

NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN HÓA HỌC VÀ HOẠT TÍNH ỨC CHẾ ENZYME α -GLUCOSIDASE CỦA CAO ETHYL ACETATE THÂN CÂY QUÉO (*MANGIFERA REBA*)

Dương Thị Thanh Trúc^{1*}, Nguyễn Trung Nhân²

¹Trường Đại học Khánh Hòa; ²Trường Đại học Khoa học Tự Nhiên – Đại học Quốc gia thành phố Hồ Chí Minh

Tóm tắt: Từ cao ethyl acetate của thân cây Quáo (*Mangifera reba*) đã phân lập 3 hợp chất 5,7-hydroxychromone (**1**), gallic acid (**2**) và methyl gallate (**3**). Cấu trúc của các hợp chất đã được xác định dựa vào dữ liệu phổ cộng hưởng từ hạt nhân NMR và so sánh với các tài liệu tham khảo. Các hợp chất trên đã được thử hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase. Hai hợp chất **1** và **2** thể hiện hoạt tính mạnh với giá trị IC_{50} lần lượt là 27,0 và 50,9 μ M so với chất đối chứng dương acarbose (IC_{50} , 214.5 μ M).

Từ khóa: *Mangifera reba*, Anacardiaceae, ức chế enzyme α -glucosidase.

1. Đặt vấn đề

Trong cơ thể, màng tế bào ruột non tiết ra enzyme α -glucosidase thủy phân carbohydrate từ thức ăn thành các oligosaccharide, rồi thủy phân oligosaccharide thành glucose và thẩm thấu vào máu qua màng ruột non để nuôi các tế bào của cơ thể. Khi cơ thể bị rối loạn chuyển hóa carbohydrate thì lượng đường trong máu cao sẽ dẫn đến bệnh đái tháo đường. Bằng cách ức chế hoạt động của enzyme α -glucosidase có thể làm chậm quá trình thủy phân của carbohydrate và làm giảm lượng đường trong máu [3,4,9]. Do đó, việc tìm kiếm các cây thuốc có nguồn gốc từ tự nhiên có khả năng ức chế enzyme α -glucosidase có ý nghĩa rất lớn nhằm ngăn ngừa bệnh đái tháo đường.

Chính vì vậy, chúng tôi tiến hành sàng lọc hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase của một số cây thuốc nhằm phát hiện khả năng điều trị bệnh đái tháo đường của chúng.

Dựa trên kết quả thử hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase của các mẫu cao CH_3OH từ các loài cây thu hái tại rừng Quốc gia Mã Đà tỉnh Đồng Nai cho thấy mẫu cao của thân cây Quáo (*Mangifera reba* P.) họ

Đào lộn hột Anacardiaceae có hoạt tính mạnh ($IC_{50} = 0,1 \mu g/mL$) [10], tuy nhiên chưa có tài liệu nào nghiên cứu về thành phần hóa học cũng như hoạt tính sinh học của loài cây này ở Việt Nam cũng như thế giới. Do vậy loài cây này hứa hẹn nhiều tiềm năng sẽ phân lập được các hợp chất có khả năng ức chế enzyme α -glucosidase mạnh, bổ sung dữ liệu về các loài dược liệu có tác dụng hỗ trợ điều trị bệnh đái tháo đường.

Quáo hay xoài Quáo có tên khoa học là *Mangifera reba* P., thuộc chi *Mangifera*, họ Đào lộn hột (Anacardiaceae). Thân to, cao 10-20 m, có cây cao tới 30 m gọi là cây đại thụ, với cành non có cạnh. Lá có phiến thuôn dài-mũi mác, dài 12-16 cm, rộng 3-5 cm, đầu nhọn, gốc hình góc tròn rộng; gân bên 18-22 đôi, mỏng, hơi nổi rõ ở mặt trên; cuống dài 0,1-0,25 cm. Cụm hoa ở ngọn dài 1,5 cm; không cuống, dạng tháp, có lông cứng, với nhánh mọc đứng mang đầy hoa. Hoa lưỡng tính; lá đài 5, dài 0,8 cm, hình tam giác nhọn; cánh hoa dài hơn lá đài, cong, thuôn, có 3 mào to có tuyến, dài đến nửa cánh. Quả hạch đẹp, dài 7-8 cm, cong; nhân hạt mang nhiều gân to. Cây sinh trưởng và phát triển rất tốt ở

Việt Nam, phổ biến ở các tỉnh miền Trung và miền Nam [2].

2. Thực nghiệm

2.1. Hóa chất và thiết bị

Máy ghi phổ cộng hưởng từ hạt nhân Bruker-500 MHz có chứa chất nội chuẩn TMS, silica gel pha thường (Merck), bản mỏng silica gel pha thường (Merck) và các dung môi *n*-hexane, chloroform, ethyl acetate, ethanol và methanol (Schalau, độ tinh khiết >99%) cùng các dụng cụ cơ bản của phòng thí nghiệm.

2.2. Nguyên liệu

Cây được thu hái ở Rừng Quốc gia Mã Đà, Khu bảo tồn Thiên nhiên - Văn hoá, huyện Vĩnh Cửu, tỉnh Đồng Nai vào tháng 03 năm 2014, được định danh bởi PGS. TS. Trần Hợp, Viện Sinh học Nhiệt đới Thành phố Hồ Chí Minh.



Hình 1. Lá, quả của cây Quáo

Từ 6,0 kg thân cây tươi được đem phơi khô, xay nhỏ thành bột.

2.3. Chiết xuất và phân lập

Chiết Soxhlet 6,0 kg bột khô thân cây lần lượt với các dung môi *n*-hexane, ethyl acetate và methanol thu được dịch trích *n*-hexane, ethyl acetate và methanol. Tiến hành thu hồi dung môi dưới áp suất kém thu được cao *n*-hexane (51,5 g), ethyl acetate (84 g) và cao methanol (139,2 g). Cao ethyl acetate (84 g) được tiến hành sắc ký cột pha thường với hệ dung môi giải ly là $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{OH}$ (0%-100%) thu được 10 phân đoạn, **QA** (0,9 g), **QB** (2,9 g), **QC** (0,9 g), **QD** (0,9 g), **QE** (1,7 g), **QF** (4,7 g), **QG** (30 g), **QH** (8,8 g), **QI** (11,9 g), **QJ** (7,7 g).

Các phân đoạn được tiến hành sắc ký cột và sắc ký điều chế trên silica gel pha thuận với các hệ dung môi giải ly khác nhau, thu

được hợp chất tinh khiết. Từ phân đoạn **QC** phân lập được hợp chất **1**, từ phân đoạn **QG** đã phân lập được hai hợp chất **2** và **3**.

Hợp chất **1** có dạng bột vô định hình, màu trắng, tan tốt trong dung môi acetone. Sắc kí bản mỏng với hệ dung môi giải ly *n*-hexane: CHCl_3 (5:5), hấp thu UV ở bước sóng 245 nm, hiện hình với thuốc thử H_2SO_4 20% hơi nóng, cho vết màu vàng. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, acetone- d_6) 12,75 (1H, s), 8,05 (1H, d, 6,0), 6,38 (1H, d, 2,0), 6,25 (1H, d, 2,0), 6,21 (1H, d, 6,0). $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, acetone- d_6) 182,9, 165,2, 165,1, 157,7, 157,6, 111,6, 104,8, 99,8, 94,8.

Hợp chất **2** dạng bột màu trắng, tan tốt trong dung môi acetone. Sắc kí bản mỏng pha thường với hệ dung môi giải ly $\text{CHCl}_3\text{:CH}_3\text{COCH}_3\text{:CH}_3\text{OH}$ (8:1:1) thu được vết tròn, hấp thu UV ở bước sóng 245 nm, hiện hình với thuốc thử H_2SO_4 20%, hơi nóng cho vết màu đen. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, acetone- d_6) 7,14 (s). $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, acetone- d_6) 168,1, 146,1, 138,7, 122,2, 110,2.

Hợp chất **3** là chất bột màu trắng, tan tốt trong dung môi acetone. Sắc kí lớp mỏng với hệ dung môi giải ly $\text{CHCl}_3\text{:CH}_3\text{COCH}_3$ (7:3) thu được vết tròn, hấp thu UV 254 nm, hiện hình với thuốc thử H_2SO_4 20% hơi nóng, cho vết màu tím đen. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, acetone- d_6) 7,11 (1H, s), 3,78 (3H, s). $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, acetone- d_6) 167,2, 146,0, 138,6, 121,9, 109,8, 51,9.

2.4. Quy trình thử hoạt tính

Quy trình thử hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase được thực hiện như sau: mẫu được hòa tan trong dung dịch đệm phosphate 0,01 M, pH 7. Thêm 25 mL enzyme α -glucosidase 0,2 U mL $^{-1}$, lắc đều, ủ trong 5 phút tại nhiệt độ 37°C. Tiếp tục thêm 25 mL dung dịch chất nền *p*-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside 3 mM và ủ trong 30 phút tại 37°C để phản ứng xảy ra. Sau khi ủ, thêm 375 mL Na_2CO_3 0,1 M để ngừng phản ứng. Dung dịch sau đó được đo quang tại bước sóng 401 nm. Mỗi mẫu thử được thực hiện tại 5 nồng độ 250, 100, 50, 25, 10 mM, mỗi nồng độ thực hiện 3 lần. Khả năng ức chế enzyme α -glucosidase được đánh giá thông qua giá trị phần trăm ức chế (I%):

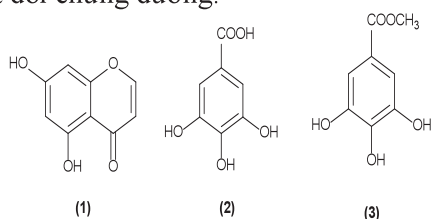
$$I\% = \frac{A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \cdot 100\%$$

Trong đó:

A_{control} : Giá trị mật độ quang của dung dịch không chứa mẫu khảo sát.

A_{sample} : Giá trị mật độ quang của dung dịch chứa mẫu khảo sát.

Dựa trên phần trăm ức chế tại các nồng độ khác nhau của mẫu thử, đánh giá khả năng ức chế enzyme α -glucosidase của mẫu thử thông qua giá trị IC_{50} . Giá trị IC_{50} được định nghĩa là nồng độ của một mẫu thử mà tại đó nó có thể ức chế được 50% enzyme α -glucosidase. Quy trình sử dụng acarbose là chất đối chứng dương.



Hình 2. Cấu trúc các hợp chất phân lập được

3. Kết quả nghiên cứu và thảo luận

Hợp chất **1** có dạng bột vô định hình, màu trắng, tan tốt trong dung môi acetone. Sắc kí bản mỏng với hệ dung môi giải ly *n*-hexane: $CHCl_3$ (5:5), hấp thu UV ở bước sóng 245 nm, hiện hình với thuốc thử H_2SO_4 20% hơi nóng, cho vết màu vàng.

Phổ 1H -NMR (500 MHz, acetone- d_6) của hợp chất **1** xuất hiện tín hiệu proton OH kiềm nổi [δ_H 12,75 (1H, s)], 2 proton olefin [δ_H 8,05 (d, 6,0, H-2), 6,21 (d, 6,0 Hz, H-3)], 2 proton thơm ghép *meta* với nhau [δ_H 6,38 (d, 2,0, H-8), 6,25 (d, 2,0, H-6)]. Phổ ^{13}C -NMR (125 MHz, acetone- d_6) của hợp chất **1** cho tín hiệu cộng hưởng của 9 tín hiệu của carbon, trong đó có 1 carbon carbonyl ketone [δ_C 182,9 (C-4)], 6 carbon của một vòng thơm [δ_C 165,2 (C-5), 165,1 (C-7), 157,6 (C-8a), 104,8 (C-4a), 99,8 (C-6), 94,8 (C-8)] và 2 carbon olefin [δ_C 157,7, (C-2), 111,6 (C-3)]. Từ dữ liệu phổ NMR kết hợp so sánh tài liệu tham khảo, cấu trúc của hợp chất **1** được đề nghị là 5,7-hydroxychromone.[13]

Hợp chất **2** dạng bột màu trắng, tan tốt trong dung môi acetone. Sắc kí bản mỏng pha thường với hệ dung môi giải ly $CHCl_3:CH_3COCH_3:CH_3OH$ (8:1:1) thu được

vết tròn, hấp thu UV ở bước sóng 245 nm, hiện hình với thuốc thử H_2SO_4 20%, hơi nóng cho vết màu đen.

Phổ 1H -NMR (500 MHz, acetone- d_6) của hợp chất **2** chỉ xuất hiện tín hiệu của 2 proton thơm [δ_H 7,14 (s, H-2, H-6)]. Phổ ^{13}C -NMR (125 MHz, acetone- d_6) của hợp chất **2** xuất hiện tín hiệu cộng hưởng của 7 carbon, bao gồm 1 carbon carboxyl [δ_C 168,1 (1-COOH)] và tín hiệu của một vòng thơm [δ_C 122,2 (C-1), 110,2 (C-2, C-6), 146,1 (C-3, C-5), 138,7 (C-4)]. Từ dữ liệu phổ NMR kết hợp so sánh với tài liệu tham khảo, cấu trúc của hợp chất **2** được đề nghị là gallic acid [5].

Hợp chất **3** là chất bột màu trắng, tan tốt trong dung môi acetone. Sắc kí lớp mỏng với hệ dung môi giải ly $CHCl_3:CH_3COCH_3$ (7:3) thu được vết tròn, hấp thu UV 254 nm, hiện hình với thuốc thử H_2SO_4 20% hơi nóng, cho vết màu tím đen.

Phổ 1H -NMR (500 MHz, acetone- d_6) của hợp chất **3** xuất hiện tín hiệu của một vòng thơm thế ở vị trí 1, 3, 4, 5 [δ_H 7,11 (2H, s, H-2 và H-6)] và một nhóm methoxy [δ_H 3,78 (s)]. Phổ ^{13}C -NMR (125 MHz, acetone- d_6) hiện diện các tín hiệu cộng hưởng ứng với 8 carbon, trong đó có 1 carbon carbonyl ester [δ_C 167,2 (C=O)], 6 carbon thơm [δ_C 146,0 (C-3, C-5), 138,6 (C-4), 121,9 (C-1), 109,8 (C-2, C-6)] và 1 carbon methoxyl (δ_C 51,9, -OCH₃). Từ dữ liệu phổ NMR kết hợp so sánh với tài liệu tham khảo, cấu trúc của hợp chất **3** được đề nghị là methyl gallate [14].

Các hợp chất phân lập được đều được thử hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase. Kết quả cho thấy các hợp chất **1** và **2** thể hiện hoạt tính mạnh hơn chất đối chứng dương acarbose (IC_{50} 214,5 μ M), với giá trị IC_{50} lần lượt là 27,0, 50,9 μ M. Tại nồng độ 50 μ M hai hợp chất **1** và **2** có phần trăm ức chế ($I\%$) trên 50% với giá trị lần lượt là $68,34 \pm 0,82$ và $55,0 \pm 1,1$.

4. Kết luận

Từ cao ethyl acetate của thân cây Quế đã phân lập được 3 hợp chất 5,7-hydroxychromone (**1**), gallic acid (**2**) và methyl gallate (**3**). Cấu trúc của các hợp chất đã được xác định dựa vào dữ liệu phổ cộng hưởng từ hạt nhân NMR và so sánh với các tài liệu tham khảo. Kết quả thử hoạt tính của các hợp chất trên cho thấy hai hợp chất (**1**) và

(2) có khả năng ức chế enzyme α -glucosidase mạnh hơn chất đối chứng dương acarbose. Nghiên cứu đã góp phần cung cấp dữ liệu về thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của cây Quáo-loài cây có hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase mạnh nhưng trước đây chưa có tài liệu công bố về thành phần hóa học cũng như hoạt tính sinh học của loài cây này ở Việt Nam và thế giới.

Tài liệu tham khảo

1. Dương Thị Thanh Trúc, Đặng Hoàng Phú, Lê Hữu Thọ, Đỗ Văn Nhật Trường, Nguyễn Xuân Hải, Nguyễn Minh Hoàng, Nguyễn Thị Thanh Mai, Nguyễn Trung Nhân (2021), “Thành phần hóa học và hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase của thân cây Chóp mao (*Salacia chinensis* L.)”, *Tạp chí phát triển khoa học và công nghệ - Khoa học Tự nhiên*, 5(3), 1422-1428.
2. Phạm Hoàng Hộ (1999), *Cây cỏ Việt nam*, Nxb Trẻ, quyển 2, trang 158-166.
3. Nguyễn T. K., Diệp T. T. B., Đặng T. B. T., Lại T. P. Q., Trần Q. K. (2006), *Nội tiết học*, Đại học Y Dược thành phố Hồ Chí Minh, Nxb Y Học.
4. Nguyễn Thị Thanh Mai (2015), “Nghiên cứu hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase của một số cây thuốc Đồng Tháp”, *Tạp chí Hóa, Lý và Sinh học*, tập 20 (4).
5. Chen, Z.; Liu, Y. M.; Yang, S.; Song, B. A.; Xu, G. F.; Bhadury, P. S.; Jin, L. H.; Hu, D. Y.; Liu, F.; Xue, W.; Zhou, X. (2008), “Studies on the chemical constituents and anticancer activity of *Saxifraga stolonifera* L. Meib”, *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 16(3), pp. 1337-1344.
6. Dương Thị Thanh Trúc, Cao Thị Ha Vy, Dang Hoang Phu, Nguyen Minh Hoang, Nguyen Trung Nhan (2019), “Lupan-type triterpenoids from the stems of *Salacia chinensis* L. (Celastraceae) and their α -glucosidase inhibitory activities”, *Vietnam Journal of Chemistry*, 57(4), pp. 433-437.
7. P. H. Dang, H. X. Nguyen, T. T. T. Duong, T. K. T. Tran, P. T. Nguyen, T. K. T. Vu, H. C. Vuong, N. H. T. Phan, M. T. T. Nguyen, N. T. Nguyen (2017), S. Awale, “ α -Glucosidase inhibitory and cytotoxic taxane diterpenoids from the stem bark of *Taxus wallichiana*”, *J. Nat. Prod.*, 80, pp.1087-1095.
8. M. T. T. Nguyen, N. T. Nguyen, H. X. Nguyen, T. N. N. Huynh, B. S. Min (2012), “Screening of α -glucosidase inhibitory activity of Vietnamese medicinal plants: isolation of active principles from *Oroxylum indicum*”, *Nat. Prod. Sci.*, 18, pp.47-51.
9. Nhan T. Nguyen, Truc T. T. Duong, Phu H. Dang, Hai X. Nguyen, Tho H. Le, Truong N. V. Do, Thinh D. Le, Tu H. Tran, Mai T. T. Nguyen (2021), “A new 7',9'-epoxylignan from the stems of *Salacia chinensis*”, *Natural Product Research*, DOI: 10.1080/14786419.2021.1900178.
10. Truc T.T. Duong, Phu H. Dang, Hai X. Nguyen, Mai T.T. Nguyen, Nhan T. Nguyen (2017), “A study on α -Glucosidase inhibitory activity of medicinal plants from Dong Nai provine”, *Vietnam Journal of Chemistry*, 55 (5e3,4), pp. 537-540.
11. Truc T.T. Duong, Phu H. Dang, Hai X. Nguyen, Mai T.T. Nguyen, Nhan T. Nguyen (2017), “Study on α -Glucosidase inhibitory activity of medicinal plants from Phu Yen provine”, *Vietnam Journal of Chemistry*, 55 (3e), pp. 89-91.
12. Truc T.T. Duong, Truong N.V. Do, Hai X. Nguyen, Tho H. Le, Phu H. Dang, Nhan T. Nguyen, Tuyen N.T. Nguyen, Thao D. Nguyen, Mai T.T. Nguyen (2017), “ α -Glucosidase inhibitors from the stem of *Mangifera reba*”, *Tetraheron Letters*, 58 (23), pp. 2280-2283.
13. Ramos, M. R.; Jerz, G.; Villanueva, S.; Dellamary, F. L.; Waibeld, R.; Winterhalter, P. (2004), “Two glucosylated abscisic acid derivates from avocado seeds (*Persea americana* Mill. Lauraceae cv. Hass)”, *Phytochemistry*, 65(7), pp. 955-962.
14. Wang, H. Q.; Peng, C. Z.; Chen, Y. G. (2015), “Phenolics from *Elaeocarpus braceanus*”, *Chemistry of Natural Compounds*, 51(6), pp. 1520-1524.

STUDY ON CHEMICAL CONSTITUENTS AND α -GLUCOSIDASE INHIBITORY ACTIVITY OF THE ETHYL ACETATE EXTRACT FROM STEM OF *MANGIFERA REBA*

Duong Thi Thanh Truc¹, Nguyen Trung Nhan²

¹Khanh Hoa University; ²VNUHCM-University of Science

Abstract: *The ethyl acetate extract from the stem of Mangifera reba isolated 5,7-hydroxychromone (1), gallic acid (2) and methyl gallate (3). The chemical structures of these compounds were elucidated based on the NMR spectroscopic analysis and comparison with the literatures. All isolated compounds were tested α -glucosidase inhibitory activity. Compounds 1 and 2 showed more potent inhibitory activity, with IC_{50} values 27.0 and 50.9 μ M respectively, than that of a positive control acarbose (IC_{50} , 214.5 μ M)*

Keywords: *Mangifera reba*, Anacardiaceae, α -glucosidase inhibitory activity.