

Nghiên cứu mối quan hệ giữa hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase và cấu trúc của các hợp chất epoxy lignan

- Lê Hữu Thọ
- Nguyễn Xuân Hải
- Nguyễn Thị Thanh Mai

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

(Bài nhận ngày 07 tháng 12 năm 2016, nhận đăng ngày 28 tháng 11 năm 2017)

TÓM TẮT

Epoxy lignan là những hợp chất thuộc họ polyphenol có rất nhiều hoạt tính sinh học như ức chế sự phát triển của các tế bào ung thư, kháng oxy hóa, làm hạ đường huyết, ... Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành nghiên cứu hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase của 11 hợp chất epoxy lignan được phân lập từ thân cây Mít dai (*Artocarpus heterophyllus*), thân cây Guồỉ đỏ (*Willughbeia cochinchinensis*), vỏ thân Cắn sen (*Crateva religiosa*) và keo Ong dú (*Trigona minor*). Kết quả cho thấy hợp chất 1-4, 7-

10 có hoạt tính ức chế mạnh hơn chất đối chứng dương acarbose (IC_{50} , 214.5 μ M). Dựa vào các kết quả này, mối tương quan hoạt tính-cấu trúc của các hợp chất cho thấy sự hiện diện của nhóm hydroxyl tại các vị trí C-4 và C-4' đóng vai trò quan trọng trong việc làm tăng hoạt tính. Hơn nữa, các hợp chất diepoxy lignan có nhóm ketone tại vị trí C-9' cũng làm cải thiện hoạt tính mạnh hơn. Ngược lại, sự mở vòng epoxy tại vị trí C-7 và C-9' sẽ làm giảm hoạt tính.

Từ khóa: epoxy lignan, ức chế α -glucosidase, mối quan hệ hoạt tính cấu trúc

MỞ ĐẦU

Lignan là hợp chất polyphenol có nguồn gốc từ tự nhiên được tìm thấy qua quá trình sinh tổng hợp của các phenylpropanoid. Các hợp chất này có vai trò quan trọng trong thực phẩm hằng ngày hay được sử dụng làm thuốc hỗ trợ điều trị ung thư, kháng oxy hóa, ... Vì thế, lignan được xem như là hoạt chất tiềm năng trong các nghiên cứu tổng hợp, bán tổng hợp và chức năng sinh học của các hợp chất này. Hầu hết các hợp chất lignan trong tự nhiên tồn tại ở các khung sườn khác nhau và có hoạt tính sinh học đặc trưng. Điển hình như các hợp chất epoxy lignan có rất nhiều hoạt tính sinh học như khả năng gây độc, ức chế sự phát triển của các tế bào ung thư, kháng viêm, kháng khuẩn, kháng virus, kháng oxy hóa và hoạt tính ức chế gốc tự do NO, enzyme cAMP phosphodiesterase, cytochrome oxidase, succinoxidase, ... [1-3].

Những năm gần đây, các công trình nghiên cứu cho thấy các hợp chất 7,9'-epoxy lignan và 7,9':7',9'-diepoxy lignan có khả năng ức chế enzyme α -glucosidase. Đây là enzyme xúc tác cho quá trình thủy phân carbohydrate để giải phóng α -D-glucose trong cơ thể. Khi lượng đường α -D-glucose trong máu tăng cao sẽ gây ra bệnh đái tháo đường. Do vậy, nếu tìm được chất ức chế enzyme α -glucosidase sẽ làm giảm quá trình thủy phân và hấp thu carbohydrate vào cơ thể. Như vậy có thể làm giảm được hàm lượng đường trong máu của người bệnh, đây cũng chính là liệu pháp điều trị bệnh đái tháo đường một cách hiệu quả và an toàn [4-7].

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành nghiên cứu hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase của các thành phần epoxy lignan được phân lập từ thân cây Mít dai (*Artocarpus heterophyllus*), thân cây

Guồi đỏ (*Willughbeia cochinchinensis*), vỏ thân cây Cần sen (*Crateva religiosa*) và keo Ong dú (*Trigona minor*). Từ đó, có cơ sở dữ liệu để giải thích mối tương quan về cấu trúc các hợp chất epoxyignan và hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase của chúng.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Hóa chất – dụng cụ

Dung dịch đệm phosphate 0,01 M, pH 7,0. Dung dịch Na_2CO_3 0,1 M. Dung dịch nền *p*-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside (*p*-NP-G) 3 mM. Dung dịch enzyme α -glucosidase 0,2 U mL⁻¹. Dung dịch mẫu dự trữ: cân chính xác 1,5 mg đối với mẫu chất tinh khiết có phân tử lượng 500 đvC, hòa tan trong đệm phosphate 0,01 M, pH 7,0. Sau đó, tiến hành pha loãng thành dung dịch mẫu làm việc 1000 μM . Chất đối chứng dương acarbose.

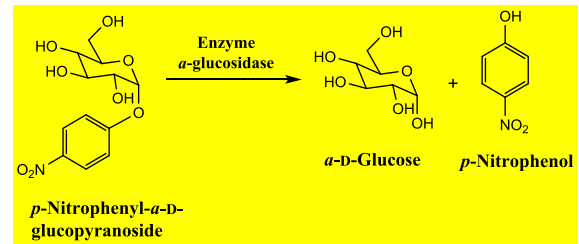
Thiết bị quang phổ UV-VIS Shimadzu 1800.

Phương pháp thử hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase

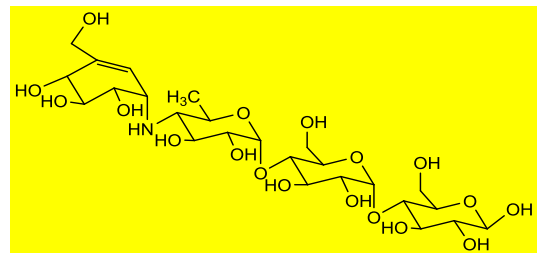
Hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase dựa trên phương pháp phân tích trắc quang. Enzyme α -glucosidase xúc tác quá trình thủy phân cơ chất heterogenous như saccharose và *p*-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside. Do đó, để khảo sát hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase, *p*-nitrophenyl- α -D-glucopyranosid (*p*-NP-G) được sử dụng như là cơ chất ban đầu (chất nền) và enzyme α -glucosidase sẽ chuyển hóa cơ chất này thành α -D-glucose và *p*-nitrophenol. Theo phản ứng, lượng α -D-glucose sinh ra tỉ lệ với *p*-NP-G bị thủy phân và lượng *p*-nitrophenol tạo thành. Vì vậy dựa vào độ hấp thụ của *p*-nitrophenolate ở bước sóng 401 nm có thể định lượng α -D-glucose sinh ra. Khi mẫu thử có hoạt chất ức chế enzyme α -glucosidase thì hàm lượng *p*-nitrophenol tạo thành sẽ giảm. So sánh cường độ màu của dung dịch khi có và không có hoạt chất ức chế, sẽ tính được khả năng ức chế enzyme α -glucosidase của hoạt chất đó [8-9] (Hình 1).

Để có cơ sở đánh giá hoạt tính của những mẫu chất khảo sát, chúng tôi sử dụng acarbose làm chất đối chứng dương để so sánh, vì đây là hợp chất được

sử dụng làm chất đối chứng trong các tài liệu tham khảo [8-9] (Hình 2).



Hình 1. Phản ứng thủy phân enzyme α -glucosidase với cơ chất *p*-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside



Hình 2. Cấu trúc của acarbose ($\text{C}_{25}\text{H}_{43}\text{NO}_{18}$)

Khả năng ức chế enzyme α -glucosidase được đánh giá thông qua giá trị phần trăm ức chế (I %):

$$I \% = \frac{A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \times 100 \%$$

Trong đó:

A_{control} : Giá trị mật độ quang của dung dịch không chứa mẫu khảo sát.

A_{sample} : Giá trị mật độ quang của dung dịch chứa mẫu khảo sát.

Dựa trên phần trăm ức chế tại các nồng độ khác nhau của mẫu thử, tiến hành đánh giá khả năng ức chế enzyme α -glucosidase của mẫu thử thông qua giá trị IC_{50} . Giá trị IC_{50} (Inhibitory concentration) được định nghĩa là nồng độ của một mẫu thử mà tại đó nó có thể ức chế được 50 % enzyme α -glucosidase.

Quy trình thử hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase

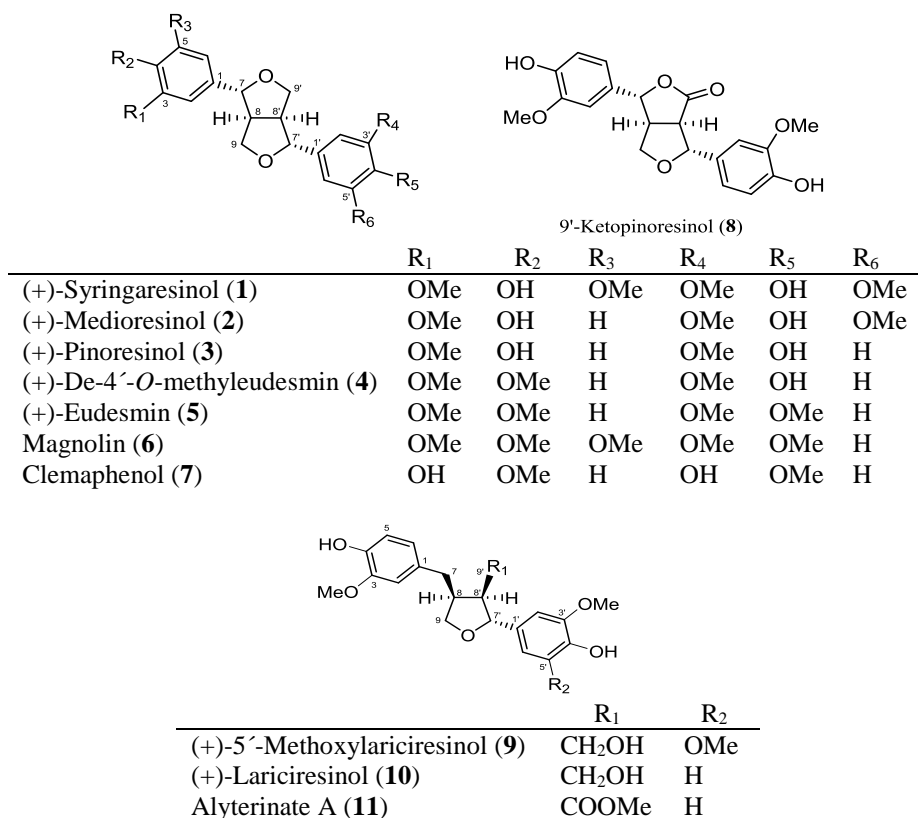
Quy trình thử hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase được thực hiện như sau: mẫu được hòa tan trong dung dịch đệm phosphate 0,01 M, pH 7,0. Thêm 25 μL enzyme α -glucosidase 0,2 U mL⁻¹, lắc đều, ủ trong 5 phút tại nhiệt độ 37 °C. Tiếp tục thêm

25 μL dung dịch chất nền *p*-nitrophenyl- α -D-glucopyranosid 3 mM và ủ trong 30 phút tại 37 $^{\circ}\text{C}$ để phản ứng xảy ra. Sau khi ủ, thêm 375 μL Na_2CO_3 0,1 M để ngừng phản ứng. Dung dịch sau đó được đo quang tại bước sóng 401 nm.

Mỗi mẫu thử được thực hiện tại 5 nồng độ 250, 100, 50, 25, 10 μM , mỗi nồng độ thực hiện 3 lần. Tương ứng với mỗi nồng độ mẫu thử, tiến hành thực hiện một mẫu trắng, mẫu trắng tương tự như mẫu thử nhưng thay dung dịch enzyme α -glucosidase bằng dung dịch đệm phosphate 0,01 M, pH 7,0. Từ đó tính được giá trị phần trăm ức chế (I %) với từng nồng độ khảo sát là giá trị trung bình cộng của 3 giá trị mật độ quang đo được ở mỗi nồng độ.

Thu nhận các hợp chất epoxyignan có nguồn gốc tự nhiên

Tiến hành thu nhận các hợp chất (+)-syringaresinol (1), (+)-medioresinol (2) và 9'-ketopinoresinol (8) được phân lập từ thân cây Mít dai (*Artocarpus heterophyllus*); hợp chất (+)-pinoresinol (3) và alyterinate A (11) được cô lập từ thân cây Guồỉ đỏ (*Willughbeia cochinchinensis*); hợp chất magnolin (6) được cô lập từ vỏ thân Cây sen (*Crateva religiosa*); hợp chất (+)-de-4'-*O*-methyleudesmin (4), (+)-eudesmin (5), clemaphenol (7), (+)-5'-methoxylariciresinol (9) và (+)-lariciresinol (10) được cô lập từ keo Ong dú (*Trigona minor*). Cấu trúc các hợp chất này được trình bày trong Hình 3.



Hình 3. Cấu trúc của các hợp chất epoxyignan

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả thử hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase của các hợp chất epoxyignan

Tiến hành thử hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase của 11 hợp chất epoxyignan, kết quả cho thấy tất cả các hợp chất đều có khả năng ức chế enzyme α -glucosidase ở các nồng độ khảo sát. Trong đó, hợp chất **1–4, 7–10** có giá trị ức chế enzyme α -

glucosidase mạnh hơn chất đối chứng dương acarbose (IC_{50} , 214,5 μ M). Hợp chất (+)-syringaresinol (**1**), (+)-medioresinol (**2**), 9'-ketopinoresinol (**8**) có giá trị ức chế rất mạnh với giá trị IC_{50} lần lượt là 18,9; 22,8; và 16,1 μ M; trong đó hợp chất **8** ức chế enzyme α -glucosidase mạnh nhất (Bảng 1).

Bảng 1. Kết quả thử hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase của các hợp chất epoxyignan

Hợp chất	Phần trăm ức chế (%)					IC_{50} (μ M)
	250 μ M	100 μ M	50 μ M	25 μ M	10 μ M	
1		79,80 \pm 0,43	68,38 \pm 0,34	55,41 \pm 0,36	40,20 \pm 0,99	18,9
2	*	85,5 \pm 1,6	64,91 \pm 0,60	53,33 \pm 0,41	30,9 \pm 1,0	22,8
3	*	72,40 \pm 0,31	57,0 \pm 1,8	40,92 \pm 0,31	17,2 \pm 1,1	37,9
4	72,1 \pm 1,5	55,02 \pm 0,91	38,2 \pm 1,0	22,41 \pm 0,34	7,92 \pm 0,75	85,1
5	51,68 \pm 0,49	32,49 \pm 0,51	26,09 \pm 0,15	22,89 \pm 0,56	19,69 \pm 0,78	236,9
6	3,59 \pm 0,21	-	-	-	-	> 250
7	96,7 \pm 1,2	36,6 \pm 1,0	19,61 \pm 0,72	7,21 \pm 0,80	1,21 \pm 0,31	131,8
8	*	85,47 \pm 0,92	70,47 \pm 0,74	59,30 \pm 0,79	43,67 \pm 0,92	16,1
9	*	86,52 \pm 0,21	61,62 \pm 0,30	35,20 \pm 0,68	18,8 \pm 1,3	33,7
10	*	76,16 \pm 0,27	29,6 \pm 1,2	16,8 \pm 1,2	-	69,6
11	49,21 \pm 0,51	37,6 \pm 1,0	33,73 \pm 0,12	31,78 \pm 0,99	29,86 \pm 0,87	~ 250
Acarbose	59,8 \pm 1,2	21,2 \pm 2,2	9,8 \pm 1,1	3,2 \pm 1,7	-	214,5

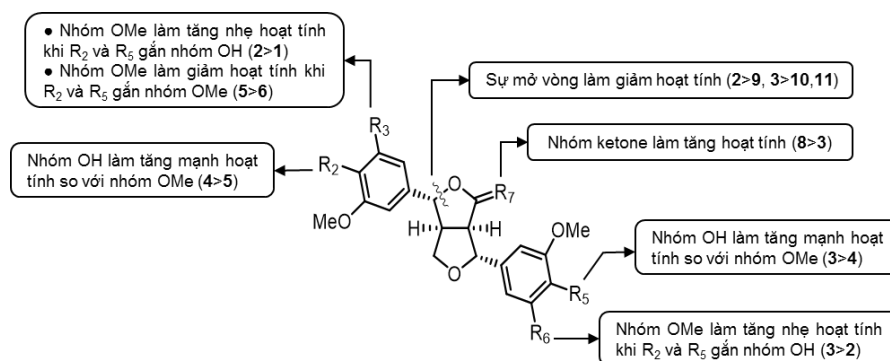
(*) Phần trăm ức chế hơn 100 %

(-) Phần trăm ức chế < 1%

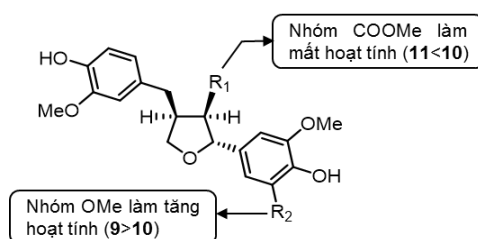
Mối quan hệ giữa hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase và cấu trúc của các hợp chất epoxyignan

Dựa vào giá trị IC_{50} của các hợp chất 7,9':7',9'-diepoxyignan (**1–8**) cho thấy có mối quan hệ giữa cấu trúc và hoạt tính hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase của chúng. Kết quả cho thấy hợp chất **8** có hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase mạnh nhất với giá trị IC_{50} = 16,1 μ M. Thêm vào đó, sự biến mất một nhóm ketone tại vị trí C-9' của hợp chất **3** làm giảm hoạt tính đáng kể (IC_{50} , 37,9 μ M). Điều này chứng minh sự xuất hiện nhóm ketone tại vị trí C-9' làm tăng mạnh khả năng ức chế enzyme α -glucosidase. Bên cạnh đó, sự methoxy hóa tại vị trí C-5 và C-5' làm tăng nhẹ hoạt tính (hợp chất **2** > hợp

chất **1** và hợp chất **3** > hợp chất **4**). Ngược lại, hoạt tính của chúng giảm khi thay đổi 2 nhóm thế hydroxyl bởi 2 nhóm methoxy tại vị trí C-4 và C-4' (hợp chất **5** > hợp chất **6**). Kết quả thử hoạt tính còn cho thấy sự hydroxyl hóa tại vị trí C-4 và C-4' của hợp chất 7,9':7',9'-diepoxyignan đóng vai trò quan trọng trong quá trình ức chế enzyme α -glucosidase. Điều này được chứng minh thông qua sự so sánh giá trị IC_{50} của hợp chất **4** (IC_{50} , 84,1 μ M) và **5** (IC_{50} , 236,9 μ M), hợp chất **1** (IC_{50} , 18,9 μ M) và **2** (IC_{50} , 22,8 μ M). Ngoài ra, sự mở vòng tại vị trí C-7 hợp chất 7,9':7',9'-diepoxyignan sẽ làm giảm hoạt tính đáng kể (hợp chất **2** > hợp chất **9**, hợp chất **3** > hợp chất **10** và hợp chất **11**) (Hình 4).



Hình 4. Mối quan hệ giữa hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase và cấu trúc của các hợp chất 7,9':7',9-diepoxyignan



Hình 5. Mối quan hệ giữa hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase và cấu trúc của các hợp chất 7,9'-epoxyignan

Tiếp theo, kết quả thử hoạt tính của hợp chất (9–11) cho thấy sự methoxy hóa tại vị trí C-5' ở hợp chất 9 (IC_{50} , 33,7 μ M) cải thiện hoạt tính đáng kể (hợp chất 9 > hợp chất 10). Ngoài ra, sự xuất hiện nhóm methyl carboxylate làm mất khả năng ức chế enzyme α -glucosidase (hợp chất 11 < hợp chất 10) (Hình 5).

KẾT LUẬN

Tóm lại, nghiên cứu này đã cho thấy hoạt chất 9'-ketopinoresinol (8) được xem là chất ức chế enzyme α -glucosidase mạnh nhất (IC_{50} , 16,1 μ M). Nghiên cứu mối tương quan cấu trúc–hoạt tính cho thấy sự xuất hiện của nhóm hydroxyl tại các vị trí C-4, C-4' và nhóm ketone tại vị trí C-9' đóng vai trò quan trọng

trong việc ức chế sự hoạt động của enzyme α -glucosidase. Kết quả nghiên cứu này góp phần cung cấp những bằng chứng khoa học chứng minh khả năng ức chế enzyme α -glucosidase của các hoạt chất epoxyignan, từ đó xác định vai trò của các hợp chất thiên nhiên đối với cơ thể con người, và bổ sung cơ sở dữ liệu cho các nghiên cứu tìm ra các loại thuốc từ thiên nhiên hỗ trợ điều trị bệnh đái tháo đường.

Lời cảm ơn: Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn đến Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM, đã tài trợ trong khuôn khổ Đề tài mã số T2016-07.

Study on structure–activity relationships (SARs) of epoxyignan compounds with α -glucosidase inhibitory activity

- Le Huu Tho
- Nguyen Xuan Hai
- Nguyen Thi Thanh Mai

University of Science, VNU-HCM

ABSTRACT

*Epoxyignans are polyphenolic compounds, which possess various biological activities such as antiproliferative activity on cancer cells, antioxidant, antihyperglycemic, ... In this research, we study on α -glucosidase inhibitory activity of 11 epoxyignans isolated from the stem of *Artocarpus heterophyllus*, the stem of *Willughbeia cochinchinensis*, the stem bark of *Crateva religiosa*, and the propolis of *Trigona minor*. The results showed that, compounds 1–4 and 7–10 were more potent inhibitory activity*

than that of positive control acarbose (IC_{50} , 214.5 μ M). Based on the results, their structure-activity relationships showed that the presence of the hydroxyl group at C-4, and C-4' positions play an important role in increasing the activity. Furthermore, diepoxyignans having a ketone group at C-9' exhibited stronger activity. In contrast, the opening of an epoxy ring at C-7 the C-9' positions reduced the activity.

Keywords: Epoxyignan, α -glucosidase inhibition, structure–activity relationships (SARs)

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. W.D.MacRae, G. H. N.Towers, Biological activities of lignans, *Phytochemistry*, 23, 1207–1220 (1984).
- [2]. J.L. Ríos, R.M. Giner, J.M. Prieto, New findings on the bioactivity of lignans, in: R. Atta ur (Ed.) *Studies in Natural Products Chemistry*, Elsevier, 183–292 (2002).
- [3]. X. Wang, Z. Liu, W. Qiao, R. Cheng, B. Liu, G. She, Phytochemicals and biological studies of plants from the genus *Balanophora*, *Chemistry Central Journal*, 6, 79–85 (2012).
- [4]. Y. Chen, Y. Liu, X. Li, J. Zhang, G. Li, Lignin interacting with α -glucosidase and its inhibitory effect on the enzymatic activity, *Food Biophysics*, 10, 264–272 (2014).
- [5]. Y.H. Chu, S.H. Wu, J. F. Hsieh, Isolation and characterization of α -glucosidase inhibitory constituents from *Rhodiola crenulata*, *Food Research International*, 57, 8–14 (2014).
- [6]. A. Wikul, T. Damsud, K. Kataoka, P. Phuwapraisirisan, (+)-Pinoresinol is a putative hypoglycemic agent in defatted sesame (*Sesamum indicum*) seeds though inhibiting α -glucosidase, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 22, 5215–5217 (2012).
- [7]. Z. Yin, W. Zhang, F. Feng, Y. Zhang, W. Kang, α -Glucosidase inhibitors isolated from medicinal plants, *Food Science and Human Wellness*, 3, 136–174 (2014).
- [8]. P.H. Dang, N.T. Nguyen, H. X. Nguyen, L.B. Nguyen, T. H. Le, T. N.Do, M.V.Can, M. T.T. Nguyen, α -Glucosidase inhibitors from the leaves of *Embelia ribes*, *Fitoterapia*, 100, 201–207 (2015).
- [9]. P.H. Dang, H.X. Nguyen, N. T. Nguyen, H. N. Le, M. T. Nguyen, α -Glucosidase inhibitors from the stems of *Embelia ribes*, *Phytotherapy Research*, 28, 1632–1636 (2014).