

STUDY ON PHYTOCHEMICAL ESTIMATION AND SAPONIN ANALYSIS FROM THE AERIAL PARTS OF *W. X* “BRISTOL RUBY”

Nguyen Duc Hung*, Tu Quang Tan

TNU - University of Education

ARTICLE INFO	ABSTRACT
<p>Received: 28/10/2021</p> <p>Revised: 20/12/2021</p> <p>Published: 28/12/2021</p>	<p>Study on the phytochemical estimation of the ethanolic extract from the aerial parts <i>W. x</i> “Bristol ruby” confirmed the presence of flavonoid, tannin, terpenoid and triterpenoid saponin, whereas alkaloid, steroid and cardiac glycoside were found to be absent. Total saponin content was resulted as 4.28%. The elucidation of saponin was obtained by various chromatographic methods. The structure of this saponin was established by 1D and 2D NMR data, combined with mass spectroscopy (ESI-MS) which further identified as Lonicerose A was also reported due to the data in literature which could be used to evaluate other biological activities on this compound. It could be concluded that this is the first report of phytochemical composition and total saponin analysis carried out on the aerial parts of <i>W. x</i> “Bristol ruby”.</p>
<p>KEYWORDS</p> <p><i>Weigela x</i> “Bristol ruby”</p> <p>Aerial parts</p> <p>Chemical estimation</p> <p>Saponin analysis</p> <p>Lonicerose A</p>	

NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN HÓA HỌC VÀ PHÂN TÍCH THÀNH PHẦN SAPONIN TỪ PHẦN THÂN LÁ CỦA LOÀI *W. X* “BRISTOL RUBY”

Nguyễn Đức Hùng*, Từ Quang Tân

Trường Đại học Sư phạm – ĐH Thái Nguyên

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
<p>Ngày nhận bài: 28/10/2021</p> <p>Ngày hoàn thiện: 20/12/2021</p> <p>Ngày đăng: 28/12/2021</p>	<p>Nghiên cứu về thành phần hóa học có trong cao chiết ethanol từ phần thân lá của loài <i>W. x</i> “Bristol ruby” cho kết luận về sự có mặt của các thành phần flavonoid, tannin, terpenoid và saponin triterpenoid, nhưng không có các thành phần alkaloid, steroid và glycoside tim. Saponin toàn phần trong mẫu thô có hàm lượng 4,28%. Nghiên cứu đã phân lập được một saponin bằng các phương pháp sắc ký khác nhau. Sau đó, từ dữ liệu về phổ cộng hưởng từ hạt nhân NMR kết hợp với phổ khối lượng (ESI-MS), cấu trúc hóa học của hợp chất này được xác định là Lonicerose A có phần aglycone dạng hederagenin. Nghiên cứu đã bàn luận về hoạt tính sinh học của hợp chất saponin này dựa trên cơ sở dữ liệu về hợp chất saponin, tạo cơ sở cho các đánh giá hoạt tính sinh học tiếp theo. Đây là lần đầu tiên thành phần hóa học và hàm lượng saponin toàn phần được đánh giá trên phần thân lá của loài <i>W. x</i> “Bristol ruby”.</p>
<p>TỪ KHÓA</p> <p><i>Weigela x</i> “Bristol ruby”</p> <p>Phần thân lá</p> <p>Thành phần hóa học</p> <p>Định lượng saponin</p> <p>Lonicerose A</p>	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.5210>

* Corresponding author. Email: hungnd@tnue.edu.vn

1. Đặt vấn đề

Chi *Weigela* thuộc họ Kim ngân (Caprifoliaceae) có khoảng 10 loài ban đầu phân bố chủ yếu ở Nhật Bản, Hàn Quốc, Trung Quốc; tuy nhiên, có hơn 200 loài đã được lai tạo [1], [2]. Nhiều loài trong số này được sử dụng với mục đích làm cảnh. Các nghiên cứu trước đây đã chỉ ra rằng, các hợp chất saponin phân lập từ một số loài thuộc chi *Weigela* như *W. subsessilis*, *W. x "kosteriana variegata"*, *W. stelzneri* và *W. florida* "Jean's gold" có hoạt tính sinh học mạnh mẽ như kháng viêm, kháng oxy hóa và hoạt tính gây độc trên một số dòng tế bào ung thư [1], [3]–[7]. Do đó, các loài thuộc chi *Weigela* có tiềm năng là nguồn cung cấp các hợp chất hóa học có hoạt tính sinh học. *W. x "Bristol ruby"* là một loài cây bụi, có vùng phân bố chủ yếu tại châu Âu. Nghiên cứu trước đó trên một số hợp chất saponin triterpenoid được phân lập từ phần rễ của loài thực vật này cho thấy có hoạt tính gây độc trên dòng tế bào ung thư đại trực tràng (CT26) [8]. Do đó, để hoàn thiện dữ liệu về phân loại theo hóa học (Chemotaxonomy) về các hợp chất saponin của chi *Weigela* và họ Kim ngân (Caprifoliaceae), nghiên cứu tiếp tục được tiến hành trên phần thân lá của loài *W. x "Bristol ruby"*.

Trong nghiên cứu này, thành phần hóa học có trong cao chiết ethanol của phần thân lá của loài *W. x "Bristol ruby"* được định tính bằng các phản ứng hóa học. Hàm lượng saponin toàn phần có trong cao chiết ethanol được xác định bằng phương pháp cân. Nghiên cứu tiến hành phân lập hợp chất saponin tách chiết từ cao chiết ethanol bằng các phương pháp sắc ký khác nhau, xác định cấu trúc hóa học của hợp chất này bằng các phương pháp phổ hiện đại, bao gồm phổ cộng hưởng từ hạt nhân 1 và 2 chiều (1D và 2D NMR), kết hợp với phổ khối lượng (ESI-MS). Đồng thời, hoạt tính sinh học của hợp chất saponin được thảo luận để có đánh giá tổng quan và định hướng nghiên cứu hoạt tính sinh học tiếp theo.

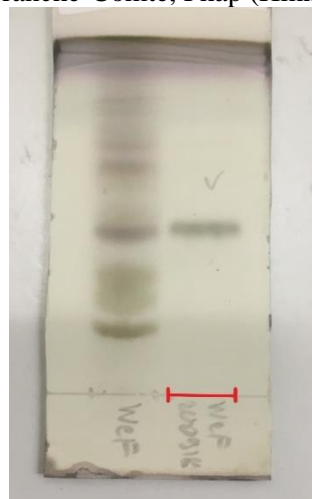
2. Đối tượng, phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Mẫu vật: Phần thân lá của loài *W. x "Bristol ruby"* thu được tại Jardiland®, Chenove, Pháp ở tọa độ 47°17'06,4"N, 5°01'28,1"E. Sau đó, mẫu vật được giám định theo phương pháp của Chase và cộng sự (2016) [9]. Mẫu tiêu bản được đánh số 20.160.110 và lưu giữ tại phòng thí nghiệm Laboratoire de Pharmacognosie, Université de Bourgogne Franche-Comté, Pháp (Hình 1).



Hình 1. Hình ảnh loài *W. x "Bristol ruby"*



Hình 2. HPTLC của hợp chất WeF200918

2.2. Hóa chất và thiết bị

Các dung môi bao gồm EtOH, MeOH, CHCl₃, EtOAc, HCl, H₂SO₄, NaOH, FeCl₃, CH₃COOH, *n*-BuOH đều đạt tiêu chuẩn kỹ thuật trước khi sử dụng. Thuốc thử Dragendorff và

Mayer được cung cấp bởi Sigma-Aldrich, Pháp. Sắc ký bản mỏng (TLC) và sắc ký bản mỏng hiệu năng cao (HPTLC) sử dụng pha thuận tráng silica gel 60F₂₅₄ (Merck, Đức). Sắc ký lỏng chân không (VLC) được thực hiện trên pha đảo silica gel RP-18, kích thước 70-200 μm (Silicycle, Canada). Chất hấp phụ của sắc ký cột (CC) là Sephadex[®] LH20 (Sigma Aldrich, Pháp). Sắc ký lỏng hiệu năng trung bình (MPLC) được thực hiện trên pha thuận silica gel 60, kích thước 15-40 μm (Merck, Đức), sử dụng cột sắc ký thủy tinh Büchi kích thước 460 mm x 25 mm, 460 mm x 15 mm và 110 mm x 15 mm. Thuốc thử vanilin/acid sunfuric (1% vanillin trong EtOH/H₂SO₄ 50/1).

Mẫu nghiên cứu được chiết bằng máy vi sóng MARS 6 (CEM[®], Mỹ). Cao chiết được phân tách trên hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng trung bình (MPLC), sử dụng bơm mẫu M305 (Gilson[®], Mỹ). Cao chiết và các phân đoạn saponin được đông khô bằng hệ thống đông khô chân không Heto Drywinner DW 6-55-1 (Thermo Fisher Scientific, Mỹ). Phổ cộng hưởng từ hạt nhân 1 và 2 chiều (1D and 2D NMR) được đo trên máy Varian INOVA 600 (Agilent Technologies[®], USA), trong đó phổ proton ¹H-NMR và phổ carbon ¹³C lần lượt được đo ở tần số 600 MHz và 150 MHz, sử dụng pyridine-*d*₅ là dung môi hòa tan. Hằng số tương tác (*J*) được tính theo đơn vị Hz và độ dịch chuyển hóa học (δ) được tính theo đơn vị ppm. Phổ khối lượng ion hóa phun mù điện tử (ESI-MS) được đo trên máy Bruker micrOTOF II mass spectrometer (Bruker[®], Đức).

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Phương pháp tạo cao chiết

Phần thân lá của loài *W. x* “Bristol ruby” được phơi khô và nghiền thành bột mịn (30g) được tiến hành tạo dịch chiết bằng phương pháp vi sóng với các điều kiện được thiết lập bao gồm nhiệt độ 60°C, công suất 200W, thời gian chiết 30 phút, chiết 3 lần sử dụng dung môi EtOH/H₂O (75/35) với 300 mL/lần. Sau đó, dịch chiết được loại bỏ dung môi bằng cô quay chân không và được loại bỏ nước còn tồn dư bằng phương pháp đông khô chân không, thu được cao chiết khô hoàn toàn (11,1 g).

2.3.2. Định tính thành phần hóa học

Thành phần hóa học của cao chiết ethanol từ phần thân lá của loài *W. x* “Bristol ruby” được định tính bằng các phản ứng hóa học, trong đó định tính alkaloid, flavonoid, tannin, steroid, terpenoid được thực hiện theo mô tả của Alqethami và cộng sự (2021) [10], định tính saponin và glycoside tim, một loại glycoside đặc biệt có tác dụng lên hoạt động của tim, được thực hiện theo mô tả của Traore và cộng sự (2015) [11]. Dịch chiết được chuẩn bị bằng cách hòa tan cao chiết trong 2 mL DMSO 10%.

- Định tính alkaloid (Hager test): Chuẩn bị 2 ống nghiệm, mỗi ống nghiệm 1 mL dịch chiết có thêm 2,5 mL H₂SO₄ 5%, sau đó lắc đều. Ống nghiệm 1 có nhỏ 2 giọt thuốc thử Dragendorff và ống nghiệm 2 nhỏ 2 giọt thuốc thử Mayer. Nếu trong ống nghiệm 1 xuất hiện màu cam và ống nghiệm 2 có kết tủa trắng thì kết luận trong dịch chiết có alkaloid.

- Định tính flavonoid (Shinoda test): Nhỏ vài giọt HCl đậm đặc và thêm ít bột Mg vào ống nghiệm chứa dịch chiết được hòa tan trong 10 mL CH₃OH. Nếu trong ống nghiệm có màu vàng, đỏ đến xanh thì kết luận trong dịch chiết có flavonoid.

- Định tính glycoside tim (Kellar-Kiliani test): Dung dịch A và B được chuẩn bị lần lượt gồm 100 mL acid acetic loãng 1% + 1 mL FeCl₃ 5% và 100 mL H₂SO₄ đậm đặc + 1 mL FeCl₃ 5%. Dịch chiết được bổ sung 1 mL dung dịch A, sau đó nhỏ thêm 1 mL dung dịch B. Nếu trong ống nghiệm có màu đỏ hoặc nâu thì kết luận trong dịch chiết có glycoside tim.

- Định tính tannin (Braymer test): Nhỏ vài giọt FeCl₃ 10% vào ống nghiệm chứa 2 mL dịch chiết. Nếu trong ống nghiệm có kết tủa màu xám xanh hoặc xanh thẫm thì kết luận trong dịch chiết có tannin.

- Định tính steroid (Liebermann – Burchardt test): Nhỏ vài giọt H₂SO₄ đậm đặc vào ống nghiệm chứa dịch chiết. Nếu trong ống nghiệm có màu tím đỏ xuất hiện ở phần giữa chất lỏng thì kết luận trong dịch chiết có steroid.

- Định tính terpenoid (Liebermann – Burchardt test): Nhỏ vào ống nghiệm chứa dịch chiết 2 mL chloroform, sau đó nhỏ thêm vài giọt H₂SO₄ đậm đặc. Nếu trong ống nghiệm có màu xanh xuất hiện ở phần giữa chất lỏng thì kết luận trong dịch chiết có terpenoid.

- Định tính saponin (Salkowski test): Chuẩn bị 2 ống nghiệm, mỗi ống nghiệm 1 mL dịch chiết. Sau đó, nhỏ vào ống nghiệm 1 và 2 lần lượt 5 mL HCl 0,1N và 5 mL NaOH 0,1N. Nếu bọt của ống nghiệm 2 bền hơn ống nghiệm 1 thì kết luận trong dịch chiết có saponin triterpenoid, ngược lại thì kết luận trong dịch chiết ethanol có saponin steroid.

2.3.3. Định lượng saponin toàn phần trong cao chiết

Hàm lượng saponin toàn phần trong cao chiết được thực hiện theo phương pháp của Namba và cộng sự (1974) dựa trên sự phân cực của các dung môi khác nhau [12]. Cụ thể, cao chiết được hòa tan hoàn toàn với H₂O và sau đó được lắc với n-BuOH theo tỷ lệ 1:1 (200 mL H₂O : 200 mL BuOH), lặp lại 3 lần. Dịch n-BuOH sau đó được thu thập và loại bỏ dung môi bằng cô quay chân không, thu được cặn chiết. Cặn chiết sau đó tiếp tục được đông khô bằng phương pháp đông khô chân không thu được saponin đông khô. Tinh sạch saponin đông khô bằng sắc ký CC, sử dụng chất hấp phụ là Sephadex[®] LH20 và dung môi là EtOH 96%, thu được saponin toàn phần. Cân và tính khối lượng saponin toàn phần trong nguyên liệu. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

Hàm lượng saponin toàn phần được tính theo công thức:

$$M = \frac{a}{b} \times 100$$

Trong đó:

M là hàm lượng saponin toàn phần (%), *a* là khối lượng saponin toàn phần (g) và *b* là khối lượng nguyên liệu thô ban đầu (g).

2.3.4. Phân lập và xác định cấu trúc của hợp chất saponin

Saponin toàn phần tiếp tục được phân đoạn bằng phương pháp MPLC pha thuận, sử dụng dung môi rửa giải CHCl₃/MeOH/H₂O với độ phân cực tăng dần (80/20/2, 75/25/3, 70/30/5, v/v/v) thu được 5 phân đoạn (A-E). Phân đoạn B tiếp tục được phân đoạn bằng MPLC pha thuận, sử dụng dung môi rửa giải CHCl₃/MeOH/H₂O 75/25/3 (v/v/v) thu được hợp chất saponin tinh sạch ký hiệu là **WeF200918** (8,0 mg) (Hình 2).

Hợp chất WeF200918: Bột màu trắng, phổ khối lượng ESI-MS [M + Na]⁺, m/z 1067,5394 (tương ứng với cấu trúc phân tử C₅₂H₈₄O₂₁Na, 1067,5403). Phổ proton ¹H NMR và phổ carbon ¹³C NMR lần lượt được đo ở tần số 600 MHz và 150 MHz, sử dụng dung môi hòa tan là pyridine-*d*₅, xem Bảng 3.

Cấu trúc của hợp chất WeF200918 được thực hiện bằng các phương pháp phân tích cấu trúc hiện đại, bao gồm phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) và phổ khối lượng (MS). Đồng thời, các phân tử đường của hợp chất được xác định bằng phương pháp thủy phân acid và cấu hình tuyệt đối của các phân tử đường được thực hiện theo mô tả của Nguyễn và cộng sự (2019) [8]. Theo đó, thủy phân hoàn toàn 3 mg hợp chất WeF200918 bằng 5 mL CF₃COOH trong 3 giờ ở nhiệt độ 95°C. Dung dịch sau đó được chiết bằng CH₂Cl₂ (5 mL/lần, lặp lại 3 lần). Dịch chiết sau đó được loại bỏ dung môi bằng cô quay chân không, sau đó phân tích bằng TLC, sử dụng pha động là dung môi CHCl₃/MeOH/H₂O 8/5/1 (v/v/v) và được so sánh với mẫu xác thực để xác định loại phân tử đường. Ngoài ra, các phân tử đường tiếp tục được hòa tan trong 100 μL anhydrous pyridine, sau đó bổ sung L-cysteine methyl ester hydrochloride (nồng độ 0,06 mol/L). Hỗn hợp sẽ được khuấy ở nhiệt độ 60°C trong 1 giờ, sau đó bổ sung 150 μL hexamethyldisilazane/trimethylchlorosilane tỷ lệ 3:1. Hỗn hợp tiếp tục được khuấy ở nhiệt độ 60°C trong 30 phút. Phần kết tủa sau khi được ly tâm sẽ được loại bỏ và phần nổi phía trên sẽ được cô đặc dưới dòng N₂. Phần cặn sẽ được phân đoạn lần lượt bằng 0,1 mL *n*-hexane và 1 mL H₂O. Sau đó, 1 μL phân hexane sẽ được phân tích bởi sắc ký khí (GC). Cấu hình tuyệt đối của

phân tử đường sẽ được xác định bằng cách so sánh thời gian lưu (retention time) với các dẫn xuất thiazolidine được điều chế theo cách tương tự từ đường chuẩn (Sigma-Aldrich, Pháp).

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Thành phần hóa học của phần thân lá loài *W. x "Bristol ruby"*

Kết quả định tính thành phần hóa học của phần thân lá loài *W. x "Bristol ruby"* được thể hiện trong Bảng 1.

Bảng 1. Thành phần hóa học trong cao chiết của loài *W. x "Bristol ruby"*

Nhóm chất	Thuốc thử	Hiện tượng	Kết luận
Alkaloid	H ₂ SO ₄ + Dragendorff	Không	Không có
	H ₂ SO ₄ + Mayer	Không	
Flavonoid	Mg + HCl	Màu vàng tới xanh	Có
Glycoside tim	CH ₃ COOH + FeCl ₃ + H ₂ SO ₄	Không	Không có
Tannin	FeCl ₃	Kết tủa xám	Có
Steroid	C ₂ H ₅ OH + H ₂ SO ₄	Không	Không có
Terpenoid	C ₂ H ₅ OH + CHCl ₃ + H ₂ SO ₄	Màu xanh	Có
Saponin triterpenoid	C ₂ H ₅ OH + HCl + NaOH	Bọt bền	Có

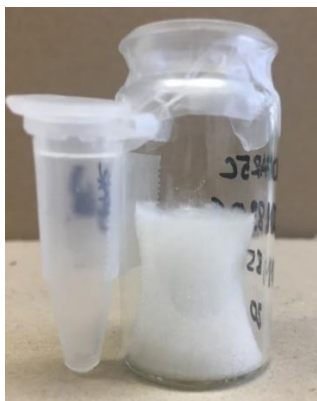
Thí nghiệm xác định thành phần alkaloid có trong phần thân lá loài *W. x "Bristol ruby"* cho kết quả không có kết tủa ở cả 2 ống nghiệm, do đó kết luận không có thành phần alkaloid trong phần thân lá loài *W. x "Bristol ruby"*. Kết luận này tương đồng với nghiên cứu trước đây của Raffauf (1996) về các loài thực vật có chứa thành phần alkaloid, trong đó có họ Kim ngân (Caprifoliaceae). Tác giả kết luận phần lớn trong số 365 loài thuộc 16 chi của họ Kim ngân được nghiên cứu không có thành phần alkaloid [13]. Định tính trong cao chiết có thành phần flavonoid do trong ống nghiệm xuất hiện màu vàng tới xanh bằng phản ứng Shinoda. Kết quả này trùng khớp với nghiên cứu của Chang (1997) trên 4 loài thuộc chi *Weigela*, kết luận về sự có mặt của thành phần flavonoid [14]. Thành phần tannin trong cao chiết được định tính bằng phản ứng Braymer cho kết quả xuất hiện màu xanh thẫm trong ống nghiệm. Nghiên cứu tiếp tục xác định thành phần saponin trong cao chiết bằng phản ứng Salkowski, kết quả cho thấy có bọt bền vững ở ống nghiệm 2, ngược lại ở ống nghiệm 1 có hiện tượng bọt tan nhanh. Do đó, kết luận trong cao chiết của loài *W. x "Bristol ruby"* có chứa thành phần saponin triterpenoid. Kết quả này trùng khớp với các nghiên cứu trước đây trên các loài *W. stelzneri*, *W. florida* "Pink Poppet", *W. florida* "Jean's Gold", *W. x 'kosteriana variegata'*, *W. florida* "rumba", *W. subsessilis* và *W. hortensis* [7]–[12], [15], [16]. Ngoài ra, thành phần terpenoid có trong cao chiết được xác định bằng phản ứng Liebermann – Burchardt cho kết quả xuất hiện màu xanh trong ống nghiệm. Tuy nhiên, các thành phần khác như steroid, glycoside tim đều cho phản ứng không rõ ràng, do đó trong cao chiết không có các nhóm steroid và glycoside tim.

3.2. Định lượng saponin toàn phần trong cao chiết

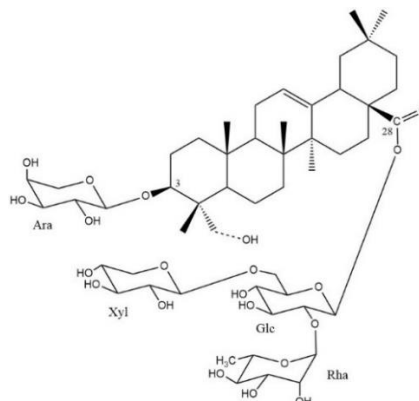
Sau khi tiến hành định tính các thành phần hóa học và xác định có thành phần saponin triterpenoid, nghiên cứu tiếp tục tiến hành định lượng hàm lượng saponin toàn phần có trong cao chiết ethanol từ phần thân lá của loài *W. x "Bristol ruby"*. Kết quả được thể hiện trong bảng 2 và hình 3.

Bảng 2. Kết quả xác định hàm lượng saponin toàn phần trong phần thân lá của loài *W. x "Bristol ruby"*

STT	Mẫu thân lá khô (g)	Cao chiết ethanol (g)	Saponin toàn phần (g)	Hàm lượng saponin toàn phần (%)	Giá trị trung bình (%)
1	30,0	11,1	1,22	4,07	4,28 ± 0,20
2	30,5	10,8	1,36	4,46	
3	31,3	12,1	1,35	4,31	



Hình 3. Saponin toàn phần thu được sau khi tinh sạch và đông khô chân không



Hình 4. Cấu trúc hóa học của hợp chất WeF200918

Đây là nghiên cứu đầu tiên về đánh giá hàm lượng saponin toàn phần trên chi *Weigela*. Hình 3 mô tả hình thái saponin sau khi được tinh sạch và đông khô chân không. Kết quả xác định hàm lượng saponin toàn phần trong phần thân lá của loài *W. x* “Bristol ruby” được thể hiện trong Bảng 3, sử dụng phương pháp cân của Namba và cộng sự [12]. Hàm lượng saponin toàn phần đạt 4,28%. Tuy nhiên, theo đánh giá Wang và cộng sự (2019), phương pháp tách chiết có ảnh hưởng tới hàm lượng saponin toàn phần [17]. Cụ thể, sử dụng phương pháp tách chiết áp suất lỏng cho hàm lượng saponin toàn phần (7,36%) cao hơn so với các phương pháp tách chiết khác như chiết Soxhlet (6,99%) và chiết ngâm dầm (Maceration) (6,0%). Do đó, cần tiến hành nghiên cứu khác để tối ưu phương pháp tách chiết hàm lượng saponin thành phần trong phần thân lá của loài *W. x* “Bristol ruby”.

3.3. Xác định cấu trúc hóa học của hợp chất WeF200918

Dữ liệu từ phổ ESI-MS cho kết quả một pic ion phân tử tại m/z 1067,5394 $[M + Na]^+$, từ đó kết luận khối lượng phân tử của hợp chất WeF200918 là 1044, tương ứng với công thức phân tử là $C_{52}H_{84}O_{21}$.

Phổ carbon ^{13}C trên vùng aglycone của hợp chất WeF200918 cho thấy có sự xuất hiện của 8 carbon bậc 4 (C), 5 carbon bậc 3 (CH), 11 carbon bậc 2 (CH_2) và 6 carbon bậc 1 (CH_3). Ngoài ra, 2 tín hiệu δ_C 124,0 và 145,4 gợi ý sự xuất hiện của 1 liên kết đôi tại vị trí 12 của phần aglycone. Tiếp tục nghiên cứu dữ liệu của phổ proton 1H NMR cho thấy có 6 tín hiệu dạng vạch đơn (signet) tại δ_H 0,82, 0,94, 1,05, 1,15, 0,79, 0,85, tương ứng với 6 tín hiệu CH_3 tại vị trí 24, 25, 26, 27, 29 và 30 của phần aglycone. Proton olefin tại δ_H 5,39 (1H, t-like, H-12) khẳng định sự có mặt của một liên kết đôi tại vị trí 12 của aglycone. Ngoài ra, từ dữ liệu của phổ proton 1H NMR còn cho các tín hiệu của nhóm oxymethine proton tại δ_H 4,15 (tương ứng với vị trí 3) và 1 tín hiệu của nhóm chức alcohol (OH) tại δ_H 3,55 và 4,16 (tương ứng với vị trí 23). Các tín hiệu từ phổ carbon ^{13}C và phổ proton 1H NMR trên cho thấy có sự trùng khớp với phân tín hiệu của vùng aglycone của khung hederagenin trước đó đã được mô tả trên một số hợp chất saponin tách chiết từ một số loài thuộc chi *Weigela* [1], [7]. Tín hiệu downfield tại δ_C 83,4 (C-3) và upfield tại δ_C 178,0 (C-28) gợi ý về cấu trúc của hợp chất WeF200918 có dạng glycosid 2 mạch đường.

Quan sát trên phổ NMR 2 chiều HSQC cho thấy có sự xuất hiện của 4 proton anomeric tại δ_H 4,78 (d, $J = 7,0$ Hz), 4,93 (d, $J = 7,0$ Hz), 6,02 (d, $J = 8,2$ Hz), 6,35 (br s) và 4 carbon tương ứng tại δ_C 106,5, 107,6, 96,0, 102,7. Tiếp tục nghiên cứu trên các phổ NMR 2 chiều khác gồm HMBC, COSY, TOCSY và ROESY, kết hợp với kết quả thủy phân acid đưa ra kết luận về sự có mặt của 4 phân tử đường gồm α -L-arabinopyranosyl (Ara), α -L-rhamnopyranosyl (Rha), β -D-xylopyranosyl (Xyl) và β -D-glucopyranosyl (Glc). Cấu hình tuyệt đối của các phân tử đường được xác định là D cho Glc và Xyl, L cho Ara và Rha bằng phân tích GC. Giá trị hằng số tương

tác (*J*) giữa 2 phân tử proton H-1 và H-2 của phân tử đường Ara, Glc và Xyl trong khoảng 5,0-8,2 Hz xác định dạng β anomeric cho phân tử đường Glc và Xyl, và dạng α anomeric cho phân tử đường Ara. Ngoài ra, giá trị hằng số tương tác giữa phân tử proton H-1 và carbon C-1 trong khoảng 165-168 Hz đã xác định dạng α -pyranoid anomeric của phân tử đường Rha.

Chuỗi oligosaccharide của hợp chất WeF200918 được thiết lập dựa trên phân tích phổ NMR 2 chiều HMBC và ROESY. Cụ thể, tương tác HMBC giữa δ_H 4,93 (Ara H-1) và δ_C 83,4 (algycone C-3), và tương tác ROESY giữa δ_H 4,93 (Ara H-1) và δ_H 4,15 (algycone H-3) khẳng định phân tử đường Ara liên kết vào vị trí C-3 của phần aglycone. Tín hiệu upfield tại δ_C 96,0 (Glc C-1) và tín hiệu upfield tại δ_C 178,0 (algycone C-28) chứng minh sự xuất hiện của một liên kết ester giữa phân tử đường Glc vào vị trí C-28 của phần aglycone [18]. Phân tử đường Rha được xác định liên kết vào vị trí C-2 của phân tử đường Glc qua tương tác HMBC giữa δ_H 6,35 (Rha H-1) và δ_C 77,1 (Glc C-2) và tương tác ROESY giữa δ_H 6,35 (Rha H-1) và δ_H 4,27 (Glc H-2). Ngoài ra, tương tác HMBC giữa δ_H 4,78 (Xyl H-1) và δ_C 70,0 (Glc C-6) và tương tác ROESY giữa δ_H 4,78 (Xyl H-1) và δ_H 4,19 (Glc H-6) khẳng định sự liên kết của phân tử đường Xyl vào vị trí C-6 của phân tử đường Glc.

Từ những dẫn chứng trên thiết lập được cấu trúc hóa học của hợp chất WeF200918 là 3-*O*- α -L-arabinopyranosylhederagenin 28-*O*- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 6)-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)]- β -D-glucopyranosyl ester (Loniceroside A) (hình 4). Hợp chất này lần đầu tiên được phân lập từ phần thân lá của loài *Lonicera japonica* [19].

Bảng 3. Dữ liệu phổ 1H và ^{13}C -NMR của hợp chất WeF200918

Carbon	Phần aglycone			Phần đường	
	δ_C (ppm)	δ_H (Hz)		δ_C (ppm)	δ_H (Hz)
1	40,0	0,96 m, 1,51 m	Ara-1	107,6	4,93 d (7,0)
2	27,3	1,92 m, 2,16 m	2	74,1	4,37
3	83,4	4,15	3	75,7	4,08
4	44,6	-	4	70,8	4,22
5	48,8	1,58 d (11,7)	5	68,0	3,68 dd (11,1, 1,2), 4,21
6	19,5	1,32, 1,63	Rha-1	102,7	6,35 br s
7	34,1	1,62, 1,64	2	73,1	4,72 br s
8	41,2	-	3	73,8	4,48 dd (9,3, 2,9)
9	49,4	1,70	4	74,8	4,28 dd (9,9, 9,3)
10	38,2	-	5	71,2	4,42 dq (9,9, 6,4)
11	25,1	1,85, 1,95	6	20,0	1,67 d (6,4)
12	124,0	5,39 t-like	Xyl-1	106,5	4,78 d (7,0)
13	145,4	-	2	75,8	3,89
14	43,5	-	3	78,9	4,07
15	29,8	1,44, 1,95	4	72,1	4,11
16	24,6	1,95, 2,08	5	68,1	3,56, 4,22
17	47,6	-	Glc-1	96,0	6,02 d (8,2)
18	43,2	3,08	2	77,1	4,27
19	47,6	1,14, 1,68	3	80,2	4,17
20	31,9	-	4	71,9	4,26
21	35,2	1,09 m, 1,27 m	5	78,7	4,00
22	33,5	1,74, 1,97	6	70,0	4,19, 4,55
23	65,4	3,55, 4,16			
24	14,8	0,82 s			
25	17,5	0,94 s			
26	18,8	1,05 s			
27	25,1	1,15 s			
28	178,0	-			
29	34,4	0,79 s			
30	25,1	0,85 s			

Hoạt tính gây độc của hợp chất Loniceroside A không có hiệu quả các dòng tế bào ung thư đại tràng (SW480, CT26), ung thư hắc tố (B16) và ung thư gan (HepG2) [1], [7]. Điều này có thể được giải thích do trong phần algycone dạng hederagenin có sự xuất hiện của nhóm alcohol (OH) tại vị trí C-3 và sự ester hóa tại vị trí C-28 của phần aglycone đã vô hiệu hoạt tính gây độc của hợp chất này đối với các dòng ung thư trên. Kết luận này cũng đồng nhất với nhận định của Bang và cộng sự (2005) về sự vô hiệu hóa của một số saponin triterpenoid có phần aglycone dạng hederagenin phân lập từ loài *Pulsatilla koreana* [20]. Tuy nhiên, theo đánh giá của Lee và cộng sự (1995) về hoạt tính kháng viêm của các hợp chất saponin triterpenoid tách chiết từ loài *Lonicera japonica* cho thấy, các hợp chất có phần aglycone dạng hederagenin thể hiện hoạt tính kháng viêm mạnh đối với một số bệnh viêm cấp tính và mãn tính khi so sánh với đối chứng dương là aspirin [21]. Do đó, đây là cơ sở để tiếp tục tiến hành các đánh giá hoạt tính sinh học khác, từ đó có kết luận tổng quan về hoạt tính sinh học của hợp chất Loniceroside A nói riêng và của các saponin triterpenoid có phần aglycone là hederagenin nói chung.

4. Kết luận

Nghiên cứu định tính thành phần hóa học có trong cao chiết ethanol của phần thân lá loài *W. x "Bristol ruby"* cho thấy có các thành phần flavonoid, tannin, terpenoid và saponin triterpenoid, nhưng không có các thành phần alkaloid, glycoside tim và steroid. Tiến hành định lượng hàm lượng saponin toàn phần trong cao chiết thu được kết quả 4,28% từ mẫu thô ban đầu. Hợp chất saponin triterpenoid Loniceroside A đã được phân lập và xác định cấu trúc dựa trên dữ liệu phổ cộng hưởng từ hạt nhân và phổ khối lượng. Nghiên cứu đề xuất cần tiếp tục tiến hành đánh giá các hoạt tính sinh học khác để có kết luận tổng quan về hợp chất saponin triterpenoid có phần algycone dạng hederagenin, tạo cơ sở cho các nghiên cứu hoạt tính sinh học tiếp theo về dạng hợp chất này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] A. Rezgui, A. -C. Mitaine-Offer, T. Miyamoto, C. Tanaka, S. Delemasure, P. Dutartre, and M. -A. Lacaille-Dubois, "Oleanolic acid and hederagenin glycosides from *Weigela stelzneri*," *Phytochemistry*, vol. 123, pp. 40-47, 2016, doi: 10.1016/j.phytochem.2015.12.016.
- [2] The Angiosperm Phylogeny Group, "Angiosperm Phylogeny Group III (APG III). An update of The Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. Botanical Journal of the Linnean Society," *Bot. J. Linn. Soc.*, vol. 161, pp. 105-121, Oct. 2009, doi: 10.1111/j.1095-8339.2009.00996.x.
- [3] Y. -M. Won, Z. -K. Seong, J. -L. Kim, H. -S. Kim, H. -H. Song, D. -Y. Kim, J. -H. Kim, S. -R. Oh, H. -W. Cho, J. -H. Cho, and H. -K. Lee, "Triterpene glycosides with stimulatory activity on melanogenesis from the aerial parts of *Weigela subsessilis*," *Arch. Pharm. Res.*, vol. 38, no. 8, pp. 1541-1551, Aug. 2015, doi: 10.1007/s12272-014-0524-0.
- [4] P. T. Thuong, B. -S. Min, W. Jin, M. Na, J. Lee, R. Seong, Y. -M. Lee, K. Song, Y. Seong, H. -K. Lee, K. Bae, and S. S. Kang, "Anti-complementary activity of ursane-type triterpenoids from *Weigela subsessilis*," *Biol. Pharm. Bull.*, vol. 29, no. 4, pp. 830-833, 2006, doi: 10.1248/bpb.29.830.
- [5] Y. C. Yoo, G. W. Lee, and Y. H. Cho, "Antioxidant and anti-inflammatory effects of extracts from the flowers of *Weigela subsessilis* on RAW 264.7 Macrophages," *J. Life Sci.*, vol. 26, no. 3, pp. 338-345, Mar. 2016, doi: 10.5352/JLS.2016.26.3.338.
- [6] N. Andriamisaina, A. -C. Mitaine-Offer, B. Pruvot, J. Chluba, T. Miyamoto, C. Tanaka, and M. -A. Lacaille-Dubois, "Phytochemistry of *Weigela x 'kosteriana variegata'* (Caprifoliaceae)," *Nat. Prod. Commun.*, vol. 13, no. 4, pp. 403-406, Jan. 2018, doi: 10.1177/1934578X1801300406.
- [7] D. H. Nguyen, A. -C. Mitaine-Offer, T. Miyamoto, C. Tanaka, P. -S. Bellaye, B. Collin, O. Chambin, and M. -A. Lacaille-Dubois, "Phytochemical analysis of two *Weigela florida* cultivars, 'Pink Poppet' and 'Jean's Gold,'" *Phytochem. Lett.*, vol. 37, pp. 85-89, 2020, doi: 10.1016/j.phytol.2020.04.009.
- [8] D. H. Nguyen, A. -C. Mitaine-Offer, S. Maroso, A. -M. Papini, T. Paululat, P. -S. Bellaye, B. Collin, O. Chambin, and M. -A. Lacaille-Dubois, "Cytotoxic glycosides from the roots of *Weigela x 'Bristol Ruby'*," *Fitoterapia*, vol. 137, p. 104242, Sep. 2019, doi: 10.1016/J.Fitote.2019.104242.

- [9] A. N. Sennikov, D. E. Soltis, D. J. Mabberley, J. W. Byng, M. F. Fay, M. J. M. Christenhusz, M. W. Chase, P. F. Stevens, P. S. Soltis, W. S. Judd, and T. A. P. Group, "An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV," *Bot. J. Linn. Soc.*, vol. 181, no. 1, pp. 1-20, Apr. 2016, doi: 10.1111/boj.12385.
- [10] A. Alqethami and A. Y. Aldhebiani, "Medicinal plants used in Jeddah, Saudi Arabia: Phytochemical screening," *Saudi J. Biol. Sci.*, vol. 28, no. 1, pp. 805–812, 2021, doi: 10.1016/j.sjbs.2020.11.013.
- [11] L. Traore, Y. Bekro, J. Pirat, and J. A. Mamyrebeva-bekro, "Study of crude extracts from *Cassia sieberiana* root bark and *Khaya grandifoliola* trunk bark: Phytochemical screening, quantitative analysis and radical scavenging activity," *Int. J. Curr. Pharm. Res.*, vol. 7, no. 3 SE-Original Article(s), pp. 22-26, Jul. 2015.
- [12] T. Namba, M. Yóhizaki, T. Tomirori, K. Kobashi, K. Mitsui, and J. Hase, "Fundamental Studies on the Evaluation of the Crude Drugs. III. Chemical and Biochemical Evaluation of Ginseng and Related Crude Drugs," *Yakugaki Zasshi*, vol. 94, no. 2, pp. 252-260, 1974. doi: 10.1248/yakushi1947.94.2_252.
- [13] R. F. Raffauf, *Plant alkaloids: a guide to their discovery and distribution*. New York: Food Products Press, 1996.
- [14] C. -S. Chang, "Flavonoid chemistry of *Weigela* (Caprifoliaceae) in Korea," *J. Plant Res.*, vol. 110, no. 2, pp. 275-281, 1997, doi: 10.1007/BF02509316.
- [15] T. Murayama, A. Kasahara, Y. Shiono, and M. Ikeda, "Structure elucidation of a triterpene glycoside isolated from *Weigela hortensis*," *Nat. Med.*, vol. 57, no. 5, pp. 181-184, 2003.
- [16] A. -S. Champy-Tixier, A. -C. Mitaine-Offer, F. Real Fernández, T. Miyamoto, C. Tanaka, A. -M. Papini, and M. -A. Lacaille-Dubois, "Oleanane-type glycosides from the roots of *Weigela florida* 'rumba' and evaluation of their antibody recognition," *Fitoterapia*, vol. 128, pp. 198-203, 2018, doi: 10.1016/j.fitote.2018.04.017.
- [17] Q. -Y. Wang, X. Dong, J. Yang, Y. -H. Hu, L. -Q. Peng, H. Zheng, and J. Cao, "Vesicle based ultrasonic-assisted extraction of saponins in *Panax notoginseng*," *Food Chem.*, vol. 303, p. 125394, 2020, doi: 10.1016/j.foodchem.2019.125394.
- [18] Q. Zheng, K. Koike, L. -K. Han, H. Okuda, and T. Nikaido, "New biologically active triterpenoid saponins from *Scabiosa tschiliensis*," *J. Nat. Prod.*, vol. 67, no. 4, pp. 604-613, Apr. 2004, doi: 10.1021/np0304722.
- [19] K. Ho Son, K. Young Jung, H. Wook Chang, H. Pyo Kim, and S. Sik Kang, "Triterpenoid saponins from the aerial parts of *Lonicera japonica*," *Phytochemistry*, vol. 35, no. 4, pp. 1005-1008, 1994. doi: 10.1016/S0031-9422(00)90656-3.
- [20] S. -C. Bang, J. -H. Lee, G. -Y. Song, D. -H. Kim, M. -Y. Yoon, and B. -Z. Ahn, "Antitumor activity of *Pulsatilla koreana* saponins and their structure-activity relationship," *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, vol. 53, no. 11, pp. 1451-1454, Nov. 2005.
- [21] S. J. Lee, E. J. Shin, K. H. Son, H. W. Chang, S. S. Kang, and H. P. Kim, "Anti-inflammatory activity of the major constituents of *Lonicera japonica*," *Arch. Pharm. Res.*, vol. 18, no. 2, p. 133, 1995, doi: 10.1007/BF02979147.