

Tác dụng chống oxy hóa, kháng khuẩn và kháng nấm của các hợp chất phân lập được từ lá cây Đinh lăng răng *Polyscias guilfoylei* cv. *quinquefolia*

Lê Hương Giang^{1,2}, Đinh Thị Vân¹, Trần Thị Lương Linh¹, Trần Thị Thùy Chi¹, Nguyễn Thị Lệ¹, Nguyễn Văn Thắng³, Nguyễn Mạnh Tuyên^{1,*}

¹Bộ môn Dược học cổ truyền, Trường Đại học Dược Hà Nội

²College of Pharmacy, Taipei Medical University, Taipei 11031, Taiwan

³Trường Đại học Tân Trào

*Tác giả liên hệ: tuyenm@hup.edu.vn

(Ngày gửi đăng: 15/9/2022 – Ngày duyệt đăng: 25/10/2022)

SUMMARY

Antibacterial and antifungal bioactivity screening leads to the isolation of two oleanane triterpenoids and a flavonoid from the n-butanol and ethyl acetate fractions of the leaf extract of Polyscias guilfoylei. Their structures were determined as 3-O-β-D-glucopyranosyl-(1→3)-β-D-glucuronopyranosyl oleanolic acid (1), quercetin-3,7-O-α-L-dirhamnopyranosid (2), and 3-O-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-β-D-glucuronopyranosyl oleanolic acid (3). Compound 1 and 2 are reported for the first time from this plant. The n-butanol fraction and compound 2 showed moderate antioxidant effect in DPPH radical scavenging activity, with IC₅₀ values were 373.92 and 46.15 μg/ml, respectively. 3-O-β-D-glucopyranosyl-(1→3)-β-D-glucuronopyranosyl oleanolic acid (1) presented moderately antibacterial activities against Saccharomyces cerevisiae with MIC of 12.5 μg/ml and Candida albicans with MIC of 50 μg/ml.

Từ khóa: chống oxy hoá, kháng khuẩn, kháng nấm, *Polyscias guilfoylei*.

Đặt vấn đề

Chi Đinh lăng (*Polyscias*) là chi lớn thứ hai trong họ Nhân sâm (Araliaceae) với 159 loài. Chi Đinh lăng được trồng ở rất nhiều nơi trên thế giới, trong đó có 10 loài được tìm thấy ở Việt Nam. Theo tri thức dân gian, cây Đinh lăng răng được sử dụng như một vị thuốc có tác dụng tăng lực, tăng sức bền, giảm mệt mỏi, giải độc, bổ huyết, tiêu sưng viêm... Tuy nhiên, hiện nay có rất ít các nghiên cứu về thành phần hóa học và tác dụng dược lý của loài cây này. Nhận thấy loài Đinh lăng răng (*Polyscias guilfoylei*) có rất nhiều tiềm năng trong lĩnh vực phân lập các hợp chất tinh khiết mới và trong nghiên cứu đánh giá hoạt tính chống oxy hóa, hoạt tính kháng vi sinh vật và kháng nấm, cũng như để nâng cao công dụng và giá trị ứng dụng trong thực tiễn của cây Đinh lăng răng, nhóm nghiên cứu đã tiến hành đánh giá cao chiết phân đoạn và các hợp chất tinh khiết đối với tác dụng chống oxy hóa dựa vào khả năng bắt gốc tự do DPPH và tác dụng kháng nấm *Saccharomyces cerevisiae* và *Candida albicans*.

Phương pháp nghiên cứu

Nguyên liệu nghiên cứu: Lá cây Đinh lăng răng *P. guilfoylei* (4,1 kg) được thu hái tại huyện Tiền Hải, tỉnh Thái Bình, Việt Nam (toạ độ GPS: 20°23'36.9"N 106°34'01.8"E)

vào tháng 8 năm 2020. Mẫu thực vật được giám định bởi ThS. Nghiêm Đức Trọng và lưu mã số tiêu bản (HNIP/18547/19) phòng Tiêu bản, Trường Đại học Dược Hà Nội.

Phương pháp nghiên cứu: Phổ cộng hưởng từ hạt nhân NMR [^1H (500 MHz), ^{13}C (125 MHz) được thực hiện bằng máy BRUKER AVANCE 500 MHz (Bruker, Billerica, MA USA). Phổ khối ion hóa tia điện (ESI-MS) được đo bằng máy Varian Agilent 1100 LC-MSD (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA). Sắc ký lớp mỏng sử dụng bản mỏng silica gel 60 F254 Merck (Darmstadt, Germany). Sắc ký cột (CC) pha thường (63–200 and 40–63 mesh, Merck) và pha đảo (RP-C₁₈) các kích thước. Sắc ký đồ được quan sát dưới đèn tử ngoại ở bước sóng 254 nm và 366 nm hoặc dùng thuốc thử là dung dịch H₂SO₄ 10 % trong ethanol.

Chiết xuất và phân lập: Lá cây Đinh lăng răng (4,1 Kg) được cắt nhỏ, ngâm chiết với ethanol 96 % ở nhiệt độ 65 °C (8 lít x 3 lần). Lọc, gộp dịch lọc, và loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm thu được cao chiết còn (1128,54 g). Cao chiết còn được chiết lần lượt với dung môi *n*-hexan (1 lít x 3 lần), EtOAc (1 lít x 3 lần), và *n*-butanol (1 lít x 3 lần). Tiến hành thu hồi dung môi theo từng phân đoạn. Các phân đoạn thu được lần lượt là *n*-hexan (282,66 g), EtOAc (126,07 g) và *n*-butanol (150,54 g).

Phân đoạn *n*-butanol (140,65 g) được chạy qua cột sắc ký (11 x 64 cm) pha tĩnh là silica gel, rửa giải bằng hệ dung môi Dichlormethan : methanol (50:1, 20:1, 10:1, 5:1, 1:1 v/v), thu được 6 phân đoạn (LB1 – LB6). Phân đoạn LB3 (5,60 g) cho qua cột pha đảo RP-18 (2 x 45 cm), pha động là methanol-nước (1:3, 1:2, 1:1,5, 1:1, 2:1, 3:1, 3,5:1) cho hợp chất **1** (79,5 mg) và 10 phân đoạn (LB3.1 – LB3.10). Phân đoạn LB3.6 (0,8 g) được tiếp tục cho qua cột pha đảo RP-18 (2 x 45 cm), rửa giải với hệ Methanol : nước = 1:2 (v/v) thu được 8 phân đoạn (LB3.6.1 – LB3.6.8). Phân đoạn LB3.6.2 (39,2 mg) cho qua cột pha đảo RP-18 (1 x 45 cm), rửa giải với hệ Methanol : nước (1:3, 1:2,5, 1:2, 1:1) thu được hợp chất **2** (26,9 mg).

Phân đoạn ethyl acetat (120,30 g) được chạy qua cột sắc ký (7 x 60 cm) pha tĩnh là silica gel (7 x 60 cm), rửa giải bằng hệ dung môi Dichlormethan : methanol (7:1, 6:1, 5:1, 2:1, 1:1 v/v), sau đó chuyển sang hệ diclormethan : methanol : nước (1:1:0.1 → 1:1:0.2), thu được 10 phân đoạn (E1 – E10). Phân đoạn E9 (5,6 g) được chạy sắc ký pha đảo RP-C₁₈ (2 x 65 cm) với hệ dung môi acetone : nước (1:1 v/v) thu được hợp chất **3** (21,7 mg).

Đánh giá tác dụng chống oxy hóa in vitro: Hoạt tính chống oxy hóa được đánh giá dựa trên khả năng bắt gốc tự do DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) được mô tả bởi W. Brand-Williams et al. [3]. Trên mỗi giếng thử của đĩa 96 giếng, trộn 10 μL dung dịch mẫu thử trong DMSO 100 % với 190 μL dung dịch DPPH/EtOH. Dải nồng độ mẫu trong mỗi giếng thử phụ thuộc vào loại mẫu: 25-50-100-200-400 $\mu\text{g/mL}$ đối với các mẫu dịch chiết thô (cao toàn phần, cao chiết các phân đoạn); 12,5-25-50-100 $\mu\text{g/mL}$ đối với các mẫu chất tinh sạch (các chất tinh khiết phân lập được). Đĩa thí nghiệm được bọc kín

tránh ánh sáng, ủ ở nhiệt độ 37 °C trong 30 phút để phản ứng oxy hóa diễn ra hoàn toàn, sau đó tiến hành đo mật độ quang ở bước sóng 515 nm với máy đọc đĩa Tecan (Tecan F150, Austria). Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Acid ascorbic (Sigma-Aldrich, USA) được sử dụng làm chứng dương.

Giá trị trung bình của SC (%) ở các nồng độ mẫu được đưa vào chương trình xử lý số liệu Excel theo công thức:

$$SC\% = \left[100 - \frac{OD(\text{mẫu thử}) - OD(\text{mẫu trắng})}{OD(\text{chứng âm tính})} \times 100 \right] \pm \sigma$$

Độ lệch tiêu chuẩn được tính theo công thức:

$$\sigma = \sqrt{\frac{(\sum x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Các phép thống kê sử dụng phương pháp phân tích phương sai ANOVA (Excel, Microsoft Office). Hiệu quả bắt gốc tự do tạo bởi DPPH của mỗi mẫu được tính dựa trên % trung hòa gốc tự do so với mẫu trắng và chứng âm tính. Mẫu có biểu hiện hoạt tính chống oxy hóa trên hệ DPPH được thực hiện các bước tiếp theo để tìm giá trị SC50 (µg/ml). Giá trị SC50 là nồng độ của chất thử mà tại đó trung hòa được 50 % các gốc tự do, được xác định bằng phần mềm TableCurve AISN Software (Jandel Scientific) qua giá trị SC% và dãy các nồng độ chất thử tương ứng.

Đánh giá tác dụng kháng vi sinh vật in vitro: Hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định được tiến hành để đánh giá hoạt tính kháng sinh của các mẫu chiết được thực hiện trên đĩa 96 giếng (96-well microtiter plate) theo phương pháp của Vander Bergher & Vlietlinck [1] [10] trên 3 dòng vi khuẩn [*Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* (ATCC 6633); *Candida albicans* (ATCC 10231); *Saccharomyces cerevisiae* (VTCC-Y-62)]. Streptomycin và Nystatin được sử dụng làm chứng dương.

Các chủng vi sinh vật được hoạt hóa trước khi tiến hành thử nghiệm trong môi trường dinh dưỡng dịch thể đặc biệt (24 giờ đối với vi khuẩn, 48 giờ đối với nấm). Sau đó được pha loãng tới nồng độ 0,5 đơn vị McLand (khoảng 108 vi sinh vật/ml) rồi tiến hành thí nghiệm. Các mẫu thử pha trong DMSO để được các dung dịch gốc có nồng độ 8 g/ml với các mẫu dịch chiết thô; 2 g/ml với các mẫu chất tinh sạch. Trên mỗi giếng thử của phiên 96 giếng, trộn 10 µL dung dịch mẫu thử trong DMSO 100 % với 190 µL dung dịch vi sinh vật đã hoạt hóa. Sau đó, tiếp tục pha loãng 3 lần, dải nồng độ mẫu trong mỗi giếng thử phụ thuộc vào loại mẫu: 400; 200; 100; 50 µg/ml đối với các mẫu dịch chiết thô, 100; 50; 12,5; 6,25 µg/mL đối với các mẫu chất tinh sạch. Đối chứng dương là kháng sinh pha trong DMSO 100 % với nồng độ thích hợp: Streptomycin 0,1 mM, Tetracylin: 0,1 mM, Nystatin: 0,1 mM. Đối chứng âm chỉ có vi sinh vật thử nghiệm, sau đó để trong tủ ấm 37 °C/24 giờ cho vi khuẩn và 30 °C đối với nấm.

Kết quả được xác định dựa trên sự hình thành sinh khối của VSV trong mỗi giếng thử, được xác định sau khi đo mật độ quang (sử dụng máy Tecan F150, Austria) cho các vi khuẩn và nấm men, hoặc được quan sát bằng mắt thường đối với nấm sợi, mẫu dương tính khi nhìn bằng mắt thường thấy trong suốt, không có vi sinh vật phát triển. Nồng độ ức chế tối thiểu MIC ($\mu\text{g/mL}$) là nồng độ thử nghiệm thấp nhất mà VSV bị ức chế.

Kết quả và bàn luận

Sàng lọc hoạt tính: Các cao chiết phân đoạn được tiến hành sàng lọc hoạt tính để lựa chọn phân đoạn tiềm năng có tác dụng sinh học, làm định hướng phân lập các hợp chất tinh khiết từ phân đoạn đó.

Đối với hoạt tính chống oxy hóa *in vitro*, phân đoạn *n*-butanol cho khả năng trung hòa gốc tự do SC% là 52,61 % (giá trị trung hòa gốc tự do lớn hơn 50 % được coi là tiềm năng, được tiếp tục tìm giá trị SC₅₀ - nồng độ của chất thử mà tại đó trung hòa được 50 % các gốc tự do), trong khi giá trị SC% của phân đoạn *n*-hexan và ethyl acetat lần lượt là 13,52 % và 18,86 % (Bảng 1.). Do đó, nhóm nghiên cứu lựa chọn phân đoạn *n*-butanol để phân lập các hợp chất tiềm năng có tác dụng chống oxy hóa.

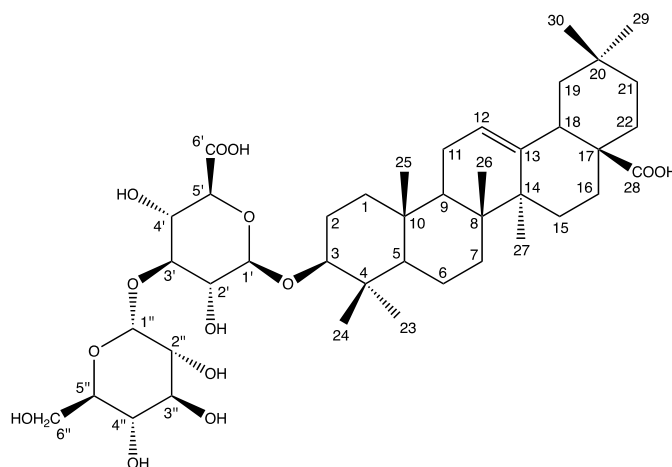
Đối với hoạt tính kháng vi sinh vật *in vitro*, phân đoạn *n*-hexan biểu hiện hoạt tính kháng chủng *Bacillus subtilis* với giá trị MIC là 400 $\mu\text{g/ml}$, tuy nhiên giá trị MIC này ở mức yếu, được đánh giá là chưa đủ tiềm năng để tiến hành phân lập các hoạt chất có tác dụng kháng vi sinh vật. Ở chủng *Saccharomyces cerevisiae*, phân đoạn *n*-butanol và ethyl acetat có giá trị MIC đều là 200 $\mu\text{g/ml}$. Phân đoạn *n*-butanol cũng thể hiện hoạt tính kháng nấm *Candida albicans* khá tốt với giá trị MIC là 200 $\mu\text{g/ml}$ (Bảng 2). Dựa vào các kết quả thu được, lựa chọn phân đoạn *n*-butanol và ethyl acetat để phân lập các hợp chất tiềm năng có tác dụng kháng vi sinh vật.

Phân lập: Hợp chất 1-3 được xác định cấu trúc bởi dữ liệu phổ ¹H, ¹³C NMR và phổ khối MS, được xác định là 3-O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucuronopyranosyl oleanolic acid (1), and quercetin-3,7-O- α -L-dirhamnopyranoside (2), acid 3-O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucuronopyranosyl oleanolic (3). Hợp chất 1 và 2 lần đầu tiên được phân lập từ cây Đinh lăng rừng.

3-O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucuronopyranosyl oleanolic acid (1) – Bột vô định hình màu trắng. ESI-MS $m/z = 793.60$ [M-H]⁻. ¹H NMR (Pyridine-d₅, 500 MHz) δ H: 3,31 (1H, dd, $J = 16,0/7,0$ Hz, H-3); 5,41 (1H, br s, H-12); 3,21 (1H, dd, $J = 17,5/10,0$ Hz, H-18); 1,22 (3H, s, H-23); 0,90 (3H, s, H-24); 0,74 (3H, s, H-25); 0,92 (3H, s, H-26); 1,25 (3H, s, H-27); 0,91 (3H, s, H-29); 0,95 (3H, s, H-30); 4,94 (1H, d, $J = 8,0$ Hz, H-1'); 4,08 (1H, d, $J = 9,5$ Hz, H-2'); 4,33 (1H, d, $J = 18,0$ Hz, H-4'); 4,46 (1H, d, $J = 6,0$ Hz, H-5'); 5,32 (1H, d, $J = 7,5$ Hz, H-1''); 4,05 (1H, t, $J = 9,0$ Hz, H-2''); 4,21 (1H, t, $J = 9,0$ Hz, H-3''); 4,18 (1H, t, $J = 15,5$ Hz, H-4''); 3,97 (1H, dd, $J = 12,5/3,5$ Hz, H-5''); 4,51 (1H, dd, $J = 8,0/5,5$ Hz, H-6''); ¹³C NMR (Pyridine-d₅, 125 MHz) δ C: 38,4 (C-1), 26,3 (C-2); 89,1 (C-3); 39,3 (C-4); 55,6 (C-5); 18,3 (C-6); 33,1 (C-7); 39,5

(C-8); 47,8 (C-9); 36,8 (C-10); 23,5 (C-11); 122,4 (C-12); 144,6 (C-13); 42,0 (C-14); 28,1 (C-15); 23,5 (C-16); 46,5 (C-17); 41,8 (C-18); 46,3 (C-19); 30,8 (C-20); 34,0 (C-21); 33,0 (C-22); 28,0 (C-23); 16,8 (C-24); 15,2 (C-25); 17,2 (C-26); 26,0 (C-27); 180,1 (C-28); 23,6 (C-30); 106,4 (C-1'); 74,2 (C-2'); 71,4 (C-3'); 77,0 (C-4'); 87,1 (C-5'); 172,0 (C-6'); 105,4 (C-1''); 75,3 (C-2''); 78,4 (C-3''); 71,3 (C-4''); 77,9 (C-5''); 62,2 (C-6'').

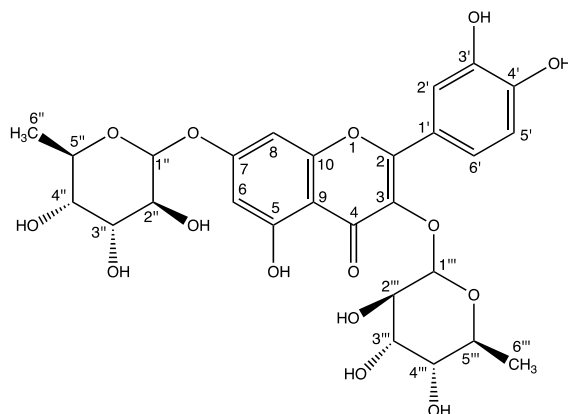
Hợp chất 1 thu được dưới dạng bột vô định hình, màu trắng. Dựa trên tín hiệu mảnh ion $m/z = 793,60$ $[M-H]^-$ thu được trong phổ khối ESI-MS và kết hợp với phổ ^{13}C NMR, công thức phân tử của hợp chất **1** được xác định là $C_{42}H_{66}O_{14}$ ($M = 794$). Trên phổ 1H NMR cho thấy những tín hiệu singlet đặc trưng của nhóm methyl (CH_3) tại δ_H 0,74 (3H, s, H-25); 0,90 (3H, s, H-24); 0,91 (3H, s, H-29); 0,92 (3H, s, H-26); 0,95 (3H, s, H-30); 1,22 (3H, s, H-23); và 1,25 (3H, s, H-27), gợi ý đây là những tín hiệu đặc trưng của nhóm methyl thuộc khung triterpen. Kết hợp với phổ ^{13}C NMR, thu được 42 tín hiệu với 2 tín hiệu carbon tại δ_C 122,4 (C-12); 144,6 (C-13) đặc trưng cho nối đôi ở vị trí C12-C13 của khung olean và tín hiệu cộng hưởng tại δ_C 180,1 (C-28) gợi ý là tín hiệu đặc trưng của nhóm -COOH tại vị trí C-28. Từ dữ liệu phổ thu được dẫn đến kết luận rằng hợp chất là một triterpen thuộc khung oleanan. Sự hiện diện của hai carbon anomer qua hai mũi cộng hưởng ở $\delta_C = 106,4$ (C-1') và 105,4 (C-1'') cùng với 8 carbon loại -CH của phân tử đường cộng hưởng trong vùng 87,1 - 71,3 ppm, cho phép dự đoán **1** là một saponin có gắn hai phân tử đường. Như vậy, hợp chất **1** có phần aglycon là acid oleanolic và phần đường gồm có hai phân tử đường ($\delta_C = 106,4$ và 105,4), đó là đường glucose ($\delta_C = 62,2$; C-6'') và đường glucuronat ($\delta_C = 172,0$, C-6' (-COOH)). Sự có mặt của 2 phân tử đường còn được xác định qua sự hiện diện của hai proton ở $\delta_H = 5,32$ (1H, d, $J = 7,5$ Hz, H-1''), 4,94 (1H, d, $J = 8,0$ Hz, H-1'). Hai phân tử đường đều có cấu hình β do hằng số ghép của hai proton anomer này là $J = 7,5$ và 8,0 Hz. Phân tử đường thứ nhất gắn vào aglycon tại C-3 ($\delta_C = 89,1$), phân tử đường thứ hai gắn vào phân tử đường thứ nhất tại C-3' ($\delta_C = 71,4$). Phổ ESI-MS cũng giúp xác định **1** là một saponin với phần aglycon là acid oleanolic, phần đường gồm có một phân tử glucuronat và một phân tử glucose. So sánh dữ liệu phổ NMR của hợp chất **1** với những giá trị đã công bố trong tài liệu tham khảo [7], dẫn đến kết luận hợp chất **1** được xác định là **acid 3-O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucuronopyranosyl oleanolic** (Hình 1).



Hình 1. Cấu trúc hóa học của hợp chất 1

Quercetin-3,7-O- α -L-dirhamnopyranoside (2) – Bột vô định hình màu vàng. ESI-MS $m/z = 593.30$ $[M-H]^-$. 1H NMR (CD_3OD , 500 MHz) δ_H : 6,49 (1H, s, H-6); 6,74 (1H, s, H-8); 7,36 (1H, d, $J = 8,4$ Hz, H-2'); 6,94 (1H, $J = 7,2$ Hz, H-5'); 5,58 (1H, br s, H-1''); 3,33 – 3,52 (4H, m, H-2'', H-4''), 4,25 (1H, br s, H-5''); 1,29 (3H, d, $J = 6,0$ Hz, H-6''); 5,39 (1H, br s, H-1'''); 3,33 – 3,52 (4H, m, H-2''', H-4'''); 3,82 (1H, dd, $J = 9,0/4,0$ Hz, H-3'''); 4,05 (1H, br s, H-5'''); 0,97 (3H, d, $J = 6,0$ Hz, H-6'''); ^{13}C NMR (CD_3OD , 125 MHz) δ_C : 158,1 (C-2); 136,5 (C-3); 179,8 (C-4); 163,5 (C-5); 99,9 (C-6); 163,0 (C-7); 95,6 (C-8); 160,0 (C-9); 107,5 (C-10); 123,0 (C-1'); 116,5 (C-2'); 146,4 (C-3'); 150,0 (C-4'); 117,0 (C-5'); 122,7 (C-6'); 100,6 (C-1''); 72,1 (C-2''); 73,2 (C-4''); 71,7 (C-5''); 17,6 (C-6''); 103,5 (C-1'''); 71,9 (C-3'''); 73,6 (C-4'''); 71,3 (C-5'''); 18,1 (C-6''').

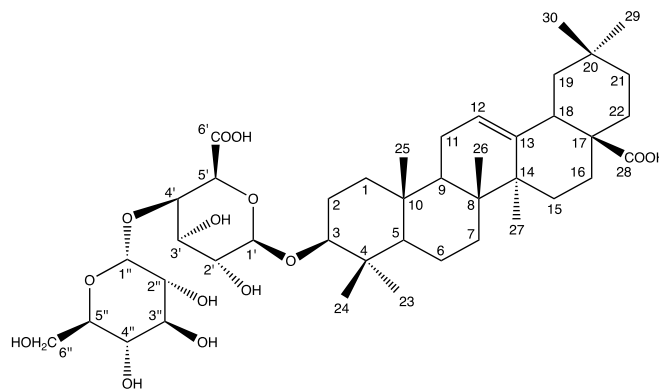
Hợp chất 2 thu được dưới dạng bột vô định hình, màu vàng. Từ dữ liệu phổ ESI-MS thu được mảnh ion $m/z = 593,30$ $[M-H]^-$ và kết hợp những tín hiệu cacbon thu được trong phổ ^{13}C NMR gợi ý công thức phân tử của hợp chất 2 được xác định là $C_{27}H_{30}O_{15}$ ($M = 594$). Phổ UV cho hai giá trị hấp thụ cực đại ở 256 và 351 nm nên 2 có thể là một flavonoid. Dữ liệu phổ 1H NMR hiển thị những tín hiệu proton của vòng benzen tại δ_H 7,36 (1H, d, $J = 8,4$ Hz, H-2'); 6,94 (1H, d, $J = 7,2$ Hz, H-5'); Từ hằng số tương tác (J) cho thấy các proton nằm ở các vị trí *ortho* và *meta* với nhau. Việc không ghi nhận các tín hiệu của proton tại vị trí H-3' và H-4' cho phép dự đoán hai vị trí này đều có nhóm thế, dẫn đến kết luận 2 có khung quercetin. Ngoài ra, trên phổ 1H NMR cũng xuất hiện hai tín hiệu δ_H 5,58 (1H, br s, H-1'') và δ_H 5,39 (1H, br s, H-1''') đặc trưng cho 2 proton anomer của 2 phân tử đường. Phổ ^{13}C cho thấy hợp chất có 17 carbon trong vùng $\delta_C = 180,0 - 95,6$, như vậy hợp chất 2 là một flavonoid có gắn 2 phân tử đường. Ở vùng từ trường cao có hai mũi đôi với δ_H 1,29 (3H, d, $J = 6,0$ Hz, H-6'') và δ_H 0,97 (3H, d, $J = 6,0$ Hz, H-6''') ứng với 2 nhóm $-CH_3$ ($\delta_C = 17,6$, C-6'' và $\delta_C = 18,1$, C-6'''), vậy hai phân tử đường này là đường rhamnose. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất 2 so sánh với những giá trị công bố trong tài liệu tham khảo [2], xác định được hợp chất 2 là **quercetin-3,7-O- α -L-dirhamnopyranosid** (Hình 2).



Hình 2. Cấu trúc hóa học của hợp chất 2

3-O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucuronopyranosyl oleanolic acid (3) – Bột vô định hình màu trắng. ESI-MS $m/z = 793.50$ [M-H]⁻. ¹H NMR (Prydine-d₅, 500 MHz) δ H: 1,53 (2H, m, H-1); 1,25 (3H, s, H-23); 0,99 (6H, s, H-24, H-29); 0,82 (3H, s, H-25); 1,00 (3H, s, H-26); 1,31 (3H, s, H-27); 1,36 (3H, s, H-30); 5,20 (1H, d, $J = 8,0$ Hz, H-1'); 4,93 (1H, $J = 7,5$ Hz, H-1''); 3,36 (2H, m, H-2' và H-2''); 4,08 (2H, m, H-3' và H-3''); 4,17 (2H, m, H-4' và H-4''); 4,32 (2H, m, H-5' và H-5''); 4,56 (1H, d, $J = 9,5$ Hz, H-6a'); 4,47 (1H, m, H-6b'); ¹³C NMR (Prydine-d₅, 125 MHz) δ C: 38,3 (C-1); 26,1 (C-2); 89,1 (C-3); 39,5 (C-4); 55,5 (C-5); 18,2 (C-6); 32,9 (C-7); 39,4 (C-8); 47,6 (C-9); 36,6 (C-10); 23,4 (C-11); 122,4 (C-12); 144,5 (C-13); 41,9 (C-14); 28,0 (C-15); 23,5 (C-16); 46,5 (C-17); 41,7 (C-18); 46,2 (C-19), 30,7 (C-20); 33,0 (C-21); 33,9 (C-22); 28,0 (C-23); 16,3 (C-24); 15,1 (C-25); 17,1 (C-26); 26,1 (C-27); 180,2 (C-28); 33,0 (C-29); 23,5 (C-30); 106,1 (C-1'); 74,5 (C-2'); 76,4 (C-3'); 83,5 (C-4'); 76,5 (C-5'); 174,9 (C-6'); 104,5 (C-1''); 74,3 (C-2''); 77,1 (C-3''); 71,0 (C-4''); 77,9 (C-5''); 61,9 (C-6'').

Hợp chất **3** thu được dạng bột vô định hình, màu trắng. Công thức phân tử là C₄₂H₆₆O₁₄ (M = 794) dựa trên cơ sở thu được ion pic $m/z = 793.50$ [M-H]⁻ trong phổ khối ESI-MS và kết hợp với phổ ¹³C NMR. Phân tích phổ ¹H NMR của hợp chất **3** cho thấy, hợp chất **3** là một saponin có cấu trúc tương tự với hợp chất **1**, chỉ có sự khác biệt ở vị trí C-3' và C-4'. Để xác định vị trí của phần acid glucuronic và đường glucose, hợp chất **3** được đo thêm phổ HMBC cho xác định các tương tác như ở hình 3. So sánh dữ liệu phổ NMR của hợp chất **3** với những giá trị đã công bố trong tài liệu tham khảo [9], do đó hợp chất **3** được xác định là acid 3-O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucuronopyranosyl oleanolic (Hình 3). Nghiên cứu trước đây của Nguyễn Thị Ánh Tuyết [9] phân lập được hỗn hợp của **1** và **3**, chính vì vậy, đây là lần đầu tiên hợp chất **1** và **3** được phân lập riêng biệt từ chi *Polyscias* và từ loài Đinh lăng răng *Polyscias guilfoylei* cv. *quinquefolia*.



Hình 3. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC của hợp chất 3

Hoạt tính chống oxy hóa *in vitro*: Hoạt tính chống oxy hóa của các cao phân đoạn và các hoạt chất tinh khiết được đánh giá dựa trên khả năng bắt gốc tự do DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl). Phân đoạn *n*-butanol (nồng độ 400 $\mu\text{g/ml}$) và hợp chất 2 (nồng độ 100 $\mu\text{g/ml}$) biểu hiện hoạt tính chống oxy hóa trên hệ DPPH khá tốt với giá trị SC_{50} lần lượt là 373,92 và 46,15 $\mu\text{g/ml}$ (Bảng 1). Hợp chất 2 là hợp chất thuộc nhóm flavonol với khung quercetin. Cấu trúc này đã được nghiên cứu về khả năng bắt gốc tự do mạnh hơn nhờ có sự hiện diện của nhóm 3-hydroxyl. Hơn nữa, nhóm thế ở vị trí 3' và 4' cũng góp phần làm tăng tác dụng chống oxy hóa [5].

Bảng 1. Khả năng trung hòa gốc tự do ($\text{SC}\%$) và giá trị SC_{50} của các phân đoạn và các hợp chất

	Khả năng trung hòa gốc tự do ($\text{SC}\%$)	SC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
Phân đoạn <i>n</i> -hexane	13.52 ± 0.48	-
Phân đoạn <i>n</i> -butanol extract	52.61 ± 1.06	373.92
Phân đoạn ethyl acetate extract	18.86 ± 0.16	-
Hợp chất 1	1.94 ± 0.53	-
Hợp chất 2	74.01 ± 1.11	46.15
Hợp chất 3	1.86 ± 0.34	-
Chứng dương (DPPH/EtOH + acid ascorbic)	82.23 ± 0.75	13.88

Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

Hoạt tính kháng vi sinh vật *in vitro* – Các cao chiết phân đoạn và các hợp chất được đánh giá hoạt tính kháng vi sinh vật *in vitro* đối với 3 dòng vi khuẩn [*Bacillus subtilis* subsp. *Spizizenii* (ATCC 6633); *Candida albicans* (ATCC 10231); *Saccharomyces cerevisiae* (VTCC–Y–62)]. Kết quả được trình bày ở Bảng 2. Theo bảng phân loại của Tamokou et al.[8], dịch chiết phân đoạn *n*-hexan biểu hiện khả năng ức chế đáng kể với vi khuẩn *B.subtillis*; và dịch chiết phân đoạn *n*-butanol, phân đoạn ethyl acetat biểu hiện khả năng ức chế đáng kể chủng nấm men *S. cerevisiae* và *C. albicans*. Đáng chú ý, hợp chất 1 biểu hiện hoạt tính ức chế 2 chủng VSV thuộc *S. cerevisiae* và *C. albicans* ở mức độ trung bình với nồng độ ức chế tối thiểu MIC lần lượt là 12,5 và 50 $\mu\text{g/ml}$. Nấm men *Saccharomyces cerevisiae* là một mô hình hoàn hảo để xác định và

nghiên cứu các hợp chất kháng nấm nhờ sự bảo tồn chức năng của các gen nấm [4]. Nấm men *S. cerevisiae* là một mô hình tuyệt vời để xác định các sản phẩm tự nhiên có nguồn gốc thực vật với các đặc tính chống tăng sinh. Các hợp chất có các đặc tính kháng loại nấm men này được nhận định là ứng cử viên thích hợp để nghiên cứu thêm về cơ chế kháng nấm, vì chúng có thể có đích tác dụng trên các thành phần của bộ máy điều hòa chu kỳ tế bào, và do đó có thể có các đặc tính chống tăng sinh có giá trị trong điều trị [6]. Các hợp chất như vậy có thể hữu ích trong việc điều trị các bệnh tăng sinh như ung thư hoặc điều trị nhiễm trùng nấm. *Candida* là một loại nấm gây bệnh được biết đến là nguyên nhân gây ra nhiễm nấm cao hàng đầu cho con người trên toàn thế giới. Kết quả MIC 50 µg/ml của hợp chất **1** trên chủng *C. Albicans* cho thấy tiềm năng trong việc tiến hành thêm các nghiên cứu phân tích về cơ chế tác dụng và hoạt tính in vivo của hợp chất này. Điều này rất hứa hẹn vì hoạt tính kháng nấm của hợp chất có nguồn gốc được liệu này có thể cung cấp lựa chọn mới trong điều trị các bệnh nhiễm nấm cơ hội và nhiễm nấm kháng thuốc do *C. Albicans*.

Bảng 2. Giá trị MIC của các cao phân đoạn và các hợp chất

	MIC (µg/ml)		
	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Candida albicans</i>
Phân đoạn <i>n</i> -hexan	400	-	-
Phân đoạn <i>n</i> -butanol	-	200	200
Phân đoạn ethyl acetate	-	200	-
Hợp chất 1	-	12.5	50
Hợp chất 2	-	-	-
Hợp chất 3	-	-	-
Chứng dương			
Streptomycin	7.188		
Nystatin		5.781	11.563

Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

Kết luận

Dựa trên định hướng sàng lọc các phân đoạn có hoạt tính sinh học tiềm năng, nghiên cứu đã phân lập được ba hợp chất từ phân đoạn *n*-butanol và phân đoạn ethyl acetat, bao gồm hai saponin và một flavonoid, có tên là 3-O-β-D-glucopyranosyl-(1→3)-β-D-glucuronopyranosyl oleanolic acid (**1**), quercetin-3,7-O-α-L-dirhamnopyranosid (**2**), and 3-O-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-β-D-glucuronopyranosyl oleanolic acid (**3**). Đây là lần đầu tiên hợp chất **1** và **2** được phân lập từ cây Đinh lăng rừng. Phân đoạn *n*-butanol và hợp chất **quercetin-3-7-O-α-L-dirhamnopyranoside** biểu hiện hoạt tính chống oxy hóa trên hệ DPPH với giá trị IC₅₀ lần lượt là 373,92 và 46,15 µg/ml. Chất tinh khiết **acid 3-O-β-D-glucopyranosyl-(1→3)-β-D-**

glucuronopyranosyl oleanolic biểu hiện hoạt tính ức chế 2 chủng vi sinh vật thuộc *S. cerevisiae* và *C. albicans* với nồng độ ức chế tối thiểu MIC lần lượt là 12,5 và 50 µg/ml.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. A.J. Vlietinck (1998), *Screening methods for detection and evaluation of biological activities of plant preparation*, Kluwer academic publishers, USA, pp. 37-52.
2. Ba Y. Y. Liu Q. Y., Shi R. B., Zhang Lan-zhen (2012), "Studies on flavonoids from *Euonymus alatus*", *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 43, pp. 242-246.
3. Brand-Williams W. Cuvelier M. E., Berset C. (1995), "Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity", *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), pp. 25-30.
4. Gassner Nadine C. Tamble, Craig M. Bock, Jonathan E. Cotton, Naomi White, Kimberly N. Tenney, Karen St Onge, Robert P. Proctor, Michael J. Giaever, Guri Nislow, Corey Davis, Ronald W. Crews, Phillip Holman, Theodore R. Lokey, R. Scott (2007), "Accelerating the discovery of biologically active small molecules using a high-throughput yeast halo assay", *Journal of natural products*, 70(3), pp. 383-390.
5. Matsuda Hisashi Morikawa Toshio, Ando Shin, Toguchida Iwao, Yoshikawa Masayuki (2003), "Structural Requirements of Flavonoids for Nitric Oxide Production Inhibitory Activity and Mechanism of Action", *Bioorganic & medicinal chemistry*, 11, pp. 1995-2000.
6. Qaddouri Bouchra Guaadaoui, Abdelkarim Bellirou, Ahmed Hamal, Abdellah Melhaoui, Ahmed Brown, Grant W. Bellaoui, Mohammed (2011), "The Budding Yeast "*Saccharomyces cerevisiae*" as a Drug Discovery Tool to Identify Plant-Derived Natural Products with Anti-Proliferative Properties", *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*, 2011, pp. 954140-954140.
7. Shao Chun-Jie Kasai Ryoji, Xu Jing-Da, Tanaka Osamu (1989), "Saponins from Roots of *Kalopanax septemlobus* (THUNB.) KOIDZ., Ciquiu : Structures of *Kalopanax*-saponins C, D, E and F", *CHEMICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN*, 37(2), pp. 311-314.
8. Tamokou J. D. D. Mbaven, A. T., Kuete V. (2017), "Chapter 8 - Antimicrobial Activities of African Medicinal Spices and Vegetables", *Medicinal Spices and Vegetables from Africa*, Kuete Victor, Academic Press, pp. 207-237.
9. Tuyet Nguyen Thi Anh (2009), Chemical compositions of some medicinal plants from the genus *Polyscias* in the *Araliaceae* family, University of Science - VNUHCM.
10. Vanden Bergher D.A., Vlietinck (1991), *Screening methods for Antibacterial and Ativiral Agent from Higher Plants*, Academic Press, pp. 100-125.