

# Định tính thành phần hóa học và phân lập saponin từ lá loài *Weigela florida* (Bunge) A. DC

Nguyễn Đức Hùng\*, Từ Quang Tân, Chu Hoàng Mậu

Trường Đại học Sư phạm, Đại học Thái Nguyên, 20 Lương Ngọc Quyến, phường Quang Trung, TP Thái Nguyên, tỉnh Thái Nguyên, Việt Nam

Ngày nhận bài 13/1/2022; ngày chuyển phản biện 18/1/2022; ngày nhận phản biện 14/2/2022; ngày chấp nhận đăng 17/2/2022

## Tóm tắt:

Chi *Weigela* thuộc họ Kim ngân (*Caprifoliaceae*) được sử dụng rộng rãi trong y học cổ truyền tại các nước châu Á. Các hợp chất hóa học tách chiết từ các loài thuộc chi thực vật này có nhiều hoạt tính sinh học mạnh như kháng viêm, kháng oxy hóa, kháng bổ thể, miễn dịch và gây độc trên một số dòng tế bào ung thư. Nghiên cứu định tính thành phần hóa học của phần lá loài *Weigela florida* (Bunge) A. DC, một loài cây cảnh dạng bụi cho thấy có các thành phần flavonoid, tannin, terpenoid và triterpenoid saponin, tuy nhiên không có các hợp chất glycoside tim, alkaloid và steroid. Hàm lượng saponin toàn phần trong cao chiết được định lượng theo phương pháp sắc ký phân bố ngược dòng thu được kết quả đạt 2,66% (wt%) so với mẫu thô ban đầu. Nghiên cứu đã phân lập được một triterpenoid saponin hai mạch đường có phần algycone dạng hederagenin bằng các phương pháp sắc ký, kết hợp với phương pháp phổ hiện đại (1 và 2 chiều NMR) và phổ khối lượng (ESI-MS).

**Từ khóa:** saponin toàn phần, triterpenoid saponin, *Weigela florida* (Bunge) A. DC, 3-O- $\alpha$ -L-arabinopyranosylhederagenin 28-O- $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopyranosyl ester.

**Chỉ số phân loại:** 1.6

## 1. Đặt vấn đề

Từ xa xưa, con người đã khám phá thiên nhiên để tìm kiếm các loài thực vật có tác dụng chữa bệnh. Quá trình này gắn liền với nghiên cứu các hợp chất chuyển hóa thứ cấp. Đó là những hợp chất được tạo ra trong cơ thể của sinh vật nhằm phản ứng lại các stress sinh học và phi sinh học [1]. Trong thực vật, các hợp chất này có hoạt tính sinh học mạnh như tăng cường sức khỏe con người và chống lại bệnh tật nên được sử dụng rộng rãi trong ngành công nghiệp dược phẩm [2]. Một số hợp chất chuyển hóa thứ cấp như alkaloid, terpenoid và phenylpropanoid hiện đang được nghiên cứu để phát triển các loại thuốc mới [3].

Nghiên cứu trước đây đã chứng minh các loài cây cảnh thuộc chi *Weigela* Thunb. chứa các hợp chất chuyển hóa thứ cấp có hoạt tính sinh học như kháng viêm, chống oxy hóa, kháng bổ thể, miễn dịch và hoạt tính gây độc trên một số dòng tế bào ung thư [4-10]. Trong số đó, *W. florida* (Bunge) A. DC là loài cây cảnh bụi, được trồng làm cảnh tại châu Âu do có màu sắc hoa đẹp và dễ phát triển. Nghiên cứu bước đầu trên các hợp chất hóa học tách chiết từ loài cây này cho thấy có hoạt tính gây độc trên một số dòng tế bào

ung thư đại tràng (CT26), gan (HepG2) và hắc tố da (B16) [11]. Do đó, để hoàn thiện dữ liệu về phân loại hoá học thực vật (Chemotaxonomy) đối với các loài thuộc chi *Weigela*, họ *Caprifoliaceae* và tìm kiếm các hợp chất hóa học có hoạt tính sinh học, nghiên cứu tiến hành khảo sát thành phần hóa học trên phần lá của loài *W. florida* (Bunge) A. DC, xác định hàm lượng saponin toàn phần và bước đầu tách chiết saponin bằng phương pháp sắc ký, kết hợp với phương pháp phổ hiện đại (1 và 2 chiều NMR) và phổ khối lượng (ESI-MS) để xác định cấu trúc hóa học của hợp chất phân lập được. Đồng thời, hoạt tính sinh học của hợp chất phân lập được đã được bàn luận dựa trên cơ sở dữ liệu Scifinder® của Hiệp hội Hóa học Mỹ, là cơ sở để tiếp tục tiến hành các nghiên cứu sâu hơn về hoạt tính sinh học của hợp chất này.

## 2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

### 2.1. Vật liệu

Phần lá của loài *W. florida* (Bunge) A. DC được thu thập vào tháng 6/2018 tại Trung tâm Giống cây cảnh Jardiland®, Chenove, Pháp (tọa độ 47°17'06.4"N, 5°01'28.1"E). Mẫu vật được lưu giữ tại Laboratoire de Pharmacognosie, Université de Bourgogne Franche-Comté, Pháp (hình 1).

\*Tác giả liên hệ: Email: hungnd@tnue.edu.vn

# Phytochemical screening and isolation of saponin from the leaves of *Weigela florida* (Bunge) A. DC

Duc Hung Nguyen\*, Quang Tan Tu, Hoang Mau Chu

University of Education, Thai Nguyen University,  
20 Luong Ngoc Quyen Street, Quang Trung Ward, Thai Nguyen City, Thai Nguyen Province, Vietnam

Received 19 January 2022; revised 14 February 2022; accepted 17 February 2022

## Abstract:

Species of the *Weigela* genus, Caprifoliaceae family, are currently used in folk medicine, specifically in Asia. Chemical compounds extracted from species of this plant genus have many strong biological activities such as anti-inflammatory, antioxidant, anti-complementary, immune and cytotoxicity on some cancer cell lines. A qualitative study on the chemical composition of leaves of *W. florida* (Bunge) A. DC led to an identification of flavonoid, tannin, terpenoid and triterpenoid saponin, whereas cardiac glycoside, alkaloid and steroid were found to be absent. Total saponin content was quantified to be 2.66% (wt%) from the initial sample using the chromatography method. A diglycosidic hederagenin-type triterpenoid saponin was isolated using different chromatographical methods, in combination with 1D and 2D spectroscopic methods and mass spectroscopy (ESI-MS).

**Keywords:** total saponin content, triterpenoid saponin, *Weigela florida* (Bunge) A. DC, 3-O- $\alpha$ -L-arabinopyranosylhederagenin 28-O- $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopyranosyl ester.

**Classification number:** 1.6



Hình 1. Hình ảnh loài *W. florida* (Bunge) A. DC (ảnh Nguyễn Đức Hùng).

## 2.2. Hóa chất và thiết bị

Các dung môi sử dụng trong nghiên cứu đều đạt tiêu chuẩn kỹ thuật. 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 60F<sub>254</sub> (Merck, Đức). Sắc ký cột (CC) sử dụng chất hấp phụ 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  $\mu$ m (Merck, Đức), sử dụng cột sắc ký thủy tinh kích thước 460x25 mm, 460x15 mm và 110x15 mm (Büchi, Thụy Sĩ). Thuốc thử sử dụng để nhận biết saponin trong cao chiết là vanilin/axit sunfuric (pha 1% vanillin trong dung môi EtOH:H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> theo tỷ lệ 50:1).

Máy phá mẫu sử dụng vi sóng MARS 6 (CEM®, Mỹ) được sử dụng để tạo cao chiết. Máy cô quay chân không Rotavator R-210 (Büchi, Thụy Sĩ) được sử dụng để loại bỏ dung môi. Hệ thống đông khô chân không Heto Drywinner DW 6-55-1 (Thermo Fisher Scientific, Mỹ) được sử dụng để đông khô cao chiết và phân đoạn *n*-BuOH. Phổ 1D và 2D NMR được đo trên máy Varian INOVA 600 (Agilent Technologies®, Mỹ), trong đó tần số được thiết lập để đo phổ <sup>1</sup>H-NMR và <sup>13</sup>C-NMR lần lượt là 600 và 150 MHz. Pyridine-*d*<sub>5</sub> được sử dụng để hòa tan mẫu. Hằng số tương tác (*J*) và độ dịch chuyển hóa học ( $\delta$ ) lần lượt được tính theo đơn vị Hz và ppm. Máy đo phổ khối Bruker microOTOF II mass spectrometer (Bruker®, Đức) được sử dụng để đo phổ khối lượng ESI-MS.

## 2.3. Phương pháp nghiên cứu

**Phương pháp tạo cao chiết:** Phần lá khô của loài *W. florida* (Bunge) A. DC được nghiền thành bột mịn (15,6 g). Sau đó, tiến hành chiết bằng phương pháp hỗ trợ vi sóng, thời gian chiết 45 phút ở nhiệt độ 60°C, công suất 200 W. Dung môi sử dụng để tạo dịch chiết là EtOH:H<sub>2</sub>O (75:35), 250 ml/lần, lặp lại 3 lần. Sau đó, loại bỏ dung môi của dịch chiết bằng cô quay chân không, thu được cao chiết. Sau đó, cao chiết tiếp tục được đông khô chân không để loại bỏ nước còn tồn dư, thu được cao chiết khô hoàn toàn.

**Định tính thành phần hóa học:** Định tính thành phần alkaloid, flavonoid, tannin, steroid, terpenoid của cao chiết ethanol từ phần lá của loài *W. florida* (Bunge) A. DC được tiến hành theo phương pháp của A. Alqethami và cs (2021) [12]. Ngoài ra, saponin và glycoside tim, một loại glycoside đặc biệt có tác dụng lên hoạt động của tim, được định tính theo mô tả của L. Traore và cs (2015) [13]. Hòa tan cao chiết trong 2 ml DMSO 10% để tạo dịch chiết sử dụng trong các phản ứng định tính.

- Định tính alkaloid (phản ứng Hager): Nhỏ 1 ml dịch chiết vào mỗi 2 ống nghiệm, sau đó tiếp tục nhỏ từ từ 2,5

ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$  5%, lắc đều. Nhỏ thuốc thử Dragendorff vào ống nghiệm 1 và thuốc thử Mayer vào ống nghiệm 2. Quan sát hiện tượng trong ống nghiệm nếu thấy có kết tủa trắng thì kết luận có thành phần alkaloid.

- Định tính tannin (phản ứng Braymer): Nhỏ 1 ml dịch chiết vào trong ống nghiệm, sau đó nhỏ tiếp vài giọt  $\text{FeCl}_3$  10%. Quan sát hiện tượng trong ống nghiệm nếu thấy có kết tủa màu xanh thì kết luận có tannin.

- Định tính glycoside tim (phản ứng Kellar-Kiliani): Chuẩn bị dung dịch A (100 ml axit acetic loãng + 1 ml  $\text{FeCl}_3$  5%) và dung dịch B (100 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$  đậm đặc + 1 ml  $\text{FeCl}_3$  5%). Nhỏ 1 ml dịch chiết vào trong ống nghiệm, sau đó nhỏ tiếp theo thứ tự 1 ml dung dịch A và 1 ml dung dịch B. Quan sát hiện tượng trong ống nghiệm nếu thấy có màu đỏ hoặc nâu thì kết luận có glycoside tim.

- Định tính flavonoid (phản ứng Shinoda): Nhỏ 1 ml dịch chiết vào trong ống nghiệm có chứa 10 ml  $\text{CH}_3\text{OH}$ , sau đó thêm vài giọt HCl đậm đặc và ít bột Mg. Quan sát hiện tượng trong ống nghiệm nếu thấy có màu vàng, đỏ đến xanh thì kết luận có thành phần flavonoid.

- Định tính terpenoid (phản ứng Liebermann - Burchardt): Nhỏ 1 ml dịch chiết vào trong ống nghiệm, sau đó nhỏ tiếp theo thứ tự 2 ml chloroform và vài giọt  $\text{H}_2\text{SO}_4$  đậm đặc. Quan sát hiện tượng trong ống nghiệm nếu thấy có màu xanh xuất hiện ở phần giữa chất lỏng thì kết luận có terpenoid.

- Định tính steroid (phản ứng Liebermann - Burchardt): Nhỏ 1 ml dịch chiết vào trong ống nghiệm, sau đó nhỏ tiếp vài giọt  $\text{H}_2\text{SO}_4$  đậm đặc. Quan sát hiện tượng trong ống nghiệm nếu thấy có màu tím đỏ xuất hiện ở phần giữa chất lỏng thì kết luận có steroid.

- Định tính saponin (phản ứng Salkowski): Nhỏ 1 ml dịch chiết vào 2 ống nghiệm, sau đó nhỏ 5 ml HCl 0,1 N vào ống nghiệm 1 và 5 ml NaOH 0,1 N vào ống nghiệm 2. Quan sát hiện tượng trong ống nghiệm nếu bọt của ống nghiệm 2 bền hơn ống nghiệm 1 thì kết luận có triterpenoid saponin, ngược lại là steroid saponin.

**Định lượng saponin toàn phần trong cao chiết:** Hàm lượng saponin toàn phần trong cao chiết được thực hiện theo phương pháp sắc ký phân bố ngược dòng của T. Namba và cs (1974) [14] dựa trên sự phân cực của các dung môi. Cụ thể, hòa tan hoàn toàn cao chiết trong 5 ml  $\text{H}_2\text{O}$ , sau đó bổ sung 200 ml dung dịch phân tách  $n\text{-BuOH}:\text{H}_2\text{O}$  (tỷ lệ 1:1) và để lắng trong 12 giờ. Sau đó, phần dịch  $n\text{-BuOH}$  được tách riêng và loại bỏ dung môi, thu được phân đoạn  $n\text{-BuOH}$  của cao chiết. Tinh sạch phân đoạn  $n\text{-BuOH}$  bằng sắc ký CC, sử dụng chất hấp phụ là Sephadex® LH20 và dung môi là EtOH 96%. Kiểm tra sự có mặt của saponin trong phân đoạn bằng TLC và thuốc thử vanilin/axit sunfuric. Các

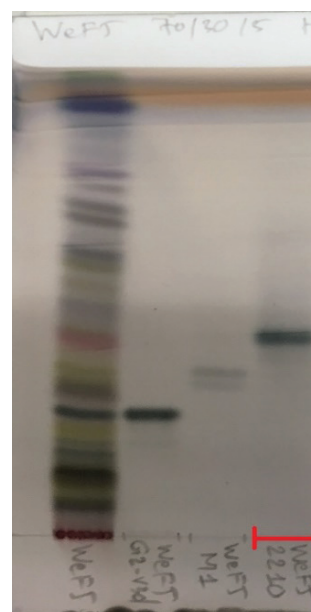
phân đoạn saponin thu được tiếp tục được đông khô chân không để loại bỏ nước, thu được saponin toàn phần. Cân và tính khối lượng saponin toàn phần trong nguyên liệu. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

Hàm lượng saponin toàn phần trong cao chiết được tính theo công thức sau:

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

trong đó M là hàm lượng saponin toàn phần (%); a là khối lượng saponin toàn phần (g); b là khối lượng nguyên liệu thô ban đầu (g).

**Phân lập và xác định cấu trúc của hợp chất saponin:** Sau khi thu được saponin toàn phần, nghiên cứu tiếp tục tiến hành tách phân đoạn và phân lập hợp chất saponin. Cụ thể, phân đoạn saponin toàn phần bằng phương pháp MPLC silica gel 60 ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  80/20/2, 75/25/3, v/v/v) thu được 4 phân đoạn (A-D). Phân đoạn C tiếp tục được phân đoạn bằng MPLC silica gel 60 ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  70/30/5, v/v/v) thu được hợp chất saponin tinh sạch ký hiệu là WeFJ2210 (2,3 mg) (hình 2).



Hình 2. HPTLC của hợp chất WeFJ2210.

Hợp chất WeFJ2210: Bột màu trắng, phổ khối lượng ESI-MS  $[M + \text{Na}]^+$ ,  $m/z$  921,4839 (tương ứng với cấu trúc phân tử  $\text{C}_{46}\text{H}_{74}\text{NaO}_{17}$ , 921,4824). Phổ  $^1\text{H-NMR}$  và  $^{13}\text{C-NMR}$  lần lượt được đo ở tần số 600 và 150 MHz, sử dụng dung môi hòa tan là pyridine- $d_5$ .

Cấu trúc của hợp chất WeFJ2210 được xác định bằng các phương pháp phân tích cấu trúc hiện đại, bao gồm phổ cộng hưởng từ hạt nhân (1 và 2 chiều NMR) và phổ khối lượng (ESI-MS). Các phân tử đường của hợp chất được xác định bằng phương pháp thủy phân axit và cấu hình tuyệt đối



của các phân tử đường được thực hiện theo mô tả của D.H. Nguyen và cs (2019) [8]. Theo đó, 5 ml  $\text{CF}_3\text{COOH}$  được sử dụng để thủy phân hoàn toàn 3 mg hợp chất WeFJ2210 trong thời gian 3 giờ ở nhiệt độ  $95^\circ\text{C}$ .  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  được sử dụng để chiết dung dịch thu được (5 ml/lần, lặp lại 3 lần). Loại bỏ dung môi của dịch chiết bằng hệ thống cô quay chân không, sau đó phân tích bằng TLC ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  tỷ lệ 8/5/1 v/v/v) và so sánh với mẫu chuẩn để xác định loại phân tử đường có trong hợp chất WeFJ2210. Bên cạnh đó, 100  $\mu\text{l}$  anhydrous pyridine được sử dụng để hòa tan các phân tử đường, sau đó tiếp tục bổ sung L-cysteine methyl ester hydrochloride 0,06 mol/l. Tiếp tục khuấy hỗn hợp ở nhiệt độ  $60^\circ\text{C}$  trong 1 giờ, thêm 150  $\mu\text{l}$  hexamethyldisilazane/trimethylchlorosilane tỷ lệ 3:1 và khuấy thêm 30 phút. Phần nổi phía trên sau khi ly tâm được tách riêng và cô đặc dưới dòng nitơ. Tiến hành sắc ký cột phần kết tủa bằng dung môi *n*-hexane. Phân đoạn thu được sau đó sẽ được phân tích bởi sắc ký khí (GC), so sánh thời gian lưu (retention time) với các dẫn xuất thiazolidine được điều chế theo cách tương tự từ đường chuẩn để xác định cấu hình tuyệt đối của phân tử đường.

### 3. Kết quả và bàn luận

#### 3.1. Thành phần hóa học của phần lá loài *W. florida* (Bunge) A. DC

Kết quả đánh giá thành phần hóa học của phần lá loài *W. florida* (Bunge) A. DC được thể hiện ở bảng 1.

**Bảng 1. Thành phần hóa học trong cao chiết của phần lá loài *W. florida* (Bunge) A. DC.**

| Nhóm chất            | Thuốc thử                                                               | Hiện tượng        | Kết luận |
|----------------------|-------------------------------------------------------------------------|-------------------|----------|
| Alkaloid             | $\text{H}_2\text{SO}_4 + \text{Dragendorff}$                            | Không             | Không có |
|                      | $\text{H}_2\text{SO}_4 + \text{Mayer}$                                  | Không             |          |
| Tannin               | $\text{FeCl}_3$                                                         | Kết tủa xám       | Có       |
| Glycoside tim        | $\text{CH}_3\text{COOH} + \text{FeCl}_3 + \text{H}_2\text{SO}_4$        | Không             | Không có |
| Flavonoid            | $\text{Mg} + \text{HCl}$                                                | Màu vàng tới xanh | Có       |
| Terpenoid            | $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH} + \text{CHCl}_3 + \text{H}_2\text{SO}_4$ | Màu xanh          | Có       |
| Steroid              | $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH} + \text{H}_2\text{SO}_4$                 | Không             | Không có |
| Triterpenoid saponin | $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH} + \text{HCl} + \text{NaOH}$              | Bọt bền           | Có       |
| Steroid saponin      | $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH} + \text{HCl} + \text{NaOH}$              | Bọt tan nhanh     | Không có |

Kết quả bảng 1 cho thấy, cao chiết không cho phản ứng với thuốc thử  $\text{H}_2\text{SO}_4 + \text{Dragendorff}$  và  $\text{H}_2\text{SO}_4 + \text{Mayer}$ , do đó trong cao chiết không có hợp chất alkaloid. Nhận định này được khẳng định bởi nghiên cứu của R.F. Raffaui (1996) [15] về các loài thực vật có chứa hợp chất alkaloid, trong đó phần lớn các chi thuộc họ Kim ngân (*Caprifoliaceae*) không có hợp chất alkaloid. Tiếp tục định tính flavonoid trong cao chiết bằng phản ứng Shinoda cho kết quả xuất hiện màu

vàng tới xanh trong ống nghiệm, do đó kết luận về sự có mặt của hợp chất flavonoid trong phần lá của loài *W. florida* (Bunge) A. DC. C.S. Chang (1997) [16] đã tiến hành nghiên cứu về thành phần hóa học có trong một số loài thuộc chi *Weigela* và kết luận về sự có mặt của hợp chất flavonoid trong cao chiết. Sự có mặt của thành phần saponin trong cao chiết được xác định bằng phản ứng tạo bọt Salkowski cho kết quả xuất hiện bọt ở cả 2 ống nghiệm, tuy nhiên ở ống nghiệm chứa 5 ml NaOH 0,1 N cho bọt bền, trong khi ở ống nghiệm chứa 5 ml HCl 0,1 N cho bọt tan nhanh, do đó kết luận về sự có mặt của hợp chất triterpenoid saponin trong cao chiết. Kết quả này được khẳng định bởi các nghiên cứu trước đây về thành phần triterpenoid saponin trên một số loài thuộc chi *Weigela* [6, 8-11, 17]. Terpenoid và tannin lần lượt được định tính bởi phản ứng Liebermann - Burchardt và Braymer cho kết quả xuất hiện màu xanh và kết tủa xám trong các ống nghiệm, do đó kết luận về sự có mặt của các hợp chất này trong phần lá của loài *W. florida* (Bunge) A. DC. Tuy nhiên, khi tiến hành định tính các hợp chất khác như glycoside tim và steroid đều không xuất hiện kết quả theo mô tả của thí nghiệm, do đó kết luận các hợp chất này không có trong cao chiết của phần lá loài *W. florida* (Bunge) A. DC.

#### 3.2. Định lượng saponin toàn phần trong cao chiết của phần lá loài *W. florida* (Bunge) A. DC

Cao chiết sau khi thu được bằng phương pháp hỗ trợ vi sóng tiếp tục được loại bỏ các tạp chất bằng phương pháp sắc ký phân bố ngược dòng, kết hợp sử dụng các phương pháp sắc ký hiện đại và đông khô chân không thu được saponin toàn phần. Kết quả xác định hàm lượng saponin toàn phần trong cao chiết của phần lá loài *W. florida* (Bunge) A. DC được thể hiện ở bảng 2.

**Bảng 2. Kết quả xác định hàm lượng saponin toàn phần trong cao chiết của phần lá loài *W. florida* (Bunge) A. DC.**

| STT | Mẫu lá khô (g) | Cao chiết ethanol (g) | Saponin toàn phần (g) | Hàm lượng saponin toàn phần (%) | Giá trị trung bình (%) |
|-----|----------------|-----------------------|-----------------------|---------------------------------|------------------------|
| 1   | 15,6           | 3,9                   | 0,43                  | 2,76                            | 2,66±0,25              |
| 2   | 16,2           | 3,6                   | 0,46                  | 2,84                            |                        |
| 3   | 16,0           | 3,8                   | 0,38                  | 2,38                            |                        |

Kết quả bảng 2 cho thấy, hàm lượng saponin toàn phần đạt 2,66% (wt%). Tuy nhiên, nghiên cứu của Q.Y. Wang và cs (2020) [18] về tách chiết saponin từ loài *Panax notoginseng* đã đưa ra kết luận về ảnh hưởng của phương pháp tách chiết tới hàm lượng saponin toàn phần. Nhóm tác giả kết luận, sử dụng phương pháp tách chiết áp suất lỏng cho hàm lượng saponin toàn phần cao hơn so với các phương pháp chiết Soxhlet và chiết ngâm dầm (Maceration) [18].

Bên cạnh đó, việc lựa chọn dung môi và tỷ lệ các thành phần trong dung môi cũng ảnh hưởng đến hàm lượng saponin toàn phần [19]. Do đó, cần tiếp tục tiến hành nghiên cứu hàm lượng saponin toàn phần, sử dụng các phương pháp tách chiết khác như Soxhlet, Maceration, chiết hỗ trợ sóng âm (ultrasound assisted extraction), đồng thời đánh giá trên nhiều loại dung môi khác nhau để tối ưu phương pháp tách chiết hàm lượng saponin toàn phần trong phần lá của loài *W. florida* (Bunge) A. DC.

### 3.3. Xác định cấu trúc hóa học của hợp chất WeFJ2210

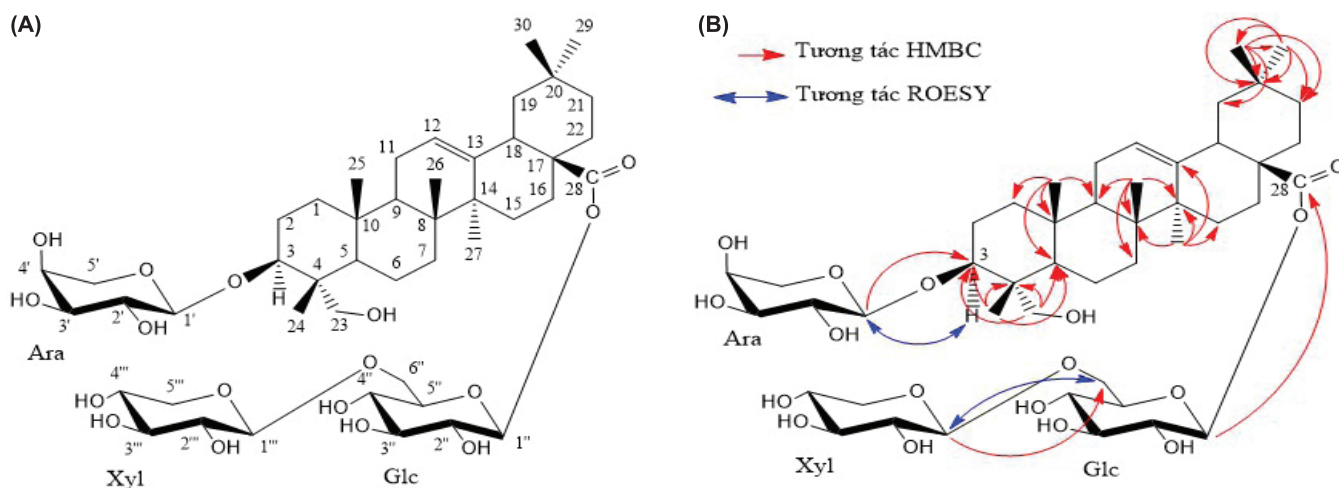
Dữ liệu từ phổ ESI-MS cho kết quả một pic ion phân tử tại  $m/z$  921,4839  $[M + Na]^+$ , từ đó kết luận khối lượng phân tử của hợp chất WeFJ2210 là 898, tương ứng với công thức phân tử là  $C_{46}H_{74}O_{17}$ .

Dữ liệu từ phổ  $^{13}C$ -NMR cho thấy, trên vùng aglycone của hợp chất WeFJ2210 có 6 carbon bậc 1 ( $CH_3$ ), 11 carbon bậc 2 ( $CH_2$ ), 5 carbon bậc 3 ( $CH$ ) và 8 carbon bậc 4 ( $C$ ). Ngoài ra, 2 tín hiệu  $\delta_C$  124,9 và 145,6 gợi ý sự xuất hiện của một liên kết đôi tại vị trí 12 của phần aglycone. Dữ liệu của phổ  $^1H$ -NMR cho thấy, có 6 tín hiệu dạng vạch đơn (signet) tại  $\delta_H$  0,84, 0,91, 1,05, 1,14, 0,80 và 0,81, tương ứng với 6 tín hiệu  $CH_3$  tại các vị trí 24, 25, 26, 27, 29 và 30 của phần aglycone (bảng 3). Proton olefin tại  $\delta_H$  5,26 (1 H, 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  $^1H$ -NMR trên vùng aglycone còn cho các tín hiệu của nhóm oxymethine proton  $\delta_H$  4,16 tại vị trí 3 và nhóm chức OH  $\delta_H$  3,60 và 4,17 tại vị trí 23. Các tín hiệu từ phổ  $^{13}C$ -NMR và  $^1H$ -NMR trên cho thấy có sự trùng khớp với phần 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  $\delta_C$  83,5 (C-3) và upfield tại  $\delta_C$  178,0 (C-28) gợi ý về cấu trúc của hợp chất WeFJ2210 có dạng glycoside 2 mạch đường.

Quan sát trên phổ NMR 2 chiều HSQC cho thấy có 3 proton xuất hiện trên vùng anomeric tại  $\delta_H$  4,95 (d,  $J=7,0$  Hz), 4,82 (d,  $J=7,6$  Hz), 6,15 (d,  $J=8,2$  Hz) và 3 carbon tương ứng tại  $\delta_C$  107,7, 106,8 và 96,8. Tiếp tục nghiên cứu trên các phổ NMR 2 chiều HMBC, COSY, TOCSY và ROESY, kết hợp với kết quả thủy phân axit đưa ra kết luận về sự có mặt của 4 phân tử đường gồm  $\alpha$ -L-arabinopyranosyl (Ara),  $\beta$ -D-xylopyranosyl (Xyl) và  $\beta$ -D-glucopyranosyl (Glc). Cấu hình tuyệt đối của các phân tử đường được xác định là D cho Glc và Xyl; L cho Ara 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 và Glc trong khoảng 5,0-8,2 Hz xác định dạng  $\alpha$  anomeric cho phân tử đường Ara và dạng  $\beta$  anomeric cho phân tử đường Xyl và Glc.

Chuỗi oligosaccharide của hợp chất WeFJ2210 được thiết lập dựa trên phân tích phổ NMR 2 chiều HMBC và ROESY. Cụ thể, tương tác HMBC giữa  $\delta_H$  4,95 (Ara H-1) và  $\delta_C$  83,5 (aglycone C-3); tương tác ROESY giữa  $\delta_H$  4,95 (Ara H-1) và  $\delta_H$  4,17 (aglycone H-3) xác định phân tử đường Ara liên kết vào vị trí C-3 của phần aglycone. Tín hiệu upfield tại  $\delta_C$  96,0 (Glc C-1) và  $\delta_C$  178,8 (aglycone 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 [20]. Ngoài ra, tương tác HMBC giữa  $\delta_H$  4,82 (Xyl H-1) và  $\delta_C$  70,2 (Glc C-6); tương tác ROESY giữa  $\delta_H$  4,82 (Xyl H-1) và  $\delta_H$  4,25 (Glc H-6) khẳng định phân tử đường Xyl liên kết với vị trí C-6 của phân tử đường Glc.



Hình 3. Cấu trúc hóa học của hợp chất WeFJ2210. (A) Công thức được đánh số vị trí carbon; (B) Tương tác HMBC và ROESY.

Từ những dẫn chứng trên thiết lập được cấu trúc hóa học của hợp chất WeFJ2210 là 3-*O*- $\alpha$ -L-arabinopyranosylhederagenin 28-*O*- $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopyranosyl ester (hình 3). Hợp chất này được phân lập lần đầu tiên từ phần thân lá của loài *Lonicera japonica* [21].

**Bảng 3. Dữ liệu phổ  $^1\text{H-NMR}$  và  $^{13}\text{C-NMR}$  của hợp chất WeFJ2210.**

| Phần aglycone |                  |                     | Phần đường |                  |                     |
|---------------|------------------|---------------------|------------|------------------|---------------------|
| Carbon        | $\delta_c$ (ppm) | $\delta_H$ (Hz)     | Carbon     | $\delta_c$ (ppm) | $\delta_H$ (Hz)     |
| 1             | 40,1             | 0,96 m, 1,50 m      | Ara-1      | 107,7            | 4,95 d (7,0)        |
| 2             | 27,2             | 1,94 m, 2,16 m      | 2          | 74,1             | 4,38                |
| 3             | 83,5             | 4,17                | 3          | 75,7             | 4,08                |
| 4             | 44,7             | —                   | 4          | 70,8             | 4,22                |
| 5             | 48,8             | 1,59 d (1,57)       | 5          | 68               | 3,69 d (11,1), 4,22 |
| 6             | 19,6             | 1,27, 1,62          | Xyl-1      | 106,8            | 4,82 d (7,6)        |
| 7             | 34,0             | 1,60, 1,67          | 2          | 76,1             | 3,92                |
| 8             | 41,2             | —                   | 3          | 79,1             | 4,07                |
| 9             | 49,4             | 1,69                | 4          | 72,5             | 4,10                |
| 10            | 38,1             | —                   | 5          | 68,1             | 3,55 d (10,0), 4,21 |
| 11            | 24,9             | 1,86, 1,97          | Glc-1      | 96,8             | 6,15 d (8,2)        |
| 12            | 124,3            | 5,26 t-like         | 2          | 75,5             | 4,08                |
| 13            | 145,6            | —                   | 3          | 79,5             | 4,20                |
| 14            | 43,4             | —                   | 4          | 71,8             | 4,29                |
| 15            | 29,8             | 1,49, 1,98          | 5          | 79,0             | 4,03 m              |
| 16            | 24,7             | 1,96, 2,10          | 6          | 70,2             | 4,25, 4,60          |
| 17            | 47,6             | —                   |            |                  |                     |
| 18            | 43,1             | 3,11                |            |                  |                     |
| 19            | 47,5             | 1,14, 1,65          |            |                  |                     |
| 20            | 32,1             | —                   |            |                  |                     |
| 21            | 35,0             | 1,02 m, 1,25 m      |            |                  |                     |
| 22            | 33,6             | 1,75, 1,94          |            |                  |                     |
| 23            | 65,5             | 3,60 d (11,1), 4,17 |            |                  |                     |
| 24            | 14,8             | 0,84 s              |            |                  |                     |
| 25            | 17,4             | 0,91 s              |            |                  |                     |
| 26            | 18,8             | 1,05 s              |            |                  |                     |
| 27            | 27,3             | 1,14 s              |            |                  |                     |
| 28            | 178,0            | —                   |            |                  |                     |
| 29            | 34,3             | 0,80 s              |            |                  |                     |
| 30            | 25,0             | 0,81 s              |            |                  |                     |

Nghiên cứu về đánh giá hoạt tính sinh học của hợp chất WeFJ2210 trên dòng tế bào ung thư CT26, B16 và HepG2 cho thấy, hợp chất này không có hoạt tính gây độc trên các dòng tế bào ung thư nêu trên. Nhóm tác giả kết luận rằng, sự ester hóa tại vị trí C-28 và sự xuất hiện của nhóm OH tại vị trí C-3 của phần aglycone dẫn tới sự bất hoạt của hoạt tính gây độc trên 3 dòng tế bào ung thư CT26, B16 và HepG2 của hợp chất triterpenoid saponin có aglycone dạng hederagenin [11]. Nhận định này được khẳng định bởi nghiên cứu của S.C. Bang và cs (2005) [22] về hoạt tính gây độc trên dòng tế bào ung thư A-549, SK-OV-3, SK-MEL-2 và HCT15 của hợp chất triterpenoid saponin có aglycone dạng hederagenin phân lập từ loài *Pulsatilla koreana*. Tuy nhiên, hợp chất có phần aglycone dạng này là Loniceroside A và Loniceroside C được phân lập từ chi *Lonicera* có hoạt tính kháng viêm và kháng khuẩn mạnh trên vết phù nề gây ra bởi dầu croton trên tai chuột [23]. Ngoài ra, hoạt tính kháng các loại vi khuẩn gram dương *S. aureus*, *S. epidermidis* và gram âm *P. aeruginosa*, *E. coli*, *E. cloacae*, *K. pneumoniae* cũng được thể hiện trên một số hợp chất saponin dạng này [24]. Do đó, cần tiếp tục nghiên cứu đánh giá các hoạt tính sinh học khác như kháng viêm, kháng khuẩn của hợp chất WeFJ2210, từ đó có kết luận tổng quan về hoạt tính sinh học của hợp chất này, góp phần hoàn thiện phân loại hoá học thực vật đối với các loài thuộc chi *Weigela* nói riêng và họ *Caprifoliaceae* nói chung.

#### 4. Kết luận

Trong nghiên cứu này, cao chiết từ phần lá của loài *W. florida* (Bunge) A. DC chứa các nhóm hợp chất flavonoid, tannin, terpenoid, triterpenoid saponin và không có các nhóm hợp chất glycoside tim, alkaloid và steroid. Hàm lượng saponin toàn phần trong cao chiết chiếm tỷ lệ 2,66% (wt%) so với mẫu thô ban đầu. Hợp chất triterpenoid saponin có phần aglycone dạng hederagenin đã được phân lập và làm sáng tỏ cấu trúc hóa học. Hợp chất này đã được công bố có nhiều hoạt tính sinh học. Vì vậy, cần tiếp tục nghiên cứu để làm rõ mối liên quan giữa hoạt tính của hợp chất này cũng như các thành phần hóa học khác của loài *W. Florida* (Bunge) A. DC nhằm giải thích trên cơ sở khoa học kinh nghiệm sử dụng trong dân gian.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] B. Field, F. Jordán, A. Osbourn (2006), "First encounters - deployment of defence-related natural products by plants", *New Phytol.*, **172**(2), pp.193-207, DOI: 10.1111/j.1469-8137.2006.01863.x.
- [2] Y. Li, D. Kong, Y. Fu, et al. (2020), "The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants", *Plant Physiol. Biochem.*, **148**, pp.80-89, DOI: 10.1016/j.plaphy.2020.01.006.
- [3] G. Sanchita, A. Sharma (2018), "Chapter 23 - Gene expression analysis in medicinal plants under abiotic stress conditions", *Plant Metabolites and Regulation Under Environmental Stress*, Academic Press, pp.407-414, DOI: 10.1016/B978-0-12-812689-9.00023-6.
- [4] H.J. Lim, E.Y. Jie, I.S. Park, et al. (2021), "Anti-inflammatory effects of *Weigela subsessilis* callus extract via suppression of MAPK and NF- $\kappa$ B signaling", *Plants*, **10**(8), DOI: 10.3390/plants10081635.
- [5] Y.C. Yoo, G.W. Lee, Y.H. Cho (2016), "Antioxidant and anti-inflammatory effects of extracts from the flowers of *Weigela subsessilis* on RAW 264.7 macrophages", *J. Life Sci.*, **26**(3), pp.338-345, DOI: 10.5352/JLS.2016.26.3.338.
- [6] P.T. Thuong, B.S. Min, W.Y. Jin, et al. (2006), "Anti-complementary activity of ursane-type triterpenoids from *Weigela subsessilis*", *Biol. Pharm. Bull.*, **29**(4), pp.830-833, DOI: 10.1248/bpb.29.830.
- [7] A.S.C. Tixier, A.C.M. Offer, F.R. Fernandez (2018), "Oleanane-type glycosides from the roots of *Weigela florida* 'rumba' and evaluation of their antibody recognition", *Fitoterapia*, **128**, pp.198-203, DOI: 10.1016/j.fitote.2018.04.017.
- [8] D.H. Nguyen, A.C.M. Offer, S. Maroso, et al. (2019), "Cytotoxic glycosides from the roots of *Weigela* x 'Bristol Ruby'", *Fitoterapia*, **137**, DOI: 10.1016/j.fitote.2019.104242.
- [9] A. Rezgui, A.C.M. Offer, T. Miyamoto, et al. (2016), "Oleanolic acid and hederagenin glycosides from *Weigela stenzneri*", *Phytochemistry*, **123**, pp.40-47, DOI: 10.1016/j.phytochem.2015.12.016.
- [10] N. Andriamisaina, A.C.M. Offer, B. Pruvot, et al. (2018), "Phytochemistry of *Weigela* x 'kosteriana variegata' (Caprifoliaceae)", *Nat. Prod. Commun.*, **13**(4), pp.403-406, DOI: 10.1177/1934578X1801300406.
- [11] D.H. Nguyen, A.C.M. Offer, T. Miyamoto (2020), "Phytochemical analysis of two *Weigela florida* cultivars, 'Pink Poppet' and 'Jean's Gold'", *Phytochem. Lett.*, **37**, pp.85-89, DOI: 10.1016/j.phytol.2020.04.009.
- [12] A. Alqethami, A.Y. Aldhebiani (2021), "Medicinal plants used in Jeddah, Saudi Arabia: Phytochemical screening", *Saudi J. Biol. Sci.*, **28**(1), pp.805-812, DOI: 10.1016/j.sjbs.2020.11.013.
- [13] L. Traore, Y.A. Bekro, J.L. Pirat, et al. (2015), "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.*, **7**(3), pp.22-26.
- [14] T. Namba, M. Yoshizaki, T. Tomimori (1974), "Fundamental studies on the evaluation of the crude drugs. 3. Chemical and biochemical evaluation of Ginseng and related crude drugs", *Yakugaki Zasshi*, **94**(2), pp.252-260, DOI: 10.1248/yakushi1947.94.2\_252.
- [15] R.F. Raffa (1996), *Plant Alkaloids: A Guide to Their Discovery and Distribution*, Food Products Press, 279pp.
- [16] C.S. Chang (1997), "Flavonoid chemistry of *Weigela* (Caprifoliaceae) in Korea", *J. Plant Res.*, **110**(2), pp.275-281, DOI: 10.1007/BF02509316.
- [17] Y.M. Won, Z.K. Seong, J.L. Kim, et al. (2015), "Triterpene glycosides with stimulatory activity on melanogenesis from the aerial parts of *Weigela subsessilis*", *Arch. Pharm. Res.*, **38**(8), pp.1541-1551, DOI: 10.1007/s12272-014-0524-0.
- [18] Q.Y. Wang, X. Dong, J. Yang, et al. (2020), "Vesicle based ultrasonic-assisted extraction of saponins in *Panax notoginseng*", *Food Chem.*, **303**, DOI: 10.1016/j.foodchem.2019.125394.
- [19] C.Y. Cheok, H. Salman, R. Sulaiman, et al. (2014), "Extraction and quantification of saponins: A review", *Food Res. Int.*, **59**, pp.16-40, DOI: 10.1016/j.foodres.2014.01.057.
- [20] Q. Zheng, K. Koike, L.K. Han, et al. (2004), "New biologically active triterpenoid saponins from *Scabiosa tschiliensis*", *J. Nat. Prod.*, **67**(4), pp.604-613, DOI: 10.1021/np0304722.
- [21] K.H. Son, K.Y. Jung, H.W. Chang, et al. (1994), "Triterpenoid saponins from the aerial parts of *Lonicera japonica*", *Phytochemistry*, **35**(4), pp.1005-1008, DOI: 10.1016/S0031-9422(00)90656-3.
- [22] S.C. Bang, J.H. Lee, G.Y. Song, et al. (2005), "Antitumor activity of *Pulsatilla koreana* saponins and their structure-activity relationship", *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **53**(11), pp.1451-1454, DOI: 10.1248/cpb.53.1451.
- [23] W.J. Kwak, C.K. Han, H.W. Chang, et al. (2003), "Loniceroside C, an anti-inflammatory saponin from *Lonicera japonica*", *Chem. Pharm. Bull.*, **51**(3), pp.333-335, DOI: 10.1248/cpb.51.333.
- [24] S. Pasi, N. Aligiannis, H. Pratsinis, et al. (2009), "Biologically active triterpenoids from *Cephalaria ambrosioides*", *Planta Med.*, **75**(02), pp.163-167, DOI: 10.1055/s-0028-1088391.