

Phân lập, định lượng các thành phần thu được trong mẫu keo ong từ rừng nhiệt đới Việt Nam

Trần Thị Mỹ Kiều*, Hoàng Thị Thoa, Đỗ Thị Bích Ngọc

Khoa Dược, Đại học Nguyễn Tất Thành

*ttmkieu@ntt.edu.vn

Tóm tắt

Tình hình chung và mục tiêu nghiên cứu: Keo ong là một loại nhựa tự nhiên, được thu thập bởi ong mật (*Apis mellifera*). Ong mật sẽ thu thập keo ong từ chồi của các loại cây khác nhau. Với sự đa dạng của keo ong ở vùng nhiệt đới, nhóm nghiên cứu tiến hành xác định thành phần hóa học của keo ong rừng Eawy (Đắk Lắk) so sánh với một mẫu keo ong châu Âu và một mẫu keo ong thương mại. Mẫu keo ong châu Âu có thành phần hóa học là flavonoid, acid phenolic và este liên quan đến keo ong loại poplar. Và 5 chiết xuất keo ong khác từ rừng Eawy cho thấy sự hiện diện của các hợp chất và các polyphenol khác nhau. Phương pháp nghiên cứu: Phân tích bằng sắc ký flash của dịch chiết etanolic thu được 14 phân đoạn, 3 trong số đó được phân tích bởi HPLC/UV và HPLC/MS, NMR. *Kết quả*: Một trong những hợp chất chính của keo ong này đã được tinh chế và được phân tích bằng NMR. Đó là một flavanone cụ thể là pinocembrine.

Nhận 28.02.2019
Được duyệt 18.11.2019
Công bố 25.12.2019

Từ khóa
keo ong Eawy,
thành phần hóa học,
sắc ký flash,
HPLC-MS

© 2019 Journal of Science and Technology - NTTU

1 Đặt vấn đề

Keo ong là hỗn hợp nhựa tự nhiên và rất phức tạp, với nhiều thành phần khác. Keo ong do ong mật (*Apis mellifera*) thu thập từ chồi cây, nhựa cây, hoa của những loài thực vật khác nhau. Keo ong chứa sáp, nhựa, polyphenol và các dẫn xuất của chúng[1]. Hiện nay, thành phần của keo ong có thể thay đổi tùy thuộc vào hệ thực vật địa phương. Nhờ sự đa dạng của keo ong ở rừng nhiệt đới, nhóm nghiên cứu khám phá thành phần hóa học của keo ong thu được so với sản phẩm thương mại và một mẫu keo ong châu Âu để đánh giá hiệu suất chiết và thành phần hóa học của keo ong.

1.1 Keo ong ở châu Phi

- Tây Phi: Nghiên cứu của E.A. Ophori và cộng sự từ keo ong miền nam Nigeria bằng sắc ký lỏng kết hợp với máy dò tán xạ ánh sáng chứng minh sự hiện diện của isoflavonoid prenylated và stilbenoid mới trong keo ong, với nguồn thực vật có thể là *Macaranga Schweinfurthii*. Ở Ghana, hai hoạt chất thuộc nhóm stilbene mới được phân lập từ keo ong và xác định bằng HPLC-MS là prenyl phloroglucinone và tetrahydroxy-stilbene prenylated từ nguồn thực vật *Dorstenia poinsettifolia* var. *anyusta* Engl. (Moraceae)[1]

- Bắc Phi: Nghiên cứu về một loại keo ong Ai Cập cho thấy các hợp chất keo ong chính (nguồn thực vật có thể: *Macaranga* spp.) là geranyl flavanones và anthra-quinones[2].

- Nam Phi: Phân tích UPLC-ESI-MS của 39 mẫu keo ong từ Nam Phi (nguồn thực vật có thể: *Dalbergia ecastophyllum*) đã báo cáo 15 acid phenolic chính[3] và flavonoid, những chất chính là: acid cafeic, quercetin, galangin, chrysin, pinobanksin, pinobanksin 5-methyl ether, pinocembrin[4].

- Đông Phi: Một keo ong được thu hoạch ở Kenya (nguồn thực vật có thể: *Phyllanthus myrtifolius*) chứa hai phytoestrogen mới: tetrahydrojusticidin B và 6-methoxydiphylline. Ngoài ra, các thành phần khác đã được xác định trong keo ong Kenya này là: phyllamycin, triterpenes, aryl-naphthalene, macarangine, schweinfurthines A và B[5]. Zhang và cộng sự cũng đã chỉ ra rằng các hợp chất keo ong chính là triterpen và chủ yếu là dẫn xuất của amyryl và lupeol[6]. Các hợp chất hóa học được tìm thấy trong các mẫu từ phía tây bắc Cameroon (nguồn thực vật: *Mangifera indica*) là: prenyl và geranyl stilbenes, prenyl phloroglucinone, triterpenoid, phloroglucinonone, α và β -amyryl, lupeol, cycloartenol, lignans, flavonoid geranyl acid mangi-feronic, ambonic, mangiferolic, ambolic[1,7] và tetrahydro-justicidin B, 6-methoxydiphylline[8].

1.2 Keo ong châu Âu



Keo ong châu Âu thường bao gồm flavonoid, acid cinnamic và este. Keo ong từ Bulgaria, Ý, Thụy Sĩ và Pháp có các hợp chất chính như pinocembrin, pinobanksin, chrysin, galangin và prenyl este của acid caffeic, ferulic[9-12].

Keo ong dính ở nhiệt độ 20°C trở lên. Ở nhiệt độ thấp hơn, keo ong trở nên cứng và giòn. Thực tế, trong quá trình thu thập mật hoa và phấn hoa, ong mật cũng đồng thời thu thập nhựa cây từ các chồi cây, hoa khác nhau trong khu vực sinh sống của chúng. Sau đó, nhựa cây được ong mật nhai, kết hợp với nước bọt của ong để hình thành một hỗn hợp chất mới gọi là keo ong. Keo ong được ong sử dụng để ổn định cấu trúc của tổ ong, giảm độ rung cho tổ ong, sửa chữa những vết rách, kẽ hở không mong muốn của tổ ong, tăng cường phòng thủ cho tổ ong do niêm phong các lỗ vào, ngăn ngừa kí sinh trùng và vi khuẩn xâm nhập, hạn chế sự phát triển của vi khuẩn, nấm mốc, chống sự thối rữa và phòng chống mọi khả năng lây lan các bệnh có khả năng nguy hại trong tổ ong.

Đến nay, với công nghệ chiết xuất tiên tiến cũng như được rất nhiều các nhà khoa học cả đông y lẫn tây y nghiên cứu và phát triển, keo ong đã được xác nhận là thành phần, phương thuốc quý, tác dụng keo ong rất tốt và được sử dụng rộng rãi trong cuộc sống như: tác dụng kháng khuẩn, chống virus, nấm, nhiễm trùng, chống viêm, điều hòa miễn dịch, tăng cường sức đề kháng, chống loét, làm chóng lành vết thương và kích thích mau lên da non với các thành phần hợp chất quý như: protein, acid amin, vitamin, khoáng chất, các flavonoid[13].

1.3 Tiến độ nghiên cứu ở Việt Nam

Ở nước ta, mỗi đàn ong mật chỉ cho thu hoạch được khoảng 0,2kg/đàn/năm do đặc thù của giống ong, vùng nguyên liệu còn nhiều hạn chế và đặc biệt là người nuôi ong cũng chưa chú trọng vào sản phẩm keo ong nên chúng ta chưa có nguồn keo ong tốt. Năm 2017, Nguyễn Thị Thanh Mai và các đồng nghiệp phát hiện ra rằng keo ong của *Apis mellifera*, được nuôi ở Việt Nam, có hàm lượng flavonoid và polyphenol thấp hơn keo ong của Brazil, gấp 3-10 lần. Vì vậy, keo ong Việt Nam có tác dụng chống oxi hóa và hoạt tính kháng khuẩn yếu hơn. Tuy nhiên, keo ong Việt Nam có hoạt tính chống ung thư rất mạnh, đặc biệt là ung thư tuyến tụy[14].

2 Nội dung và phương pháp nghiên cứu

2.1 Nguyên liệu và máy móc

2.1.1 Keo ong thô

5 mẫu keo ong thô được thu thập ngẫu nhiên từ rừng Eawy vào hè năm 2018 và 1 mẫu keo ong thô châu Âu có sẵn từ đợt nghiên cứu trước đó, thu ở 1 khu rừng phía nam Barcelona vào hè năm 2017.

2.1.2 Keo ong thương mại (bột và chất lỏng)

Keo ong thương mại từ phòng thí nghiệm Cooper (Melun) có hai dạng: chiết xuất khô (bột mịn, mùi dễ chịu, 250g) và

chiết xuất chất lỏng (V = 1 lít, màu nâu).

2.1.3 Máy móc sử dụng

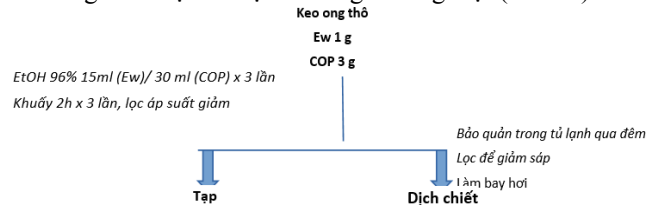
- Máy quang phổ NMR JEOL ở 270 MHz cho NMR ¹H
- Máy phân tích HPLC-UV, MS
- Đầu đọc microplaque TECAN Infinite 2002.

2.2 Phương pháp nghiên cứu

2.2.1 Dịch chiết

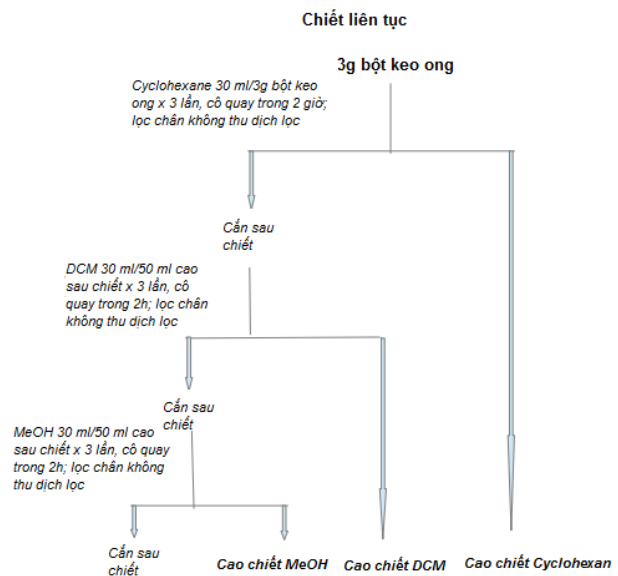
5 mẫu keo ong thô từ rừng Eawy và 1 mẫu keo ong châu Âu được bảo quản lạnh (sử dụng nitơ lỏng) để tăng diện tích tiếp xúc trước khi chiết.

Qui trình chiết etanolic (EEP) được thực hiện với 6 mẫu keo ong thu được và bột keo ong thương mại (Hình 1).



Hình 1 Qui trình chiết ethanol của keo ong thô

Sau đó, qui trình chiết xuất liên tiếp với các dung môi khác nhau được thực hiện như qui trình Hình 2.



Hình 2 Qui trình chiết liên tục với 3 dung môi

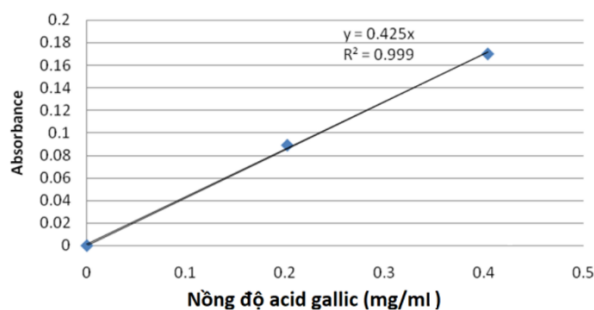
2.2.2 Sắc kí lớp mỏng

Phân tích bằng sắc kí lớp mỏng được thực hiện trên ALUGRAM Xtra SIL G/UV₂₅₄, độ dày 0,20mm, silicagel 60 với chỉ thị fluorescence UV₂₅₄. Môi trường sử dụng là hỗn hợp cyclohexan và ethyl acetat với tỉ lệ 80:20 hoặc 70:30 (COP-EEP) tùy vào độ phân cực của dịch chiết hoặc phân đoạn của keo ong thương mại. Vanilin sulfuric được lựa chọn làm chất thử hiện màu.

2.2.3 Định lượng

2.2.3.1 Định lượng polyphenol toàn phần

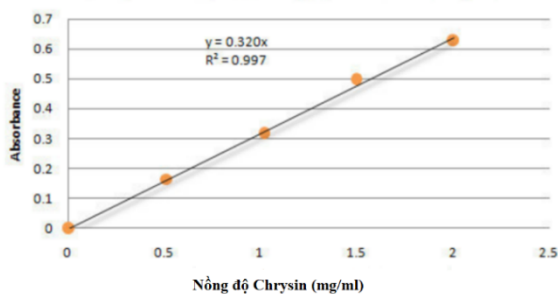
Tỉ lệ polyphenol toàn phần được xác định theo phương pháp đo màu Folin-Ciocalteu [13,14] nhưng tiến hành trực tiếp trong microplaque. 10 μ l dịch chiết (0,5mg/ml trong MeOH) được trộn với 20 μ l nước và 10 μ l chất phản ứng Folin-Ciocalteu. Sau khi lắc 3 phút, 120 μ l H₂O và 40 μ l dung dịch Na₂CO₃ 20% được thêm vào (thực hiện 3 lần phản ứng cùng lúc). Độ hấp thụ đo được ở 760nm sau khi ủ 30 phút trong tối. Một mẫu trắng được chuẩn bị tương tự nhưng thay dịch chiết bằng MeOH. Dùng acid gallic làm tương quan so sánh để dựng đồ thị (0-0,8mg/ml ; $y=0,425x$; $r^2=0,999$, n=3). Tỉ lệ polyphenol toàn phần biểu thị bằng miligram tương đương acid gallic so với dịch chiết (gram) (mg GAE/g).



Hình 3 Định lượng polyphenol toàn phần

2.2.3.2 Định lượng flavonoid toàn phần

Tỉ lệ flavon/flavonol được xác định bằng phương pháp của Woisky và Salatino [16] và được tiến hành trực tiếp trong microplaque. 60 μ l ethanol 95% được trộn với 20 μ l dịch chiết (ở 1,5mg/ml trong MeOH), rồi thêm 10 μ l dung dịch nước của AlCl₃ 4%, 10 μ l dung dịch nước của kali acetat 0,4M (thực hiện phản ứng 3 lần). Sau 30 phút ủ ở nhiệt độ phòng, đo độ hấp thụ ở 415nm. Dung dịch nước của AlCl₃ 4% được thay bằng Milli Q trong mẫu trắng. Chrysin được sử dụng như là chất chuẩn và được chuẩn bị ở nồng độ 50, 100, 150, 200 μ g/ml để xây dựng đồ thị ($y=0,320x$; $r^2=0,997$, n=3). Tỉ lệ flavon/flavonol được biểu thị bằng miligram của Chrysin tương đương theo gram dịch chiết (mg CE/g).



Hình 4 Định lượng flavonoid toàn phần

2.2.4 HPLC- DAD

Dịch chiết khô được hòa tan trong MeOH (10mg/ml) và li tâm ở 13000rpm trong 10 phút trước khi tiêm mẫu (10 μ l).

Phân tích này được thực hiện trên HPLC Waters 2695 DAD 2996 và cột Licrospher® 100 RP-18 (125 \times 4mm, μ m). Điều kiện rửa giải: pha động 0,1% acid formic (A) và MeOH (B), gradient 25-100 % B (0-40 phút), 100% B (40-45 phút), 100-25 % B (45-46 phút), 25% B (46-55 phút), tốc độ 1ml/phút. Sắc kí đồ được ghi nhận ở 2 bước sóng (254 và 280nm).

2.2.5 Sắc kí flash

2.2.5.1 Dịch chiết EEP

120,0g bột keo ong được chiết theo qui trình EEP (EtOH 96%, 2 \times 600ml trong 2 giờ). Hiệu suất chiết là 10,8%.

10,0g dịch chiết trước đó được hòa tan trong lượng tối thiểu DCM và acetone, và cô quay cho đến khi thu được bột mịn. Sau đó thêm 15,4g Silic. Sắc kí phân đoạn được thực hiện trên CombiFlash Teledyne ISCO, cột Redisep Silica 120g (CV 225ml), lưu lượng 50ml/phút với hệ thống rửa giải (cyclohexane (A) + AcOEt (B)) như sau: (0-10 phút) 0% B; (10-90 phút) 0-100% B; (90 - 00 phút) 100% B.

Sắc kí đồ được lưu ở bước sóng 254 và 280nm. 220 tuýp đã được thu thập và chia thành 14 phân đoạn (từ A đến P).

2.2.5.2 Phân đoạn G

300mg dịch chiết khô của phân đoạn G được hòa tan trong lượng tối thiểu DCM và acetone, và cô quay cho đến khi thu được bột mịn sau đó thêm 600mg Silic.

Sắc kí phân đoạn được thực hiện trên cùng máy với cột Redisep C18 (6g), tốc độ 10ml/phút với hệ thống rửa giải (H₂O (A) + MeOH (B)) như sau: (0-15 phút) 25% B; (15-25 phút) 30% B; (25-43,5 phút) 45% B; (43,5-44,7 phút) 48,8 % B; (44,7-50,1 phút) 50% B; (50,1- 60 phút) 50% B; (60-62 phút) 100% B; (62-72 phút) 100 % B; (72-74 phút) 50% B; (74-84 phút) 50% B.

Sắc kí đồ được lưu ở 254 và 280nm. 54 tuýp được thu thập.

2.2.6. HPLC-MS

Điều kiện tách giống như HPLC-DAD, sử dụng máy HPLC Waters 2795 Waters 2487 Dual. Phân tích khối lượng được thực hiện với ESI (Electrospray Ionisation) ở dạng âm tính và dương tính, điều kiện : Gaz vector, He; khuếch đại năng lượng của tương tác, 1,3V; khí khô và máy phun sương, N₂, 7l/phút; áp suất khí, 30psi; nhiệt độ sấy, 340°C ; tốc độ, 1,0ml/phút ; tỉ lệ 1:9; phạm vi đo m/z 100-1000.

3 Kết quả và thảo luận

3.1 Chiết xuất

3.1.1 Keo ong thô

Hiệu suất của chiết xuất keo ong châu Âu là khoảng 70%. Các mẫu khác có năng suất EEP từ 23 đến 47%. Đối với chiết xuất liên tiếp, hiệu suất rất khác nhau từ mẫu này sang mẫu khác. Đối với các chiết xuất cyclohexan, hiệu suất nằm trong khoảng từ 8 đến 52%, đối với các chiết xuất DCM, hiệu suất thay đổi từ 1 đến 26%, cuối cùng các chiết xuất MeOH có tỉ lệ 1-6%.

3.1.2 Keo ong thương mại

3.1.2.1 Bột keo ong



Hiệu suất EEP của keo ong thương mại cũng như những sản phẩm chiết xuất liên tiếp ở mức thấp (12% và 3,9-7,8%).

3.1.2.2 Keo ong lỏng

Nồng độ của dịch chiết được tính từ dữ liệu trong Bảng 1.

Bảng 1 Nồng độ tính bằng mg/ml của keo ong COF

Số	V (ml)	M (mg)	C (mg /ml)
1	20	5013,5	250,7
2	20	5027,7	251,3
Trung bình			251,0

3.2 Định lượng Polyphenol toàn phần (PT) bằng phương pháp Folin-Ciocalteu

Kết quả định lượng PT trong Bảng 2.

Bảng 2 Kết quả định lượng PT

Dịch chiết	Lượng PT (mg GAE/g)	Dịch chiết	Lượng PT (mg GAE/g)
COP-EEP	246,3 ± 5,5	COP-MeOH	279,1 ± 4,5
COP-DCM	210,6 ± 8,6	COF	179,4 ± 6,7

Có thể thấy sự khác biệt đáng kể về lượng PT của dịch chiết keo ong thương mại bằng các loại dung môi khác nhau trong bảng kết quả. Theo dự kiến, nồng độ PT cao hơn trong chiết xuất EtOH và MeOH. Các tỉ lệ này tương ứng với các giá trị được tìm thấy trong tài liệu cho loại keo ong "poplar".

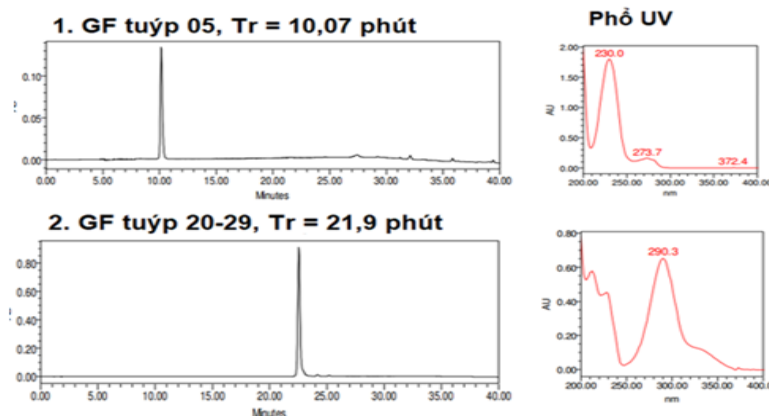
3.3 Định lượng Flavonoid toàn phần (FT) bằng phương pháp tạo phức AlCl₃

Bảng 4 Các hợp chất được xác định trong phân đoạn F

Số	HPLC Tr (phút)	CTCT/ M	Tên hoạt chất	Thông tin khối lượng	λ _{max}
1	10,6	C ₇ H ₆ O ₂ 122	Acide benzoïque	[M+H] ⁺ = 123	230, 273 nm
2	22,5	C ₁₅ H ₁₂ O ₄ 256	Pinocembrine	[M+H] ⁺ = 257 [M+ Na] ⁺ = 269	290, 330 nm
3	29,8	C ₁₆ H ₁₂ O ₄ 268	Tectochrysin	[M-H] ⁻ = 267	268, 312 nm

3.5.2 Fraction G

Phân đoạn G được tinh khiết hóa bằng sắc kí flash và phân tích bằng HPLC-UV và MS (Hình 5).



Hình 5 Sắc kí flash và kết quả phân tích HPLC-UV, MS

Kết quả định lượng FT được thể hiện trong Bảng 3.

Bảng 3 Kết quả định lượng FT

Dịch chiết	Lượng FT (mg CE/g)	Dịch chiết	Lượng FT (mg CE/g)
COP-EEP	582,0 ± 5,4	COP-MeOH	452,0 ± 7,3
COP-DCM	518,3 ± 3,1	COF	457,0 ± 5,6

Từ những kết quả này, với 450 đến 580mg CE/g dịch chiết, không thể so sánh trực tiếp với các giá trị của tài liệu, bởi vì những kết quả này hiếm khi được biểu thị bằng tương đương chrysin, nên sẽ được thảo luận trong phần kết luận dựa trên các giá trị của keo ong Cooper (ở phần cuối báo cáo này).

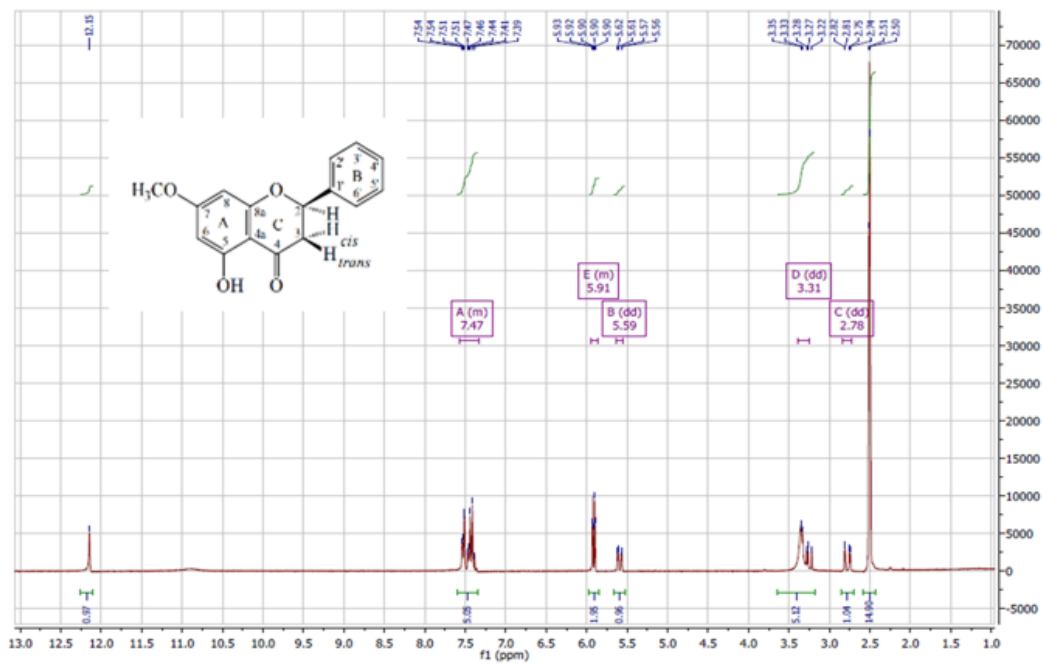
3.4 Sắc kí lỏng hiệu năng cao

Sắc kí đồ của mẫu EEP keo ong châu Âu và dịch chiết của keo ong thương mại là tương tự nhau. Các peak đa số quan sát được trong khoảng từ 5 đến 30 phút. Với mẫu EEP 1, các đỉnh đa số được quan sát trong khoảng từ 25 đến 30 phút (các hợp chất hầu như không phân cực). Ngược lại, EEP 2 chứa các đỉnh trong khoảng từ 2 đến 10 phút (các hợp chất khá phân cực). Sắc kí đồ của mẫu EEP 3, EEP 4 và EEP 5 là tương tự nhau, các đỉnh chính được quan sát trong khoảng từ 1 đến 7 phút (các hợp chất rất phân cực) và từ 35 đến 45 phút (các hợp chất không phân cực).

3.5 Nhận diện cấu trúc và các hợp chất chủ yếu trong mẫu

3.5.1. Phân đoạn F

Dữ liệu ESI-MS và λ_{max} cho mỗi hợp chất đã xác định được báo cáo trong Bảng 4.



Hình 6 Phổ NMR proton của GF 20-29. Theo phân tích HPLC-UV, HPLC-MS, hợp chất số 2 là acid benzoic đã được xác định trong phần trước. Với phổ ^1H NMR, nhóm methoxy được nhận diện ở δ 3,31. Một proton ở δ 12,15, hydroxyl tự do ở vị trí 5 với cầu nối H-O tại carbonyl ở vị trí 4. Hai mũi đôi ở δ 5,59 ($J = 1\text{Hz}$) đến meta H-6 và H-8. Một bộ số năm proton ở δ 7,39-7,54 đã xác nhận sự không thay thế của vòng B. Đặc điểm của NMR ^1H là sự vắng mặt của proton flavanone H-3 điển hình và sự hiện diện của hệ thống ABX. Phần X xuất hiện dưới dạng cặp song song do H-2 và phần AB, là hai cặp song song của một proton với nhau ở δ 2,75 và 2,82 tương ứng với H-3 (cis) và H-3 (trans). Từ dữ liệu kết hợp với tài liệu tham khảo, có thể dự đoán cấu trúc này là của (S) -5-hydroxy-7-methoxyflavanone hay pinostrobin.

4 Kết luận và kiến nghị

4.1 Kết luận

- Đối với keo ong thô

Các kết quả liên quan đến năng suất chiết xuất keo ong châu Âu (EEP khoảng 70%), các phân tích SKLM và HPLC dẫn đến giả thuyết rằng keo ong này thuộc loại "poplar"[12]. Các mẫu khác có hiệu suất chiết EEP từ 23 đến 47% với các hợp chất đa số không phân cực, còn các polyphenol chiếm thiểu số (nghiên cứu hiện đang được tiến hành). Liên quan đến việc chiết xuất liên tiếp, không thể phân tích được do tổn thất đáng kể trong quá trình lọc (lên tới 85% cho keo ong số 1). Do số lượng nhỏ vật liệu được cung cấp, thí nghiệm này không thể lặp lại. Sắc kí đồ của EEP châu Âu và hai keo ong thương mại là tương tự nhau. Các đỉnh đa số được quan sát trong khoảng từ 5 đến 30 phút. Đối với EEP số 1, các peak đa số được quan sát trong khoảng từ 25 đến 30 phút (hợp chất đa số không phân cực). Ngược lại, EEP số 2 chứa các peak chính trong khoảng từ 2 đến 10 phút (các hợp chất phân cực). Sắc kí đồ của mẫu số 3 và 4 (trên cây ca cao và cà phê) và mẫu số 5 là tương tự nhau. Các đỉnh đa số được quan sát trong khoảng từ 1 đến 7 phút (các hợp chất rất phân cực) trong khoảng từ 35 đến 45 phút (các hợp chất không phân cực).

- Đối với keo ong thương mại

Phân tích HPLC của keo ong thương mại gần giống với keo ong Pháp. Tuy nhiên, hiệu suất chiết xuất của bột keo ong rất thấp so với keo ong Pháp đã nghiên cứu trước đây (11,8% so với 68,4%)[12]. Kết quả của các thử nghiệm flavonoid toàn phần cho bột và dịch chiết tương ứng là $582 \pm 5,4\text{mgCE/g}$ và $457 \pm 5,6\text{mgCE/g}$ dịch chiết khô. Phân tích sắc kí flash của chiết xuất ethanol của keo ong thương mại ở dạng bột thu được 14 phân đoạn, phân tích HPLC/MS và NMR của 2 trong số đó giúp xác định một số hợp chất của keo ong này: acid benzoic, và flavonoid (pinostrobin, pinocembrin, tectochrysin).

4.2 Kiến nghị

Nghiên cứu về keo ong Eawy hiện đang được tiếp tục với mục đích xác định thành phần các hợp chất (đa phần không phân cực và một số polyphenol); mặt khác là để tìm kiếm nguồn gốc thực vật của các mẫu này và để đánh giá các hoạt tính sinh học, đặc biệt là hoạt tính chống ung thư. Ngoài ra, với ý tưởng từ sản phẩm keo ong xanh của Brazil, nhóm nghiên cứu sẽ tiếp tục đề tài với mong muốn tạo ra sản phẩm keo ong nhiệt đới cho tác dụng phòng chống ung thư.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển Khoa học và Công nghệ Trường Đại học Nguyễn Tất Thành, mã số đề tài 2018.01.32.

Tài liệu tham khảo

1. Elnakady, Yasser A., et al. "Characteristics, chemical compositions and biological activities of propolis from Al-Bahah, Saudi Arabia." *Scientific reports* 7 (2017): 41453.
2. El Hady, Faten K. Abd, and Ahmed G. Hegazi. "Egyptian propolis: 2. Chemical composition, antiviral and antimicrobial activities of East Nile Delta propolis." *Zeitschrift für Naturforschung C57.3-4* (2002): 386-394.
3. Acikelli, Ali Haydar, et al. "Flavonoids isolated from Caribbean propolis show cytotoxic activity in human cancer cell lines." *International journal of clinical pharmacology and therapeutics* 51.1 (2013): 51-53.
4. Aghel, Sara, et al. "Effect of Iranian propolis on salivary total antioxidant capacity in gamma-irradiated rats." *Journal of dental research, dental clinics, dental prospects* 8.4 (2014): 235.
5. Ali, Fatma H., Gehan M. Kassem, and Osama A. Atta-Alla. "Propolis as a natural decontaminant and antioxidant in fresh oriental sausage." *Veterinaria italiana* 46.2 (2010): 167-172.
6. Alvareda, Elena, et al. "196 Antiinflammatory activity of phenolic compounds extracted from Uruguayan propolis and grape." *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* 33.sup1 (2015): 129-129.
7. Noori, A. L., et al. "Synergistic effects of honey and propolis toward drug multi-resistant *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans* isolates in single and polymicrobial cultures." *International journal of medical sciences* 9.9 (2012): 793.
8. Amoros, M., et al. "Comparison of the anti-herpes simplex virus activities of propolis and 3-methyl-but-2-enyl caffeate." *Journal of natural products* 57.5 (1994): 644-647.
9. Aso, Keiko, et al. "Inhibitory effect of propolis on the growth of human leukemia U937." *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 27.5 (2004): 727-730.
10. Bankova, V., et al. "Antibacterial diterpenic acids from Brazilian propolis." *Zeitschrift für Naturforschung C* 51.5-6 (1996): 277-280.
11. Barud, Hernane da Silva, et al. "Antimicrobial Brazilian propolis (EPP-AF) containing biocellulose membranes as promising biomaterial for skin wound healing." *Evidence-based complementary and alternative medicine* 2013 (2013).
12. Bazvand, Leila, et al. "Antibacterial effect of triantibiotic mixture, chlorhexidine gel, and two natural materials Propolis and Aloe vera against *Enterococcus faecalis*: An ex vivo study." *Dental research journal* 11.4 (2014): 469.
13. Brumfitt, W., J. M. Hamilton-Miller, and I. Franklin. "Antibiotic activity of natural products: 1. Propolis." *Microbios* 62.250 (1990): 19-22.
14. Nguyen, Hai Xuan, et al. "A New Alkenylphenol from the Propolis of Stingless Bee *Trigona minor*." *Natural Product Communications* 13.1 (2018): 1934578X1801300121.

Isolation, quantification of the active pharmaceutical compounds in propolis in Vietnam's rainforests

Tran Thi My Kieu*, Hoang Thi Thoa, Do Thi Bich Ngoc

Nguyen Tat Thanh University

*ttmkieu@ntt.edu.vn

Abstract Introduction: Propolis is a natural resin, collected by honeybees (*Apis mellifera*) from buds of different plants, added with beeswax and salivary secretions, in order to repair and disinfect the beehive. Firstly, the diversity of propolis in tropical areas led us to explore the chemical compositions of Vietnam propolis, especially five samples from Eawy. The one from Europe had an unusual chemical composition (flavonoids, phenolic acids and esters) associated with a "polar" type propolis. The five other propolis extracts showed the presence of major apolar compounds and different minor polyphenols. **Materials and methods:** A fractionation by Flash chromatography of the ethanolic extract of Eawy propolis resulted in 14 fractions, 3 of which were analysed by dereplication (HPLC/UV and HPLC/MS). **Results:** One of the major compounds of this kind of propolis was purified and analysed by proton NMR. It is a flavanone namely pinocebrine.

Keywords Eawy propolis, chemical compositions, flash chromatography, HPLC-MS