

BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



NGUYỄN THỊ NGỌC MAI

**NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN HOÁ HỌC VÀ HOẠT TÍNH ỨC
CHẾ ENZYME α - GLUCOSIDASE CỦA LOÀI SÀM TÁM SÓNG
(*MEMECYLON OCTOCOSTATUM* MERR. & CHUN)**

LUẬN VĂN THẠC SĨ KHOA HỌC VẬT CHẤT

Ngành: Hoá hữu cơ

Mã số: 8440114

HÀ NỘI - 2024

BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



NGUYỄN THỊ NGỌC MAI

**NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN HOÁ HỌC VÀ HOẠT TÍNH ỨC CHẾ
ENZYME α - GLUCOSIDASE CỦA LOÀI SÀM TÁM SÓNG
(*MEMECYLON OCTOCOSTATUM* MERR. & CHUN)**

LUẬN VĂN THẠC SĨ KHOA HỌC VẬT CHẤT

Ngành: Hoá hữu cơ

Mã số: 8440114

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC

HƯỚNG DẪN 1

TS. Nguyễn Thị Thu Hà

HƯỚNG DẪN 2

TS. Nguyễn Lê Anh

HÀ NỘI - 2024

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đề tài nghiên cứu trong luận văn này hoàn toàn sử dụng các tài liệu, số liệu do chính tôi nghiên cứu và thu thập. Cho nên kết quả nghiên cứu của luận văn này được đảm bảo về tính trung thực, chính xác và khách quan. Bên cạnh đó, kết quả của luận văn này cũng chưa từng được báo cáo và công bố trong bất kỳ nghiên cứu nào. Kết quả trình bày bao gồm số liệu có trong luận văn hoàn toàn đúng sự thật, nếu sai tôi xin hoàn toàn chịu trách nhiệm về mặt pháp lý.

Hà Nội, tháng 9 năm 2024

Người làm luận văn



Nguyễn Thị Ngọc Mai

LỜI CẢM ƠN

Luận văn này được nghiên cứu và hoàn thiện tại Viện Hoá học – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, với sự hỗ trợ kinh phí từ đề tài nghiên cứu cấp Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, mã số ĐL0000.05/24-26.

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới TS. Nguyễn Thị Thu Hà và TS. Nguyễn Lê Anh – người đã rất tâm huyết, tận tình hướng dẫn, chỉ bảo và hỗ trợ tôi xuyên suốt khoảng thời gian tôi học tập và nghiên cứu luận văn thạc sĩ này tại Viện Hoá học – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Tôi xin trân trọng cảm ơn sự giúp đỡ tận tình của Ban lãnh đạo Học viện Khoa học và Công nghệ và Viện Hoá học đã luôn tạo điều kiện tốt nhất cho tôi trong suốt quá trình tôi học tập ở đây.

Tôi xin gửi lời cảm ơn chân thành tới các anh, chị cùng nghiên cứu tại Viện Hoá học đã luôn nhiệt tình, quan tâm, chỉ dạy và hỗ trợ tôi để tôi có thể hoàn thành luận văn của mình một cách tốt nhất.

Đặc biệt, tôi vô cùng biết ơn tất cả người thân trong gia đình, những người bạn đã luôn đồng hành, cho tôi những lời khuyên, lời động viên để tôi có thể hoàn thành luận văn thạc sĩ này.

Xin chân thành cảm ơn!

Hà Nội, tháng 9 năm 2024

Người làm luận văn



Nguyễn Thị Ngọc Mai

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	
LỜI CẢM ƠN	
DANH MỤC KÝ HIỆU, CHỮ VIẾT TẮT	
DANH MỤC BẢNG	
DANH MỤC HÌNH	
DANH MỤC SƠ ĐỒ	
MỞ ĐẦU	1
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU	3
1.1. TỔNG QUAN VỀ CHI MEMECYLON L.....	3
1.1.1. Giới thiệu chung về chi <i>Memecylon</i> L.	3
1.1.2. Giới thiệu chung về Sầm tám sóng (<i>Memecylon octocostatum</i>)..	4
1.1.3. Nghiên cứu trong và ngoài nước	4
1.1.4. Tác dụng dược lý của các loài chi <i>Memecylon</i>	9
1.2. TỔNG QUAN VỀ ENZYME α – GLUCOSIDASE VÀ BỆNH TIỂU ĐƯỜNG	13
1.2.1. Enzyme α -glucosidase và chất ức chế enzyme α -glucosidase ...	13
1.2.2. Bệnh tiểu đường và các nhóm thuốc điều trị.....	13
CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	17
2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU	17
2.1.1. Mẫu thực vật.....	17
2.1.2. Hoá chất.....	17
2.1.3. Thiết bị.....	18
2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	18
2.2.1. Phương pháp chiết xuất, phân lập và xác định cấu trúc.....	18
2.2.2. Phương pháp đánh giá hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase ..	21
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....	23
3.1. PHÂN LẬP VÀ XÁC ĐỊNH CẤU TRÚC CÁC HỢP CHẤT.....	23
3.1.1. Quy trình ngâm chiết và phân lập chất sạch	23
3.1.2. Dữ liệu phổ các hợp chất phân lập được.....	27
3.1.3. Cấu trúc của các hợp chất phân lập được.....	28
3.2. ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH ỨC CHẾ ENZYME α – GLUCOSIDASE	48
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	51

KẾT LUẬN	51
KIẾN NGHỊ	51
TÀI LIỆU THAM KHẢO	52
PHỤ LỤC PHỔ	PL1

DANH MỤC KÝ HIỆU, CHỮ VIẾT TẮT

Ký hiệu	Tiếng Anh	Diễn giải
NMR	Nuclear Magnetic Resonance	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân
¹ H-NMR	Proton Magnetic Resonance spectroscopy	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân proton
¹³ C-NMR	Carbon 13 Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân cacbon 13
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarisation	Phổ DEPT
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation	Phổ tương tác dị hạt nhân qua nhiều liên kết
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence	Phổ tương tác dị hạt nhân trực tiếp H → C
COSY	Corrrelated Spectroscopy	Phổ COSY
MS	Mass spectrometry	Phổ khối lượng MS
TMS	Tetramethylsilane	
DMSO	Dimethyl sulfoxide	
EtOAc	Ethylacetate	
MeOH	Methanol	
IC ₅₀	Inhibitory Concentration at 50%	Nồng độ ức chế 50% hoạt động enzyme
δ _H	Proton chemical shift	Độ dịch chuyển hoá học của proton
δ _C	Carbon chemical shift	Độ dịch chuyển hoá học của carbon
s	Singlet	
d	Doublet	
t	Triplet	
q	Quartet	
m	Multiplet	
Dd	Double doublet	

DANH MỤC BẢNG

Bảng 3. 1: Khối lượng các phân đoạn của cặn EtOAc	24
Bảng 3. 2: Số liệu phổ NMR của hợp chất MOB3 và hợp chất tham khảo....	30
Bảng 3. 3: Số liệu phổ NMR của hợp chất MOEA3 và hợp chất tham khảo.	37
Bảng 3. 4: Kết quả đánh giá hoạt tính ức chế enzyme α – glucosidase.....	48

DANH MỤC HÌNH

Hình 2. 1: Loài <i>Memecylon octocostatum</i> Merr. & Chun thu hái tại Quảng Trị	17
Hình 2. 2: Sắc ký cột	19
Hình 2. 3: Sắc ký lớp mỏng	19
Hình 3. 1: Phổ HR-ESI-MS của hợp chất MOB3	30
Hình 3. 2: Phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất MOB3	30
Hình 3. 3: Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ của hợp chất MOB3	32
Hình 3. 4: Phổ COSY của hợp chất MOB3	33
Hình 3. 5: Phổ HSQC của hợp chất MOB3	33
Hình 3. 6: Phổ HMBC của hợp chất MOB3	34
Hình 3. 7: Một số tương tác chính trên phổ HMBC và COSY của hợp chất MOB3	34
Hình 3. 8: Phổ HR-ESI-MS của hợp chất MOB2	35
Hình 3. 9: Phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất MOB2	36
Hình 3. 10: Phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất MOEA3	38
Hình 3. 11: Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ của hợp chất MOEA3	39
Hình 3. 12: Phổ HMBC giãn rộng của hợp chất MOEA3	39
Hình 3. 13: Một số tương tác chính trên phổ HMBC của hợp chất MOEA3	40
Hình 3. 14: Phổ $^1\text{H NMR}$ của MOE5.1	41
Hình 3. 15: Phổ $^{13}\text{C NMR}$ của MOE5.1	41
Hình 3. 16: Phổ $^{13}\text{C NMR}$ của MOE5.1	42
Hình 3. 17: Phổ HMBC của MOE5.1	42
Hình 3. 18: Một số tương tác chính trên phổ HMBC của hợp chất MOE5.1	43
Hình 3. 19: Phổ ESI-MS của MOB4.1	44
Hình 3. 20: Phổ $^1\text{H NMR}$ của MOB4.1	44
Hình 3. 21: Phổ $^{13}\text{C NMR}$ của MOB4.1	45
Hình 3. 22: Phổ ESI-MS của MOE1.2	46
Hình 3. 23: Phổ $^1\text{H NMR}$ của MOE1.2	46
Hình 3. 24: Các hợp chất phân lập được từ loài <i>Memecylon octocostatum</i> ...	47

DANH MỤC SƠ ĐỒ

Sơ đồ 3. 1. Quy trình ngâm chiết mẫu thực vật	23
Sơ đồ 3. 2: Sơ đồ tạo các phân đoạn từ cặn chiết EtOAc	24
Sơ đồ 3. 3: Sơ đồ phân lập các hợp chất từ cặn EtOAc	25
Sơ đồ 3. 4: Sơ đồ tạo các phân đoạn từ cặn chiết MeOH	25
Sơ đồ 3. 5: Sơ đồ phân lập các hợp chất từ cặn nước	26

MỞ ĐẦU

Thực vật trên thế giới vốn rất đa dạng và phong phú. Hiện nay ước tính có đến khoảng 285.650 loài thực vật đã được phát hiện. Việt Nam có khí hậu nhiệt đới ẩm gió mùa, giúp sinh vật phát triển một cách thuận lợi, có khoảng 12.000 loài thuộc 2.256 chi, 305 họ. Theo nghiên cứu của Võ Văn Chi (2012), Việt Nam sở hữu khoảng 3.200 loài thực vật có giá trị làm thuốc. Tuy nhiên, thông qua điều tra của Viện Dược liệu (2016), số lượng cây thuốc đã được ghi nhận hiện lên tới 5.117 loài. Dù vậy, ở Việt Nam, các loài cây thuốc vẫn chưa được nghiên cứu một cách toàn diện, đặc biệt là về các thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của chúng. Điều này dẫn đến việc thiếu cơ sở khoa học để phát triển các sản phẩm ứng dụng trong các lĩnh vực dược phẩm, thực phẩm và nông nghiệp.

Chi Sâm *Memecylon* là một trong những chi của họ Mua (Melastomataceae) bao gồm khoảng 300 loài phân bố ở các vùng nhiệt đới tại châu Đại Dương, châu Á, châu Phi, Madagascar, quanh Thái Bình Dương và châu Mỹ. Có rất nhiều nghiên cứu về thành phần hoá học và hoạt tính sinh học của các loài thuộc chi này. Chi Sâm có thành phần chính là các nhóm chất thuộc nhóm flavonoid, acid béo, phenol, terpenoid, terpene, alkane, enzyme, benzen, acetate, ester, alcol, dẫn xuất carbohydrate và một số hợp chất khác [1]. Trong đó, phenol và flavonoid được biết đến là các tác nhân chống lại bệnh tiểu đường do có khả năng ức chế enzyme thủy phân carbohydrate như enzyme α -amylase và α -glucosidase. Cho tới ngày nay, đã có một số loài trong chi Sâm được nghiên cứu như *M. umbellatum*, *M. talbotianum*, *M. edule*... tuy nhiên loài *M. octocostatum* chưa có báo cáo nào về thành phần hóa học cũng như hoạt tính sinh học của nó. Vì lý do này, việc nghiên cứu và điều tra thành phần hóa học cùng với việc đánh giá hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase của các chất đã được phân lập từ loài *M. octocostatum* sẽ mang lại giá trị khoa học và ứng dụng cao. Nghiên cứu này không chỉ có ý nghĩa quan trọng trong việc khai thác và sử dụng hiệu quả nguồn tài nguyên thiên nhiên của đất nước mà còn góp phần

vào sự phát triển các ứng dụng thực tiễn. Do đó, tôi đã quyết định chọn đề tài “Nghiên cứu thành phần hoá học và hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase từ loài Sầm tám sóng (*Memecylon octocostatum* Merr. & Chun)”.

Mục tiêu của luận án: Nghiên cứu được thành phần hóa học và hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase của cao chiết và các hợp chất phân lập được từ loài Sầm tám sóng (*Memecylon octocostatum* Merr. & Chun).

Nội dung luận văn gồm có:

1. Thu hái và xử lý mẫu thân lá loài *Memecylon octocostatum*;
2. Tạo các cao chiết và các phân đoạn đem đi tinh chế thu được các hợp chất sạch;
3. Phân lập các hợp chất sạch sử dụng các phương pháp sắc kí và sử dụng các phương pháp phổ để xác định cấu trúc của các chất đã phân lập được;
4. Đánh giá hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase của các cao chiết và chất sạch đã phân lập.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

1.1. TỔNG QUAN VỀ CHI *MEMECYLON* L.

1.1.1. Giới thiệu chung về chi *Memecylon* L.

Chi Sầm (*Memecylon* L.) hiện có hơn 300 loài, được tìm thấy ở các vùng khí hậu nhiệt đới ở châu Á, châu Đại Dương, châu Phi, quanh Thái Bình Dương và châu Mỹ. Ấn Độ hiện có hơn 30 loài, trong khi Trung Quốc có 11 loài. Giáo sư Chen Cheih (1984) đã phân loại và mô tả ngắn gọn về hình thái, sinh thái, sự phân bố của 11 loài và 2 thứ. Tập thể nghiên cứu Jie Chen & S. S. Renner (2007) đã xác định và mô tả của 11 loài ở Trung Quốc. Nhà khoa học Guillaumin (1908 - 1923) thực hiện những nghiên cứu đầu tiên về chi Sầm ở Việt Nam, ông xây dựng khoá phân loại và mô tả vắn tắt các đặc điểm, phân bố và giá trị sử dụng, tên địa phương của 15 loài. Đáng chú ý nhất trong các công trình của người Việt Nam phải kể đến Phạm Hoàng Hộ (2000) đã xây dựng khoá phân loại 15 loài, mô tả bổ sung các đặc điểm hình thái, đặc điểm sinh thái, phân bố. Nguyễn Kim Đào (2003) đã xác định và mô tả 15 loài thuộc chi Sầm ở Việt Nam [2].

Chi Sầm (*Memecylon* L.) thường có đặc điểm hình thái chung là cây gỗ nhỏ, thân bám bụi và bóng, nhiều cành, không có vết sẹo hay vết nứt dọc. Thân cây có dạng tròn với 4 góc cạnh. Có lá đơn mọc đối nhau, có thể có cuống hoặc không, và có thể có hình bầu dục, hình elip hoặc hình trứng. Thân cây có chất liệu da, dai hoặc nhiều thịt, thường không thẳng với gân chính và mép lá rõ rệt. Cụm hoa của chi Sầm thường mọc ở nách lá hoặc đỉnh, có cuống và có thể là kiểu sim đơn hoặc kép, đôi khi mọc thành chùm. Cuống hoa nằm gần đốt trên và có hai lá bắc nhỏ. Nụ hoa được hình thành như hình nón. Có đài hoa dạng đầu, có màu, với 4 răng không rõ ràng. Cánh hoa có 4 cánh, thường rụng sớm và có màu. Nhị hoa được tạo thành từ 8 sợi, 2 ngắn nhỏ mở ra bằng rãnh hình thành bao phấn; trung đới có mũi nằm đối diện bao phấn, lớn hơn so với các ngắn bao phấn và không kéo dài. Bầu hoa hạ gắn với đáy, có 1 ô, gồm 8 lá noãn

và phần noãn từ 7 đến 12; vòi nhụy hình dùi với các đốt ở đáy. Quả mọng, hình cầu hoặc bầu dục, đôi khi có vòng đài ở đỉnh; hạt bên trong [1].

1.1.2. Giới thiệu chung về Sầm tám sóng (*Memecylon octocostatum*)

Ở Việt Nam, chi Sầm có khoảng 15 loài [3]. Loài *Memecylon octocostatum* hay còn gọi là Sầm tám sóng, được 2 nhà thực vật học Merr. & Chun mô tả lần đầu tiên năm 1935. *M. octocostatum* thuộc loại cây có thân gỗ nhỏ, thân cao khoảng 7-8 m, đường kính 20-30 cm. Cành có mặt cắt ngang hình tròn; nhẵn, không lông. Lá mọc đối nhau; phiến lá hình bầu dục, có kích thước 3-5x2-2,5 cm; đỉnh nhọn; gốc lá tù; mặt trên màu nâu sẫm, mặt dưới màu nâu đỏ; mép nguyên; 2 mặt nhẵn; gân chính rõ, gân bên không rõ; cuống dài 2-5 mm. Cụm hoa mọc dạng xim một ngả hay hai ngả, dài 6-8 mm, nằm ở vị trí nách lá; cuống cụm hoa dài 2-4 mm; có lá bắc, hình dùi, dài 1 mm; cuống hoa dài 1-2 mm, nhẵn; đế hoa hình chén, dài 2-2,8 mm; 4 cạnh. Hoa có 4 lá đài dính nhau ở dưới; có thùy tam giác dài khoảng 0,8 mm. Cánh hoa có 4 cánh; hình trứng; kích thước 3 x 1,5 mm; mép có răng không đều; đỉnh nhọn; màu xanh lam. Nhị 8; chỉ nhị dài 2,5-3 mm; bao phấn hình trứng, nhỏ, mở bằng nắp ở đầu, dài 1,2 mm. Quả mọng; hình cầu; dài 6-8 mm, có 8 cạnh; đài tồn tại tạo thành vòng thắt hình vuông miện trên đỉnh quả. Hạt 1; đường kính 1-1,5 mm; bề mặt nhẵn [2].

Ở nước ta, cây phân bố ở Ninh Thuận (Cà Ná), Lâm Đồng, Đồng Nai, Quảng Trị. Chúng mọc rải rác trong rừng hoặc ven những khu rừng thưa. Cây ưa ánh sáng và phát triển mạnh ở độ cao 700-800 m. *M. octocostatum* được sử dụng làm thuốc trị các vấn đề về da cụ thể như mụn, lở loét.

1.1.3. Nghiên cứu trong và ngoài nước

1.1.3.1. Các nghiên cứu trong nước

Các công trình nghiên cứu về chi *Memecylon* tại Việt Nam phải kể tới nghiên cứu tiêu biểu của Phạm Hoàng Hộ (2000). Ông đã khoá định loại và mô tả ngắn gọn các đặc điểm và sự phân bố của 15 loài: *M. acuminatum*, *M.*

angustifolium, *M. chevalieri*, *M. caeruleum*, *M. confertiflorum*, *M. edule*, var. *ovatum*, *M. fruticosum*, *M. harmandii*, *M. langbianense*, *M. ligustrinum*, *M. lilacinum*, *M. octocostatum*, *M. scutellatum*, *M. umbellatum* [3].

Năm 2003, Nguyễn Kim Đào cùng các cộng sự cũng đã thống kê, mô tả 15 loài và 3 thứ với nghiên cứu “Danh mục các loài thực vật ở Việt Nam” [4] về cơ bản cũng có sự tương đồng về các loài với nghiên cứu của Phạm Hoàng Hộ.

Đỗ Huy Bích và cộng sự (2004) đã mô tả đặc điểm hình thái, phân bố, nghiên cứu thành phần hoá học của loài *M. edule* trong công trình “Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam” [5].

Năm 2020, trong công bố “Nghiên cứu phân loại chi Sầm – *Memecylon* L. ở Việt Nam” Nguyễn Thị Bích Hương và các cộng sự đã mô tả đặc điểm hình thái của chi, xây dựng khoá định loại 14 loài và 4 thứ thuộc chi *Memecylon* ở Việt Nam dựa trên đặc điểm hình thái [2].

Nguyễn Tuấn Phương (2023) đã tách chiết, xác định được cấu trúc và đánh giá hoạt tính kháng viêm của 6 hợp chất tách được từ cây Sầm núi (*Memecylon scutellatum* (Lour.)) [1].

Có thể thấy các nghiên cứu trong nước chủ yếu là các công trình mang tính chất thống kê, còn khá ít các nghiên cứu đi sâu vào việc phân lập chất, xác định cấu trúc và đem đi đánh giá hoạt tính sinh học của các loài thuộc chi Sầm.

1.1.3.2. Các nghiên cứu trên thế giới

Nhà khoa học Chen Cheih (1984) đã xây dựng khoá định loại và mô tả vắn tắt về đặc điểm hình thái, sinh thái, phân bố của 11 loài và 2 thứ [6].

Elavazhagan và các cộng sự đã phân tích thành phần hoá học có trong dịch chiết chloroform và ethyl acetate của hạt loài *M. edule* được thu hái tại Ấn Độ. Kết quả cho thấy sự hiện diện của các hợp chất alkaloid, triterpene, flavonoid và saponin [7]. Dịch chiết methanol của *M. edule* chứa squalene, palmitic acid, và acid béo từ phân tích GC-MS và các nhóm chức năng được

xác định bằng phổ FT-IR [8]. Khi phân tích GC-MS của chiết xuất ethyl acetate loài *M. edule* cho thấy 26 hợp chất và stearic acid là thành phần chiếm ưu thế (20,19%) [9]. Somsak Nualkaew và cộng sự đã phân lập được 9 hợp chất phenol từ lá loài *M. edule* trong đó có một chất mới là 2-butanone 4-glucopyranoside 6'-O-gallate và một hợp chất có hoạt tính chống oxi hoá cao đã được ứng dụng trong thực tiễn là epigallocatechin-3-O-gallate (EGCG) [10]. Các nghiên cứu khác trên thế giới cũng chỉ ra rằng EGCG có hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase cao. Leilei Xu và cộng sự đã chứng minh hoạt tính ức chế α -glucosidase của EGCG ($IC_{50} = 19,5 \pm 0,3 \mu M$) cao hơn acarbose ($IC_{50} = 278,7 \pm 1,1 \mu M$), EGCG ức chế α -glucosidase theo cách thuận nghịch và không cạnh tranh [11].

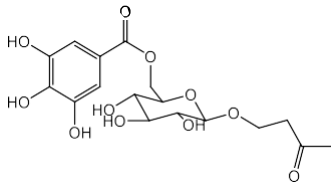
Trong các nghiên cứu về loài *M. umbellatum* cho thấy sự có mặt của phytosterol, terpenoid, glycosid, tannin và flavonoid, cacbohydrate và các hợp chất phenolic [12-14]. Thành phần hóa học phân trên mặt đất của *M. umbellatum* bao gồm β - amyrin, sitosterol, oleanic acid, ursolic acid, sitosterol- β -D glucoside umbe lactone [15]. Joshi và cộng sự [16] làm sáng tỏ cấu trúc của các acid béo như octocosoic acid, cerotic acid, ethyl palmitate, palmitic acid và butyric acid dựa trên dữ liệu phổ từ dịch chiết n-hexane của rễ loài thực vật này. Các dịch chiết khác nhau của thân cây *M. umbellatum* được xác định các thành phần hóa học bằng cách sử dụng GC-MS, kết quả cho thấy có 20 hợp chất từ dịch chiết chloroform, 11 hợp chất từ dịch chiết ether và 10 hợp chất từ dịch chiết ethanol [8].

Dịch chiết methanol của *M. talbotianum* đã được xác định 18 chất chuyển hóa, trong đó synapoylhexose-formic acid; kaempferol 3-O-feruloylhexosyl rhamnoside, 6-Carabinosyl-8-C-glucosyl-apigenin và isorhamnetin-3-O-glycoside-7-Oglycoside là những thành phần chính [17]. Trong phân tích HPLC, rutin, quercetin và protocatechuic acid được tìm thấy là các thành phần chính có trong *M. talbotianum*. Sự hiện diện của các hợp chất này trong loài được báo cáo lần đầu tiên và chúng có thể là tác nhân tạo nên hoạt động chống

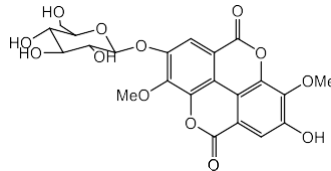
đái tháo đường của *M. talbotianum* [18]. Rất nhiều nghiên cứu trên thế giới đã chỉ ra hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase của các hợp chất này cao hơn acarbose: quercetin, kaemferol có IC50 lần lượt là $30,67 \pm 3,67 \mu\text{M}$ và $42,59 \pm 9,0 \mu\text{M}$ trong khi acarbose có IC50 là $177,5 \pm 27,5 \mu\text{M}$.

Dịch chiết methanol loài *M. terminale* cũng phát hiện sự có mặt các alkaloid, flavonoid, steroid, tannin và phenol [19]. Các hợp chất anthocyanins là Cy-3, 5- diglucoside được tìm thấy từ *M. amplexicaule* và Mv-3, 5- diglucoside từ *M. caeruleum* [20]. Một hợp chất chalcone mới có cấu trúc thú vị là polyanthumin cùng năm hợp chất quen thuộc là myricetin 3-O-(3''-O-galloyl)- α -l- rhamnopyranoside, sulfuretin, fustin, gallic acid, ethyl gallate, được phân lập từ thân loài *Memecylon polyanthum* H.L. Li [21].

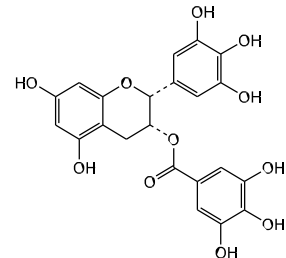
Ellagic glycosides



2-butanone 4-gluco-pyranoside 6'-O-gallate

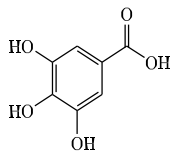


3,3'-di-O-methylellagic acid 4-O- β -D-gluco-pyranoside

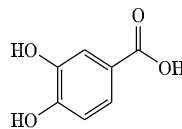


Epigallocatechin-3-O-gallate

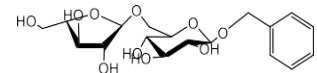
Phenol



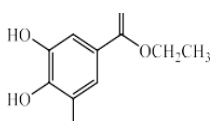
Gallic acid



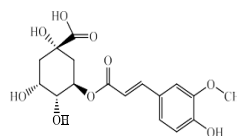
Protocatechuic acid



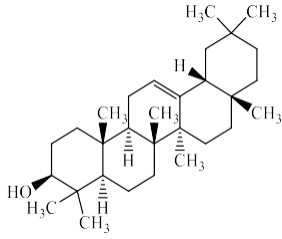
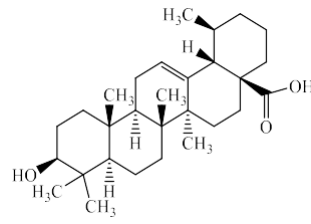
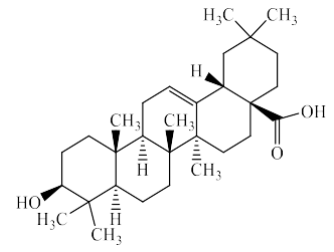
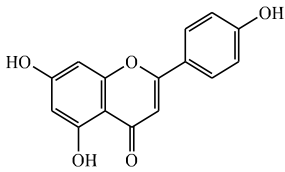
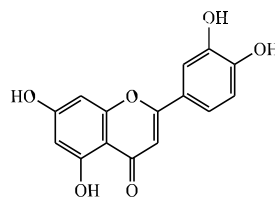
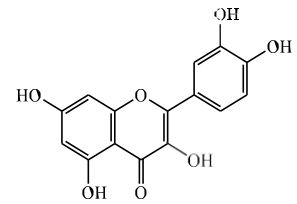
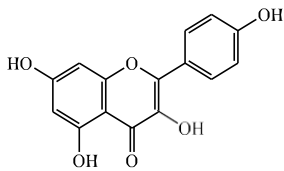
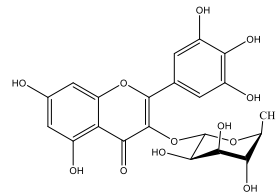
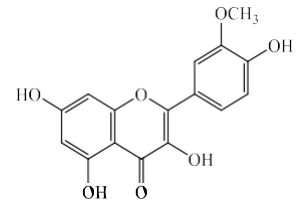
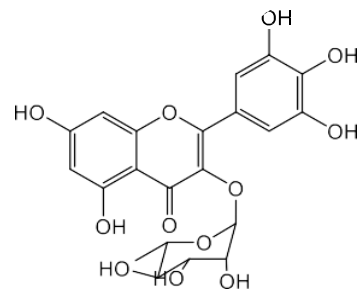
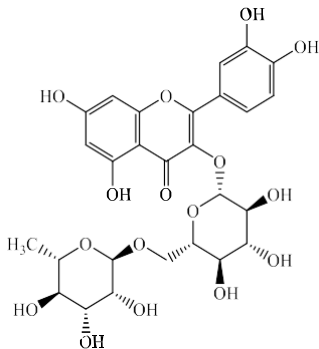
Benzyl-(6-O- α -l-arabinofuranosyl)-
O- β -D-gluco-pyranoside

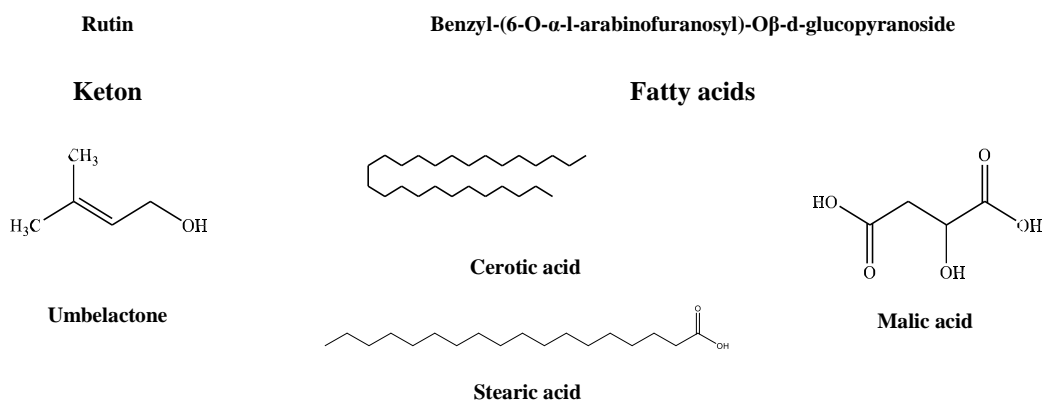


Ethyl gallate



Feruloyl quinic acid

Triterpenes**B-amyrin****Ursolic acid****Oleanolic acid****Flavonoids****Apigenin****Lutcolin****Quercetin****Kaemferol****Myricetin-3-O- α -l-rhamnopyranoside****Isorhamnetin**



1.1.4. Tác dụng dược lý của các loài chi *Memecylon*

- **Tác dụng chống tiểu đường**

Trong chi *Memecylon*, loài *M. malabaricum* đã xuất hiện trong các bài thuốc cổ truyền của người Ấn Độ trong việc chữa bệnh tiểu đường. Các nghiên cứu sơ bộ về khả năng ức chế α - amylase của dịch chiết thô cho thấy khả năng ức chế 10,60 % hoạt động enzyme ở giá trị nồng độ 5 μ g/mL [22]. Ở một công bố khác, tác dụng chữa bệnh tiểu đường của dịch chiết methanol của lá loài này cũng đã chỉ ra hoạt tính ức chế enzyme phụ thuộc vào liều lượng trên chuột [21]. Dịch chiết methanol của *M. malabaricum* cũng cho thấy một hiệu quả tương tự khi so sánh với chất tham khảo tiêu chuẩn gliclazide [23].

Loài *M. umbellatum* cũng được ứng dụng như một dược liệu từ xa xưa với tác dụng hạ đường huyết. Việc sử dụng dịch chiết cồn từ lá cây *M. umbellatum* dẫn đến giảm đáng kể mức đường huyết ở chuột bình thường và chuột bị tiểu đường do alloxan [24]. Các nghiên cứu độc tính cấp của dịch chiết *M. umbellatum* cho thấy nó không có tác dụng phụ trên gan, thận và làm giảm đáng kể mức urea và creatinine so với lô đối chứng. Các nghiên cứu độc tính trường diễn đã xác nhận sự gia tăng trọng lượng cơ thể của dịch chiết trên chuột. Tiềm năng chống đái tháo đường và hạ đường huyết của *M. umbellatum* đã được đánh giá với các dịch chiết khác như hexane, ethyl acetate và methanol, tuy nhiên dịch chiết methanol cho thấy hoạt động chống đái tháo đường cao hơn cả [25].

Kết quả thử nghiệm cho thấy, dịch chiết methanol từ lá loài *M. talbotianum* làm giảm mức đường huyết trên động vật bệnh tiểu đường do streptozotocin gây ra, cải thiện chỉ số lipid máu, giảm nguy cơ stress oxy hóa và cải thiện tổn thương gan và tuyến tụy [26].

- **Tác dụng chống viêm**

Dịch chiết cồn của *M. umbellatum* được đánh giá về hoạt tính chống viêm bằng cách sử dụng mô hình chuột gây viêm cấp tính bằng carrageenan làm phù chân ở chuột và gây mô hình viêm mạn tạo u hạt bằng cấy viên cotton vào da lưng chuột. Kết quả thử nghiệm cho ta thấy tác dụng chống viêm ở cả 2 mô hình động vật và trọng lượng của tuyến thượng thận cũng được tăng đáng kể trong quá trình thử nghiệm. Kết quả cho thấy tác dụng chống viêm phụ thuộc tùy vào liều lượng được sử dụng [27].

Tác dụng chống viêm của lá *M. edule* được thử nghiệm với cao chiết ethyl acetate, bằng cách sử dụng propiolate ethyl phenyl (EPP) gây phù tai chuột. Kết quả cho thấy bên tai bị phù nề giảm đáng kể sau khi bôi cao EtOAc 30 phút. Sau 4 giờ, tác dụng giảm 50% so với chất tham chiếu indomethacin cùng liều lượng [28].

Memecyalaene, một hợp chất mới được phân lập từ *M. Malabaricum*, chất này đã được mang đi thử nghiệm để đánh giá cho tác dụng chống viêm ở chuột bạch tạng trong mô hình cấp tính và bán cấp tính. Phân tích các chỉ số sinh hóa, như các enzyme chống oxy hóa, peroxy hóa lipid ức chế ở gan, cũng như mucopolysaccharides cho thấy memecyalaene làm tăng đáng kể hoạt động của enzyme chống oxy hóa (CAT, SOD và GPx ($P < 0,05$)), ức chế lipid peroxide trong gan và mucopolysaccharide trong mô u hạt. Hoạt động chống viêm của Memecyalaene cho thấy trong cả hai mô hình viêm được cho là do tác dụng ức chế chất chống oxy hóa và phospholipase A2 của chúng. Vì vậy, nghiên cứu đã chứng minh cơ sở khoa học của việc sử dụng *M. malabaricum* trong dân gian đối với các bệnh liên quan đến viêm và giả thiết cơ chế hoạt động của nó [29].

- **Tác dụng chống oxy hoá**

Dịch chiết methanol của lá *M. umbellatum* được đánh giá hoạt tính chống oxy hóa. Kết quả cho thấy dịch chiết này có đặc tính chống oxy hóa tương đương với chất đối chứng là ascorbic acid [29]. Chiết xuất methanol của *M. talbotianum* thể hiện phản ứng mạnh với các gốc tự do DPPH, ABTS, gốc superoxide [30]. Dịch chiết methanol từ *M. terminale* cho thấy hoạt động chống oxy hóa mạnh nhất và tác dụng thể hiện phụ thuộc vào liều lượng [31].

- **Tác dụng bảo vệ gan, thận**

Rễ *M. Umbellatum* có tác dụng bảo vệ gan, chống lại acetaminophen gây ra độc tính trên gan ở chuột đã được đánh giá. Một liều uống 200 hoặc 400 mg/kg thể hiện hoạt tính bảo vệ gan bằng cách giảm chỉ số các enzyme huyết thanh và phục hồi mô gan trở về bình thường khi so sánh với nhóm đối chứng. Chuột thử nghiệm còn thể hiện rõ rệt khả năng chống lại carbon tetrachloride gây độc cho gan. Kết quả thu được cho thấy dịch chiết làm giảm chỉ số SGOT, SGPT, ALP, γ -GT và liều 400 mg/kg với bilirubin, tương ứng với thuốc tiêu chuẩn silymarin. Kết quả cũng cho thấy rằng lô điều trị với dịch chiết còn đã rút ngắn đáng kể thời gian gây mê ở chuột như so với nhóm chỉ thử nghiệm với CCl_4 [19].

Dịch chiết còn của rễ loài *M. umbellatum* đã được nghiên cứu về hoạt tính bảo vệ thận chống lại bệnh thận cấp do cisplatin gây ra ở chuột. Dịch chiết ở liều 100 đến 400 mg / kg trọng lượng cơ thể cho thấy tác dụng giảm urê máu, huyết thanh, creatinine phụ thuộc vào liều lượng và khả năng bình thường hóa các thay đổi mô bệnh học ở lô được điều trị. Những phát hiện này cho thấy khả năng bảo vệ thận của loài thực vật này [32].

- **Hoạt động chống ung thư**

Hoạt tính chống tăng sinh của chiết xuất ethyl acetate lá *M. edule* trên các dòng tế bào ung thư dạ dày (NUGC và MKN-74) và tế bào niêm mạc dạ dày lành (GES-1). Kết quả ghi nhận cho thấy dịch chiết ức chế sự phát triển

của tế bào ung thư dạ dày theo cách thức phụ thuộc vào liều lượng và độc tính tế bào mạnh hơn trên tế bào ung thư dạ dày so với tế bào lành và độc tính rõ ràng hơn đối với khối u ác tính. Trong thử nghiệm apoptosis, dịch chiết này ức chế được biểu hiện quá mức của Cyt-c và kích hoạt caspases-3, điều hòa Bcl-2 trên các tế bào MKN-74 và NUGC theo con đường ty thể. Nghiên cứu cho rằng dịch chiết ethyl acetate của *M. edule* gây apoptosis có chọn lọc ở các tế bào ung thư dạ dày, nhấn mạnh tầm quan trọng của loài thực vật này trong điều trị ung thư dạ dày của y học cổ truyền [33].

- **Tác dụng kháng khuẩn**

Dịch chiết cồn của *M. umbellatum* được đánh giá về hoạt tính kháng khuẩn, kết quả nghiên cứu cho thấy khả năng kháng khuẩn tối đa trên chủng *Staphylococcus aureus* và kháng vi khuẩn Gram âm, kháng nấm nhẹ [34, 35]. Dịch chiết methanol của *M. edule* chống lại các chủng vi khuẩn Gram dương (*Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* và *Micrococcus luteus*) và vi khuẩn Gram âm (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Kelebsiella pneumonia*) và các loại nấm (*A. Fumigatus*, *Candida albicans* và *Aspergillus niger*) bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch. Kết quả thể hiện dịch chiết có hoạt tính đáng kể chống lại vi khuẩn gram dương, vi khuẩn gram âm và nấm [35]. Dịch chiết chloroform và ethyl acetate từ hạt của loài thực vật này cho thấy hoạt tính kháng khuẩn ở mức trung bình và các chất chuyển hóa thứ cấp của cây được sử dụng để chữa lành vết thương và các dạng nhiễm trùng do vi khuẩn gây ra [36]. Vivek và cộng sự đã báo cáo hoạt tính kháng khuẩn của dịch chiết methanol của các loài *M. talbotianum*, *M. malabaricum*, *M. Umbellatum*, *M. Wightii* và *M. edule*. Chúng chống lại cả vi khuẩn Gram dương và Gram âm và nấm được thử nghiệm [37, 38]. Dịch chiết từ loài *M. terminal* cũng cho thấy hoạt tính kháng khuẩn chống lại các chủng vi khuẩn Gram dương và Gram âm khác nhau và hiệu quả phụ thuộc vào liều lượng thử nghiệm [19].

1.2. TỔNG QUAN VỀ ENZYME α – GLUCOSIDASE VÀ BỆNH TIỂU ĐƯỜNG

1.2.1. Enzyme α -glucosidase và chất ức chế enzyme α -glucosidase

Như đã biết, enzyme α -glucosidase (E.C.3.2.1.20) là nhóm enzyme quan trọng trong lớp glycoside hydrolase (GH). Những enzyme trong nhóm này gồm có maltase, maltase-glucoamylase, glucosidase, glucoinvertase, α -D-glucosidase, α -glucopyranosidase, α 1,4-glucosidase, α -glucosid hydrolase và α -D - glucosid glucohydrolase. Trong đó, enzyme α - glucosidase đóng vai trò chính trong việc phân tách liên kết glycoside của các phân tử carbohydrate với nhau, đây là liên kết vô cùng mạnh mẽ trong các polymer tự nhiên.

Các chất ức chế enzyme α -glucosidase (AGIs) làm giảm lượng đường trong máu bằng cách làm chậm quá trình hấp thụ carbohydrate từ ruột non. Các hợp chất này thường có cấu trúc tương tự như disaccharide hoặc oligosaccharide, cho phép chúng gắn vào vị trí liên kết carbohydrate của enzyme α -glucosidase. Điều này tạo ra sự ức chế cạnh tranh, làm giảm hoạt động của enzyme trong niêm mạc ruột non. Kết quả là, carbohydrate không được hấp thụ ngay ở ruột, mà sẽ được thủy phân chậm ở hồng tràng, tá tràng và hồi tràng, làm việc hấp thụ glucose giảm đi đáng kể.

Dựa theo các nghiên cứu, thuốc miglitol và acarbose – điển hình cho thuốc AGIs không chỉ làm giảm lượng đường trong máu sau bữa ăn mà còn thúc đẩy giải phóng GLP-1 (Glucagon-like peptide-1), giúp ức chế con đói. Mặc dù acarbose có thể làm giảm quá trình tiêu hóa carbohydrate bằng cách ức chế enzyme α -glucosidase, nhưng nó cũng có thể xuất hiện một số tác dụng phụ như đầy bụng, tiêu chảy và buồn nôn. Do đó, nghiên cứu và phát triển các AGIs mới có thể cải thiện hiệu quả điều trị đái tháo đường tuýp 2 đồng thời giảm thiểu các tác dụng phụ không mong muốn. Nhiều AGIs đã được phát hiện ở nhiều loài sinh vật, chủ yếu là từ thực vật.

1.2.2. Bệnh tiểu đường và các nhóm thuốc điều trị

Tiểu đường có thể hiểu là một bệnh rối loạn về chuyển hóa được đặc trưng bởi lượng đường huyết liên tục cao hơn so với mức thông thường. Lý do chính là bởi vì cơ thể không sản sinh ra đủ lượng insulin cần có hoặc việc sử dụng insulin không mang lại hiệu quả, hoặc bởi vì cả hai lý do trên, dẫn đến khó chuyển hóa glucose, protein, mỡ và các khoáng chất. Trong điều kiện bình thường, cơ thể chuyển đổi glucose, lipid và protein thành năng lượng cho các hoạt động của não, cơ và các tế bào. Tuy nhiên, ở những người mắc bệnh đường huyết, sẽ rất khó khăn trong việc cơ thể chuyển hóa carbohydrate từ thức ăn thành năng lượng, dẫn đến sự tích tụ đường trong máu. Nếu mức đường huyết duy trì cao, điều này có thể làm tăng các khả năng mắc các bệnh về tim và gây nhiều vấn đề có hại cho các cơ quan khác như mắt, các cơ quan thần kinh và thận, cũng như nhiều vấn đề sức khỏe nghiêm trọng khác. Bệnh tiểu đường có 3 thể chính:

- Tiểu đường thai kỳ là một loại tiểu đường phát triển trong thời kỳ mang thai. Thường loại tiểu đường này sẽ biến mất sau khi em bé chào đời. Tuy nhiên, sản phụ đã từng bị tiểu đường thai kỳ về sau sẽ có nguy cơ cao mắc tiểu đường tuýp 2. Đôi khi bệnh tiểu đường được chẩn đoán trong thời kỳ mang thai là tiểu đường tuýp 2.
- Tiểu đường tuýp 1 là bệnh phụ thuộc vào insulin, nó giết chết các tế bào beta – tế bào tiết insulin của đảo tụy, dẫn đến việc insulin quá ít và nhu cầu sử dụng insulin ngoại sinh tăng lên. Bệnh này thường được chẩn đoán ở trẻ em và thanh thiếu niên, đặc biệt là những người dưới 20 tuổi, và chiếm khoảng 5 – 10% tổng số ca mắc bệnh tiểu đường. Loại tiểu đường này có tiến triển nhanh chóng và xuất hiện bất ngờ, điều này giúp dễ dàng nhận diện bệnh hơn.
- Tiểu đường tuýp 2 là bệnh không có sự phụ thuộc vào insulin gây rối loạn chuyển hoá carbohydrate, do sự thiếu hụt sản xuất insulin cũng như tác động của insulin đến cơ thể làm tăng lượng đường trong máu. Cơ chế của bệnh đầu tiên khi mới mắc bệnh là sự đề kháng với insulin. Nghĩa là cơ thể sản sinh ra đủ lượng insulin nhưng lại không thể sử dụng chúng đúng cách hay nói cách

khác insulin không thực hiện được đúng chức năng của nó. Insulin đóng vai trò là cầu nối trung gian đưa glucose vào bên trong tế bào sau đó các tế bào sẽ sử dụng nguồn “thức ăn” này để tạo ra nguồn năng lượng cho cơ thể. Tiểu đường tuýp 2 là dạng bệnh tiểu đường phổ biến nhất và chủ yếu ảnh hưởng đến những người trên 40 tuổi, trong khi bệnh này đang ngày càng phổ biến ở những người trẻ tuổi hơn. 90 – 95% tổng số ca tiểu đường là tiểu đường tuýp 2. Một trong những thách thức của bệnh này là các biểu hiện của bệnh không rõ ràng, khiến việc chẩn đoán bệnh thường gặp khó khăn [39].

Các sản phẩm cuối cùng của quá trình thủy phân tinh bột bằng enzyme α -amylase là maltose, maltotriose, α -dextrin và một ít glucose. Các sản phẩm này được thủy phân thành các monosaccharide thành phần của chúng bởi các enzyme của các tế bào ruột non thường được gọi là α -glucosidase gồm maltase, sucrose, isomaltase và lactase. Điều này gây ra sự gia tăng đột ngột lượng đường trong máu, đây là một biến chứng nghiêm trọng liên quan đến bệnh tiểu đường loại 2.

Một trong những cách tiếp cận điều trị hiệu quả nhất trong việc quản lý tình trạng tăng đường huyết là giảm sản xuất và hấp thụ glucose ở đường tiêu hoá thông qua việc ức chế các enzyme tiêu hoá carbohydrate như α -amylase và α -glucosidase [40].

Thuốc điều trị bệnh tiểu đường:

Để kiểm soát được đường huyết, bệnh nhân cần kết hợp cả việc sử dụng thuốc và chế độ ăn phù hợp. Người bệnh có thể sử dụng thuốc dạng tiêm hoặc viên uống.

- Các thuốc dạng tiêm: Insulin, Amylin
- Các thuốc dạng uống:
 - Thuốc nhóm biguanide như: metformin, buformin, phenformin
 - Thuốc nhóm dẫn xuất sulfamide như: carbutamide, tolbutamide, phenbutamide, metabutamide, ...

- Thuốc nhóm dẫn xuất sulfamide như: glypinamide, gliclazide, glibonuride, glipizide, ...
- Thuốc nhóm ức chế enzyme α -glucosidase: Acarbose, Voglibose, Benfluorex
- Thuốc nhóm meglitinide: repaglinide (Prandin) và nateglinide (Starlix)

CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

2.1.1. Mẫu thực vật

Mẫu thân lá Sầm tám sóng *Memecylon octocostatum* Merr. & Chun được thu hái tại tỉnh Quảng Trị vào tháng 10 năm 2023 được PGS.TS. Vũ Tiến Chính, Bảo tàng Thiên nhiên Việt Nam, Viện Hàn lâm KHCN Việt Nam giám định mẫu thực vật.

Mẫu tiêu bản kí hiệu MO-2023/QT được lưu trữ tại Phòng Hóa sinh ứng dụng, Viện Hóa học, Viện Hàn lâm KHCN Việt Nam.



Hình 2. 1: Loài *Memecylon octocostatum* Merr. & Chun thu hái tại Quảng Trị

2.1.2. Hoá chất

Các dung môi: dichloromethane, acetone, ethyl acetate, methanol, *n*-hexane

Sắc ký lớp mỏng (TCL) được thực hiện trên bản mỏng có tráng sẵn Silica gel 60 Merck F₂₅₄ có độ dày 0,25 mm. Quan sát bản mỏng dưới ánh sáng tử ngoại ở 2 bước sóng $\lambda = 254$ nm và $\lambda = 365$ nm. Thuốc thử trong phân tích TLC: FeCl₃, Ceri sulfat, Vanilin/ H₂SO₄ đặc.

Sắc ký cột (CC) sử dụng Silica gel Merck cỡ hạt 40-60 μ m.

Sắc ký cột (CC) với pha tĩnh là Sephadex LH-20.

Enzyme α -Glucosidase (Sigma G0660), cơ chất p-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside (pNPG, Sigma N1377), sodium phosphate buffer (PBS) 0,1M

pH 6,8, Na_2CO_3 (Merck), đĩa nhựa 96 giếng (SPL, Hàn Quốc), pipette đơn kênh, đa kênh (Eppendorf), đầu tít các thể tích...

2.1.3. Thiết bị

Phổ khối phun mù điện tử (ESI-MS) được phân tích bằng máy sắc ký lỏng ghép khối phổ LC/MSD Agilent series 1100, sử dụng chế độ ESI và đầu dò DAD.

Phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) được ghi lại trên thiết bị Bruker Avance 600 MHz, với TMS được dùng làm chất chuẩn nội.

Máy quang phổ Biotech Epoch 2 bước sóng 410 nm.

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.2.1. Phương pháp chiết xuất, phân lập và xác định cấu trúc

2.2.1.1. Phương pháp chiết mẫu thực vật

Mẫu nghiên cứu được phơi khô tự nhiên, sau đó đem nghiền nhỏ và ngâm chiết với dung môi EtOH 80% ở nhiệt độ 55-60°C. Quá trình chiết được thực hiện lặp lại 3 lần. Gộp các dịch chiết và cất loại dung môi ở áp suất thấp để thu được cao chiết EtOH tổng. Tiếp đó, hòa lại cao chiết tổng bằng dung môi ethanol: H_2O (1:1) và chiết lần lượt với dung môi n-hexane và EtOAc. Cô cất chân không thu được các cao chiết tương ứng.

2.2.1.2. Phương pháp phân lập chất

Phương pháp sắc ký cột và sắc ký lớp mỏng được sử dụng để phân lập các chất.

• Phương pháp sắc ký cột (CC)

Phương pháp này được sử dụng để phân tách các cặn chiết từ đó phân lập được chất sạch. Có 2 pha là pha tĩnh và pha động. Với pha tĩnh, thông thường cột sẽ được nhồi các chất hấp phụ như silica gel dành cho pha thường, silica gel dành cho pha đảo, Sephadex LH – 20, ... Còn pha động là các dung

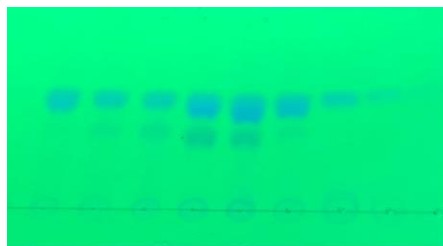
môi phân cực như dichloromethane, methanol, acetone, n-hexane, ethyl acetate, H₂O, ... Các chất sẽ ra khỏi cột lần lượt theo độ phân cực.



Hình 2. 2: Sắc ký cột

- *Sắc ký lớp mỏng (TLC)*

Sắc ký lớp mỏng hay còn gọi là sắc ký phẳng, phương pháp này sử dụng kỹ thuật phân bố 2 pha – pha rắn và pha lỏng để phân tách chất ra khỏi hỗn hợp các chất. Trong đó pha chuyển động (pha động) là phần chất lỏng – dung dịch cần phân tách được đưa vào sau đó đi qua chất hấp thụ trơ hay còn gọi là pha không chuyển động (pha tĩnh) như silicagel hay nhôm oxide. Phần chất hấp thụ đem tráng thành lớp mỏng sau đó được phủ lên trên nền phẳng như tấm nhôm, kính, hoặc plastic. Sắc ký lớp mỏng được dùng trong cả phân tích định tính và phân tích định lượng. Hệ số lưu R_f là đại lượng đặc trưng cho mức độ di chuyển của chất phân tích được tính bằng tỷ lệ giữa khoảng cách mà hợp chất di chuyển được và khoảng cách dung môi di chuyển.



Hình 2. 3: Sắc ký lớp mỏng

Hệ số di chuyển R_f là đại lượng đặc trưng quan trọng về mức độ tách, nó không phải là hằng số và chỉ có giá trị từ 0 đến 1, hệ số này còn tùy vào sử dụng dung môi nào và bản sắc ký nào.

Hiện nay có một số cải tiến có thể kết hợp với kỹ thuật truyền thống nhằm đơn giản hoá một vài thao tác và tăng khả năng dung giải của sắc ký lớp mỏng từ đó cho kết quả chuẩn xác hơn là phương pháp sắc ký lớp mỏng hiệu năng cao (high performance TLC - HPTLC).

2.2.1.3. Phương pháp xác định cấu trúc

Một trong những phương pháp hiện đại hiện nay để phân tích, xác định cấu trúc các hợp chất hoá học là sử dụng phổ NMR. Phương pháp này dựa trên nguyên tắc về sự cộng hưởng của các hạt nhân được đặt trong cùng một từ trường. Với phổ NMR, hằng số tương tác spin – spin J và độ dịch chuyển hoá học δ là hai thông số quan trọng có liên quan đến cấu trúc của một phân tử. Và sử dụng kết quả phân tích quang phổ giúp chúng ta xây dựng được cấu trúc phân tử của hợp chất đó. Cấu trúc hoá học của các hợp chất để xác định được thì cần phải sử dụng cùng lúc các phương pháp phổ khác nhau như phổ cộng hưởng từ hạt nhân một chiều ($^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$), phổ khối lượng (MS) và phổ cộng hưởng từ hạt nhân hai chiều (HSQC, HMBC, COSY, NOESY).

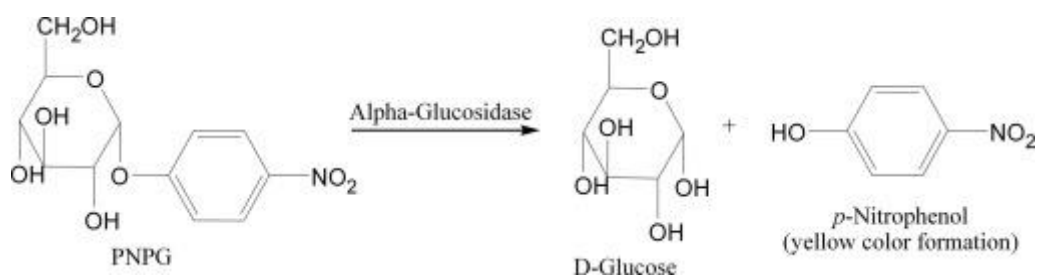
Các chất đã được phân lập và “làm sạch” bằng các phương pháp sắc ký sẽ được mang đi đo phổ NMR để xác định cấu trúc của các hợp chất. Trước hết, để biết các hợp chất đã đủ độ tinh khiết hay chưa thì cần được đem đi đo phổ proton $^1\text{H-NMR}$. Khi đã đạt về độ “sạch” thì sẽ được tiếp tục đo phổ cacbon $^{13}\text{C-NMR}$ và DEPT. Một số hợp chất có cấu trúc đơn giản và hay gặp thì có thể dễ dàng xác định ngay chỉ với phương pháp phổ cộng hưởng từ hạt nhân một chiều như $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ và DEPT. Ngược lại, với những hợp chất có cấu trúc phức tạp hơn thì phải sử dụng đến phương pháp phổ cộng hưởng từ hạt nhân hai chiều như HMBC, HSQC, NOESY, COSY để xác định được cấu trúc. Cuối cùng, khi đã xác định xong các cấu trúc thông qua các

phương pháp phổ thì có thể khẳng định công thức phân tử của các hợp chất bằng phổ MS hoặc phổ HRMS.

2.2.2. Phương pháp đánh giá hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase

2.2.2.1. Nguyên lí của phép thử

Dựa trên phản ứng phân cắt cơ chất *p*-Nitrophenyl- α -D-glucopyranoside dưới tác động của enzyme α - glucosidase, từ đó giải phóng sản phẩm màu vàng là *p*-Nitrophenol.



Ở bước sóng 410 nm, tiến hành đo độ hấp thụ của hỗn hợp tham gia phản ứng, thời điểm 30 phút sau phản ứng, cho kết quả về lượng sản phẩm *p*-Nitrophenol được sinh ra, từ đó phản ánh hoạt độ của enzyme α – glucosidase [41].

2.2.2.2. Thực nghiệm

Hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase được xác định bằng cách sử dụng đĩa 96 giếng với tổng thể tích phản ứng là 200 μ l/giếng. Mẫu thử được pha loãng với DMSO 100% hoặc nước cất vô trùng đến nồng độ phản ứng cuối cùng là 256; 64; 16; 4; 1 μ g/ml. Với chất tham khảo acarbose.

Các thành phần phản ứng như sau:

Phosphate buffer 100 mM pH 6,8	: 40 μ l
α -glucosidase 0,4 U/ml	: 25 μ l
Mẫu thử	: 10 μ l
<i>p</i> -nitrophenyl α -D-glucopyranoside 2,5 mM	: 25 μ l

Trong mẫu đối chứng, mẫu thử được thay thế bằng dung dịch đệm phản

ứng. Ủ thí nghiệm ở nhiệt độ 37° C. Dừng phản ứng lại bằng 100 µl Na₂CO₃ sau 30 phút. Sử dụng máy đo quang phổ có bước sóng 410 nm để đo độ hấp thụ của phản ứng.

Khả năng ức chế enzyme α- glucosidase của mẫu thử được xác định bằng công thức:

$$\% \text{ Ức chế enzyme} = (\text{OD}_{\text{chứng (+)}} - \text{OD}_{\text{mẫu thử}}) / (\text{OD}_{\text{chứng (+)}} - \text{OD}_{\text{chứng (-)}}) \times 100\%$$

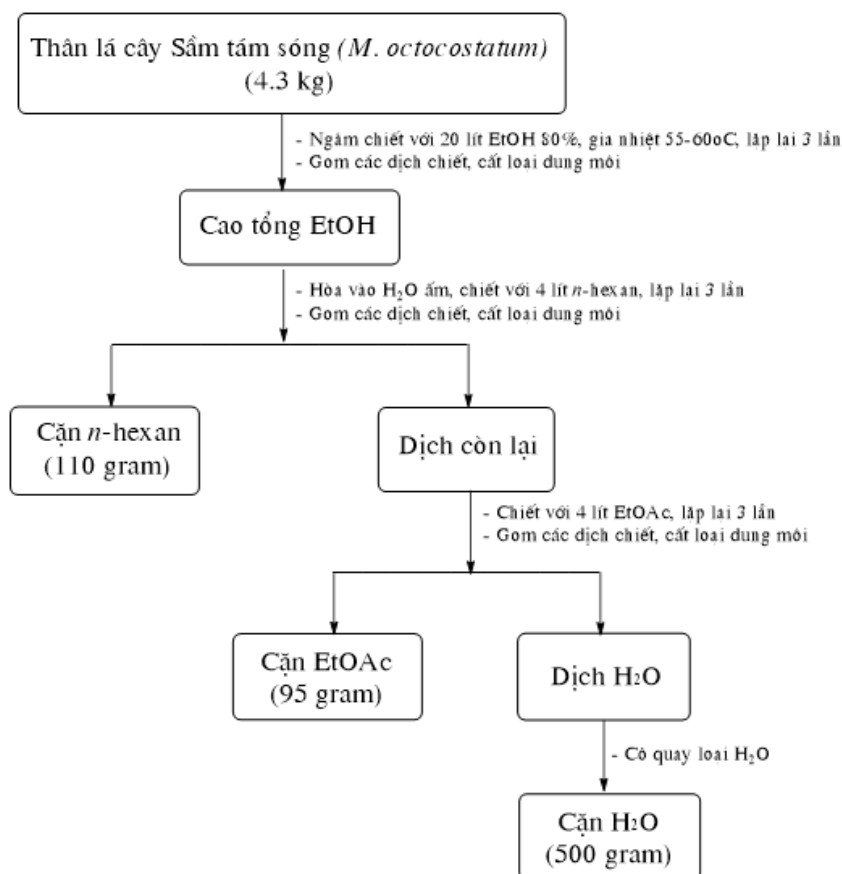
Được biết, IC₅₀ (half maximal inhibitory concentration) là nồng độ chất thử ức chế 50% hoạt động của enzyme α-glucosidase, được tính bằng phần mềm Tablecurve [41].

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. PHÂN LẬP VÀ XÁC ĐỊNH CẤU TRÚC CÁC HỢP CHẤT

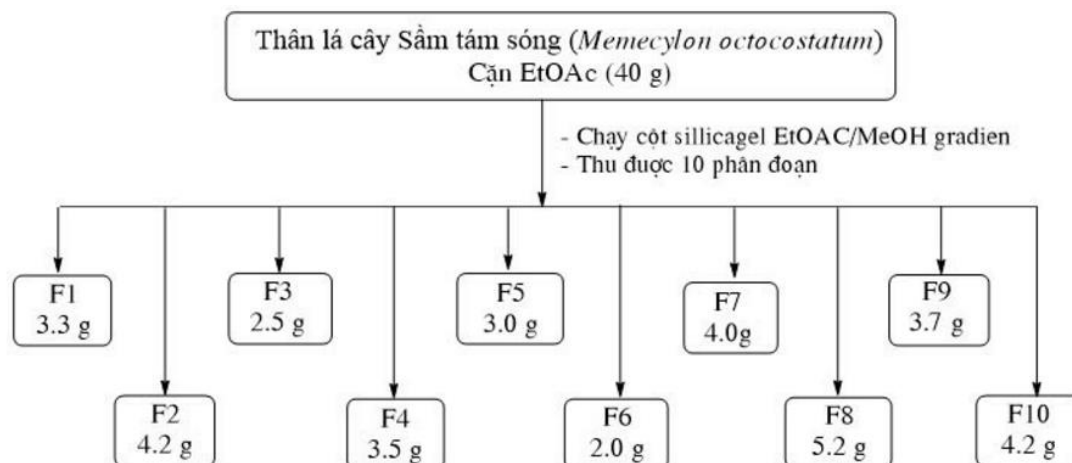
3.1.1. Quy trình ngâm chiết và phân lập chất sạch

Thân lá cây Sầm tám sóng sau khi thu hái, được để khô tự nhiên trong bóng mát cho khô tự nhiên. Mẫu được xay nhỏ (4,3 kg) và ngâm chiết với chiết với cồn EtOH 80%, gia nhiệt 55-60°C trong 8h. Quá trình chiết được lặp lại 3 lần. Dịch chiết EtOH tổng được gộp lại và quay cất loại dung môi dưới áp suất giảm thu được cao tổng EtOH. Hòa cao tổng EtOH vào nước ấm, chiết phân lớp lần lượt với *n*-hexane và EtOAc. Dung môi hữu cơ được cất loại bằng máy quay cất chân không, thu được các cặn chiết với khối lượng tương ứng là: *n*-hexane (110 g), EtOAc (95 g) và cặn nước (500 g). Quy trình ngâm và chiết mẫu thực vật được trình bày ở Sơ đồ 3.1.



Sơ đồ 3.1. Quy trình ngâm chiết mẫu thực vật

Cặn chiết EtOAc (40 g) được đưa lên cột silica gel, giải hấp gradient với hệ dung môi EtOAc/MeOH gradient thu được 10 phân đoạn (F1 – F10). Quá trình tạo các phân đoạn của cặn chiết này được trình bày ở **Sơ đồ 3.2**.



Sơ đồ 3. 2: Sơ đồ tạo các phân đoạn từ cặn chiết EtOAc

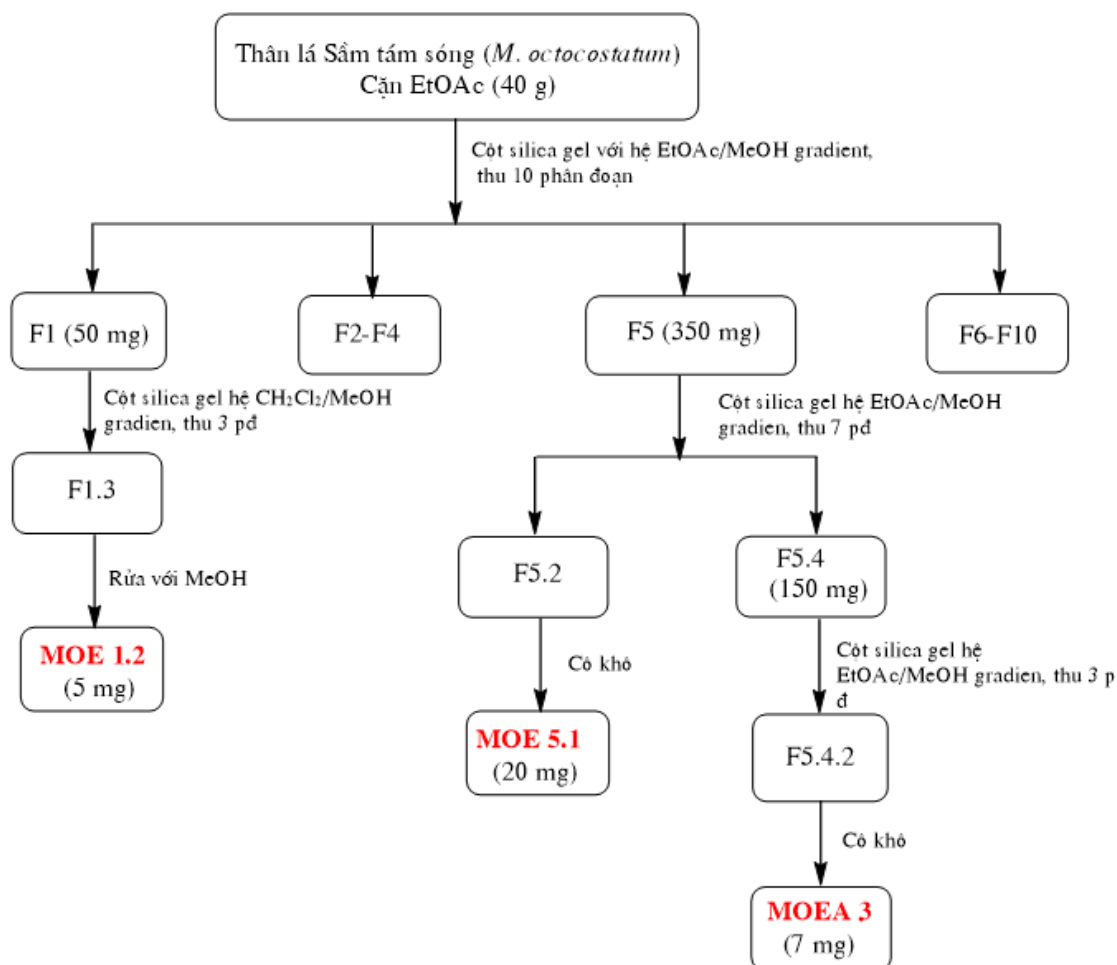
Bảng 3. 1: Khối lượng các phân đoạn của cặn EtOAc

Phân đoạn	Tỉ lệ hệ dung môi EtOAc/MeOH	Khối lượng (gram)
F1	100/0	3.3
F2	90/10	4.2
F3	80/20	2.5
F4	70/30	3.5
F5	60/40	3.0
F6	50/50	2.0
F7	40/60	4.0
F8	30/70	5.2
F9	20/80	3.7
F10	0/100	4.2

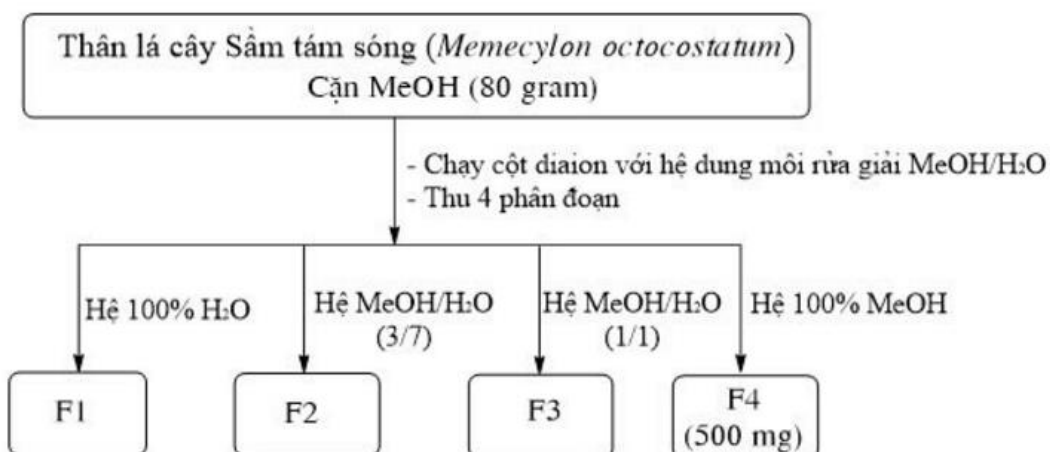
Phân đoạn F1 (50 mg) được tiếp tục tinh chế bằng cột silica gel với hệ dung môi $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ gradient thu được 3 phân đoạn (F1.1- F1.3). Phân đoạn E1.3 được rửa bằng MeOH (100%) thu được chất **MOE 1.2** (5 mg). Phân đoạn F5 (350 mg) được tinh chiết bằng cột silica gel với hệ dung môi EtOAc/MeOH gradient, thu được 7 phân đoạn (F5.1 - F5.7). Phân đoạn F5.2 cô khô thu được chất **MOE 5.1** (20 mg). Phân đoạn F5.4 (150 mg) được tinh chiết bằng cột silica gel với hệ dung môi EtOAc/MeOH gradient, thu được 3

phân đoạn (F5.4.1 - F5.4.3). Phân đoạn F5.4.2 cô khô thu được chất **MOEA 3** (7 mg). Quá trình phân lập các hợp chất từ cặn EtOAc được trình bày ở **Sơ đồ 3.3**.

3.3.

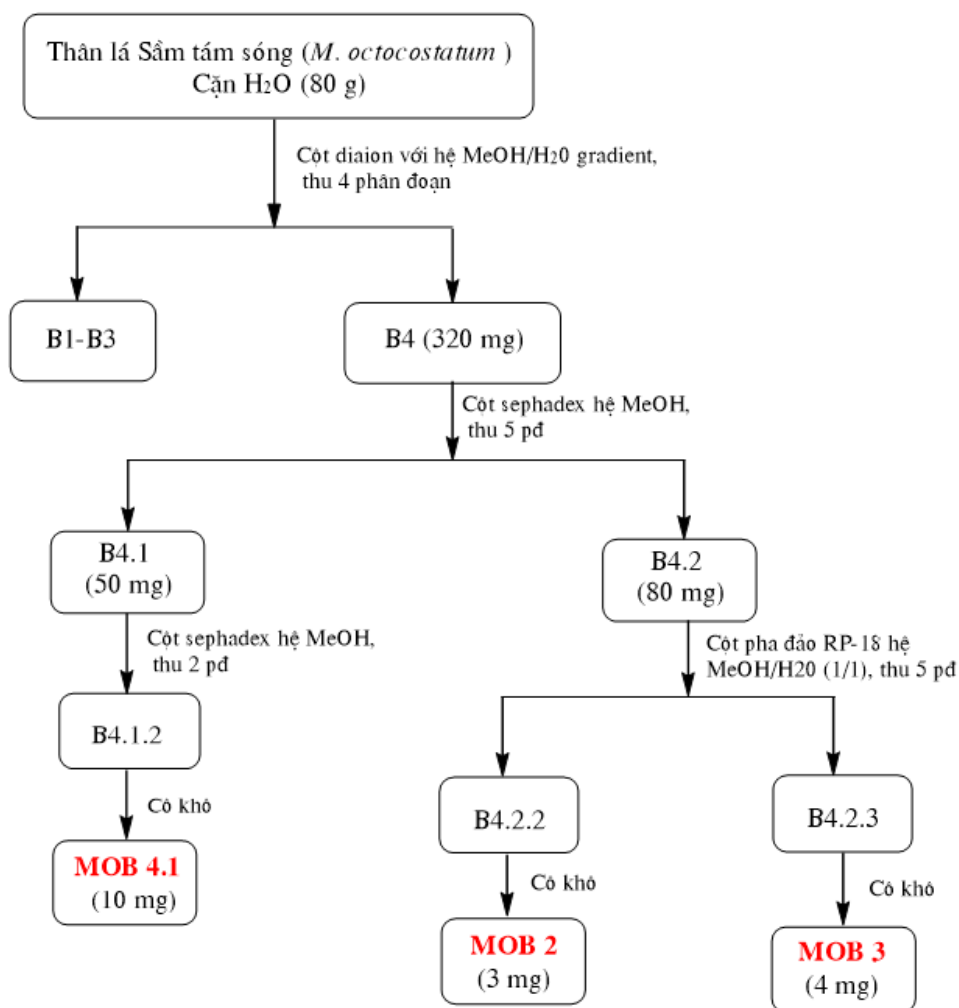


Sơ đồ 3. 3: Sơ đồ phân lập các hợp chất từ cặn EtOAc



Sơ đồ 3. 4: Sơ đồ tạo các phân đoạn từ cặn chiết MeOH

Cặn chiết nước (80 g) được đưa lên cột Diaion với rửa giải với hệ dung môi MeOH/H₂O (100% H₂O đến 100% MeOH) thu được 4 phân đoạn (B1-B4) ứng với hệ dung môi rửa giải như sau: B1 (100% H₂O), B2 (70% H₂O), B3 (50% MeOH), và B4 (100% MeOH). Quá trình tạo các phân đoạn của cặn chiết này được trình bày ở **Sơ đồ 3.4**.



Sơ đồ 3. 5: Sơ đồ phân lập các hợp chất từ cặn nước

Phân đoạn B4 (320 mg) được cho lên cột sephadex (MeOH) thu được 5 phân đoạn (B4.1 – B4.5). Phân đoạn B4.1 (50 mg) được tiến hành tinh chế lại bằng cột sephadex (MeOH) thu được 2 phân đoạn (B4.1.2- B4.1.2). Hợp chất **MOB 4.1** (10 mg) thu được từ phân đoạn B4.1.2. Phân đoạn B4.2 (80 mg) được tinh chế bằng cột pha đảo RP-18 với hệ dung môi (MeOH: H₂O, 1:1) thu được 5 phân đoạn nhỏ (B4.2.1-B4.2.5). Phân đoạn B4.2.2 cô khô thu được chất **MOB**

2 (3 mg). Phân đoạn B4.2.3 cô khô thu được hợp chất **MOB 3** (4 mg). Quá trình phân lập các hợp chất từ cặn nước được trình bày ở **Sơ đồ 3.5**.

3.1.2. Dữ liệu phổ các hợp chất phân lập được

3.1.2.1. Hợp chất MOB3 (3-O-methyl-3',4'-methylenedioxy ellagic acid 4-O-β-D-glucopyranoside)

Chất rắn màu trắng.

HR-ESI-MS: m/z 513,0620 $[M+Na]^+$ (tính toán lý thuyết cho $[C_{22}H_{18}O_{13}Na]^+$, m/z 513,0640)

1H -NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ (ppm) và ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 150 MHz) δ (ppm): Xem bảng 3.1

3.1.2.2. Hợp chất MOB2 (3,3'-di-O-methylellagic acid 4-O-β-D-glucopyranoside)

Chất rắn màu trắng.

HR-ESI-MS: m/z 515,0780 $[M+Na]^+$ (tính toán lý thuyết cho $[C_{22}H_{20}O_{13}Na]^+$, m/z 515,0796)

1H -NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ (ppm): 3,23-3,53 (5H, m, 1H, H-1''- H-6''a); 3,70 (1H, dd, $J= 12,0; 2,4$ Hz, H-6''b); 4,05 (3H, s, OCH₃), 4,09 (3H, s, OCH₃); 4,60 (1H, t, $J= 5,4$ Hz, OH); 5,08 (1H, d, $J= 5,4$ Hz, OH); 5,15 (1H, d, $J=7,5$ Hz, H-1''); 5,17 (1H, d, $J= 4,5$ Hz, OH); 5,48 (1H, br.s, OH), 7,53 (1H, s, H-5'); 7,82 (1H, s, H-5).

3.1.2.3. Hợp chất MOEA3 (3,4,3'-tri-O-methylellagic acid)

Chất rắn màu trắng

1H -NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ (ppm) và ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 150 MHz) δ (ppm): Xem bảng 3.2

3.1.2.4. Hợp chất MOE5.1 (daucosterol)

Chất rắn màu trắng.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD) δ (ppm): 0,71 (3H, s, CH_3 -18); 0,84 (3H, d, $J = 7,0$ Hz, CH_3 -27); 0,86 (3H, d, $J = 6,5$ Hz, CH_3 -26); 0,87 (3H, t, $J = 7,5$ Hz, CH_3 -29); 0,92 (3H, d, $J = 6,5$ Hz, CH_3 -21); 1,04 (3H, s, CH_3 -19); 3,62 (1H, m, H-3); 3,69 (1H, dd, $J = 5,0; 12,0$ Hz, H-6'a); 3,86 (1H, dd, $J = 2,5; 12,0$ Hz, H-6'b); 4,04 (1H, d, $J = 8,0$ Hz, H-1'); 5,38 (1H, d br, $J = 5,5$ Hz, H-6).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD , 150 MHz) δ_{C} (ppm): 12,3 (C-18), 12,3 (C-29), 19,3 (C-21), 19,4 (C-19), 19,8 (C-26), 20,2 (C-27), 22,1 (C-28), 24,1 (C-15), 25,2 (C-23), 27,1 (C-16), 29,2 (C-25), 30,3 (C-8), 30,6 (C-7), 32,9 (C-20), 33,1 (C-2), 34,9 (C-1), 37,2 (C-10), 37,4 (C-4), 38,4 (C-12), 39,6 (C-13); 47,1 (C-24), 51,5 (C-9), 57,3 (C-17), 58,0 (C-14), 62,7 (C-6'), 71,5 (C-4'), 74,9 (C-2'), 77,6 (C-5'), 77,9 (C-3'), 79,9 (C-3), 102,3 (C-1'), 122,7 (C-6), 141,7 (C-5).

3.1.2.5. Hợp chất MOB4.1 (3,4,5-trihydroxybenzoic acid)

Chất rắn màu trắng.

ESI-MS: m/z 171 $[\text{M}+\text{H}]^+$

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 600 MHz) δ (ppm): 7,06 (2H, s, H-2 + H-6)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD , 150 MHz) δ_{C} (ppm): 110,3 (C-2 + C-6), 122,5 (C-1), 139,4 (C-4), 146,4 (C-3 + C-5), 167,4 (C=O).

3.1.2.6. Hợp chất MOE1.2 (docosan-1-ol)

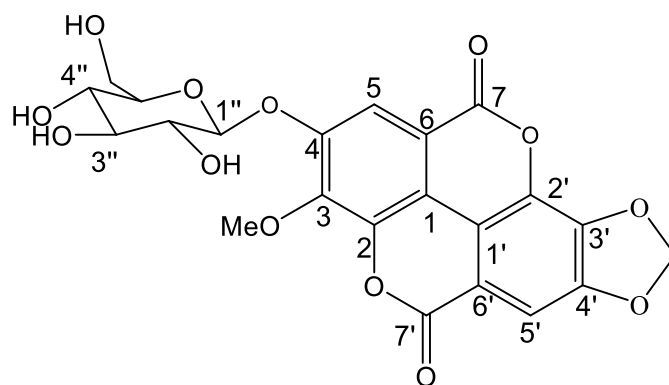
Chất dạng sáp.

ESI-MS: m/z 327 $[\text{M}+\text{H}]^+$

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz) δ (ppm): 0,88 (3H, t, $J = 7,2$ Hz, CH_3 -21); 1,56 (4H, m, 2 x CH_2); 1,28 (36H, m, 18 x CH_2); 3,64 (2H, m, CH_2 -1).

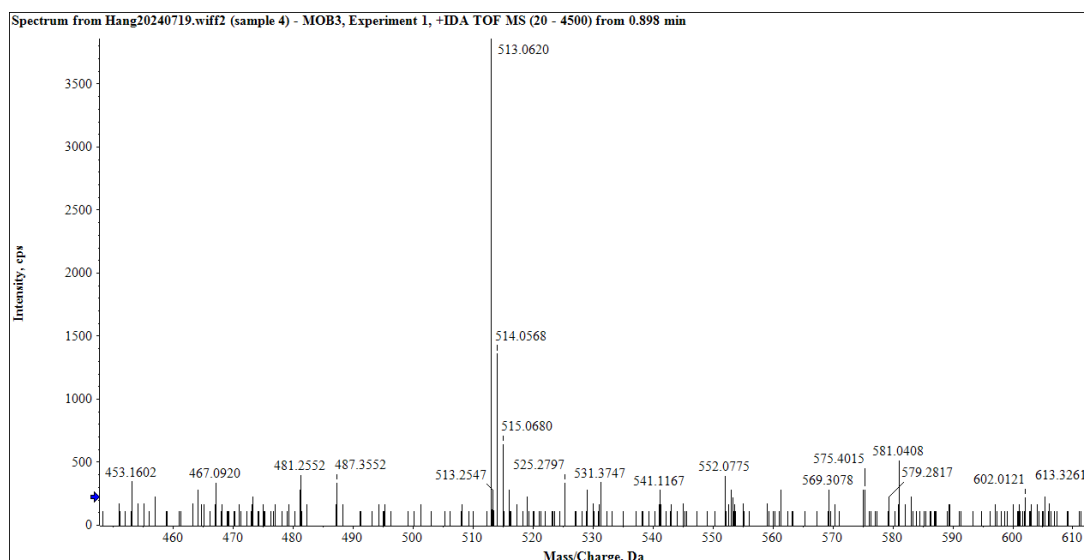
3.1.3. Cấu trúc của các hợp chất phân lập được

3.1.3.1. Hợp chất MOB3 (3-O-methyl-3',4'-methylenedioxy ellagic acid 4-O- β -D-glucopyranoside)

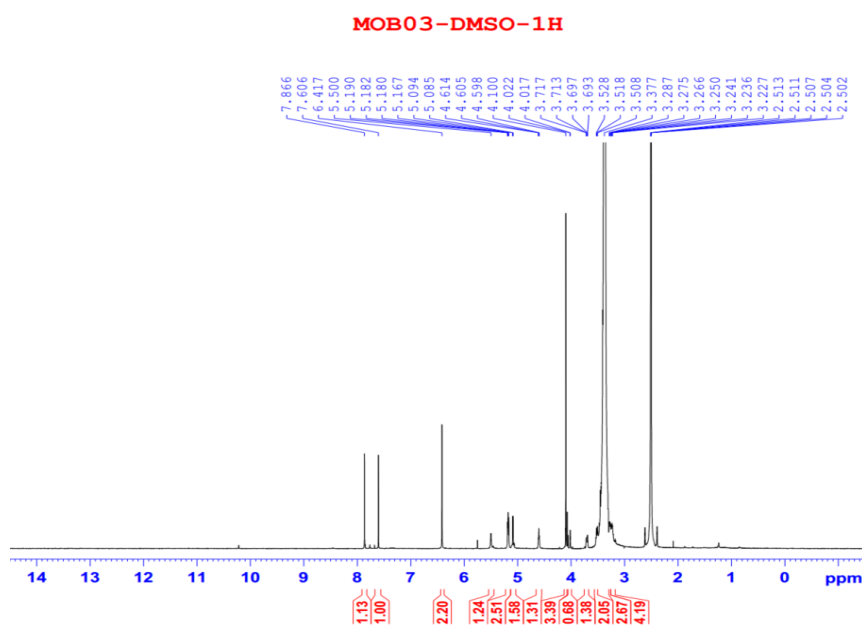


Hợp chất **MOB3** thu được dưới dạng bột màu trắng. Trên phổ khối phân giải cao HR-ESI-MS cho kết quả pic ion phân tử ở m/z 513,0620 $[M+Na]^+$ (sau tính toán cho kết quả công thức phân tử $[C_{22}H_{18}O_{13}Na]^+$, m/z 513,0640). Phổ ^{13}C -NMR cho phép xác định công thức phân tử của **MOB3** là $C_{22}H_{18}O_{13}$. Trên phổ 1H -NMR của hợp chất **MOB3**, cho tín hiệu của 1 nhóm methoxy ở δ_H 4,10 (s, 3H, 3-OCH₃) và tín hiệu của 2 proton vòng thơm ở δ_H 7,61 (s, 1H, H-5'); 7,87 (s, 1H, H-5), 1 nhóm dioxymethylene ở δ_H 6,42 (s, 2H, -OCH₂O-). Ngoài ra, trên phổ 1H -NMR còn xuất hiện tín hiệu của 1 proton anomeric tại δ_H 5,17 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H, H-1'') cùng các tín hiệu proton của một phân tử đường glucopyranose nằm trong khoảng δ_H 3,23-3,70.

Phổ ^{13}C -NMR và HSQC cho phép xác định tín hiệu của 22 nguyên tử carbon bao gồm 1 nhóm methoxy ở δ_C 61,7 (3-OCH₃), 1 nhóm dioxymethylene ở δ_C 104,4 (-OCH₂O-), 2 nhóm carbonyl ở δ_C 157,6 (C-7); 158,3 (C-7'), 2 nhóm methin ở δ_C 104,1 (C-5'), 112,4 (C-5), 10 carbon sp^2 không liên kết trực tiếp với hydro và 6 carbon thuộc phân tử đường glucopyranose. Proton anomeric H-1'' tại δ_H 5,17 cho hằng số tương tác lớn ($J = 7,8$ Hz) cho phép xác định phân tử đường là β -glucopyranose. Những dữ liệu phổ trên cho phép xác định hợp chất **MOB3** là dẫn xuất ellagic acid glucoside. Giả thiết này được khẳng định nhờ phân tích phổ 2D-NMR, đặc biệt là phổ HMBC.



Hình 3. 1: Phổ HR-ESI-MS của hợp chất MOB3



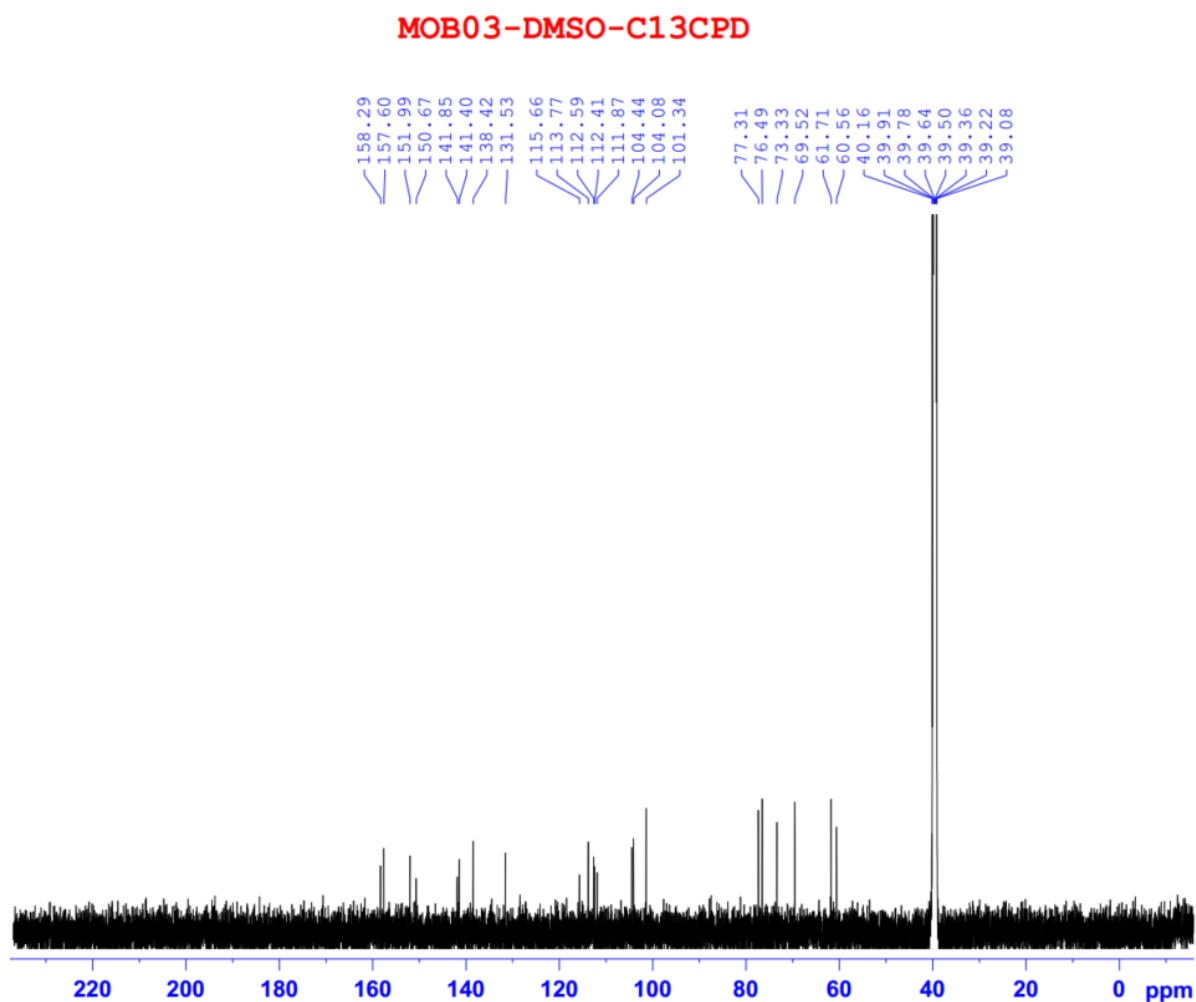
Hình 3. 2: Phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất MOB3

Bảng 3. 2: Số liệu phổ NMR của hợp chất MOB3 và hợp chất tham khảo

C	Hợp chất MOB3		3-O-methyl-3',4'-methyleneedioxy ellagic acid 4-O- β -D-glucopyranoside
	$\delta_C^{a,b}$	δ_H (độ bội, $J = \text{Hz}$) ^{a,c}	$\delta_C^{(d, \#)}$
1	113,8	-	114,5
2	141,8	-	142,3
3	141,9	-	142,9
4	152,0	-	152,8

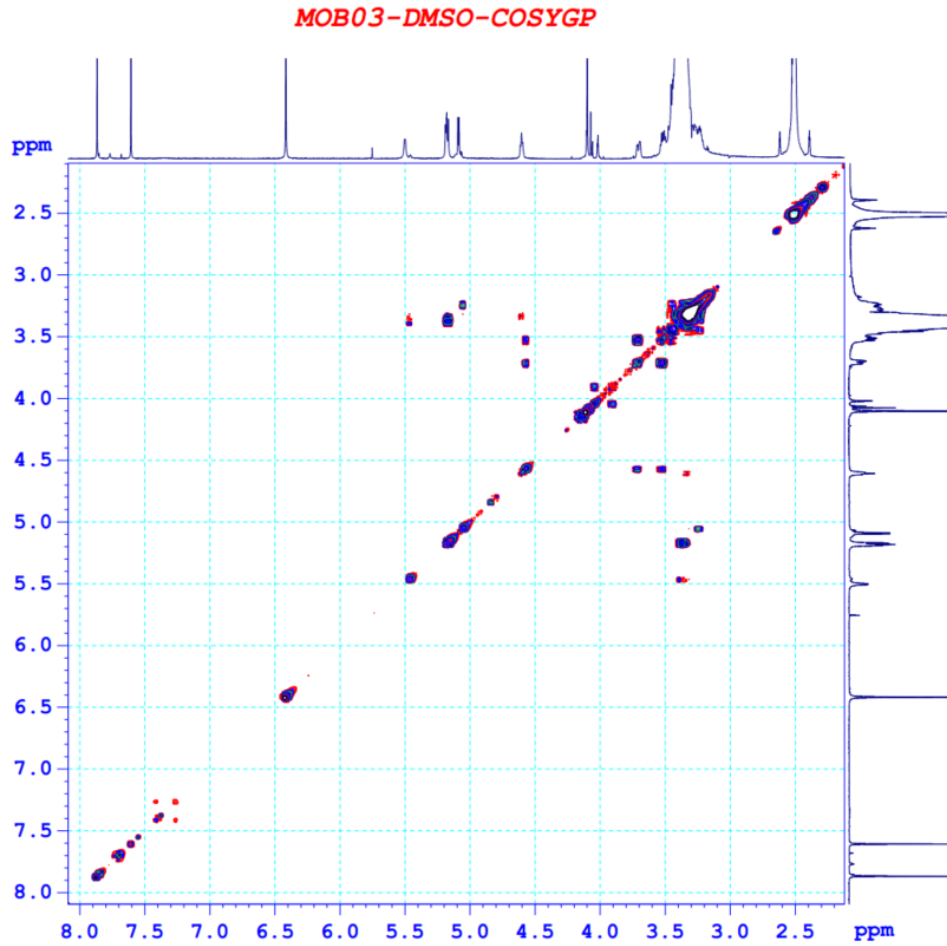
5	112,4	7,87 (s)	113,5
6	111,9	-	112,3
7	157,6	-	158,4
1'	115,7	-	116,2
2'	141,4	-	142,4
3'	138,4	-	139,3
4'	150,7	-	151,6
5'	104,1	7,61 (s)	104,7
6'	112,6	-	112,7
7'	158,3	-	159,1
1''	101,3	5,17 (d, $J=7,8$ Hz)	102,4
2''	73,3	3,39 (m)	74,2
3''	76,5	3,35 (m)	77,3
4''	69,5	3,23 (m)	70,3
5''	77,3	3,43 (m)	78,0
6''	60,6	3,52 (dd, $J=12,0; 6,0$ Hz) 3,70 (dd, $J=12,0; 2,4$ Hz)	61,5
OCH ₃	61,7	4,10 (s)	62,2
-OCH ₂ O-	104,4	6,42 (d, $J=8,5$ Hz)	105,2
OH		4,61 (t, $J=5,4$ Hz)	
OH		5,09 (d, $J=5,4$ Hz)	
OH		5,18 (d, $J=4,8$ Hz)	
OH		5,50 (br. s)	

^aĐo trong DMSO-*d*₆, ^b150 MHz, ^c600 MHz, ^dđo trong CD₃OD, 125 MHz, ^e[42]

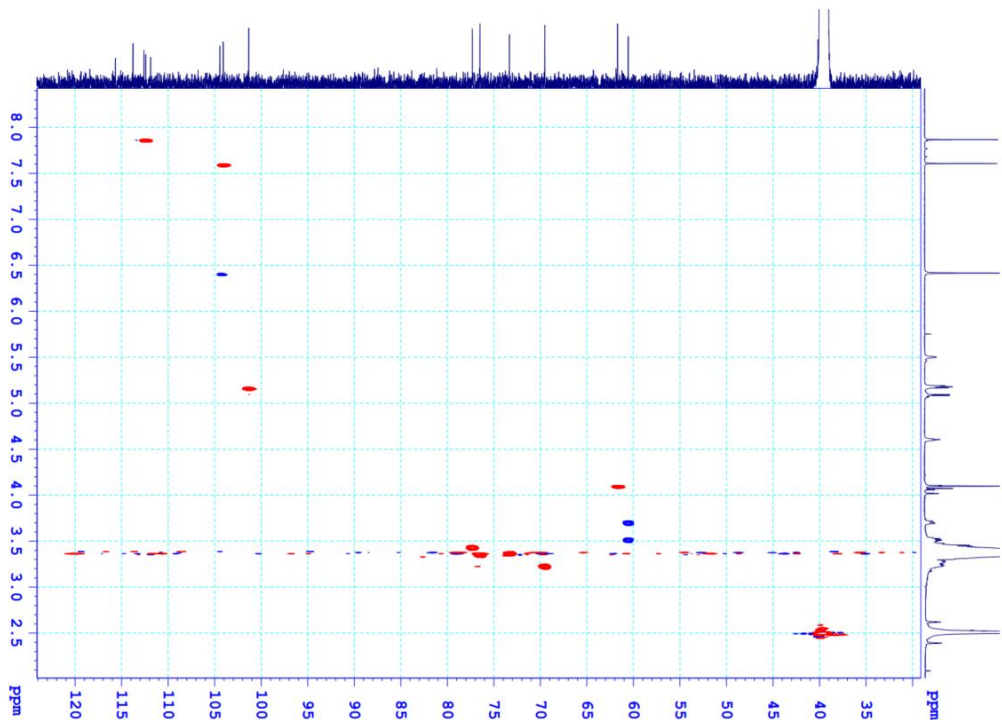


Hình 3. 3: Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất MOB3

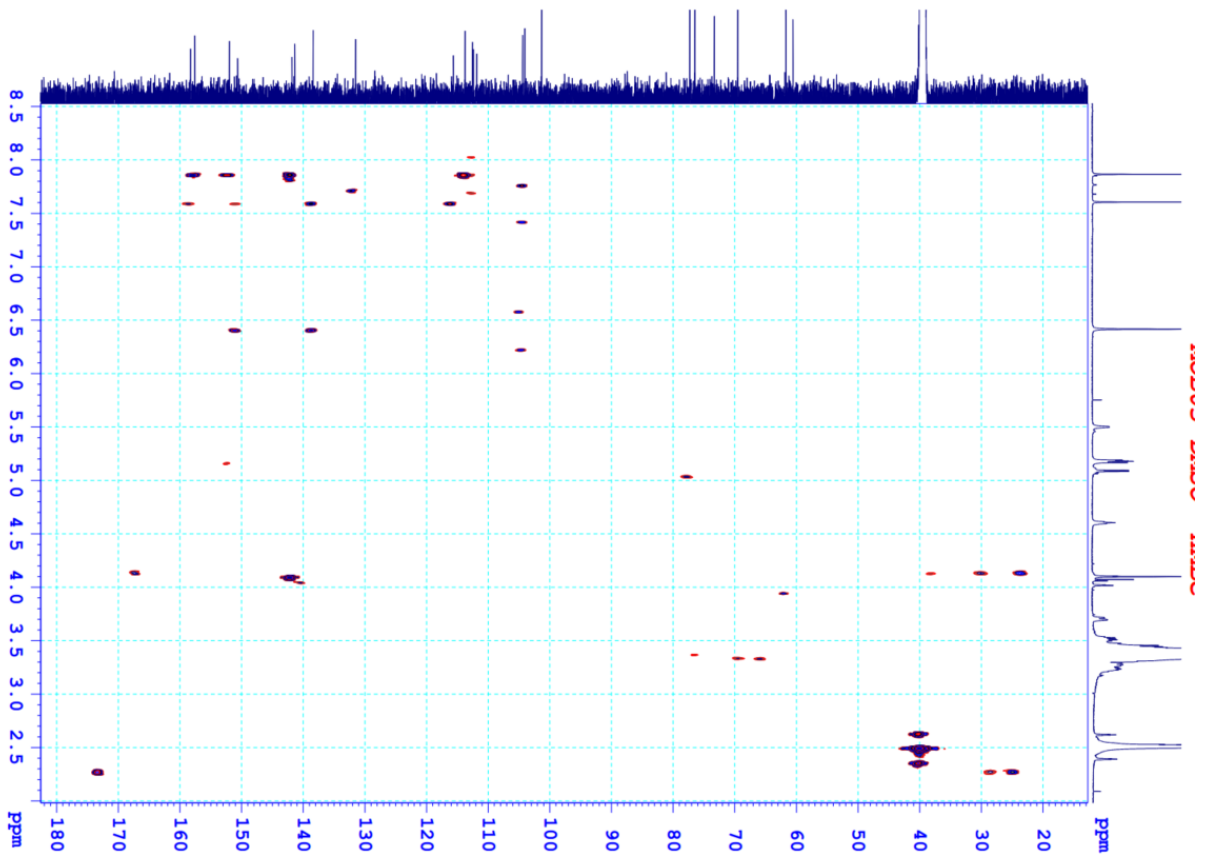
Trên phổ COSY cho thấy tín hiệu của 1 hệ tương tác spin-spin của phân tử đường β -glucopyranose (Hình 3.7). Trên phổ HMBC cho thấy tương tác xa giữa proton của nhóm dioxymethylene với C-3' (δ_{C} 138,4) và C-4' (δ_{C} 150,7) cho phép xác định chúng gắn ở vị trí C-3' và C-4'. Proton của nhóm methoxy tương tác với carbon C-3 (δ_{C} 141,9) trên phổ HMBC cho phép xác định nhóm methoxy này gắn ở vị trí C-3. Tương tác giữa proton anomeric H-1'' tại δ_{H} 5,17 với C-4 (δ_{C} 160,0) trên phổ HMBC cho phép xác định phân tử đường β -glucopyranose gắn với khung ellagic acid ở vị trí C-4 (Hình 4.7).



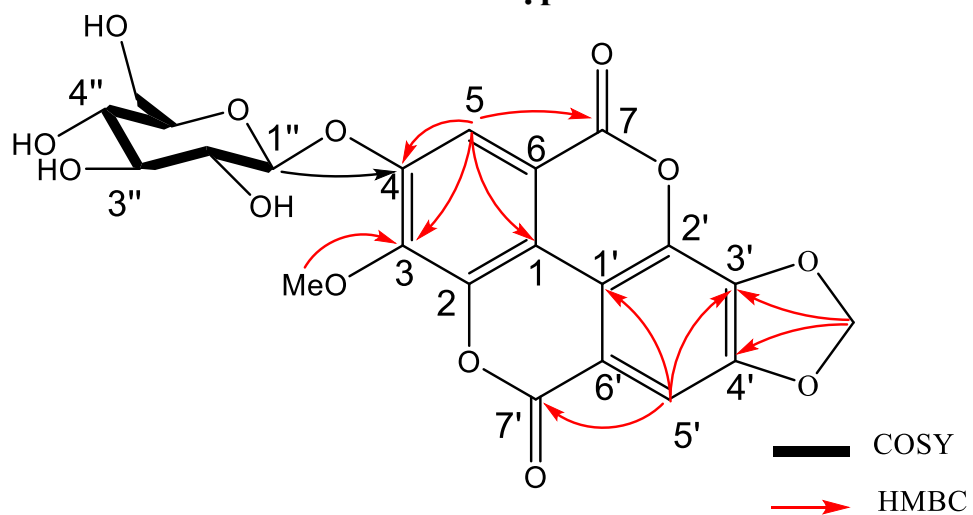
Hình 3. 4: Phổ COSY của hợp chất MOB3



Hình 3. 5: Phổ HSQC của hợp chất MOB3



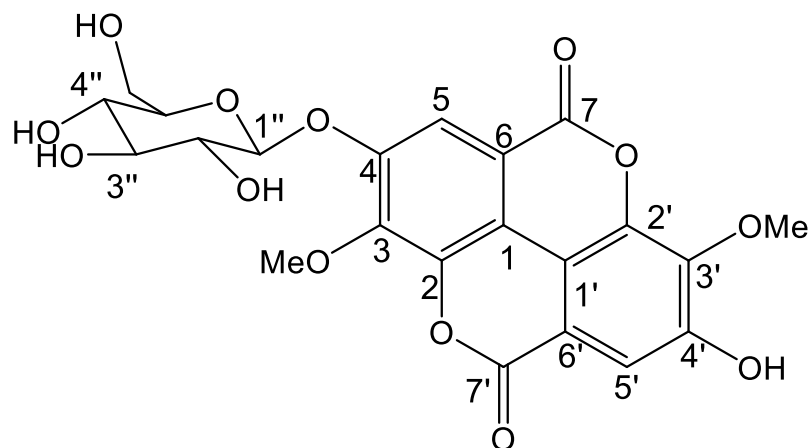
Hình 3. 6: Phổ HMBC của hợp chất MOB3



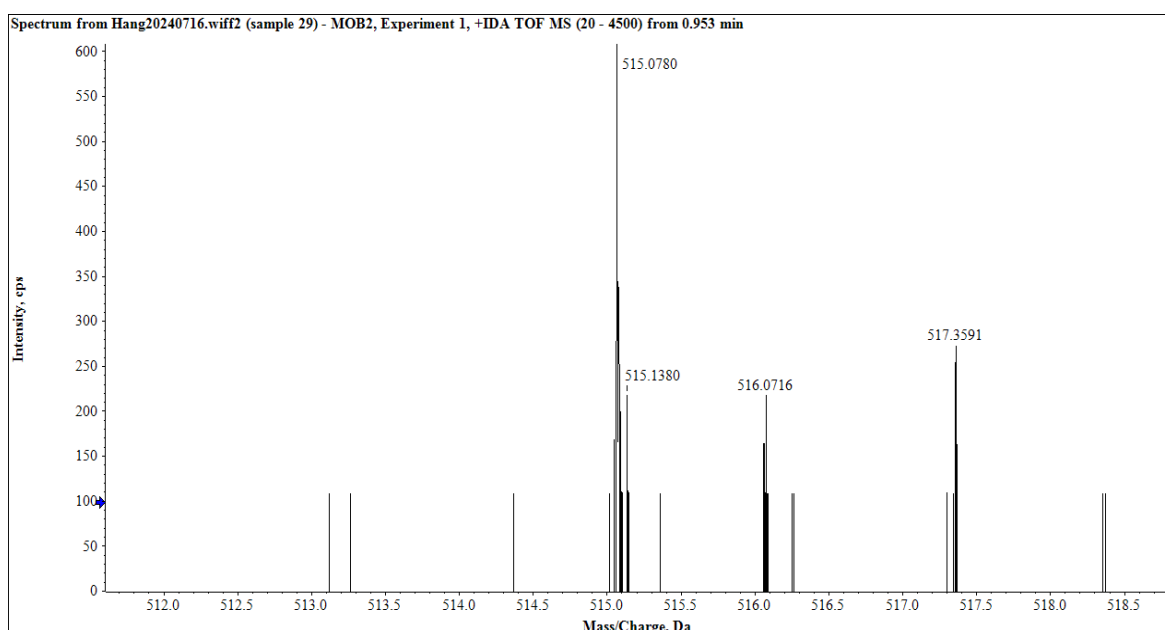
Hình 3. 7: Một số tương tác chính trên phổ HMBC và COSY của hợp chất MOB3

Kết hợp với các dữ liệu phân tích phổ HR-ESI-MS, 1D-NMR, 2D-NMR và đối chứng với tài liệu tham khảo [42, 43] xác định được hợp chất **MOB3** là 3-O-methyl-3',4'-methylenedioxy ellagic acid 4-O- β -D-glucopyranoside.

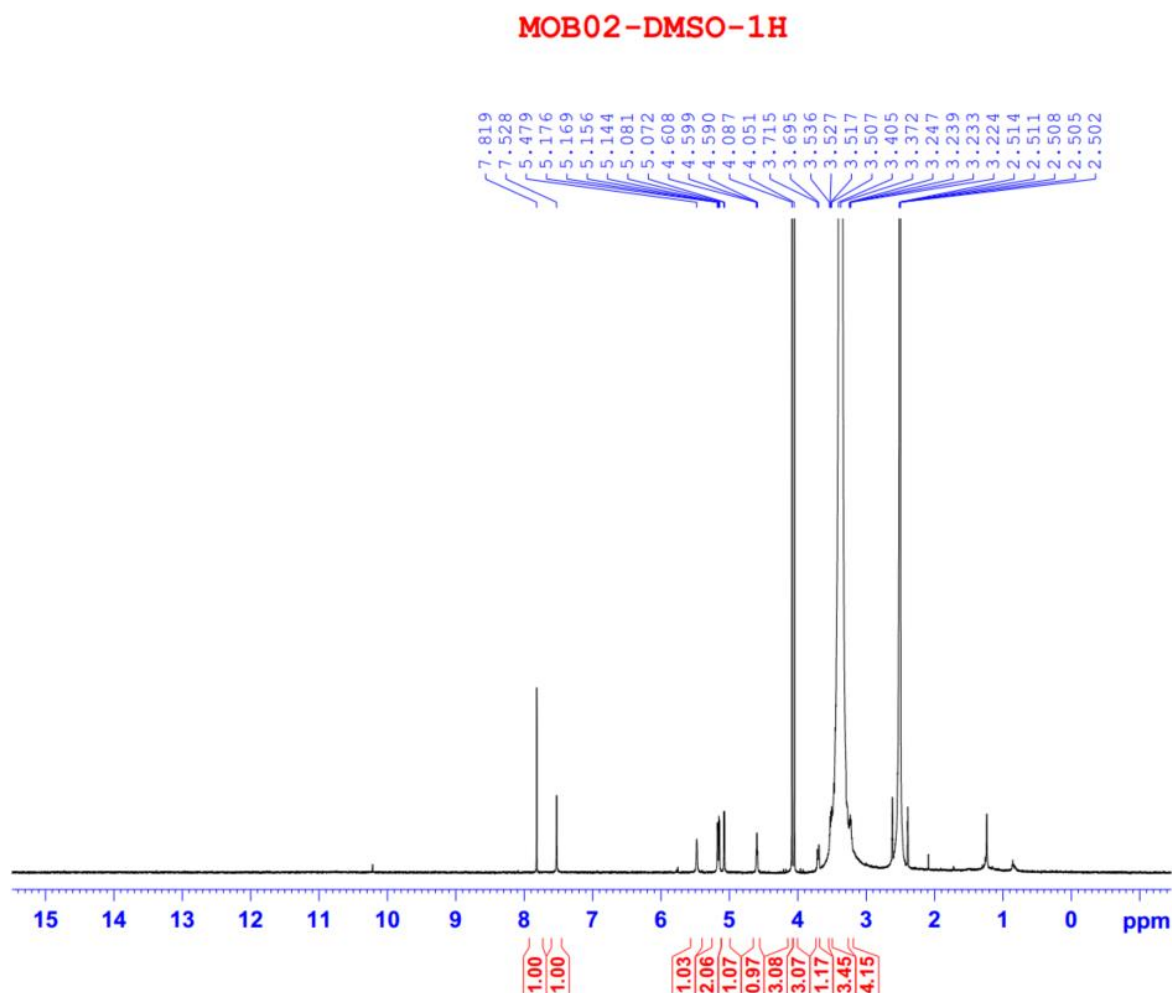
3.1.3.2. Hợp chất MOB2 (3,3'-di-O-methylellagic acid 4-O- β -D-glucopyranoside)



Hợp chất **MOB2** thu được dưới dạng chất rắn có màu trắng. Trên phổ khối phân giải cao HR-ESI-MS hiện kết quả pic ion phân tử ở m/z 515,0780 $[M+Na]^+$ (kết quả tính toán cho công thức phân tử $[C_{22}H_{20}O_{13}Na]^+$, m/z 515,0796). Phổ 1H -NMR của hợp chất **MOB2** có sự tương đồng lớn với hợp chất **MOB3** nhưng khác là thấy mất đi tín hiệu của 1 nhóm dioxymethylene, thay vào đó là 1 nhóm methoxy.



Hình 3. 8: Phổ HR-ESI-MS của hợp chất MOB2

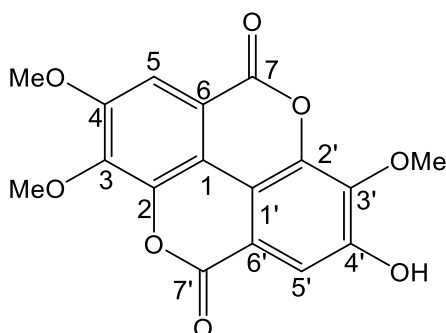


Hình 3. 9: Phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất MOB2

Phân tích phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất **MOB2** cho thấy tín hiệu của 2 nhóm methoxy ở δ_{H} 4,05 (3H, s, OCH_3), 4,09 (3H, s, OCH_3), 2 proton vòng thơm ở δ_{H} 7,53 (1H, s, H-5'); 7,82 (1H, s, H-5), 1 proton anomeric tại δ_{H} 5,15 (1H, d, $J = 7,5$ Hz, H-1'') và các nhóm oxymethine, oxymethylene của đường glucopyranose nằm trong khoảng δ_{H} 3,23-3,70.

Từ các dữ liệu phổ HR-ESI-MS, $^1\text{H-NMR}$ và đối chứng với tài liệu tham khảo [44] cho phép xác định hợp chất **MOB2** là 3,3'-di-*O*-methylellagic acid 4-*O*- β -D-glucopyranoside.

3.1.3.3. Hợp chất MOEA3 (3,4,3'-tri-*O*-methylellagic acid)



Hợp chất **MOEA3** thu được dưới dạng chất rắn màu trắng. Phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất **MOEA3** có sự tương đồng lớn với hợp chất **MOB2** nhưng khác là thấy mất đi tín hiệu của phân tử đường glucopyranose thay vào đó là 1 nhóm methoxy.

Phân tích dữ liệu phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất **MOEA3** cho tín hiệu của 3 nhóm methoxy ở δ_{H} 3,99 (3H, s, 4-OCH₃); 4,04 (3H, s, 3-OCH₃); 4,06 (3H, s, 3'-OCH₃), 2 proton vòng thơm ở δ_{H} 7,53 (1H, s, H-5'); 7,61 (1H, s, H-5).

Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ cho phép xác định tín hiệu của 17 nguyên tử carbon bao gồm 3 nhóm methoxy ở δ_{C} 56,7 (4-OCH₃); 61,0 (3'-OCH₃); 61,3 (3-OCH₃), 2 nhóm carbonyl ở δ_{C} 158,3 (C-7); 158,4 (C-7'), 2 nhóm methin sp^2 ở δ_{C} 107,5 (C-5); 111,1 (C-5') và 10 carbon sp^2 không liên kết trực tiếp với hydro.

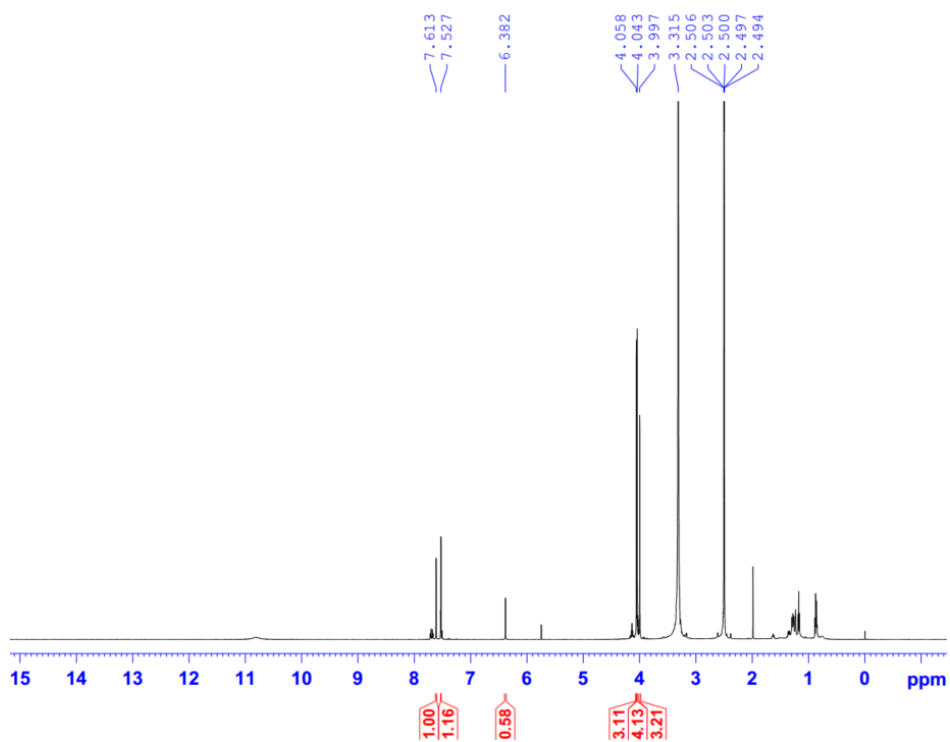
Trên phổ HMBC cho thấy tương tác xa giữa H-5 với C-3/C-4/C-6/C-1 và tương tác xa giữa H-5' với C-3'/C-4'/C-6'/C-1'. Tương tác giữa proton của nhóm methoxy ở 3,99 (3H, s, 4-OCH₃); 4,04 (3H, s, 3-OCH₃); 4,06 (3H, s, 3'-OCH₃) lần lượt với 153,8 (C-4), 140,8 (C-3), 140,2 (C-3') cho phép xác định 3 nhóm methoxy này gắn lần lượt với C-4, C-3 và C-3'.

Bảng 3. 3: Số liệu phổ NMR của hợp chất MOEA3 và hợp chất tham khảo

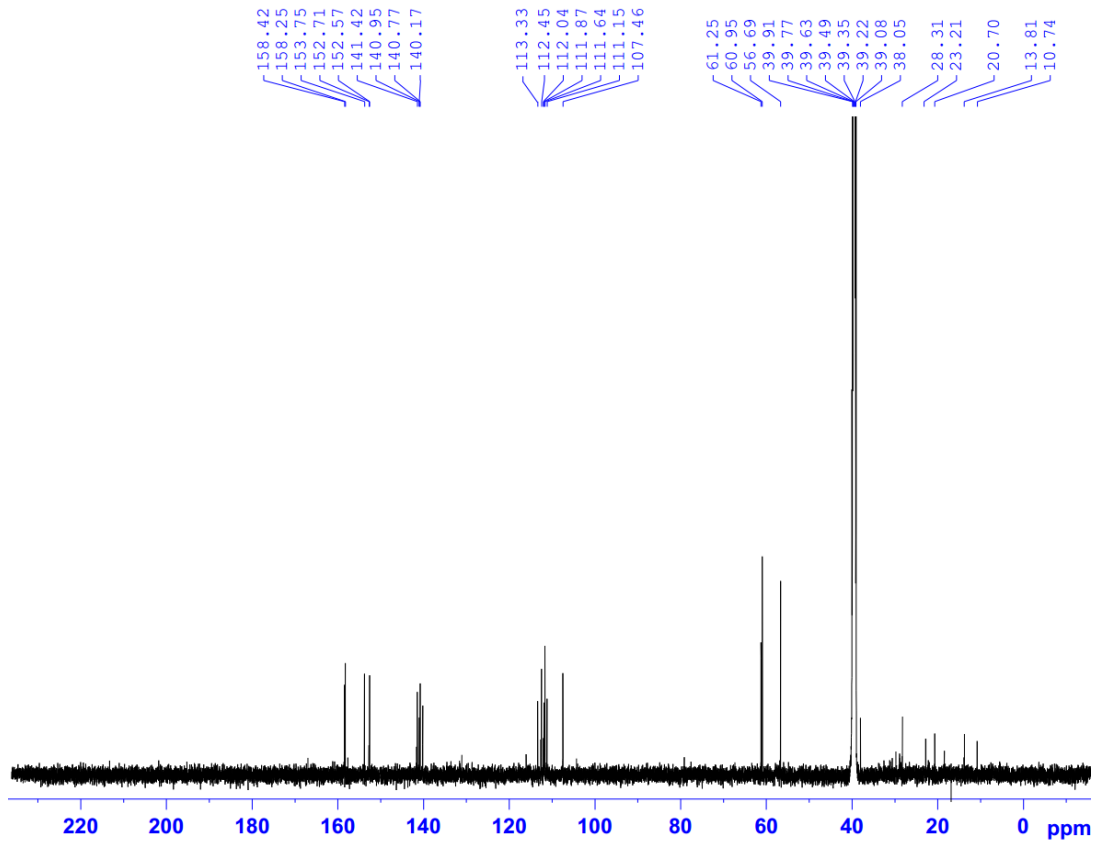
C	Hợp chất MOB3		<i>3,4,3'-tri-O-methylellagic acid</i>
	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}}$	δ_{H} (độ bội, $J = \text{Hz}$) ^{a,c}	$\delta_{\text{C}}^{\text{(a,b,#)}}$
1	112,5	-	111,9
2	141,4	-	141,5

3	140,8	-	140,8
4	153,8	-	153,4
5	107,5	7,61 (s)	107,5
6	113,3	-	113,6
7	158,3	-	158,6
1'	111,6	-	110,7
2'	140,9	-	141,0
3'	140,2	-	140,4
4'	152,6	-	153,7
5'	111,1	7,53 (s)	111,8
6'	111,9	-	112,5
7'	158,4	-	158,4
3-OCH ₃	61,3	4,04 (s)	61,3
4-OCH ₃	56,7	3,99 (s)	56,7
3'-OCH ₃	61,0	4,06 (s)	60,9

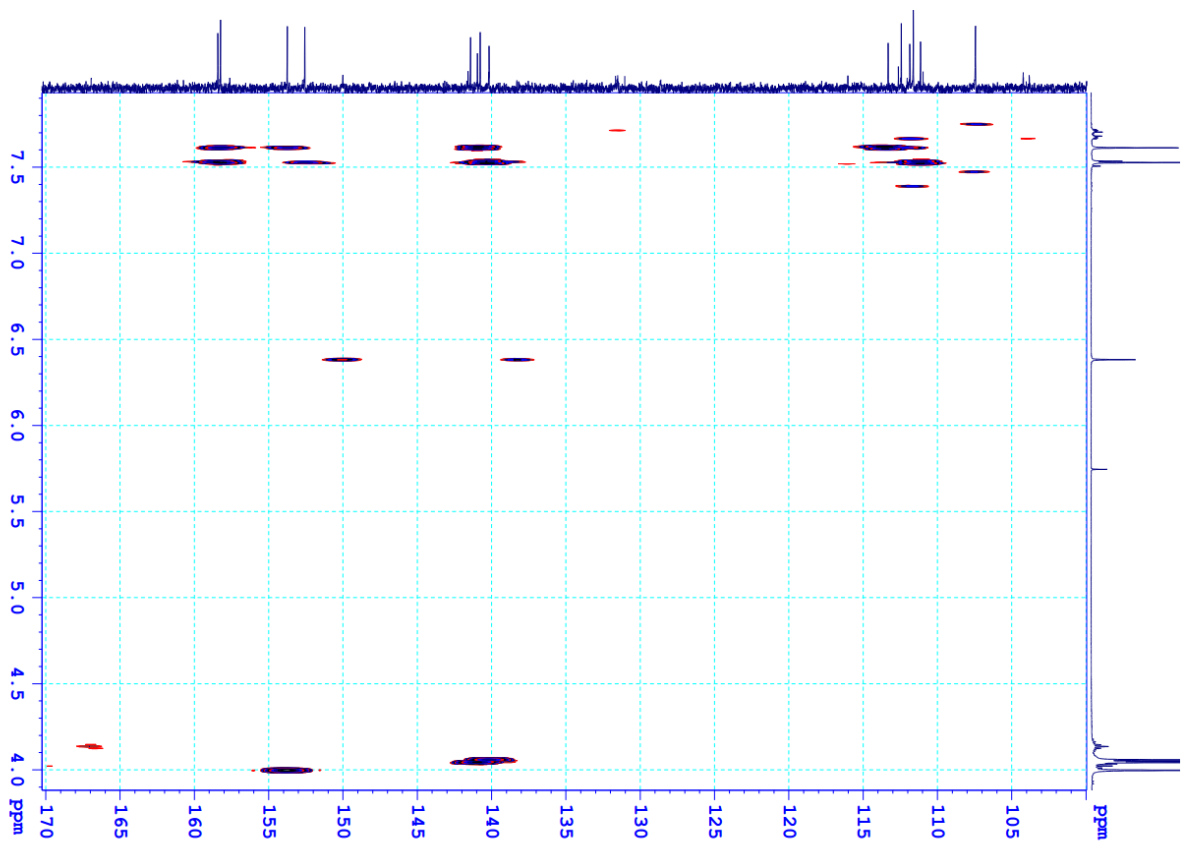
^aĐo trong DMSO-d₆, ^b150 MHz, ^c600 MHz, ^d[45]



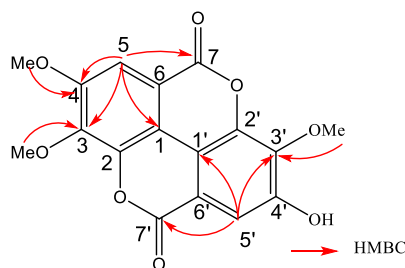
Hình 3. 10: Phổ ¹H-NMR của hợp chất MOEA3



Hình 3. 11: Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ của hợp chất MOEA3



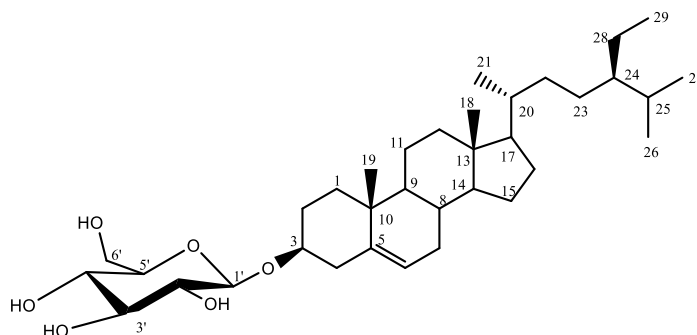
Hình 3. 12: Phổ HMBC giãn rộng của hợp chất MOEA3



Hình 3. 13: Một số tương tác chính trên phổ HMBC của hợp chất MOEA3

Từ các dữ liệu phổ $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ và HMBC và đối chứng với tài liệu tham khảo [45] xác định được hợp chất **MOEA3** là 3,4,3'-tri-O-methylellagic acid.

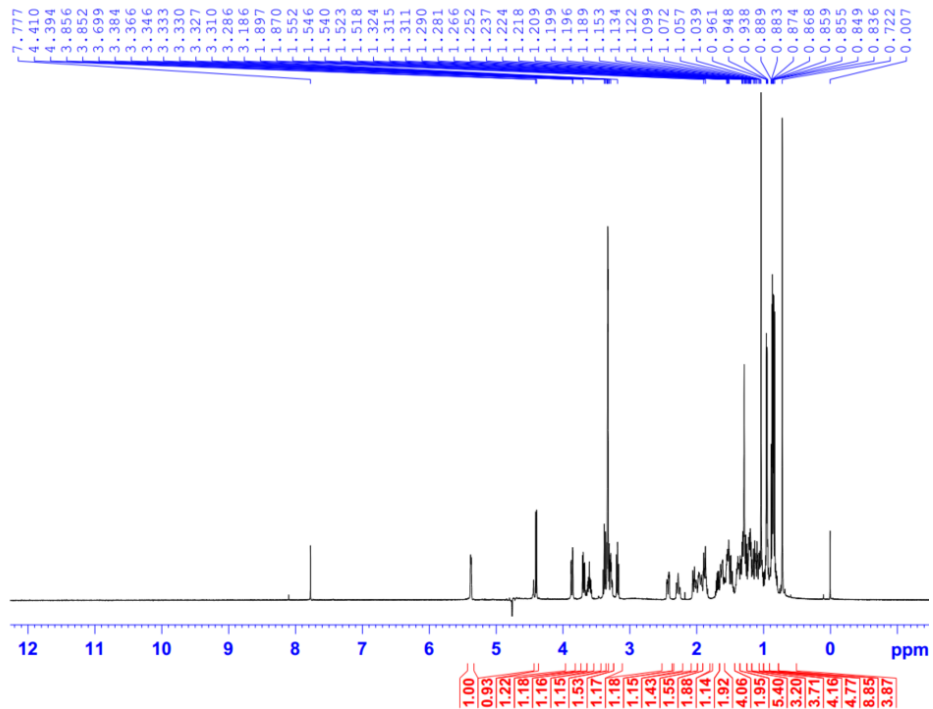
3.1.3.4. Hợp chất MOE5.1 (daucosterol)



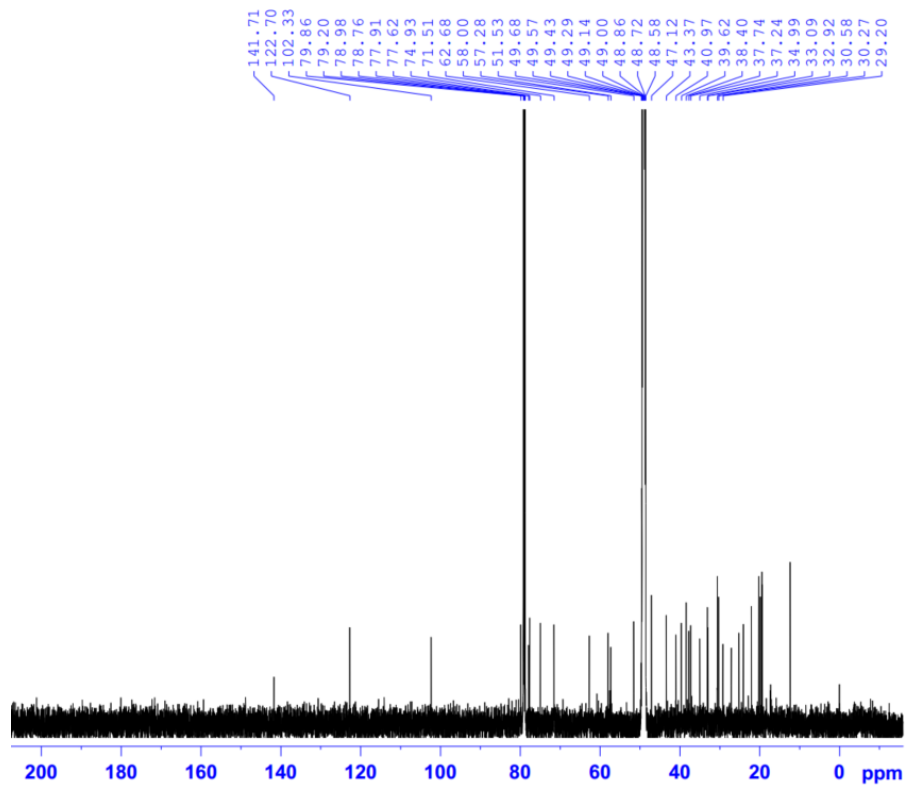
Chất **MOE5.1** được phân lập dưới dạng chất rắn màu trắng. Phổ $^1\text{H NMR}$ có tín hiệu cộng hưởng của 6 nhóm methyl ở δ_{H} 0,71 (3H, s, CH_3 -18); 0,84 (3H, d, $J = 7,0$ Hz, CH_3 -27); 0,86 (3H, d, $J = 6,5$ Hz, CH_3 -26); 0,87 (3H, t, $J = 7,5$ Hz, CH_3 -29); 0,92 (3H, d, $J = 6,5$ Hz, CH_3 -21); 1,04 (3H, s, CH_3 -19). Tín hiệu của 1 proton methine sp^2 ở δ_{H} 5,38 (1H, d br, $J = 5,5$ Hz, H-6) và các nhóm oxymethin, oxymethylene của một phân tử đường glucopyranose xuất hiện trong khoảng 3,17 đến 3,88 cũng được quan sát thấy trên phổ $^1\text{H NMR}$. Proton anomer của phân tử đường glucopyranose được quan sát thấy ở δ_{H} 4,04 (1H, d, $J = 8,0$ Hz, H-1'), với hằng số tương tác lớn ($J = 8,0$ Hz) xác định được phân tử đường là β -glucopyranoside.

Phổ $^{13}\text{C NMR}$ và HSQC cho phép xác định tín hiệu của 35 nguyên tử carbon bao gồm có một liên kết đôi tại δ_{C} 122,7 (C-6), 141,7 (C-5), 6 nhóm oxymethin, một nhóm oxymethylene, 7 nhóm methin, 11 nhóm methylene, 6

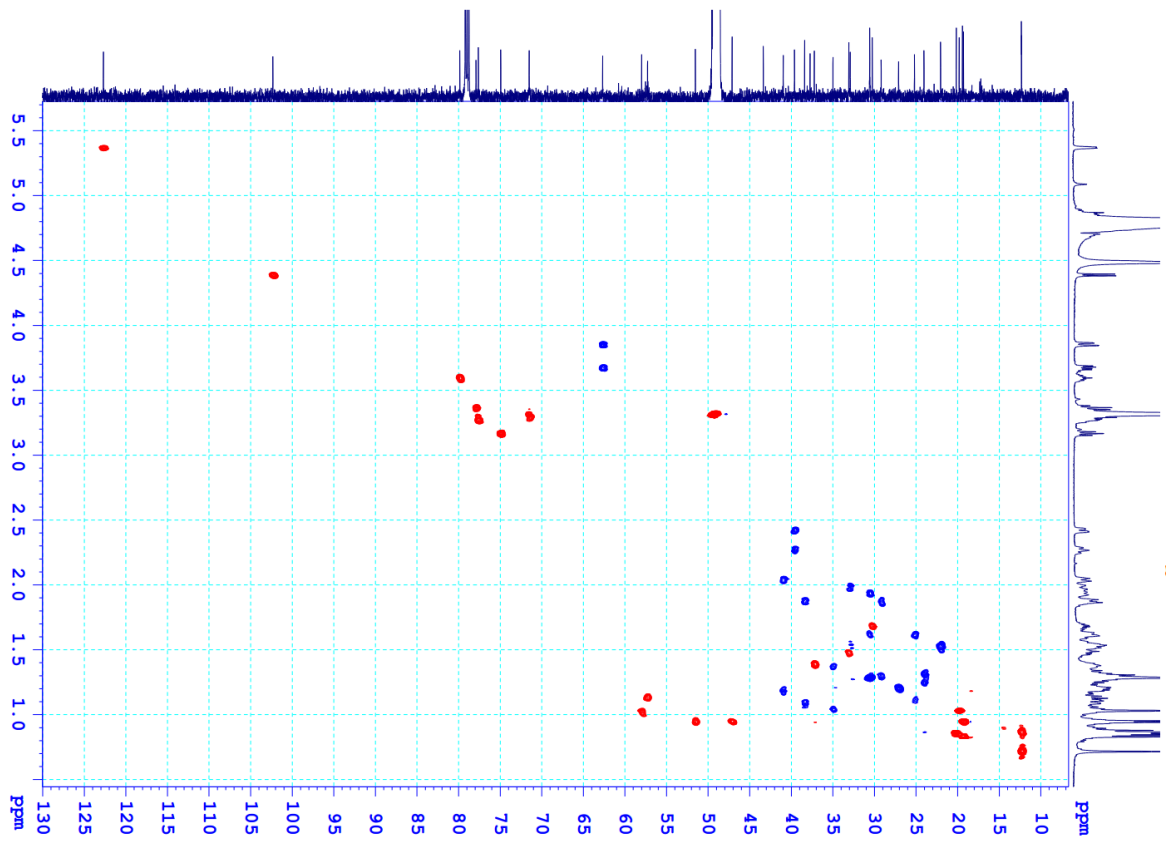
nhóm methyl và 2 carbon không liên kết trực tiếp với hydro. Các dữ liệu phổ ^1H NMR và ^{13}C NMR của hợp chất **MOE5.1** trùng khớp với hợp chất daucosterol và được khẳng định bằng phổ HMBC.



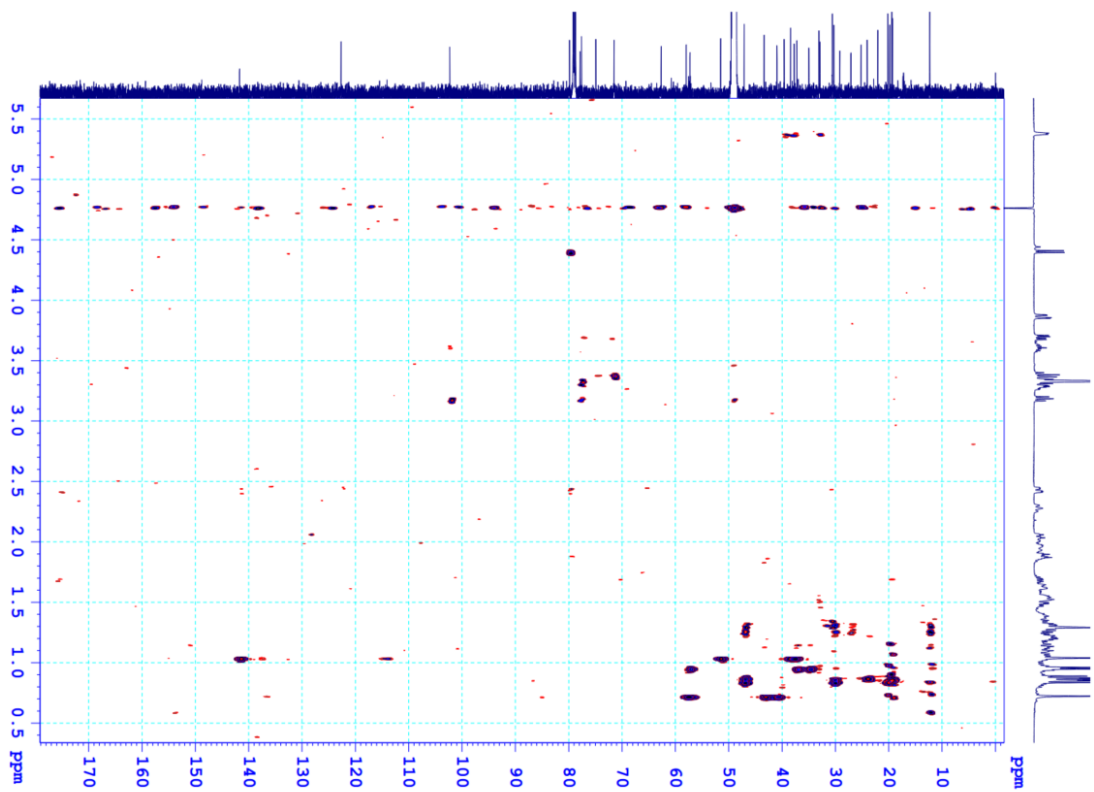
Hình 3. 14: Phổ ^1H NMR của MOE5.1



Hình 3. 15: Phổ ^{13}C NMR của MOE5.1

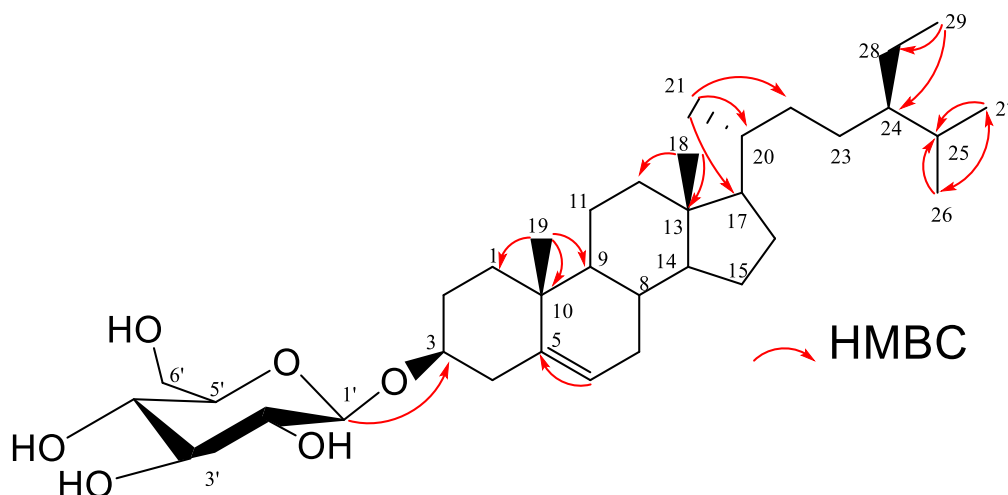


Hình 3. 16: Phổ ^{13}C NMR của MOE5.1



Hình 3. 17: Phổ HMBC của MOE5.1

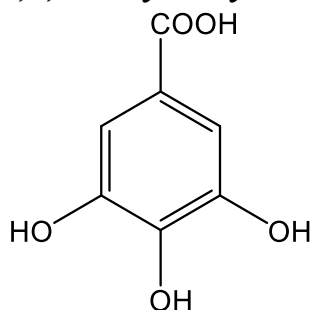
Trên phổ HMBC cho thấy tương tác của proton anomeric H-1' với C-3 cho phép xác định phân tử đường β -glucopyranoside gắn với khung steroid ở vị trí C-3. Sáu nhóm methyl được xác định gắn ở các vị trí C-10, C-13, C-20, C-28 và C-25 được khẳng định bằng các tương tác xa trên phổ HMBC (Hình 3.18).



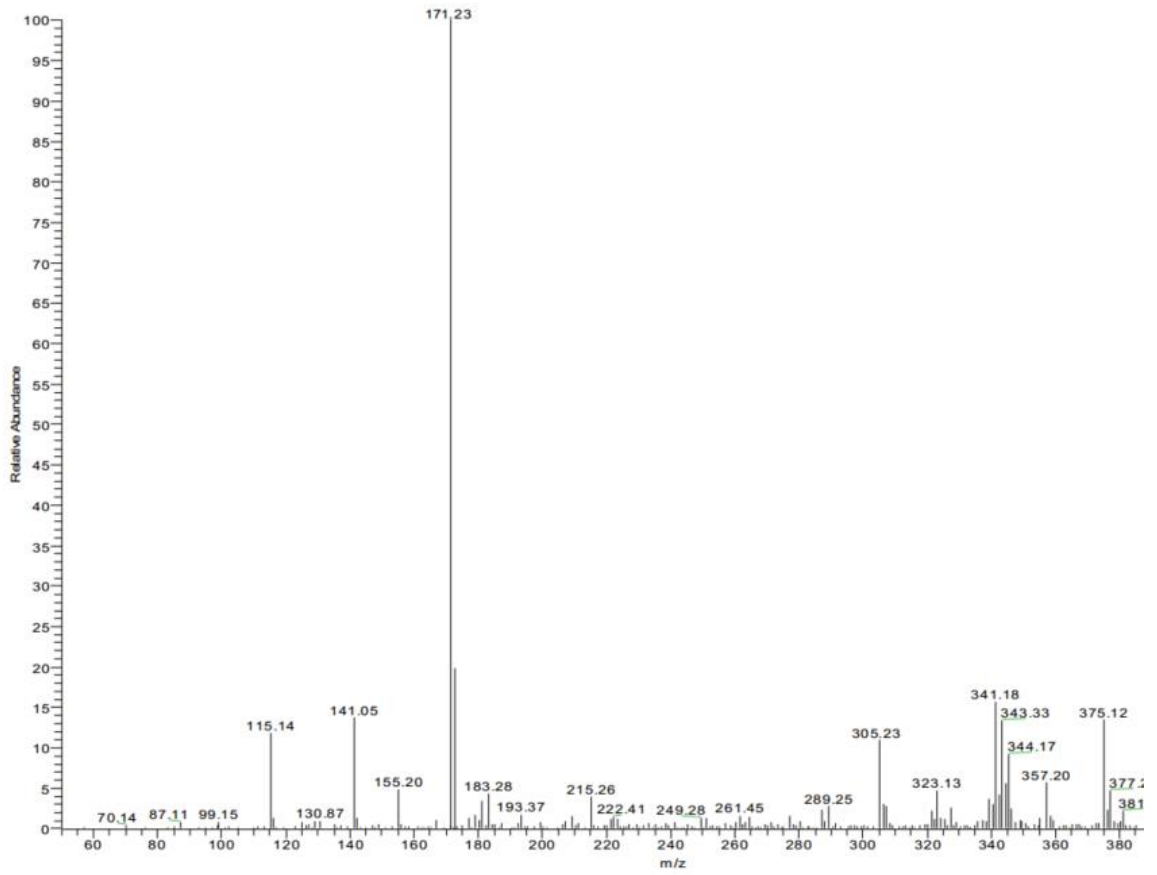
Hình 3. 18: Một số tương tác chính trên phổ HMBC của hợp chất MOE5.1

Dựa vào dữ liệu phổ và đối chiếu với tài liệu tham khảo [46] cho phép xác định hợp chất **MOE5.1** là daucosterol. Đây là một hợp chất glucoside phổ biến ở các loài thực vật bậc cao.

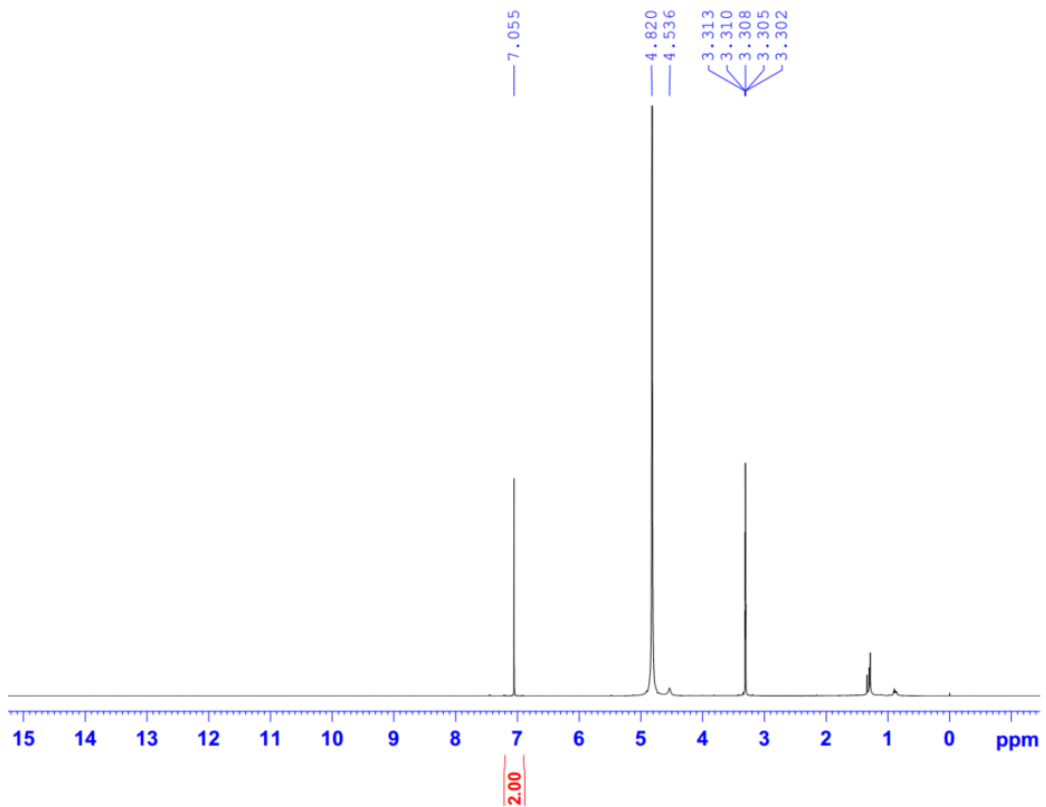
3.1.3.5. Hợp chất MOB4.1 (3,4,5-trihydroxybenzoic acid)



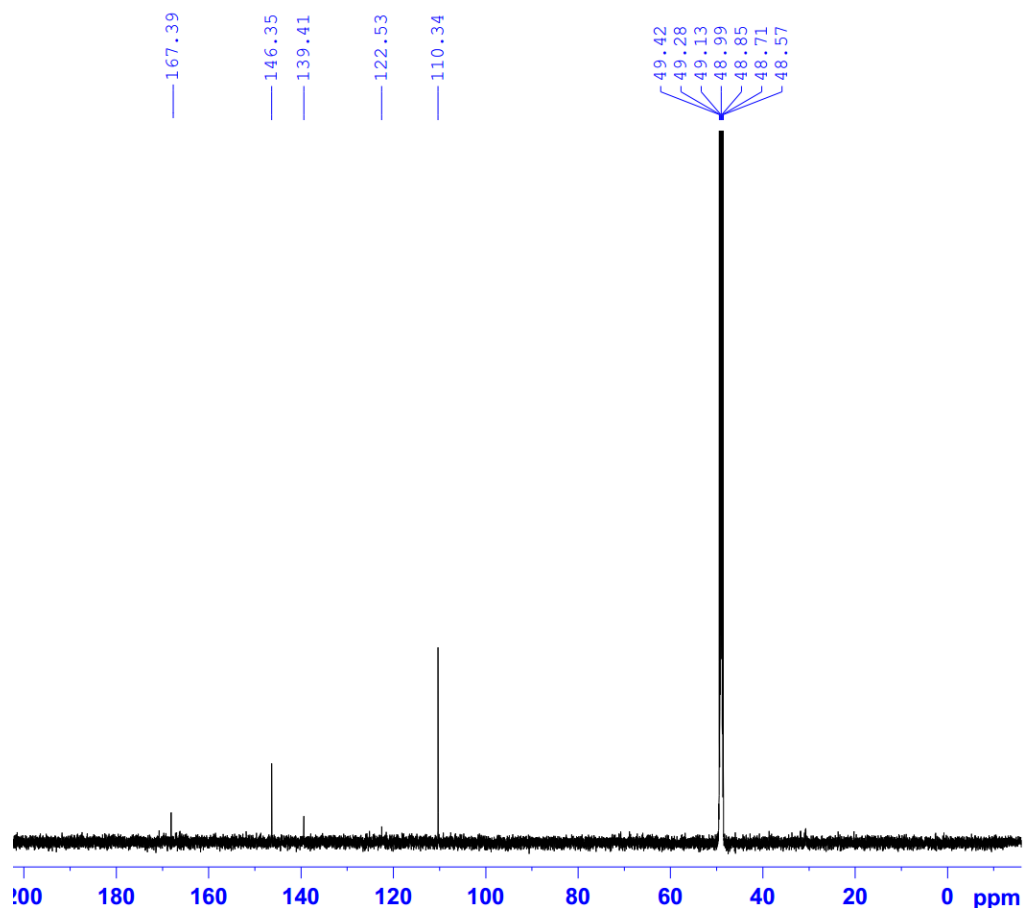
Hợp chất **MOB4.1** thu được dưới dạng chất rắn có màu trắng. Trên phổ khối ESI-MS cho pic ion phân tử proton hóa ở m/z 171 $[M+H]^+$. Phổ 1H NMR cho tín hiệu của 2 proton vòng thơm dưới dạng singlet ở 7,06 (2H, s, H-2 + H-6).



Hình 3. 19: Phổ ESI-MS của MOB4.1



Hình 3. 20: Phổ ^1H NMR của MOB4.1

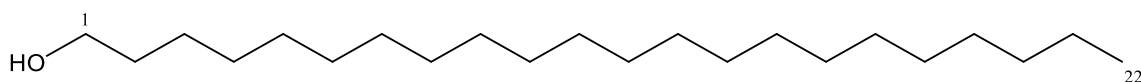


Hình 3. 21: Phổ ^{13}C NMR của MOB4.1

Phổ ^{13}C -NMR cho tín hiệu của 1 nhóm carbonyl ở δ_{C} 167,4 (C=O), 4 carbon không tương tác trực tiếp với hydro ở δ_{C} 122,5 (C-1), 139,4 (C-4), 146,4 (C-3 + C-5) và 2 nhóm methine sp^2 ở δ_{C} 110,3 (C-2 + C-6). Độ chuyển dịch hóa học của C-4, C-3 và C-5 cho phép xác định các carbon này gắn với oxy.

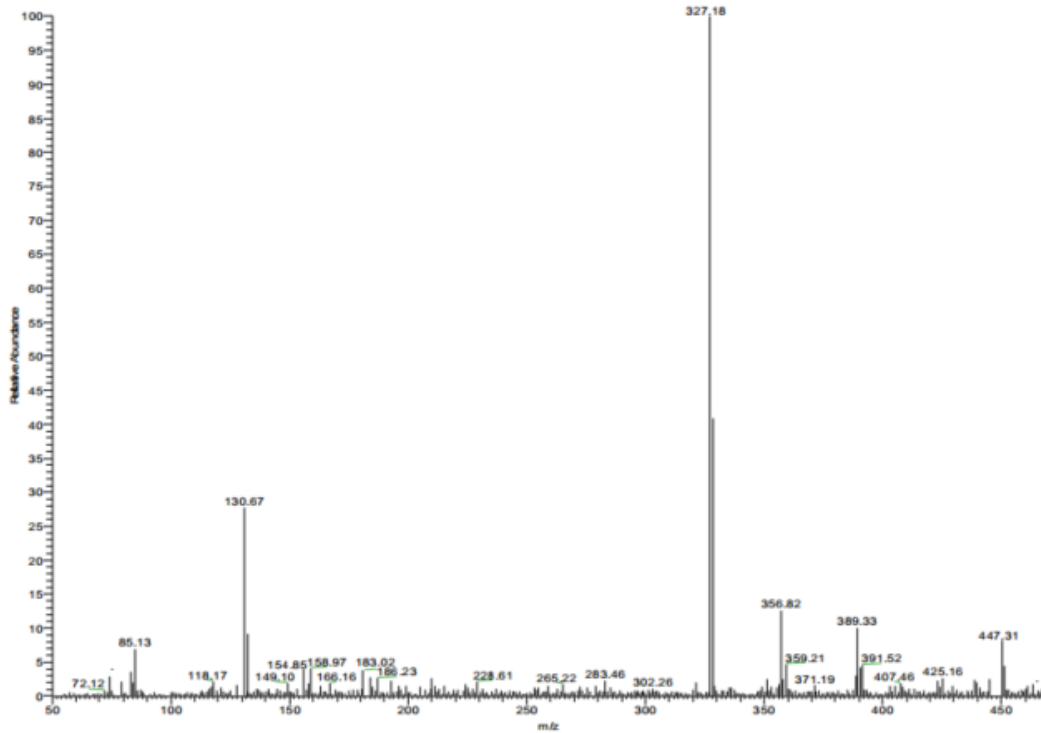
Từ các dữ liệu phổ và đối chứng với tài liệu tham khảo [47] cho phép xác định hợp chất **MOB4.1** là 3,4,5-trihydroxybenzoic acid.

3.1.3.6. Hợp chất MOE1.2 (docosan-1-ol)

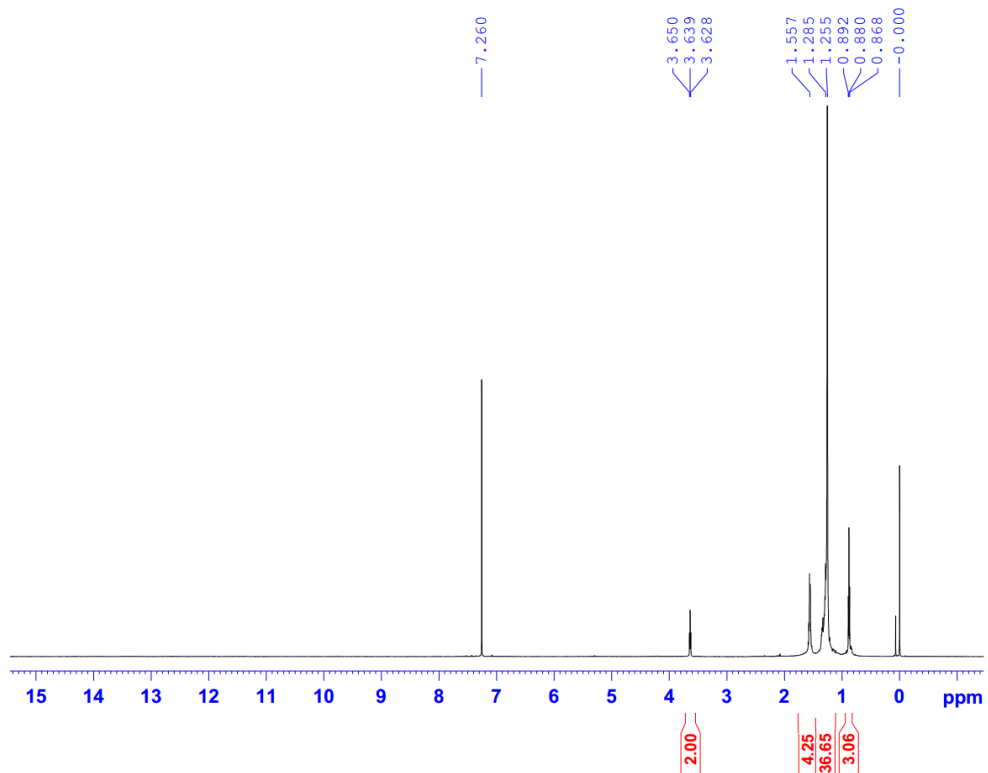


MOE1.2 được phân lập ở dạng chất rắn màu trắng. Trên phổ khối ESI-MS cho pic ion phân tử proton hóa ở m/z 327 $[\text{M}+\text{H}]^+$. Phổ ^1H -NMR của **MOE1.2** cho các tín hiệu đặc trưng của 1 alcol mạch dài. Trên phổ ^1H -NMR cho tín hiệu của 1 nhóm methyl ở δ_{H} 0,88 (3H, t, $J = 7,2$ Hz, CH_3 -22), 1 nhóm

oxymethylene ở δ_H 3,64 (2H, t, $J = 7,2$ Hz, H-1) và 1 loạt các proton vùng aliphatic nằm trong khoảng δ_H 1,26-1,56. Từ các dữ liệu phổ và đối chứng với tài liệu tham khảo [48] cho phép xác định chất **MOE1.2** là docosan-1-ol.

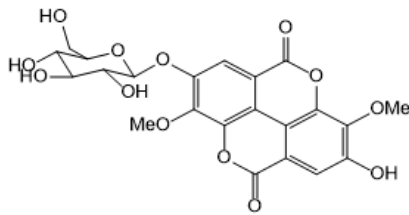


Hình 3. 22: Phổ ESI-MS của MOE1.2

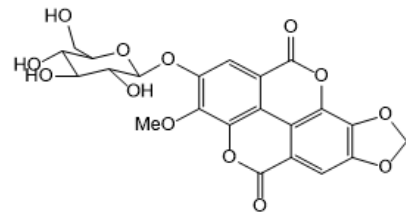


Hình 3. 23: Phổ 1H NMR của MOE1.2

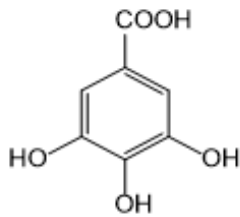
Như vậy từ loài *M. octocostatum* đã phân lập và xác định cấu trúc hóa học của 6 hợp chất, cấu trúc của các hợp chất được xác định là 3-O-methyl-3',4'-methylenedioxy ellagic acid 4-O- β -D-glucopyranoside (**1**), 3,3'-di-O-methylellagic acid 4-O- β -D-glucopyranoside (**2**), 3,4,3'-tri-O-methylellagic acid (**3**), daucosterol (**4**), 3,4,5-trihydroxybenzoic acid (**5**), docosan-1-ol (**6**). Các hợp chất phân lập được là dẫn xuất của ellagic acid, steroid, hợp chất phenolic và alcol mạch dài đều phù hợp với các lớp chất đã được phân lập từ chi *Memecylon*.



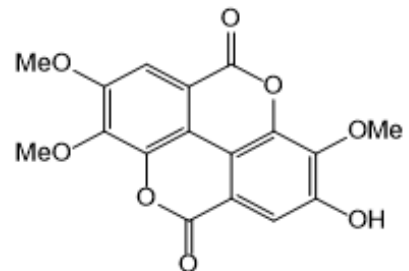
3-O-methyl-3',4'-methylenedioxy ellagic acid 4-O- β -D-glucopyranoside (MOB2)



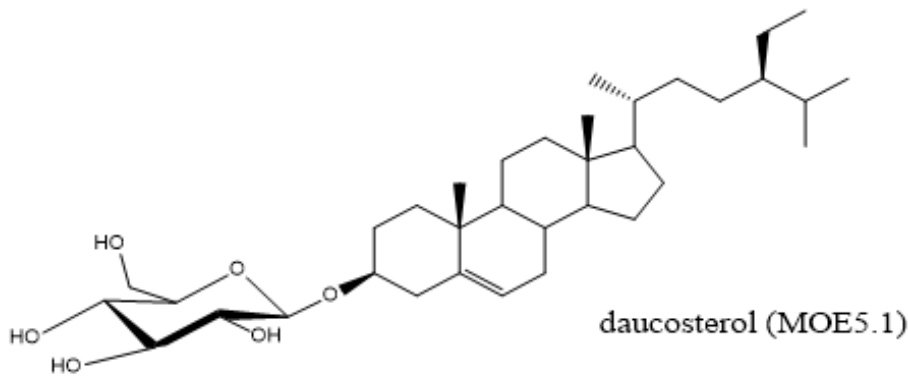
3,3'-di-O-methylellagic acid 4-O- β -D-glucopyranoside (MOB3)



3,4,5-trihydroxybenzoic acid (MOB4)



3,4,3'-tri-O-methylellagic acid (MOEA3)



daucoosterol (MOE5.1)



docosan-1-ol (MOE1.2)

Hình 3. 24: Các hợp chất phân lập được từ loài *Memecylon octocostatum*

3.2. ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH ỨC CHẾ ENZYME α – GLUCOSIDASE

Enzyme α - glucosidase rất quan trọng trong quá trình thủy phân carbohydrate để sản sinh ra đường trong cơ thể con người. Có thể làm chậm lại quá trình tiết và hấp thụ glucose, bằng chất ức chế hoạt động của enzyme này, từ đó có tác dụng làm giảm lượng đường trong máu. Để đánh giá được tác dụng hạ đường huyết của loài *M. octocostatum*, các hợp chất phân lập được đánh giá hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase theo phương pháp được mô tả ở Chương 2. Kết quả được trình bày ở Bảng 3.3.

Bảng 3. 4: Kết quả đánh giá hoạt tính ức chế enzyme α – glucosidase

TT	Tên mẫu	Nồng độ thử ($\mu\text{g/ml}$)	Phần trăm ức chế (%)	Giá trị IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
1	Cao EtOAc	256	100	0,34 \pm 0,028
		64	100	
		16	100	
		4	100	
		1	92	
		0,25	44	
2	Cao nước	256	100	1,0 \pm 0,05
		64	100	
		16	100	
		4	83	
		1	50	
		0,25	20	
3	3-O-methyl-3',4'-methylenedioxy ellagic acid 4-O- β -D-glucopyranoside	128	0	>128
		32	0	
		8	0	
		2	0	
4	3,3'-di-O-methylellagic acid 4-O- β -D-glucopyranoside	128	0	>128
		32	0	
		8	0	
		2	0	
5	3,4,3'-tri-O-methylellagic acid	128	0	>128
		32	0	
		8	0	
		2	0	
6	daucosterol	128	75	

TT	Tên mẫu	Nồng độ thử ($\mu\text{g/ml}$)	Phần trăm ức chế (%)	Giá trị IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
		32	71	1,08 \pm 0,06
		8	66	
		2	58	
		0,5	45	
7	3,4,5-trihydroxybenzoic acid	128	0	>128
		32	0	
		8	0	
		2	0	
8	docosan-1-ol	128	0	>128
		32	0	
		8	0	
		2	0	
Chất tham khảo	Acarbose	256	63	198,55 \pm 6,25
		64	38	
		16	0	
		4	0	

Kết quả thử nghiệm Bảng 3.1 cho thấy, cao chiết EtOAc và cao chiết nước của phần thân lá của loài Sâm tám sóng có hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase mạnh với giá trị IC_{50} lần lượt là 0,34 \pm 0,028 $\mu\text{g/ml}$ và 1,0 \pm 0,05 $\mu\text{g/ml}$, mạnh hơn chất tham khảo Acarbose (IC_{50} = 198,55 \pm 6,25 $\mu\text{g/ml}$). Đây là kết quả có ý nghĩa, vì các cao chiết có giá trị $\text{IC}_{50} \leq 100$ $\mu\text{g/ml}$ được coi là có tiềm năng để nghiên cứu sâu hơn. Trong số các hợp chất phân lập được, daucosterol cũng thể hiện hoạt tính mạnh với IC_{50} là 1,08 \pm 0,06 $\mu\text{g/ml}$, cao hơn chất tham khảo Acarbose (IC_{50} = 198,55 \pm 6,25 $\mu\text{g/ml}$). Các hợp chất còn lại không thể hiện hoạt tính ở nồng độ nghiên cứu với $\text{IC}_{50} > 128$ $\mu\text{g/ml}$.

Dẫn xuất của ellagic acid đã được chứng minh là có nhiều hoạt tính sinh học khác nhau. Các hợp chất 3-O-methyl-3',4'-methylenedioxy ellagic acid 4-O- β -D-glucopyranoside, 3,3'-di-O-methylellagic acid 4-O- β -D-glucopyranoside được cho là có khả năng chống oxy hóa đáng kể, do chúng chứa số lượng lớn các nhóm hydroxyl [49] Trong báo cáo của Wardana và cộng sự, trên mô hình thử nghiệm *invitro*, acid 3,4,3'-tri-O-methylellagic được đánh giá có hoạt tính ức chế dòng tế bào ung thư T47D (ung thư vú) và HeLa (ung

thư cổ tử cung) với giá trị EC_{50} lần lượt là $55,35 \pm 6,28 \mu\text{g/ mL}$ và $12,57 \pm 2,22 \mu\text{g/ mL}$. Trên mô hình sàng lọc *in silico*, axit 3,4,3'-tri-O-methylelagic được chứng minh là thuốc điều trị ung thư cổ tử cung và ung thư vú tiềm năng do tác động lên các enzyme chịu trách nhiệm điều hòa ung thư ở cấp độ phân tử là enzyme kinase phụ thuộc cyclin 9 (CDK9) và sirtuin 1 (SIRT1) [45].

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

Lần đầu tiên loài *M. octocostatum* thu hái tại huyện Vĩnh Linh, tỉnh Quảng Trị được nghiên cứu thành phần hóa học và hoạt tính sinh học. Kết quả nghiên cứu cho thấy:

- Từ cặn EtOAc và cặn nước, sáu hợp chất đã được phân lập và xác định cấu trúc hóa học. Các hợp chất đã được xác định cấu trúc là 3-O-methyl-3',4'-methylenedioxy ellagic acid 4-O- β -D-glucopyranoside (**1**), 3,3'-di-O-methylellagic acid 4-O- β -D-glucopyranoside (**2**), 3,4,3'-tri-O-methylellagic acid (**3**), daucosterol (**4**), 3,4,5-trihydroxybenzoic acid (**5**), docosan-1-ol (**6**).

- Đánh giá tác dụng ức chế enzyme α -glucosidase, cao EtOAc và cao nước thể hiện hoạt tính mạnh với giá trị IC_{50} lần lượt là $0,34 \pm 0,028$ μ g/ml và $1,0 \pm 0,05$ μ g/ml. Trong số các hợp chất phân lập được, daucosterol thể hiện hoạt tính mạnh với giá trị IC_{50} là $1,08 \pm 0,06$ μ g/ml. Các hợp chất còn lại không thể hiện tác dụng ở nồng độ nghiên cứu với $IC_{50} > 128$ μ g/ml.

KIẾN NGHỊ

- Tiếp tục tinh chế và xác định cấu trúc các hợp chất ở các phân đoạn còn lại của cao chiết EtOAc cũng như cao chiết nước của thân lá cây Sầm tám sóng.

- Cần tiếp tục có các nghiên cứu sâu hơn về mặt cơ chế tác dụng điều trị tiểu đường của các cao chiết của loài thực vật này nhằm định hướng ứng dụng chúng làm thuốc hoặc thực phẩm chức năng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Phương, N.T., *Nghiên cứu tách chiết, xác định cấu trúc và đánh giá hoạt tính kháng viêm của một số hợp chất tách được từ cây Sầm núi (Memecylon scutellatum (Lour.))*. 2023, Học viện Khoa học và Công nghệ.
2. Hường, N.T.B. and D.H. Sơn, *Nghiên cứu phân loại chi Sầm (Memecylon L.) ở Việt Nam*. 2020.
3. Hộ, P.H., *Cây cỏ Việt Nam*. Vol. Quyển 2. 2000: Nhà xuất bản Trẻ. 99-102.
4. Đào, N.K., *Danh lục các loài thực vật Việt Nam*. Tập, 2003. **2**: p. 918 - 920.
5. Bích, Đ.H., et al., *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam*. Tập, 2004. **1**: p. 215-217.
6. Chen, F. and C. Hu, *Flora Reipublicae Popularis Sinicae. Tomus 39*. 1984, Beijing, China: Science Press. p. 284 - 293.
7. Elavazhagan T, Kantha D, and Arunachalam, *Phytochemical and antibacterial studies of seed extracts of Memecylon edule*. Int J Eng Sci Technol 2010. **2**: p. 498-503.
8. Murugesan, S. and A. Panneerselvam, *Evaluation of Phytochemical Constituents from Stems of Memecylon umbellatum Brum. F. by GC-MS Analysis*. Research & Reviews: Journal of Botanical Sciences, 2013. **2**: p. 29-34.
9. Srinivasan, R., D. Natarajan, and M. Shivakumar, *Antimicrobial and GC-MS analysis of Memecylon edule leaf extracts*. International Journal of Current Pharmaceutical Review and Research, 2014. **5**: p. 1-13.
10. Nualkaew, S., et al., *Isolation of a new compound, 2-butanone 4-glucopyranoside 6'-O-gallate and other 8 compounds from the anti-inflammatory leave extracts of Memecylon edule Roxb*. Natural product research, 2017. **31**(12): p. 1370-1378.
11. Xu, L., et al., *Inhibitory effect of epigallocatechin-3-O-gallate on α -glucosidase and its hypoglycemic effect via targeting PI3K/AKT signaling pathway in L6 skeletal muscle cells*. International journal of biological macromolecules, 2019. **125**: p. 605-611.
12. Basha NS, et al., *Preliminary phytochemical screening and evaluation of the antimicrobial potential of Memecylon umbellatum Burm (Melastomataceae) aerial parts*. Pharmacologyonline, 2011: p. 174-84.
13. Murugesan, S., A. Pannerselvam, and A.C. Tangavelou, *Phytochemical screening and Antimicrobial activity of the leaves of Memecylon umbellatum burm. F.* Journal of applied Pharmaceutical science, 2011(Issue): p. 42-45.
14. Rajesh, V., et al., *In vitro evaluation of Memecylon umbellatum Burm. F for antihyperglycemic activity and phytochemical potential*. Int J Pharmacogn Phytochem Res, 2014. **6**: p. 785-91.

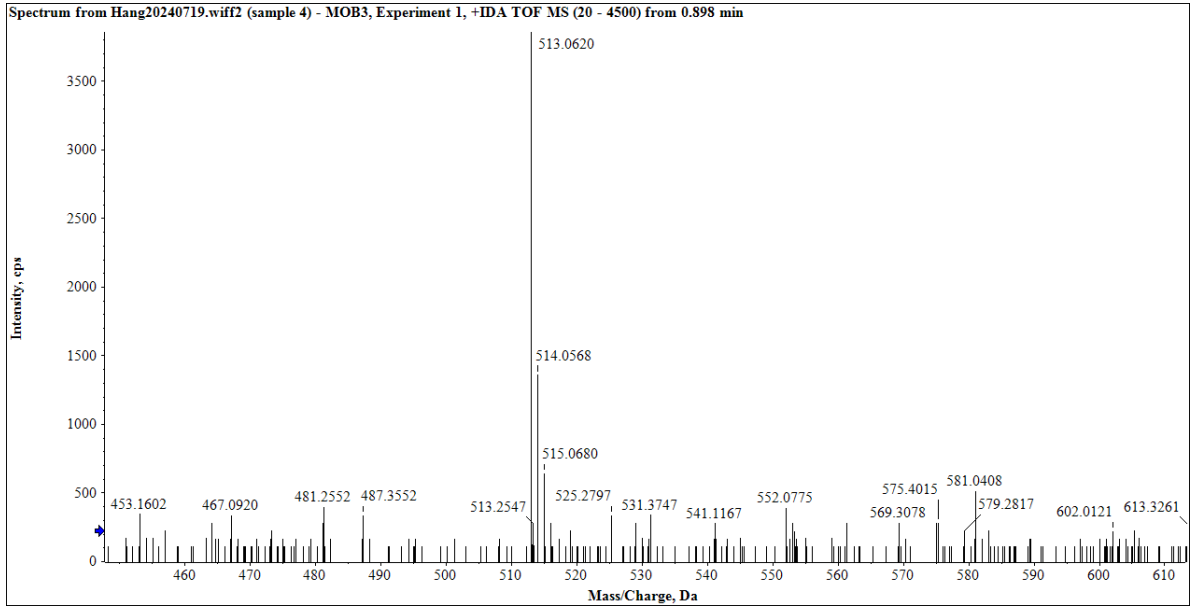
15. SK, A. and R. RP, *Umbelactone (4-Hydroxy-3-methylbut-2-ene-4,1-olide)*, *New constituent of Memecylon umbellatum*. *Phytochemistry*, 1978. **17**: p. 1663-1664.
16. Joshi, H., et al., *Fatty acids from Memecylon umbellatum (Burm.)*. *Asian Journal of Research in Chemistry*, 2009. **2**(2): p. 178-180.
17. Bharathi TR and P. HS, *UPLC-ESI-MS-based metabolite analysis of Memecylon talbotianum Brandis. and its potential bioactive paper presented in Metabolomics conference IISC Bangalore*. Bangalore, 2015.
18. TR, B., et al. *Antidiabetic effect of Memecylon talbotianum Brandis extract on streptozotocin induced diabetes in male wistar rats*. in *Paper presented in International Symposium on Chemical Biology*. 2015.
19. Puttaswamy, R., S. Padukone, and R.N. Achur, *Pharmacological and gross behavioral studies on Memecylon terminale Dalz, a medicinal plant from Western Ghats in southern India*. *World Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2013: p. 81-92.
20. Lowry, J., *Anthocyanins of the Melastomataceae, Myrtaceae and some allied families*. *Phytochemistry*, 1976. **15**: p. 513-516.
21. Tejavathi, D. and B. Sumalatha, *Phytochemical, antioxidant and antidiabetic analysis of leaf and stem extracts of Memecylon malabaricum (CB Clarke) Cogn*. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research*, 2020: p. 606-613.
22. Chen, G., et al., *Polyanthumin, a novel cyclobutane chalcone trimer from Memecylon polyanthum*. *Journal of Asian natural products research*, 2015. **17**(2): p. 170-177.
23. Ramaiah, M., K. Srikantha Rao, and G. Rao, *B-Anitdiabetic activity of Methanolic extract of Memecylon malabaricum (Melastomataceae) leaves*. *International Journal of Phytopharmacy*, 2012. **4**: p. 822-828.
24. M, R., R. KS, and R. BG, *Antidiabetic activity of Methanolic extract of Memecylon malabaricum (Melastomataceae) leaves*. *Int J Phytopharm* 2012. **2**: p. 9-12.
25. Amalraj, T. and S. Ignacimuthu, *Evaluation of the hypoglycaemic effect of Memecylon umbellatum in normal and alloxan diabetic mice*. *Journal of ethnopharmacology*, 1998. **62**(3): p. 247-250.
26. Puttaswamy, R., S. Peethambar, and R. Achur, *Hypoglycemic activity of Memecylon umbellatum leaves methanolic extract*. *World J Pharm Pharm Sci*, 2013. **6**: p. 6202-11.
27. H, O., et al., *Anti-Inflammatory potential of Memecylon umbellatom roots extract*. *Int J Pharmacol Biol Sci* 2009. **3**: p. 11-15.
28. Nualkaew, S., et al., *Anti-inflammatory, analgesic and wound healing activities of the leaves of Memecylon edule Roxb*. *Journal of Ethnopharmacology*, 2009. **121**: p. 278-281.
29. Rekha, N., et al., *Anti-inflammatory properties of Memecylaene: A novel compound isolated from Memecylaene Malabaricum*. *Research Journal*

- of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences, 2014. **5**: p. 1645-1654.
30. Rumzhum, N.N., et al., *Evaluation of Antioxidant, Antino Potentialities of Methanolic Extract of Memecylon umbellatum*. Research Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry, 2012. **4**: p. 84-88.
 31. TR, B., R. Nadafi, and H. ghaffari, *The pharmaceutical potential of solvent extracts of M. talbotianum Brandis*. International Symposium on Chemical Biology-Drug Discovery, 2014.
 32. Joshi, H., et al., *Hepatoprotective activity of Memecylon umbellatum roots against acetaminophen induced hepatotoxicity in rats*. J Res Educ Indian Med, 2008. **14**(2): p. 49-54.
 33. Joshi, H., et al., *the Nephroprotective activity of Memecylon umbellatom*. Herbal Heritage, 2009. **1**: p. 65-9.
 34. Naidu, V., et al., *Apoptogenic activity of ethyl acetate extract of leaves of Memecylon edule on human gastric carcinoma cells via mitochondrial dependent pathway*. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, 2013. **6**(5): p. 337-345.
 35. Satya, S., et al., *Antimicrobial Screening of leaves of Memecylon umbellatum*. Ancient Science of Life, 2003. **23**(2): p. 120-122.
 36. Mohideen, S., et al., *Antimicrobial activity of Memecylon edule ROXB. and Memecylon umbellatum BURM. F*. Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res, 2012. **15**(1): p. 79-82.
 37. Yashoda, K., et al., *Antimicrobial and Radical Scavenging Activity of Memecylon malabaricum*. Science, Technology and Arts Research Journal, 2014. **3**(2): p. 174-179.
 38. T, E., K. D, and Arunachalam, *Phytochemical and antibacterial studies of seed extracts of Memecylon edule*. 2010. **2**: p. 498-503.
 39. Diseaases, N.I.o.D.a.D.a.K., *What Is Diabetes*.
 40. Oboh, G., et al., *Inhibition of key enzymes linked to type 2 diabetes and sodium nitroprusside induced lipid peroxidation in rats' pancreas by phenolic extracts of avocado pear leaves and fruit*. International Journal of Biomedical Science: IJBS, 2014. **10**(3): p. 208.
 41. Ting, L., et al., *A microplate-based screening method for alpha-glucosidase inhibitors*. Chinese Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics, 2005. **10**(10): p. 1128.
 42. Khallouki, F., et al., *Isolation, purification and identification of ellagic acid derivatives, catechins, and procyanidins from the root bark of Anisophyllea dichostyla R. Br*. Food and Chemical Toxicology, 2007. **45**(3): p. 472-485.
 43. Li, X.C., et al., *NMR assignments of ellagic acid derivatives*. Magnetic Resonance in Chemistry, 1999. **37**(11): p. 856-859.
 44. Ye, G., et al., *Ellagic acid derivatives from the stem bark of Dipentodon sinicus*. Chemistry of Natural Compounds, 2007. **43**: p. 125-127.

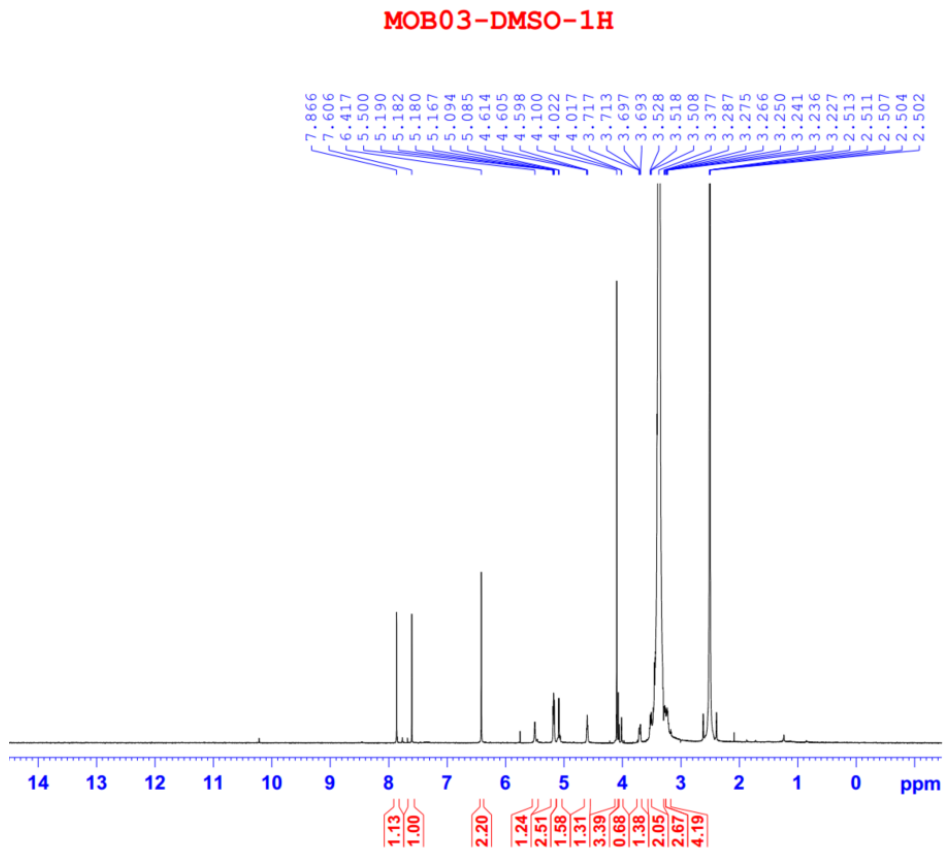
45. Wardana, A.P., et al., 3, 4, 3'-Tri-O-methylellagic acid as an anticancer agent: *in vitro* and *in silico* studies. RSC advances, 2022. **12**(46): p. 29884-29891.
46. Anh, Đ.T.T., et al., Nghiên cứu phân lập thành phần hóa học của cây Lá gan *Pellionia latifolia* (Blume) Boerl.(Urticaceae) thu hái ở Yên Bái.
47. Tukiran, T., et al., A phenolic acid and its antioxidant activity from stem bark of chloroform fraction of *Syzygium littorale* (blume) amshoff (Myrtaceae). *Molekul.* 2016; **11** (2): 180-9.
48. Tsankova, E., A. Trendafilova, and C. Gussev, *Chemical constituents of Cnicus benedictus L.* Dokladi na Bulgarskata Akademia na Naukite, 1994. **47**(2): p. 53-56.
49. Saadullah, M., et al., *Cytotoxic and antioxidant potentials of ellagic acid derivatives from Conocarpus lancifolius (Combretaceae).* Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 2020. **19**(5): p. 1037-1080.

PL1

PHỤ LỤC PHỔ

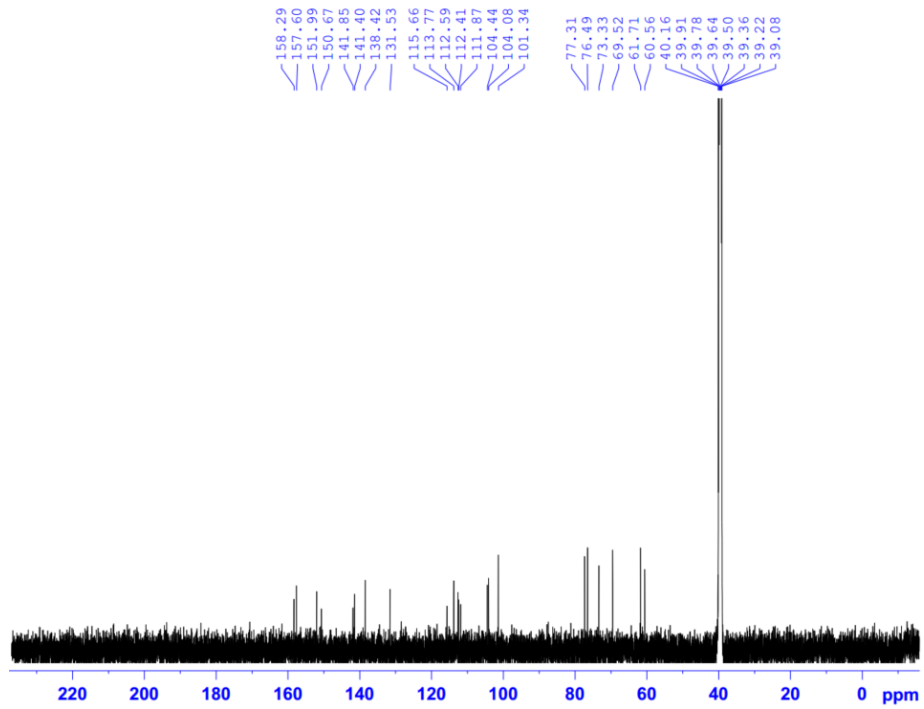


Phụ lục 1. Phổ HR-ESI-MS của hợp chất MOB3



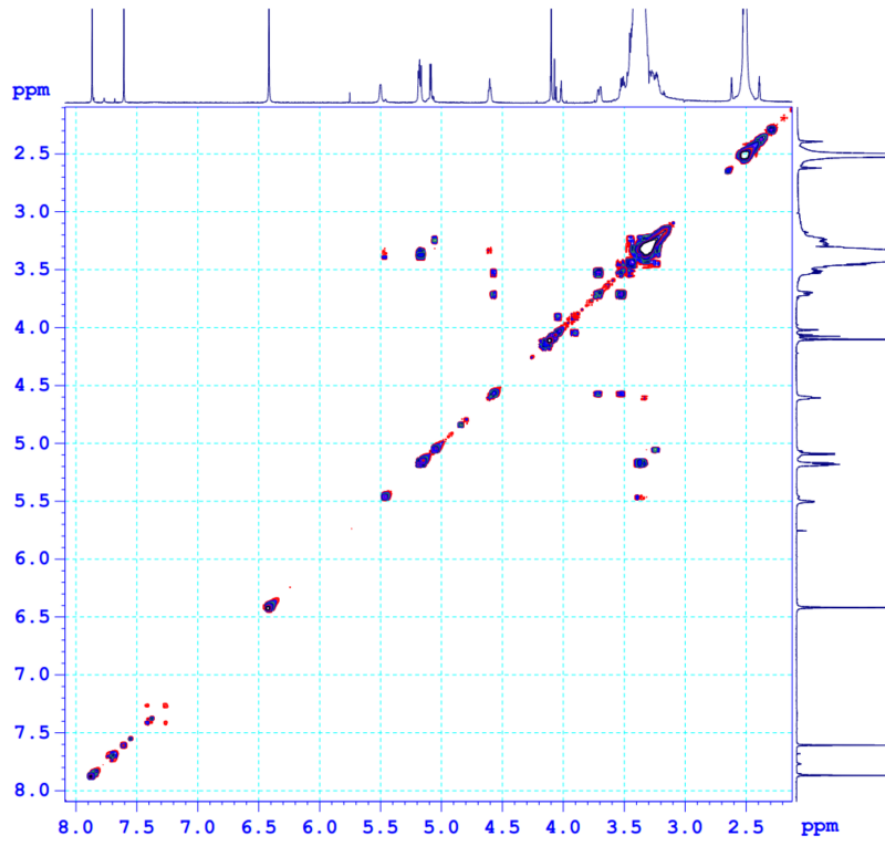
Phụ lục 2. Phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất MOB3

MOB03-DMSO-C13CPD

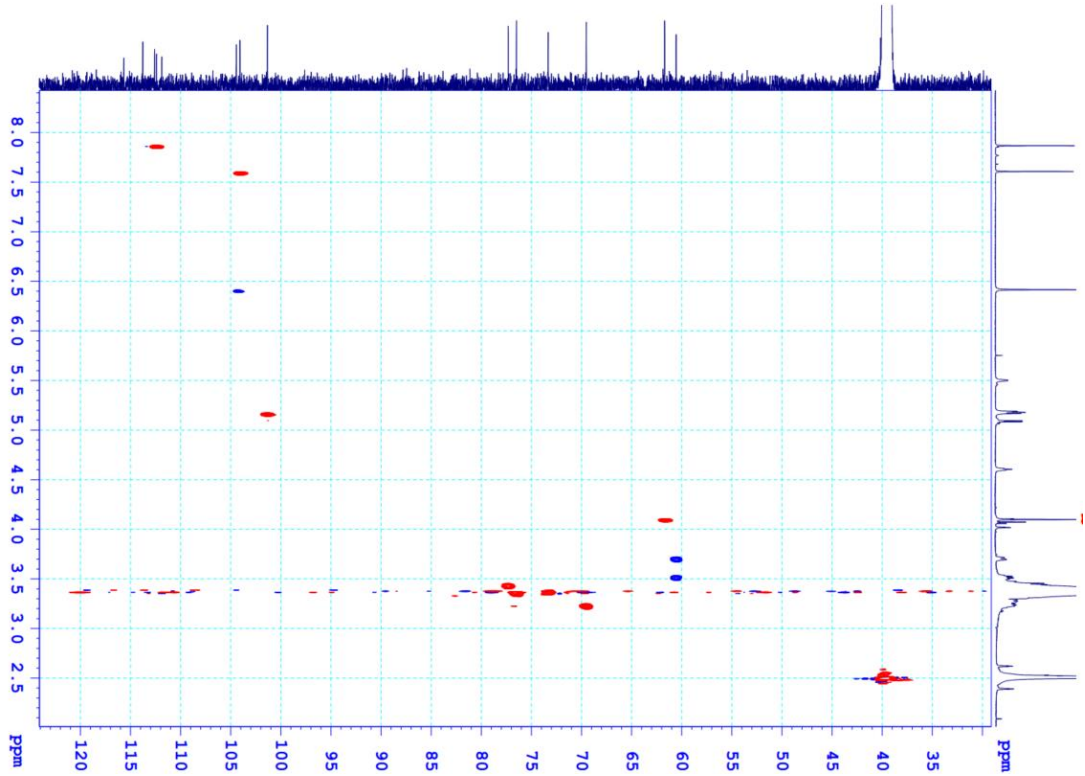


Phụ lục 3. Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất MOB3

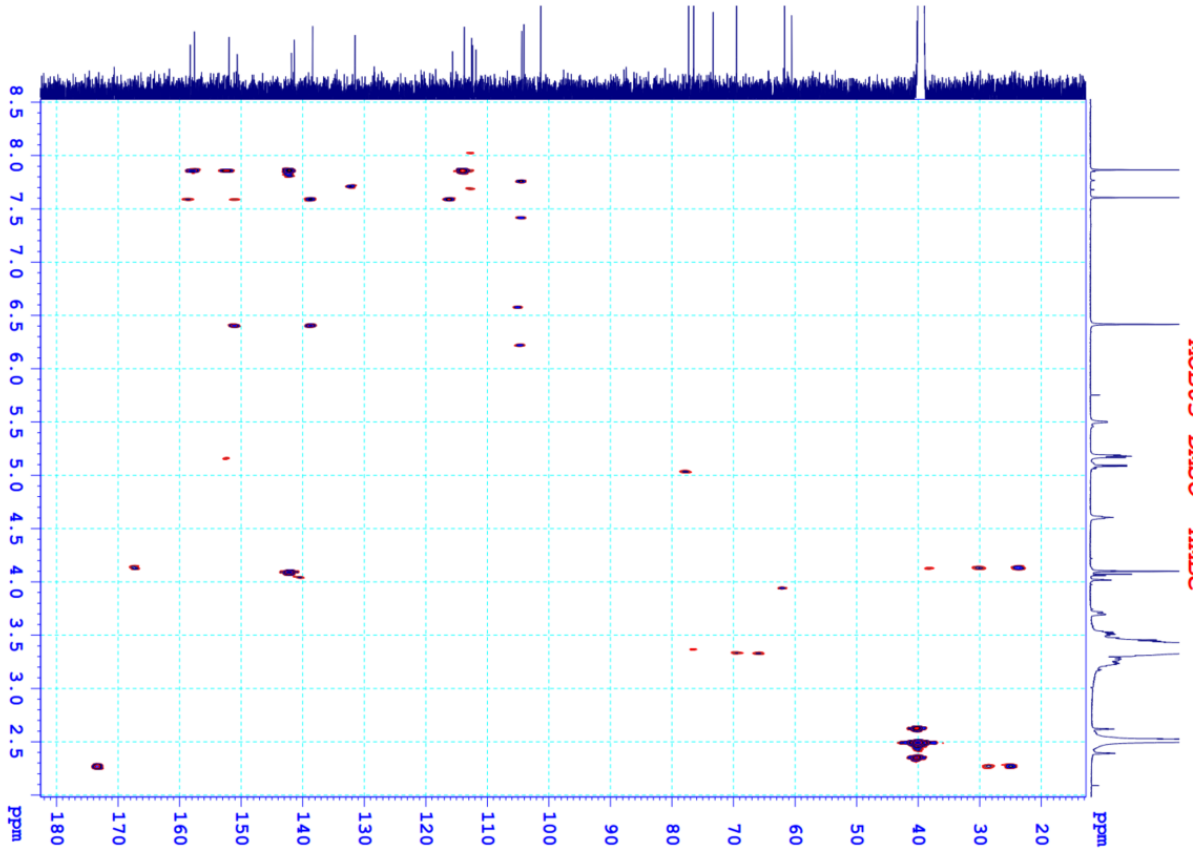
MOB03-DMSO-COSYGP



Phụ lục 4. Phổ COSY của hợp chất MOB3

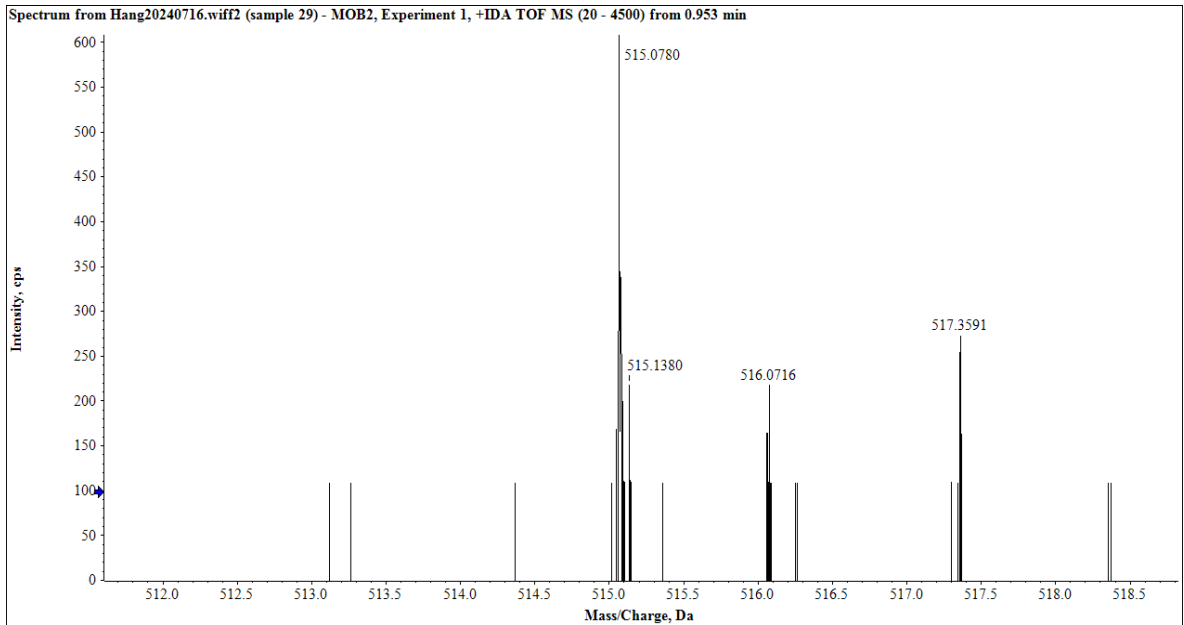


Phụ lục 5. Phổ HSQC của hợp chất MOB3

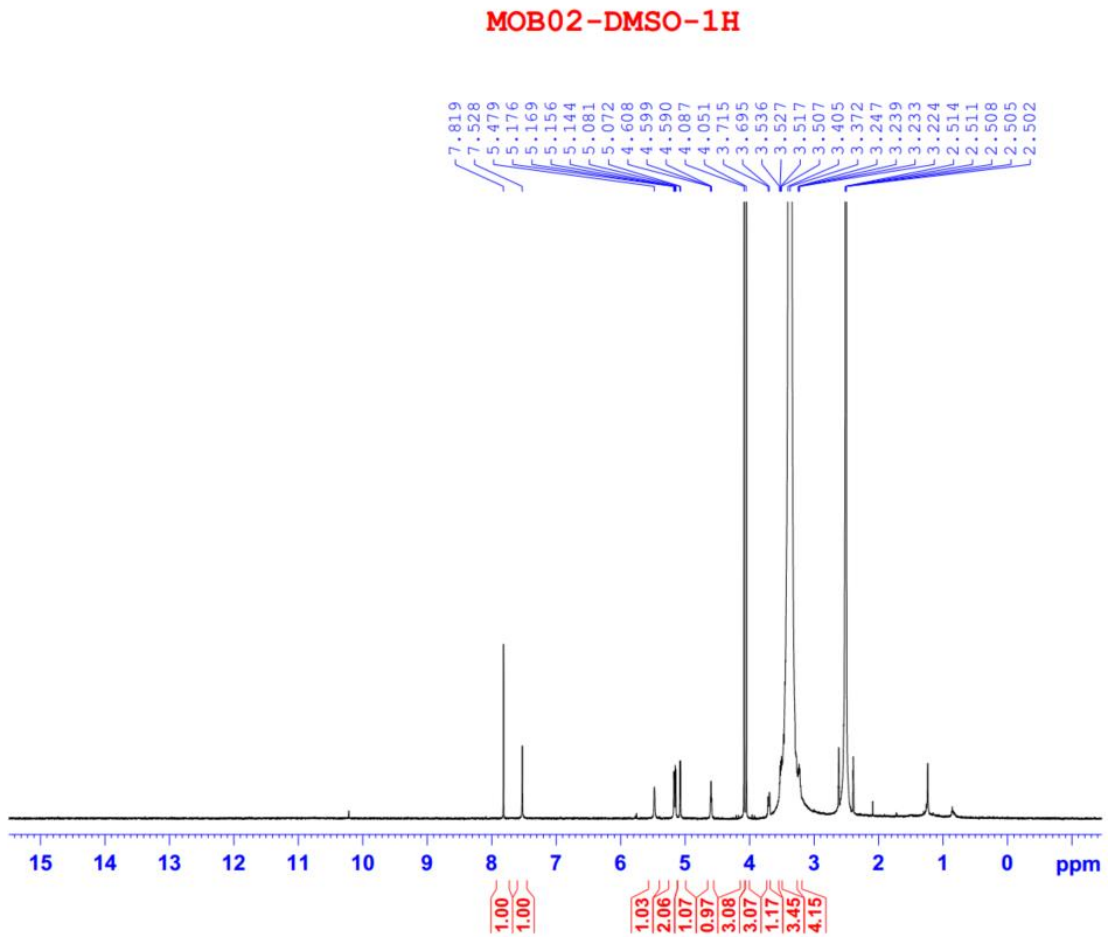


Phụ lục 6. Phổ HMBC của hợp chất MOB3

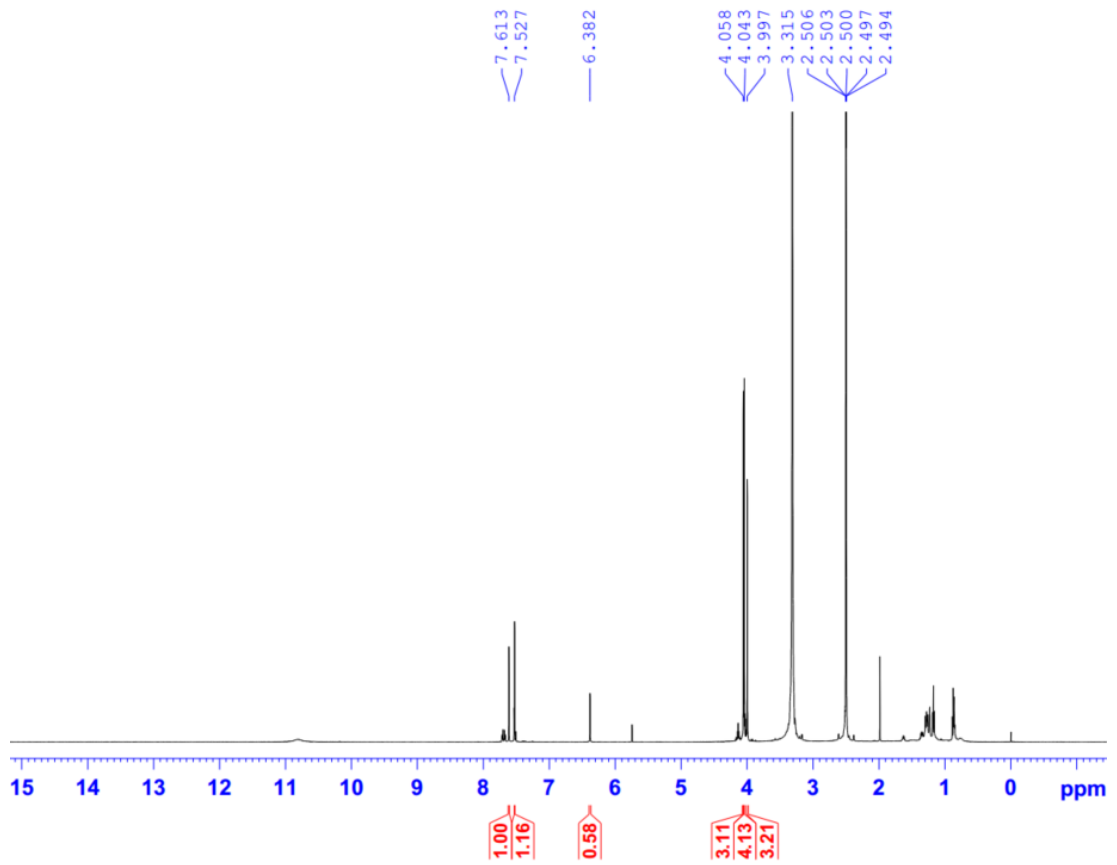
PL4



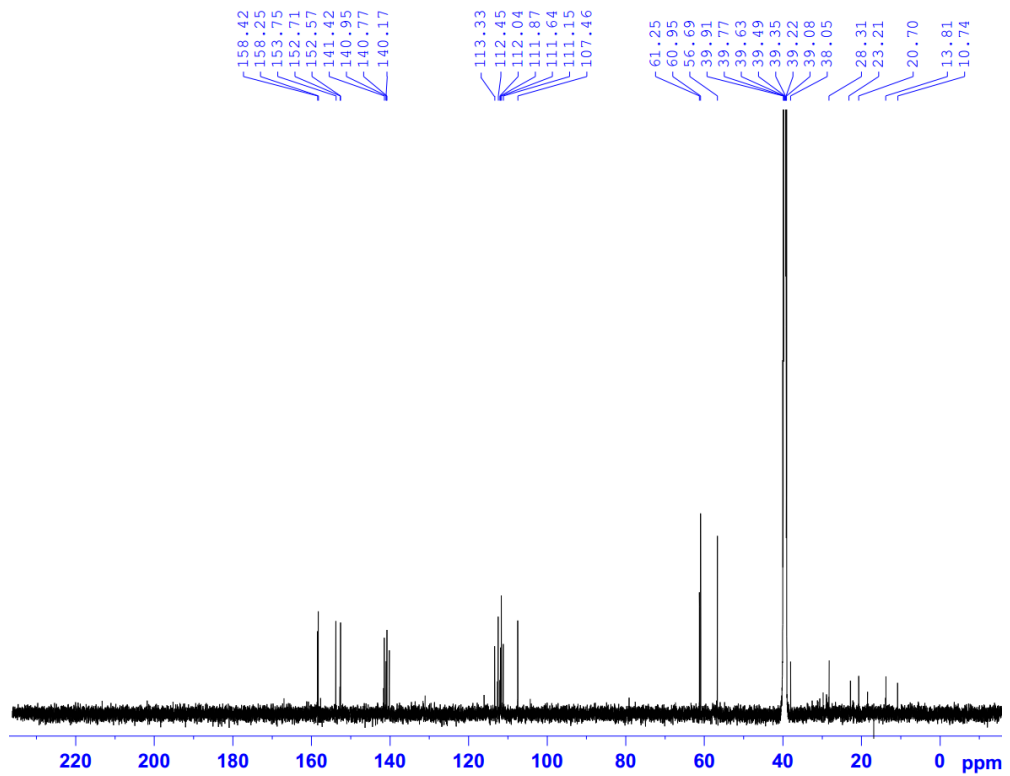
Phụ lục 7. Phổ HR-ESI-MS của hợp chất MOB2



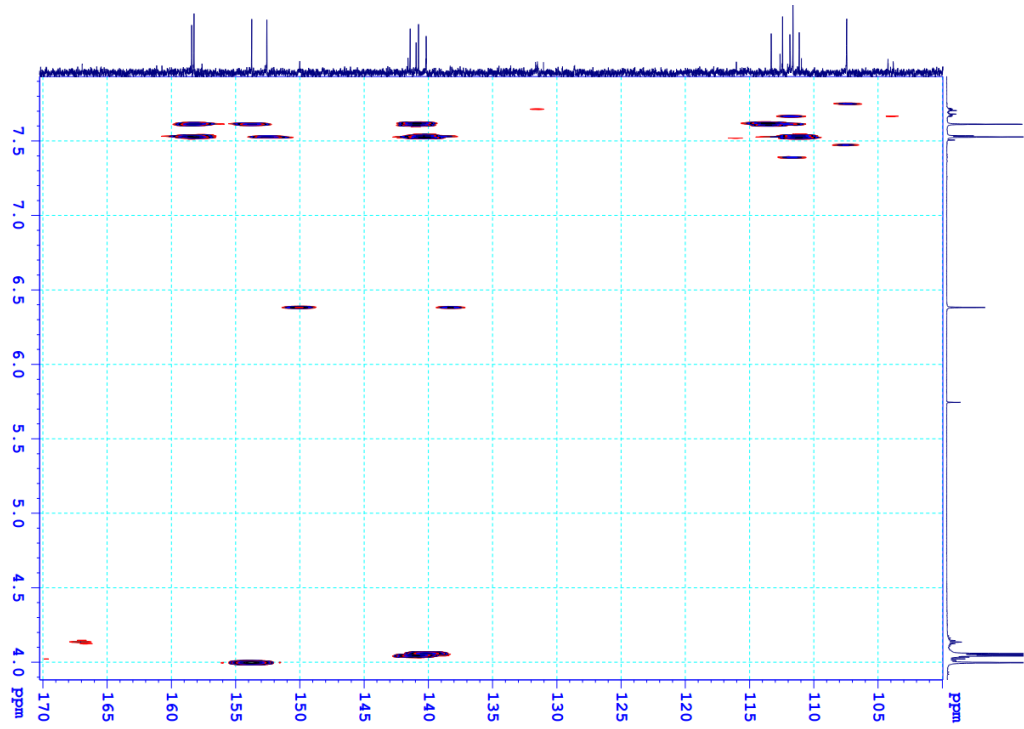
Phụ lục 8. Phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất MOB2



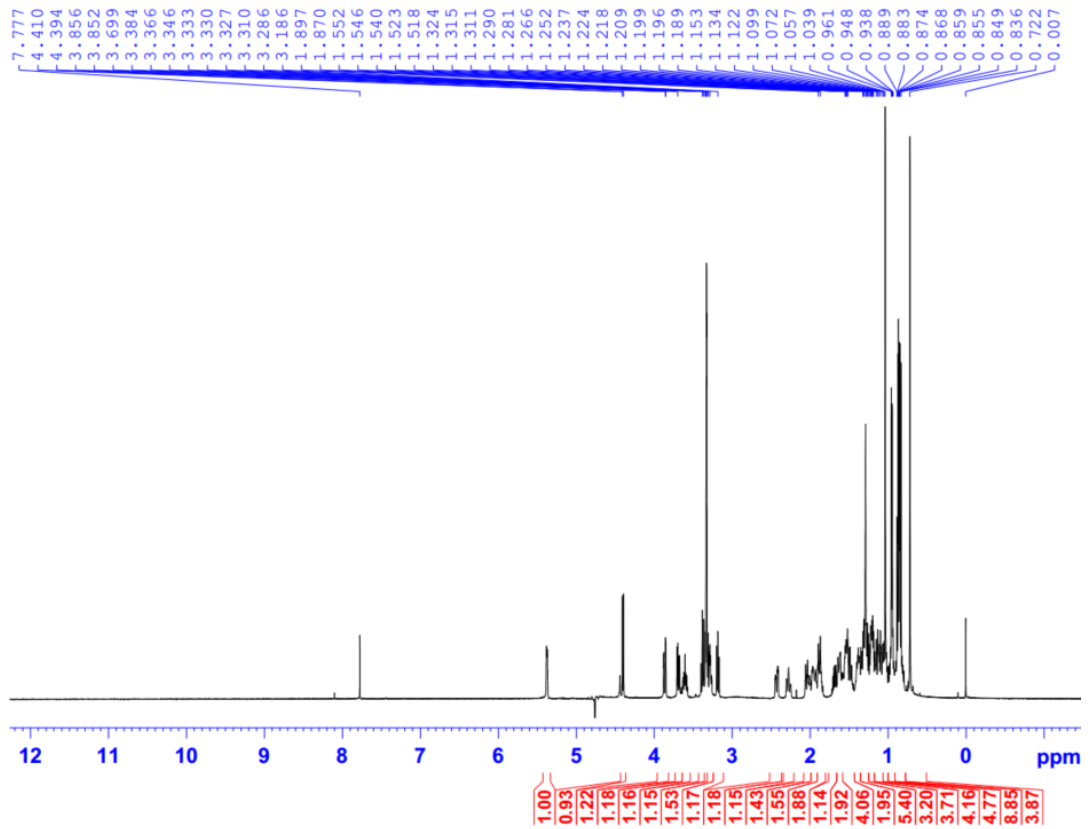
Phụ lục 9. Phổ ¹H-NMR của hợp chất MOEA3



Phụ lục 10. Phổ ¹³C-NMR của hợp chất MOEA3

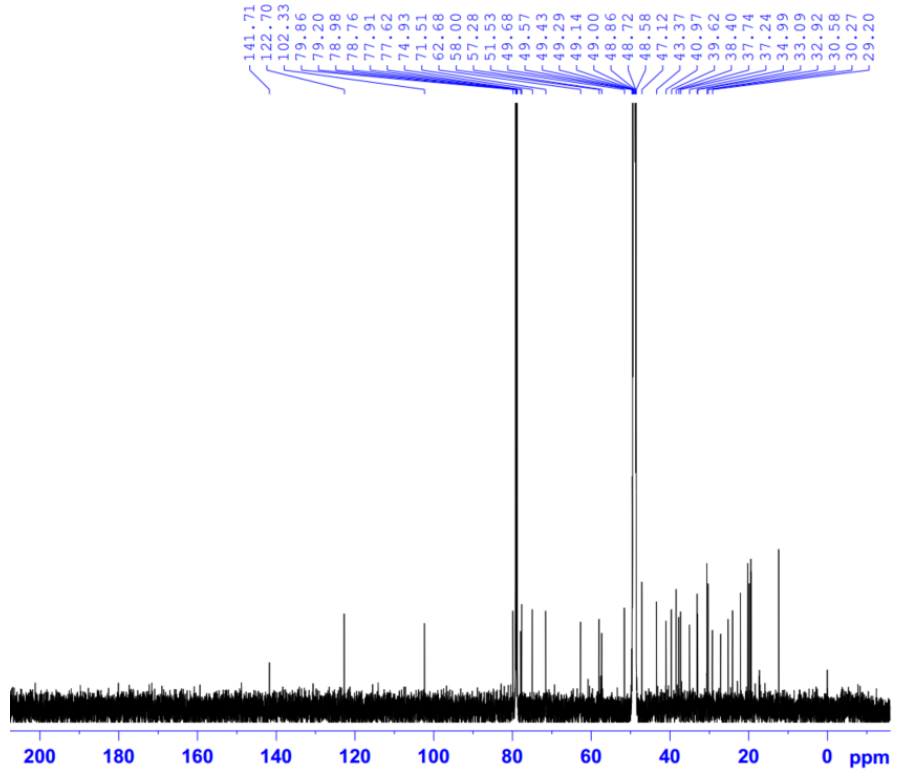


Phụ lục 11. Phổ HMBC giãn rộng của hợp chất MOEA3

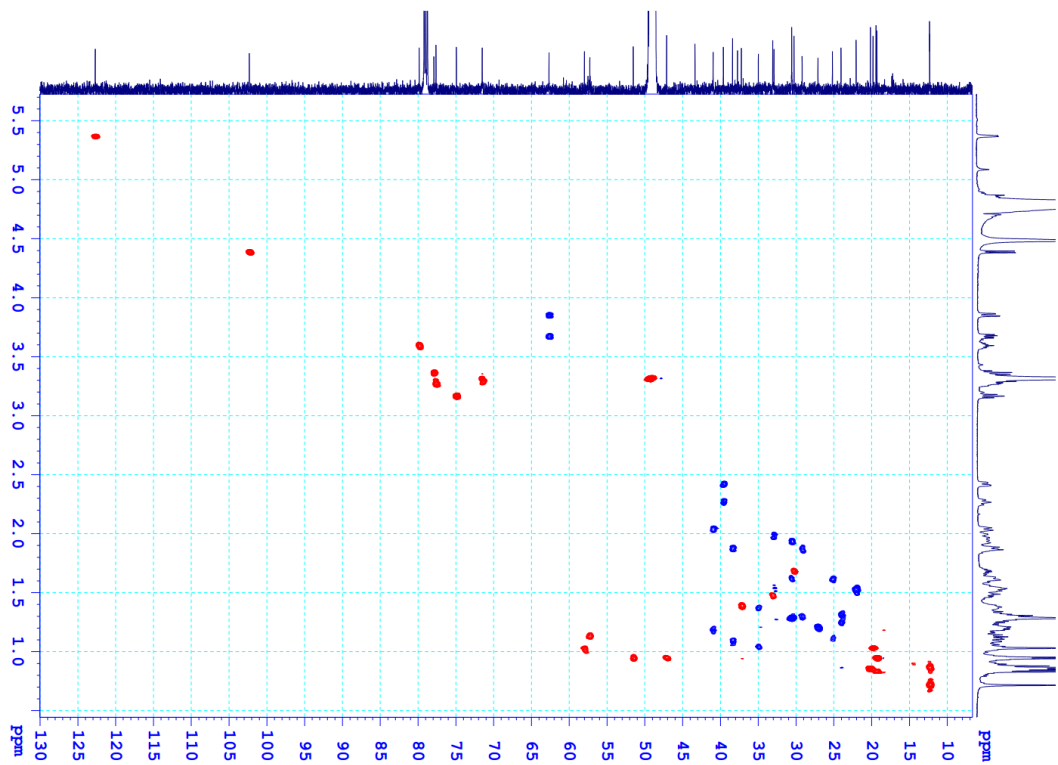


Phụ lục 12. Phổ ¹H NMR của MOE5.1

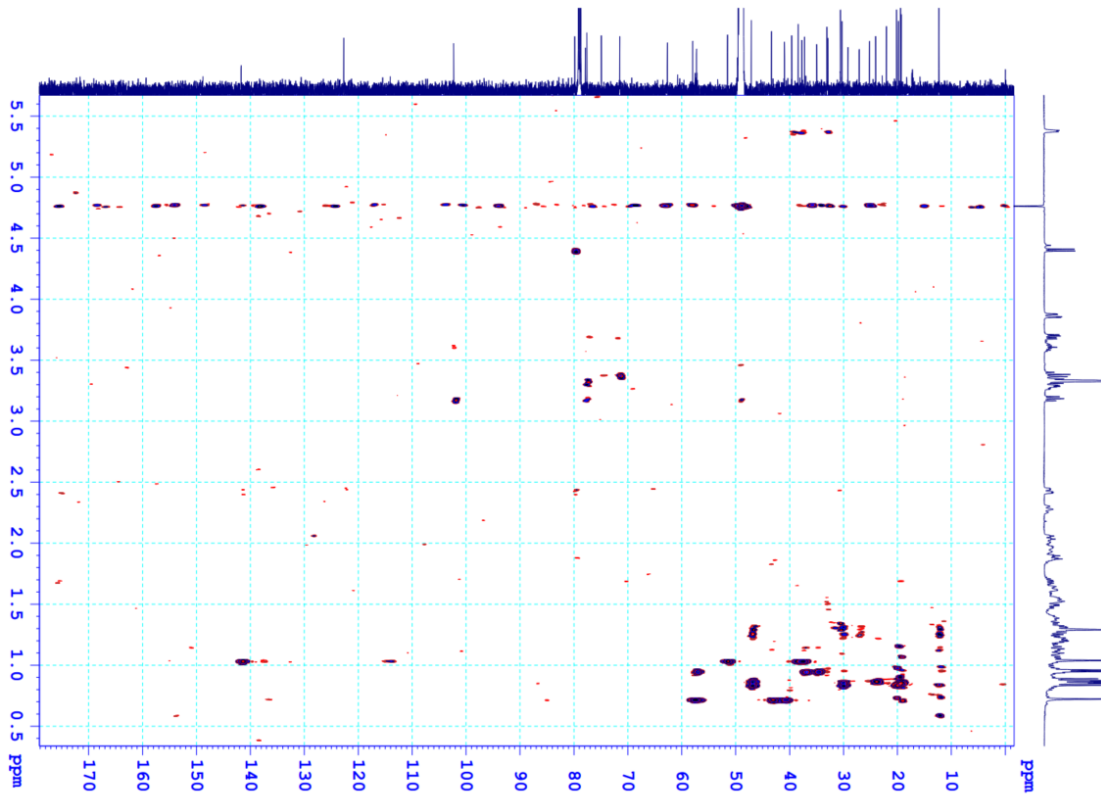
PL7



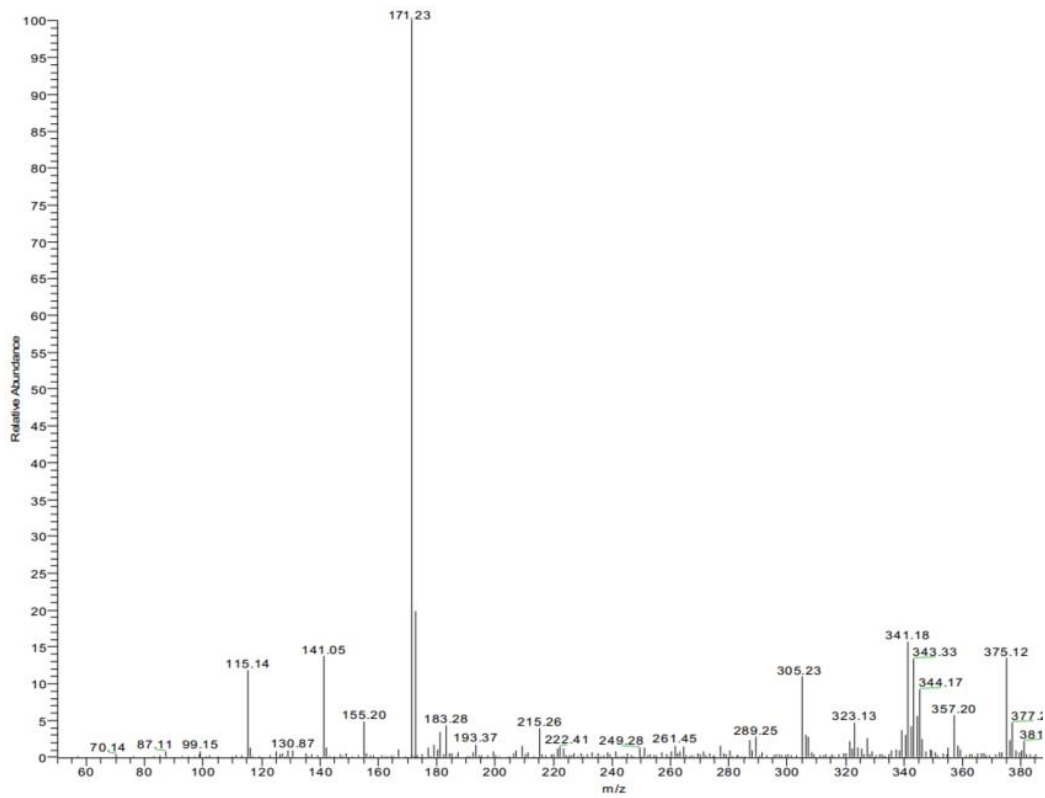
Phụ lục 13. Phổ ^{13}C NMR của MOE5.1



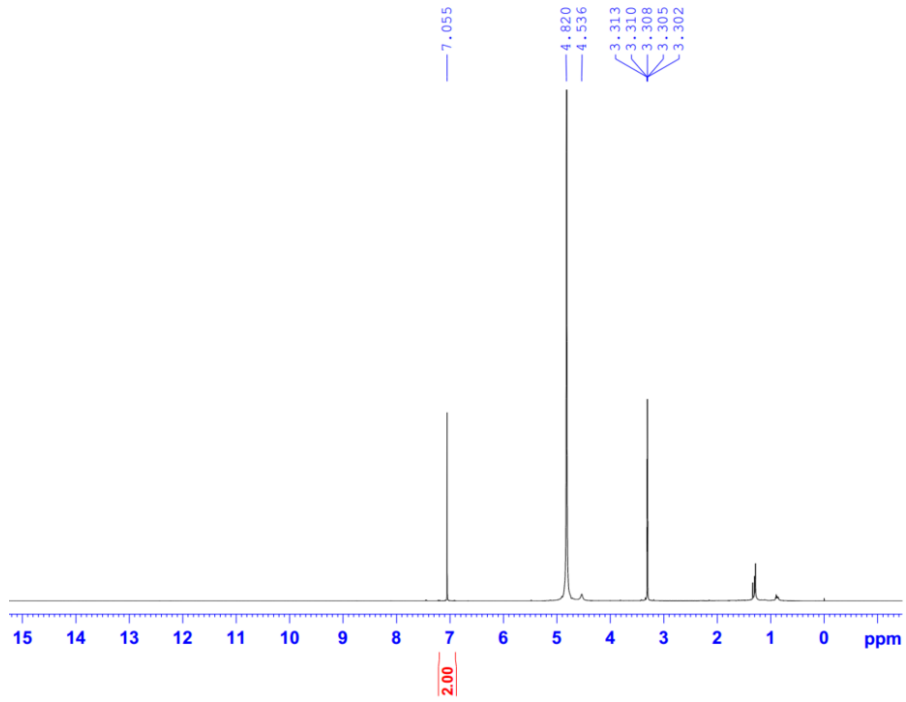
Phụ lục 14. Phổ HSQC của MOE5.1



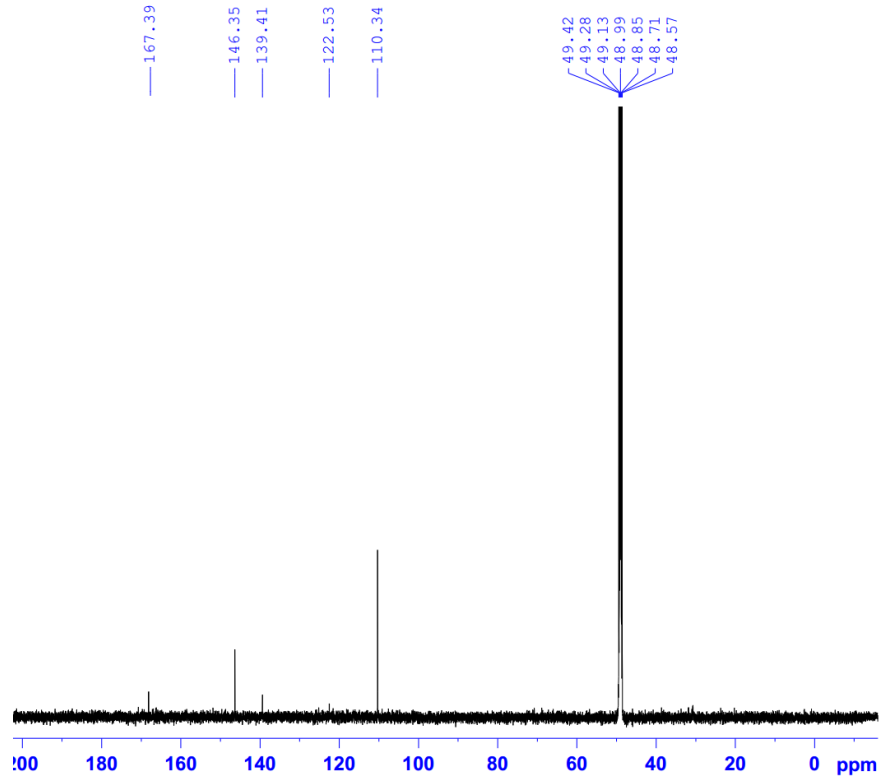
Phụ lục 15. Phổ HMBC của MOE5.1



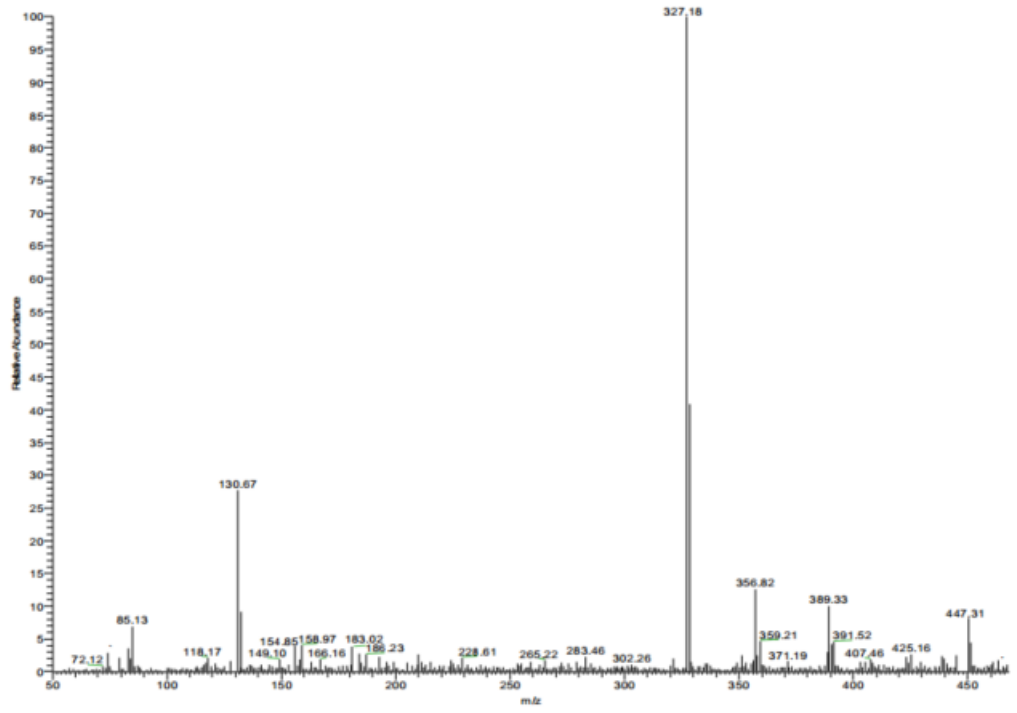
Phụ lục 16. Phổ ESI-MS của MOB4.1



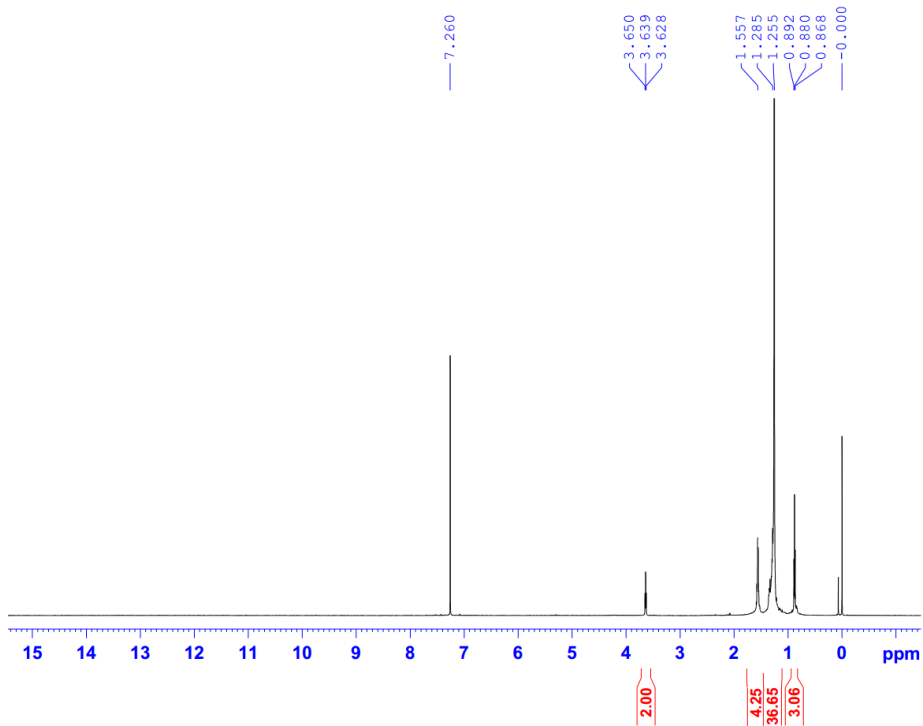
Phụ lục 17. Phổ ^1H NMR của MOB4.1



Phụ lục 18. Phổ ^{13}C NMR của MOB4.1



Phụ lục 19. Phổ ESI-MS của MOE1.2



Phụ lục 20. Phổ ¹H NMR của MOE1.2