

FLAVONOIDS FROM *MILLETIA RETICULATA* IN VIETNAM

Vu Thi Thu Le¹, Ngo Thi Trang³, Nguyen Thi Hue⁴, Le Thi Huyen⁴, Vu Thanh Dat², Do Tien Lam^{2,3*}, Dang Thi Ngoc Ha¹

¹TNU - University of Agriculture and Forestry, ²Institute of Natural Products Chemistry - VAST

³Graduate University of Science and Technology – VAST, ⁴VNU - University of Science

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Received: 12/10/2022	The plants of the genus <i>Millettia</i> with the main chemical components belonging to the flavonoid group are known to be valuable medicinal herbs and have been widely used in folk remedies. In particular, the species <i>Millettia reticulata</i> Benth has the effect of curing joint pain, rheumatism; treatment of back pain, numbness, pain, injury, blood circulation, etc. From the <i>n</i> -hexane and ethyl acetate fractions of the stem from <i>Millettia reticulata</i> in Lang Son province, three flavonoid compounds have been isolated and determined, including 5-hydroxy-6,7-dimethoxyflavanone (MR1), 4'-methoxytecto-chrysin (MR2) and pashanone (MR3). Their chemical structures were elucidated by 1D- and 2D-NMR and by comparison with those reported in the literature. This research result is consistent with the main chemical composition of species of the genus <i>Millettia</i> reported.
Revised: 04/11/2022	
Published: 08/11/2022	
KEYWORDS	
<i>Millettia</i>	
<i>Millettia reticulata</i>	
Flavonoid	
4'-methoxytecto-chrysin	
Pashanone	

CÁC HỢP CHẤT FLAVONOID TỪ CÂY KÊ HUYẾT ĐẰNG (*MILLETIA RETICULATA*) Ở VIỆT NAM

Vũ Thị Thu Lê¹, Ngô Thị Trang³, Nguyễn Thị Huệ⁴, Lê Thị Huyền⁴, Vũ Thành Đạt², Đỗ Tiến Lâm^{2,3*}, Đặng Thị Ngọc Hà¹

¹Trường Đại học Nông Lâm – ĐH Thái Nguyên

²Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

³Học viện Khoa học và Công nghệ – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

⁴Trường Đại học Khoa học tự nhiên – ĐH Quốc gia Hà Nội

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
Ngày nhận bài: 12/10/2022	Các thực vật chi Thàn mát (<i>Millettia</i>) với thành phần hóa học chính thuộc nhóm flavonoid, được biết đến là các dược liệu quý và đã được ứng dụng rất nhiều trong các bài thuốc dân gian. Đặc biệt, loài <i>Millettia reticulata</i> Benth có tác dụng chữa đau nhức xương khớp, thấp khớp; trị lưng gối đau mỏi tê bại, đòn ngã tổn thương, hoạt huyết,... Từ căn <i>n</i> -hexane và ethyl acetate của thân cây Kê huyết đằng (<i>Millettia reticulata</i>) ở Lạng Sơn đã phân lập và xác định cấu trúc hóa học ba hợp chất flavonoid: 5-hydroxy-6,7-dimethoxyflavanone (MR1), 4'-methoxytecto-chrysin (MR2) và pashanone (MR3). Cấu trúc hóa học của chúng đã được làm sáng tỏ bằng phổ cộng hưởng từ hạt nhân 1 chiều và hai chiều, kết hợp so sánh với tài liệu tham khảo. Kết quả này phù hợp với thành phần hóa học chính của các loài thuộc chi <i>Millettia</i> đã công bố.
Ngày hoàn thiện: 04/11/2022	
Ngày đăng: 08/11/2022	
TỪ KHÓA	
<i>Millettia</i>	
<i>Millettia reticulata</i>	
Flavonoid	
4'-methoxytecto-chrysin	
Pashanone	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.6646>

* Corresponding author. Email: dotienlam198@gmail.com

1. Giới thiệu

Chi *Millettia* thuộc họ Fabaceae có khoảng 260 loài, được phân bố rộng khắp ở các vùng nhiệt đới đến các vùng cận nhiệt đới. Ở châu Phi có khoảng 139 loài và châu Á có khoảng 121 loài, ở Việt Nam có khoảng 20 loài, phân bố hầu hết cả ba miền đất nước [1], [2]. Các thực vật chi *Thàn mát* (*Millettia*) được biết đến là các dược liệu quý và đã được ứng dụng rất nhiều trong các bài thuốc dân gian. Đặc biệt, loài *Millettia reticulata* có tác dụng chữa đau nhức xương khớp, thấp khớp; trị lưng gối đau mỏi tê bại, đòn ngã tổn thương, hoạt huyết [3], [4].

Cùng với đó, thành phần hóa học chính của các loài thuộc chi *Millettia* là các hợp chất thuộc nhóm flavonoid, chủ yếu thuộc khung như isoflavone (khoảng 100 hợp chất), flavone (khoảng 30 hợp chất), flavanone (khoảng 20 hợp chất), chalcone (khoảng 30 hợp chất), ngoài ra còn có các thành phần khác như flavanonol, rotenoid,... [5]. Flavonoid đã được chứng minh có hoạt tính sinh học vô cùng phong phú đa dạng như kháng viêm, làm bền thành mạch, chống độc, bảo vệ chức năng gan, chống oxi hoá, virus và ung thư... [6], [7]. Điều đó gợi ý các loài thuộc chi *Millettia* có tác dụng sinh học tốt.

Kê huyết đằng là một vị thuốc có tên khoa học *Millettia reticulata* Benth thuộc chi *Thàn mát* và họ Đậu. Cây còn có một số tên gọi khác như Hoạt huyết đằng, Huyết đằng, Đại huyết đằng,...

Đặc điểm thực vật học: Dạng cây leo. Lá mỏng, giòn, không lông. Hoa xếp xít nhau ở đầu nhánh, màu đỏ. Quả đỏ nâu chứa 3-6 hạt.

Sinh thái: Mọc ở hàng rào, trồng cây bụi, ven rừng, trong rừng rậm thường xanh, ở độ cao tới 1000 m.

Phân bố: Lạng Sơn, Quảng Ninh và nhiều địa phương có trồng.

Bộ phận dùng: Rễ và dây.

Tính vị và tác dụng: Thân dây có vị đắng. Rễ thư cân hoạt huyết, trấn tĩnh, dây tán khí, tán phong, hoạt huyết, thông kinh hoạt lạc.

Công dụng: Chữa đau nhức mỏi gân xương, đau mỏi, chóng mặt, thiếu máu, phong tê thấp, viêm khớp dạng thấp,...

Từ căn chiết etyl axetat phân lập từ thân của loài *Millettia reticulata* thu được hợp chất đều thuộc nhóm chất flavonoid. Trong đó, có một flavan-3-ol: (-)-epicatechin, hai flavanone: naringenin và 5,7,3',5'-tetrahydroxyl-flavanone, hai isoflavone: formononetin và genistein; và một dẫn xuất chalcone: isoliquiritigenin [8].

Các dẫn xuất flavonoid được thử nghiệm ức chế một số dòng tế bào ung thư (Hep-G2, Sk-Hep-1, Huh7, PLC5, COLO205, HT29 và SW872). Trong số những hợp chất phân lập, genistein thể hiện hoạt tính ức chế mạnh nhất đối với tế bào ung thư gan nguyên phát ở người SK-Hep-1 ($IC_{50} = 16,23 \mu M$). Tế bào SK-Hep-1 được xử lý bằng genistein dẫn đến sự mất điện thế màng ty thể. Genistein cũng kích thích sự gia tăng biểu hiện protein Fas, FasL và p53. Mặt khác, việc xử lý bằng genistein đã thay đổi tỷ lệ mức độ biểu hiện của thành phần gen trong họ Bcl-2, gây ra sự hoạt hóa của enzym caspase-9 và caspase-3 và sự phân cắt poly (ADP-ribose) polymerase (PARP). Những kết quả nghiên cứu chỉ ra, genistein gây ra quá trình tự chết apoptosis ở các tế bào SK-Hep-1 thông qua cả hai con đường Fas và trung gian ty thể [8].

Ngoài ra, trong rễ, vỏ và hạt Kê huyết đằng còn có các hợp chất friedelan-3- α -ol, β -sitosterol, daucosterol, 7-oxo- β -sitosterol, ononin, prunetin, afrormosin, daidzein, 3,7-dihydroxy-6-methoxy-dihydroflavonol, 2',4',3,4-tetrahydroxychalcone, licochalcone, medicagol, protocatechuic acid, 9-methoxycoumestrol, cajanin, stigmast-5-ene-3 β -7 α -diol, 5 α -stigmastane-3 β [1].

Hơn nữa, các nghiên cứu về Kê huyết đằng (*Millettia reticulata*) ở Việt Nam hầu như mới tập trung ở khía cạnh liệt kê, nhận biết, mô tả hoặc tổng kết kinh nghiệm dân gian mà ít có các nghiên cứu nào về thành phần hóa học. Vì vậy, bài báo đề cập đến quá trình chiết, phân lập và xác định cấu trúc hóa học của một số hợp chất flavonoid từ cây Kê huyết đằng (*Millettia reticulata*) ở Việt Nam có ý nghĩa khoa học và thực tiễn.

2. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên liệu

Mẫu thân cây thu hái tại Lộc Bình - Lạng Sơn vào tháng 10 năm 2021, được TS Nguyễn Quốc Bình, Bảo tàng Thiên nhiên Việt Nam xác định tên khoa học là *Millettia reticulata* Benth, họ Fabaceae. Tiêu bản mẫu được lưu trữ tại Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp phân lập các hợp chất [9]

Việc phân lập các căn chiết của cây Kê huyết đằng được thực hiện bởi sự phối hợp giữa sắc ký lớp mỏng (TLC) và sắc ký cột (CC).

Sắc ký lớp mỏng: Bản mỏng DC-Alufoilen 60 F254, hãng Merck và RP-18 F254S, hãng Merck. Đèn tử ngoại (bước sóng 254 nm và 365 nm) và thuốc thử vanilin - H₂SO₄ 5% trong methanol để phát hiện chất.

Sắc ký cột: Sắc ký cột thường có pha tĩnh là silica gel 60, cỡ hạt 0,040-0,063 mm, hãng Merck. Sắc ký cột pha đảo có pha tĩnh là YMC C18, cỡ hạt 30-50 µm, hãng Fujisilica Chemical Ltd. Sephadex LH-20 là pha tĩnh trong sắc ký cột rây phân tử.

2.2.2. Phương pháp xác định cấu trúc hợp chất [10], [11]

Xác định cấu trúc các hợp chất sạch bằng cách sử dụng các phương pháp và thiết bị hiện đại. Các phương pháp và thiết bị được sử dụng gồm có:

Điểm chảy (mp): Đo trên máy Kofler micro-hotstage tại Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Phổ cộng hưởng từ nhân (NMR): Đo trên máy Bruker Avance 500 MHz tại Viện Hóa học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Gồm 1D-NMR (¹H-NMR, ¹³C-NMR và DEPT) và 2D-NMR (HSQC, HMBC). Dung môi được sử dụng gồm CD₃OD và CDCl₃.

3. Thực nghiệm

3.1. Thu nhận các căn chiết từ cây Kê huyết đằng

Mẫu cây Kê huyết đằng (*Millettia reticulata*) được xử lý theo phương pháp thường quy như sau: Mẫu sau khi thu được cắt nhỏ, sấy khô và nghiền nhỏ được 3000g. Sau đó, mẫu được ngâm chiết với methanol (3 lần) dưới sự hỗ trợ của máy siêu âm. Dịch chiết được dồn lại và đem cất kiệt dung môi ở nhiệt độ nhỏ hơn 50°C thu được căn tổng methanol (**MR**, 180g). Căn methanol được bổ sung thêm nước và chiết phân bố lần lượt với *n*-hexane và ethyl acetate. Sau đó, loại dung môi thu được căn *n*-hexan (**MRH**, 45g), ethyl acetate (**MRE**, 62g) và nước (**MRW**, 70g) tương ứng.

3.2. Phân lập các hợp chất từ các căn chiết cây Kê huyết đằng

Căn chiết *n*-hexan **MRH** (40 g) được tiến hành tách thô trên sắc ký cột silica gel với hệ dung môi giải ly *n*-hexan - ethyl axetat (HE 100:0 → 0:100) thu được 3 phân đoạn (**MRH1** - **MRH3**).

Phân đoạn **MRH1** (5,1 g) được phân tách trên sắc ký cột silica gel với hệ dung môi giải ly *n*-hexan - ethyl axetat (10:1 → 6:1) thu được 3 phân đoạn nhỏ (**MRH1.1** - **MRH1.3**). Phân đoạn **MRH1.2** được kết tinh lại trong axeton thu được hợp chất **MR1** (8,2 mg).

Phân đoạn **MRH2** (4,2 g) được phân tách trên sắc ký cột silica gel với hệ dung môi giải ly *n*-hexan - ethyl axetat (8:1 → 2:1) thu được 3 phân đoạn nhỏ (**MRH2.1** - **MRH2.3**). Phân đoạn **MRH2.3** được kết tinh lại trong axeton thu được hợp chất **MR2** (9,5 mg).

Căn chiết ethyl axetat **MRE** (50 g) được tiến hành tách thô trên sắc ký cột silica gel với hệ dung môi giải ly diclometan - metanol (DM 100:0 → 0:100) thu được 5 phân đoạn (**MRE1** - **MRE5**).

Phân đoạn **MRE1** (3,5 g) được phân tách trên sắc ký cột RP18 với hệ dung môi giải ly metanol - nước (3:7 → 7:3) thu được 3 phân đoạn nhỏ (**MRE1.1** - **MRE1.3**). Phân đoạn **MRE1.3** được tách tiếp trên sắc ký cột sephadex LH-20, giải ly bằng metanol thu được hợp chất **MR3** (7,0 mg).

• **Hợp chất 5-hydroxy-6,7-dimethoxyflavanone (MR1)**

Hợp chất **MR1** thu được dạng bột, màu vàng (8,2 mg), nhiệt độ nóng chảy 98 – 100°C.

Phổ $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, CDCl_3); δ (ppm): 5,47 (1H, dd, $J=11,0$ và $2,5$ Hz, H-2); 3,04 và 2,80 (2H, dd, 13,5 và 2,5 Hz, H-3); 6,21 (1H, s, H-8); 7,48 (2H, m, H-2' và H-6'); 7,43 (2H, m, H-3' và H-5'); 7,37 (1H, m, H-4'); 3,87 (3H, s, 6-OCH₃); 3,88 (3H, s, 7-OCH₃).

Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ (125MHz, CDCl_3); δ (ppm): 79,6 (C-2); 45,7 (C-3); 189,0 (C-4); 155,5 (C-5); 128,6 (C-6); 158,2 (C-7); 92,3 (C-8); 155,4 (C-9); 106,1 (C-10); 138,7 (C-1'); 125,9 (C-2' và C-6'); 128,8 (C-3' và C-5'); 128,5 (C-4'); 61,5 (6-OCH₃); 56,2 (7-OCH₃).

• **Hợp chất 4'-methoxytectochrysin (MR2)**

Hợp chất **MR2** (9,5 mg) có dạng tinh thể hình kim màu vàng, nhiệt độ nóng chảy: 173 - 175°C.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD); δ (ppm): 12,81 (5-OH), 7,85 (2H, dd, $J=1,5$ và $5,5$ Hz, H-2' và H-6'); 7,03 (2H, dd, $J=1,5$ và $5,5$ Hz, H-3' và H-5'); 6,58 (1H, s, H-3); 6,49 (1H, d, $J=2,0$ Hz, H-8); 6,37 (1H, d, $J=2,0$ Hz, H-6); 3,89 (3H, s, 4'-OCH₃); 3,88 (3H, s, 7-OCH₃).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CD_3OD); δ (ppm): 164,1 (C-2); 104,4 (C-3); 182,5 (C-4); 162,3 (C-5); 98,1 (C-6); 165,5 (C-7); 92,7 (C-8); 157,8 (C-9); 105,6 (C-10); 123,7 (C-1'); 128,1 (C-2', C-6'); 162,6 (C-4'); 114,5 (C-3', C-5'); 55,8 (3'-OCH₃); 55,6 (7-OCH₃).

• **Hợp chất pashanone (MR3)**

Hợp chất **MR3** dạng hình kim, màu vàng nhạt (7,0 mg), nhiệt độ nóng chảy: 147 - 149°C.

Phổ $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, CD_3OD); δ (ppm): 7,94 (1H, d, $J=13,0$ Hz, H- β); 7,75 (1H, d, $J=13,0$ Hz, H- α), 7,66 (2H, dd, $J=1,5$ và $6,5$ Hz, H-2, H-6); 7,45 (2H, m, H-3, H-5); 7,41 (1H, m, H-4); 6,09 (1H, s, H-5'); 4,84 (2'-OH); 3,92 (3H, s, 4'-OCH₃); 3,80 (3H, s, 3'-OCH₃);

Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ (125MHz, CD_3OD); δ (ppm): 136,8 (C-1); 130,4 (C-2, C-6); 128,8 (C-3, C-5); 131,2 (C-4); 106,9 (C-1'); 158,8 (C-2'); 130,0 (C-3'); 160,5 (C-4'); 92,3 (C-5'); 160,3 (C-6'); 129,4 (C- α); 143,2 (C- β); 194,4 (C- β'); 60,9 (3'-OCH₃); 56,5 (4'-OCH₃).

4. Kết quả và bàn luận

4.1. Hợp chất 5-hydroxy-6,7-dimethoxyflavanone (MR1)

Hợp chất **MR1** thu được dưới dạng tinh thể hình kim, màu vàng. Phân tích sơ bộ dữ liệu phổ NMR của **MR1** cho biết đây là một hợp chất thuộc khung flavonoid. Phổ $^1\text{H-NMR}$ của **MR1** cho biết tín hiệu proton bị che chắn dạng singlet tại δ_{H} 6,21(1H, s, H-8) của vòng A; tín hiệu của 5 proton thơm tại δ_{H} 7,48 (2H, m, H-2' và H-6'); 7,43 (2H, m, H-3' và H-5') và 7,37 (1H, m, H-4') của vòng B. Tín hiệu cụm proton dưới dạng doublet-doublet tại δ_{H} 5,47 (1H, dd, $J=11,0$ và $2,5$ Hz, H-2); 3,04 và 2,80 (2H, dd, 13,5 và 2,5 Hz, H-3) đặc trưng cho các hợp chất thuộc khung flavanone. Ngoài ra, trên phổ còn có tín hiệu proton dưới dạng singlet của 2 nhóm methoxyl tại δ_{H} 3,87 (3H, s, 6-OCH₃); 3,88 (3H, s, 7-OCH₃).

Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ kết hợp với phổ DEPT cho biết trong phân tử của **MR1** có 17 carbon, gồm có 2 nhóm methoxyl tại δ_{C} 61,5 (6-OCH₃); 56,2 (7-OCH₃), 1 nhóm methylene tại δ_{C} 45,7 (C-3), 07 nhóm methine tại δ_{C} 79,6 (C-2); 92,3 (C-8); 125,9 (C-2' và C-6'); 128,8 (C-3' và C-5'); 128,5 (C-4') và 7 carbon bậc 4 tại δ_{C} 189,0 (C-4); 155,5 (C-5); 128,6 (C-6); 158,2 (C-7); 155,4 (C-9); 106,1 (C-10); 138,7 (C-1') với 1 nhóm carbonyl tại δ_{C} 189,0 (C-4).

Phổ HMBC của **MR1** cho biết tương tác giữa proton nhóm methoxyl 6-OCH₃ (δ_{H} 3,87) với carbon C-6 (δ_{C} 128,6) khẳng định nhóm methoxyl này đính với carbon C-6 và tương tác giữa proton nhóm methoxyl 7-OCH₃ (δ_{H} 3,88) với carbon C-7 (δ_{C} 158,2) khẳng định nhóm methoxyl này đính với carbon C-7 trong vòng A. Tương tác giữa proton methine H-8 (δ_{H} 6,21) với C-7 (δ_{C} 158,2), C-9 (δ_{C} 155,4) khẳng định nhóm methine duy nhất của vòng A đính vào vị trí C-8. Trên phổ HMBC còn quan sát được tương tác giữa H-3 (δ_{H} 3,04 và 2,80) với C-4 (δ_{C} 189,0), C-2 (δ_{C}

79,6) và C-10 (δ_C 106,1) và H-2 (δ_H 5,47) với C-4 (δ_C 189,0), C-3 (δ_C 45,7) và C-1' (δ_C 138,7) khẳng định liên kết trong vòng C và kết nối giữa vòng A-C-B của hợp chất **MR1**.

Dựa vào các số liệu phân tích phổ 1H -, ^{13}C -NMR, DEPT, HSQC và HMBC của **MR1**, kết hợp so sánh dữ liệu phổ trong tài liệu tham khảo [12], [13] cho phép khẳng định **MR1** chính là 5-hydroxy-6,7-dimethoxyflavanone, có cấu trúc như hình 1 và dữ liệu phổ NMR như bảng 1.

Bảng 1. Dữ liệu phổ 1H - và ^{13}C -NMR của chất **MR1** và **MR2**

Vị trí	MR1		MR2	
	δ_C	δ_H (mult., J Hz)	δ_C	δ_H (mult., J Hz)
2	79,6	5,47 (1H, dd, $J=11,0$; 2,5)	164,1	-
3	45,7	2,80 (1H, dd, $J=13,5$; 2,5) 3,04 (1H, dd, $J=13,5$; 2,5)	104,4	6,58 (1H, s)
4	189,0	-	182,5	-
5	155,5	-	162,3	-
6	128,6	-	98,1	6,37 (1H, d, $J=2,0$)
7	158,2	-	165,5	-
8	92,3	6,21 (1H, s)	92,7	6,49 (1H, d, $J=2,0$)
9	155,5	-	157,8	-
10	106,1	-	105,6	-
1'	138,7	-	123,7	-
2',6'	125,9	7,48 (2H, m)	128,1	7,85 (2H, dd, $J=1,5$; 5,5)
4'	128,5	7,37 (1H, m)	162,6	-
3', 5'	128,8	7,43 (2H, m)	114,5	7,03 (2H, dd, $J=1,5$; 5,5)
5-OH	-	6,41 (1H, brs)	-	12,81 (1H, s)
6-OCH ₃	61,5	3,87 (3H, s)	-	-
7-OCH ₃	56,2	3,88 (3H, s)	55,6	3,88 (3H, s)
4'-OCH ₃	-	-	55,8	3,89 (3H, s)

4.2. Hợp chất 4'-methoxytectochrysin (MR2)

Hợp chất **MR2** thu được dưới dạng tinh thể hình kim, màu vàng. Phổ 1H -NMR của **MR2** cho biết tín hiệu proton đặc trưng của hệ vòng thơm ABX dưới dạng doublet tại δ_H 6,49 (1H, d, $J=2,0$ Hz, H-8) và 6,37 (1H, d, $J=2,0$ Hz, H-6); cặp proton vòng thơm thể kiểu A_2B_2 dưới dạng doublet-doublet tại δ_H 7,85 (2H, dd, $J=1,5$ và 5,5 Hz, H-2',6') và δ_H 7,03 (2H, dd, $J=1,5$ và 5,5 Hz, H-3',5'). Ngoài ra, trên phổ còn có tín hiệu đặc trưng cho nhóm hydroxyl liên kết cầu hydro nội phân tử với carbon thuộc nhóm carbonyl (C-4) tại δ_H 12,08 ppm ở vùng trường thấp, tín hiệu của proton olefin tại δ_H 6,58 (1H, s, H-3) và tín hiệu proton dưới dạng singlet của 2 nhóm methoxyl tại δ_H 3,89 (3H, s, 4'-OCH₃) và 3,88 (3H, s, 7-OCH₃). Phổ ^{13}C -NMR của **MR2** cho biết tín hiệu đặc trưng của carbon nhóm carbonyl tại δ_C 182,5 (C-4), hai carbon nhóm methoxyl tại δ_C 55,8 (4'-OCH₃) và 55,6 (7-OCH₃) và hai carbon olefin tại δ_C 164,1 (C-2) và 104,4 (C-3). Đây là một hợp chất flavonoid.

Phổ HSQC của **MR2** cho phép gán các giá trị của hydro với các carbon tương ứng. Phổ HMBC của **MR2** cho biết tương tác của proton methine H-6 (δ_H 6,49) với C-5 (δ_C 162,3), C-7 (δ_C 165,5), C-8 (δ_C 92,7), C-9 (δ_C 157,8) và C-10 (δ_C 105,6); giữa proton methine H-8 (δ_H 6,49) với C-5 (δ_C 162,3), C-6 (δ_C 98,1), C-7 (δ_C 165,5), C-9 (δ_C 157,8) và C-10 (δ_C 105,6) của vòng A trong hợp chất **MR2**. Ngoài ra, tương tác của nhóm hydroxy tại δ_H 12,81 ppm với C-5 (δ_C 162,3), C-6 (δ_C 98,1) và C-10 (δ_C 105,6) khẳng định nhóm hydroxy đính vào vị trí C-5 và tương tác giữa proton nhóm methoxyl 7-OCH₃ (δ_H 3,88) với carbon C-7 (δ_C 165,5 ppm) khẳng định nhóm methoxyl này đính với carbon C-7 trong vòng A. Tương tác giữa hai proton tương đương H-2', H-6' (δ_H 7,85) với C-2 (δ_C 164,1), C-1' (δ_C 123,7), C-3' và C-5' (δ_C 114,5), C-4' (δ_C 162,6) của hai proton tương đương H-3', H-5' với các carbon C-1' (δ_C 123,7), C-2' và C-6' (δ_C 128,1), C-4' (δ_C 162,6) đã chỉ ra sự có mặt của vòng B. Nhóm methoxyl 4'-OCH₃ (δ_H 3,89) với carbon C-4' (δ_C 165,6) khẳng định nhóm methoxyl này đính với carbon C-4'. Ngoài ra, trên phổ HMBC cũng

quan sát được tương tác giữa H-3 (δ_H 6,58) với C-2 (δ_C 164,1) và C-4 (δ_C 182,5) trong vòng C. Sự liên kết giữa vòng A-C-B của hợp chất **MR2** được thể hiện rõ trong sự tương tác giữa H-3 (δ_H 6,58) với các carbon C-1' (δ_C 123,7) và C-10 (δ_C 105,6).

Căn cứ vào các số liệu phân tích phổ 1H -, ^{13}C -NMR, HSQC và HMBC của **MR2**, kết hợp các dữ kiện phổ thu được và so sánh phổ với tài liệu tham khảo [14], [15] cho phép xác định **MR2** chính là 4'-methoxytectochrysin (hình 1 và bảng 1).

4.3. Hợp chất pashanone (MR3)

Hợp chất **MR3** thu được dạng hình kim, màu vàng nhạt (7,0 mg). Phổ 1H -NMR của **MR3** cho biết, tín hiệu của hai proton olefinic dưới dạng doublet-doublet tại δ_H 7,94 (1H, d, $J=13,0$ Hz, H- β) và 7,75 (1H, d, $J=13,0$ Hz, H- α) đặc trưng cho hai proton ở vị trí α và β với cấu hình *trans* của khung chalcone, tín hiệu của 5 proton thơm tại δ_H 7,66 (2H, dd, $J=1,5$ và 6,5 Hz, H-2, H-6); 7,45 (2H, m, H-3, H-5) và 7,41 (1H, m, H-4) thuộc vòng A; 1 proton thơm dưới dạng singlet bị che chắn tại δ_H 6,09 (1H, s, H-5') và 2 proton của nhóm methoxyl tại δ_H 3,92 (3H, s, 4'-OCH₃) và 3,80 (3H, s, 3'-OCH₃) thuộc vòng B; và tín hiệu của nhóm hydroxyl tại δ_H 4,84 (2'-OH).

Phổ ^{13}C -NMR và DEPT xuất hiện tín hiệu của 17 nguyên tử carbon, gồm hai nhóm methoxyl tại δ_C 60,9 (3'-OCH₃); 56,5 (4'-OCH₃), tám nhóm methine tại δ_C 130,4 (C-2, C-6); 128,8 (C-3, C-5); 131,2 (C-4); 92,3 (C-5'); 129,4 (C- α) và 143,2 (C- β) và bảy nguyên tử carbon bậc 4 tại δ_C 136,8 (C-1); 106,9 (C-1'); 158,8 (C-2'); 130,0 (C-3'); 160,5 (C-4'); 160,3 (C-6') và 194,4 (C- β'), trong đó có một nhóm carbonyl tại δ_C 194,4 (C- β').

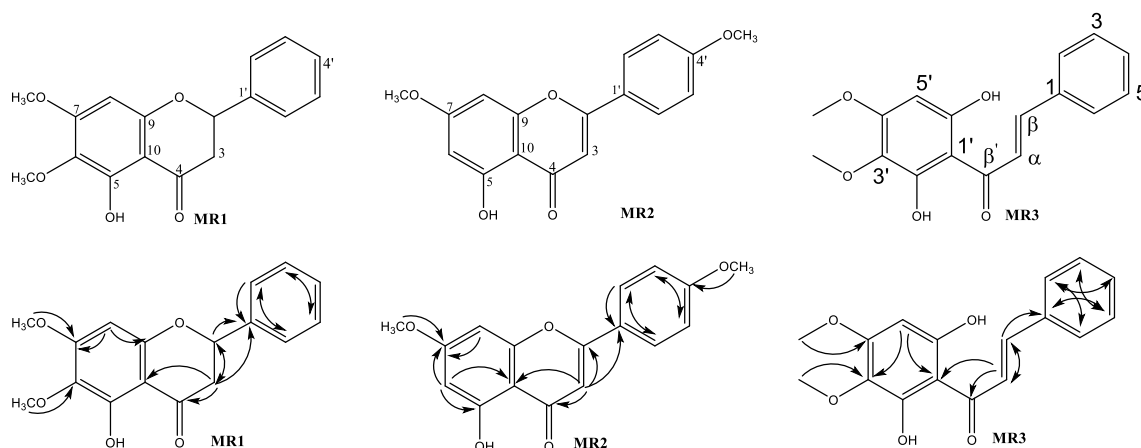
Phổ HMBC của **MR3** quan sát được tương tác giữa H-(4'-OCH₃) với C-4' (δ_C 160,5) và H-(3'-OCH₃) với C-3' (δ_C 130,0). Điều này cho phép gán vị trí của 2 nhóm methoxy tại C-4' và C-3' tương ứng. Tương tác giữa H- β (δ_H 7,94) với C- β' (δ_C 194,4), C- α (δ_C 129,4) và C-1 (δ_C 136,8); và tương tác giữa H- α (δ_H 7,75) với C- β' (δ_C 194,4), C- β (δ_C 143,2), C-1 (δ_C 136,8) và C-1' (δ_C 106,9) cho thấy sự gắn kết giữa vòng A và B với nhau qua cầu nối là nhóm carbonyl α , β -không no.

Bảng 2. Dữ liệu phổ của chất **MR3** và chất tham khảo [16]

Vị trí	δ_C	MR3 δ_H (mult., J Hz)	# δ_C	[16] # δ_H (mult., J Hz)
1	136,8	-	135,6	-
2, 6	130,4	7,66 (2H, dd, $J=1,5$ và 6,5)	128,6	7,61 (2H, m)
3, 5	128,8	7,45 (2H, m)	129,0	7,41 (2H, m)
4	131,2	7,41 (1H, m)	127,6	7,39 (1H, m)
α	129,4	7,75 (1H, d, 13,0)	130,3	7,81 (1H, d, 15,6)
β	143,6	7,94 (1H, d, 13,0)	142,7	7,91 (1H, d, 15,6)
β'	194,4	-	193,4	-
1'	106,4	-	106,6	-
2'	158,8	-	159,0	-
3'	130,3	-	128,5	-
4'	160,5	-	155,5	-
5'	92,3	6,09 (1H, s)	90,0	6,07 (1H, s)
6'	160,3	-	159,2	-
3'-OCH ₃	60,9	3,80 (3H, s)	61,0	3,91 (3H, s)
4'-OCH ₃	56,5	3,92 (3H, s)	56,2	3,93 (3H, s)
2'-OH	-	4,84 (2H, s)	-	14,36 (2H, s)

δ_H và # δ_C của pashanone (1H : 400 MHz, ^{13}C : 125 MHz, CDCl₃) [16]

Qua các phân tích số liệu phổ 1H -, ^{13}C -NMR, DEPT, HSQC và HMBC kết hợp với so sánh dữ liệu phổ trong tài liệu tham khảo [16], [17] có thể xác định hợp chất **MR3** là 2',6'-dihydroxy-3',4'-dimethoxychalcone hay pashanon có cấu trúc và tương tác chính HMBC (H $\rightarrow$ C) của nó được thể hiện như hình 1. Hợp chất này còn được phân lập từ loài *Polygonum ferrugineum* [18], *Polygonum hydropiper* [19] và *Polygonum lapathifolium* [20].



Hình 1. Cấu trúc hóa học và tương tác chính HMBC ($H \rightarrow C$) của **MR1**, **MR2** và **MR3**

5. Kết luận

Từ thân cây Kê huyết đằng (*Millettia reticulata*) ở Lạng Sơn, bằng các phương pháp sắc ký, kết hợp với phương pháp tinh chế kết tinh lại trong dung môi thích hợp, ba hợp chất flavonoid 5-hydroxy-6,7-dimethoxyflavanone (**MR1**), 4'-methoxytectochrysin (**MR2**) và pashanone (**MR3**) đã được phân lập. Cấu trúc hóa học của chúng được xác định bằng phổ cộng hưởng từ hạt nhân một chiều và hai chiều. Các phân đoạn còn lại được tiếp tục phân lập và xác định cấu trúc hóa học.

Lời cảm ơn

Công trình được hoàn thành với sự hỗ trợ kinh phí của Bộ Giáo dục và Đào tạo thuộc Đề tài Khoa học và Công nghệ cấp Bộ, Mã số B2021-TNA-19.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] J. T. Banzouzu, A. Prost, M. RaJemiarimiraho, and P. Ongoka, "Traditional uses of the African *Millettia* species (Fabaceae)," *International Journal of Botany*, vol. 4, no. 4, pp. 406-420, 2008.
- [2] T. B. Nguyen, *Fabaceae family in the List of Plants of Vietnam*. Agriculture Publishing House, 2003.
- [3] V. C. Vo, *Dictionary of Vietnamese Medicinal Plants*. Publishing House Medicine, 2012.
- [4] H. B. Do, Q. C. Dang, X. C. Bui, T. D. Nguyen, T. D. Do, V. H. Pham, N. L. Vu, D. M. Pham, K. M. Pham, T. T. Doan, T. Nguyen, and T. Tran, *The medicinal plants and animals in Vietnam*. Science and Technology Publishing House, 2004.
- [5] J. W. Kamau, "Phytochemistry and Biological activity of the root extract of *Millettia oblata*," Degree Master of Science (Medicinal Chemistry), Jomo Kenyatta University of Agriculture and Technology, 2002.
- [6] A. C. Rana and B. Gulliya, "Chemistry and Pharmacology of Flavonoids- A Review," *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, vol. 53, no. 1, pp. 8-20, 2019.
- [7] T.-Y. Wang, Q. Li, and K.-S. Bi, "Review-Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate," *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 13, no. 1, pp. 12-23, 2018.
- [8] S.-C. Fang, C.-L. Hsu, H.-T. Lin, and G.-C. Yen, "Anticancer Effects of Flavonoid Derivatives Isolated from *Millettia reticulata* Benth in SK-Hep-1 Human Hepatocellular Carcinoma Cells," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 58, no. 2, pp. 814-820, 2010.
- [9] K. P. P. Nguyen, *Methods for isolating organic compounds*. National University Ho Chi Minh City Publishing House, 2007.
- [10] D. T. Nguyen, *The basis of spectral methods applied in chemistry*. Science and Technics Publishing House, 2011.
- [11] D. T. Nguyen, *Spectroscopic methods in organic chemistry*. Hanoi National University Publishing House, 2010.

- [12] T. T. T. Tran, D. Q. Tran, T. H. A. Nguyen, and V. S. Tran, "Chemical constituents of *Milusa sinensis* Finet et Gagnep. (Annonaceae). Part 1 – Flavonoides," *Vietnam Journal of Chemistry*, vol. 47, no. 6, pp. 745-748, 2009.
- [13] H. Yoon, S. Eom, J. Hyun, G. Jo, D. Hwang, S. Lee, Y. Yong, J. C. Park, Y. H. Lee, and Y. Lim, "¹H and ¹³C NMR Data on Hydroxy/methoxy Flavonoids and the Effects of Substituents on Chemical Shifts," *Bull. Korean Chem. Soc.*, vol. 32, no. 6, pp. 2101-2107, 2011.
- [14] J. C. Romero-Benavides, G. C. Ortega-Torres, J. Villacis, S. L. Vivanco-Jaramillo, K. I. Galarza-Urgilés, and N. Bailon-Moscoso, "Phytochemical Study and Evaluation of the Cytotoxic Properties of Methanolic Extract from *Baccharis obtusifolia*," *International Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 2018, pp. 1-5, 2018, Art. no. 8908435.
- [15] R. Mangoyi, J. Midiwo, and S. Mukanganyama, "Isolation and characterization of an antifungal compound 5-hydroxy-7,4'-dimethoxyflavone from *Combretum zeyheri*," *BMC Complement Altern Med.*, vol. 15, 2015, Art. no. 405.
- [16] A. Hailemariam, M. Feyera, T. Deyou, and N. Abdissa, "Antimicrobial Chalcones from the Seeds of *Persicaria lapathifolia*," *Biochem Pharmacol (Los Angel)*, vol. 7, 2018, Art. no. 237, doi: 10.4172/2167-0501.1000237.
- [17] C.-S. Yoon, H. Lee, Z. Liu, H.-K. Lee, and D.-S. Lee, "Effects of Compounds Isolated from *Lindera erythrocarpa* on Anti-Inflammatory and Anti-Neuroinflammatory Action in BV2 Microglia and RAW264.7 Macrophage," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 23, 2022, Art. no. 7122, doi: 10.3390/ijms 23137122.
- [18] S. N. Lo'pez, M. G. Sierra, S. J. Gattuso, R. L. Furlan, and S. A. Zacchino, "An unusual homoisoflavanone and a structurally-related dihydrochalcone from *Polygonum ferrugineum* (Polygonaceae)," *Phytochemistry*, vol. 67, pp. 2152-2158, 2006.
- [19] A. V. Kurkina, T. Ryasanova, and K. V. Alexandrovich, "Flavonoids from the Aerial Part of *Polygonum hydropiper*," *Chemistry of Natural Compounds*, vol. 49, no. 5, 2013, doi: 10.1007/s10600-013-0758-y.
- [20] R. Kubinova, R. Porizkova, T. Bartl, A. Navratilova, A. Čizek, and M. Valentova, "Biological activities of polyphenols from *Polygonum lapathifolium*," *Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat*, vol. 13, no. 6, pp. 506-516, 2014.