

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
ĐẠI HỌC ĐÀ NẴNG**

PHAN TÁT HOÀ

**NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN HÓA HỌC VÀ
HOẠT TÍNH SINH HỌC CỦA CÂY KÈ BẮC BỘ
(*LIVISTONA TONKINENSIS* MAGOLON) VÀ
CÂY CỌ XÈ [*LIVISTONA CHINENSIS* (JACQ.)
R.BR.] THUỘC HỌ CAU CỦA VIỆT NAM**

**Chuyên ngành : Hóa Hữu cơ
Mã số : 60.44.27**

TÓM TẮT LUẬN VĂN THẠC SĨ KHOA HỌC

Đà Nẵng, Năm 2011

Công trình được hoàn thành tại
ĐẠI HỌC ĐÀ NẴNG

Người hướng dẫn khoa học: GS.TSKH. TRẦN VĂN SUNG

Người phản biện 1: GS.TS. ĐÀO HÙNG CƯỜNG

Người phản biện 2: PGS.TS. LÊ THỊ LIÊN THANH

Luận văn sẽ được bảo vệ tại Hội đồng chấm Luận văn tốt nghiệp thạc sĩ khoa học họp tại Đại học Đà Nẵng vào ngày 25 tháng 06 năm 2011.

* Có thể tìm hiểu luận văn tại:

- Trung tâm Thông tin – Học liệu, Đại học Đà Nẵng
- Thư viện trường Đại học Sư Phạm, Đại học Đà Nẵng

MỞ ĐẦU

1. Lí do chọn đề tài

Trong vô số loài thực vật ở Việt Nam, có nhiều loài cây thuộc chi *Livistona* của họ Cau (Arecaceae) có giá trị sử dụng cao, được dùng làm thuốc chữa nhiều bệnh theo kinh nghiệm dân gian. Nhưng các công trình nghiên cứu về thành phần hoá học, hoạt tính sinh học của các hợp chất chính trong các cây thuộc chi nói trên ở trong nước hầu như rất ít, có cây còn chưa được nghiên cứu. Còn các công trình nghiên cứu của nước ngoài thì được công bố chưa nhiều. Có thể nhận thấy việc tiếp tục nghiên cứu thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của các loài cây thuộc chi *Livistona* nói trên ở Việt Nam là một hướng nghiên cứu có nhiều triển vọng. Vì vậy chúng tôi chọn đề tài “**Nghiên cứu thành phần hoá học và hoạt tính sinh học của cây Kè Bấc bộ (*Livistona tonkinensis*) và cây Cọ xẻ (*Livistona chinensis*) thuộc họ Cau của Việt Nam**”.

2. Mục đích nghiên cứu

– Thăm dò hoạt tính sinh học của các dịch chiết từ các bộ phận của cây.

– Nghiên cứu thành phần hóa học của các dịch chiết thu được.

3. Đối tượng và phạm vi nghiên cứu

– Điều tra sơ bộ, thu thập, xử lí nguyên liệu là các bộ phận của cây *Livistona chinensis* (Cọ Xẻ).

– Chiết các mẫu thực vật bằng các dung môi có độ phân cực khác nhau.

– Thử hoạt tính sinh học của các dịch chiết thu được.

– Nghiên cứu phân lập, tinh chế các hợp chất từ các dịch chiết.

– Xác định cấu trúc hóa học các hợp chất phân lập được.

Qua quá trình nghiên cứu sàng lọc sơ bộ ban đầu của hai loài *Livistona tonkinensis* và *Livistona chinensis*, với mục đích ưu tiên nghiên cứu cây đã có nhiều ứng dụng rộng rãi trong các bài thuốc dân gian và trong cuộc sống; mặt khác, do thời gian thực hiện đề tài có hạn nên chúng tôi quyết định chọn hướng ***nghiên cứu thành phần hoá học và hoạt tính sinh học của loài Cọ Xẻ (*Livistona chinensis*)***.

4. Phương pháp nghiên cứu

4.1. Các phương pháp nghiên cứu lí thuyết

4.2. Các phương pháp nghiên cứu thực nghiệm

5. Ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài

– Những kết quả về thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của cây *Livistona chinensis* sẽ đóng góp vào kho tàng các hợp chất thiên nhiên của Việt Nam và thế giới.

– Tìm hiểu những đặc trưng cấu trúc nổi bật của các hợp chất có hoạt tính và khả năng biến đổi cấu trúc để có hoạt tính tốt hơn.

Góp phần định hướng sử dụng và khai thác hợp lí cây Cọ Xẻ ở Việt Nam.

– Tạo cơ sở khoa học cho việc sử dụng nguồn thực vật của Việt Nam một cách hiệu quả.

6. Cấu trúc của luận văn

Ngoài phần mở đầu, kết luận, tài liệu tham khảo và phụ lục luận văn được chia thành các chương như sau:

Chương 1 – Tổng quan

Chương 2 – Các nghiên cứu thực nghiệm

Chương 3 – Kết quả và thảo luận.

CHƯƠNG 1 – TỔNG QUAN

Họ Cau (Arecaceae) trên thế giới có khoảng 236 chi, 3500 loài phân bố chủ yếu ở vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới như châu Mỹ, châu Phi, châu Á và Australia. Ở Việt Nam có 39 chi, 103 loài và 2 thứ. Trong đó chi Cọ (*Livistona*) là một trong những chi có nhiều ứng dụng trong cuộc sống và trong y học.

1.1. Mô tả thực vật [1]

1.1.1. Đặc điểm chung về hình thái của họ Cau (Arecaceae)

1.1.1.1. Thân cây

1.1.1.2. Lá

1.1.1.3. Hoa

1.1.1.4. Quả

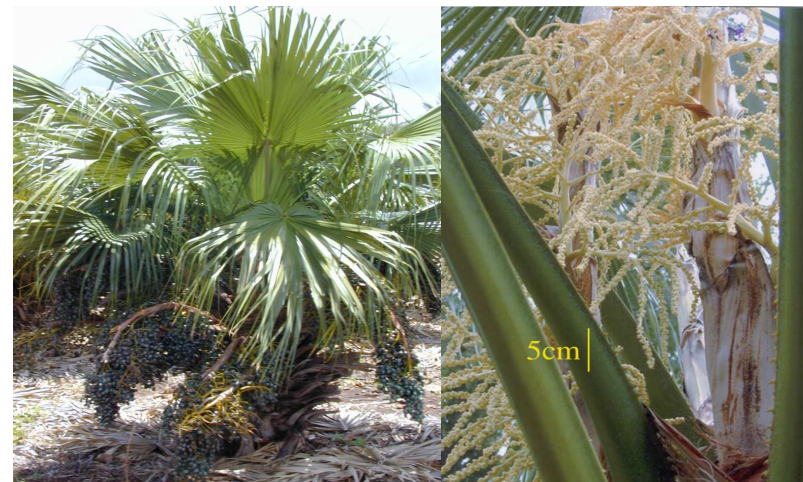
1.1.1.5. Hạt

1.1.2. Đặc điểm chung của chi Cọ (*Livistona*)

1.1.2.1. *Livistona chinensis* (Jacq.) R. Br. – Cọ xẻ, Kè tàu

Cây mọc đơn độc có thân cao 8 – 15 m, đường kính 20 – 30 cm, hình trụ, nhẵn, có nhiều vòng do sẹo lá để lại. Lá hình quạt, xẻ thùy hình chân vịt thành nhiều thùy. Bẹ lá có sợi, mép lá có gai dẹp, cong. Lưỡi gốc phiến lá hình bán nguyệt có chóp. Thùy lá hình đường, đỉnh thùy xẻ đôi sâu 10 – 15 (30) cm, các thùy rủ xuống. Cụm hoa phân nhánh 2 – 3 lần. Hoa thành nhóm 4 – 5 hoa đính trên mẫu lõi. Hoa hình cầu, có cạnh, đường kính khoảng 2 mm. Đài 3, tràng hợp ở gốc, xẻ 3 thùy, hình tam giác. Nhị 6, chỉ nhị ngắn, bao phấn hình bầu dục; bầu hình trứng ngược; vòi nhụy ngắn. Quả hình bầu dục, cỡ 1 – 1,5 x 0,8 – 1 cm có màu xanh lục. Hạt 1, hình bầu dục [1].

Cây có hoa tháng 4, có quả tháng 5 – 6. Mọc rải rác trong rừng nhiệt đới [28].



a. Cây và quả

b. Cụm hoa

(nguồn : www.wikideep.it)

(ảnh : T.P.Anh)

Hình 1.1. *Livistona chinensis* (Jacq.) R.Br.

1.1.2.2. *Livistona halongensis* T. H. Nguyen & Kiew – Cọ Hạ Long

1.1.2.3. *Livistona saribus* (Lour.) Merr. ex A. Chev. – Cọ

1.1.2.4. *Livistona tonkinensis* – Kè Bắc Bộ

1.2. Các ứng dụng

1.2.1. Giá trị sử dụng một số loài trong họ Cau

1.2.2. Công dụng của các cây trong chi Cọ (*Livistona*)

1.2.2.1. Cọ Xẻ (*Livistona chinensis*)

Theo đông y, Cọ xẻ có vị ngọt và chát, tính bình, hạt làm tiêu ung thư, khối u, rễ giảm đau. Y học dân gian Trung Quốc dùng hạt cọ xẻ chữa ung thư mũi, họng, thực quản, ung thư rau, bệnh bạch cầu. Rễ cây này được dùng để trị hen suyễn, giảm đau do tiêm. Liều dùng 15 – 30 gam, dạng thuốc sắc. Trong vị thuốc dân gian hạt cây Cọ xẻ (*Livistona chinensis*) có tên “Quỳ thụ tử”.

1.2.2.2. Kè Nam (*Livistona saribus*)

1.2.2.3. Cọ Hạ Long (*Livistona halongensis*)

1.2.2.4. Kè Bắc Bộ (*Livistona tonkinensis*)

1.3. Tình hình nghiên cứu trong nước và trên thế giới về họ Cau

1.3.1. Các nghiên cứu về thành phần hoá học và hoạt tính sinh học một số loài cây trong họ Cau (*Arecaceae*)

1.3.1.1. Cây Cau (*Areca catechu* L.)

1.3.1.2. Cây Cọ Dầu (*Elaeis guineensis* Jacq.)

1.3.1.3. Cây Dừa (*Cocos nucifera* L.)

1.3.2. Các nghiên cứu về thành phần hoá học và hoạt tính sinh học các cây trong chi Cọ (*Livistona*)

1.3.2.1. Cọ Hạ Long (*Livistona halongensis*)

➤ Nhóm tác giả Trần Văn Lộc và cộng sự đã tách và xác định được cấu trúc của 6 chất từ dịch chiết n-hexan của vỏ thân cây này. Bao gồm: Cyclomusalenon, Cyclolaucadenon, 3 β -Cyclomusalenol, Stigmast-4-en-3-on, Stigmasterol và β -Sitosterol

Về hoạt tính sinh học, các dịch chiết hexan và MeOH của vỏ cây Cọ Hạ Long có hoạt tính ức chế hoạt động của enzym peroxydaza ở mức độ trung bình. Các dịch chiết n-hexan, Chloroform và MeOH đều không có hoạt tính ức chế sự phát triển của 4 dòng tế bào ung thư thử nghiệm là KB, LU), MCF7 và Hep.G2 [7].

1.3.2.2. Cọ Xẻ (*Livistona chinensis*)

➤ Cây Cọ xẻ là cây đã được nghiên cứu nhiều hơn về thành phần hoá học và hoạt tính sinh học. Singh, R.P. và Kaur G. (Ấn Độ) thông báo hoạt tính chống tạo mạch (antiangiogenic) và hoạt tính chống tăng sinh tế bào (antiproliferative) *in vitro* của dịch chiết quả và hạt Cọ xẻ. Phân đoạn chứa các hợp chất phenol của cây này có hoạt tính

phá màu (hemolytic) [30]. Nhóm tác giả trên cũng đưa ra giả thiết là hàm lượng cao các hợp chất phenol là nguyên nhân gây chết các tế bào [23].

Nhóm nghiên cứu của Hoang W.C. (Đài Loan) đã thông báo hoạt tính ức chế enzym sinh trưởng biểu bì (Epidermal Growth Factor, EGF) và enzym hoạt tính phân bào (Mitogen – activated protein kinase, MAPK) trong các dòng tế bào ung thư ở người bởi một phân đoạn protein kí hiệu là LC-X được tách và tinh chế từ hạt cây Cọ xẻ [22].

Zhong Z.G. và cộng sự đã nghiên cứu hoạt tính ức chế sinh trưởng của dịch chiết rễ Cọ xẻ đối với 7 dòng tế bào ung thư gồm: ung thư dạ dày SGC 7901, ung thư máu L 1210, P 388D1, ung thư cuống họng Hela, ung thư gan hele 7404, ung thư hắc tố da (melanoma B16) và ung thư thần kinh chuột nhất lai chuột cống NG 108 – 15. Tất cả các dòng tế bào ung thư thử nghiệm đều bị ức chế bởi dịch chiết etyl acetat từ rễ Cọ xẻ [33].

Maurer – Menestrina và cộng sự (Brazil) đã tách và xác định cấu trúc của một betaxylan (polysacharid) có nhiều nhóm thế từ nhựa quả Cọ xẻ [17].

Cheng S. và cộng sự đã công bố kết quả nghiên cứu rất chi tiết về hoạt tính ức chế tế bào ung thư máu HL 60 của dịch chiết cùi và dịch chiết nước hạt cây Cọ xẻ. Theo đó, dịch chiết cùi có hoạt tính tốt hơn [14]. Muneo Tsukiyama và cộng sự (Nhật Bản) đã nghiên cứu tác dụng chống tích tụ mỡ, làm căng da, chống nhăn, giảm béo của dịch chiết hạt Cọ xẻ. Theo đó, có thể nghiên cứu để sử dụng dịch chiết hạt cọ xẻ trong mỹ phẩm [27].

Về thành phần hoá học của cây Cọ xẻ thì mới chỉ có một vài công bố, theo đó đa số các chất đã được tách và xác định cấu trúc

thuộc nhóm flavonoid [20], [25], [26]. Mới đây nhất trên bài báo đăng trên Fitoterapia [31], nhóm tác giả Xiaobin Zeng và cộng sự đã tách được 11 hợp chất flavonoid từ quả cọ Xê, trong đó có 3 chất mới (**1**, **2** và **3**) là:

2S,3S-3,5,7,3',5'-pentahydroxyflavan (**1**)

2R,3R-3,5,6,7,8,4'-hexahydroxyflavan (**2**)

Và 2R,3R-3,5,6,7,8,3',5'-heptahydroxyflavan (**3**)

Về hoạt tính sinh học, chất 2S,3S-3,5,7,3',5'-pentahydroxyflavan (**1**) có tác dụng ức chế đáng kể đối với dòng tế bào HL-60 với IC₅₀ là 0,2±0,01 và CNE-1 với IC₅₀ là 1,0±0,1 μM áp đảo so với các hợp chất tham khảo trong các khảo nghiệm. Hầu hết các hợp chất cũng cho thấy có hoạt tính kháng oxi hóa mạnh [31].

Hai loài *Livistona tonkinensis* và *Livistona saribus* cho đến nay, chúng tôi chưa thấy công trình nghiên cứu nào về thành phần hoá học và hoạt tính sinh học được công bố.

CHƯƠNG 2 – CÁC NGHIÊN CỨU THỰC NGHIỆM

2.1. Nguyên liệu, hóa chất, thiết bị nghiên cứu

2.1.1. Nguyên liệu

2.1.2. Hóa chất, thiết bị nghiên cứu

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp chiết mẫu thực vật

2.2.2. Phương pháp tách và tinh chế chất

2.2.3. Phương pháp xác định cấu trúc hóa học của các chất

2.2.4. Phương pháp thăm dò hoạt tính sinh học

2.2.4.1. Thử hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định

2.2.4.2. Hoạt tính gây độc tế bào

2.2.4.3. Phương pháp thử hoạt tính kháng oxi hóa

2.2.5. Phương pháp lựa chọn chất hấp phụ và dung môi chạy cột sắc kí [10]

2.2.5.1. Chọn chất hấp phụ

2.2.5.2. Lựa chọn dung môi chạy cột sắc kí

2.2.6. Tỷ lệ giữa lượng mẫu chất cần tách với kích thước cột [10]

2.2.6.1. Tỷ lệ giữa lượng mẫu chất cần tách với lượng silicagel sử dụng

2.2.6.2. Tỷ lệ giữa chiều cao lượng silicagel và đường kính trong của cột sắc kí

2.2.7. Cách nạp silicagel vào cột [10]

2.2.7.1. Nạp silicagel ở dạng sệt

2.2.7.2. Nạp silicagel dạng khô

2.2.8. Cách nạp mẫu vào cột [10]

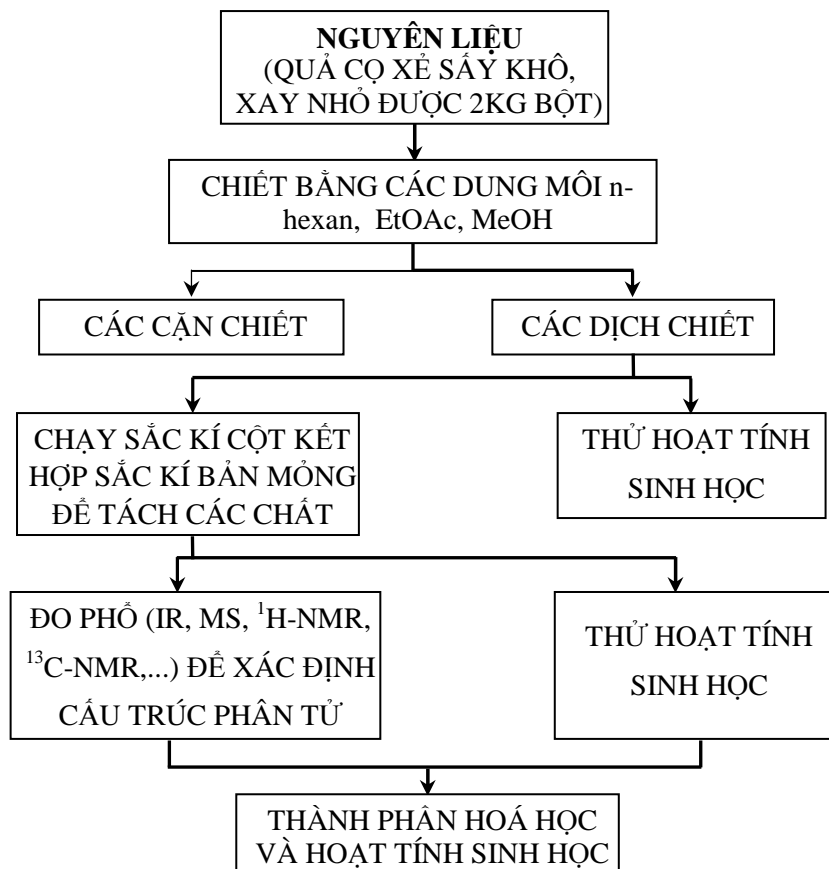
2.2.8.1. Phương pháp khô

2.2.8.2. Phương pháp ướt

2.3. Các nghiên cứu thực nghiệm

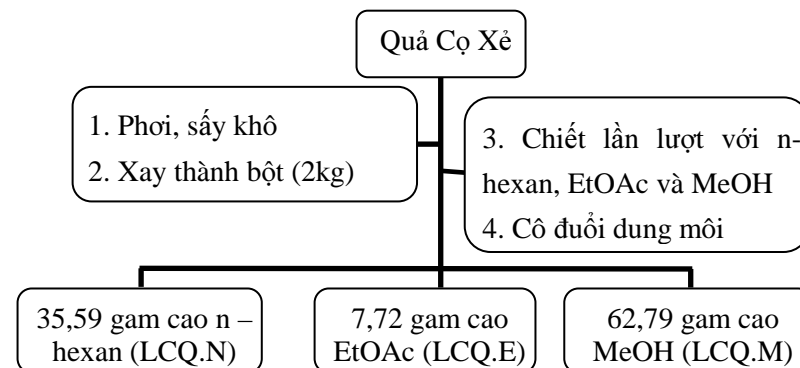
2.3.1. Sơ đồ thực nghiệm

Quá trình thực nghiệm được mô tả theo hình 2.1:



Hình 2.1. Sơ đồ thực nghiệm

Nguyên liệu là quả Cọ Xẻ được rửa sạch, sấy khô rồi đem xay thu được 2kg bột. Nguyên liệu được chiết ngâm lần lượt với các dung môi n-hexan, EtOAc và MeOH. Phần cao chiết thu được bao gồm: 35,59g cao n-hexan, 7,72g cao EtOAc và 62,79g cao MeOH.



Hình 2.2. Sơ đồ chiết mẫu quả Cọ Xẻ

Phần cao n-hexan (lỏng) dạng dầu béo sánh, màu vàng da cam đang được tiếp tục chạy cột sắc kí đồng thời kết hợp với chạy GC – MS để xác định và định danh thành phần hoá học.

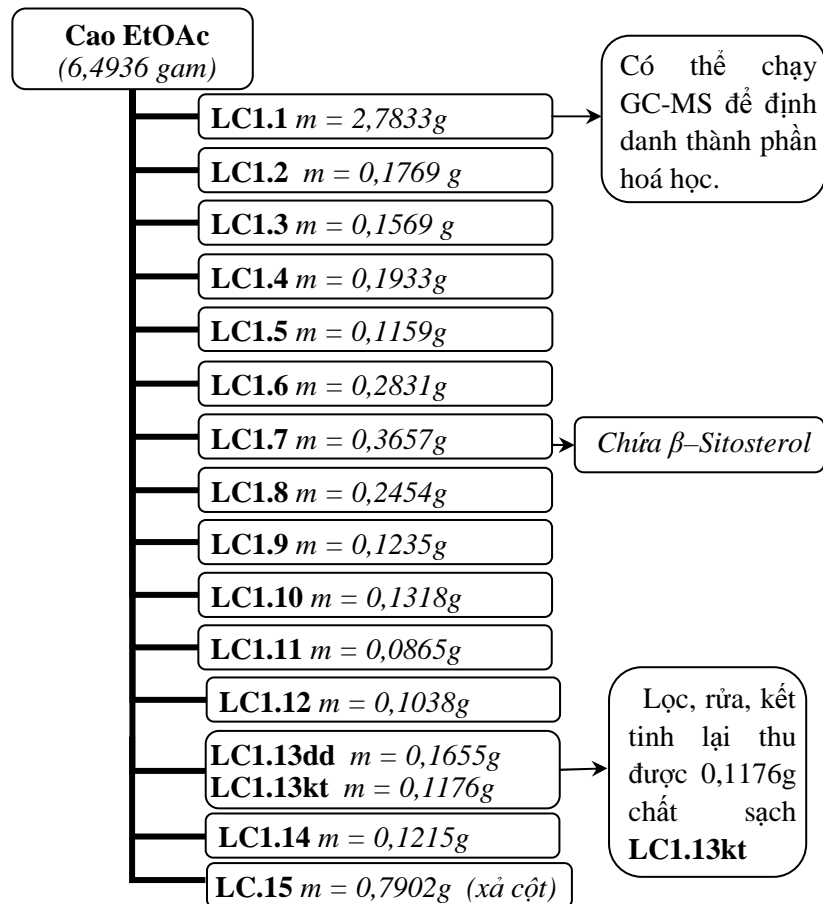
2.3.2. Chạy cột sắc kí phần cao EtOAc

Phần cao EtOAc lấy ra 6,4936 gam chạy cột Silicagel với hệ dung môi n-hexan:EtOAc = 95:5 rồi tăng dần độ phân cực, thu được 15 phân đoạn từ **LC1.1** đến **LC1.15** với tổng lượng chất 5,9609 gam.

Phân đoạn **LC1.13** xuất hiện chất kết tinh với tinh thể hình kim, màu vàng. Lọc, rửa kết tinh bằng dung môi EtOAc thu được tinh thể. Kết tinh lại ở nhiệt độ phòng thu được 62,1 mg tinh thể sạch. Kiểm tra bằng bản mỏng với hệ dung môi n-hexan : EtOAc = 1 : 9; soi đèn UV có màu tím, phun thuốc thử Vanilin/H₂SO₄ và hơi nóng cho màu vàng. Kí hiệu chất là **LC1.13kt**. Chất **LC1.13kt** được đo các loại phổ để xác định cấu trúc.

Phân đoạn **LC1.7** được chấm bản mỏng so sánh với chất chuẩn β-Sitosterol. Hệ dung môi n-hexan : EtOAc = 9 : 1, cho kết quả chất chính trong **LC1.7** có cùng R_f (R_f = 0,5) và cùng màu sắc (màu tím) khi phun thuốc thử Vanilin/H₂SO₄ với chất chuẩn β-Sitosterol.

Các phân đoạn **LC1.1** và **LC1.2** chứa chủ yếu là dầu béo (có màu da cam) có thể đo GC-MS để định danh thành phần hoá học. Các phân đoạn còn lại khi chấm bản mỏng thấy không khả thi lắm nên chưa được nghiên cứu.



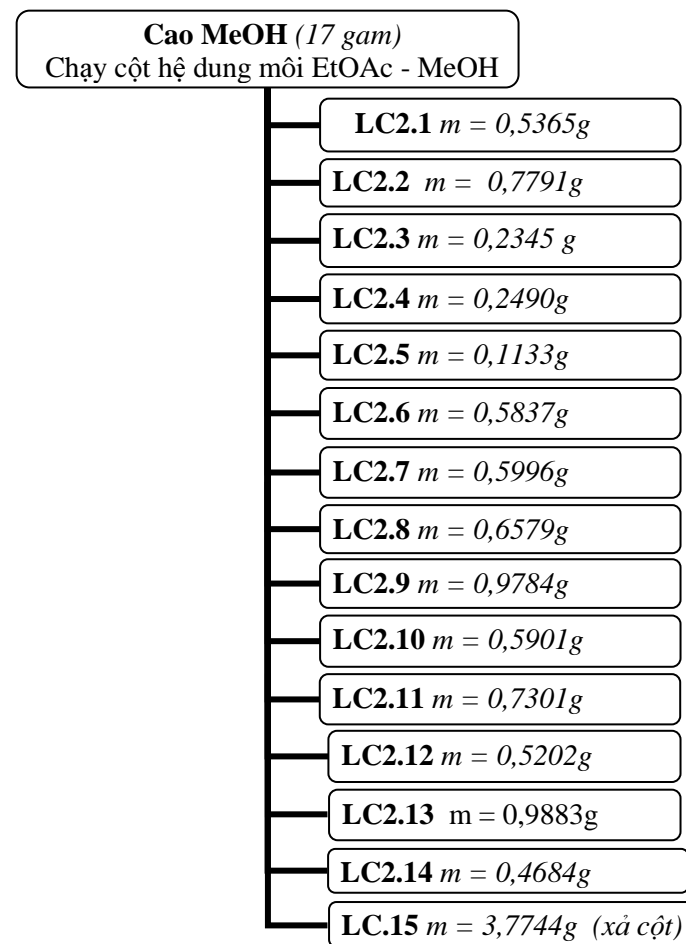
Hình 2.3. Sơ đồ phân lập và tinh chế chất từ cao EtOAc

2.3.3. Chạy cột phân cao MeOH

Khối lượng mẫu: 17 gam

Khối lượng silicagel cho vào cột sắc kí: 400 gam

Hệ dung môi ban đầu: EtOAc : MeOH = 95:5



Hình 2.4. Sơ đồ phân tách và tinh chế chất từ cao MeOH

Chạy cột sắc kí với độ phân cực của hệ dung môi tăng dần từ EtOAc : MeOH = 95 : 5 đến 6 : 4; rồi rửa cột với MeOH và hệ MeOH : H₂O thu được 15 phân đoạn kí hiệu từ **LC2.1** đến **LC2.15** với tổng lượng chất là 11,8035g.

Phân đoạn **LC2.2** (0,7791g) có chứa chất kết tinh tinh thể hình kim, màu vàng. Lọc tinh thể và kết tinh lại trong hỗn hợp EtOAc/MeOH thu được chất sạch (m = 150 mg), đem so sánh với chất đã tách được **LC1.13kt** bằng sắc kí bản mỏng. Kết quả là trùng nhau.

Phân đoạn **LC2.4** (m = 0,2490g) tách được 14mg chất kết tinh vô định hình, màu trắng, tan trong hệ dung môi CH₂Cl₂ – MeOH. Kí hiệu là **LC2.4**. Sắc kí bản mỏng hệ CH₂Cl₂ : MeOH = 94 : 6 nhắc lại cho R_f ≈ 0,3. Không hiện UV, hiện thuốc thử Vanilin màu tím. Đem so sánh với chất chuẩn Stigmasterol glucosid. Kết quả trùng nhau. Đo phổ ¹H-NMR chất **LC2.4** để xác định cấu trúc.

Phân đoạn **LC2.6** (m = 0,5837 gam) lọc và rửa phần kết tủa. Hoà tan trong dung môi MeOH rồi tiến hành chạy cột Sephadex LH-20 (với dung môi MeOH) thu được 16,3 mg chất sạch. Chấm bản mỏng hệ dung môi CH₂Cl₂ : MeOH = 8 : 2 cho R_f = 0,5. Chất hiện UV màu tím (mờ), thuốc thử Vanilin màu nâu xám. Kí hiệu là **LC2.6**. Đem đo phổ ¹H, ¹³C-NMR (DMSO) để xác định cấu trúc.

Phân đoạn **LC2.10** chạy sắc kí cột silicagel với hệ dung môi ban đầu CH₂Cl₂ : MeOH : H₂O = 8 : 3 : 0,5, xả cột với MeOH. Lấy một phần xả cột quay khô thu được 25,6mg chất sạch. Chấm bản mỏng với hệ CH₂Cl₂ : MeOH : H₂O = 6 : 4 : 1 cho R_f = 0,58. Chất không hiện UV, hiện thuốc thử Vanilin màu xám đen. Kí hiệu chất là **LC2.10**. Đem đo phổ NMR chất **LC2.10** để xác định cấu trúc.

Phần xả cột có khối lượng 3,7744 gam. Phần này chúng tôi đã thực hiện phản ứng acetyl hoá để giảm bớt độ phân cực thu được sản phẩm acetyl hoá có khối lượng m = 2,7445 gam và phần không bị acetyl hoá với khối lượng m = 1,3252 gam. Phần sản phẩm acetyl hoá và các phân đoạn còn lại của dịch chiết MeOH đang được tiếp tục chạy sắc kí cột để tách chất.

CHƯƠNG 3 – KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả thử hoạt tính sinh học

3.1.1. Hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định

Bảng 3.1 cho thấy kết quả thử hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định của các dịch chiết từ quả Cọ Xê (*Livistona chinensis*) trong các dung môi n-hexan (LCQ.N), dung môi EtOAc (LCQ.E) và dung môi MeOH (LCQ.M).

Các chủng vi khuẩn và nấm gây bệnh được thử hoạt tính bao gồm:

L.fermentum: *Lactobacillus fermentum*

B.subtilis: *Bacillus subtilis*

S.aureus: *Staphylococcus aureus*

S.enterica: *Salmonella enterica*

E.coli: *Escherichia coli*

P.aeruginosa: *Pseudomonas aeruginosa*

C.albican: *Candida albican*

Bảng 3.1. Kết quả thử hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định.

Nồng độ ức chế 50% sự phát triển của vi sinh vật và nấm (IC ₅₀ , µg/ml)		Tên dịch chiết		
		LCQ.N	LCQ.E	LCQ.M
Gram (+)	<i>Lactobacillus fermentum</i>	> 256	> 256	> 256
	<i>Bacillus subtilis</i>	> 256	> 256	> 256
	<i>Staphylococcus aureus</i>	209,71	> 256	46,77
Gram (-)	<i>Salmonella enterica</i>	> 256	> 256	> 256
	<i>Escherichia coli</i>	> 256	> 256	> 256
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	> 256	> 256	> 256
Nấm	<i>Candida albican</i>	> 256	> 256	> 256

Theo kết quả ở bảng 3.1 ta thấy chỉ có dịch chiết quả Cọ xẻ trong MeOH (LCQ.M) và dịch chiết quả Cọ xẻ trong n-hexan (LCQ.N) có hoạt tính ức chế sinh trưởng đối với vi khuẩn Gram (+) *Staphylococcus aureus* với nồng độ ức chế 50% IC_{50} là 46,77 và 209,71 $\mu\text{g/ml}$ tương ứng. Còn lại không có hoạt tính đối với các vi sinh vật được thử.

Kết quả thử nghiệm cho thấy các dịch chiết từ quả Cọ Xẻ ức chế chọn lọc vi khuẩn *Staphylococcus aureus* là một loài vi khuẩn lên mủ xanh khó điều trị. Đây là một kết quả lí thú.

3.1.2. Hoạt tính chống oxi hoá

Kết quả thử hoạt tính chống oxi hoá được đưa ra ở bảng 3.2.

Bảng 3.2. Kết quả thử hoạt tính chống oxi hoá.

Nồng độ chất thử ($\mu\text{g/ml}$)	% ức chế hoạt động của enzym		
	LCQ.N	LCQ.E	LCQ.M
128	8	7	82
32	0	4	36
8	0	0	23
2	0	0	9
0,5	0	0	0
IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	> 128	> 128	61,22

Theo kết quả ở bảng 3.2 ta thấy rằng dịch chiết quả Cọ xẻ trong MeOH (LCQ.M) có hoạt tính ức chế hoạt động của enzym *peroxydaza* với nồng độ ức chế 50% IC_{50} là 61,22 $\mu\text{g/ml}$. Các dịch chiết khác không có hoạt tính. Các chất có IC_{50} > 128 $\mu\text{g/ml}$ được coi là không có hoạt tính.

3.1.3. Hoạt tính gây độc tế bào

Kết quả thử hoạt tính gây độc tế bào của các dịch chiết từ quả Cọ xẻ được đưa ra ở bảng 3.3.

Theo kết quả ở bảng 3.3 ta thấy, dịch chiết quả Cọ xẻ trong MeOH có hoạt tính với 3 dòng tế bào ung thư thử nghiệm là: KB (ung thư biểu mô), MCF-7 (ung thư vú) và Hep.G2 (ung thư gan) với giá trị IC_{50} lần lượt là: 68,04; 88,30 và 101,25 $\mu\text{g/ml}$ tương ứng. Các dịch chiết khác không có hoạt tính ức chế các dòng tế bào ung thư thử nghiệm.

Bảng 3.3. Kết quả thử hoạt tính gây độc tế bào

Số TT	Tên mẫu	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)			
		KB	LU	MCF-7	Hep. G2
1	LCQ.N	> 128	> 128	> 128	> 128
2	LCQ.E	> 128	> 128	> 128	> 128
3	LCQ.M	68,04	> 128	88,30	101,25

Qua các thử nghiệm hoạt tính sinh học ta thấy dịch chiết MeOH từ quả Cọ Xẻ (*Livistona chinensis*) có hoạt tính gây độc tế bào tương đối tốt. Đồng thời, nó cũng có hoạt tính kháng oxi hoá và kháng khuẩn. Bởi vậy rất đáng quan tâm nghiên cứu kĩ dịch chiết này.

3.2. Xác định cấu trúc các chất tách được

3.2.1. Số liệu phổ của các chất tách được

3.2.1.1. Chất LC1.13kt

☞ Phổ hồng ngoại (FT-IR) KBr

ν_{max} (cm^{-1}): 3597,17 (nhóm OH tự do), 3335,69 (tù, mạnh, nhóm -OH có liên kết Hidro), 2961,12 và 2840,48 (CH_3), 1657,75 và 1617,57 (Carbonyl), 1582,74 và 1587,74 (C=C nhân thơm), 1464,87 và 1360,40 (CH_3), 1172,88, 1116,63 (C-O), 843,39 (nhân thơm), 647,83; 602,29; 457,63.

☞ Phổ MS (EI): m/z $[M-H]^- = 329 \rightarrow M = 330$.

☞ Phổ $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6)

δ (ppm): 3,884 (6H, s); 6,20 (1H, d, $J=2,09$ Hz); 6,55 (1H, d, $J=2,09$ Hz); 6,973 (1H, s); 7,324 (2H, s) và 12,956 (1H, s).

☞ Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, DMSO-d₆)

δ (ppm): 56,35 (2C của 2 nhóm $-\text{OCH}_3$); 94,162 (CH); 98,796 (CH); 103,571 (CH); 103,708 (CH); 104,388 (2xCH); 120,376 (C); 139,849 (C); 148,174 (2xC); 157,310 (C); 161,377 (C); 163,632 (C); 164,102 (C); 181,772 (C)

3.2.1.2. Chất LC2.6

☞ Phổ $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, DMSO-d₆)

δ (ppm): 3,17 (1H, d, $J = 4,8$ Hz), 3,26 (2H, br. s), 3,31 (1H, giống t), 3,48 (1H, quin., 5,9 Hz), 3,71 (1H, \approx dd), 4,467 (1H, dd, $J = 6,0; 14,2$ Hz), 4,597 (1H, t, $J = 5,6$ Hz), 4,65 (1H, dd, $J = 5,2; 14,2$ Hz), 4,77 (1H, d, $J = 7,09$ Hz), 4,998 (1H, t, $J = 5,8$ Hz), 5,03 (1H, d, $J = 4,8$ Hz), 5,10 (1H, s), 5,36 (1H, s), 7,00 (1H, t, $J = 7,4$ Hz), 7,10 (1H, d, $J = 8,1$ Hz), 7,20 (1H, t, $J = 7,6$ Hz), 7,37 (1H, d, $J = 7,4$ Hz).

☞ Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ (125MHz, DMSO-d₆)

δ (ppm): 58,335 (CH₂), 60,836 (CH₂), 69,817 (CH), 73,476 (CH), 76,559 (CH), 77,124 (CH), 101,494 (CH), 114,874 (CH), 121,82 (CH), 127,28 (CH), 127,779 (CH), 131,553 (C), 154,755 (C).

3.2.1.3. Chất LC2.4

☞ Phổ $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, DMSO-d₆)

δ (ppm): 0,65 (3H, s, H - 18), 0,79 (3H, d, $J = 6,9$ Hz, H - 27), 0,81 (3H, d, $J = 6,5$ Hz, H - 26), 0,83 (3H, t, $J = 7,0$ Hz, H - 29), 0,89 (3H, d, $J = 6,4$ Hz, H - 21), 0,954 (3H, s, H - 19), 2,122 (1H, m), 2,36 (1H, m), 2,894 (1H, m), 3,01 (1H, m), 3,07 (1H, m), 3,12 (1H, m), 3,40 (1H, m), 3,45 (1H, m), 3,64 (1H, m, H 3 α), 4,21 (1H, d, $J = 7,8$ Hz, H - 6A), 4,43 (1H, t, $J = 5,8$ Hz, H - 6B), 4,861 - 4,90 (3H, m, H - 1', H - 22, H - 23), 5,32 - 5,33 (1H, m, H - 6).

3.2.1.4. Chất LC2.10

☞ Phổ $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, DMSO - d₆)

δ (ppm): 3,115 (1H, t, $J = 9,3$ Hz), 3,172 (1H, t, $J = 7,6$ Hz), 3,395 (2H, br. s), 3,45 (1H, d, $J = 9,7$ Hz), 3,546 (4H, br. s), 3,63 (1H, d, $J = 9,7$ Hz), 3,765 (1H, giống t), 3,869 (1H, br. s), 4,379 (1H, br. s), 4,407 (1H, br. s), 4,503 (1H, br. s), 4,777 (3H, br. s), 5,042 (1H, br. s), 5,164 (1H, d, $J = 3,3$ Hz, H-1-Glc), 5,194 (1H, s).

☞ Phổ $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, D₂O)

δ (ppm): 3,374 (1H, t, $J = 9,5$ Hz), 3,46 (1H, dd, $J = 3,7; 9,9$ Hz), 3,579 (2H, br. s), 3,664 (1H, t, $J = 9,5$ Hz), 3, 721 - 3,758 (5H, m), 3,776 - 3,812 (1H, m), 3,955 (1H, t, $J = 8,5$ Hz), 4,12 (1H, d, $J = 8,8$), 5,318 (1H, d, $J = 3,7$ Hz, H-1-Glc).

☞ Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ (125MHz, DMSO - d₆)

δ (ppm): 60,664 (CH₂), 62,28 (2xCH₂), 70,00 (CH), 71,773 (CH), 72,958 (CH), 70,047 (CH), 74,448 (CH), 77,222 (CH), 82,652 (CH), 91,912 (CH), 104,163 (C).

☞ Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ (125MHz, D₂O)

δ (ppm): 60,194 (CH₂), 61,443 (CH₂), 62,398 (CH₂), 69,287 (CH), 71,115 (CH), 72,449 (CH), 72,625 (CH), 74,066 (CH), 76,517 (CH), 81,407 (CH), 103,727 (C).

3.2.2. Xác định cấu trúc của các chất tách được [11], [16]

3.2.2.1. Chất LC1.13kt: 5,7,4'-trihydroxy-3',5'-dimetoxy-flavon

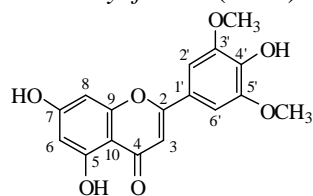
Chất LC 1.13kt (1) là tinh thể hình kim, màu vàng, nhiệt độ nóng chảy 290 - 291 °C. Phổ hồng ngoại của chất (1) có đỉnh hấp thụ của nhóm OH tự do (3597,11 cm⁻¹) và OH liên kết hydro (3335,69 cm⁻¹), carbonyl (1657,75 và 1617,57 cm⁻¹) và liên kết C-O-C (1172,88 và 1116,63 cm⁻¹). Phổ NMR có đóng góp quan trọng cho việc xác định cấu trúc của chất (1). Phổ $^1\text{H-NMR}$ có một singlet của

6H tại $\delta = 3,884$ ppm. Vùng nhân thơm và olefin có 4 cụm tín hiệu bao gồm: 1 dublet tại $\delta 6,20$ ppm (1H, $J = 2,09$ Hz); 1 dublet tại $\delta = 6,55$ ppm (1H, $J = 2,09$ Hz) chứng tỏ có 2 proton ở vị trí ortho với nhau trong nhân thơm, một singlet ở $\delta = 6,973$ ppm (1H); một singlet ở $\delta = 7,324$ ppm (2H) chứng tỏ có sự đối xứng trong một vòng benzen thế bốn lần. Ngoài ra còn có một singlet ở $\delta = 12,956$ ppm của một proton phenolic hoặc một axit carboxylic.

Phổ ^{13}C cho kết quả 17 tín hiệu carbon. Phổ DEPT cho thấy có 2 nhóm OCH_3 (trùng nhau) với $\delta = 56,350$ ppm; 5 nhóm CH, trong đó có 2 nhóm tín hiệu trùng nhau tại $\delta = 104,388$ ppm; 10 carbon bậc 4, trong đó có 2 carbon có tín hiệu trùng nhau tại $\delta = 148,174$ ppm. Các số liệu trên cho thấy chất (1) là một flavon có vòng B thế đối xứng và trong số các nhóm thế có 2 nhóm OCH_3 .

Phổ MS (EI) có pic ion âm với $m/z [\text{M}-\text{H}]^- = 329 \rightarrow \text{M} = 330$ phù hợp với công thức phân tử $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_7$.

So sánh phổ ^{13}C -NMR của chất (1) với phổ của triclin trong [12] thấy hoàn toàn đồng nhất (Bảng 3.4). Như vậy chất (1) chính là 5,7,4'-trihydroxy-3',5'-dimethoxy-flavon (triclin) với cấu tạo như sau:



(1). 5,7,4'-trihydroxy-3',5'-dimethoxy-flavon (triclin)

Bảng 3.4. Số liệu phổ NMR của chất (1) và của triclin [12].

Vị trí C	Chất 1 (DMSO-d ₆)		Triclin (DMSO-d ₆)
	δH	δC	δC
2	–	163,63	164,0
3	6,973 (s)	103,57	103,6

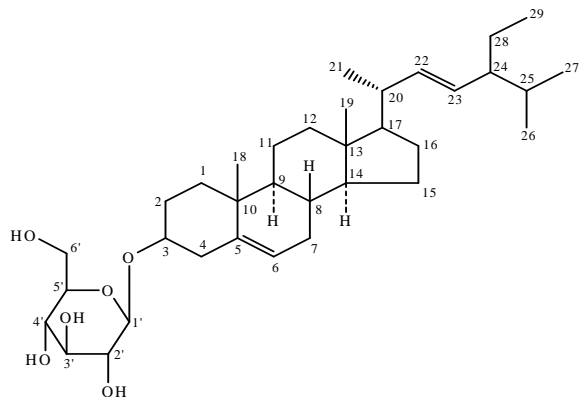
4	–	181,77	181,6
5	–	157,30	157,2
6	6,55 (d; 2,09)	98,80	98,7
7	–	163,63	163,5
8	6,20 (d; 2,09)	94,16	94,1
9	–	161,38	161,3
10	–	120,38	120,8
1'	–	139,85	139,7
2'	7,324 (s)	104,39	104,3
3'	–	148,17	148,0
4'	–	164,10	164,0
5'	–	148,17	148,0
6'	7,324 (s)	104,39	104,3
OCH_3	3,884 (s)	56,35	56,3

Triclin có nhiều hoạt tính sinh học thú vị. Ví dụ như: hoạt tính kháng virus *Cytomegalovirus* với $\text{EC}_{50} = 0,17$ $\mu\text{g/ml}$ và $\text{IC}_{50} = 205$ $\mu\text{g/ml}$ [13], hoạt tính ức chế sự phát triển của tế bào ung thư ruột kết (với $\text{IC}_{50} = 16\mu\text{M}$) và tế bào ung thư vú (với $\text{IC}_{50} = 0,6\mu\text{M}$) [17], hoạt tính kháng histamin [24], hoạt tính kháng oxy hoá với $\text{IC}_{50} = 88$ $\mu\text{g/ml}$ [32].

3.2.2.2. Chất LC2.4: Stigmast-5, 22-dien-3 β -O- β -D-glucopyranosid.

Chất LC 2.4 (2) là chất bột vô định hình, màu trắng, hiện màu tím trên bản mỏng khi phun với thuốc thử vanilin/ H_2SO_4 và hơi nóng, có Rf trùng với stigmasterol glucosid. Điều này được củng cố thêm khi phổ ^1H -NMR của chất (2) đồng nhất với phổ của stigmasterol-5, 22-dien-3 β -O- β -D-glucopyranosid (stigmasterol glucosid) [18], với

các tín hiệu chủ chốt tại $\delta = 0,65$ (3H; s; H-18); 0,79 (3H; d; 6,9; H-27); 0,81 (3H; d; 6,5; H-26); 0,83 (3H; t; 7,0; H-29); 0,89 (3H; d; 6,4; H-21); 0,954 (3H; s; H-19); 4,21 (1H; d; 7,8); 4,43 (1H; t; 5,8); 4,861–4,90 (3H; m; H-1'; H-22 và H-23); 5,32 – 5,33 (1H; m; H-6).

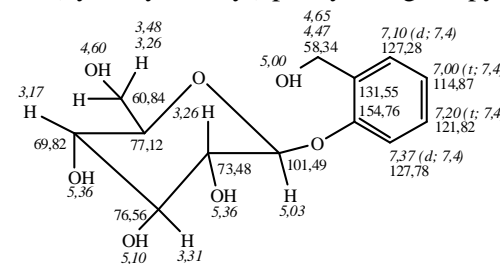


(2). *Stigmast-5, 22-dien-3 β -O- β -D-glucopyranosid*

3.2.2.3. Chất LC2.6: Salicin

Chất LC 2.6 (3): Tinh thể hình kim, không màu. Phổ ^{13}C -NMR và phổ DEPT cho biết có 13 tín hiệu carbon, trong đó có 2 nhóm CH_2 , 9 nhóm CH và hai carbon bậc 4. Có 6 carbon vùng nhân thơm, trong đó có 2 carbon bậc 4 tại $\delta = 134$ và 151 ppm. Điều này gợi ý rằng nhân thơm được thế hai lần và một trong hai nhóm thế có gốc oxi ($\delta = 151$ ppm). Các tín hiệu còn lại là của một phân tử đường hexose và một nhóm CH_2OH ($\delta = 58,333$ ppm). Phổ ^1H -NMR (DMSO- d_6) có 2 vùng tín hiệu rõ rệt: một vùng proton nhân thơm (4 proton) và một vùng của phân tử đường và 1 nhóm CH_2OH (14 proton). Vùng proton thơm có 4 cụm pic bao gồm 2 triplet [(7,00 ppm; 1H; 7,4Hz); (7,197; 1H; 7,4Hz)] và 2 dublet [(7,10 ppm; 7,4Hz); (7,37 ppm; 7,4Hz)] chứng tỏ hai nhóm thế ở vị trí ortho với

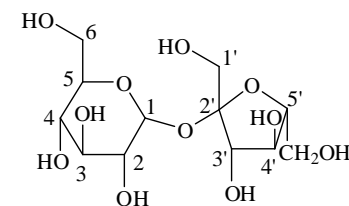
nhau. Kết hợp với dữ liệu phổ trong [15] và [18] có thể kết luận chất (3) là salicin [2-(hydroxy-methyl) phenyl-D-glucopyranoside].



(3). Salicin

3.2.2.4. Chất LC2.10: Saccharose

Chất LC 2.10 (4): Hiện màu xám với thuốc thử vanilin/ H_2SO_4 trên sắc ký lớp mỏng. Phổ ^1H và ^{13}C -NMR cho thấy chất (4) là một disaccharid với một aldohexose và một ketohexose. Phổ ^1H -NMR (DMSO- d_6) cho thấy có 22 proton trong vùng $\delta = 3,09 - 5,194$ ppm. với 1 proton anomeric tại $\delta = 5,164$ (d; 3,3Hz) gợi ý cho saccharose. Phổ ^1H -NMR (D_2O) cũng phù hợp với giả thuyết trên với tín hiệu H-anomeric tại $\delta = 5,318$ (d; 3,7Hz) cũng như tín hiệu C-anomeric (D_2O) tại $\delta = 92,213$ (α -glucose) và 103,727 (fructose) và 91,912 (α -glucose) và 104,163 (fructose) trong DMSO- d_6 . Trong DMSO- d_6 hai tín hiệu nhóm CH_2OH của fructose trùng nhau ($\delta = 62,28$) nhưng trong D_2O chúng tách ra rõ rệt ($\delta = 61,443$ và 62,389). Phân tích kỹ phổ ^1H và ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 và D_2O) cho phép kết luận chất (4) là saccharose.



(4). Saccharose.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

1. Kết luận

Thăm dò hoạt tính sinh học

Các dịch chiết n-hexan (LCQ.N), EtOAc (LCQ.E) và MeOH (LCQ.M) từ quả Cọ Xẻ đã được thử hoạt tính sinh học.

Kết quả thử hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định cho thấy, các dịch chiết n-hexan (LCQ.N) và MeOH (LCQ.M) có hoạt tính ức chế sinh trưởng đối với vi khuẩn Gram (+) *Staphylococcus aureus* với nồng độ IC₅₀ lần lượt là 46,77 và 209,71 $\mu\text{g/ml}$.

Ở hoạt tính chống oxi hoá thì chỉ có dịch chiết từ quả Cọ Xẻ trong MeOH có hoạt tính ức chế hoạt động của enzym *peroxydaza* với IC₅₀ là 61,22 $\mu\text{g/ml}$.

Ở hoạt tính gây độc tế bào, chỉ có dịch chiết MeOH của quả Cọ Xẻ có hoạt tính đối với 3 dòng tế bào ung thư thử nghiệm là: KB (ung thư biểu mô), MCF – 7 (ung thư vú) và Hep.G2 với các giá trị IC₅₀ lần lượt là 68,04; 88,30 và 101,25 $\mu\text{g/ml}$. Các dịch chiết khác không có hoạt tính trong các thử nghiệm nêu trên.

Đây là lần đầu tiên các hoạt tính sinh học này của các dịch chiết n – hexan, EtOAc và MeOH từ quả Cọ Xẻ được nghiên cứu.

Thành phần hoá học

Từ dịch chiết EtOAc và dịch chiết MeOH của quả Cọ xẻ (*Livistona chinensis*), bằng các phương pháp sắc kí cột silicagel, sắc kí cột sephadex LH-20 kết hợp với sắc kí lớp mỏng, các phương pháp kết tinh và các phương pháp phổ hiện đại như IR, MS, NMR, chúng tôi đã tách và xác định được cấu của 4 hợp chất, bao gồm:

Chất LC1.13kt: Tricin

Chất này đã được phân lập trước đây từ các chi *Aechmea*, *Billbergia*, *Graminneeae* và có nhiều trong họ Cyperaceae (họ Cói).

Chất LC2.6: 2-(hydroxy-methyl) phenyl-D-glucopyranoside (salicin).

Salicin đã được phân lập trước đây từ vỏ cây bạch dương và vỏ thân cây liễu. Chất này có hoạt tính hạ sốt, chống viêm khớp, giảm đau.

Chất LC2.4: *Stigmast-5, 22-dien-3 β -O- β -D-glucopyranosid*

Chất LC2.10: Saccharose

Đây là lần đầu tiên các chất này được phân lập từ quả Cọ xẻ (*Livistona chinensis*) thuộc họ Cau ở Việt Nam.

2. Kiến nghị

Tiếp tục phân lập các phân đoạn còn lại của dịch chiết MeOH và chạy cột sắc kí kết hợp với GC/MS phân cao n-hexan để xác định thành phần hoá học. Đồng thời thử hoạt tính sinh học của các chất tách được để có cái nhìn tổng thể về hoá thực vật cũng như hoạt tính sinh học của quả Cọ xẻ, góp phần làm tăng giá trị sử dụng cũng như chữa bệnh của vị thuốc “Quy thụ tử” trong các bài thuốc dân gian.