

# HOẠT TÍNH CHỐNG UNG THƯ TỪ CÂY LUỖI RẮN (*HEDYOTIS CORYMBOSA*) VÀ LUỖI RẮN TRẮNG (*HEDYOTIS DIFFUSA*)

Lại Kim Dung, Trần Văn Sung, Phạm Gia Điền  
Viện Hoá Học - Trung tâm Khoa học Tự nhiên và Công nghệ Quốc gia  
Đường Hoàng Quốc Việt - Cầu Giấy - Hà Nội

## ANTICANCER FROM *HEDYOTIS CORYMBOSA* AND *HEDYOTIS DIFFUSA*

### Abstract:

5 compounds isolated from *Hedyotis corymbosa* and *Hedyotis diffusa* were tested for their anticancer potential, two anthraquinones named 3-hydroxy-2-formyl-1-methoxyanthraquinone and 3-hydroxy-2-methyl-1-methoxyanthraquinone have been isolated from n-hexane extract. Their structures have been assigned by the spectroscopic methods like IR, UV, MS and especially by  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$ -NMR.

Key words: *Hedyotis corymbosa* and *Hedyotis diffusa*, anthraquinone

### 1- Mở đầu

Cây Luối rắn (*Hedyotis corymbosa*) và Luối rắn trắng (*Hedyotis diffusa*), họ cà phê (*Rubiaceae*) là loại cỏ nhỏ, mọc bò, dài khoảng 20-50cm, mọc vào mùa mưa phổ biến ở những nơi râm mát ven đường, bãi đất hoang... [1], [2].

Theo kinh nghiệm dân gian ở Ấn Độ, Trung Quốc, Việt Nam, cây Luối rắn và Luối rắn trắng có vị ngọt nhạt, tính mát có tác dụng chữa sốt, đau nhức xương cốt [1], [2]. Gần đây người ta còn dùng cây Luối rắn và Luối rắn trắng trong bài thuốc điều trị và ngăn ngừa bệnh ung thư như ung thư gan, vú, dạ dày... [3].

Theo một số tài liệu đã công bố, chi *Hedyotis* có chứa nhiều hợp chất khung iridoit, cumarin, tritecpen [8], [9], [10]. Ngoài ra còn ancaloit và anthraquinon. Gần đây, nhiều hợp chất anthraquinon có hoạt tính kháng khuẩn, kháng vi trùng sốt rét được phân lập từ chi *Hedyotis*. Để góp phần nghiên cứu thành phần hoá học các cây thuốc cổ truyền Việt Nam, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu cây Luối rắn và Luối rắn trắng. Bài này chúng tôi giới thiệu một số kết quả trong việc phân lập, xác định cấu trúc hoá học của hai hợp chất có khung anthraquinon và tiến hành thử hoạt tính chống ung thư của một số hợp chất từ cây của Việt nam.

### 2- Kết quả và thảo luận

Từ cặn dịch chiết n-hexan của cây Luối rắn, bằng sắc kí cột trên silicagel, giải hấp bằng dung môi thích hợp thu được chất I tinh thể hình kim sạch. Từ cây Luối rắn trắng thu được chất II sạch. Hai chất tách ra được xác định cấu trúc bằng sự kết hợp các phương pháp phổ như phổ hồng ngoại (IR), phổ khối lượng (MS), phổ cộng hưởng từ hạt nhân proton và cacbon 13 ( $^1\text{H}$ - và  $^{13}\text{C}$ -NMR)

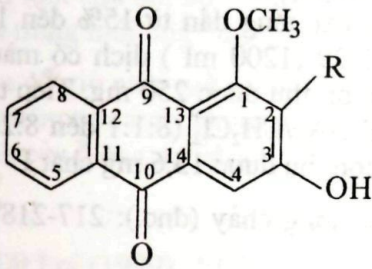
Chất I: Phổ khối và chạm electron (EI-MS) cho pic ion phân tử  $m/z$  282 (30)  $[\text{M}]^+$  và mảnh cơ bản  $m/z$  254 (100)  $[\text{M}-\text{CO}]^+$ , 225 (35) và 139 (30). Phổ IR có đỉnh hấp thụ ở  $\nu^*=1675$  và  $1647\text{ cm}^{-1}$  đặc trưng cho nhóm CO của hợp chất anthraquinon. Phổ  $^1\text{H}$ -NMR ở phía trường thấp có singulet của nhóm CHO ( $\delta$ 10,4 ppm 1H, s) và singulet từ ( $\delta$ 12,27 1H, s) của nhóm OH. Phía trường cao có singulet của nhóm  $\text{OCH}_3$  ( $\delta$ 4,13 3H, s). Cả ba nhóm thế này đều được gắn với vòng A. Điều này được thấy rõ thêm qua singulet ở  $\delta$ 7,61 (1H, s, H-4). Cặp dublet kép ở  $\delta$ 8,23 (1H, dd,  $J=1,38$  và  $7,97$  Hz) và  $\delta$ 8,28 (1H, dd,  $J=1,38$  và  $7,97$  Hz), cặp triplet của dublet ở  $\delta$ 7,79 (1H, td,  $J=1,65$  và  $7,42$  Hz) và  $\delta$ 7,83 (1H, td,  $J=1,65$  và  $7,42$  Hz) cho phép khẳng định vòng C không có nhóm thế.

Phổ  $^{13}\text{C-NMR}$  và APT cho biết phân tử có 16 cacbon trong đó có 9 cacbon bậc 4, 6 nhóm CH và 1 nhóm  $\text{CH}_3$ . Nhóm CHO được khẳng định qua tín hiệu của CH ở phía trường thấp  $\delta 195,2$  ppm và hai nhóm cacbonyl ở  $\delta 179,96$  (C-9) và  $\delta 181,72$  (C-10). Tín hiệu ở  $\delta 64,73$  của nhóm  $\text{OCH}_3$ .

Từ số liệu phổ và so sánh với tài liệu [4],[5],[6] đã xác định được cấu trúc của chất I là 3-hydroxy-2-formyl-1-methoxyanthraquinon.

Chất II có pic ion phân tử ở  $m/z$  268  $[\text{M}]^+$ . Phổ IR có cực đại hấp thụ ở  $\nu^*$   $3402\text{ cm}^{-1}$  cho thấy phân tử có nhóm OH và  $\nu^*$   $1673$  và  $1640\text{ cm}^{-1}$  đặc trưng cho nhóm CO của anthraquinon. Phổ  $^1\text{H-NMR}$  có singulet từ ở trường thấp ( $\delta 11,23$  1H, s) khẳng định sự có mặt của nhóm OH, phía trường cao có singulet của nhóm  $\text{CH}_3$  ( $\delta 2,21$  3H, s) và của nhóm  $\text{OCH}_3$  ( $\delta 3,76$  3H, s). Cả ba nhóm thế này đều ở vòng A. Điều này được thấy rõ thêm qua singulet ở  $\delta 7,44$  (1H, s, H-4). Cặp dublet kép ở  $\delta 8,27$  (1H, dd,  $J=1,37$  và  $7,69$  Hz) và  $\delta 8,18$  (1H, dd,  $J=1,37$  và  $7,69$  Hz), cặp triplet của dublet ở  $\delta 7,79$  (1H, td,  $J=1,65$  và  $7,42$  Hz) và  $\delta 7,71$  (1H, td,  $J=1,65$  và  $7,42$  Hz) cho thấy vòng C không có nhóm thế.

Phổ  $^{13}\text{C-NMR}$  cho biết phân tử chất II có 16 cacbon. Phía trường cao có tín hiệu ở  $\delta 9,17$  của nhóm  $\text{CH}_3$  và  $\delta 60,60$  của nhóm  $\text{OCH}_3$ . Phía trường thấp là các tín hiệu  $\delta 182,30$  (C-10) và  $\delta 179,88$  (C-9),  $\delta 161,40$  (C-3) và  $\delta 160,32$  (C-1). So sánh số liệu phổ của chất II với tài liệu [7],[8], đã xác định được cấu trúc của chất II là 3-hydroxy-2-methyl-1-methoxyanthraquinon. Chất này có tên là rubiadin-1-methyl-ether và đã được phân lập từ cây *Morinda elliptica* [6], *Prismatomeris sessiliflora* [7], *Prismatomeris malayana* [8].



I: R=CHO

II: R=CH<sub>3</sub>

Ngoài hai anthraquinon trên chúng tôi còn phân lập được 3 chất sạch khác, cấu trúc của chúng đang được tiếp tục nghiên cứu. Gần đây các hợp chất có khung anthraquinon được nhiều nhà khoa học trên thế giới quan tâm do chúng có hoạt tính kháng khuẩn và kháng khối u mạnh [7], [9].

#### Kết quả thử hoạt tính chống tế bào ung thư: ( $\text{ED}_{50}$ $\mu\text{g/ml}$ ).

| STT | Mẫu thử  | L1210 | B16   |
|-----|----------|-------|-------|
| 1   | D5       | >30   | 50,63 |
| 2   | C5       | >30   | 50,57 |
| 3   | Chất I   | 3,17  | 3,87  |
| 4   | Chất II  | 3,91  | 5,24  |
| 5   | Chất III | >30   | >100  |
| 6   | Chất IV  | 27,65 | 29,37 |
| 7   | Chất V   | 18,32 | 29,22 |

$\text{ED}_{50}$  ( $\mu\text{g/ml}$ ) được tính bằng chương trình máy tính nhằm xác định giá trị nồng độ của thuốc mà có thể tiêu diệt (hoặc ức chế sinh sản) 50% số tế bào ung thư so với mẫu đối chứng (không có thuốc). Các thí nghiệm đều được lặp 3 lần để lấy giá trị trung bình.

Mẫu D5 là dịch chiết MeOH của cây *Hedyotis diffusa*

Mẫu C5 là dịch chiết MeOH của cây *Hedyotis corymbosa*

Chất I là 3-hydroxy-2-formyl-1-methoxyanthraquinon.

Chất II là 3-hydroxy-2-methyl-1-methoxyanthraquinon.

Chất III, chất IV, chất V đang được nghiên cứu xác định cấu trúc.

Từ kết quả thử cho thấy chất I và chất II có khả năng chống tế bào ung thư cao đối với cả hai dòng tế bào L1210 và B16. Chúng tôi đang tiến hành thử khả năng kháng vi trùng sốt rét của các hợp chất này.

### 3- Thực nghiệm

Phổ  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -NMR được đo trên máy GEMINI 300 và 75,5 MHz tương ứng.

Phổ hồng ngoại (FTIR) được ghi dưới dạng viên nén trong KBr trên máy IMPACT 410 của hãng CARLZEISS JENA, CHLB Đức tại Viện Hoá học, Trung tâm Khoa học tự nhiên và công nghệ Quốc gia.

Phổ tử ngoại được ghi trên máy UVIKON 940.

Phổ khối được ghi trên máy ADM 402, ADM Intectra GmbH, CHLB Đức.

Sắc ký lớp mỏng phân tích được tiến hành trên bản mỏng nhôm silicagel Merck 60  $F_{245}$  trắng sẵn, độ dày 0,2 mm. Sắc ký cột dùng silicagel cỡ hạt 0,063-0,200 mm

#### Xử lý mẫu và phương pháp chiết

Cây Lưỡi rắn được thu hái vào tháng 8 năm 1997 tại Từ Liêm - Hà Nội. 500 g mẫu cây khô xay nhỏ được chiết bằng MeOH ở nhiệt độ phòng, loại dung môi dưới áp suất giảm thu được 31g cặn MeOH. Hoà tan cặn này trong 300 ml  $\text{H}_2\text{O}$  và chiết với n-hexan, cất loại dung môi thu được 13g cặn dịch chiết n-hexan. Cặn này được phân tách bằng sắc ký trên cột silicagel, dung môi giải hấp n-hexan/EtOAc (lượng EtOAc tăng dần từ 15% đến 100%) thu được 56 phân đoạn (100 ml/pđ). Từ phân đoạn 17-29 (1200 ml) dịch có màu vàng chanh hiện màu nâu đỏ với iếm / ethanol, loại dung môi, thu được 250 mg. Tiếp tục làm sạch trên cột silicagel, dung môi giải hấp là n-hexan/EtOAc/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (8:1:1 đến 8:2:1). Từ phân đoạn 15-18 (120 ml) sau khi kết tinh lại trong axeton thu được 15,6 mg chất I.

Chất I: Tinh thể hình kim màu vàng có nhiệt độ nóng chảy (đnc.): 217-218°C (kết tinh trong axeton).  $R_f = 0,42$  [n-hexan / EtOAc (7:2)].

$\text{IR}^{\text{KBr}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 2958, 1675, 1647, 1562, 1342, 1258.

$\text{UV}\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$  nm (log $\epsilon$ ) 248,3 (1,8) 281,5 (1,6) 378,4 (0,25)

$\text{EI-MS}$  ( $m/z$ ) (%): 282 [ $\text{M}^+$ ](30), 254[ $\text{M-CO}^+$ ](100), 225 [254-CHO] $^+$  (35), 139(20).

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 7,61$  (H-4, s); 8,23 (H-5, dd,  $J=1,38$  và 7,97 Hz); 7,83 (H-6, td,  $J=1,65$  và 7,42 Hz); 7,79 (H-7, td,  $J=1,65$  và 7,42 Hz); 8,28 (H-8, dd,  $J=1,38$  và 7,97 Hz); 12,27 (OH-3, s); 4,13 (OCH<sub>3</sub>-1, s); 10,40 (CHO-2, s).

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 166,45$  (C-1); 117,96 (C-2); 166,48 (C-3); 113,02 (C-4); 127,27 (C-5); 134,70 (C-6); 134,72 (C-7); 127,00 (C-8); 179,96 (C-9); 181,72 (C-10); 132,35 (C-11); 133,54 (C-12); 117,57 (C-13); 141,50 (C-14); 64,73 (OCH<sub>3</sub>); 195,25 (CHO).

Chất II: Tinh thể hình kim màu vàng cam được tách ra từ dịch chiết n-hexan của cây Lưỡi rắn trắng, nhiệt độ nóng chảy (đnc.): 293 -295°C (kết tinh trong axeton).  $R_f = 0,19$  [n-hexan / EtOAc /  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (8:1:1)]

$\text{IR}^{\text{KBr}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3402, 2925, 1673, 1640, 1565, 1339.

UV $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}}$  nm (log $\epsilon$ ): 238 (4,26), 244 (4,23), 282 (4,55), 358 (3,48).

EI-MS ( $m/z$ ) (%): 268 [M]<sup>+</sup> (100), 239 [M-CO]<sup>+</sup> (12), 149 (100), 113 (20).

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  = 7,44 (H-4, s); 8,18 (H-5, dd, J=1,10 và 7,69 Hz); 7,79 (H-6, td, J=1,65 và 7,42 Hz); 7,71 (H-7, td, J=1,65 và 7,42 Hz); 8,27 (H-8, dd, J=1,37 và 7,69Hz); 11,23 (OH-3, s); 3,76 (OCH<sub>3</sub>-1, s); 2,13 (CH<sub>3</sub>-2, s).

<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  = 160,32 (C-1); 125,99 (C-2); 161,40 (C-3); 108,92 (C-4); 125,89 (C-5); 133,19 (C-6); 134,28 (C-7); 126,46 (C-8); 179,88 (C-9); 182,30 (C-10); 134,36 (C-11); 131,86 (C-12); 117,73 (C-13); 134,51 (C-14); 60,60 (OCH<sub>3</sub>); 9,17 (CH<sub>3</sub>).

**Thử hoạt tính sinh học trên tế bào ung thư máu L1210 (mg/ml), tế bào ung thư da B6 (mg/ml).**

- Phương pháp thử:

Phương pháp thử hoạt tính sinh học chống tế bào ung thư được tiến hành theo phương pháp của viện nghiên cứu quốc gia Mỹ (National Cancer Institute – NCI) như sau:

- Chuẩn bị dung dịch tế bào: 24 giờ trước khi thử phải chuẩn bị dung dịch tế bào có nồng độ 0,8 – 1x10<sup>6</sup> tế bào/ml (tỷ lệ tế bào sống >95%), nuôi giữ trong tủ ấm 37<sup>o</sup>C có dòng khí 5% CO<sub>2</sub>. Trước khi thử nồng độ tế bào phải đạt được 5x10<sup>4</sup> tế bào/ml (dung dịch A).

- Chuẩn bị mẫu thử hoạt tính: Mẫu thử được pha ở nồng độ 0,1mg/ml trong dimethylsulfoxide (DMSO). Sau đó pha loãng 10 lần với chính dung dịch dinh dưỡng để nuôi cấy tế bào (dung dịch B).

Lần lượt cho 60, 30, 15  $\mu$ l dung dịch mẫu thử (B) vào các ống nghiệm Screw-cappet đã có sẵn trong mỗi ống 3ml dung dịch tế bào (A).

Sau 48 giờ nuôi giữ trong tủ ấm 37<sup>o</sup>C có dòng khí 5% CO<sub>2</sub>. Số lượng tế bào của từng ống được đếm trên máy Hemacytometer ( số lượng tế bào thực tế cho mỗi nồng độ là giá trị trung bình của 3 ống nghiệm).

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Đỗ Tất Lợi (1999), *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*. NXB Y học, Tr. 250.
- [2] Phạm Hoàng Hộ (1999), *Cây cỏ Việt Nam*. Mekong Printing, Tập II, Tr.129.
- [3] Đỗ Huy Bích, *Về hai cây thuốc chữa ung thư*. Báo Khoa học và đời sống số 27 (1071) ngày 6-7-1995.
- [4] Đỗ Quốc Việt (2000), *Luận án thạc sĩ khoa học hoá học, Viện Hoá Học. Trung tâm Khoa học Tự nhiên và Công nghệ Quốc gia*.
- [5] Thomson R.H (1971), *Naturally occurring quinones*. Academic Press New York pp.382.
- [6] Nor Hadiani, Abdul M. Ali et al (1997). "Anthraquinones from *Morinda elliptica*". *Phytochemistry* 45 (8) pp.1723-1725.
- [7] Kittiak Likhitwitayawuid, Sukanya dej-adtsai et al (1999). "Antimalarials from *Stephania venosa*, *Prismatomeris sessiliflora*, *Diospyros montana* and *Murraya siamensis*". *Planta Medica*, 65, pp.754–756.
- [8] H.H.Lee (1969). "Colouring matters from *Prismatomeris malayana*". *Phytochemistry*, 8, pp. 501-503.
- [9] Tong Ing Ho, Gen-Phon Chen et al (1986). "Anthraquinones from *Hedyotis diffusa*". *Phytochemistry*, 25 (8), pp.1988-1989.
- [10] Y.Nishihama, K.Masuda, M.Yamaki, S.Takagi, K.Sakina (1981). "Three new Iridoid Glucosides from *Hedyotis diffusa*". *Planta Medica*, 43, pp. 28-33.