



DOI:10.22144/ctujos.2024.351

## NGHIÊN CỨU PHÂN LẬP CÁC HỢP CHẤT KHÁNG VIÊM TỪ CAO CHIẾT PHÂN ĐOẠN N-HEXANE CỦA SA SÂM NAM (*Launaea sarmentosa*)

Nguyễn Quốc Châu Thanh<sup>1,2\*</sup>, Võ Thành Khang<sup>2,3</sup>, Nguyễn Hữu Khiêm<sup>2,3</sup>, Tạ Thanh Hồng<sup>1,3</sup>, Hà Thị Kim Quy<sup>1</sup> và Nguyễn Thị Hồng<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ

<sup>2</sup>Phòng thí nghiệm Thử nghiệm Sinh học, Tòa nhà Công nghệ cao, Trường Đại học Cần Thơ

<sup>3</sup>Phòng thí nghiệm Hóa dược, Tòa nhà Công nghệ cao, Trường Đại học Cần Thơ

\*Tác giả liên hệ (Corresponding author): [nqcthanh@ctu.edu.vn](mailto:nqcthanh@ctu.edu.vn)

### Thông tin chung (Article Information)

Nhận bài (Received): 14/03/2024

Sửa bài (Revised): 07/05/2024

Duyệt đăng (Accepted): 14/06/2024

**Title:** Study on isolation of anti-inflammatory compounds from n-hexane extract of *Launaea sarmentosa*

**Author(s):** Nguyen Quoc Chau Thanh<sup>1,2\*</sup>, Vo Thanh Khang<sup>2,3</sup>, Nguyen Huu Khiem<sup>2,3</sup>, Ta Thanh Hong<sup>1,3</sup>, Ha Thi Kim Quy<sup>1</sup> and Nguyen Thi Hong<sup>1</sup>

**Affiliation(s):** Can Tho University

### TÓM TẮT

Nghiên cứu này phân lập và đánh giá hoạt tính kháng viêm của 3 hợp chất từ cao chiết phân đoạn n-hexane của Sa sâm nam (*Launaea sarmentosa*) thông qua khả năng trung hòa gốc tự do nitric oxide (NO) và ức chế sản phẩm NO từ mô hình đại thực bào RAW264.7 được kích thích bởi LPS. Kết quả cho thấy hợp chất 3 (lutein) thể hiện khả năng ức chế NO cao nhất với giá trị  $IC_{50}$  lần lượt là 23,65 và 29,23  $\mu\text{g/ml}$ . Cấu trúc của các hợp chất được xác định là hỗn hợp của stigmasterol và  $\beta$ -sitosterol (1), daucosterol (2) và lutein (3) dựa trên cơ sở phân tích dữ liệu phổ 1D, 2D-NMR, kết hợp với so sánh các dữ liệu phổ đã được công bố. Trong đó, lutein lần đầu tiên được phân lập ở loài Sa sâm nam.

**Từ khóa:** Kháng viêm, phân lập, RAW264.7, nitric oxide, Sa sâm nam

### ABSTRACT

In this study, anti-inflammatory compound was isolated and evaluated from n-hexane extract of *Launaea sarmentosa* via nitric oxide (NO) radical scavenging activity and the NO inhibition on RAW264.7 macrophages in LPS-stimulated. Results showed that compound 3 (lutein) exerted its activity through NO inhibition with  $IC_{50}$  values of 23,65 and 29,23  $\mu\text{g/mL}$ , respectively. Their chemical structures were determined using 1D, 2D-NMR spectroscopy in comparison with previous studies, including a mixture of stigmasterol and  $\beta$ -sitosterol (1), daucosterol (2), and lutein (3). Besides, lutein is reported for the first time from *L. Sarmentosa*.

**Keywords:** Anti-inflammatory, isolation, RAW264.7, nitric oxide, *Launaea sarmentosa*

## 1. GIỚI THIỆU

Trong những năm gần đây, nhiều sản phẩm có nguồn gốc tự nhiên, đặc biệt là các cây dược liệu dân gian đã được sử dụng một cách rộng rãi trong y học nhờ công dụng chữa bệnh đa dạng của chúng (Đức,

2011; Phong và ctv., 2024). Các dược chất chiết xuất từ cây dược liệu thường được tin dùng bởi độ an toàn trong điều trị cao cũng như ít gây tác dụng phụ. Ở các loài thực vật, quá trình sinh tổng hợp những hợp chất hóa học diễn ra liên tục theo những chu trình được thiết lập sẵn, các hợp chất này vừa là sản phẩm

cấu thành các mô vừa là các chất chuyển hóa thứ cấp giúp duy trì sự sống, sự đa dạng về khung cấu trúc các hợp chất thiên nhiên phần lớn quyết định hoạt tính sinh học khác nhau ở mỗi loài dược liệu (Thao et al., 2015). Chính vì lẽ đó, dược liệu dân gian đã trở thành hướng nghiên cứu quan trọng trong việc tìm kiếm các chất có hoạt tính sinh học cao để bào chế thực phẩm chức năng hoặc phát triển các loại thuốc mới.

Sa sâm nam (*Launaea sarmentosa*) là một loại thảo dược quý, phân bố chủ yếu ở vùng ven biển và các đảo lớn, từ Quảng Ninh, Hải Phòng vào đến Đồng Nai, các vùng ven biển phía Nam Trung Quốc (Đảo Hải Nam), Ấn Độ, Ai Cập và một số nơi ở châu Phi. Các nghiên cứu trước đây trên Sa sâm nam cho thấy sự hiện diện của nhiều hợp chất như polyphenol, flavonoid, saponin, alkaloid, tannin và steroid (Them et al., 2018). Các hợp chất này thể hiện hoạt tính kháng viêm, kháng khuẩn, kháng oxy hóa và bảo vệ gan rất tốt (Golam et al., 2014; Them et al., 2018). Đặc biệt, theo một nghiên cứu trước đây đã khẳng định khả năng kháng viêm của cao chiết methanol Sa sâm nam trên mô hình đại thực bào RAW264.7 (Thanh et al., 2018). Nghiên cứu trên đã bước đầu cho thấy tiềm năng lớn trong việc hỗ trợ điều trị các bệnh liên quan đến viêm của Sa sâm nam.

Viêm là hàng loạt các chuỗi phản ứng tự nhiên của cơ thể để chống lại sự tấn công của những yếu tố tác động từ bên ngoài hoặc những rối loạn nội sinh, bao gồm các phản ứng sinh học vô cùng phức tạp, góp phần duy trì cân bằng nội môi trong cơ thể người. Việc biểu hiện quá mức trạng thái viêm trong cơ thể sẽ dẫn đến các biến chứng nguy hiểm về tim mạch, xương khớp, hệ miễn dịch,... (Huynh et al., 2019; He et al., 2023). Viêm cũng được coi là nguyên nhân gây ra nhiều bệnh khác nhau, chẳng hạn như xơ vữa động mạch, ung thư, hen suyễn và một số rối loạn bệnh lý thần kinh, chẳng hạn như bệnh Alzheimer hoặc bệnh Parkinson (Sharma et al., 2007; Visavadiya et al., 2012; Bath et al., 2021). Việc sản xuất quá mức các cytokine gây viêm đóng vai trò quan trọng trong các bệnh viêm nhiễm, bao gồm yếu tố hoại tử (TNF- $\alpha$ ); interleukin (IL)-1 $\beta$  và IL-6; và các chất trung gian gây viêm, bao gồm các loại oxygen phản ứng (ROS), nitric oxide (NO), và prostaglandin E2 (PGE2); được tạo ra bởi enzyme iNOS và cyclooxygenase-2 (COX-2) trong đại thực bào (Huynh et al., 2019; Thanh et al., 2020; Shang et al., 2023). Vì vậy, việc đánh giá khả năng ức chế các chất trung gian gây viêm của các hoạt chất có thể phản ánh chính xác mức độ của quá trình viêm, làm tiền đề để đánh giá tác động của các tác nhân trị

liệu này trong việc hỗ trợ điều trị các hội chứng liên quan đến viêm.

Chính vì thế, mô hình đại thực bào nuôi cấy RAW264.7 được áp dụng đáp ứng viêm thông qua việc kích thích bằng lipopolysaccharide (LPS) (nội độc tố ở vách của các vi khuẩn Gram âm kích hoạt các con đường tín hiệu quan trọng điều hòa các phản ứng viêm). Quá trình viêm dễ dàng nhận biết được thông qua việc tế bào sản sinh quá mức lượng nitric oxide (NO). Khả năng kháng viêm của các hợp chất phân lập được từ cao phân đoạn *n*-hexane của cây Sa sâm nam được đánh giá thông qua hoạt động ức chế sản sinh chất trung gian gây viêm này. Đồng thời, cấu trúc các hợp chất bằng phân tích dữ liệu phổ 1D, 2D-NMR cũng được nghiên cứu sâu.

## 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Hóa chất và thuốc thử

Hóa chất: Dimethyl sulfoxide (Sigma-Aldrich, Thụy Sĩ), Griess-reagent (FUJIFILM-Wako, Nhật Bản), Sodium nitroprusside (Sigma-Aldrich, Thụy Sĩ), Sodium nitrite (Xilong, Trung Quốc), Lipopolysaccharide (FUJIFILM-Wako, Nhật Bản), Dulbecco's Modified Eagle Medium (Sigma-Aldrich, Thụy Sĩ), Fetal Bovine Serum (Gibco, Anh), Penicillin-streptomycin (Sigma-Aldrich, Thụy Sĩ), CCK-8 Kit (Dojindo, Nhật Bản), N-Nitro-L-arginine methyl ester (Sigma-Aldrich, Thụy Sĩ), Curcumin (Sigma-Aldrich, Thụy Sĩ), Phosphate Buffer Saline Solution pH 7.4 (Biosharp, Trung Quốc).

Dung môi hữu cơ: *n*-hexane, ethyl acetate, methanol, chloroform (Chemsol, Việt Nam).

### 2.2. Nguyên liệu

Sa sâm nam được thu hái tại xã Thạnh Hải, huyện Thạnh Phú, tỉnh Bến Tre, Việt Nam. Mẫu được định danh và lưu trữ tại Bộ môn Sinh học, Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ. Nguyên liệu tươi được xử lý, sau đó sấy khô ở nhiệt độ 55°C. Sau khi sấy khô, nguyên liệu được nghiền nhuyễn và bảo quản ở nhiệt độ 4°C. Độ ẩm dược liệu được xác định với kết quả là 5,08±0,99% theo hướng dẫn của Dược điển Việt Nam V (Bộ Y tế, 2017).

Bột nguyên liệu (7,5 kg) được tiến hành ngâm dầm trong dung môi methanol trong 24 giờ. Dịch chiết được cô quay dưới áp suất kém thu được 950 g cao chiết methanol Sa sâm nam.

Chiết lỏng-lỏng cao methanol Sa sâm nam với *n*-hexane. Dịch chiết được cô quay dưới áp suất kém thu được 246 g cao phân đoạn *n*-hexane.

Sau đó, cao phân đoạn được tiến hành sàng lọc hoạt tính kháng viêm dựa trên hoạt động trung hòa hoặc ức chế sản sinh gốc tự do (sản phẩm) nitric oxide theo hai mô hình thử nghiệm sinh học được mô tả (mục 2.4 và 2.5). Kết quả cho thấy cao phân đoạn *n*-hexane thể hiện khả năng trung hòa gốc tự do NO được giải phóng bởi sodium nitroprusside và khả năng ức chế sản sinh gốc tự do nitric oxide trên mô hình đại thực bào RAW264.7, dựa trên cơ sở này cao phân đoạn *n*-hexane được dùng trong các thí nghiệm tiếp theo.

### 2.3. Phân lập các hợp chất từ cao phân đoạn *n*-hexane Sa sâm nam

Cao phân đoạn *n*-hexane (246 g) được tách bằng sắc ký cột trên silica gel, rửa giải bằng *n*-hexane: ethyl acetate: methanol (100:0:0 đến 0:0:100) để thu được 18 phân đoạn (H1-H18). Phân đoạn H3 (8,55 g) được chia thành 5 phân đoạn nhỏ bằng silica gel, rửa giải bằng *n*-hexane: ethyl acetate (100:0 đến 0:100). Phân đoạn H3.2 (478 mg) được xử lý nhiều lần bằng sắc ký cột silica gel để thu được hợp chất **1** (81 mg, rửa giải bằng *n*-hexane: chloroform, 70:30). Phân đoạn H5 (13 g) được tách bằng sắc ký cột silica gel nhiều lần để thu được hợp chất **3** (54 mg, rửa giải bằng *n*-hexane: ethyl acetate, 90:10). Phân đoạn H18 (47 g) xuất hiện kết tinh màu trắng lẫn nhiều tạp chất. Tiến hành sắc ký cột silica gel và kết tinh nhiều lần trong các dung môi khác nhau để thu được 73 mg hợp chất **2** (rửa giải bằng chloroform: methanol, 85:15).

Hợp chất **1** có dạng tinh thể hình kim, màu trắng trong. <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ, ppm, J/Hz): 5,36 (*brt*, *J* = 5,4 Hz, *J* = 1,8 Hz, H-6); 5,17 (*dd*, *J* = 15,0 Hz; *J* = 8,4 Hz, H-22b); 5,04 (*dd*, *J* = 15 Hz; *J* = 8,4 Hz, H-23b); 3,52 (*brs*, H-3); 1,02 (*d*, *J* = 7,2 Hz, H-21b); 1,01 (*s*, H-19); 0,92 (*d*, *J* = 6,6 Hz, H-21a); 0,86 (*t*, *J* = 4,2 Hz, H-29); 0,84 (*d*, *J* = 4,8 Hz, H-28a); 0,83 (*m*, H-28b); 0,82 (*s*, H-26a); 0,81 (*d*, *J* = 6,5 Hz, H-27a); 0,79 (*d*, *J* = 6,5 Hz, H-27b); 0,70 (*s*, H-18a); 0,68 (*s*, H-18b). <sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ, ppm): 140,8 (C-5); 138,3 (C-22b); 129,3 (C-23b); 121,7 (C-6); 71,8 (C-3); 56,9 (C-14b); 56,8 (C-14a); 56,1 (C-17a); 56,0 (C-17b); 51,3 (C-24b); 50,2 (C-9a); 50,1 (C-9b); 45,9 (C-24b); 42,3 (C-13); 42,2 (C-4); 39,8 (C-12b); 39,7 (C-12a); 37,3 (C-1); 36,5 (C-10); 36,2 (C-20); 34,0 (C-22a); 31,9 (C-7); 31,9 (C-8); 31,9 (C-25b); 31,7 (C-2); 29,2 (C-25a); 28,9 (C-16a); 28,3 (C-16b); 26,1 (C-23a); 25,4 (C-28b); 24,4 (C-15a); 24,3 (C-15b); 23,1 (C-28a); 21,2 (C-11); 21,1 (C-21b); 19,8 (C-26); 19,4 (C-19b); 19,1

(C-27); 19,0 (C-19a); 18,8 (C-21a); 12,2 (C-29b); 2,1 (C-29a); 12,0 (C-18a); 11,9 (C-18b).

Hợp chất **2** có dạng bột, màu trắng. <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ, ppm, J/Hz): 5,33 (*brt*, *J* = 4,8 Hz, *J* = 1,8 Hz, H-6); 4,23 (*d*, *J* = 7,8 Hz, H-1'); 3,66 (*m*, H-3); 3,61 (*m*, H-6'); 3,47 (*m*, H-5'); 3,39 (*m*, H-6'); 3,15 (*m*, H-3'); 3,02 (*m*, H-4'); 2,92 (*m*, H-2'); 2,38 (*m*, H-12a); 2,13 (*m*, H-12b); 1,26 (*m*; 3,0 Hz, H-19); 0,65 (*s*, H-18). <sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ, ppm): 140,4 (C-5); 121,1 (C-6); 100,8 (C-1'); 76,9 (C-3); 76,74 (C-5'); 76,69 (C-3'); 73,4 (C-2'); 70,1 (C-4'); 61,1 (C-6'); 56,1 (C-17); 55,4 (C-14); 49,6 (C-8); 45,1 (C-24); 41,8 (C-13); 39,9 (C-12); 39,8 (C-4); 38,3 (C-10); 36,8 (C-1); 36,2 (C-9); 35,4 (C-20); 33,3 (C-22); 31,4 (C-7); 29,2 (C-16); 28,7 (C-27); 27,7 (C-2); 25,4 (C-23); 23,8 (C-15); 22,6 (C-25); 20,6 (C-11); 19,7 (C-21); 19,1 (C-19); 19,0 (C-28); 18,6 (C-29); 11,7 (C-26); 11,6 (C-18).

Hợp chất **3** có dạng bột, màu đỏ cam. <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ, ppm, J/Hz): 6,66 (*m*, *ovl*, H-11, H-15, H-11', H-15'); 6,37 (*m*, *ovl*, H-12, H-12'); 6,28 (*m*, *ovl*, H-14, H-14'); 6,16 (*m*, *ovl*, H-7, H-8, H-10, H-8', H-10'); 5,54 (*s*, H-4'); 5,45 (*dd*, *J* = 15,6 Hz, *J* = 9,6 Hz, H-7'); 4,25 (*s*, H-3'); 4,02 (*m*, H-3); 2,41 (*d*, *J* = 10,2 Hz, H-6'); 2,07 (*dd*, *J* = 16,8 Hz, *J* = 9,6 Hz, H-4); 1,97 (*s*, *ovl*, H-19, H-20'); 1,96 (*s*, H-20); 1,91 (*s*, H-19'); 1,86 (*dd*, *J* = 13,2 Hz, *J* = 6 Hz, H-2b); 1,79 (*m*, H-2b'); 1,74 (*s*, H-18); 1,63 (*s*, H-18'); 1,50 (*t*, *J* = 12,0 Hz, H-2a'); 1,38 (*dd*, *J* = 13,2 Hz, *J* = 7,2 Hz, H-2a); 1,07 (*s*, *ovl*, H-16, H-17); 1,00 (*s*, H-17'); 0,85 (*s*, H-16'). <sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ, ppm): 138,5 (*ovl*, C-8, C-8'); 138,0 (C-6); 137,8 (C-5'); 137,7 (C-12'); 137,6 (C-12); 136,5 (C-13); 136,4 (C-13'); 135,7 (C-9'); 135,1 (C-9); 132,6 (*ovl*, C-14, C-14'); 131,3 (C-10'); 130,8 (C-10); 130,09 (C-15); 130,05 (C-15'); 128,7 (C-7'); 126,2 (C-5); 125,6 (C-7); 124,9 (C-11); 124,8 (C-11'); 124,5 (C-4'); 65,9 (C-3'); 65,1 (C-3); 55,0 (C-6'); 48,5 (C-2'); 44,7 (C-2); 42,6 (C-4); 37,1 (C-1); 34,0 (C-1'); 30,3 (C-16); 29,5 (C-16'); 28,7 (C-17); 24,3 (C-17'); 22,9 (C-18'); 21,6 (C-18); 13,1 (C-19); 12,81 (*ovl*, C-20, C-20'); 12,75 (C-19').

### 2.4. Hoạt động trung hòa gốc tự do nitric oxide

Sự mất cân bằng nội sinh do quá trình sản sinh quá mức của NO được xem là một trong những nguyên nhân chính dẫn đến quá trình viêm (Sharma et al., 2007). Vì vậy, việc đánh giá sản phẩm NO có thể phản ánh chính xác mức độ của viêm. Mô hình thực nghiệm khảo sát khả năng kháng viêm dựa trên cơ sở trung hòa gốc tự do nitric oxide được giải phóng bởi sodium nitroprusside (một trong những

chất hóa học giải phóng gốc tự do NO dưới tác động của các kích thích) bước đầu sàng lọc được các hoạt chất có hoạt tính kháng viêm.

Hỗn hợp phản ứng theo tỷ lệ 1:1 bao gồm các chất với các nồng độ khác nhau và sodium nitroprusside 5 mM. Hỗn hợp trên được ủ dưới ánh sáng trong 30 phút. Lượng NO sinh ra được xác định dựa trên phức màu bằng thuốc thử Griess. Độ hấp thụ quang được xác định ở bước sóng 540 nm và đường chuẩn được xây dựng dựa trên dãy nồng độ của sodium nitrite. Khả năng trung hòa gốc tự do nitric oxide đánh giá thông qua giá trị IC<sub>50</sub>, được định nghĩa là nồng độ chất thử nghiệm mà tại đó 50% gốc tự do nitric oxide đã được trung hòa. Các kết quả so sánh với curcumin được xem như đối chứng dương (Mahmud et al., 2017; Das et al., 2019).

**2.5. Hoạt động ức chế sản sinh gốc tự do nitric oxide trên mô hình đại thực bào RAW264.7**

Đại thực bào RAW264.7 được tiến hành nuôi cấy trong môi trường DMEM (Dulbecco’s Modified Eagle Medium) có bổ sung FBS (Fetal bovine serum) 10%, penicillin-streptomycin 1% cùng các phụ phẩm cần thiết. Tế bào được giữ trong tủ CO<sub>2</sub> 5% ở 37°C cho các thí nghiệm tiếp theo. Chất thử nghiệm sẽ được hòa tan vào dung môi thích hợp, hòa tan vào môi trường nuôi cấy tế bào và ủ với tế bào RAW264.7 trong đĩa 96 giếng (2x10<sup>4</sup> tế bào/giếng) ở 37°C trong 24 giờ. Môi trường sau khi ủ được loại bỏ, rửa 3 lần với dung dịch đệm phosphat (PBS) pH=7,4 và tiến hành đánh giá độc tính tế bào. Độc tính tế bào của các chất thử nghiệm được bố trí thực hiện với nồng độ xác định được đo độ hấp thụ tại bước sóng 450 nm theo hướng dẫn của nhà sản xuất CCK-8 Kit.

Hoạt tính kháng viêm của các hợp chất được đánh giá theo hoạt động ức chế nitric oxide (NO) sinh ra từ tế bào RAW264.7 sau khi được kích thích với LPS. 100 µL môi trường nuôi cấy được ủ với cao chiết trong 18 giờ với sự hiện diện hoặc không hiện diện của LPS. Sau đó, thêm vào 100 µL dung dịch Griess, ủ trong 10 phút ở nhiệt độ phòng. Độ hấp thụ quang được đo tại bước sóng 540 nm. N-Nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, 100 µM) được sử dụng như đối chứng dương (Thanh et al., 2020).

**2.6. Xử lý và phân tích dữ liệu**

Các thí nghiệm trên được lặp lại 3 lần. Kết quả được phân tích thống kê bằng phương pháp ANOVA trên phần mềm GraphPad Prism 8.0.1.

**3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

**3.1. Kết quả hoạt động trung hòa gốc tự do nitric oxide**

Đánh giá khả năng trung hòa gốc tự do nitric oxide được giải phóng bởi sodium nitroprusside của 3 hợp chất phân lập được từ cao *n*-hexane Sa sâm nam đã được tiến hành. Kết quả khảo sát được trình bày trong Bảng 1. Cụ thể, với nồng độ 500 µg/mL hợp chất **1** trung hòa được 23,2±0,75% lượng nitric oxide sinh ra, tương ứng với 31,68±0,47% ở hợp chất **2**. Do đó, hai hợp chất **1** và **2** kém hiệu quả cho quá trình ức chế lượng nitric oxide. Kết quả này được kết luận dựa trên nồng độ tối thiểu ức chế 50% gốc tự do vượt ngưỡng đánh giá là tiềm năng đối với các thử nghiệm sinh học được báo cáo trong các nghiên cứu trước đây (Loan và ctv., 2013; Huynh et al., 2019; Vinh và ctv., 2022). Đáng chú ý, hợp chất **3** cho khả năng trung hòa NO rất tốt với IC<sub>50</sub> là 23,65±1,68 µg/mL, so với đối chứng dương curcumin là 17,69±0,32 µg/mL. Vì vậy, nhận thấy khả năng kháng viêm tiềm năng, hợp chất này tiếp tục được thử nghiệm trên mô hình đại thực bào RAW264.7.

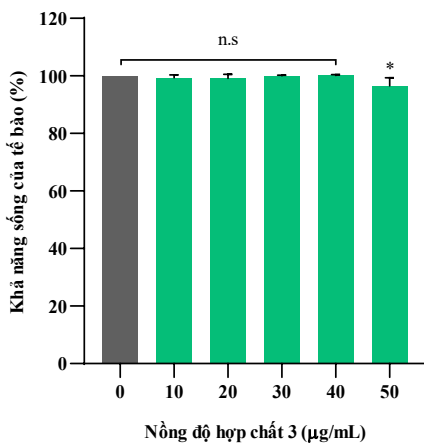
**Bảng 1. Khả năng trung hòa gốc tự do nitric oxide của các hợp chất phân lập từ cao phân đoạn *n*-hexane của cây Sa sâm nam**

Hợp chất	IC <sub>50</sub> (µg/mL)
1	>500
2	>500
3	23,65±1,68

**3.2. Kết quả kháng viêm trên mô hình đại thực bào RAW264.7**

*3.2.1. Kết quả gây độc tế bào trên mô hình đại thực bào RAW264.7*

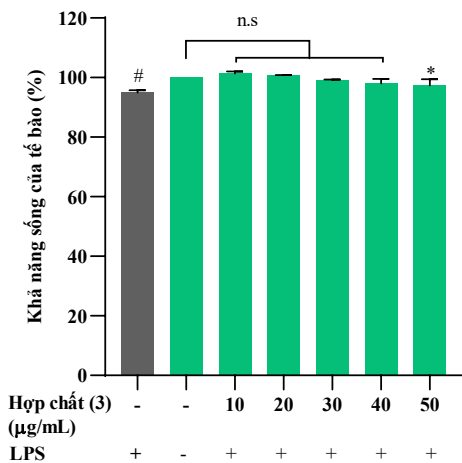
Hợp chất **3** đã được tiến hành khảo sát ở các nồng độ khác nhau (10 – 50 µg/mL), được trình bày trong Hình 1 và Hình 2. Kết quả cho thấy, chất này không gây độc tế bào trong điều kiện khảo sát. Bên cạnh đó, ở nồng độ 50 µg/mL có trên 94% tế bào sống sót.



**Hình 1. Khả năng gây độc tế bào của hợp chất 3**

Ghi chú: n.s: không khác biệt ý nghĩa về mặt thống kê; \*:  $p < 0,01$  so với nghiệm thức tế bào được nuôi trong điều kiện bình thường

Ngoài ra, hình ảnh quan sát tế bào cho thấy tế bào vẫn phát triển dưới hình thái bình thường khi có sự hiện diện của hợp chất 3 ở nồng độ 30 µg/mL (Hình 3D). Mặt khác, tế bào được kích thích với LPS làm giảm khả năng sống so với mẫu đối chứng nhưng không có sự khác biệt khi được điều trị với hợp chất 3 ở nồng độ từ 0 – 40 µg/mL (Hình 2).

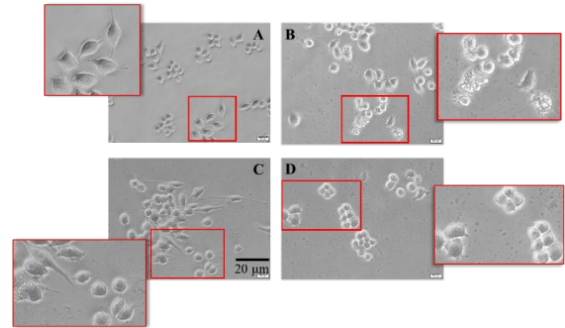


**Hình 2. Khả năng gây độc tế bào của hợp chất 3 với sự hiện diện của LPS**

Ghi chú: #:  $p < 0,05$  so với tế bào được nuôi trong điều kiện bình thường; n.s: không khác biệt ý nghĩa về mặt thống kê; \*:  $p < 0,01$  so với nghiệm thức tế bào được nuôi trong điều kiện bình thường

Bên cạnh đó, hình dạng của đại thực bào có sự thay đổi, màng tế bào dày lên quá mức hoặc một số

bị thủng màng khi bị kích thích với LPS (Hình 3B). Điều này cho thấy sự tương đồng của nghiên cứu này với các nghiên cứu trước đây, khi tế bào bị chết theo chu trình (apoptosis) gây ra bởi kích thích của LPS, biểu hiện điển hình là kích hoạt kiểu hình của đại thực bào ở trạng thái viêm, thể hiện ở Hình 3B (Dai et al., 2019). Tuy nhiên, hình dạng của tế bào được bảo vệ hoặc phục hồi khi được điều trị với hợp chất 3 (Hình 3C). Như vậy, hợp chất 3 thể hiện khả năng bảo vệ tế bào trước khả năng gây độc của kích thích viêm LPS.

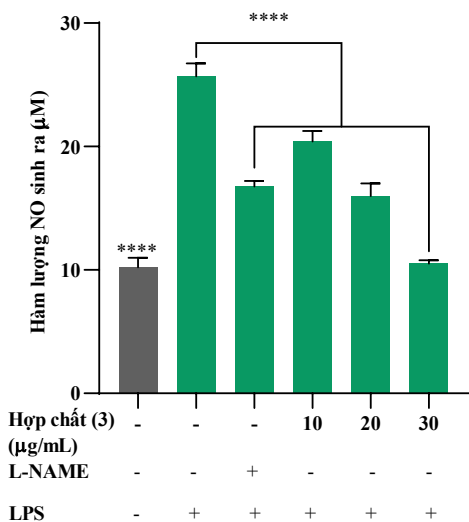


**Hình 3. Hình thái tế bào được ghi nhận dưới kính hiển vi trong cùng điều kiện thí nghiệm**

Ghi chú: (A), tế bào được nuôi trong điều kiện bình thường; (B), tế bào được nuôi trong điều kiện có sự hiện diện của LPS; (C), tế bào được nuôi trong điều kiện có sự hiện diện của LPS và hợp chất 3 nồng độ 30 µg/mL; (D), tế bào được nuôi trong điều kiện có hợp chất 3 nồng độ 30 µg/mL.

### 3.2.2. Kết quả kháng viêm nội bào trên mô hình đại thực bào RAW264.7

Khả năng ức chế của hợp chất 3 đối với hàm lượng NO sinh ra dưới sự kích thích của LPS được tiến hành khảo sát (Hình 4). Tế bào đáp ứng lại kích thích này bằng cách điều hòa miễn dịch, sản sinh NO dưới tác động của các hệ enzyme và phóng thích các gốc tự do (Ruhee et al., 2019). Kết quả cho thấy, tăng dần nồng độ cao chiết đã ức chế đáng kể sự sản sinh các sản phẩm NO bởi kích thích LPS (Hình 4). Cụ thể, giá trị  $IC_{50}$  tương ứng đối với hợp chất 3 là  $29,23 \pm 0,70$  µg/mL. So sánh với đối chứng L-NAME, nồng độ hợp chất 3 ở 20 µg/mL ức chế hàm lượng NO với giá trị xấp xỉ nhau. Như vậy, kết quả trên đã bước đầu đánh giá tổng quan khả năng kháng viêm của hợp chất 3 thông qua sự ức chế trực tiếp đến sản phẩm NO sinh ra trong quá trình viêm trong mô hình đại thực bào RAW264.7 dưới sự kích thích bởi LPS.



**Hình 4. Khả năng ức chế sản sinh NO nội bào của hợp chất 3 với sự kích thích của LPS**

Ghi chú: \*\*\*\*,  $p < 0,0001$  so với nghiệm thức chỉ có sự hiện diện của LPS

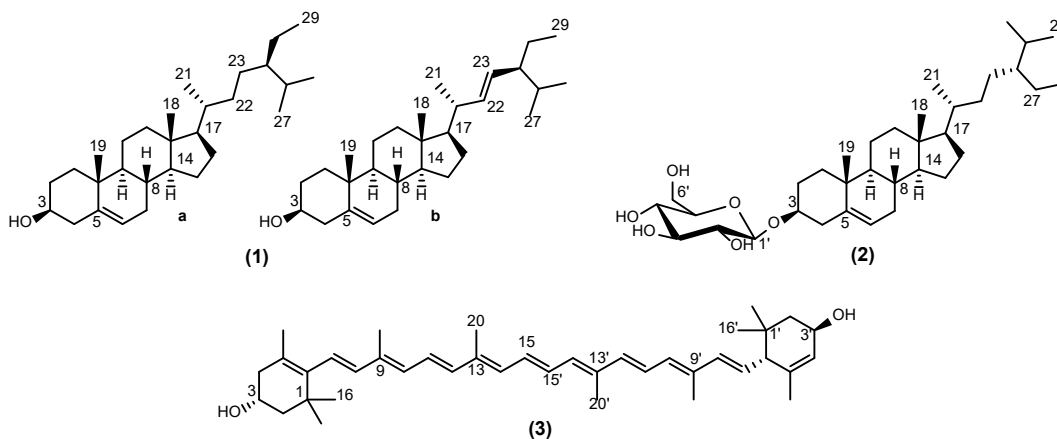
**3.3. Kết quả xác định cấu trúc các hợp chất**

Các hợp chất được phân lập từ cao *n*-hexane của cây Sa sâm nam sau khi đánh giá hoạt tính kháng viêm sẽ được định danh, bao gồm hỗn hợp hai steroid (1), steroid saponin (2) và một hợp chất tetraterpenoid (3). Cấu trúc của các hợp chất được trình bày ở Hình 5 đã được làm sáng tỏ bằng phương pháp phân tích dữ liệu phổ 1D và 2D-NMR, kết hợp so sánh với dữ liệu phổ được báo cáo trước đó.

Dữ liệu NMR của hợp chất 1 được đặc trưng bởi tín hiệu của các cặp nguyên tử carbon olefinic ở  $\delta_C$  121,7; 140,9 ppm tương ứng với  $\delta_H$  tại 5,36 (*brt*)

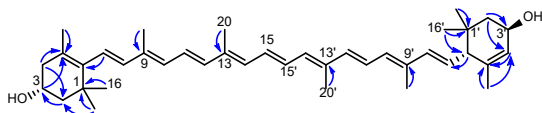
ppm; 129,3 và 138,3 ppm tương ứng với  $\delta_H$  tại 5,17 (*dd*); 5,04 (*dd*) ppm. Có sự hiện diện của một nhóm hydroxymethin tại  $\delta_C$  71,8 ppm tương ứng với  $\delta_H$  3,52 (*brs*) ppm, đặc trưng của các sterol hoặc triterpenol. Có sự hiện diện của các cặp tín hiệu *singlet* của nhóm methyl tại  $\delta_H$  ở 0,68 (*s*); 0,70 (*s*) và 1,01 (*s*) ppm cùng với các cặp tín hiệu *doublet* và *triplet* trong vùng 0,79-1,02 ppm của các nhóm methyl bậc 1, 2 và bậc 3. Sự xuất hiện các cặp tín hiệu gần kề sát nhau và các mũi tín hiệu có cường độ rất cao ở phổ  $^{13}C$ -NMR. Trong đó, sự xuất hiện cùng lúc của  $\delta_C$  138,3 (C-22b); 129,3 (C-23b) ppm và  $\delta_C$  34,0 (C-22a); 26,1 (C-23a) ppm cho thấy hợp chất 1 là một hỗn hợp của hai sterol. Dựa trên dữ liệu phổ thu được, kết hợp so sánh với các nghiên cứu đã công bố, hợp chất 1 được xác định là hỗn hợp của stigmasterol và  $\beta$ -sitosterol (Erwin et al., 2020).

Phổ  $^1H$ -NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) của hợp chất 2 cho thấy mũi tín hiệu proton olefin tại  $\delta_H$  5,33 (*brt*) tương ứng với carbon olefin tại  $\delta_C$  121,1 ppm. Tương tự hợp chất 1, mũi tín hiệu proton tại  $\delta_H$  3,66 (*m*) ppm và carbon tại vị trí  $\delta_C$  76,9 ppm là tín hiệu thường thấy của nhóm hydroxymethin trong khung cấu trúc của các sterol hoặc triterpenol. Phổ  $^1H$ -NMR còn cho biết nhóm tín hiệu proton của 1 đơn vị đường  $\beta$ -glucoside ( $\delta_H$  trong khoảng 2,92 - 3,61 ppm) tương ứng với các tín hiệu carbon tại  $\delta_C$  61,1; 70,1; 73,4; 76,69; 76,74 ppm. Trong đó, mũi proton anomeric với  $\delta_H$  4,23 (*d*,  $J = 7,8$  Hz) ppm tương ứng với carbon tại vị trí  $\delta_C$  100,8 ppm. Ngoài ra, ở vùng trường cao từ 0,65 - 2,37 ppm là các tín hiệu proton của nhóm methine và methylene còn lại trong khung cấu trúc. Các tín hiệu trên đặc trưng của một sterol hoặc triterpene có liên kết *O*-glycoside với một đơn vị đường  $\beta$ -glucose. Kết hợp việc so sánh với kết quả nghiên cứu đã công bố, có thể dự đoán cấu trúc của hợp chất 2 là daucosterol (Azadeh et al., 2013).



**Hình 5. Cấu trúc các hợp chất 1, 2 và 3**

Phổ  $^{13}\text{C-NMR}$  của hợp chất **3** cho thấy 21 mũi tín hiệu carbon olefin tại  $\delta_{\text{C}}$  ở 126,2; 138,0; 125,6; 138,5; 135,1; 130,8; 124,9; 137,6; 136,5; 132,6; 130,09; 124,5; 137,8; 128,7; 138,5; 135,7; 131,3; 124,8; 137,7; 136,4 và 130,05 ppm. Trong đó, mũi tín hiệu tại  $\delta_{\text{C}}$  ở 132,6 ppm là tín hiệu *overlet*. Mười tín hiệu đại diện cho proton nhóm methyl tại  $\delta_{\text{H}}$  ở 1,07 (s); 1,07 (s); 1,74 (s); 1,96 (s); 1,97 (s); 0,85 (s); 1,00 (s); 1,63 (s); 1,91(s); 1,97(s) ppm tương ứng với mười mũi tín hiệu carbon tại các vị trí  $\delta_{\text{C}}$  30,3; 28,7; 21,6; 13,1; 12,8; 29,5; 24,3; 22,9; 13,1 và 12,8 ppm. Tín hiệu của hai nhóm hydroxymethin tại vị trí  $\delta_{\text{C}}$  ở 65,1 và 65,9 ppm tương ứng với  $\delta_{\text{H}}$  ở 4,02 (m) và 4,25 (s). Từ dữ liệu trên, bước đầu có thể dự đoán hợp chất **3** thuộc nhóm các hợp chất carotenoid. Phổ HMBC cho thấy mối tương quan của proton và carbon lân cận qua hai hoặc ba nối hóa trị, các tương quan quan trọng của hợp chất **3** được trình bày trong Hình 6. Dựa vào các dữ liệu phổ trên và so sánh với nghiên cứu đã công bố, có thể dự đoán cấu trúc của hợp chất **3** là lutein, đây là hợp chất lần đầu tiên được phân lập từ loài Sa sâm nam (Farouk et al., 2022).



**Hình 6. Một số tương tác HMBC quan trọng của hợp chất 3**

Ghi chú: → biểu diễn cho mối tương quan của  $^1\text{H}$  đối với  $^{13}\text{C}$ .

Trong nghiên cứu này, khả năng kháng viêm của lutein đã được đánh giá trên mô hình đại thực bào

nuôi cấy RAW264.7 thông qua ức chế sản sinh NO với giá trị  $\text{IC}_{50}$  là 29,23  $\mu\text{g/mL}$  (tương đương với nồng độ 51,37  $\mu\text{M}$ ). Các kết quả tương tự cũng đã được công bố, lutein tại nồng độ 10  $\mu\text{M}$  ức chế gần 30% lượng NO sinh ra trên cùng mô hình thử nghiệm (Mohamed & Yassaman, 2007). Ngoài ra, lutein ở nồng độ 50  $\mu\text{M}$  làm giảm đáng kể tình trạng viêm liên quan đến sản xuất NO do LPS gây ra trong mô hình tế bào thần kinh đệm BV-2 (Wanqiang et al., 2015).

#### 4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã phân lập được ba hợp chất trong cao phân đoạn *n*-hexane Sa sâm nam và sàng lọc hoạt tính kháng viêm dựa trên hai mô hình thử nghiệm, bao gồm trung hòa gốc tự do NO và đại thực bào RAW264.7 dưới kích thích bởi LPS. Trong đó, hợp chất **3** thể hiện tiềm năng kháng viêm với các giá trị  $\text{IC}_{50}$  lần lượt là 23,65 và 29,23  $\mu\text{g/mL}$  tương ứng mà không gây độc tế bào ở các nồng độ thử nghiệm. Dựa trên cơ sở phân tích dữ liệu phổ 1D và 2D-NMR, kết hợp với so sánh các dữ liệu phổ đã được công bố đã xác định được cấu trúc của các hợp chất trên là hỗn hợp của stigmasterol và  $\beta$ -sitosterol (**1**), daucosterol (**2**) và lutein (**3**). Ngoài ra, lutein được xác định là lần đầu tiên được phân lập ở loài Sa sâm nam (*Launaea sarmentosa*).

#### LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được sự hỗ trợ kinh phí từ Đề tài Khoa học Công nghệ cấp Bộ, mã số: B2023-TCT-21.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Azadeh, M., Soodabeh, S., Seyed, N. O., Abbas, H., Mohammad, R. S. A., Mahdi, V., Yasmin, A., & Mahnaz, K.. (2013). Chemical constituents and cytotoxic effect of the main compounds of *Lythrum salicaria* L. *Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*, 68(9), 367-375. <https://doi.org/10.1515/znc-2013-9-1004>
- Bath, P. M., Coleman, C. M., Gordon, A. L., Lim, W. S., & Webb, A. J. (2021). Nitric oxide for the prevention and treatment of viral, bacterial, protozoal and fungal infections. *F1000Research*, 10(536), 1-43. <https://doi.org/10.12688/f1000research.51270.2>
- Bộ Y Tế. (2017). *Dược điển Việt Nam V*. Nhà xuất bản Y học
- Dai, B., Wei, D., Zheng, N. N., Chi, Z. H., Xin, N., Ma, T. X., Zheng, L. Y., Sumi, R., & Sun, L. (2019). *Coccomyxa gloeobotrydiformis* polysaccharide inhibits lipopolysaccharide induced inflammation in RAW 264.7 macrophages. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 51, 2523–2535. <https://doi.org/10.1159/000495922>
- Das, G., Patra, J. K., Debnath, T., Ansari, A., & Shin, H. S. (2019). Investigation of antioxidant, antibacterial, antidiabetic, and cytotoxicity potential of silver nanoparticles synthesized using the outer peel extract of *Ananas comosus* (L). *Plos One*, 14(8), 1-19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220950>
- Đức, N. M. (2011). Báo cáo phân tích xu hướng công nghệ: sản xuất thuốc và thực phẩm chức năng từ dược liệu. *Sở Khoa Học Và Công Nghệ TP-HCM/Trung Tâm Thông Tin Khoa Học Và Công Nghệ*.

- Erwin, Pusparohmana, W.R., Safitry, R.D., Marlina, E., Usman, & Kusuma, I.W. (2020). Isolation and characterization of stigmasterol and  $\beta$ -sitosterol from wood bark extract of *Baccaurea Macrocarpa* Miq. Mull. Arg. *Rasayan Journal of Chemistry*, 13(4), 2552-2558.  
<http://dx.doi.org/10.31788/RJC.2020.1345652>
- Farouk, K. E., Abeer, S., Sami, I. A., & Rania, E. (2022). Lutein isolated from *Scenedesmus obliquus microalga* boosts immunity against cyclophosphamide-induced brain injury in rats. *Scientific Reports*, 12, 1-13.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-022-25252-9>
- Golam, S. R., Md, M. R., Mohammad, S. H., Md, M. H., Md, M. B., Sayed, K. A., & Masud, R. (2014). Assessment of pharmacological activities of two medicinal plant of Bangladesh: *Launaea sarmentosa* and *Aegialitis rotundifolia* roxb in the management of pain, pyrexia and inflammation. *Biological Research*, 47(55), 1-11.  
<http://dx.doi.org/10.1186/0717-6287-47-55>
- He, J., Gou, P., Yang, L., & He, J. W. (2023). Anti-inflammatory constituents isolated from the flowers of *Hosta plantaginea* via suppression of the NF- $\kappa$ B signaling pathway in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. *RSC Advances*, 13, 7179-7184.
- Huynh, N. K. T., Thao, Q. C., Jeong, A. K, Mi, H. W., & Byung, S. M. (2019). Anti-inflammatory and cytotoxic activities of constituents isolated from the fruits of *Ziziphus jujuba var. inermis* Rehder. *Fitoterapia*, 137, 1-7.  
<https://doi.org/10.1016/j.fitote.2019.104261>
- Loan, P. T., Thái, T. H., Kiệt, P. V., Anh, H. L. T., Minh, C. V., Thảo, D. T., & Suu, T. T. (2013). Hoạt tính sinh học của một số hợp chất phân lập từ gỗ cây Cẩm Lai (*Dalbergia Oliveri Gamble* Ex Prain). *Tạp chí Sinh học*, 35(4), 439-444.
- Mahmud, Z. A., Bachar, S. C., Hasan, C. M., Emran, T. B., Qais, N., & Uddin, M. M. N. (2017). Phytochemical investigations and antioxidant potential of roots of *Leea macrophylla* (Roxb). *BMC Reaseach Notes*, 10(245), 1-9.  
<https://doi.org/10.1186/s13104-017-2503-2>
- Millat, M. S., Islam, S., Hussain, M. S., Moghal, M. M. R., & Islam, T. (2017). Anti-bacterial Profiling of *Launaea sarmentosa* (Willd.) and *Bruguiera Cylindrical* (L.): Two distinct ethnomedicinal plants of Bangladesh. *European Journal of Experimental Biology*, 7, 1(6), 1-5.  
<https://doi.org/10.21767/2248-9215.100006>
- Mohamed, M. R., & Yassaman, S. (2007). Dietary lutein modulates inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene and protein expression in mouse macrophage cells (RAW 264.7). *Molecular Nutrition & Food Research*, 51, 333-340.  
<https://doi.org/10.1002/mnfr.200600170>
- Phong, T. D. T., Dung, Q. T. H., & Ngọc, T. H. K. (2024). Đánh giá tình hình sử dụng và kết quả điều trị bằng thuốc Y học cổ truyền và thuốc Dược liệu của người dân tại các trạm y tế huyện Châu Thành – tỉnh Hậu Giang năm 2022 – 2023. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 60(2A), 53-58.  
<https://doi.org/10.22144/ctujos.2024.259>
- Ruhee, R. T., Ma, S., & Suzuki, K. (2019). Sulforaphane protects cells against lipopolysaccharide-stimulated inflammation in murine macrophages. *Antioxidants*, 8(12), 577.  
<https://doi.org/10.3390/antiox8120577>
- Shang, D., Liu, H., & Tu, Z. (2023). Pro-inflammatory cytokines mediating senescence of vascular endothelial cells in atherosclerosis. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 37(5), 928-936.  
<https://doi.org/10.1111/fcp.12915>
- Sharma, J. N., Al-Omran, A., & Parvathy, S. S. (2007). Role of nitric oxide in inflammatory diseases. *Inflammopharmacology*, 15, 252-259.  
<https://doi.org/10.1007/s10787-007-0013-x>
- Thanh, Q. C. N., Tran, D. B., Ryo, K., Tuan, L. A. B., Yen, D. H. N., Tuan, N. T., Kanaori, K., & Kamei, K. (2020). Effects of *Launaea sarmentosa* Extract on Lipopolysaccharide-Induced Inflammation via Suppression of NF- $\kappa$ B/MAPK Signaling and NrF2 Activation. *Nutrients*, 12, 1-16.  
<https://doi.org/10.3390/nu12092586>
- Thao, N. P., Luyen, P. T. T., Jung, E. K., Sohyun, K., Young, S. K., Thanh, N. V., Cuong, N. X., Kiem., P. V., Minh, C. V., & Kim, H. K. (2015). *In vitro* anti-inflammatory components isolated from the carnivorous plant *Nepenthes mirabilis* (Lour.) *Rafarin*. *Pharmaceutical Biology*, 54(4), 588-594.  
<https://doi.org/10.3109/13880209.2015.1067234>
- Them, L. T., Dung, P. T. N., Trinh, P. T. N., Hung, Q. T., Vi, L. N. T., Tuan, N. T., Lam, T. D., Thuy, N. V., & Dung, L. T. (2018). Saponin, Polyphenol, Flavonoid content and  $\alpha$ -glucosidase Inhibitory Activity, Antioxidant potential of *Launaea sarmentosa* leaves grown in Ben Tre province, Vietnam. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 542, 1-5.  
<https://doi.org/10.1088/1757-899X/542/1/012036>
- Vinh, H. V., Hoa, Q. K. H., & Hương, T. N. L. (2022). Thử nghiệm hoạt tính sinh học của hai hợp chất flavonol glucoside phân lập được từ nhĩ Hoa mai vàng. *Tạp chí Khoa học Trường Đại*



*học Cần Thơ*, 58(2), 200-208.

<https://doi.org/10.22144/ctu.jvn.2022.138>

Visavadiya, N. P., McEwen, M. L., Pandya, Patrick, J. D., Sullivan, G., Gwag, B. J., & Springer, J. E. (2012). Antioxidant properties of Neu2000 on mitochondrial free radicals and oxidative damage. *Toxicology in Vitro*, 27(2), 788-97. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2012.12.011>

Wanqiang, W., Yuelian, L., Yue, W., Yawen, Z., Zhen, W., & Xuebo, L. (2015). Lutein suppresses inflammatory responses through Nrf2 activation and NF- $\kappa$ B inactivation in lipopolysaccharide-stimulated BV-2 microglia. *Molecular Nutrition & Food Research*, 59, 1663-1673. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201500109>