

Nghiên cứu thành phần hóa học và hoạt tính chống oxy hóa của quả Cúc gai *Silybum marianum* L. (Gaernt) trồng tại Đắk Lắk

Nguyễn Thị Trang^{1*}, Lê Minh Tuấn¹, Phan Thị Ánh Ngọc¹, Phạm Thị Thùy Trang¹, Huỳnh Ngọc Thụy²

¹Trường Đại học Y Dược Buôn Ma Thuật

²Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh

*nttrang@bmtuvietnam.com

Tóm tắt

Tại Việt Nam, việc sản xuất thuốc điều trị viêm gan từ silymarin được chiết từ quả Cúc gai chủ yếu nhập cao nguyên liệu từ nước ngoài. Nghiên cứu ngày so sánh thành phần hóa học của Cúc gai trồng tại Đắk Lắk với Cúc gai trồng trên thế giới, từ đó đánh giá khả năng phát triển và quy hoạch vùng trồng tại địa phương. Quá trình chiết xuất, phân lập (sắc ký cột và sắc ký lớp mỏng), xác định cấu trúc (đo phổ NMR) và thử hoạt tính chống oxy hóa (xác định IC₅₀ về hoạt tính bắt gốc tự do DPPH) chất phân lập từ quả Cúc gai. Kết quả đã phân lập được ba hợp chất: silybin A, B (100 mg) và quercetin (50 mg) từ cao dichloromethan (17,60 g), isoquercitrin (30 mg) từ cao ethyl acetat (8,54 g). Hoạt tính chống oxy hóa của các hợp chất gồm quercetin, silybin A, B và isoquercitrin thể hiện thông qua khả năng bắt gốc tự do DPPH với giá trị IC₅₀ lần lượt là 2,42 µg/mL; 6,82 µg/mL; 8,62 µg/mL. Nghiên cứu đã góp phần bổ sung thông tin, nâng cao giá trị sử dụng và định hướng cho các nghiên cứu tiếp theo trên loài này ở Việt Nam.

Nhận 15/12/2024
Được duyệt 10/03/2025
Công bố 28/04/2025

Từ khóa
Silybum marianum (L)
Gaernt., Cúc gai, thành
phần hóa học, DPPH,
hoạt tính chống oxy hóa

© 2025 Journal of Science and Technology - NTTU

1 Đặt vấn đề

Cây Cúc gai (CG) – *Silybum marianum* (L.) Gaertn. thuộc họ Asteraceae. Loài cây này có gân lá có màu trắng sữa nên còn được gọi là cây Kế sữa, Kế thánh hay Kế Đức mẹ. Chi *Silybum* chỉ có 2 loài *S. marianum* (L.) Gaertn. và *S. eburneum* Coss. et Durr thuộc họ Asteraceae [1, 2]. CG là loài cây thảo hàng năm, có nguồn gốc ở Địa Trung Hải, được tìm thấy nhiều ở đồng bằng sông Nile và trồng rộng rãi ở Trung Quốc

[3]. Trong những năm gần đây, đã có nhiều nghiên cứu phân tích thành phần hóa học, hoạt tính chống oxy hóa và kháng khuẩn, chứng minh tính chất dược lý, đặc biệt là khả năng phòng ngừa và điều trị các bệnh về gan [4]. CG đã được các nhà khoa học trên thế giới nghiên cứu và xác định có 89 chất hữu cơ và 23 nguyên tố vi lượng. Các nhóm chất bao gồm: dầu béo, flavonolignan, flavonoid, phytosterol, polyacetylen, triterpenoid, lignan, tannin, acid amin và một số chất khác, ... [5].

Silymarin là một hỗn hợp các flavonoid và flavonolignan, trong đó flavonolignan là nhóm hoạt chất quan trọng, được chiết xuất từ quả CG gồm có silybin, isosilybin, silychristin, silydianin và taxifolin [10]. Theo nhiều nghiên cứu, nhóm flavonolignan chiếm (0,1-14) % trong tổng số các hợp chất hữu cơ đã được phân lập và hỗn hợp silymarin chiếm (0,1-6) % của nhóm flavonolignan. Trong đó, silybin là thành phần hoạt chất chính chiếm (50-70) % hỗn hợp silymarin [6].

Tại tỉnh Lâm Đồng cũng có một số vùng trồng CG, còn tại tỉnh Đắk Lắk không thấy có vùng trồng và nghiên cứu nào về loài được công bố về thành phần hóa học và tác dụng sinh học. Ngoài ra, nhóm nghiên cứu cũng có trồng tại xã Phú Xuân, huyện Krông Năng, tỉnh Đắk Lắk và thu được một số kết quả nổi bật về thời gian sinh trưởng (8-9) tháng có thể thu hoạch quả, cây cao tầm (1,5-2,5) m, 45 kg lá tươi/100 m², 10 kg quả/100 m², 40 quả/g, có thể thu nhiều nhất 400 quả/hoa và với cùng một diện tích trồng trọt nếu cây được trồng thưa nhau thì số lượng hoa trên một cây có thể đạt (30-40) hoa/cây.

Quả CG là bộ phận dùng chính đã được nghiên cứu và sử dụng chủ yếu trong các chế phẩm điều trị bệnh gan. Tại Việt Nam hiện nay, trên thị trường có các sản phẩm nhập khẩu (Silibene N, viên Legalon, thuốc tiêm Legalon SIL) và sản phẩm nội địa (Silymarin B-Complex Extra, Silymarin Arginine Complex, Silymarin 70 mg, Nano Silymarin) [6]. Trên thị trường Việt Nam nhiều doanh nghiệp sản xuất thuốc điều trị viêm gan từ silymarin nhưng chủ yếu là nhập cao nguyên liệu từ nước ngoài chưa chủ động được nguồn nguyên liệu này.

Từ đó, nhóm nghiên cứu đặt vấn đề phân lập và xác định cấu trúc hợp chất từ quả của cây CG trồng tại xã Phú Xuân, huyện Krông Năng, tỉnh Đắk Lắk với mục đích phân lập được hợp chất từ quả so với các vùng trồng đã

được công bố trên thế giới và trong nước, qua đó đánh giá khả năng phát triển, quy hoạch vùng trồng tại địa phương để chủ động nguồn nguyên liệu làm thuốc.

2 Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1 Đối tượng nghiên cứu

Nguyên liệu là quả CG thu hái tại huyện Krông Năng, tỉnh Đắk Lắk vào tháng 8 năm 2023. Mẫu được xử lý, bảo quản đáp ứng theo yêu cầu của từng nội dung nghiên cứu. Mẫu được định danh bằng phương pháp so sánh và đối chiếu đặc điểm hình thái với khóa phân loại chi và loài trong Thực vật chí Việt Nam [7].

Mẫu được sấy khô, bảo quản trong bao bì kín và lưu tại Bộ môn Dược liệu-Dược cổ truyền-Thực vật, Khoa Dược, Trường Đại học Y Dược Buôn Ma Thuột.

2.2 Phương pháp nghiên cứu

2.2.1 Chiết xuất và phân lập

Bột dược liệu (3,0 kg) đã được xay nhỏ đến kích thước thích hợp được chiết ngấm kiệt ở nhiệt độ phòng với 50 L cồn 96 %, chiết 3 lần, mỗi lần 5 ngày, cô thu hồi dung môi được 1,0 L cao lỏng (tương ứng khoảng 210,75 g cao đặc). Sau đó cao lỏng tiếp tục được chiết phân bổ lỏng – lỏng với dung môi có độ phân cực tăng dần: *n*-hexan, dichloromethan, ethyl acetat. Các dịch được tiến hành cô thu hồi dung môi để được các cao phân đoạn. Sau khi tiến hành phân lỏng – lỏng, cô thu hồi dung môi, thu được các cao phân đoạn với khối lượng như sau: 50,51 g cao *n*-hexan (SMH); 17,60 g cao dichloromethan (SMC); 8,54 g cao ethyl acetat (SME); 172,4 g cao nước (SMW). Quá trình phân lập sử dụng phương pháp sắc ký cột với các cơ chế chủ yếu là cột hấp phụ, cột trao đổi ion và cột lọc qua gel. Sắc ký lớp mỏng được sử dụng để theo dõi quá trình rửa giải [8]. Cao dichloromethan (SMC) được chấm sắc ký lớp mỏng cho thấy các vết tách rõ ràng với hệ dung môi

dichloromethan:methanol (10:1, v/v). Do đó, sẽ lựa chọn hệ dung môi dichloromethan : methanol để khai triển với các tỉ lệ lần lượt là dichloromethan : methanol (100:0, 80:1, 60:1, 40:1, 20:1, 10:1, 5:1, 1:1, 0:100, v/v). Theo dõi quá trình khai triển bằng SKLM. Sau khi cô quay cất thu hồi dung môi thu được 5 phân đoạn ký hiệu lần lượt là SMC1 (4,1 g), SMC2 (3,2 g), SMC3 (2,3 g), SMC4 (3,4 g) và SMC5 (2,1 g). Qua sắc ký đồ của phân đoạn SMC2 được lựa chọn phân lập để thu được hợp chất chính trong quả CG. Phân đoạn SMC2 triển khai trên sắc ký cột pha đảo. Hệ dung môi rửa giải là methanol:nước (1:1, v/v). Theo dõi quá trình khai triển bằng SKLM. Sau khi cô quay cất thu hồi dung môi thu được 4 phân đoạn ký hiệu lần lượt là SMC2A, SMC2B, SMC2C và SMC2D. Trong đó, phân đoạn SMC2C (100 mg) và SMC2D (50 mg) trên sắc ký đồ cho một vết sắc ký rõ ràng, không lẫn tạp chất là hợp chất 1 và hợp chất 2.

Cao ethy acetat (SME) thu được có 2 phần. Phần tủa (3,17 g) được ký hiệu là SMET triển khai trên sắc ký cột pha đảo. Hệ dung môi rửa giải là methanol:nước (1:2, v/v) thu được 3 phân đoạn ký hiệu lần lượt là SMET1, SMET2, và SMET3. Phân đoạn SMET2 (30 mg) thu được hợp chất 3.

2.2.2 Xác định cấu trúc các hợp chất

Phổ NMR (^1H -NMR, ^{13}C -NMR, HSQC, HMBC và COSY), biện giải kết quả và so sánh với tài liệu tham khảo. Thực hiện trên máy AVANCE 600 (Bruker) tại phòng NMR, Viện Hóa học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

2.2.3 Sàng lọc hoạt tính chống oxy hóa trên mô hình DPPH

Phương pháp đo quang

Phương pháp được thực hiện theo Bondet và cộng sự với một số thay đổi nhỏ [9].

Chuẩn bị mẫu đo: mẫu trắng (4 mL MeOH), mẫu chứng (2 mL DPPH 0,2 mM + 2 mL MeOH), mẫu thử (2 mL dung dịch thử + 2 mL DPPH 0,2 mM). Ủ mẫu ở nhiệt độ phòng trong vòng 30 phút trong tối để phản ứng xảy ra hoàn toàn. Độ hấp thụ được đo ở bước sóng 517 nm. Mỗi thử nghiệm tiến hành lặp lại 3 lần khác nhau. Kết quả hoạt tính bắt gốc tự do DPPH được tính theo công thức:

$$\text{HTCO (\%)} = \frac{(\text{Abs}_{\text{chứng}} - \text{Abs}_{\text{thử}}) / \text{Abs}_{\text{chứng}}}{\text{Abs}_{\text{chứng}}} \times 100$$

(Abs: độ hấp thụ ở bước sóng 517 nm).

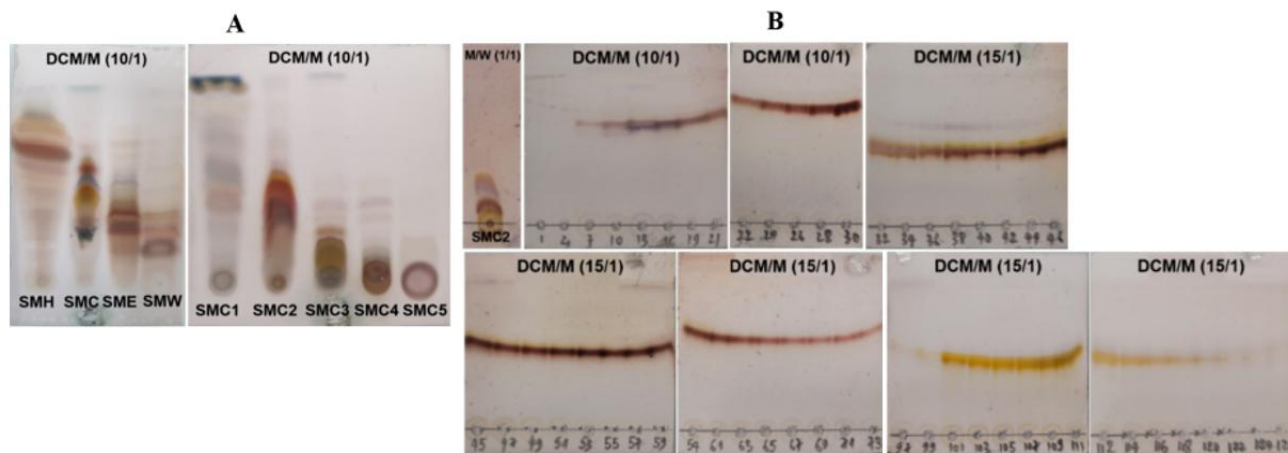
Phương pháp xác định giá trị IC_{50} về hoạt tính bắt gốc tự do DPPH

Giá trị IC_{50} được xác định thông qua kết quả bắt gốc tự do DPPH của vitamin C ở dãy nồng độ 0,39 $\mu\text{g/mL}$; 0,78 $\mu\text{g/mL}$; 1,56 $\mu\text{g/mL}$; 3,125 $\mu\text{g/mL}$ và 6,25 $\mu\text{g/mL}$. Mẫu thử ở dãy nồng độ 400 $\mu\text{g/mL}$, 200 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$ và 10 $\mu\text{g/mL}$.

3 Kết quả và bàn luận

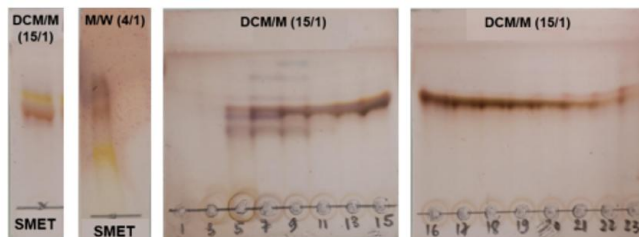
3.1 Chiết xuất và phân lập

Dựa vào SKLM của 4 cao SMH, SMC, SME và SMW với hệ dung môi dichloromethan:methanol (10:1, v/v) cho thấy nhóm hợp chất flavonoid và flavonolignan hiện màu vàng đến vàng cam với thuốc thử H_2SO_4 10 % tại cao SMC và SME rất rõ ràng. Trong đó hỗn hợp silymarin (gồm hợp chất flavonoid và flavonolignan) là nhóm chất chính cần phân lập trong quả CG. Khai triển cao SMC thu được 5 phân đoạn SMC1-SMC5. Theo tài liệu tham khảo [10] cho thấy phân đoạn SMC2 vết sắc ký có khoảng R_f và hiện màu vàng cam của flavonoid, màu đỏ nâu của flavonolignan được triển khai trên sắc ký pha đảo với hệ dung môi rửa giải methanol:nước (1:1, v/v). Theo dõi quá trình khai triển bằng SKLM. Phân lập được hợp chất 1 là SMC2C (100 mg) và hợp chất 2 là SMC2D (50 mg).



Hình 1 A. Sắc ký đồ phân đoạn SMC và quá trình rửa giải của cột pha thường
B. Sắc ký đồ phân đoạn SMC2 và quá trình rửa giải của cột sắc ký pha đảo

Tương tự trên bản SKLM được khai triển hệ dung môi dichloromethan:methanol (10:1, v/v) cao SME và phần tủa SMET cho thấy nhóm hợp chất flavonoid hiện màu vàng đến vàng cam với thuốc thử H_2SO_4 10 %. Do đó, SMET được triển khai trên sắc ký cột pha đảo với hệ dung môi rửa giải là methanol:nước (1:2, v/v). Phân lập được hợp chất 3 là SMET2 (30 mg).



Hình 2 Sắc ký đồ phân đoạn tủa SMET và quá trình rửa giải của cột sắc ký pha đảo
Quá trình chiết xuất từ 3,0 kg bột quả đã phân lập được silybin A, B (100 mg), quercetin (50 mg) và isoquercitrin (30 mg). Từ đó cho thấy hàm lượng silymarin chiếm khoảng (3,0-6,0) % trong quả CG trồng tại Đắk Lắk, do đó đối chiếu với tài liệu đã được công bố thì vùng trồng CG trên thế giới có hàm lượng silymarin chiếm (1,5-3,0) % (tính trên khối lượng quả khô) và silybin chiếm (50-70) % silymarin [11]. Điều đó chứng minh hàm lượng silybin trong quả CG tại Đắk Lắk gấp đôi so với vùng khác. Vì vậy việc mở rộng vùng trồng để đảm bảo cho việc cung cấp được nguồn nguyên liệu trong nước là rất cần thiết.

3.2 Xác định cấu trúc các hợp chất

3.2.1 Xác định cấu trúc hợp chất SMC2C

Hợp chất SMC2C được tách ra ở dạng bột vô định hình màu trắng, kém tan trong methanol, $R_f = 0,5$ (dichloromethan:methanol, 15:1, v/v).

Phổ ^{13}C -NMR của SMC2C thể hiện đây là hỗn hợp gồm 2 đồng phân A, B. Trong đó có các tín hiệu của vòng thơm và tín hiệu vùng trường thấp nhất 197,73 ppm và 197,71 ppm, nhận định SMC2C có khung cấu trúc flavonoid.

Phổ 1H -NMR tại 4 tín hiệu proton δ_H 5,92 (1H, d, $J = 2,4$ Hz), 5,88 (1H, d, $J = 2,4$ Hz), 5,08 (1H, d, $J = 10,8$ Hz), 4,60 (1H, d, $J = 10,8$ Hz) cho thấy khung 5, 7-dihydroxylflavanonol. 6 tín hiệu proton của vòng thơm tại H2', H5', H6', H2'', H5'', H6'' thể hiện vị trí vòng thơm B gắn với 1 nhóm alcohol cinnamic. Thêm vào đó, 4 tín hiệu proton δ_H 4,91 (1H, d, $J = 7,8$ Hz), 4,17 (1H, ddd, $J = 7,8$ Hz, 4,2 Hz, 2,4 Hz), 3,55 (1H, dd, $J = 12,0$ Hz, 4,2 Hz), 3,37 (1H, dd, $J = 12,0$ Hz, 2,4 Hz) thể hiện rằng 1 nhóm propanol nối với vòng dioxan.

Từ dữ kiện phổ trên chúng ta chứng tỏ SMC2C thuộc nhóm flavonoidlignan. Đối chiếu tài liệu tham khảo [12] hợp chất SMC2C được xác định là hỗn hợp silybin A và silybin B (hợp chất 1) được trình bày ở Bảng 1.

3.2.2 Xác định cấu trúc hợp chất SMC2D

Hợp chất SMC2D được tách ra ở dạng bột vô định hình màu vàng nhạt, tan tốt trong methanol, $R_f = 0,6$ (dichloromethan:methanol, 15:1, v/v).

Phổ ^{13}C -NMR của SMC2D có 17 tín hiệu, trong đó có 15 tín hiệu C vòng thơm và tín hiệu vùng trường thấp nhất 175,8 ppm, nhận định SMC2D có khung cấu trúc flavonol. Phổ ^1H -NMR có 3 tín hiệu proton thuộc hệ tương tác ABX δ_{H} 7,53 (1H, *dd*, $J = 2,4$ Hz; 8,4 Hz); 7,67 (1H, *d*, $J = 1,8$ Hz), 6,88 (1H, *d*, $J = 8,4$ Hz) thuộc vòng B. Hai tín hiệu proton ghép cặp meta trên vòng A tại δ_{H} 6,18 (1H, *d*, $J = 1,8$ Hz) và 6,40 (1H, *d*, $J = 1,8$ Hz).

Từ dữ kiện phổ trên chứng tỏ SMC2D thuộc nhóm flavonoid. Kết hợp tương tác trên phổ HMBC và đối chiếu tài liệu tham khảo [13] hợp chất SMC2D được xác định là quercetin (hợp chất 2) được trình bày ở Bảng 2.

3.2.3 Xác định cấu trúc hợp chất SMET2

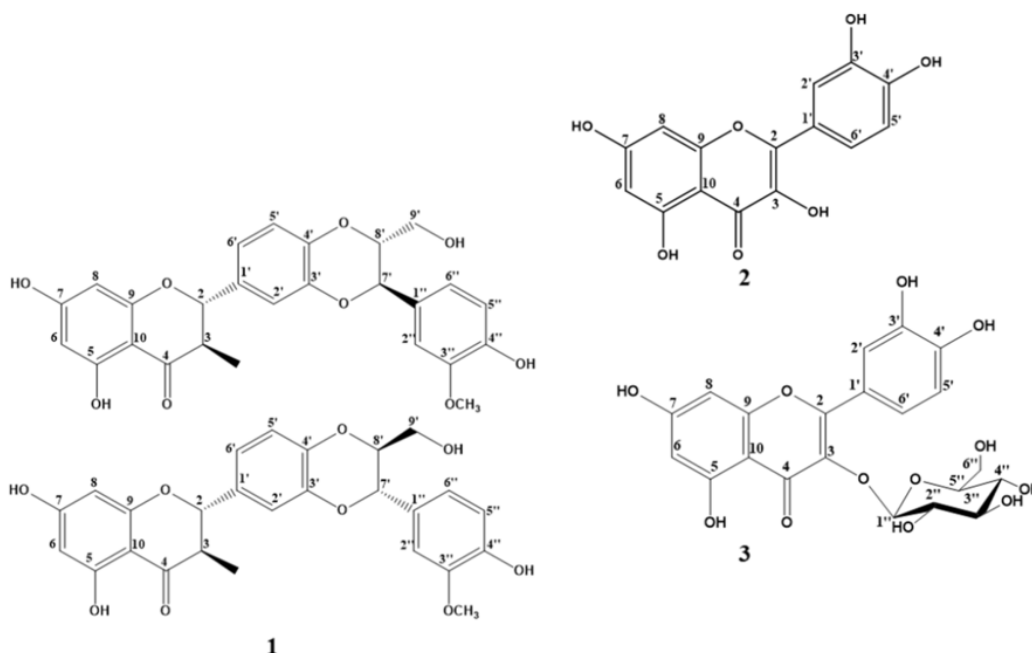
Hợp chất SMET2 được tách ra ở dạng bột vô định hình màu vàng nhạt, tan tốt trong methanol, $R_f = 0,5$ (dichloromethan:methanol, 15:1, v/v).

Phổ ^{13}C -NMR của SMET2 có 21 tín hiệu cộng hưởng, trong đó có 15 tín hiệu C của vòng thơm với tín hiệu downfield nhất δ_{C} 177,4 nhận định SMET2 có khung flavonol, có các vị trí cộng hưởng ở vùng (60-80) ppm,

tín hiệu C anomer ở 100,9 ppm của đường glucose. Do đó, SMET2 là một flavonol glycosid có phần đường liên kết qua dây nối *O*-glycosid.

Phổ ^1H -NMR phần aglycol SMET2 có 3 tín hiệu proton thuộc hệ tương tác ABX δ_{H} 7,58 (1H, *d*, $J = 2,4$ Hz), 6,84 (1H, *d*, $J = 9,0$ Hz), 7,57 (1H, *dd*, $J = 9,0$ Hz; 2,4 Hz) thuộc vòng B. Hai tín hiệu proton ghép cặp meta trên vòng A tại δ_{H} 6,20 (1H, *d*, $J = 2,4$ Hz) và 6,40 (1H, *d*, $J = 1,8$ Hz). Phần đường có tín hiệu ở vùng trường cao (3,15-3,97) ppm tương ứng $\text{C}2''$ và $\text{C}5''$ trên HSQC, tín hiệu proton anomer tại δ_{H} 5,46 (1H, *d*, $J = 7,8$ Hz) tương ứng C-1'' (δ_{C} 100,9 ppm), proton của nhóm $-\text{CH}_2$ có tín hiệu δ_{H} 3,58 (1H, *d*, $J = 11,4$ Hz) và 3,32 (1H, *s*), do đó phần đường là β -D-glucose.

Phổ HMBC thể hiện H-1'' anomer của đường glucose tương tác với δ_{C} 133,3 (C-3) do đó phần đường liên kết qua dây nối 3-*O*-glycosid. Kết hợp phổ HSQC, HMBC, COSY và dữ liệu phổ đã được báo cáo, xác định SMET2 là isoquercitrin (hợp chất 3), dữ liệu phổ [14] được trình bày ở Bảng 3.



Hình 3 Cấu trúc hóa học của các hợp chất 1-3

Bảng 1 Dữ liệu phổ NMR của hợp chất 1 và Silybin A, B

C	CH _n	Hợp chất 1 (DMSO-d ₆ , 125/600 MHz)			Silybin A, B (DMSO-d ₆ , 125/600 MHz)		
		δ_C ppm		δ_H ppm, mult., (J, Hz)	δ_C ppm		δ_H ppm, mult., (J, Hz)
2	CH	82,6	82,5	5,08 (d, 10,8 Hz)	82,5	82,5	5,08 (d, 11,4 Hz)
3	CH	71,4	71,5	4,60 (d, 10,8 Hz)	71,4	71,4	4,62 (d, 11,4 Hz)
4	C	197,7	197,7	-	197,8	197,7	-
5	C	163,3	163,3	-	163,3	163,3	-
6	CH	96,1	96,1	5,92 (d, 2,4 Hz)	96,0	96,1	5,91 (d, 2,1 Hz)
7	C	166,8	166,8	-	166,8	166,8	-
8	CH	95,0	95,0	5,88 (d, 2,4 Hz)	95,0	95,1	5,86 (d, 2,1 Hz)
9	C	162,5	162,5	-	162,5	162,5	-
10	C	100,5	100,5	-	100,4	100,4	-
1'	C	130,0	130,1	-	130,0	130,1	-
2'	CH	116,5	116,6	7,67 (d, 2,3 Hz)	116,5	116,7	7,09 (d, 2,1 Hz)
3'	C	143,3	143,2	-	143,3	143,2	-
4'	C	143,7	143,6	-	143,6	143,6	-
5'	CH	116,3	116,4	6,88 (d, 8,4 Hz)	116,3	116,3	6,97 (d, 8,3 Hz)
6'	CH	121,3	121,2	7,01 (dd, 8,4 Hz, 2,3 Hz)	121,4	121,2	7,00 (dd, 8,3 Hz, 2,1 Hz)
7'	CH	75,9	75,9	4,91 (d, 7,8 Hz)	75,8	75,9	4,90 (d, 8,0 Hz)
8'	CH	78,1	78,1	4,17 (ddd, 7,8 Hz, 4,2 Hz, 2,4 Hz)	78,1	78,1	4,17 (ddd, 8,0 Hz, 4,6 Hz, 2,5 Hz)
9'	CH ₂	60,2	60,2	3,55 (dd, 12,0 Hz, 4,2 Hz)	60,1	60,2	3,53 (dd, 12,2 Hz, 4,6 Hz)
				3,37 (dd, 12,0 Hz, 2,4 Hz)			3,34 (dd, 12,2 Hz, 2,5 Hz)
1''	C	127,5	127,5	-	127,4	127,5	-
2''	C(H)	111,7	111,7	7,01 (m)	111,6	111,6	7,01 (d, 2,0 Hz)
3''	C	147,6	147,6	-	147,6	147,6	-
4''	C	147,0	147,0	-	147,0	147,0	-
5''	CH	115,3	115,3	6,80 (d, 7,8 Hz)	115,3	115,3	6,80 (d, 8,1 Hz)
6''	CH	120,5	120,5	6,87 (d, 7,8 Hz)	120,5	120,5	6,86 (dd, 8,1 Hz, 2,0 Hz)
	OCH ₃	55,7	55,7	3,78 (s)	55,7	55,7	3,77 (s)
	3-OH	-	-	5,80 (s)	-	-	5,82 (s)
	5-OH	-	-	11,88 (s)	-	-	11,90 (s)
	7-OH	-	-	10,89 (s)	-	-	10,85 (s)
	9'-OH	-	-	4,95 (s)	-	-	4,96 (s)
	4''-OH	-	-	9,13 (s)	-	-	9,16 (s)

Bảng 2 Dữ liệu phổ NMR của hợp chất 2 và Quercetin

C	CH _n	Hợp chất 2 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 125/600 MHz)			Quercetin (DMSO- <i>d</i> ₆ , 125/600 MHz)	
		δ_C ppm	δ_H ppm, mult., (J, Hz)	HMBC	δ_C ppm	δ_H ppm, mult., (J, Hz)
2	C	146,8	-	-	146,8	-
3	C	135,7	-	-	135,8	-
4	C	175,8	-	-	175,8	-
5	C	160,7	-	-	160,7	-
6	CH	98,2	6,18 (d, 1,8 Hz)	7, 8, 9, 10	98,2	6,18 (d, 2,0 Hz)
7	C	163,9	-	-	163,9	-
8	CH	93,3	6,40 (d, 1,8 Hz)	5, 6, 7, 10	93,4	6,40 (d, 2,0 Hz)
9	C	156,1	-	-	156,1	-
10	C	103,0	-	-	103,0	-
1'	C	121,9	-	-	121,9	-
2'	CH	115,0	7,67 (d, 1,8 Hz)	2, 3', 6', 4'	115,0	7,67 (d, 2,2 Hz)
3'	C	145,0	-	-	145,1	-
4'	C	147,7	-	-	147,7	-
5'	CH	115,6	6,88 (d, 8,4 Hz)	4', 2', 3', 1'	115,6	6,87 (d, 8,4 Hz)
6'	CH	119,9	7,53 (dd, 8,4 Hz, 2,4 Hz)	2, 4', 2'	120,0	7,53 (dd, 8,4 Hz, 2,2 Hz)
5-OH		-	12,48 (s)	-	-	-
7-OH		-	-	-	-	-
3'-OH		-	9,31 (s)	-	-	-
4'-OH		-	-	-	-	-

Bảng 3 Dữ liệu phổ NMR của hợp chất 3 và Isoquercitrin

C	CH _n	Hợp chất 3 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 125/600 MHz)			Isoquercitrin (DMSO- <i>d</i> ₆ , 125/600 MHz)	
		δ_C ppm	δ_H ppm, mult., (J, Hz)	HMBC	δ_C ppm	δ_H ppm, mult., (J, Hz)
2	C	156,3	-	-	156,5	-
3	C	133,3	-	-	133,5	-
4	C	177,4	-	-	177,7	-
5	C	161,2	-	-	161,5	-
6	CH	98,6	6,20 (d, 2,4 Hz)	8, 10, 5, 7	98,9	6,20 (d, 2,4 Hz)
7	C	164,1	-	-	164,3	-
8	CH	93,4	6,40 (d, 1,8 Hz)	6, 10, 2, 7, 4	93,0	6,40 (d, 1,8 Hz)
9	C	156,1	-	-	156,4	-
10	C	103,9	-	-	104,2	-

1'	C	121,1	-	-	121,4	-
2'	CH	115,2	7,58 (<i>d</i> , 2,4 Hz)	1', 3', 6', 4', 5'	115,4	7,56 (<i>br s</i>)
3'	C(H)	144,8	-	-	145,0	-
4'	C	148,4	-	-	148,7	-
5'	CH	116,2	6,84 (<i>d</i> , 9,0 Hz)	-	116,4	6,84 (<i>d</i> , 8,4 Hz)
6'	CH	121,5	7,57 (<i>dd</i> , 9,0 Hz, 2,4 Hz)	1', 3', 4', 5', 2	121,8	7,57 (<i>d</i> , 2,4 Hz)
1''	CH	100,9	5,46 (<i>d</i> , 7,8 Hz)	3, 3'', 2''	101,0	5,46 (<i>d</i> , 7,2 Hz)
2''	CH	74,1	3,23 (<i>m</i>)	-	74,3	-
3''	CH	76,5	3,23 (<i>m</i>)	-	76,7	-
4''	CH	69,9	3,09 (<i>m</i>)	-	70,1	-
5''	CH	77,5	3,09 (<i>m</i>)	-	77,8	-
6''	CH ₂	60,9	3,58 (<i>d</i> , 11,4 Hz)	-	61,9	-
			3,32 (<i>m</i>)	-		-
5-OH		-	12,63 (<i>s</i>)	-	-	12,65 (<i>s</i>)
7-OH		-	10,83 (<i>s</i>)	-	-	10,86 (<i>s</i>)
3'-OH		-	9,19 (<i>s</i>)	-	-	9,24 (<i>s</i>)
4'-OH		-	9,70 (<i>s</i>)	-	-	9,74 (<i>s</i>)

3.3 Kết quả xác định giá trị IC₅₀ về hoạt tính bắt gốc tự do DPPH

Khả năng bắt gốc tự do DPPH của quercetin, hỗn hợp silybin A, B và isoquercitrin được đánh giá thông qua giá trị IC₅₀ được trình bày trong Bảng 4.

Bảng 4 Phương trình hồi quy và giá trị IC₅₀ của các hợp chất

STT	Hợp chất	Phương trình hồi quy	IC ₅₀ (µg/mL)
1	Vitamin C (chất đối chiếu)	$y = 8,9994x + 29,100$ $R^2 = 0,9804$	2,32
2	Quercetin	$y = 3,7437x + 40,923$ $R^2 = 0,9934$	2,42
3	Silybin A, B	$y = 0,7449x + 44,922$ $R^2 = 0,997$	6,82
4	Isoquercitrin	$y = 0,7312x + 43,699$ $R^2 = 0,9987$	8,62

Kết quả thử hoạt tính chống oxy hóa cho thấy các hợp chất silybin A, B (IC₅₀ = 6,82 µg/mL), quercetin (IC₅₀ = 2,42 µg/mL) và isoquercitrin (IC₅₀ = 8,62 µg/mL) đều cho thấy hoạt tính mạnh. Theo tài liệu tham khảo [10] cho thấy dựa trên cấu trúc của silybin thể hiện cấu tạo cơ bản của một flavonolignan bao gồm nhóm catechol và nhóm -OH ở vị trí số 3 liên kết với nhóm carbonyl C-4. Trong đó, nhóm -OH vị trí số 3 có khả năng dịch chuyển electron của hệ thống vòng B và vòng C tạo nên khả năng bắt gốc tự do. Tuy nhiên, trong cấu trúc của

quercetin tại vị trí C-2 và C-3 có liên kết đôi, nhóm -OH ở vị trí C-3 và carbonyl C-4 sẽ tạo ra hệ liên hợp làm tăng khả năng bắt gốc tự do nên thể hiện hoạt tính mạnh hơn so với silybin A, B. Isoquercitrin tại vị trí C-3 nhóm -OH được thay thế bằng dây nối glycosid là liên kết với glucose nên hoạt tính bị giảm do hệ liên hợp bị phá vỡ. Mặt khác, trong cấu trúc của 3 hợp chất trên đều có các nhóm -OH phenol tại vị trí C-5 và C-7 đều thể hiện khả năng bắt gốc tự do. Silybin A, B có giá trị IC₅₀ = 6,82 µg/mL = 14,15 µM có hoạt tính sinh

học mạnh hơn so với nghiên cứu của Radek Gaza'k cùng cộng sự năm 2010 với giá trị $IC_{50} = 21,00 \mu M$ [15]. Tương tự, quercetin ($IC_{50} = 2,42 \mu g/mL = 8,01 \mu M$) cũng có hoạt tính mạnh hơn so với nghiên cứu [16] với giá trị $IC_{50} = 11,00 \mu M$. Điều này cho thấy các chất chính phân lập được từ quả CG chủ yếu là nhóm flavonoid và flavonolignan đều thể hiện hoạt tính sinh học mạnh hơn so với các nghiên cứu đã công bố. Do đó, nghiên cứu này cũng đã chứng minh được việc trồng và phát triển CG tại Đắk Lắk là có triển vọng và sẽ góp phần cung cấp nguồn nguyên liệu silymarin trong và ngoài nước trong tương lai.

4 Kết luận và đề xuất

Ba hợp chất được xác định cấu trúc gồm silybin A, B và quercetin được phân lập từ cao dichloromethan, isoquercitrin từ cao ethyl acetat với giá trị IC_{50} trên mô hình DPPH lần lượt là quercetin ($IC_{50} = 2,42 \mu g/mL$), hỗn hợp silybin A, B ($IC_{50} = 6,82 \mu g/mL$), isoquercitrin ($IC_{50} = 8,62 \mu g/mL$) cho thấy các hợp chất trong quả CG đều thể hiện hoạt tính sinh học mạnh. Kết quả nghiên cứu trên cho thấy Đắk Lắk là vùng trồng thích hợp để phát triển loài CG, góp phần nâng cao giá trị sử dụng dược liệu tại vùng và là tiền đề cho các nghiên cứu tiếp theo để có thể triển khai sản xuất các sản phẩm ra thị trường.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu được tài trợ bởi Trường Đại học Y Dược Buôn Ma Thuột, mã đề tài DTC24.004

Tài liệu tham khảo

1. O. Porwal, M.S.M. Ameen, E. T. Anwer, et al. (2019). *Silybum marianum* (Milk Thistle): Review on its chemistry, morphology, ethno medical uses, phytochemistry and pharmacological activities. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 9, 199.
2. V. Valková, H. Dúranová, J. Bilčíková, and M. Hábán. (2020). Milk thistle (*Silybum marianum*): A valuable medicinal plant with several therapeutic purposes. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 9, 836.
3. L. Abenavoli, A. A. Izzo, et al. (2018). Milk thistle (*Silybum marianum*): A concise overview on its chemistry, pharmacological, and nutraceutical uses in liver diseases. *Phytotherapy Research*, 32(11), 2202.
4. H. Avci, et al. (2017). Protective effects of silymarin and curcumin on cyclophosphamide-induced cardiotoxicity. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 69(5), 317.
5. J. A. Duke. (2004). Milk thistle seed chemical constituents. *Sky Herbals Journal*, 27, 31.
6. Đặng Quang Chung, Đỗ Huy Bích, Bùi Xuân Chương và cs. (2006). *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam tập 2*. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội, tr. 254-270.
7. K. B. Le. (2007). *Flora of Vietnam, Family (Asteraceae)*. Science and Technics Publishing House.
8. Bộ Y tế (2018). *Dược điển Việt Nam V tập 2*. Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, PL.
9. V. Bondet, W. Brand-William, and C. L. W. T. Berset. (1997). Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH. Free radical method. *LWT-Food Science and Technology*, 30(6), 609.

10. D. Biedermann, et al. (2014). Chemistry of silybin. *Natural Product Reports*, 31, 1138-1157.
11. B. Michal. (2017). Silybin, a major bioactive component of milk thistle (*Silybum marianum* L. Gaernt.) - chemistry, bioavailability, and metabolism. *Molecules*, 22, 1942.
12. G. N. José, et al. (2013). HiFSA fingerprinting applied to isomers with near-identical NMR spectra: the silybin/isosilybin case. *The Journal of Organic Chemistry*, 78, 2827.
13. Y. N. Kim, S. J. Lee, and E. J. Jeong. (2018). Structure determination of flavonoids isolating from *Nymphaea tetragona* using NMR spectra and spin simulations. *Journal of the Korean Magnetic Resonance Society*, 22(3), 54.
14. Y. Yang, et al. (2009). Separation and purification of three flavonoids from *Helichrysum arenarium* (L.) Moench by HSCCC. *Chromatographia*, 69, 963.
15. G. Radek, et al. (2010). Antioxidant and antiviral activities of silybin fatty acid conjugates. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 45, 1059-1067.
16. V. Eva, V. Jan, et al. (2014). Chemo-enzymatic synthesis of silybin and 2,3-dehydrosilybin dimers. *Molecules*, 19, 4115.

Phytochemical investigation and antioxidant activity of Milk thistle fruit *Silybum marianum* (L) Gaernt. grown in Dak Lak

Nguyen Thi Trang^{1*}, Le Minh Tuan¹, Phan Thi Anh Ngoc¹, Pham Thi Thuy Trang¹, Huynh Ngoc Thuy²

¹Buon Ma Thuot Medical University

²University of Medicine and Pharmacy at Ho Chi Minh City

*nttrang@bmtuvietnam.com

Abstract In Viet Nam, the production of hepatitis treatment drugs from silymarin extracted from Asteraceae fruit mainly imports raw materials from abroad. This study compared the chemical composition of Asteraceae grown in Dak Lak province with that grown worldwide, then evaluated the development potential and planning of local growing areas. The process of extraction, isolation (column chromatography and thin layer chromatography), structure determination (NMR spectroscopy) and antioxidant activity testing (IC₅₀ determination of DPPH free radical scavenging activity) of the isolated substance from Milk thistle fruit. The results isolated three compounds, including silybin A, B (100 mg), quercetin (50 mg) from dichloromethane extract (17.60 g), and isoquercitrin (30 mg) from ethyl acetate extract (8.54 g). The antioxidant activity of the compounds including quercetin, silybin A, B and isoquercitrin was investigated through DPPH scavenging activity with IC₅₀ values of (2,42; 6,82; 8,62) µg/mL, respectively. The present study contributed to enhance the use value and orient further studies on this species in Viet Nam.

Keywords *Silybum marianum* (L) Gaernt., Milk thistle, chemical constituents, DPPH, antioxidant activity

