

Chromen và coumarin từ rễ cây xáo tam phân (*Paramignya trimerera*)

- Trịnh Hoàng Dương
- Trần Thu Phương
- Nguyễn Diệu Liên Hoa

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

- Hà Diệu Ly
- Khoa Y, ĐHQG-HCM

(Bài nhận ngày 09 tháng 12 năm 2016, nhận đăng ngày 28 tháng 11 năm 2017)

TÓM TẮT

Xáo tam phân có tên khoa học là *Paramignya trimerera* (Oliv.) Burkill, thuộc họ Cam quýt (Rutaceae), có tác dụng chống viêm gan và trị ung thư. Trước đây, đã có một số công bố về việc cô lập alkaloid, coumarin và chromen từ rễ của loài cây này. Trong nghiên cứu này, chúng tôi báo cáo kết quả phân lập bảy hợp chất gồm ba chromen là 2,2-dimethylchrom-3-en-6-carboxaldehyd (1),

eulatachromen (2) và ninhvanin (3) cùng với bốn coumarin là 7-demethylsuberosin (4), xanthyletin (5), 6,7-dihydroxycoumarin (6) và 6-methoxy-7-hydroxycoumarin (7) từ rễ cây xáo tam phân thu hái ở tỉnh Phú Yên. Cấu trúc hóa học của các hợp chất này được xác định bằng phương pháp phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR).

Từ khóa: Xáo tam phân (*Paramignya trimerera*), phân lập, xác định cấu trúc, chromen, coumarin

MỞ ĐẦU

Xáo tam phân có tên khoa học là *Paramignya trimerera* (Oliv.) Burkill, thuộc họ Cam quýt (Rutaceae), là loài tiểu mộc leo, có gai dài, hơi cong xuống, cành không lông, trái tròn to 15 mm [1]. Theo kinh nghiệm dân gian thì xáo tam phân có tác dụng giải nhiệt, bồi bổ sức khỏe, mát gan và đặc biệt là có khả năng trị ung thư. Trước đây, đã có 12 công bố về thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của rễ và thân cây, tất cả đều thực hiện trên cây mọc ở Việt Nam [2-13]. Tuy nhiên số lượng hợp chất cô lập được từ các nghiên cứu trước đây chưa phản ánh đầy đủ về thành phần hóa học của loài này, do đó chúng tôi thực hiện khảo sát này nhằm góp phần cung cấp thêm thông tin về thành phần hóa thực vật của cây Xáo tam phân. Năm 2013, Nguyễn Mạnh Cường và cộng sự phân lập được ba hợp chất là ostruthin, ninhvanin và 6-(2-hydroxyethyl)-2,2-dimethyl-2H-1-benzopyran [2]. Cũng năm này, nhóm của Phạm Huy Bách tìm thấy ostruthin [3] trong khi Bùi Trọng Đạt và cộng sự tìm

thấy một coumarin mới và dẫn xuất chromen [4]. Năm 2014, Trần Thị Thúy Quỳnh và cộng sự thu được ba coumarin là ostruthin, 8-methoxyostruthin và xanthyletin cùng với hai acridon alkaloid là oriciacridon và citrussin-I [5-6]. Qua năm 2015, nhóm của Nguyễn Mạnh Cường tìm thấy hai coumarin glucosid mới là paratrimerin A và B cùng với 6-(6-hydroxy-3,7-dimethylocta-2,7-dienyl)-7-hydroxycoumarin [7]. Nguyễn Thị Ngọc Dung và cộng sự xây dựng được quy trình định lượng đồng thời ostruthin và 8-methoxyostruthin trong rễ cây bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao [8]. Tiếp đó, nhóm của Nguyễn Văn Tạng công bố nghiên cứu cho thấy phương pháp sấy khô rễ cây bằng vi sóng và sử dụng dung môi chiết là methanol với sự hỗ trợ của phương pháp siêu âm phù hợp để tạo cao chiết cho các nghiên cứu tiếp theo [9-10]. Một số nghiên cứu về hoạt tính sinh học cũng đồng thời được công bố. Nguyễn Minh Khởi và cộng sự cho thấy ostruthin, hợp chất chính trong rễ, có tác dụng ức chế sự phát

triển của tế bào ung thư cổ tử cung Hela ở mức độ trung bình ($IC_{50} = 18,4 \mu M$) [11]. Nghiên cứu của Đỗ Thị Thảo và cộng sự bước đầu cho thấy cao methanol của rễ có tác dụng bảo vệ gan gần tương đương chất đối chứng dương silymarin khi thử nghiệm trên chuột [12]. Trong một công bố năm 2016 [13], nhóm chúng tôi đã báo cáo kết quả phân lập và thử hoạt tính gây độc tế bào ung thư gan HepG2 của 4 coumarin là ostruthin, 8-methoxyostruthin, 7-hydroxycoumarin, 7-methoxycoumarin và 4 alkaloid có khung acridon là oriciacridon, 5-hydroxyacronycin, citriscinin-I và glycocitrin-III từ rễ cây thu hái ở tỉnh Phú Yên. Các hợp chất này thể hiện hoạt tính yếu với $IC_{50} 30,53 = 62,90 \mu g/mL$.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Đối tượng nghiên cứu

Rễ cây xáo tam phân được thu hái tại tỉnh Phú Yên và được TS. Đặng Văn Sơn, Viện Sinh học Nhiệt đới-Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, định danh.

Hóa chất và thiết bị

Phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR): máy Bruker Avance 500 [500 MHz (1H) và 125 MHz (^{13}C)] với acetone- d_6 là dung môi, được hiệu chỉnh dựa trên độ dịch chuyển hóa học của dung môi sử dụng. Sắc ký

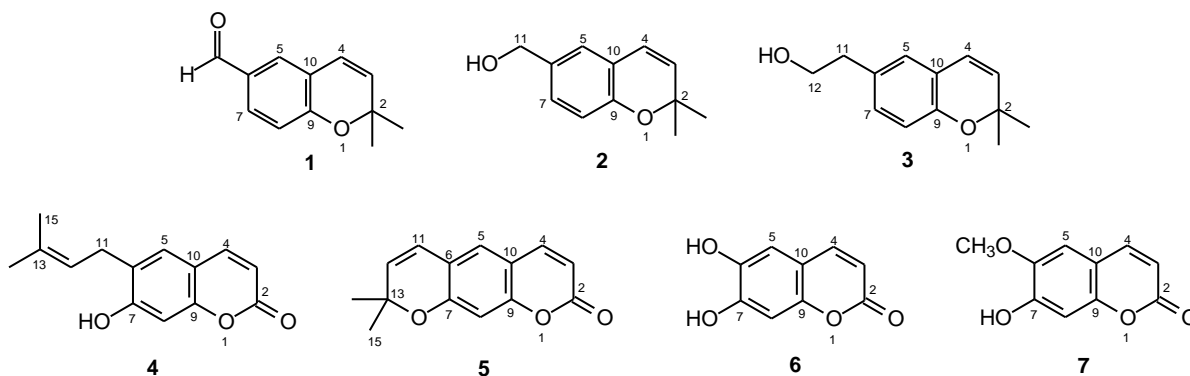
cột (SKC): silica gel hay RP-18 (Merck). Sắc ký (SK) lọc gel: Sephadex LH-20 (GE Healthcare). Sắc ký lớp mỏng: bản silica gel hay RP-18 (Merck). Tất cả dung môi đều được chưng cất lại trước khi sử dụng.

Chiết xuất và phân lập

Mẫu rễ cây được phơi khô, xay nhỏ, trích (2,1 kg) với *n*-hexan rồi ethyl acetat (EtOAc) bằng bộ chiết Soxhlet. Thu hồi dung môi thu được cao *n*-hexan (105 g) và cao EtOAc (65 g). SKC cao *n*-hexan trên silica gel (hexan-EtOAc 0-100 %) thu được năm phân đoạn (H1-5). SKC phân đoạn H1 trên silica gel (hexan-EtOAc 0-100 % rồi chloroform ($CHCl_3$)-acetone 0-5 % thu được 2,2-dimethylchrom-3-en-6-carboxaldehyd (**1**; 4,9 mg), eulatachromen (**2**; 3,1 mg) và ninvanin (**3**; 5,0 mg). SKC phân đoạn H2 trên silica gel (hexan-EtOAc 0-100 %, rồi $CHCl_3$ -methanol (MeOH) 0-5%) thu được 7-demethylsuberosin (**4**; 3,2 mg), xanthyletin (**5**; 4,1 mg), 6,7-dihydroxycoumarin (**6**; 4,9 mg) và 6-methoxy-7-hydroxycoumarin (**7**; 5,3 mg).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Từ cao *n*-hexan của rễ cây xáo tam phân thu hái ở tỉnh Phú Yên, chúng tôi đã phân lập được 7 hợp chất (**1-7**).



Hình 1. Cấu trúc hóa học của 1-7

Hợp chất **1**: Gum không màu. Phổ 1H và ^{13}C NMR (Bảng 1) cho các tín hiệu cộng hưởng ứng với 12 carbon bao gồm một vòng benzen 1,2,4- tam hoán [$\delta_H 7,64$ (1H, dd, $J = 8,3$ & $2,0$ Hz, H-7), $7,51$ (1H, d,

$J = 2,0$ Hz, H-5) và $6,86$ (1H, d, $J = 8,3$ Hz, H-8)]; δ_C 157,6 (d, C-9), 132,1 (d, C-7), 131,3 (d, C-6), 127,9 (d, C-5), 121,5 (d, C-10) và 116,9 (d, C-8)], một nối đôi C=C mang hai proton ghép cặp *cis* [$\delta_H 6,37$ (1H,

d, $J = 9,9$ Hz, H-4) và 5,69 (1H, d, $J = 10,0$ Hz, H-3); δ_C 131,6 (d, C-3) và 121,5 (d, C-4)], một nhóm aldehyd [δ_H 9,82 (1H, s); δ_C 190,9 (s), 6-CHO] và hai nhóm methyl gắn trên carbon tứ cấp [δ_H 1,47 (6H, s); δ_C 28,6 (s, 2-(CH₃)₂)]. So sánh với tài liệu tham khảo [14] cho thấy đây là 2,2-dimethylchrom-3-en-6-carboxaldehyd (**1**), đã được Rao và cộng sự tổng hợp trước đây; tuy nhiên hợp chất này chưa được tìm thấy trong tự nhiên.

Hợp chất **2**: Gum không màu. Phổ ¹H và ¹³C NMR (Bảng 1) cho các tín hiệu cộng hưởng tương tự như hợp chất **1**, điểm khác biệt là nhóm aldehyd được thay thế bằng nhóm oxymethylen [δ_H 4,79 (2H, s); δ_C

65,7 (t, 11-CH₂)]. So sánh với tài liệu tham khảo [15] cho thấy hợp chất này là eulatachromen (**2**), chưa được tìm thấy trong tự nhiên mặc dù đã được Smith và cộng sự tổng hợp trước đây.

Hợp chất **3**: Gum không màu. Phổ ¹H và ¹³C NMR (Bảng 1) cho các tín hiệu cộng hưởng tương tự hợp chất **1**, điểm khác biệt là nhóm aldehyd được thay thế bằng một nhóm methylen mang nguyên tử oxygen [δ_H 3,81 (2H, t, $J = 6,5$ Hz, H-12); δ_C 63,9 (t, C-12)] và một nhóm methylen benzyl [δ_H 2,76 (2H, t, $J = 6,5$ Hz, H-11); δ_C 38,5 (t, C-11)]. So sánh với tài liệu tham khảo [16] cho thấy hợp chất này là ninhvanin (**3**), đã được phân lập từ rễ cây [2].

Bảng 1. Số liệu phổ ¹H và ¹³C NMR của **1-3** (trị số trong ngoặc là J tính bằng Hz)

Vị trí	1 (đo trong CDCl ₃)		2 (đo trong acetone- <i>d</i> ₆)		3 (đo trong CDCl ₃)	
	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C
1						
2		77,3		78,5		76,3
3	5,69 d (10,0)	131,6	5,84 d (9,9)	130,3	5,60 d (9,8)	129,6
4	6,37 d (9,9)	121,5	6,50 d (9,9)	122,1	6,29 d (9,8)	122,3
5	7,51 d (2,0)	127,9	7,71 d (2,2)	127,3	6,83 d (1,9)	127,0
6		131,3		128,2		130,5
7	7,64 dd (8,3 & 2,0)	132,1	7,79 dd (8,5 & 2,2)	132,5	6,95 dd (8,2 & 2,0)	131,2
8	6,86 d (8,3)	116,9	6,83 d (8,4)	117,1	6,72 d (8,2)	116,5
9		157,6		158,7		151,7
10		121,5		121,9		121,5
11			4,79 s	65,7	2,76 t (6,5)	38,5
12					3,81 t (6,5)	63,9
2 × (2-CH ₃)	1,47 s	28,6	1,45 s	28,5	1,42 s	28,1
6-CHO	9,82 s	190,9				

Hợp chất **4**: Gum không màu. Phổ ¹H và ¹³C NMR (Bảng 2) cho các tín hiệu cộng hưởng ứng với 14 carbon bao gồm một vòng benzen 1,2,4,5- tứ hoá [δ_H 7,35 (1H, s, H-5) và 6,77 (1H, s, H-8); δ_C 159,7 (s, C-7), 155,2 (s, C-9), 129,4 (d, C-5), 126,8 (s, C-6), 112,8 (s, C-10) và 102,8 (d, C-8)], một nối đôi C=C mang hai proton ghép cặp *cis* [δ_H 7,82 (1H, d, $J = 9,5$ Hz, H-4) và 6,13 (1H, d, $J = 9,5$ Hz, H-3); δ_C 144,8 (d, C-4) và 112,8 (d, C-4)], một carbon carbonyl đặc trưng của khung coumarin [δ_C 161,8 (s, C-2)]. Ngoài ra, còn có một dây nhánh isoprenyl bao gồm một nối đôi C=C tam hoá [δ_H 5,35 (1H, m, H-12); δ_C 133,4

(s, C-13) và 122,9 (d, C-12)], một nhóm methylen benzyl [δ_H 3,34 (2H, d, $J = 7,3$ Hz, H₂-11); δ_C 28,4 (t, C-11)] và hai nhóm methyl allyl [δ_H 1,73 (3H, s, H₃-14) và 1,71 (3H, s, H₃-15); δ_C 25,9 (q, C-14), 17,8 (q, C-15)]. So sánh với tài liệu tham khảo [17] cho thấy đây là demethylsuberosin (**4**) đã được tìm thấy ở loài *Spodoptera exigua*. Đây là lần đầu tiên hợp chất này được tìm thấy trong rễ xáo tam phân.

Hợp chất **5**: Gum không màu. Phổ ¹H và ¹³C NMR (Bảng 2) cho các tín hiệu cộng hưởng tương tự phổ của **4**. Điểm khác biệt là có sự đóng vòng nhóm isoprenyl tại C-6 với nhóm -OH tại C-7 trong **4** tạo

vòng 2,2-dimethylpyran trong **5**. Vòng này gồm một nối đôi C=C mang hai proton ghép cặp *cis* [δ_H 6,48 (1H, d, $J = 9,9$ Hz, H-11) và 5,84 (1H, d, $J = 9,9$ Hz, H-12); δ_C 113,8 (d, C-11) và 104,5 (d, C-12)], một carbon bậc bốn mang oxygen [δ_C 77,7 (C-13)] và hai nhóm methyl gắn vào carbon mang oxygen [δ_H 1,43 (6H, s, H₃-14 và H₃-15); δ_C 28,5 (d, C-14 và C-15)]. Vậy hợp chất này là xanthyletin (**5**), đã được phân lập từ rễ cây [5].

Hợp chất **6**: Bột vô định hình màu vàng nhạt. Phổ ¹H và ¹³C NMR (Bảng 2) cho thấy hợp chất có **9** carbon bao gồm một vòng benzen 1,2,4,5- tứ hoá [δ_H 7,05 (1H, s, H-8) và 6,78 (1H, s, H-5); δ_C 150,6 (s, C-7), 150,3 (s, C-9), 143,4 (s, C-6), 113,1 (d, C-5), 112,4 (s, C-10) và 103,6 (d, C-8)], một nối đôi C=C

mang hai proton ghép cặp *cis* [δ_H 7,77 (1H, d, $J = 9,5$ Hz, H-4) và 6,14 (1H, d, $J = 9,5$ Hz, H-3); δ_C 144,7 (d, C-4) và 111,0 (d, C-3)] và một carbon carbonyl của coumarin [δ_C 162,9 (s, C-2)]. Hợp chất này là 6,7-dihydroxycoumarin (**6**), phù hợp với tài liệu tham khảo [18], lần đầu tiên được phân lập từ rễ cây xáo tam phân.

Hợp chất **7**: Tinh thể hình kim màu trắng. Phổ ¹H và ¹³C NMR (Bảng 2) tương tự phổ của hợp chất **6**, sự khác biệt là một nhóm hydroxyl trong hợp chất **6** được thay bằng một nhóm methoxyl [δ_C 56,8 (s, 6-OCH₃)] So sánh với tài liệu tham khảo [18] cho thấy hợp chất này là 6-methoxy-7-hydroxycoumarin (**7**), lần đầu tiên được tìm thấy trong rễ cây xáo tam phân.

Bảng 2. Số liệu phổ ¹H và ¹³C NMR của **4-7** trong aceton-*d*₆ (trị số trong ngoặc là J tính bằng Hz).

Vị trí	4		5		6		7	
	δ _H	δ _C	δ _H	δ _C	δ _H	δ _C	δ _H	δ _C
1								
2		161,8		163,8		162,8		161,3
3	6,13 d (9,5)	112,8	6,19 d (9,5)	113,8	6,14 d (9,5)	113,3	6,17 d (9,5)	110,0
4	7,82 d (9,5)	144,8	7,84 d (9,5)	144,5	7,77 d (9,5)	144,5	7,84 d (9,5)	144,6
5	7,35 s	129,4	7,33 s	126,4	6,78 s	113,1	6,79 s	113,4
6		126,8		119,4		143,4		143,0
7		159,7		157,3		150,6		151,8
8	6,77 s	102,8	6,66 s	104,5	7,05 s	103,6	7,20 s	103,7
9		155,2		154,0		150,3		151,2
10		112,8		113,8		112,4		112,1
11	3,34 d (7,3)	28,4	6,48 d (9,9)	134,8				
12	5,35 m	122,9	5,85 d (9,9)	121,6				
13		133,4		77,7				
14	1,73 s	25,9	1,46 s	28,5				
15	1,71 s	17,8	1,46 s	28,5				
6-OCH							3,90 s	56,8

KẾT LUẬN

Ba chromen là 2,2-dimethylchrom-3-en-6-carboxaldehyd (**1**), eulatachromen (**2**) và ninhvanin (**3**) cùng với bốn coumarin là demethylsuberosin (**4**), xanthyletin (**5**), 6,7-dihydroxycoumarin (**6**) và 6-methoxy-7-hydroxycoumarin (**7**), đã được phân lập từ rễ cây xáo tam phân (*Paramignya trimera*). Cấu trúc

hóa học của các hợp chất này được xác định dựa vào phổ NMR. Đây là báo cáo đầu tiên về sự hiện diện của các hợp chất **1, 2, 4, 6** và **7** từ loài cây này và cũng là lần đầu tiên các hợp chất **1** và **2** được tìm thấy trong tự nhiên.

Chromenes and coumarins from the roots of *Paramignya trimera*

- **Trinh Hoang Duong**
- **Tran Thu Phuong**
- **Nguyen Dieu Lien Hoa**

University of Science, VNU-HCM

- **Ha Dieu Ly**

School of Medicine, VNU-HCM

ABSTRACT

Paramignya trimera, which belongs to the family Rutaceae, is used for the treatment of liver inflammation and cancer. Previous studies revealed that the roots of the species contained alkaloids, coumarins and chromenes. In this study, we reported the isolation of seven compounds from the roots collected in Phu Yen Province, comprising three

chromenes, 2,2-dimethylchrom-3-en-6-carboxaldehyde (1), eulatachromene (2) and ninvhanin (3), together with four coumarins, 7-demethylsuberosin (4), xanthyletin (5), 6,7-dihydroxycoumarin (6) and 6-methoxy-7-hydroxycoumarin (7). Their chemical structures were elucidated using NMR techniques.

Key words: *Paramignya trimera*, isolation, structure elucidation, chromenes, coumarins

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Phạm Hoàng Hộ, Cây cỏ Việt Nam Quyển II, NXB Trẻ Tp. Hồ Chí Minh, 439,1999.
- [2]. Nguyễn Mạnh Cường, Hồ Việt Đức, Nguyễn Văn Tài, Phạm Ngọc Khanh, Vũ Thị Hà, Trần Thu Hương, Nguyễn Duy Nhất, Bước đầu nghiên cứu thành phần hóa học cây Xáo tam phân họ Rutaceae, *Tạp chí Hóa học*, 51, 292–296 (2013).
- [3]. Phạm Huy Bách, Vũ Văn Tuấn, Nguyễn Thị Hà Ly, Nguyễn Minh Khởi, Phạm Thiên Thương, Phân lập và định lượng ostruthin trong dược liệu xáo tam phân thu hái tại Việt Nam, *Tạp chí Dược liệu*, 18, 3, 173–178 (2013).
- [4]. Bùi Trọng Đạt, Nguyễn Thanh Hồng, Lê Tiến Dũng, Nguyễn Hữu An, Mai Đình Trị, Một coumarin mới và chromene phân lập từ rễ cây Xáo tam phân *Paramignya trimera*, *Tạp chí Hóa học*, 51, 4AB, 362–365 (2013).
- [5]. Trần Thị Thúy Quỳnh, Lê Thị Kim Thoa, Phạm Đông Phương, Phân lập một số hợp chất coumarin trong rễ xáo tam phân (*Paramignya trimera* (Oliv.) Burkill), *Tạp chí Dược học*, 457, 60–64 (2014).
- [6]. Trần Thị Thúy Quỳnh, Nguyễn Trung Dũng, Phạm Đông Phương, Phân lập một vài hợp chất acridon alcaloid trong rễ xáo tam phân (*Paramignya trimera* (Oliv.) Burkill), *Tạp chí Dược học*, 458, 61–64 (2014).
- [7]. M.C. Nguyen, T.H. Tran, N.K. Pham, V.T. Nguyen, T.H. Vu, T.S. Ninh, H.T. Bui, Y.H. Kim, Paratrimersins A and B, two new dimeric monoterpene-linked coumarin glycosides from the roots and stems of *Paramignya trimera*, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 63, 945–949 (2015).
- [8]. Nguyễn Thị Ngọc Dung, Trần Thị Thúy Quỳnh, Phạm Đông Phương, Vĩnh Định, Định lượng đồng thời ostruthin và 8-methoxyostruthin trong rễ xáo tam phân (*Paramignya trimera* (Oliv.) Burkill) bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao, *Tạp chí Dược học*, 476, 934–938 (2015).
- [9]. V.T. Nguyen, Q.N.M. Pham, V.Q. Vuong, M.C. Bowyer, A.v. I. Altena, C.J. Scarlett, Phytochemical retention and antioxidant capacity of xáo tam phân (*Paramignya trimera*) root as prepared by different drying methods, *Drying Technology*, 34, 3, 324–334 (2016).

- [10]. V.T. Nguyen, M.C. Bowyer, V.Q. Vuong, A.v.I. Altena, C.J. Scarlett, Phytochemicals and antioxidant capacity of Xao tam phan (*Paramignya trimeria*) root as affected by various solvents and extraction methods, *Industrial Crops and Products*, 67, 192–200 (2015).
- [11]. Nguyễn Minh Khởi, Phạm Thị Tuyết Hằng, Đỗ Thị Phương, Nghiên cứu độc tính cấp, tác dụng bảo vệ gan và tác dụng gây độc tế bào ung thư của xáo tam phân, *Tạp chí Dược liệu*, 18, 1, 14–20 (2013).
- [12]. Đỗ Thị Thảo, Nguyễn Thị Cúc, Trần Thu Hương, Phạm Ngọc Khanh, Ninh Thế Sơn, Nguyễn Mạnh Cường, Tác dụng bảo vệ gan của cao rễ cây Xáo tam phân (*Paramignya trimeria*) trên mô hình chuột bị gây tổn thương gan bằng paracetamol, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam*, 1, 2, 60–64 (2015).
- [13]. Trịnh Hoàng Dương, Trần Thu Phương, Hà Diệu Ly, Nguyễn Thụy Vy, Đặng Văn Sơn, Nguyễn Diệu Liên Hoa, Coumarin và acridon alkaloid từ rễ cây Xáo tam phân (*Paramignya trimeria*), *Tạp chí Khoa học Đại học Quốc gia Hà Nội: Khoa học Tự nhiên và Công nghệ*, 32, 4, 115–123 (2016).
- [14]. G.V. Rao, B.N. Swamy, V. Chandregowda, G.C. Reddy, Synthesis of (\pm)Abyssinone I and related compounds: Their anti-oxidant and cytotoxic activities, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 44, 2239–2245 (2009).
- [15]. L.R. Smith, N. Mahoney, R.J. Molyneux, Synthesis and structure-Phytotoxicity relationships of acetylenic phenols and chromene metabolites, and their analogues, from the grapevine pathogen *Eutypa lata*, *Journal of Natural Product*, 66, 169–176 (2003).
- [16]. C. Wattanapiromsakul, G.P. Waterman, Flavanone, triterpene and chromene derivatives from the stems of *Paramignya griffithii*, *Phytochemistry*, 55, 269–273 (2000).
- [17]. J.T. Trumble, J.G. Millar, Biological activity of marmesin and demethylsuberosin against a generalist herbivore, *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae), *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 2859–2864 (1996).
- [18]. M.D. Makuch, I. Malawska, Coumarins in horse chestnut flowers: Isolation and qualification by UPLC method, *Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug Research*, 70, 517–522 (2013).