DOI: 10.31276/VJST.65(9).16-21

Nghiên cứu thành phần hóa học theo hướng tác dụng kháng viêm và chống ôxy hóa của cây Bồ công anh (*Lactuca indica* L.)

Kiều Thị Thủy[1], Cao Lý Tấn Thông[1], Nguyễn Thị Ái Nhung[2], Nguyễn Thành Triết[3*]

[1]*Khoa Dược, Đại học Y Dược TP Hồ Chí Minh*
[2]*Khoa Hóa, Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế*
[3]*Khoa Y học cổ truyền, Đại học Y Dược TP Hồ Chí Minh*

Ngày nhận bài 20/9/2022; ngày chuyển phản biện 23/9/2022; ngày nhận phản biện 11/10/2022; ngày chấp nhận đăng 20/10/2022

Tóm tắt:

Bồ công anh Việt Nam (*Lactuca indica* L.) là một loại dược liệu được dùng trong y học cổ truyền để trị mụn nhọt và một số bệnh viêm da. Nghiên cứu này sử dụng mô hình ức chế sản sinh nitric oxide (NO) trong tế bào RAW264.7 và thử nghiệm trung hoà 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) để sàng lọc hoạt tính kháng viêm và chống ôxy hoá *in vitro* của các cao phân đoạn từ cây *L. indica*. Qua đó, xác định được cao cloroform ức chế sản sinh NO mạnh nhất và cao ethyl acetat trung hoà DPPH tốt nhất. Từ cao cloroform và ethyl acetat phân lập được 6 hợp chất: acid pentadecanoic (1), lupeol (2), vanillin (3), 5-hydroxy-3′,4′,7-trimethoxyflavone (4), luteolin-7-*O*-*β*-D-glucoside (5), acacetin-7-*O*-*β*-D-rutinoside (6). (5) là chất duy nhất đồng thời có hoạt tính ức chế sản sinh NO (IC_{50}=13,86±1,10 µM) và có khả năng bắt gốc DPPH (IC_{50}=26,93±0,10 µM). Nghiên cứu này gợi ý rằng các phân đoạn cloroform, ethyl acetat và chất (5) đều có hiệu quả kháng viêm liên quan đến sản xuất quá mức NO trong tế bào, bên cạnh đó, chất (5) và phân đoạn ethyl acetat cũng có tác dụng chống ôxy hoá mạnh.

Từ khóa: **DPPH, *Lactuca indica* L., luteolin-7-*O*-*β*-D-glucosid, RAW264.7.**

Chỉ số phân loại: **3.4**

Đặt vấn đề

NO được sản xuất từ đại thực bào đóng vai trò quan trọng trong cơ thể người, trong đó bao gồm chức năng đáp ứng miễn dịch nhằm bảo vệ cơ thể khỏi các vi sinh vật gây bệnh, chức năng dẫn truyền thần kinh, hay tác nhân giãn cơ trơn mạch máu [1-2]. Tuy nhiên, sự sản xuất quá mức NO bởi các enzyme iNOS (inducible nitric synthase) là nguyên nhân gây ra nhiều bệnh liên quan đến viêm như sốc nhiễm khuẩn hoặc tổn thương các mô liên kết [3]. Bên cạnh đó, NO cũng là một loại gốc tự do, có thể gây tổn thương vật chất di truyền (DNA, RNA), tạo cơ hội phát sinh những đột biến gen bất lợi, ảnh hưởng đến sức khoẻ [1, 3]. Trong nỗ lực tìm kiếm các thuốc kháng viêm có nguồn gốc tự nhiên, nhiều nghiên cứu cho thấy, một số loài thuộc chi Rau diếp (*Lactuca* L.), họ Cúc (*Asteraceae* Dumort, 1822) có tiềm năng làm thuốc kháng viêm dựa trên các thử nghiệm *in vitro* và *in vivo* (điển hình như *L. sativa*, *L. scariola*, *L. indica*) [4-8].

Thuộc danh mục 100 dược liệu có giá trị y tế và kinh tế cao để tập trung phát triển giai đoạn 2020-2030 của Bộ Y tế [9], Bồ công anh Việt Nam còn là một dược liệu được dùng phổ biến trong y học cổ truyền, với công dụng thanh nhiệt tiêu độc, dùng chữa mụn nhọt, viêm nhiễm [10, 11]. Một số nghiên cứu trước đây, như của S.Y. Wang và cs (2003) [8] đã báo cáo tác dụng ức chế sản sinh NO và dập tắt gốc tự do DPPH của dịch chiết methanol từ cây *L. indica*, càng khẳng định khả năng kháng viêm và chống ôxy hoá của dược liệu này. Tuy nhiên, các hợp chất cụ thể trong cây *L. indica* mang tác dụng sinh học vẫn chưa được xác định, vì vậy cần có những nghiên cứu kết hợp sàng lọc hoạt tính kháng viêm và chống ôxy hoá của cao ethanol toàn phần và các cao phân đoạn. Đồng thời cần phân lập và đánh giá hoạt tính của các hợp chất tự nhiên trong phân đoạn có tác dụng mạnh nhất, cung cấp thêm bằng chứng về tác dụng sinh học và góp phần nâng cao giá trị của dược liệu Bồ công anh Việt Nam.

Nghiên cứu này sử dụng 2 mô hình thử nghiệm *in vitro*: ức chế sản sinh NO trong tế bào RAW264.7 được kích thích bằng lipopolysaccharid và thử nghiệm trung hoà gốc tự do DPPH để khảo sát tác dụng sinh học các cao phân đoạn chiết xuất từ cây Bồ công anh nhằm phân lập, xác định cấu trúc và hoạt tính của một số hợp chất tự nhiên từ các phân đoạn có hoạt tính tốt nhất.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng

Phần trên mặt đất cây Bồ công anh Việt Nam, khối lượng 4 kg, được cung cấp bởi PGS.TS. Nguyễn Thị Ái Nhung - Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế vào tháng 11/2019. Mẫu được lưu tại Bộ môn Dược học cổ truyền, Đại học Y Dược TP Hồ Chí Minh với ký hiệu tiêu bản BCAVN-11.19. Dược liệu được phơi âm can trong 48 giờ, sau đó sấy khô trong tủ sấy đối lưu ở nhiệt độ 50°C trong 2 giờ, xay nhỏ rồi rây (Ø 0,5 mm) thu được bột thô, bột này được dùng cho các nghiên cứu về dược lý và hóa học.

Phương pháp nghiên cứu

Thiết kế nghiên cứu: Một lượng nhỏ dược liệu (50 g mỗi mẻ) được chiết ngấm kiệt với ethanol 96% hoặc ethanol 50% (tỷ lệ dược liệu - dung môi là 1:10, kiểm tra chiết kiệt bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng so sánh lần chiết đầu và cuối), tiến hành trong dụng cụ chuyên dụng bằng inox. Cao lỏng 1:10 được cô quay đuổi dung

*Tác giả liên hệ: Email: nguyenthanhtriet1702@ump.edu.vn

Anti-inflammatory and anti-oxidant activity-guided investigation of phytoconstituents from *Lactuca indica* L.

Thi Thuy Kieu[1], Ly Tan Thong Cao[1], Thi Ai Nhung Nguyen[2], Thanh Triet Nguyen[3*]

[1]*Faculty of Pharmacy, University of Medicine and Pharmacy at Ho Chi Minh City*
[2]*Faculty of Chemistry University of Sciences, Hue University*
[3]*Faculty of Traditional Medicine, University of Medicine and Pharmacy at Ho Chi Minh City*

Received 20 September 2022; revised 11 October 2022; accepted 20 October 2022

Abstract:

Vietnamese dandelion (*Lactuca indica* L.) presents various remedies to cure pustules and several derma-inflammatory diseases in terms of traditional medicine. In this study, the anti-inflammatory and antioxidant effects of several fractions from *L. indica* were screened by assessing the inhibitory capacity of nitric oxide production in RAW 264.7 cells and the DPPH scavenging activity. Through screening steps, the chloroform extract exhibited extraordinary inhibition on NO synthesis, whereas the ethyl acetate singly showed a remarkable capacity to neutralise the DPPH radical. Bioactivity-guided isolation led to the identification of six compounds from the chloroform and ethyl acetate extracts, including pentadecanoic acid (1), lupeol (2), vanillin (3), 5-hydroxy-3′,4′,7-trimethoxyflavone (4), luteolin-7-*O*-*β*-D-glucoside (5), acacetin-7-*O*-*β*-D-rutinoside (6). Only compound (5) exhibited notable interruption in NO synthesis (IC_{50}=13.86±1.10 µM) and simultaneously neutralised DPPH radical (IC_{50}=26.93±0.10 µM). This study suggests that compound (5) as well as the chloroform and ethyl acetate extracts could be potential in preventing inflammatory diseases mediated by excessive production of NO. Additionally, (5) and the ethyl acetate extract could potentially be natural anti-oxidants.

Keywords: **DPPH, *Lactuca indica* L., luteolin-7-*O*-*β*-D-glucoside, RAW264.7.**

Classification number: **3.4**

môi ở áp suất giảm (gia nhiệt ở 45°C, ngưng tụ dung môi ở 3°C, tốc độ quay 50 vòng/phút, mức chân không -75 mBar) đến khi độ ẩm đạt dưới 20%, thu được 6,2 g cao đặc EtOH 96% và 5,7 g cao đặc EtOH 50%, sau đó các cao này được sàng lọc tác dụng ức chế sản sinh NO và bắt gốc DPPH. Kết quả cho thấy, cao EtOH 50% có tác dụng tốt hơn cao EtOH 96%. Vì vậy, mẻ lớn dược liệu (4 kg) được tiến hành chiết ngấm kiệt với EtOH 50% (tỷ lệ dược liệu - dung môi (1:10), điều kiện chiết xuất tương tự như mẻ nhỏ). Cao lỏng (1:10) được cô quay đuổi cồn, thu được cao đặc. Tiến hành lắc phân bố lỏng - lỏng cao đặc nêu trên với các dung môi hữu cơ và cô dịch chiết để thu được các cao đặc tương ứng: *n*-hexan (5,0 g), cloroform (37,0 g), ethyl acetat (7,0 g), phần còn lại là cao nước (317,0 g). Quá trình chiết phân bố lỏng mỗi phân đoạn được kiểm tra chiết kiệt bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng so sánh lần chiết đầu và cuối. Các cao phân đoạn được sàng lọc hoạt tính ức chế sản sinh NO trên tế bào RAW264.7 được kích thích bằng lipopolysaccharid (LPS) và hoạt tính bắt gốc tự do DPPH, sau đó chọn phân đoạn có hoạt tính mạnh nhất để phân lập các hợp chất mục tiêu. Tiến hành đánh giá cấu trúc các hợp chất thu được bằng các phương pháp phổ 1D-/2D-NMR (600/151 MHz, chất chuẩn nội là tetramethylsilan) và ESI-MS, đồng thời đánh giá tác dụng sinh học của các chất sạch theo 2 phương pháp ban đầu.

Phương pháp đánh giá hoạt tính ức chế sản sinh NO trong tế bào RAW264.7 được kích thích bằng LPS:

Chuẩn bị mẫu thử và tế bào: Mẫu được pha thành dung dịch gốc với nồng độ 10 mg/ml (đối với cao chiết) hoặc 100 mM (đối với chất sạch) trong dimethylsufoxid (DMSO), sau đó pha loãng dung dịch gốc thành dãy nhiều nồng độ với cùng dung môi. Tế bào RAW264.7 được nuôi cấy 48 giờ trong môi trường Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, 37°C, CO_2 5%, fetal bovin serum-FBS 10%, streptomycin sulfat), sau đó được chuyển vào đĩa 96 giếng với mật độ $2,5x10^5$ tế bào/giếng.

Tiến hành thử nghiệm: Mỗi giếng được kích thích bằng LPS (2 µl/giếng, nồng độ 0,1 mg/ml) trong 24 giờ với sự có mặt của các chất thử ở nhiều nồng độ khác nhau. Hút phần dịch nổi của tế bào để thực hiện phản ứng với thuốc thử Griess. Natri nitrit ($NaNO_2$) ở các nồng độ khác nhau được sử dụng để xây dựng đường chuẩn, độ hấp thu UV-VIS được đo ở bước sóng 570 nm. Cardamonin được sử dụng làm mẫu đối chứng dương. Phần tế bào còn lại sau khi đã sử dụng được bổ sung dung dịch 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid (MTT, nồng độ 0,5 mg/ml pha trong đệm muối phosphat - PBS), ủ 4 giờ (37°C, CO_2 5%). Hút bỏ hoàn toàn môi trường trên bề mặt, thu tinh thể formazan được hình thành, hoà tan vào isopropanol rồi đo độ hấp thu ở bước sóng 570 nm [12]. Tính toán: % ức chế sinh NO (%UC), khả năng sống sót của tế bào ở nồng độ ban đầu của mẫu thử (%CS) theo các công thức bên dưới. Nồng độ ức chế 50% được xây dựng trên 5 nồng độ thử nghiệm, giá trị IC_{50} được xác định theo phương pháp hồi quy tuyến tính trên phần mềm Graphpad Prism 5.0.

$$\%UC = [X_{tb}(\text{mẫu thử})-X_{tb}(LPS)]/[X_{tb}(control)-X_{tb}(LPS)]\times 100\%$$

trong đó: X_{tb}: nồng độ NO trung bình, được tính toán dựa vào đường chuẩn $NaNO_2$.

$$\%CS = \left[\frac{A(\text{mẫu thử}) - A(\text{mẫu thử ngày 0})}{A(DMSO) - A(DMSO\ \text{ngày 0})} \times 100\right] \pm \sigma$$

trong đó: A (mẫu thử): độ hấp thu UV-VIS của mẫu thử tại thời điểm 24 giờ tính từ lúc xử lý tế bào với LPS và chất thử; A (mẫu thử ngày 0): độ hấp thu UV-VIS của mẫu thử tại thời điểm 0 giờ tính từ lúc xử lý tế bào với LPS và chất thử; A (DMSO): độ hấp thu UV-VIS của dung môi DMSO thời điểm 24 giờ tính từ lúc xử lý tế bào với LPS và chất thử; A (DMSO ngày 0): độ hấp thu UV-VIS của dung môi DMSO thời điểm 0 giờ tính từ lúc xử lý tế bào với LPS và chất thử; σ: độ lệch chuẩn.

Phương pháp đánh giá hoạt tính bắt gốc tự do DPPH: Pha dung dịch DPPH có nồng độ 1 mM trong methanol (MeOH). Dung dịch này không bền với ánh sáng nên chỉ pha trước khi dùng. Dung dịch thử: lấy mẫu pha trong MeOH theo bảng 1. Dung dịch chứng dương: acid ascorbic 1 mM. Lắc đều các ống trong 15 giây, để ổn định ở nhiệt độ phòng trong 30 phút và đo độ hấp thu UV-VIS ở bước sóng 517 nm. Hoạt tính chống ôxy hoá (%UC) được tính theo công thức sau [13]:

$$\%UC=[(A_{chứng\ âm}-A_{thử})/(A_{chứng\ âm}-A_{trắng})]\times 100\%$$

trong đó: A là độ hấp thu UV-VIS ở bước sóng 517 nm.

Bảng 1. Thành phần các mẫu trắng, mẫu chứng, mẫu thử.

Mẫu	Dung dịch thử (ml)	MeOH (ml)	Dung dịch DPPH (ml)	Dung dịch acid ascorbic (ml)
Trắng	0	4	0	0
Chứng âm	0	3,5	0,5	0
Chứng dương	0	3	0,5	0,5
Thử	0,5	3	0,5	0

Kết quả

So sánh hoạt tính sinh học của cao ethanol 96 và 50%

Hoạt tính ức chế sản sinh NO và dập tắt gốc DPPH của 2 cao ethanol có nồng độ khác nhau được sàng lọc ở 2 nồng độ 100 µg/ml (nồng độ cao) và 30 µg/ml (nồng độ thấp). Kết quả ở bảng 2 và 3 cho thấy, cao ethanol 50% có tiềm năng hơn cao ethanol 96%.

Bảng 2. Hoạt tính ức chế NO của cao ethanol 96 và 50%.

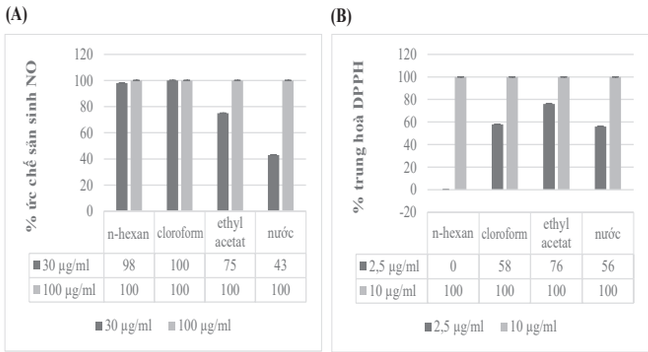
Mẫu	Hoạt tính ức chế sản sinh NO (%)		% CS
	30 µg/ml	*100 µg/ml*	
Cao EtOH 50%	56,0±13,0	91,0±6,0	92,0±5,0
Cao EtOH 96%	45,0±9,0	61,0±4,0	92,2±3,0

Bảng 3. Hoạt tính bắt gốc DPPH của cao ethanol 96 và 50%

Mẫu	Hoạt tính bắt gốc DPPH (%)	
	2,5 µg/ml	*10 µg/ml*
Cao EtOH 50%	71,1±1,7	68,0±3,5
Cao EtOH 96%	29,0±4,0	51,0±2,3

Hoạt tính sinh học của các cao phân đoạn

Hoạt tính ức chế sản sinh NO của các cao phân đoạn được sàng lọc trước tiên ở 2 nồng độ 100 µg/ml (nồng độ cao) và 30 µg/ml (nồng độ thấp) (hình 1A), các cao có hoạt tính ức chế (%UC) trên 50% được xác định giá trị IC_{50}. Tương tự, hoạt tính bắt gốc DPPH được sàng lọc trước tiên ở 2 nồng độ 10 µg/ml (nồng độ cao) và 2,5 µg/ml (nồng độ thấp) (hình 1B), các cao có hoạt tính ức chế (%UC) trên 50% được xác định giá trị IC_{50}.



Hình 1. Kết quả sàng lọc hoạt tính của các dịch chiết phân đoạn. (A) Khả năng ức chế sản sinh NO (%); **(B)** Khả năng bắt gốc DPPH (%).

Theo hình 1A, khả năng ức chế sinh NO thể hiện rõ ở các phân đoạn cloroform, n-hexan và ethyl aceatat. Cụ thể ở nồng độ 100 µg/ml, các cao này thể hiện khả năng ức chế tuyệt đối và ở nồng độ 30 µg/ml, khả năng ức chế giảm dần theo thứ tự: cloroform (100%) > n-hexan (98%) > ethyl acetat (75%). Trong 3 phân đoạn trên, n-hexan gây độc tế bào khá mạnh nên dừng khảo sát, chỉ tìm giá trị IC_{50} của cao clorofom và ethyl acetat. Giá trị IC_{50} của cao cloroform và ethyl acetat lần lượt là 17,80±0,40 và 19,57±1,10 µg/ml, so với chứng dương cardamonin là 2,88±0,02 µg/ml (bảng 4). Kết quả này cho thấy, các cao cloroform và ethyl acetat có tiềm năng để phân lập hợp chất tự nhiên có hoạt tính ức chế sản sinh NO.

Bảng 4. Hoạt tính ức chế sản sinh NO và giá trị IC_{50} của cao cloroform và ethyl acetat.

Mẫu	Hoạt tính ức chế sản sinh NO (%)				IC_{50} (µg/ml)	% CS
Cao $CHCl_3$	3 µg/ml	6,25 µg/ml	12,5 µg/ml	25 µg/ml	17,80±0,40	97,3±1,3
	20,1±9,0	30,0±5,0	50,0±2,9	91,0±1,2		
Cao EtOAc	12,5 µg/ml	25 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml	19,57±1,10	118,1±5,5
	41,1±5,0	58,0±3,0	83,0±4,9	83,1±1,1		
Cardamonin					2,88±0,02	117,1±11,0

Tương tự, trong hình 1B, ở nồng độ 2,5 µg/ml, phân đoạn có hoạt tính trung hoà DPPH tốt nhất là ethyl acetat (%UC=76), các phân đoạn còn lại có hoạt tính vừa và yếu. Giá trị IC_{50} của phân đoạn là 0,03±0,00 µg/ml, so với chứng dương acid ascorbic là 0,01±0,00 µg/ml (bảng 5). Như vậy, phân đoạn ethyl acetat khả năng cao chứa thành phần chống ôxy hoá mạnh.

Bảng 5. Khả năng bắt gốc DPPH và giá trị IC_{50} của cao ethyl acetat.

Mẫu	Khả năng bắt gốc DPPH (%)				IC_{50} (µg/ml)
Cao EtOAc	0,0015 µg/ml	0,005 µg/ml	0,015 µg/ml	0,05 µg/ml	0,03±0,00
	18,8±3,0	41,7±0,0	41,5±0,0	59,8±2,4	
Acid ascorbic	0,01±0,00				

Quy trình phân lập các hợp chất từ cao cloroform và cao ethyl acetat

Cao cloroform (35,0 g) được phân tách bằng sắc ký cột với pha tĩnh silica gel, pha động là hệ dung môi gradient có độ phân cực tăng dần $CHCl_3$-EtOAc (100:0→20:80) thu được 10 phân đoạn (P1-P10). Từ phân đoạn P2 thu được chất rắn **1** (12,2 mg) sau khi kết tinh lại nhiều lần với MeOH. Phân đoạn P3 (16,5 g) được phân tách qua cột silica gel kết hợp với pha động là hệ dung môi gradient có độ phân cực tăng dần $CHCl_3$-EtOAc (100:0→50:50) thu được 9 phân đoạn (P3.1-P3.9). Từ phân đoạn P3.3 thu được tinh thể **2** (12,1 mg) sau khi kết tinh lại nhiều lần với MeOH. Tinh chế phân đoạn P3.4 (333,0 mg) bằng sắc ký cột silica gel với hệ dung môi gradient có độ phân cực tăng dần *n*-hexan-EtOAc (100:0→10:90), kết hợp với kết tinh phân đoạn, thu được chất rắn **4** (11,6 mg). Phân đoạn P4 (910,0 mg) tinh chế qua sắc ký cột rây phân tử Sephadex LH-20 với pha động là MeOH thu được chất **3** (13,2 mg).

Sắc ký cột cao ethyl acetat (4,3 g) với pha tĩnh silica gel, pha động là hệ gradient EtOAc-MeOH (100:0→90:10) thu được 6 phân đoạn (E1-E6). Phân đoạn E3 được tinh chế bằng cách kết tinh lại nhiều lần trong MeOH, thu được chất rắn **5** (9,3 mg). Bằng cách tương tự, chất rắn **6** (6,2 mg) được cô lập từ phân đoạn E4.

Dữ liệu phổ NMR và MS của các chất phân lập được

Acid pentadecanoic (**1**): Bột vô định hình, màu trắng. ^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 600 MHz) δ_H 2,34 (2H, *t*, *J*=7,5 Hz, H-2), 1,66 (2H, *m*, H-3), 1,26 (22H, *s*, H-4→H-14), 0,88 (3H, *t*, *J*=7,0 Hz, H-15) [14]. ^{13}C-NMR ($CDCl_3$, 151 MHz) δ_C 178,9 (C-1), 14,1 (C-2), 22,7 (C-3), 24,7 (C-4), 29,1 (C-5), 29,2 (C-6), 29,4 (C-7), 29,4 (C-8), 29,6 (C-9), 29,6 (C-10), 29,6 (C-11), 29,7 (C-12), 29,7 (C-13), 31,9 (C-14), 33,9 (C-15) [14]. LC-ESI-MS $[M + Na]^+$ (264,8, 4%).

Lupeol (**2**): Tinh thể hình kim, màu trắng. ^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 600 MHz) δ_H 3,19 (1H, *dd*, *J*=11,5, 4,8 Hz, H-3), 1,92 (1H, *dtd*, *J*=13,7, 10,4, 8,4 Hz, H-13), 2,37 (1H, *td*, *J*=11,1, 5,8 Hz; H-19), 0,94 (3H, *s*, H-23), 0,76 (3H, *s*, H-24), 0,83 (3H, *s*, H-25), 1,03 (3H, *s*, H-26), 0,97 (3H, *s*, H-27), 0,79 (3H, *s*, H-28), 4,69 (1H, *d*, *J*=2,5 Hz, H-29-*α*), 4,56 (1H, *dq*, *J*=2,8, 1,4 Hz, H-29-*β*), 1,68 (3H, *s*, H-30) [15]. ^{13}C-NMR ($CDCl_3$, 151 MHz) δ_C 38,7 (C-1), 27,4 (C-2), 79,0 (C-3), 38,8 (C-4), 55,3 (C-5), 18,3 (C-6), 34,3 (C-7), 40,8 (C-8), 50,4 (C-9), 37,1 (C-10), 20,9 (C-11), 25,1 (C-12), 38,0 (C-13), 42,8 (C-14), 27,4 (C-15), 35,5 (C-16), 43,0 (C-17), 48,3 (C-18), 48,0 (C-19), 151,1 (C-20), 29,8 (C-21), 40,0 (C-22), 28,0 (C-23), 15,9 (C-24), 18,0 (C-25), 16,1 (C-26), 14,5 (C-27), 15,3 (C-28), 109,3 (C-29), 19,3 (C-30) [15]. LC-ESI-MS $[M + 3H]^{3+}$ (429,4, 5%).

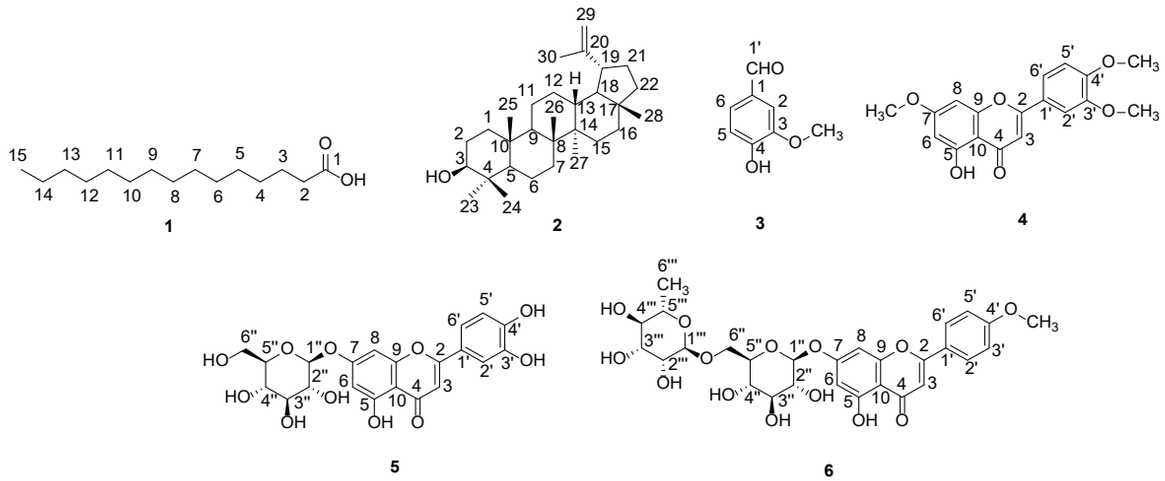
Vanillin (**3**): Tinh thể hình kim, màu trắng. ^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 600 MHz) δ_H 7,43 (1H, *m*, H-2), 7,42 (1H, *t*, *J*=1,9 Hz, H-5), 7,04 (1H, *d*, *J*=8,4 Hz, H-6), 9,83 (1H, *s*, H-1′), 6,20 (1H, *s*, 4-OH), 3,97 (3H, *s*, 3-OC$\underline{H}_3$) [16]. ^{13}C-NMR ($CDCl_3$, 151 MHz) δ_C 130,0 (C-1), 108,8 (C-2), 147,2 (C-3), 151,7 (C-4), 127,5 (C-5), 114,4 (C-6), 190,8 (C-1′), 56,1 (3-O$\underline{C}H_3$) [16]. LC-ESI-MS $[M + K + H]^+$ (191,9, 5%).

5-hydroxy-3′,4′,7-trimethoxyflavone (**4**): Bột vô định hình, màu vàng. ^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 600 MHz) δ_H 6,59 (1H, *s*, H-3), 12,79 (1H, *s*, 5-O$\underline{H}$), 6,50 (1H, *d*, *J*=2,3 Hz, H-6/H-8), 6,38 (1H, *d*, *J*=2,3 Hz, H-8/H-6), 7,35 (1H, *d*, *J*=2,2 Hz, H-2′), 6,98 (1H, *d*, *J*=8,5 Hz, H-5′), 7,53 (1H, *dd*, *J*=8,5, 2,2 Hz; H-6′), 3,99 (3H, *s*, 4′-OC$\underline{H}_3$), 3,97 (3H, *s*, 3′-OC$\underline{H}_3$), 3,89 (3H, *s*, 7-OC$\underline{H}_3$) [17]. ^{13}C-NMR ($CDCl_3$, 151 MHz) δ_C 164,0 (C-2), 104,6 (C-3), 182,4 (C-4), 162,3 (C-5), 92,7 (C-6), 165,5 (C-7), 98,1 (C-8), 157,7 (C-9), 105,6 (C-10), 123,9 (C-1′), 108,9 (C-2′), 149,4 (C-3′), 141,7 (C-4′), 111,3 (C-5′), 120,2 (C-6′), 56,2 (4′-O$\underline{C}H_3$), 56,1 (3′-O$\underline{C}H_3$), 55,8 (7-O$\underline{C}H_3$) [17, 18]. LC-ESI-MS $[M + K]^+$ (367,4, 3%).

Luteolin-7-*O*-*β*-*D*-glucoside (**5**): Bột vô định hình, màu vàng. ^{1}H-NMR (DMSO-d_6, 600 MHz) $\boldsymbol{\delta}_H$ 6,72 (1H, *s*, H-3), 12,98 (1H, *s*, 5-O$\underline{H}$), 6,79 (1H, *d*, *J*=2,2 Hz, H-6/H-8), 6,42 (1H, *d*, *J*=2,2 Hz, H-8/H-6), 7,42 (1H, *d*, *J*=2,3 Hz, H-2′), 6,90 (1H, *d*, *J*=8,4 Hz, H-5′), 7,45 (1H, *dd*, *J*=8,4, 2,3 Hz, H-6′), 5,05 (1H, *d*, *J*=7,6 Hz, H-1″), 3,72 (1H, *dd*, *J*=11,7, 1,9 Hz, H-2″), 3,45 (1H, *m*, H-3″), 3,46 (1H, *m*, H-4″), 3,26 (2H, *m*, H-6″), 3,17 (1H, *m*, H-5″) [19]. ^{13}C-NMR (DMSO-d_6, 151 MHz) $\boldsymbol{\delta}_C$ 164,3 (C-2), 103,0 (C-3), 181,7 (C-4), 160,9 (C-5), 99,4 (C-6), 162,8 (C-7), 94,5 (C-8), 156,8 (C-9), 105,2 (C-10), 121,2 (C-1′), 113,4 (C-2′), 145,6 (C-3′), 149,8 (C-4′), 115,8 (C-5′), 119,0 (C-6′), 99,7 (C-1″), 72,9 (C-2″), 77,0 (C-3″), 69,4 (C-4″), 76,2 (C-5″), 60,4 (C-6″) [19]. LC-ESI-MS $[M + H]^+$ (*m/z* 447,2, 100%).

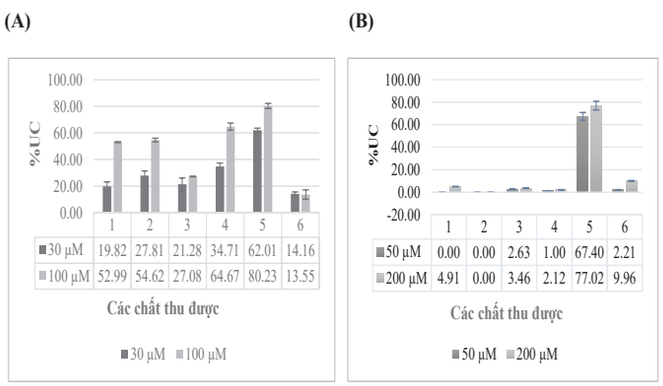
Acacetin-7-*O*-*β*-*D*-rutinoside (**6**): Bột vô định hình, màu vàng. ^{1}H-NMR (DMSO-d_6, 600 MHz) δ_H 6,93 (1H, *s*, H-3), 12,89 (1H, *s*, 5-O$\underline{H}$), 6,78 (1H, *d*, *J*=2,2 Hz, H-6/H-8), 6,45 (1H, *d*, *J*=2,2 Hz, H-8/H-6), 8,04 (2H, *d*, *J*=9,1 Hz, H-2′ & H-6′), 7,14 (2H, *d*, *J*=9,1 Hz, H-3′ & H-5′), 3,85 (3H, *s*, 4′-OC$\underline{H}_3$), 5,05 (1H, *d*, *J*=7,4 Hz, H-1″), 4,42 (1H, *d*, *J*=6,1 Hz, H-1‴), 3,66-3,14 (9H, *m*, H-2″ → H6″ & H-2‴ → H-5‴), 1,07 (3H, *d*, *J*=6,2 Hz, H-6‴) [20]. ^{13}C-NMR (DMSO-d_6, 151 MHz) δ_C 164,0 (C-2), 103,8 (C-3), 182,1 (C-4), 161,2 (C-5), 99,7 (C-6), 157,0 (C-7), 94,8 (C-8), 163,0 (C-9), 105,5 (C-10), 122,7 (C-1′), 128,5 (C-2′), 114,7 (C-3′), 162,5 (C-4′), 114,7 (C-5′), 128,5 (C-6′), 100,0 (C-1″), 73,1 (C-2″), 76,3 (C-3″), 69,6 (C-4″), 68,3 (C-5″), 66,1 (C-6″), 100,5 (C-1‴), 70,8 (C-2‴), 70,4 (C-3‴), 72,1 (C-4‴), 75,7 (C-5‴), 17,8 (C-6‴), 55,6 (4′-O$\underline{C}H_3$) [20]. LC-ESI-MS $[M + Na]^+$ (*m/z* 614,1, 8%).

Công thức cấu tạo của các hợp chất **(1→6)** được thể hiện ở hình 2.



Hình 2. Công thức cấu tạo của các hợp chất (1→6) phân lập được từ cao cloroform và cao ethyl acetat.

Hoạt tính sinh học của các chất phân lập được



Hình 3. Kết quả sàng lọc hoạt tính của các chất. (A) Khả năng ức chế sản sinh NO (%); **(B)** Khả năng ức chế gốc tự do DPPH (%).

Kết quả sàng lọc (hình 3) cho thấy, **(5)** là chất có hoạt tính ức chế sản sinh NO mạnh, đồng thời cũng là chất duy nhất có hoạt tính chống ôxy hoá mạnh. Về khả năng ức chế sinh NO, giá trị IC_{50} của 5 là 13,86±1,10 µM, so với chứng dương là cardamonin có IC_{50}=0,93±0,04 µM (bảng 6). Về khả năng bắt gốc DPPH, giá trị IC_{50} của 5 là 26,93±0,10 µM, so với chứng dương là acid ascorbic có IC_{50}=0,03±0,00 µM (bảng 7).

Bảng 6. Khả năng ức chế sản sinh NO và giá trị IC_{50} của chất (5).

Mẫu	Khả năng ức chế sản sinh NO (%)					IC_{50} (µM)	% CS
	12,5 µM	25 µM	50 µM	75 µM	100 µM		
(5)	45,5±6,0	68,5±1,6	75,8±1,0	81,9±5,5	86,5±4,2	13,86±1,10	110,3±7,5
Cardamonin						0,93±0,04	117,1±2,1

Bảng 7. Khả năng bắt gốc DPPH và giá trị IC_{50} của chất (5).

Mẫu	Khả năng bắt gốc DPPH (%)					IC_{50} (µM)
	12,5 µM	25 µM	50 µM	75 µM	100 µM	
(5)	33,5±0,2	46,5±0,4	67,4±0,2	75,6±1,2	80,0±1,2	26,93±0,10
Acid ascorbic						0,03±0,00

Bàn luận

Trong nghiên cứu này, chất **(5)** có hoạt tính ức chế sản sinh NO tương đối mạnh (IC_{50}=13,86±1,10 µM), song còn yếu hơn chứng dương. Bên cạnh đó, chỉ có **(5)** thể hiện hoạt tính dập tắt gốc DPPH trung bình (IC_{50}=26,93±0,10 µM). Kết quả này tương đồng với nghiên cứu trước đây của S.Y. Wang và cs (2003) [8]. Chất **(5)** (luteolin-7-*O*-*β*-*D*-glucoside) là một chất chống ôxy hoá và kháng viêm mạnh, điển hình cho dược liệu *L. indica*, lại có hàm lượng cao nên rất giàu tiềm năng sản xuất thực phẩm hỗ trợ sức khoẻ và hỗ trợ điều trị một số bệnh lý viêm. Trong nghiên cứu này, **(1, 3, 4)** và **(6)** là những chất lần đầu tiên được phân lập từ loài *L. indica*. Bên cạnh đó, các tài liệu trước đây đã báo cáo về sự có mặt của chất **(2)** [21] và chất **(5)** [8] trong loài cây này.

Kết luận

Nghiên cứu này đã xác định được phân đoạn có tiềm năng kháng viêm và chống ôxy hoá, đồng thời phân lập được các hợp chất mục tiêu, đặc biệt luteolin-7-*O*-*β*-*D*-glucoside là chất có cả hoạt tính kháng viêm và chống ôxy hoá mạnh từ cây *L. indica*. Các kết quả này tạo tiền đề cho các nghiên cứu tiếp theo, nhằm khai thác giá trị sử dụng của dược liệu này.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả xin cảm ơn Phòng Thí nghiệm Y Dược cổ truyền, Khoa Y học cổ truyền, Đại học Y Dược TP Hồ Chí Minh đã hỗ trợ một số thiết bị, máy móc cần thiết cho nghiên cứu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] J. MacMicking, Q.W. Xie, C. Nathan (1997), "Nitric oxide and macrophage function", *Annual Reviews of Immunology*, **15**, pp.323-350, DOI: 10.1146/annurev.immunol.15.1.323.

[2] C. Nathan (1992), "Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells", *FASEB J.*, **6(12)**, pp.3051-3064, DOI: 10.1096/fasebj.6.12.1381691.

[3] Q.W. Xie, H.J. Cho, J. Calaycay, et al. (1992), "Cloning and characterisation of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages", *Science*, **256(5054)**, pp.225-228, DOI: 10.1126/science.1373522.

[4] F. Ahmad, R.A. Khan, S. Rasheed (1992), "Study of analgesic and anti-inflammatory activity from plant extracts of *Lactuca scariola* and *Artemisia absinthium*", *Journal of Islamic Academy of Sciences*, **5(2)**, pp.111-114.

[5] J.M. Kim, K.Y. Yoon (2014), "Comparison of polyphenol contents, antioxidant, and anti-inflammatory activities of wild and cultivated *Lactuca indica*", *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, **55**, pp.248-255, DOI: 10.1007/s13580-014-0132-4.

[6] G. Pepe, E. Sommella, M. Manfra, et al. (2015), "Evaluation of anti-inflammatory activity and fast UHPLC-DAD-IT-TOF profiling of polyphenolic compounds extracted from green lettuce (*Lactuca sativa* L. var. *Maravilla de Verano*)", *Food Chemistry*, **167**, pp.153-161, DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.06.105.

[7] M. Sayyah, N. Hadidi, M. Kamalinejad (2004), "Analgesic and anti-inflammatory activity of *Lactuca sativa* seed extract in rats", *Journal of Ethnopharmacology*, **92(2-3)**, pp.325-329, DOI: 10.1016/j.jep.2004.03.016.

[8] S.Y. Wang, H.N. Chang, K.T. Lin, et al. (2003), "Antioxidant properties and phytochemical characteristics of extracts from *Lactuca indica*", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51(5)**, pp.1506-1512, DOI: 10.1021/jf0259415.

[9] Bộ Y tế Việt Nam (2019), *Quyết định số 3657/QĐ-BYT ngày 28/8/2019 của Bộ Y tế về việc ban hành Danh mục 100 dược liệu có giá trị y tế và kinh tế cao để tập trung phát triển giai đoạn 2020-2030*.

[10] Đỗ Huy Bích (2004), *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam*, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, **1**, tr.235-237.

[11] Đỗ Tất Lợi (2015), *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, Nhà xuất bản Hồng Đức, tr.72-75.

[12] V. Dirsch, H. Stuppner, A.M. Vollmar (1998), "The Griess assay: Suitable for a bio-guided fractionation of anti-inflammatory plant extracts?", *Planta Medica*, **64(5)**, pp.423-426, DOI: 10.1055/s-2006-957473.

[13] R. Amarowicz, R.B. Pegge, B. Barl, et al. (2004), "Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies", *Food Chemistry*, **84(4)**, pp.551-562, DOI: 10.1016/S0308-8146(03)00278-4.

[14] D.S. Wishart, C. Knox, A.C. Guo, et al. (2008), "HMDB: A knowledgebase for the human metabolome", *Nucleic Acids Res.*, **37(suppl_1)**, pp.D603-D610, DOI: 10.1093/nar/gkn810.

[15] A.T.M. Silva, C.G. Magalhães, L.P. Duarte, et al. (2018), "Lupeol and its esters: NMR, powder XRD data and *in vitro* evaluation of cancer cell growth", *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, **53(3)**, DOI: 10.1590/s2175-97902017000300251.

[16] C.G. Floare, M. Bogdan, A. Pîrnau (2009), "'^{1}H NMR investigation of self-association of vanillin in aqueous solution", *Journal of Physics: Conference Series*, **182**, DOI: 10.1088/1742-6596/182/1/012002.

[17] T. Nakanishi, J. Ogaki, A. Inada, et al. (1985), "Flavonoids of *Striga asiatica*", *Journal of Natural Products*, **48(3)**, pp.491-493, DOI: 10.1021/np50039a027.

[18] R. Tsunekawa, K. Katayama, K. Hanaya, et al. (2019), "Synthesis of 5-hydroxy-3′,4′,7-trimethoxyflavone and related compounds and elucidation of their reversal effects on BCRP/ABCG2-mediated anticancer drug resistance", *European Journal of Chemical Biology*, **20(2)**, pp.210-220, DOI: 10.1002/cbic.201800431.

[19] K.K. Chiruvella, A. Mohammed, G. Dampuri, et al. (2007), "Phytochemical and antimicrobial studies of methyl angolensate and luteolin-7-*O*-glucoside isolated from callus cultures of *Soymida febrifuga*", *International Journal of Biomedical Science*, **3(4)**, pp.269-278.

[20] J.C. Park, J.H. Lee, J.S. Choie (1995), "A flavone diglycoside from *Cirsium japonicum* var. *ussuriense*", *Phytochemistry*, **39(1)**, pp.261-262, DOI: 10.1016/0031-9422(94)00897-3.

[21] M. Nitta, K. Azuma, K. Hata, et al. (2013), "Systemic and local injections of lupeol inhibit tumor growth in a melanoma-bearing mouse model", *Biomedical Reports*, **1(4)**, pp.641-645, DOI: 10.3892/br.2013.116.