	3,82 t (5,0)
4	67,9	69,6	3,70 dd (10,0, 3,5)	39,0	39,3	2,42 t (11,0); 2,67 d (11,5)
5	77,2	78,7	-	140,7	140,8	-

6	68,1	69,6	3,97 d (2,5)	121,5	121,8	5,27 d (5,0)
7	34,3	35,4	1,58 ^a , 1,20 s	32,0	32,4	1,45 ^a ; 1,86 brd (15,5)
8	29,0	30,1	1,86 ^a	32,1	32,3	1,51 ^a
9	44,0	45,5	1,09 ^a	49,9	50,2	0,89 ^a
10	43,7	45,4	-	36,7	37,0	-
11	20,6	21,5	1,30 ^a	20,7	21,0	1,43 ^a ; 1,48 ^a
12	39,7	40,0	1,65 ^a , 1,09 ^a	31,8	32,1	1,66 ^a ; 2,09 ^a
13	40,1	40,7	-	44,9	45,1	-
14	54,8	56,1	1,11 ^a	52,7	53,0	1,98 ^a
15	31,5	32,3	1,91 ^a , 1,11 ^a	31,4	31,8	1,43 ^a ; 2,16 m
16	80,1	81,1	4,25 dd (13,5, 8,0)	89,6	90,1	4,42 ^a
17	61,8	63,1	1,65 ^a	89,9	90,0	-
18	16,0	16,5	0,72 s	16,9	17,2	0,91 s
19	15,1	16,2	1,25 s	19,1	19,4	0,89 s
20	41,1	42,1	1,81 m	44,5	44,8	2,23 dd (14,5; 7,0)
21	14,5	15,0	0,89 d (7,0)	9,4	9,7	1,19 d (7,5)
22	108,4	109,3	-	109,7	109,8	-
23	30,8	31,8	1,60 ^a , 1,48 ^a	*	32,1	*
24	28,4	29,2	1,56 ^a , 1,32 ^a	28,5	28,8	1,51 ^a
25	29,8	30,6	1,50 ^a	30,1	30,4	1,51 ^a
26	65,9	66,9	3,41 ^a , 3,20 t-like (11,0)	66,5	66,7	3,47 ^a ; 3,45 ^a
27	17,0	17,3	0,73 d (6,5)	17,0	17,3	0,63 d (5,5)
1-OH			4,40 d (7,0)			
2-OH			4,32 d (8,0)			
3-OH			4,59 d (5,5)			
4-OH			3,93 d (10,0)			
5-OH			4,10 s			
6-OH			3,91 d (1,5)			
				3-O-Glc		
1'				102,0	102,5	4,92 d (8,0)
2'				75,1	75,6	3,93 t (8,0)
3'				76,1	76,5	4,13 ^a
4'				77,8	77,7	4,34 ^a
5'				76,6	77,2	3,63 m
6'				61,1	61,4	4,03 dd (12,0; 3,5), 4,16 ^a
				4'-O-Rha		
1''				101,9	102,1	5,75 s
2''				72,4	73,4	4,52 ^a
3''				72,8	73,0	4,49 ^a
4''				80,0	80,3	4,40 dd (13,0; 7,5)
5''				68,1	68,3	4,89 dd (10,0; 4,0)
6''				18,5	18,9	1,61 d (6,0)

	4''-O-Rha		
1'''	102,8	103,2	6,19 s
2'''	72,0	72,6	4,83 m
3'''	72,3	72,9	4,45 dd (9,0; 3,0)
4'''	73,4	74,0	4,26 ^a
5'''	70,1	70,4	4,31 ^a
6'''	18,1	18,4	1,54 d (6,0)

^a: Tín hiệu chập; *: Không quan sát thấy; ^b Đo trong DMSO; ^c Đo trong Pyridine-d₅

TLTK [10]; @ TLTK [12]

3.3. Hoạt tính kháng viêm của các hợp chất phân lập

Các hợp chất phân lập được đánh giá hoạt tính kháng viêm thông qua khả năng ức chế sự sản sinh NO. Các hợp chất **1**, **2** và **4** thể hiện tác dụng kháng viêm ở mức độ trung bình với giá trị IC₅₀ trong khoảng 59,84 - 98,96 µg/mL.

Bảng 2. Hoạt tính kháng viêm của các hợp chất phân lập từ loài *A. triradiata*

Hợp chất	Giá trị IC ₅₀ (µg/mL)
1	59,84 ± 4,83
2	84,36 ± 2,13
3	>100
4	98,96 ± 4,40
L-NMMA	8,94 ± 0,66

3.4. Hoạt tính ức chế tế bào ung thư của các hợp chất phân lập

Trong các hợp chất phân lập, hợp chất **3** thể hiện hoạt tính ức chế 2 dòng tế bào ung thư thử nghiệm rất mạnh với giá trị IC₅₀ trong khoảng 0,95 - 0,98 µg/mL, ở mức độ gần như tương đương với mẫu đối chứng dương Ellipticine. Hợp chất **1** thể hiện tác dụng ở mức độ trung bình với giá trị IC₅₀ trong khoảng 47,55 - 72,32 µg/mL, trong đó tác dụng trên dòng tế bào LU-1 mạnh hơn trên dòng tế bào KB [11].

Bảng 3. Hoạt tính ức chế tế bào ung thư của các hợp chất phân lập từ loài *A. triradiata*

Hợp chất	Giá trị IC ₅₀ (µg/mL)	
	Tế bào LU-1	Tế bào KB
1	47,55 ± 2,64	72,32 ± 2,05
2	> 100	> 100
3	0,98 ± 0,05	0,95 ± 0,05
4	> 100	> 100
Ellipticine	0,38 ± 0,04	0,41 ± 0,05

4. BÀN LUẬN

Dựa trên dữ liệu phổ thực nghiệm kết hợp đối chiếu với các tài liệu đã công bố, cấu trúc hóa học của 4 hợp chất phân lập được xác định bao gồm 1 spirostanol steroid (**1**), 1 saponin khung spirostane (**2**), 1 alcaloid (**3**), và 1 dẫn xuất acid propenoic (**4**). Đây là lần đầu tiên các hợp chất **2**, **3** và **4** được phân lập từ chi *Aspidistra* cũng như từ loài Tỏi đá ba tia thu thập tại Việt Nam. Nghiên cứu trước đây của chúng tôi đã báo cáo về sự phân lập của hợp chất **1** [11], tuy nhiên nghiên cứu này bổ sung thêm về

hoạt tính kháng viêm của hợp chất **1** thông qua khả năng ức chế sự sản sinh NO trên tế bào RAW 264.7. Kết quả của nghiên cứu cũng bổ sung về sự có mặt của các nhóm chất alcaloid, dẫn xuất acid propenoic trong chi *Aspidistra*.

Nghiên cứu vào năm 2000 của Yoshihiro Mimaki và cộng sự đã chỉ ra hợp chất **2** có hoạt tính gây độc tế bào không đáng kể trên tế bào bạch cầu nguyên bào người HL-60 [12]. Hợp chất **3** cho thấy hoạt tính gây độc tế bào rất đáng chú ý, có khả năng ức chế 15 dòng tế bào ung thư với các giá trị IC₅₀ trong

khoảng 1,04 - 6,80 μM . Như vậy kết quả của nhóm nghiên cứu về hoạt tính mạnh của hợp chất **3** trên 2 dòng tế bào thử nghiệm cho thấy sự tương đồng với các nghiên cứu trong y văn. Có thể dự đoán mối liên quan cấu trúc và tác dụng gây độc tế bào ung thư như sau: Đối với các hợp chất spirostanol steroid, tác dụng gây độc tế bào ung thư phụ thuộc vào sự có mặt và số lượng các nhóm hydroxyl của khung spirostan. Hợp chất **1** ((25R)-spirostane-1 β ,2 β ,3 β ,4 β ,5 β ,6 β -hexol) thể hiện tác dụng trên 2 dòng tế bào LU-1 và KB ở mức độ trung bình, trong khi hợp chất (25R)-5 β -spirostane-1 β ,2 β ,3 β ,11 α ,17 α -pentol không thể hiện tác dụng [11]. Đối với spirostanol saponin, hoạt tính phụ thuộc vào cấu trúc mạch đường và sự có mặt của nhóm hydroxyl ở các vị trí khác nhau thuộc khung aglycone. Hợp chất **2** ((25R)-17 α -hydroxy-spirost-5-en-3 β -yl α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranoside) không thể hiện tác dụng gây độc tế bào trong khi hợp chất paris saponin VII thể hiện tác dụng mạnh với sự xuất hiện thêm của 1 đơn vị đường α -L-rhamnopyranosyl gắn vào vị trí C-2' của đơn vị β -D-glucopyranoside [11]. Hợp chất (25S)-17 α ,24 β -dihydroxyspirost-5-en-3 β -yl α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- α -L-rhamno-pyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranoside cấu trúc tương tự hợp chất **2**, đồng thời có thêm 1 nhóm hydroxyl ở vị trí C-24 đã thể hiện tác dụng mạnh hơn hợp chất **2** [15].

Bên cạnh đó, mặc dù các hợp chất phân lập thể hiện hoạt tính kháng viêm ở mức độ trung bình tuy nhiên đây cũng là công bố đầu tiên về hoạt tính kháng viêm của 4 chất phân lập. Như vậy các kết quả nghiên cứu đã đóng góp vào việc công bố tác dụng

kháng viêm và ức chế tế bào ung thư của 4 chất phân lập được cũng như của loài *A. triradiata*. Các kết quả thu được là cơ sở để tiến hành các nghiên cứu sâu hơn về thành phần hoá học và hoạt tính sinh học của loài *A. triradiata*, nhằm tìm kiếm những hợp chất thiên nhiên sở hữu các hoạt tính sinh học tiềm năng.

5. KẾT LUẬN

Từ loài Tỏi đá ba tia (*A. triradiata*) đã phân lập và xác định cấu trúc 4 hợp chất, gồm (25R)-spirostane-1 β ,2 β ,3 β ,4 β ,5 β ,6 β -hexol (**1**), (25R)-17 α -hydroxy-spirost-5-en-3 β -yl α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranoside (**2**), 2-methoxy pancracin (**3**) và 2-methyl-3-(4,5,7-trihydroxy-8-hydroxymethyltetrahydro-6H-4-pyran-2-yl)-2-propenoic acid (**4**). Cả 4 hợp chất đều lần đầu tiên phân lập từ chi *Aspidistra*. Các hợp chất **1**, **2** và **4** thể hiện hoạt tính kháng viêm ở mức độ trung bình với giá trị IC_{50} trong khoảng 59,84 - 98,96 $\mu\text{g/mL}$. Hợp chất **3** ức chế mạnh hai dòng tế bào ung thư LU-1 và KB với giá trị IC_{50} trong khoảng 0,95 - 0,98 $\mu\text{g/mL}$, hợp chất **1** thể hiện tác dụng gây độc tế bào ở mức độ trung bình với giá trị IC_{50} trong khoảng 47,55 - 72,32 $\mu\text{g/mL}$. Các kết quả đã góp phần làm sáng tỏ hóa thực vật đồng thời mở ra hướng nghiên cứu sâu hơn về hoạt tính ức chế tế bào ung thư của loài *A. triradiata*.

Lời cảm ơn: Kết quả nghiên cứu được tài trợ bởi đề tài KHCN cấp Đại học Huế, mã số: DHH2022-04-160. Lê Thị Bích Hiền được tài trợ bởi Chương trình học bổng đào tạo thạc sĩ, tiến sĩ trong nước của Quỹ Đối mới sáng tạo Vingroup (VINIF), mã số VINIF.2022.TS039.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Kalyuzhny S, Vislobokov N, Luu HT, Plugatar Y, Kuznetsov A, Kuznetsova S, Korzhenevsky V, Vin'Kovskaya O. *Aspidistra nikitensis* (Asparagaceae, Nolinoideae), a new species from Vietnam. *Phytotaxa* 2022; 574:289-294.
2. H. J. Tillich. The genus *Aspidistra* Ker-Gawl. (Asparagaceae) In Vietnam. *Taiwania* 2014; 59:1-8.
3. Cui J-M, Kang L-P, Zhao Y, Zhao J-Y, Zhang J, Pang X, Yu H-S, Jia D-X, Liu C, Yu L-Y. Steroidal saponins from the rhizomes of *Aspidistra typica*. *PLoS One* 2016; 11(3): e0150595.
4. Peng J, Kang L-P, Cui J-m, Pang X, Yu H-s, Xiong C-q, Zhang J, Ma B. Chemical comparison of leaf, fibrous root and rhizome of *Aspidistra sichuanensis* by UPLC/Q-TOF MS with multivariate statistical analysis. *European journal of integrative medicine* 2014; 6(6):709-710.
5. Ho DV, Hoang HNT, Vo HQ, Nguyen KV, Pham TV, Le AT, Van Phan K, Nguyen HM, Morita H, Nguyen HT. Three new steroidal saponins from *Aspidistra letreae* plants and their cytotoxic activities. *Journal of natural medicines* 2020; 74(3):591-598.
6. Liang X., Kong L., He M. A new homoisoflavone compound as a potent antibacterial agent from *Aspidistra typica* Baill. *Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences* 2016; 25(9):700-703.
7. Sun Z-Y, Zuo S-Q, Yang X, Lan J-H, Liu C-X, Guo Z-Y, Cheng F, Zou K. Aspidisaponins E - H, Four new steroidal saponins from the rhizomes of *Aspidistra elatior* Blume and their anti-inflammatory activity. *Phytochemistry Letters* 2019; 34:68-73.
8. Zhao F., Chen L., Bi. C, et al. *In vitro* anti-inflammatory effect of picrasmanolignan A by the inhibition of iNOS and COX2 expression in LPSactivated macrophage RAW 264.7 cells. *Molecular medicine reports* 2013; 8(5):1575-1579.
9. Monks A, Scudiero D, Skehan P, Shoemaker R, Paull

- K, Vistica D, Hose C, Langley J, Cronise P, Vaigro-Wolff A. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *Journal of the National Cancer Institute* 1991;83(11):757-766.
10. T Kanmoto, Y Mimaki, Y Sashida, T Nikaido, K Koike, T Ohmoto. Steroidal constituents from the underground parts of *Reineckea carnea* and their inhibitory activity on cAMP phosphodiesterase. *Chemical pharmaceutical bulletin* 1994;42(4):926-931.
11. Hien Bich Thi Le, Duc Viet Ho, Hien Minh Nguyen, Anh Tuan Le, Thi Van Anh Tran, Hoai Thi Nguyen. A new spirostanol steroid and a new spirostanol steroidal saponin from *Aspidistra triradiata* and their cytotoxic activities. *Natural Product Research* 2022; 1-10. doi: 10.1080/14786419.2022.2095635.
12. Yoshihiro Mimaki, Minpei Kuroda, Yuusuke Obata, Yutaka Sashida, Mikio Kitahara, Akira Yasuda et al. Steroidal saponins from the rhizomes of *Paris polyphylla* var. *chinensis* and their cytotoxic activity on HL-60 cells. *Natural Product Letters* 2000; 14(5):357-364.
13. Hyun-Ok, Yang Hak-cheol, Kwon Jin-Soo, Park Sung-Kwon, Chung Myung-Soo Kim. Use of an extract of *Lycoris chejuensis* and/or a compound isolated therefrom for preventing and/or treating a neurodegenerative disease. *European Patent Specification* 2010; 10.
14. Reddy, G Bala Show and N Dhananjaya. Chemical investigation of *Mycale mytilorum* and a study on toxicity and antidiabetic activity of 5-octadecylpyrrole-2-carboxaldehyde. *Bioorganic & medicinal chemistry* 2000; 8(1):27-36.
15. Hien Bich Thi Le, Duc Viet Ho, Hien Minh Nguyen, Van Anh Thi Tran & Hoai Thi Nguyen. Aspidiatas C and D, two new spirostanol saponins from *Aspidistra triradiata* and their cytotoxic activities. *Natural Product Research* 2023; 1-9. doi: 10.1080/14786419.2023.2204432