

PHÂN LẬP BẰNG HPLC ĐIỀU CHẾ VÀ ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH CỦA CRINAMIDIN TỪ TRINH NỮ HOÀNG CUNG (*CRINUM LATIFOLIUM*)

● NGUYỄN THỊ MỸ THẢO - TẠ NGUYỄN ANH THƯ
- TRƯƠNG TƯỜNG VY - VŨ HUỖNH KIM LONG*

TÓM TẮT:

Trinh nữ hoàng cung (*Crinum latifolium*, *Amaryllidaceae*) là một dược liệu được sử dụng rộng rãi để điều trị các bệnh u đường tiết niệu và sinh dục. Dược điển Việt Nam V sử dụng crinamidin làm chất đánh dấu trong định tính và định lượng dược liệu này. Tuy nhiên, hiện nay, chất chuẩn này trên thị trường có giá thành khá cao. Vì vậy, nghiên cứu này sử dụng ra phương pháp HPLC điều chế để phân lập được 504,1 mg hợp chất này có độ tinh khiết (98,95%). Hợp chất này thể hiện tác dụng kháng viêm trên tế bào RAW264.7 với IC_{50} là 158,13 $\mu\text{g/ml}$ và kháng ung thư mạnh nhất trên dòng tế bào A549 (ức chế 46,58% ở nồng độ 100 $\mu\text{g/ml}$). Kết quả bước đầu cho thấy, hợp chất này góp phần vào tác dụng chống viêm và chống khối u của dược liệu trinh nữ hoàng cung.

Từ khóa: trinh nữ hoàng cung, crinamidin, kháng viêm, kháng ung thư, HPLC điều chế.

1. Đặt vấn đề

Ngày nay, các bệnh về tiết niệu sinh dục như u nang buồng trứng, u xơ tử cung ở nữ giới và phì đại tuyến tiền liệt ở nam giới ngày càng phổ biến khi bước qua độ tuổi 50. Trinh nữ hoàng cung (*Crinum latifolium*, *Amaryllidaceae*) được sử dụng trong dân gian từ lâu để chữa các bệnh này và đã có nhiều sản phẩm trên thị trường với dạng bào chế hiện đại [2]. Thành phần hóa học của lá TNHC chủ yếu là các alkaloid khung lycorin (lycorin, pratorimine...), crinin (ambellin, powellin, crinamidin...) [5]. Dược điển Việt Nam V quy định sử dụng crinamidin làm chất chuẩn sử dụng trong định tính và định lượng dược liệu này [1]. Tuy nhiên hiện nay, trên thị trường, rất ít đơn vị cung cấp chất chuẩn này và giá thành rất cao gây khó khăn cho việc kiểm soát chất

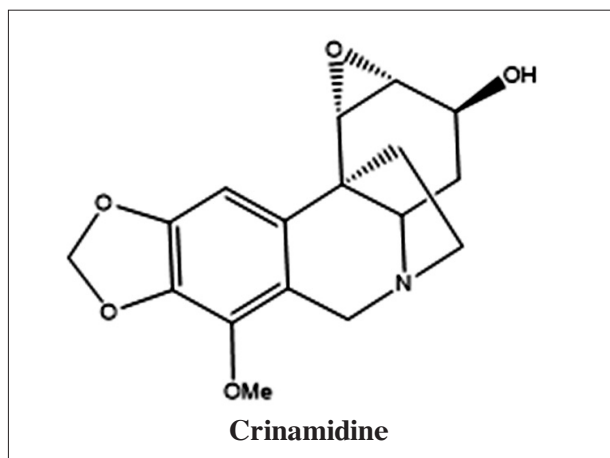
lượng nguyên liệu cũng như thành phẩm chứa trinh nữ hoàng cung. Do đó, mục tiêu của nghiên cứu nhằm đề xuất phương pháp phân lập crinamidin đơn giản, rẻ tiền, nhằm phục vụ công tác kiểm nghiệm. Bên cạnh đó, nghiên cứu cũng bước đầu đánh giá tác dụng chống ung thư và kháng viêm của hợp chất này. (Hình 1)

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Lá trinh nữ hoàng cung khô (10 kg) được cung cấp bởi Công ty Thiên Dược. Nguyên liệu được định tính bằng sắc ký lớp mỏng theo quy định của chuyên luận trinh nữ hoàng cung của Dược điển Việt Nam V [1]. Mẫu được lưu tại Phòng Nghiên cứu Phát triển, Khoa Dược, Trường Đại học Tôn Đức Thắng, mã lưu số NP-05-22.

Hình 1: Hợp chất Crinamidine



2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp chung

Sắc ký cột được thực hiện trên cột silica gel (Merck, Đức), kích thước 230-400 mesh. Sắc ký lớp mỏng được thực hiện trên bản mỏng silica gel 60 F254 tráng sẵn trên nền nhôm (Merck, Đức), phát hiện bằng thuốc thử Dragendorff. Sắc ký lỏng điều chế được thực hiện trên hệ thống LC-8A với đầu dò UV 285 nm sử dụng cột Supelco C18 25×2,12cm, 10 μ M. Phổ khối được đo trên hệ thống Agilent 1260 Infinity với đầu dò MSD SingleQuad 6135B ở chế độ ion dương với fragmentor 70 V. Phổ cộng hưởng từ hạt nhân được đo bằng máy Bruker NMR 600 MHz (Mỹ) sử dụng CDCl_3 làm dung môi đo.

2.2.2. Chiết xuất và phân lập

Lá TNHC (10 kg) được xay nhỏ và chiết ngấm kiệt với ethanol 96%. Dịch chiết được cô dưới áp suất giảm thu được cao toàn phần. Cao toàn phần được phân tán với nước và acid hóa đến pH 3-4 bằng acid acetic, sau đó chiết phân bố với *n*-hexan (6×500 ml), loại bỏ lớp *n*-hexan. Dịch nước tiếp tục được kiềm hóa bằng NH_4OH đến pH 9-10 và chiết phân bố với chloroform (6×500 ml). Gộp các dịch chloroform và cô dưới áp suất giảm thu được cao alkaloid toàn phần (ATP - 34,1 g). Cao ATP phân tách bằng cột silica gel cổ điển thu được với hệ dung môi CHCl_3 - MeOH - NH_3 (9:0.5:0.05) thu được 7 phân đoạn TN1-7. Các phân đoạn được phân tích bằng LC-ESI-MS và phân đoạn crinamidine ($[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 317.9) được tinh chế

bằng sắc ký lỏng điều chế với pha động acetonitrile và đệm phosphat pH 9,0 (22:78), tốc độ dòng 15 ml/phút, thể tích tiêm mẫu 5 ml. Dịch rửa giải được cô loại dung môi hữu cơ và chiết phân bố với chloroform. Dịch chloroform được làm khan bằng natri sulfat và cô đuổi dung môi thu được hợp chất tinh khiết.

2.2.3. Đánh giá độ tinh khiết

Crinamidin phân lập được đánh giá độ tinh khiết bằng sắc ký lớp mỏng với 3 hệ dung môi (a) CHCl_3 -MeOH (9:1), (b) CHCl_3 -MeOH- NH_4OH (7:1:0.05), (c) CHCl_3 -isopropanol- NH_4OH (4:4:0.5). Bản mỏng được quan sát ở UV 254 nm, 365 nm và phun thuốc thử dragendorff, quan sát ở ánh sáng thường. Độ tinh khiết HPLC được đánh giá sử dụng điều kiện pha động và phát hiện được mô tả ở chỉ tiêu Định lượng, chuyên luận trình nữ hoàng cung của Dược điển Việt Nam V, trang 1361 [1]. Độ tinh khiết được tính toán dựa vào phương pháp quy về 100% diện tích đỉnh với mẫu thử là hợp chất phân lập có nồng độ 1 mg/ml.

2.2.4. Xác định cấu trúc

Hợp chất crinamidine được xác định cấu trúc dựa vào phổ ESI-MS và phổ ^1H và ^{13}C -NMR dựa vào tài liệu tham khảo.

2.2.5. Đánh giá tác dụng kháng viêm

Tế bào RAW 274.7 được nuôi trong môi trường DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) được bổ sung 10% huyết thanh nhau thai bê (FBS), 2 mM L-glutamine, 10 mM HEPES và 1,0 mM sodium pyruvate trong môi trường chứa 5% CO_2 ở điều kiện 37°C. Sau khi đạt mật độ 70-80%, tế bào được cấy chuyển vào đĩa 96 giếng ở nồng độ 2×10^5 tế bào/giếng và ủ trong 24 giờ. Sau khi tế bào đã bám dính, loại bỏ môi trường cũ và thay bằng môi trường DMEM không có FBS trong 3 giờ. Tế bào sau đó được ủ với mẫu thử crinamidin (0,8-200 $\mu\text{g/ml}$) hoặc đối chứng dương dexamethason (0,8-100 $\mu\text{g/ml}$) trong 2 giờ trước khi được kích thích sản sinh yếu tố NO bằng lipopolysaccharid (LPS) 10 $\mu\text{g/ml}$ trong 24 giờ. Các giếng chỉ ủ với dung môi pha mẫu được coi là đối chứng âm. Môi trường ủ mẫu (100 μl) được chuyển sang đĩa 96 giếng mới và thêm vào 100 μl thuốc thử Griess chứa 1% (*kl/tt*) sulfanilamide trong 5% (*tt/tt*) phosphoric acid và 50 μL 0.1% (*kl/tt*) N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride pha

trong nước (Promega Cooperation, WI, USA). Hỗn hợp được ủ ở nhiệt độ phòng trong 10 phút và đo quang ở bước sóng 540 nm. Hàm lượng nitrite của từng mẫu được xác định dựa vào đường tuyến tính nồng độ chuẩn NaNO_2 và so sánh với chứng âm chỉ có LPS. Khả năng ức chế sản sinh NO được xác định theo công thức (1).

$$\% \text{ ức chế} = 100 - \frac{\text{Hàm lượng NO}_{\text{mẫu thử}}}{\text{Hàm lượng NO}_{\text{mẫu trắng}}} \times 100 \quad (1)$$

Phép thử được lặp lại 3 lần và nồng độ ức chế 50% sự hình thành NO (IC_{50}) được xác định bằng phần mềm máy tính Table Curve (2Dv4). Mức độ sống của tế bào được xác định bằng phương pháp MTT [8].

2.2.6. Đánh giá tác dụng chống ung thư

Phép thử này được thực hiện theo phương pháp của Skehan et al. (1990) [4]. Tế bào được nuôi cấy trong môi trường DMEM hoặc MEME (Minimum Essential Medium with Eagle salt), có bổ sung thêm L-glutamine, sodium pyruvat, NaHCO_3 , penicillin/streptomycin, 10% FBS và được ủ trong điều kiện 37°C , 5% CO_2 . Khi mật độ tế bào đạt 70-80%, chuyển tế bào vào đĩa 96 giếng để thử nghiệm. Các mẫu thử được hòa tan trong DMSO 100% để có nồng độ ban đầu là 20 mg/ml. Thêm 10 μl mẫu thử 20X đã pha loãng ở các nồng độ vào các giếng của đĩa 96 giếng đã chuẩn bị tế bào ở trên. Giếng chứng có tế bào ung thư (190 μl) + DMSO 1% (10 μl) sẽ được sử dụng làm đối chứng ngày 0. Tất cả các giếng đều có nồng độ DMSO 0,05%. Tế bào được ủ trong tủ ấm trong 72 giờ, sau đó được cố định bằng trichloroacetic acid (TCA) trong 1 giờ, được nhuộm bằng Sulforhodamine B (SRB) trong 30 phút ở 37° , rửa 3 lần bằng acetic acid. SRB được hòa tan bằng unbuffered Tris base 10 mM và đo mật độ quang ở bước sóng 540 nm trên máy ELISA (Biotek). Ellipticine ở các nồng độ 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 0,4 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 0,08 $\mu\text{g}/\text{ml}$ được sử dụng như chứng dương. Phần trăm ức chế sự phát triển của tế bào được xác định bằng công thức (2):

$$\% \text{ ức chế} = \frac{100\% - \text{OD}_{\text{mẫu}} - \text{OD}_{\text{ngày 0}}}{\text{OD}_{\text{DMSO}} - \text{OD}_{\text{ngày 0}}} \times 100 \quad (2)$$

Nồng độ ức chế 50% sự phát triển (IC_{50}) được xác định bằng phần mềm TableCurve 2Dv4.

3. Kết quả

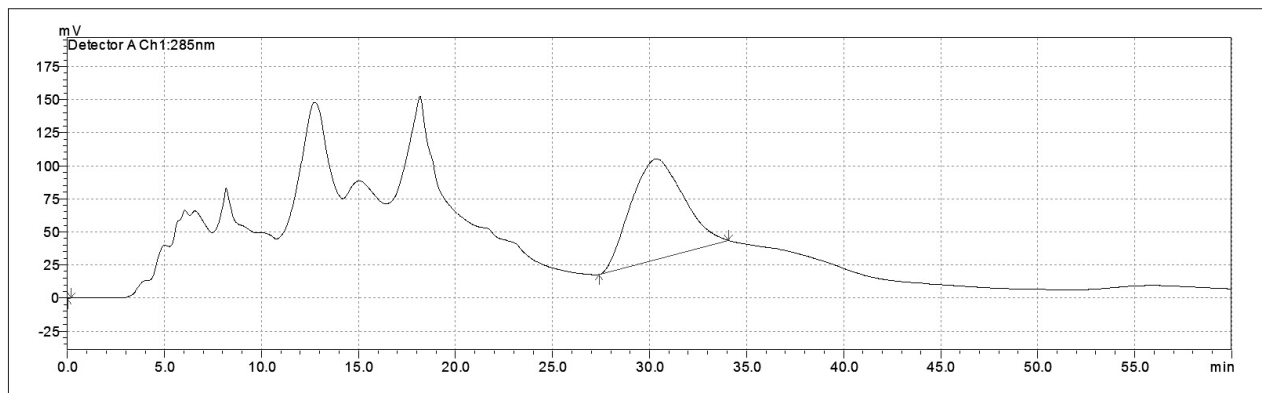
3.1. Phân lập crinamidin

Từ 10 kg lá khô TNHC chiết ngâm kiệt thu được 1,6 g cao đặc. Quá trình chiết phân bố lỏng-lỏng thu được 96,29 g cao alkaloid toàn phần. Cao alkaloid toàn phần được khai triển bằng sắc ký cột cổ điển với pha tĩnh silica gel và hệ dung môi pha động $\text{CHCl}_3\text{-MeOH-NH}_3$ (9:0.5:0.05) thu được 7 phân đoạn (TN1-7). Kết quả khảo sát bằng LC-ESI-MS cho thấy phân đoạn TN-4 (3,91 g) giàu hợp chất có phổ MS tương đồng với crinamidine. Việc sử dụng đầu dò ESI-MS để xác định sự có mặt của crinamidin giúp xác định chính xác phân đoạn chứa chất quan tâm mà không cần sử dụng chất chuẩn vốn rất đắt tiền và hiếm trên thị trường Việt Nam. Phân đoạn này được tinh chế bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao điều chế thu được phân đoạn tương ứng với đỉnh có thời gian lưu 30,3 phút (Hình 2). Việc sử dụng hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao điều chế giúp tận dụng khả năng phân tách rất tốt của cột sắc ký điều chế có kích thước hạt nhỏ (10 μm) giúp tăng đáng kể độ phân giải của đỉnh tương ứng với chất quan tâm so với các tạp chất. Ngoài ra, hệ thống sắc ký lỏng điều chế được trang bị đầu dò giúp phát hiện và thu được chính xác đỉnh tương ứng với crinamidin. Việc lựa chọn pha tĩnh liên quan mật thiết đến bản chất của chất cần phân lập. Crinamidin là hợp chất alkaloid có tính kiềm. Do đó, phương pháp sắc ký pha đảo cần sử dụng hệ dung môi pha động có chứa đệm phosphat ở pH 9,0, giúp chuyển các alkaloid thành dạng phân tử kém phân cực lưu giữ tốt trên cột nên có thể tách tốt với các tạp. Tuy nhiên, dịch rửa giải thu được có chứa các muối trong dung dịch đệm nên cần được loại bỏ bằng cách cô loại dung môi hữu cơ sau đó lặc phân bố với chloroform. Crinamidin là hợp chất alkaloid trong môi trường kiềm tồn tại ở dạng phân tử kém phân cực nên có thể tan tốt trong dung môi hữu cơ kém phân cực. Lớp chloroform được rửa lại bằng cách lặc phân bố với nước và làm khan bằng natri sulfate, cô dưới áp suất giảm thu được 504,1 mg hợp chất 1.

3.2. Đánh giá độ tinh khiết

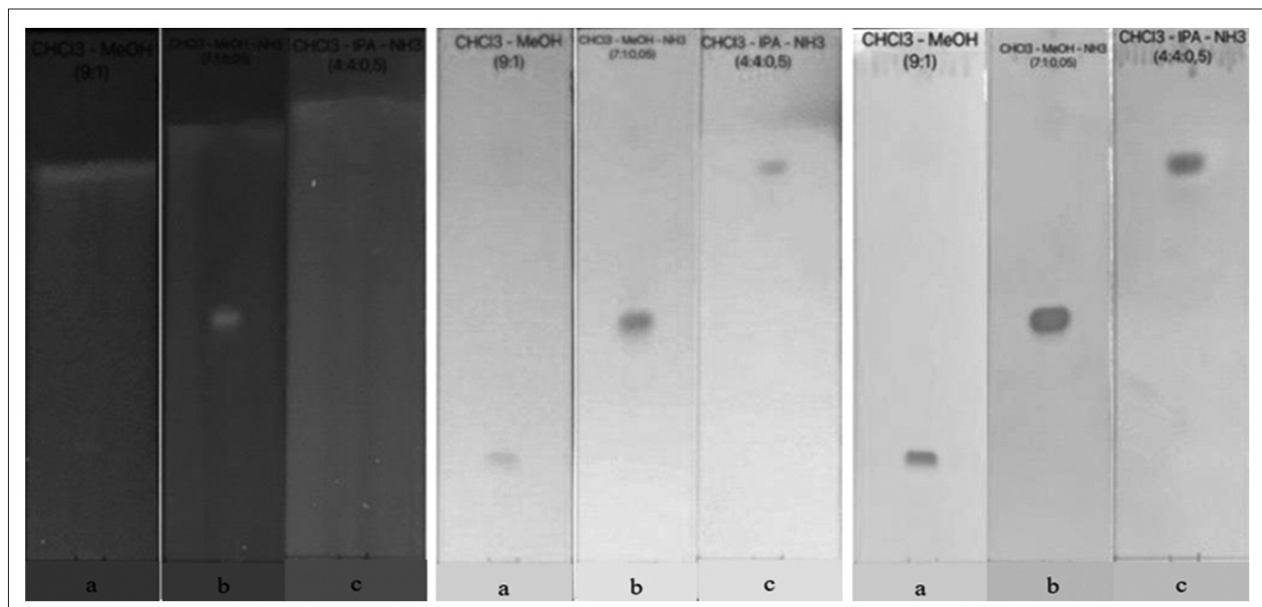
Kết quả sắc ký lớp mỏng ở 3 cho thấy hợp chất 1 chỉ cho một vết trên bảng mỏng sắc ký. Điều này

Hình 2: Sắc lý đồ HPLC điều chế phân lập hợp chất 1 từ phân đoạn TN-4



Hình 3: Bảng mỏng sắc ký đánh giá độ tinh khiết của crinamidine phân lập

(a) CHCl_3 -MeOH (9:1), (b) CHCl_3 -MeOH- NH_4OH (7:1:0.05), (c) CHCl_3 -isopropanol- NH_4OH (4:4:0.5)



cho thấy hợp chất phân lập được tinh khiết trên bảng mỏng sắc ký. Sắc ký đồ HPLC-UV ở 4 cho thấy hợp chất phân lập có độ tinh khiết 98,95% với một peak ở thời gian lưu 21,75 phút.

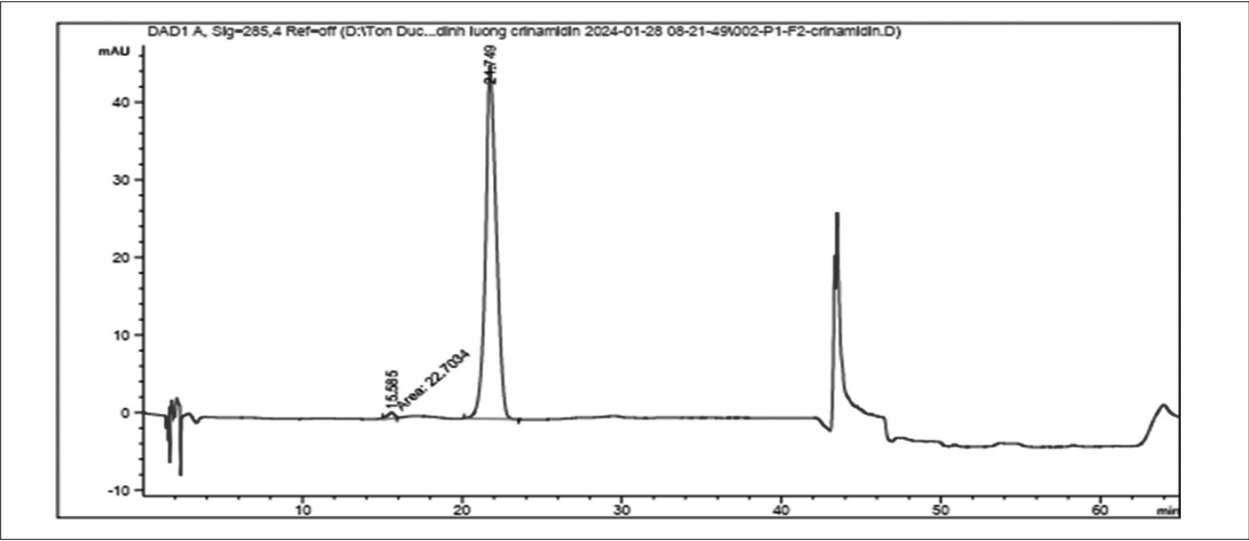
3.3. Xác định cấu trúc

Hợp chất X phân lập dạng tinh thể màu trắng có phổ cho mảnh ion phân tử m/z 318,1285 tương ứng với ion phân tử $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 318,1316 phù hợp với công thức $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{NO}_5$ ($M = 317$ đvC). Dữ liệu phổ $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, ppm, CDCl_3) và $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, ppm, CDCl_3) của hợp chất X phù hợp với crinamidin công bố theo tài liệu tham khảo [3].

3.4. Tác dụng chống ung thư

Hợp chất crinamidine được đánh giá tác dụng chống ung thư trên 4 dòng tế bào ung thư gồm MCF-7, HepG2, HT-29 và A549. Kết quả cho thấy hợp chất này có khả năng ức chế mạnh sự phát triển của tế bào A549 với tỷ lệ ức chế 46,58% ở nồng độ 100 $\mu\text{g/ml}$. Hợp chất này cũng thể hiện tác dụng ứng chế trung bình đối với các dòng tế bào MCF-7, HepG2, HT-29 với tỷ lệ ức chế ở nồng độ 100 $\mu\text{g/ml}$ lần lượt là 34,17%, 33,58%, 31,68%. Điều này phần nào giải thích được tác dụng chống ung thư của cao toàn phần

Hình 4: Sắc ký độ HPLC-UV đánh giá độ tinh khiết của crinamidin phân lập



Bảng 1. Dữ liệu phổ ¹H-NMR (600 MHz, ppm, CDCl₃) và ¹³C-NMR (125 MHz, ppm, CDCl₃) của hợp chất X so sánh với crinamidin

Vị trí	Hợp chất 1		Crinamidin [3]	
	δ_C (125 MHz, ppm, CDCl ₃)		δ_H (600 MHz, ppm, CDCl ₃)	
	d_C , ppm	d_H , ppm	d_C , ppm	d_H , ppm
1	53,8	3,77	53,8	3,75
2	56,5	3,27	56,4	3,26
3	65,4	4,48	65,5	4,48
4	29,7	1,56 - 1,61	29,7	1,56 - 1,61
4a	61,0	3,17	61,0	3,17
6	58,5	3,70 - 4,18	58,60	3,71 - 4,19
6a	117,5	-	117,6	-
7	141,1	-	141,1	-
8	133,4	-	133,4	-
9	148,2	-	148,1	-
10	96,5	6,63	96,4	6,61
10a	138,7	-	138,7	-
10b	41,7	-	41,6	-
11	39,1	2,00 - 2,37	39,2	2,00 - 2,37
12	52,4	2,77 - 3,17	52,5	2,77 - 3,17
13	100,7	5,86 - 5,87	100,7	5,85 - 5,86
14	59,1	3,54	59,1	3,59

trình nữ hoàng cung đã được chứng minh bằng thực nghiệm [7], cũng như sử dụng từ lâu để điều trị khối u theo y học cổ truyền. Điều này gợi ý rằng trình nữ hoàng cung có khả năng điều trị các ung thư khác như phổi, gan, đại tràng... bên cạnh tác dụng điều trị u xơ tử cung cung và u tuyến tiền liệt được sử dụng truyền thống.

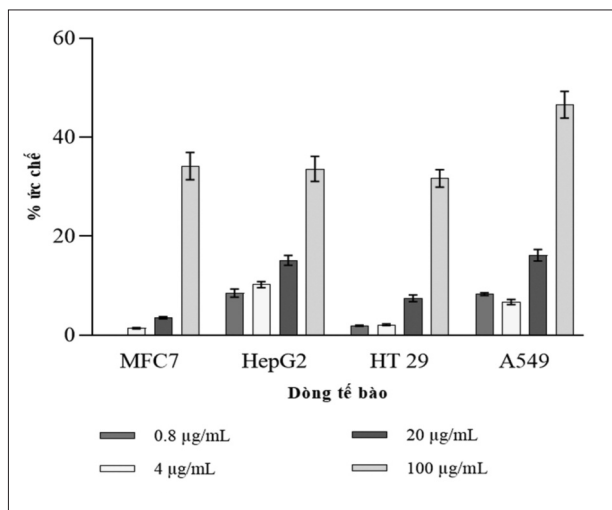
3.5. Tác dụng kháng viêm

Trên mô hình kháng viêm in vitro, crinamidin thể hiện khả năng ức chế việc sản sinh NO với IC₅₀ là 158,13 µg/ml với tỷ lệ ức chế 65,13% ở nồng độ 200 µg/ml. Kết quả này phần nào trùng khớp với nghiên cứu của Kaushik và Cộng sự (2017) về khả năng chống viêm của cao toàn phần trình nữ hoàng cung [6]. Bên cạnh đó, điều này giải thích việc sử dụng lá trình nữ hoàng cung trong dân gian để điều trị một số triệu chứng viêm đường hô hấp như viêm phế quản, viêm họng...

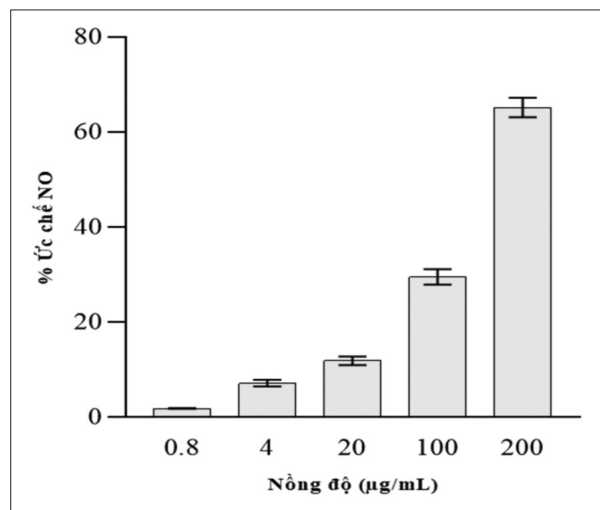
4. Kết luận

Từ lá trình nữ hoàng cung, nhóm đã chiết xuất và phân lập được

Hình 5: Tác dụng chống ung thư in vitro của crinamidine



Hình 6: Tác dụng kháng viêm thông qua khả năng ức chế NO của crinamidine



504,1 mg crinamidin với độ tinh khiết là 98,95 %. Hợp chất phân lập được lần đầu cho thấy tác dụng chống ung thư và kháng viêm trên mô hình in vitro. Kết quả này bước đầu giải thích tác dụng chống

khối u của tinh nữ hoàng cung theo kinh nghiệm dân gian. Tuy nhiên, cần những nghiên cứu sâu hơn về mặt cơ chế và trên mô hình in vivo để khẳng định hoạt tính này ứng dụng trong điều trị ■

Lời cảm ơn:

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Trường Đại học Tôn Đức Thắng trong Đề tài mã số FOSTECT.2023.10

TÀI LIỆU THAM KHẢO:

1. Bộ Y tế (2017). Dược điển Việt Nam V. Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, pp. 1361.
2. Đỗ Tất Lợi (2004). Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam. Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, trang 510-512.
3. Nguyễn Thị Ngọc Trâm, Dương Thị Thúy Nga, và các cộng sự (2016). Điều chế và thiết lập chất chuẩn crinamidin. Tạp chí Dược học, 56(1), 52-57.
4. Anne Monks, Dominic Scudiero, Philip Skehan, et al. (1991). Feasibility of a High-Flux Anticancer Drug Screen Using a Diverse Panel of Cultured Human Tumor Cell Lines. JNCI: Journal of the National Cancer Institute, 83 (11), 757-766.
5. Gasca-Silva, Cristian A., Gomes, et. al. (2022). Recent updates on *Crinum latifolium* L. (Amaryllidaceae): A review of ethnobotanical, phytochemical, and biological properties. South African Journal of Botany, 146, 162-173.
6. Kaushik, K., Upadhyay, A., Khurana, L., et al. (2017), Evaluation of analgesic and anti-inflammatory activity of *Crinum latifolium* leaves on albino mice, 6, 1635-1650.
7. Nguyen Thi Ngoc Tram, Yanchev, I., et al. (2001). Retarded growth of chemically induced with 20-methylcholanthrene tumours in rats under the action of cold-hot aqueous extracts (decoctions) from Vietnamese plant *Crinum latifolium* (L.). Exp Pathol Parasitol, 4, 9-12.
8. Tendani E. Sebola, Nkemdinma C. Uche-Okerefor, et. al. (2020). Antibacterial and Anticancer Activity and Untargeted Secondary Metabolite Profiling of Crude Bacterial Endophyte Extracts from *Crinum macowanii* Baker Leaves. International Journal of Microbiology, 2020, 8839490.

Ngày nhận bài: 13/6/2024

Ngày phản biện đánh giá và sửa chữa: 30/6/2024

Ngày chấp nhận đăng bài: 15/7/2024

Thông tin tác giả:

1. ThS. NGUYỄN THỊ MỸ THẢO¹

2. TRƯƠNG TUÔNG VY²

3. TẠ NGUYỄN ANH THU²

4. TS. VŨ HUỲNH KIM LONG^{2,*}

¹Trường Y Dược, Trường Đại học Trà Vinh

²Khoa Dược, Trường Đại học Tôn Đức Thắng

*Email: vuhuynhkimlong@tdtu.edu.vn

ISOLATING AND EVALUATING BIO-ACTIVITY OF CRINAMIDINE FROM *CRINUM LATIFOLIUM* BY USING THE PREPARATIVE HPLC METHOD

● Master. NGUYEN THI MY THAO¹

● TRUONG TUONG VY²

● TA NGUYEN ANH THU²

● Ph.D VU HUYNH KIM LONG^{2,*}

¹School of Medicine and Pharmacy, Tra Vinh University

²Faculty of Pharmacy, Ton Duc Thang University

ASBTRACT:

Crinum latifolium (Amaryllidaceae), commonly known as Trinh nu hoang cung, is a widely utilized medicinal herb for treating tumors in the urinary and reproductive systems. According to the Vietnamese Pharmacopoeia V, crinamidine is employed as a marker compound for the qualitative and quantitative analysis of this herb. However, the current market price of this reference standard is relatively high. This study employed preparative HPLC methods to isolate 504.1 mg of crinamidine with a purity of 98.95%. The compound demonstrated its anti-inflammatory activity on RAW264.7 cells with an IC₅₀ of 158.13 µg/ml and exhibited strongest anticancer effects on A549 cell lines (inhibiting 46.58% at a concentration of 100 µg/ml). Preliminary results indicated that this compound contributes to the anti-inflammatory and antitumor effects of *Crinum latifolium*.

Keywords: *Crinum latifolium*, crinamidine, anti-inflammatory, anti-cancer; prep-HPLC.