

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 Thu Hiền

NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN HÓA HỌC VÀ HOẠT
TÍNH ỨC CHẾ ENZYME α – GLUCOSIDASE,
XANTHINE OXIDASE CỦA CÂY RAU ĐẮNG ĐẤT
[*Glinus oppositifolius* (L.) A. DC.], HỌ RAU ĐẮNG ĐẤT
(Molluginaceae)

LUẬN ÁN TIẾN SĨ KHOA HỌC VẬT CHẤT

Thành phố Hồ Chí Minh - 2025

NGUYỄN THỊ THU HIỀN

HÓA HỮU CƠ

2025

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 Thu Hiền

NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN HÓA HỌC VÀ HOẠT TÍNH ỨC
CHẾ ENZYME α – GLUCOSIDASE, XANTHINE OXIDASE
CỦA CÂY RAU ĐẮNG ĐẤT [*Glinus oppositifolius* (L.) A. DC.],
HỌ RAU ĐẮNG ĐẤT (Molluginaceae)

LUẬN ÁN TIẾN SĨ KHOA HỌC VẬT CHẤT

Ngành: Hóa hữu cơ

Mã số: 9440114

Xác nhận của Học viện
Khoa học và Công nghệ

Người hướng dẫn 1
(Ký, ghi rõ họ tên)

Người hướng dẫn 2
(Ký, ghi rõ họ tên)

PGS.TS Lê Tiến Dũng

PGS.TS Nguyễn Trọng Tuấn

Thành phố Hồ Chí Minh - 2025

MỤC LỤC

DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT	v
DANH MỤC HÌNH	viii
DANH MỤC BẢNG	x
MỞ ĐẦU	1
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU	5
1.1. Tổng quan về bệnh Đái tháo đường.....	5
1.1.1. Định nghĩa và phân loại.....	5
1.1.2. Cơ chế bệnh sinh của bệnh Đái tháo đường	5
1.1.3. Tổng quan về enzyme α -glucosidase	6
1.1.4. Biểu chứng của bệnh Đái tháo đường.....	8
1.1.5. Các thuốc điều trị bệnh Đái tháo đường	8
1.1.6. Tình hình nghiên cứu về cây thuốc có tác dụng hạ đường huyết	9
1.2. Tổng quan về bệnh Gout.....	11
1.2.1. Định nghĩa.....	11
1.2.2. Cơ chế bệnh sinh của Gout	11
1.2.3. Tổng quan về enzyme xanthine oxidase (XO)	12
1.2.4. Điều trị bệnh Gout	13
1.2.5. Tình hình nghiên cứu về cây thuốc có tác dụng hạ acid uric máu	14
1.3. Tổng quan về cây Rau đắng đất.....	15
1.3.1. Sơ lược về cây Rau đắng đất	15
1.3.2. Thành phần hóa học	18
1.3.3. Tác dụng dược lý	23
1.4. Tổng quan về dược lý mạng (Network pharmacology) và docking phân tử	27
1.4.1. Dược lý mạng - Network pharmacology	27
1.4.2. Docking phân tử.....	30
CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	33
2.1. Đối tượng nghiên cứu	33

2.2. Phương pháp nghiên cứu	33
2.2.1. Chiết xuất và phân tách các phân đoạn.....	33
2.2.2. Phân lập các hợp chất	34
2.2.3. Phương pháp xác định cấu trúc hóa học các hợp chất.....	36
2.2.4. Phương pháp đánh giá hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase	36
2.2.5. Phương pháp đánh giá hoạt tính ức chế enzyme xanthine oxidase	37
2.2.6. Phương pháp xử lý số liệu	38
2.2.7. Phương pháp phân tích dược lý mạng (network pharmacology)	39
2.2.8. Phương pháp docking phân tử	41
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	42
3.1. Kết quả thử hoạt tính sinh học của các cao phân đoạn	42
3.1.1. Kết quả thử nghiệm hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase	42
3.1.2. Kết quả thử hoạt tính ức chế enzyme xanthine oxidase	42
3.2. Xác định cấu trúc hóa học các hợp chất phân lập.....	43
3.2.1. Hợp chất G-1: Vicenin 2 (apigenin 6,8-C-di- β -D-glucopyranoside)	43
3.2.2. Hợp chất G-2: Spergulacin (spergulagenin A -3-O-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)]- β -D-xylopyranosid)	45
3.2.3. Hợp chất G-3: Glinosid C (16-O-(β -D-glucopyranosyl)- 3 β ,12 β , 16 β , 21 α , 22-pentahydroxyhopan)	48
3.2.4. Hợp chất G-4: Spergulacin A (spergulagenin A-3-O-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)]- β -D-xylopyranosid).....	50
3.2.5. Hợp chất G-5: Spergulin B (3-O-[α -rhamnopyranosyl (1 $\rightarrow$ 2)- β -D-xylopyranosyl]-spergulatril)	53
3.2.6. Hợp chất G-6: Apigenin-5-O- β -D-glucopyranosyl-8-C- β -D-glucopyranosid (hợp chất mới)	55
3.2.7. Hợp chất G-7: Trifolin (kaempferol-3-O-galactoside)	57
3.2.8. Hợp chất G-8: 3-O- β -D-Xylopyranosyl-spergulagenin A	59
3.2.9. Hợp chất G-9: Spergulin A (3-O-(β -D-xylopyranosyl 3-sulphat)-spergulagenin A).....	61
3.2.10. Hợp chất G-10: Vitexin (8- β -D-glucopyranosyl apigenin)	64
3.2.11. Hợp chất G-11: Spergulin C (Hợp chất mới)	65

3.2.12. Hợp chất G-12: 2''-p-Coumaroylvitexin 7-glucosid”	68
3.2.13. Hợp chất G-13: Kaempferol (3,4',5,7-tetrahydroxyflavone)”	70
3.2.14. Hợp chất G-14: Apigenin (4',5,7-trihydroxyflavone)”	71
3.2.15. Hợp chất G-15: Astragalin (kaempferol-3-O- β -D-glucopyranosid) “ ...	72
3.2.16. Hợp chất G-16: Vanilin (4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyde) “	74
3.2.17. Hợp chất G-17: L-(-)-(N-cis-Cinnamoyl)-arginin (hợp chất mới)”	75
3.2.18. Hợp chất G-18: Acid cinnamic (trans-3-phenylacrylic acid)	77
3.2.19. Hợp chất G-19: Acid trans-ferulic (trans-4-Hydroxy-3-methoxycinnamic acid)	78
3.2.20. Hợp chất G-20: 7-O-Methylwogonin (5-hydroxy-7,8-dimethoxyflavone)	79
3.3. Kết quả thử hoạt tính sinh học của các hợp chất phân lập được	82
3.3.1. Kết quả thử hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase của các hợp chất phân lập được	82
3.3.2. Kết quả thử hoạt tính ức chế enzyme xanthine oxidase của các hợp chất phân lập được	86
3.4. Dự đoán cơ chế tác dụng và hoạt chất quan trọng của Rau đắng đất trong điều trị bệnh Đái tháo đường típ 2	91
3.4.1. Sàng lọc hợp chất và xây dựng mạng lưới hoạt chất – đích tác động (Compound–Target Network)	91
3.4.2. Xây dựng mạng lưới Tương tác Protein – Protein (PPI, Protein – Protein interaction)	95
3.4.3. Phân tích chức năng Gene Ontology (GO)	96
3.4.4. Phân tích con đường sinh hóa KEGG	97
3.4.5. Phân tích docking phân tử	99
3.4.6. Tổng kết cơ chế tác dụng tiềm năng	102
3.5. Dự đoán cơ chế tác dụng và hoạt chất quan trọng của Rau đắng đất trong điều trị bệnh Gout	103
3.5.1. Sàng lọc hợp chất và xây dựng mạng lưới hoạt chất – đích tác động (Compound–Target Network)	103
3.5.2. Xây dựng mạng lưới tương tác Protein – Protein (PPI, Protein – Protein interaction)	105

3.5.3. Phân tích chức năng Gene Ontology (GO).....	105
3.5.4. Phân tích con đường sinh hóa KEGG.....	107
3.5.5. Phân tích docking phân tử	108
3.5.6. Tổng kết cơ chế tác dụng tiềm năng	110
CHƯƠNG 4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	112
4.1. Kết luận.....	112
4.2. Kiến nghị.....	113
DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ	114
TÀI LIỆU THAM KHẢO	115

DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

Chữ tắt	Chữ nguyên	Ý nghĩa
^{13}C -NMR	Carbon -13 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân carbon 13
^1H -NMR	Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân proton
ADMET	Absorption–Distribution–Metabolism–Excretion–Toxicity	Hấp thu – phân bố – chuyển hóa – thải trừ – Độc tính
AGE-RAGE	Advanced Glycation End-products – Receptor for AGE	Sản phẩm glycat hóa bền vững – Thụ thể của AGE
AKT1	AKT Serine/Threonine Kinase 1	Kinase serine/threonine AKT1
ALB	Albumin	Albumin (loại protein chính trong huyết tương)
BC	Betweenness Centrality	Bậc trung tâm giữa
BP (GO)	Biological Process	Quá trình sinh học
CC	Closeness centrality	Bậc trung tâm gần
CC (GO)	Cellular Component	Thành phần tế bào
COSY	Correlation Spectroscopy	Phổ COSY
CTPT		Công thức phân tử
DC	Degree Centrality	Bậc trung tâm trực tiếp
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarisation Transfer Spectroscopy	Phổ DEPT
DMSO	Dimethylsulfoxide	$(\text{CH}_3)_2\text{SO}$
DPPH	1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl	1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor	Thụ thể có yếu tố tăng trưởng biểu bì
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor	Thụ thể yếu tố tăng trưởng biểu bì

EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor	Thụ thể yếu tố tăng trưởng biểu bì
EtOAc	Ethyl acetate	
GLUT9	Glucose transporter 9	Chất vận chuyển glucose 9
GO	Gene Ontology	Bản thể học gen
HIF-1	Hypoxia-Inducible Factor 1	Yếu tố cảm ứng bởi thiếu oxy 1
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Connectivity Spectroscopy	Phổ tương tác dị hạt nhân qua nhiều liên kết
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	Sắc ký lỏng hiệu năng cao
HR-APCI-MS	High Resolution -Atmospheric Pressure Chemical Ionization-Mass Spectrometry	Phổ khối lượng phân giải cao ion hóa hóa học tại áp suất khí quyển
HR-ESI-MS	High Resolution Electrospray Ionization Mass Spectrometry	Phổ khối lượng phân giải cao phun mù điện tử
HSQC	Heteronuclear Single-Quantum Coherence Spectroscopy	Phổ tương tác dị hạt nhân qua 1 liên kết
IC50	Inhibitory concentration at 50%	Nồng độ ức chế 50% đối tượng thử nghiệm
IL6	Interleukin 6	
IL6	Interleukin 6	Interleukin 6 (một loại protein điều hòa miễn dịch)
IR	Infrared spectroscopy	Phổ hồng ngoại
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes	Bách khoa toàn thư về gen và bộ gen của Kyoto
MF (GO)	Molecular function	Chức năng phân tử
OAT1	Organic anion transporter 1	Chất vận chuyển anion hữu cơ 1
PI3K-Akt	Phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (AKT)	
PPARG	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma	

PPARG	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma	Thụ thể gamma hoạt hóa bởi chất tăng sinh peroxisome
PPI	Protein – Protein interaction	Tương tác protein - protein
ROS	Reactive oxygen species	Các loại oxy phản ứng
SRC	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src	Kinase tyrosine Src (gen sinh ung nguyên mẫu)
STAT3	Signal Transducer and Activator of Transcription 3	Bộ chuyển tín hiệu và hoạt hóa phiên mã 3
TNF	Tumor Necrosis Factor	Yếu tố hoại tử khối u
TNF	Tumor Necrosis Factor	Yếu tố hoại tử khối u
TP53	Tumor Protein p53	Protein khối u p53
UPLC-HRMS	Ultra-Performance Liquid Chromatography – High-Resolution Mass Spectrometry	Sắc ký lỏng hiệu năng siêu cao – Phổ khối độ phân giải cao
URAT1	Urate transporter 1	Chất vận chuyển urat 1

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1.	Cấu trúc của phân tử α -glucosidase (PDB ID: 2QLY).....	7
Hình 1.2.	Quá trình chuyển hóa purin trong cơ thể	11
Hình 1.3.	Cấu trúc của enzyme xanthine oxidase (PDB ID: 1FIQ) [35].....	12
Hình 1.4.	Cây Rau đắng đất	17
Hình 1.5.	Cấu trúc một số flavonoid có trong Rau đắng đất	19
Hình 1.6.	Cấu trúc một số saponin có trong Rau đắng đất	22
Hình 1.7.	Cấu trúc các hợp chất khác có trong Rau đắng đất.....	23
Hình 2.1.	Hình ảnh mẫu cây Rau đắng đất	33
Hình 2.2.	Sơ đồ quy trình chiết phân bố	34
Hình 2.3.	Sơ đồ phân lập các hợp chất từ cây Rau đắng đất	1
Hình 2.4.	Phản ứng thủy phân của enzyme α -glucosidase	36
Hình 3.1.	Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC chính của hợp chất G-1	43
Hình 3.2.	Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC, COSY của G-2	45
Hình 3.3.	Công thức cấu tạo và tương tác HMBC, COSY của hợp chất G-3	48
Hình 3.4.	Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC, COSY của G-4	50
Hình 3.5.	Cấu trúc hóa học và một số tương tác HMBC chính của hợp chất G-5	53
Hình 3.6.	Cấu trúc hóa học và một số tương tác HMBC của G-6	55
Hình 3.7.	Cấu trúc hóa học và một số tương tác HMBC, COSY của G-7	57
Hình 3.8.	Cấu trúc hóa học và một số tương tác HMBC, COSY của G-8	59
Hình 3.9.	Cấu trúc hóa học và một số tương tác HMBC của G-9	61
Hình 3.10.	Cấu trúc hóa học của hợp chất G-10	64
Hình 3.11.	Cấu trúc hóa học và một số tương tác HMBC của G-11	65
Hình 3.12.	Cấu trúc hóa học và một số tương tác HMBC, COSY của G-12	68
Hình 3.13.	Cấu trúc hóa học và một số tương tác HMBC của G-13	70
Hình 3.14.	Cấu trúc hóa học và một số tương tác HMBC của G-14	71
Hình 3.15.	Cấu trúc hóa học và một số tương tác HMBC và COSY của G-15	72

Hình 3.16.	Cấu trúc hóa học và một số tương tác HMBC của G-16	74
Hình 3.17.	Cấu trúc hóa học và một số tương tác HMBC, COSY của G-17	75
Hình 3.18.	Cấu trúc hóa học và một số tương tác HMBC, COSY của G-18	77
Hình 3.19.	Cấu trúc hóa học và một số tương tác HMBC, COSY của G-19	78
Hình 3.20.	Cấu trúc hóa học và một số tương tác HMBC chính của G-20	79
Hình 3.21.	Liên quan cấu trúc - tác dụng ức chế enzyme α -glucosidase	86
Hình 3.22.	Biểu đồ Venn của <i>Glinus oppositifolius</i> và Đái tháo đường típ 2	95
Hình 3.23.	Mạng lưới hoạt chất – đích tác động.	95
Hình 3.24.	Mạng PPI Rau đắng đất – Đái tháo đường típ 2.	96
Hình 3.25.	Biểu đồ phân tích chức năng GO các gene tiềm năng của Rau đắng đất trong điều trị Đái tháo đường típ 2.....	97
Hình 3.26.	Biểu đồ 20 con đường sinh hóa khi phân tích Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG).....	98
Hình 3.27.	Sơ đồ con đường đề kháng ức chế tyrosine kinase EGFR (hsa01521, EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance)	99
Hình 3.28.	Các tư thế gắn kết của phức hợp protein – ligand có năng lượng liên kết mạnh nhất.....	102
Hình 3.29.	Biểu đồ Venn của <i>Glinus oppositifolius</i> và Gout	103
Hình 3.30.	Mạng lưới hoạt chất – đích tác động..	104
Hình 3.31.	Mạng PPI Rau đắng đất –Gout.	105
Hình 3.32.	Biểu đồ phân tích chức năng GO các gene tiềm năng của Rau đắng đất trong điều trị Gout..	106
Hình 3.33.	Biểu đồ 20 con đường sinh hóa khi phân tích Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG).....	107
Hình 3.34.	Sơ đồ con đường tín hiệu PI3K-Akt (hsa04151, PI3K-Akt signaling pathway).....	108
Hình 3.35.	Các tư thế gắn kết của phức hợp protein – ligand có năng lượng liên kết mạnh nhất.....	110

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1.	Các thuốc viên hạ glucose máu đường uống và thuốc tiêm không thuộc nhóm insulin [24].....	9
Bảng 1.2.	Các dược liệu có tác dụng chống Đái tháo đường và cơ chế tác dụng	Error! Bookmark not defined.
Bảng 1.3.	Các thuốc điều trị bệnh Gout	13
Bảng 1.4.	Tác động của một số dược liệu trong hạ acid uric [39]	14
Bảng 1.5.	MIC ₅₀ của các glinusooposid và terbinafin hydrochlorid.....	26
Bảng 1.6.	Ứng dụng dược lý mạng lưới trong y học Trung Hoa	30
Bảng 3.1.	Kết quả hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase của các cao phân đoạn của cây Rau đắng đất.....	42
Bảng 3.2.	Kết quả thử nghiệm hoạt tính ức chế enzyme xanthine oxidase của các cao phân đoạn của cây Rau đắng đất.....	43
Bảng 3.3.	Dữ liệu phổ NMR của G-1 và vicenin 2.....	44
Bảng 3.4.	Dữ liệu phổ NMR của G-2 và spergulacin	46
Bảng 3.5.	Dữ liệu phổ NMR của G-3 với glinosid C	49
Bảng 3.6.	Dữ liệu phổ NMR của G-4 với spergulacin A.....	51
Bảng 3.7.	Dữ liệu phổ NMR của G-5 và spergulin B.....	54
Bảng 3.8.	Dữ liệu phổ NMR của hợp chất G-6	56
Bảng 3.9.	Dữ liệu phổ NMR của G-7 và trifolin	58
Bảng 3.10.	Dữ liệu phổ NMR của G-8 và 3- <i>O</i> -(β -D-xylopyranosyl 3-sulphat)-spergulagenin A	60
Bảng 3.11.	Dữ liệu phổ NMR của G-9 và spergulin A.....	62
Bảng 3.12.	Dữ liệu phổ NMR của G-10 và vitexin	64
Bảng 3.13.	Dữ liệu phổ NMR của G-11 và spergulin A.....	66

Bảng 3.14. Dữ liệu phổ NMR của G-12 và 2''- <i>p</i> -coumaroylvitexin 7-glucosid.....	69
Bảng 3.15. Dữ liệu phổ NMR của G-13 và kaempferol“	71
Bảng 3.16. Dữ liệu phổ NMR của G-14 và apigenin.....	72
Bảng 3.17. Dữ liệu phổ NMR của G-15 và astragalin.....	73
Bảng 3.18. Dữ liệu phổ NMR của G-16 và vanilin	74
Bảng 3.19. Dữ liệu phổ NMR của G-17 và L-(-)-(N- <i>trans</i> -cinnamoyl)-arginin	76
Bảng 3.20. Dữ liệu phổ NMR của G-18 và acid cinnamic	77
Bảng 3.21. Dữ liệu phổ NMR của G-19 và acid <i>trans</i> -ferulic.....	78
Bảng 3.22. Dữ liệu phổ NMR của G-20 và 7-O-methylwogonin”.....	80
Bảng 3.23. Tổng hợp cấu trúc các hợp chất phân lập được	80
Bảng 3.24. Kết quả thử hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase của các hợp chất phân lập được từ cây Rau đắng đất.....	82
Bảng 3.25. Kết quả thử hoạt tính ức chế emzym xanthine oxidase của các hợp chất phân lập được từ cây Rau đắng đất.....	86
Bảng 3.26. Các hợp chất trong cây Rau đắng đất được xác định từ UPLC – HRMS..	92
Bảng 3.27. Danh sách 34 hợp chất của cây Rau đắng đất được dự đoán đích tác động”	94
Bảng 3.28. Năng lượng gắn kết giữa hoạt chất quan trọng và đích tác động tiềm năng	100
Bảng 3.29. Năng lượng gắn kết giữa hoạt chất quan trọng và đích tác động tiềm năng	109
Bảng 3.30. Tóm tắt kết quả dự đoán cơ chế tác dụng và hoạt chất quan trọng của Rau đắng đất trong điều trị bệnh Đái tháo đường týp 2 và Gout	111

MỞ ĐẦU

1. Lý do chọn đề tài

Xanthine oxydase (XO) đóng một vai trò quan trọng trong quá trình oxy hóa xúc tác hypoxanthine thành xanthine và xanthine thành acid uric trong quá trình phân hủy purin [1]. Hoạt động quá mức của XO có khả năng làm tăng nồng độ acid uric trong máu, dẫn đến bệnh Gout [2]. Do đó, ức chế hoạt động XO được đề xuất như một phương pháp điều trị đầy hứa hẹn không chỉ để điều trị chứng tăng acid uric máu mà còn đối với nhiều bệnh khác liên quan đến các loại oxy hoạt động (ROS)[3]. Một số nghiên cứu dịch tễ học quy mô lớn cho thấy bệnh Gout có liên quan đến việc tăng nguy cơ mắc bệnh Đái tháo đường. Cả bệnh Gout và Đái tháo đường đều là yếu tố nguy cơ của bệnh tim mạch và tử vong [4]. Đái tháo đường là một tình trạng bệnh lý dai dẳng được đặc trưng bởi nồng độ glucose trong máu tăng do sản xuất hoặc sử dụng insulin không đủ. Một cuộc khảo sát trên toàn thế giới cho thấy bệnh Đái tháo đường đang ảnh hưởng đến gần 12% dân số mỗi năm [5]. Điều này đã dẫn đến nhu cầu về chiến lược điều trị bệnh Đái tháo đường ngày càng tăng. Trong những thập kỷ qua, các sản phẩm tự nhiên đã nhận được sự chú ý ngày càng tăng như là lựa chọn điều trị thay thế do phạm vi hoạt động được phẩm đa dạng và giảm sự xuất hiện của tác dụng phụ. Các sản phẩm tự nhiên là nguồn phát triển thuốc không ngừng nghỉ và nhiều loại thực vật đã được chứng minh là có hiệu quả trong điều trị bệnh Đái tháo đường và Gout.

Việt Nam nằm trong vùng khí hậu nhiệt đới gió mùa nên có hệ thực vật phong phú, đa dạng, nhiều loài trong số đó từ lâu đã được sử dụng để phòng và/hoặc chữa bệnh. Đây là nguồn nguyên liệu vô cùng quý giá cho các nghiên cứu hiện đại về hợp chất tự nhiên và hoạt tính sinh học. Để có thể khai thác tốt nguồn tài nguyên này, cần có nghiên cứu một cách hệ thống về thực vật, thành phần hóa học và tác dụng sinh học của cây thuốc. Trong đó, Rau đắng đất là dược liệu phổ biến ở miền nam Việt Nam. Theo Y học cổ truyền, toàn cây Rau đắng đất có vị đắng, tính mát, quy vào kinh can, thận nên thường được sử dụng trong các bài thuốc lợi tiêu hóa, nhuận gan, ích mật, thanh nhiệt, lợi tiểu, giải độc... Trong các nghiên cứu gần đây, Rau đắng đất còn có các tác dụng dược lý như tác dụng trên hệ miễn dịch [6], bảo vệ gan [7], kháng khuẩn [8], kháng nấm [9], hạ lipid huyết, hạ glucose huyết [10], chống oxy hóa [11].... Tuy nhiên, có rất ít thông tin về đặc tính ức chế xanthine oxidase và α -glucosidase của cao chiết cũng như các chất phân lập từ loài *G. oppositifolius*.

Những năm gần đây, dược lý mạng (network pharmacology) đã trở thành xu hướng

mới trong nghiên cứu phát triển thuốc, tìm hiểu cơ chế của thuốc với nhiều mục tiêu, cải thiện tính an toàn và hiệu quả của các loại thuốc hiện có. Dược lý mạng xuất hiện như một công cụ quan trọng trong việc hiểu các mối quan hệ phức tạp cơ bản giữa thảo dược và toàn bộ cơ thể [12]. Cho đến nay các hoạt chất và tác dụng điều trị bệnh Đái tháo đường và Gout của Rau đắng đất vẫn chưa được nghiên cứu bằng phương pháp dược lý mạng.

Vì vậy, với mong muốn tìm kiếm các hoạt chất mới ứng dụng trị bệnh trong Y Dược từ nguồn nguyên liệu thiên nhiên và dự đoán cơ chế tác dụng nhằm nâng cao giá trị sử dụng cũng như góp phần vào kho tàng cây thuốc của Việt Nam, chúng tôi tiến hành đề tài “Nghiên cứu thành phần hóa học và hoạt tính ức chế enzyme α – glucosidase, xanthine oxidase của cây rau đắng đất [*Glinus oppositifolius* (L.) A. DC.], họ Rau đắng đất (Molluginaceae)”

2. Mục tiêu nghiên cứu

- Đánh giá được tác động ức chế enzyme α –glucosidase và enzyme xanthine oxidase của các cao phân đoạn
- Phân lập, tinh chế và xác định được cấu trúc một số hợp chất có hoạt tính ức chế enzyme α –glucosidase và enzyme xanthine oxidase từ cây Rau đắng đất
- Đánh giá được tác động ức chế enzyme α –glucosidase và enzyme xanthine oxidase của các chất phân lập được
- Phân tích, dự đoán cơ chế tác dụng của Rau đắng đất trong điều trị bệnh Đái tháo đường típ 2 và Gout sử dụng phương pháp dược lý mạng và docking.

3. Nội dung nghiên cứu

- Chiết xuất và điều chế cao tổng và các cao phân đoạn
- Khảo sát hoạt tính ức chế enzyme α –glucosidase và xanthine oxidase của cao phân đoạn
- Phân lập và tinh chế các hợp chất từ phân đoạn có hoạt tính
- Xác định cấu trúc các chất tinh khiết phân lập được
- Thử nghiệm hoạt tính ức chế enzyme α –glucosidase và xanthine oxidase của các chất tinh khiết phân lập được
- Phân tích dược lý mạng cơ chế tác dụng của Rau đắng đất trong điều trị bệnh Đái tháo đường típ 2. Docking phân tử giữa hoạt chất quan trọng và đích tác động tiềm năng.
- Phân tích dược lý mạng cơ chế tác dụng của Rau đắng đất trong điều trị bệnh Gout. Docking phân tử giữa hoạt chất quan trọng và đích tác động tiềm năng.

4. Ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài

Ý nghĩa khoa học

Đề tài đóng góp những dữ liệu khoa học mới về thành phần hóa học và hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase và enzyme xanthine oxidase của cây Rau đắng đất nhằm tạo cơ sở khoa học cho việc khai thác sử dụng hợp lý, hiệu quả. Đây là nghiên cứu đầu tiên tìm hiểu hợp chất tiềm năng và cơ chế tác dụng của Rau đắng đất định hướng điều trị bệnh đái tháo đường týp 2 và Gout ứng dụng dược lý mạng - giúp tiết kiệm thời gian, chi phí cho việc tìm kiếm hoạt chất và cơ chế tác dụng của thuốc, rộng hơn là cho quá trình nghiên cứu phát triển thuốc. Từ đó cung cấp thêm thông tin về loại thảo dược tiềm năng này và tạo tiền đề cho các nghiên cứu dược lý và kiểm nghiệm trong tương lai sử dụng cây thuốc này cho mục đích điều trị.

Ý nghĩa thực tiễn

Kết quả đề tài làm sáng tỏ những minh chứng khoa học về tác dụng hạ đường huyết và hạ acid uric của cây Rau đắng đất. Đồng thời cung cấp dữ liệu ban đầu về tiềm năng ứng dụng để phát triển các sản phẩm an toàn và hiệu quả từ cây Rau đắng đất trong phòng chống Đái tháo đường và Gout; Đóng góp đáng kể vào việc bảo vệ sức khỏe nói chung và trong việc tìm kiếm các cấu trúc có tác dụng dược lý nói riêng.

Những đóng góp mới của luận án

- Đây là nghiên cứu đầu tiên về hoạt tính ức chế xanthine oxidase của cây Rau đắng đất (*Glinus oppositifolius*). Cao còn toàn phần của cây Rau đắng đất thể hiện hoạt tính ức chế enzyme xanthine oxidase với $IC_{50} = 130,56 \pm 3,79 \mu\text{g/mL}$, cao EtOAc và BuOH thể hiện hoạt tính ức chế enzyme xanthine oxidase tốt với IC_{50} lần lượt là $29,67 \pm 1,02 \mu\text{g/mL}$ và $83,16 \pm 0,27 \mu\text{g/mL}$.
- Đã phân lập và xác định được 3 hợp chất mới từ phần trên mặt đất của loài *Glinus oppositifolius* là: **G-6** (apigenin-5-*O*- β -D-glucopyranosyl-8-*C*- β -D-glucopyranoside), **G-11** (spergulin C), **G-17** (L-(-)-(N-*cis*-cinnamoyl)-arginin). Trong đó hai hợp chất **G-11** và **G-6** thể hiện hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase với IC_{50} tương ứng là $31,23 \pm 0,45 \mu\text{M}$ và $257,90 \pm 1,00 \mu\text{M}$. Hợp chất **G-17** thể hiện hoạt tính ức chế enzyme xanthine oxidase với $IC_{50} = 178,02 \pm 1,65 \mu\text{M}$.
- Lần đầu tiên phân lập được hợp chất **G-20** (7-*O*-methylwogonin) từ phần trên mặt đất của loài *Glinus oppositifolius*. Đồng thời đây cũng là nghiên cứu đầu tiên thử nghiệm hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase và xanthine oxidase của hợp chất 7-*O*-methylwogonin. Kết quả cho thấy hợp chất **G-20** (7-*O*-methylwogonin) thể hiện hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase tốt với $IC_{50} = 94,92 \pm 1,85 \mu\text{M}$, và không thể hiện hoạt tính ức chế enzyme xanthine oxidase.

- Đây là nghiên cứu đầu tiên ứng dụng dược lý mạng để tìm hiểu hợp chất tiềm năng và cơ chế tác dụng định hướng điều trị bệnh Đái tháo đường tít 2 của cây Rau đắng đất. Cơ chế tác dụng chính của Rau đắng đất trên bệnh Đái tháo đường tít 2 được dự đoán là giảm đề kháng insulin (thông qua tác động đến AKT1, PPARG và con đường EGFR resistance), giảm biến chứng Đái tháo đường (thông qua tác động đến con đường AGE-RAGE, HIF-1, và STAT3), kháng viêm – chống oxy hóa (nhắm đến các đích TNF, IL6, TP53). Các hoạt chất chính là 3-oxo-olean-12-ene-28,30-dioic acid; 6,8-dimethyl-5,7,4'-trihydroxyflavon; 7-hydroxy-5-methoxy-6,8-dimethylflavon. Quá trình docking phân tử giữa các hoạt chất quan trọng của Rau đắng đất và mục tiêu tiềm năng trong điều trị bệnh Đái tháo đường tít 2 đã giúp xác minh sự chính xác của dự đoán dược lý mạng.

- Đây là nghiên cứu đầu tiên ứng dụng dược lý mạng để tìm hiểu hợp chất tiềm năng trong điều trị bệnh gout và cơ chế là giảm viêm mạn tính (thông qua các đích IL6, TNF, TP53 và con đường PI3K-Akt), chống oxy hóa – giảm acid uric (qua tác động đến TP53 và điều hòa hoạt động SLC2A9), giảm rối loạn lipid máu và nguy cơ biến chứng tim mạch. Các hoạt chất quan trọng nhất là acid *trans*-ferulic; 7-hydroxy-5-methoxy-6,8-dimethylflavon; lutein. Quá trình docking phân tử giữa các hoạt chất quan trọng của Rau đắng đất và mục tiêu tiềm năng trong điều trị bệnh Gout đã giúp xác minh sự chính xác của dự đoán dược lý mạng.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

1.1. Tổng quan về bệnh Đái tháo đường

1.1.1. Định nghĩa và phân loại

Đái tháo đường là bệnh chuyển hóa không đồng nhất, đặc trưng bởi tình trạng tăng đường huyết do khiếm khuyết về tiết insulin, về tác động của insulin hoặc cả hai. Tăng đường huyết mãn tính kéo dài có thể gây rối loạn chuyển hóa glucid, lipid, protid và gây tổn thương cho nhiều cơ quan khác nhau, đặc biệt là tim và mạch máu, mắt và hệ thần kinh, thận [13].

Đái tháo đường là một trong những nguyên nhân hàng đầu dẫn đến tử vong trên toàn cầu. Để duy trì sức khỏe và nâng cao chất lượng cuộc sống, việc chẩn đoán, phát hiện sớm và điều trị bệnh cần tuân thủ đúng các nguyên tắc cần thiết.

Đái tháo đường được chia thành 4 loại chính (American Diabetes Association-ADA 2021) [13]:

- Đái tháo đường týp 1: Xuất hiện do sự phá hủy tế bào beta của tuyến tụy, dẫn đến thiếu hụt insulin một cách tuyệt đối.
- Đái tháo đường týp 2: Hình thành bởi sự suy giảm chức năng của tế bào beta tuyến tụy, tiến triển trên nền đề kháng insulin
- Đái tháo đường thai kỳ: Được chẩn đoán vào giai đoạn giữa hoặc cuối thai kỳ, không có bằng chứng của đái tháo đường týp 1 hay týp 2 trước đó
- Các thể bệnh chuyên biệt của đái tháo đường: Do các nguyên nhân khác như đái tháo đường sơ sinh, hoặc đái tháo đường do tác động của thuốc và hóa chất (ví dụ: sử dụng glucocorticoid, điều trị HIV/AIDS, hoặc sau ghép mô)

1.1.2. Cơ chế bệnh sinh của bệnh Đái tháo đường

Cơ chế bệnh sinh của đái tháo đường týp 1

Đái tháo đường týp 1 là kết quả của sự phá hủy các tế bào beta đảo tụy thông qua hệ thống trung gian miễn dịch, dẫn đến tình trạng thiếu hụt insulin. Nhiều yếu tố di truyền và môi trường được tìm thấy trong các sự kết hợp khác nhau ở từng bệnh nhân có liên quan đến sự phát triển của bệnh [14].

Các yếu tố di truyền như các cá thể có biểu hiện quá mức kháng nguyên bạch cầu người HLA DR4, DQ8 và DQ2 làm tăng tính nhạy cảm của chúng hiện diện ở khoảng 90% bệnh nhân đái tháo đường týp 1. Những yếu tố này, cùng với một hoặc nhiều yếu tố môi trường như virus, vị trí địa lý, tuổi, cân nặng, chế độ ăn uống và tập luyện, dẫn đến việc hệ thống miễn dịch nhầm lẫn nhận dạng các thành phần tế bào beta là vật lạ và phá hủy gây ra các tổn thương vĩnh viễn. Phá hủy tiến triển qua thời gian

đến khi khối lượng tế bào beta giảm tới điểm mà nồng độ insulin không đủ để kiểm soát nồng độ glucose huyết tương [15].

Cơ chế bệnh sinh của đái tháo đường týp 2

Đái tháo đường týp 2 đặc trưng bởi tình trạng tăng đường huyết, kháng insulin và suy giảm tương đối khả năng bài tiết insulin của cơ thể. Sự giảm tiết insulin đáp ứng với glucose chủ yếu do tác động của tăng glucose máu, làm tổn thương tế bào beta tụy. Về kháng insulin, đây là hiện tượng các cơ quan đích mất hoặc suy giảm độ nhạy cảm đối với insulin. Cơ chế gây ra kháng insulin bao gồm sự rối loạn chức năng của các thụ thể insulin, bất thường trong con đường truyền tín hiệu từ thụ thể, cũng như các vấn đề liên quan đến vận chuyển hoặc chuyển hóa glucose. Kháng insulin không chỉ là yếu tố dự báo mạnh mẽ nhất về sự phát triển của bệnh tiểu đường týp 2 trong tương lai mà còn là mục tiêu điều trị khi có tình trạng tăng đường huyết [16].

Các yếu tố môi trường cũng đóng vai trò lớn vào sự phát triển của bệnh Đái tháo đường týp 2 như béo phì, lười vận động, chế độ ăn dư thừa chất béo, căng thẳng, stress và tuổi cao. Hầu hết bệnh nhân mắc bệnh Đái tháo đường týp 2 bị béo phì và đại dịch béo phì toàn cầu phần lớn giải thích sự gia tăng đáng kể tỷ lệ mắc bệnh Đái tháo đường loại 2 trong những năm qua [17]. Ở những người béo phì, mô mỡ giải phóng lượng acid béo không ester hóa, glycerol, hormone, cytokine gây viêm và các yếu tố khác có liên quan đến sự phát triển tình trạng kháng insulin. Khi tình trạng kháng insulin đi kèm với rối loạn chức năng của tế bào beta đảo tụy - tế bào giải phóng insulin - dẫn đến không kiểm soát được lượng đường trong máu [18].

1.1.3. Tổng quan về enzyme α -glucosidase

Alpha glucosidase (EC.3.2.1.20) có tên gọi khác nhau như: Glucoinvertase, α -D-glucosidase, α -glucosidase hydrolase, α -1,4-glucosidase, maltase, glucosidoinvertase, maltase glucoamylase, glucosidosucrase, nitrophenyl- α -D-glucosidase, transglucosidase, glucosidoinvertase,

α -glucosidase là một enzyme nằm trên màng bàn chải ruột non, đóng vai trò cơ bản trong quá trình tiêu hóa carbohydrate. Cơ chế là cắt đứt liên kết α -D-1,4 glucose đầu không khử. Hoạt động của α -glucosidase tăng dần từ tá tràng, đạt mức cao nhất tại hồi tràng. Bên cạnh sự hiện diện ở ruột non, α -glucosidase cũng được phát hiện trong biểu mô thận [19].

Enzyme α -glucosidase gồm hai tiểu phần: tiểu phần N tận và tiểu phần C tận (Hình 1.1). Cả hai tiểu đơn vị này đều có khối lượng phân tử khoảng 100 kDa và thuộc nhóm GH31, phân nhóm 1, nhờ sự hiện diện của chuỗi WiDMNE tại trung tâm xúc tác [20; 21].



Hình 1.1. Cấu trúc của phân tử α -glucosidase (PDB ID: 2QLY)

Chế độ ăn của con người phụ thuộc nhiều vào tinh bột thực vật như nguồn cung cấp glucose- một chất chuyển hóa quan trọng trong quá trình chuyển hóa năng lượng. Các loại tinh bột đều bao gồm hai thành phần cấu trúc chính: amylose- một chuỗi bao gồm các đơn vị glucose liên kết $\alpha(1-4)$ và amylopectin - một phân tử phân nhánh lớn hơn với các liên kết $\alpha(1-4)$ và $\alpha(1-6)$. Ở người, các loại enzyme tham gia vào quá trình tiêu hóa hoàn toàn tinh bột thành glucose gồm: α -amylase nước bọt và tuyến tụy (EC 3.2.1.1) cắt các liên kết $\alpha(1-4)$ bên trong tinh bột thành các chuỗi dextrin ngắn hơn. Hỗn hợp dextrin thu được sau đó được thủy phân thành glucose bởi enzyme α -glucosidase (EC 3.2.1.20) ở viên bào chải ruột non, enzyme glucoamylase (EC.3.2.1.3) và sucrase/isomaltase (EC 3.2.148, 3.2.10) [20; 21]. Như vậy, việc ức chế hoạt động của enzyme α -glucosidase có thể làm giảm sự phân giải carbohydrate, đồng thời làm chậm quá trình hấp thu glucose vào máu, góp phần kiểm soát lượng đường huyết sau ăn.

Hiện nay, nhiều hợp chất từ tự nhiên hoặc tổng hợp đã được tìm thấy có khả năng ức chế enzyme α -glucosidase. Tuy nhiên, khi xem xét triển khai các chất ức chế α -glucosidase, cần cân nhắc nhiều khía cạnh liên quan tới độ an toàn và độc tính. Một phân tích tổng hợp cho thấy việc sử dụng nhóm thuốc ức chế α -glucosidase có thể làm tăng nguy cơ tăng men gan (ALT và AST) hơn 3 lần giới hạn trên bình thường, đặc biệt ở liều cao hơn [22].

Ngoài ra, các tác dụng phụ phổ biến của nhóm thuốc ức chế α -glucosidase lâm sàng – như đầy hơi, tiêu chảy và đau bụng – xuất phát từ việc carbohydrate không hấp thu được bị lên men trong đại tràng [23]. Những tác dụng này có thể ảnh hưởng tới sự tuân thủ điều trị và chất lượng sống của người bệnh.

Trong phối hợp điều trị, nguy cơ tương tác thuốc là yếu tố không thể bỏ qua. Mặc dù nhóm thuốc ức chế α -glucosidase thường không có khả năng gây hạ đường huyết mạnh nếu dùng đơn độc (vì tác dụng chủ yếu ở ruột, không phụ thuộc insulin), nhưng khi phối hợp với thuốc điều trị đái tháo đường khác như Sulfonylurea hoặc Insulin,

vẫn cần theo dõi để tránh nguy cơ hạ đường huyết — nhất là khi chế độ ăn uống hoặc tiêu thụ thức ăn/đồ uống thay đổi. Hơn nữa, việc dùng nhóm thuốc ức chế α -glucosidase có thể bị ảnh hưởng bởi lượng carbohydrate trong bữa ăn hoặc loại thức ăn, do cơ chế tác dụng gắn liền với phân giải tinh bột/oligosaccharide — nên hiệu quả điều trị có thể khác nhau tùy bữa ăn và chế độ dinh dưỡng [24].

Tóm lại, để đánh giá toàn diện lợi ích-rủi ro của hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase, cần cân nhắc giữa hiệu quả kiểm soát đường huyết sau ăn, độ an toàn/độc tính và nguy cơ tương tác thuốc. Việc nghiên cứu sâu hơn về các hợp chất mới — đặc biệt những dẫn xuất từ nguồn dược liệu với tiềm năng ít tác dụng phụ hơn — là hướng triển vọng trong điều trị đái tháo đường típ 2.

1.1.4. Biến chứng của bệnh Đái tháo đường

Đái tháo đường tiến triển theo thời gian. Khi không được kiểm soát, Đái tháo đường có thể gây ra nhiều biến chứng cấp tính và mạn tính nguy hiểm. Các biến chứng cấp tính là những bệnh cảnh cấp cứu nội khoa, thường gặp và đe dọa tính mạng, gồm các loại biến chứng sau: Nhiễm toan ceton, tăng áp lực thẩm thấu, hạ đường huyết, tăng acid lactic trong máu [25].

Các biến chứng mạn tính của bệnh Đái tháo đường ảnh hưởng đến nhiều hệ cơ quan trong cơ thể, chủ yếu là do tổn thương tại các tổ chức mạch máu và thần kinh. Tình trạng này làm gia tăng nguy cơ mắc các bệnh lý nghiêm trọng như nhồi máu cơ tim, đột quỵ và tai biến mạch máu não. Ngoài ra, bệnh lý vông mạc do tiểu đường được xem là nguyên nhân hàng đầu dẫn đến mù lòa và suy giảm thị lực, gây tác động sâu sắc tới chất lượng cuộc sống của người bệnh. Bệnh Đái tháo đường là nguyên nhân thường gặp của bệnh thận mạn. Bệnh thường không có triệu chứng tới khi hội chứng thận hư hoặc suy thận. Điều trị cần chạy thận nhân tạo hay thậm chí phải ghép thận để duy trì cuộc sống. Biến chứng thần kinh ngoại biên do Đái tháo đường gây mất cảm giác ở chân, tay hay dị cảm, tê, gây đau nhức...là nguy cơ của nhiễm trùng chân đưa đến đoạn chi [26].

1.1.5. Các thuốc điều trị bệnh Đái tháo đường

Các thuốc điều trị Đái tháo đường típ 1: Chỉ định bắt buộc sử dụng insulin do sự thiếu hụt insulin hoàn toàn. Insulin có nhiều loại, nhưng chủ yếu được chia thành hai dạng chính: insulin tác dụng nhanh và insulin tác dụng chậm. Hiện nay, đã có dạng bào chế mới của insulin dưới dạng inhaler, đưa thuốc vào máu qua đường phổi. Phương pháp này mang lại nhiều lợi ích đáng kể như giảm số lần tiêm insulin hàng ngày cho bệnh nhân và cải thiện chất lượng cuộc sống [27].

Đối với các thuốc điều trị Đái tháo đường týp 2, liệu pháp thường được kết hợp với những biện pháp khác như xây dựng chế độ ăn uống khoa học và duy trì hoạt động thể lực hợp lý. Tùy vào tình trạng cụ thể của bệnh nhân, có thể bổ sung một hoặc nhiều loại thuốc đặc hiệu để điều trị hiệu quả [27]. Danh mục các loại thuốc điều trị Đái tháo đường sẽ được trình bày trong **Bảng 1.1**.

Bảng 1.1. Các thuốc viên hạ glucose máu đường uống và thuốc tiêm không thuộc nhóm insulin [27]

Nhóm	Cơ chế tác dụng
Sulfonylurea	Kích thích tiết insulin
Biguanid	Giảm sản xuất glucose ở gan
Pioglitazone (TZD)	Tăng nhạy cảm với insulin Hoạt hóa thụ thể PPARG
Ức chế enzyme α -glucosidase	Làm chậm hấp thu carbohydrate ở ruột
Ức chế enzyme DPP-4	Ức chế DPP-4 Làm tăng GLP- 1
Nhóm ức chế kênh đồng vận chuyển Natri- glucose SGLT2	Tăng thải glucose qua đường tiểu

1.1.6. Tình hình nghiên cứu về cây thuốc có tác dụng hạ đường huyết

Tình hình nghiên cứu quốc tế

Năm 2012, Pantel D. và cộng sự đã thu thập dữ liệu có sẵn về dược liệu có hoạt tính hạ đường huyết thông qua việc tăng tiết insulin từ tuyến tụy hoặc hoạt động tương tự với insulin được báo cáo trong các nguồn tài liệu khác nhau [28]. Danh sách một số dược liệu có tác dụng chống Đái tháo đường và cơ chế tác dụng được trình bày trong **Bảng 1.2**

Bảng 1.2. Một số nghiên cứu về dược liệu chống Đái tháo đường

Dược liệu	Nồng độ	Kết quả nghiên cứu	Cơ chế tác dụng
Cây Keo - vỏ cây (<i>Acacia arabica</i>)	<i>In vitro</i> : 40–5.000 $\mu\text{g/mL}$ cao ethanol; <i>In vivo</i> : 250 mg/kg đường uống	Chiết xuất vỏ cây cho thấy tác dụng hạ đường huyết, tăng tiết insulin, cải thiện dung nạp glucose, điều hòa lipid máu và giảm stress oxy hóa trên mô hình động vật	Kích thích phóng thích insulin từ tế bào β ; ức chế DPP-IV làm tăng GLP-1; cải thiện thu nhận glucose (GLUT4); giảm peroxid hóa lipid và tăng các enzym chống oxy hóa (SOD, GSH). [29; 30].

Cỏ thi – phần trên mặt đất (<i>Agrimony eupatoria</i>)	<i>In vitro</i> : 0,25–10 mg/mL (chiết xuất nước); <i>In vivo</i> : 62,5 g/kg trong thức ăn + 2,5 g/L trong nước uống	Giảm đáng kể glucose huyết thanh và các triệu chứng đái tháo đường (khát nước, tiểu nhiều); tăng khả năng vận chuyển glucose và tổng hợp glycogen ở cơ; cải thiện tình trạng suy dinh dưỡng do đái tháo đường; hỗ trợ hồi phục chức năng tế bào β	Kích thích tiết insulin từ tế bào β , tăng thu nhận glucose qua GLUT4, tăng glycogen hóa, tác dụng chống oxy hóa [31].
Dâm bụt đỏ - hoa (<i>Hibiscus rosa</i>)	25 mg/kg cao ethanol đường uống trên chuột STZ	Giảm đáng kể glucose huyết thanh và HbA1c, cải thiện dung nạp glucose, giảm lipid máu và hỗ trợ phục hồi chức năng tế bào β	Kích thích tiết insulin, tăng glycogen hóa, tác dụng chống oxy hóa và bảo vệ mô tụy [32]
Hồng hoa – hoa (<i>Carthami tinctorii</i>)	300 mg/kg cao methanol đường uống trên chuột (mô hình đái tháo đường type 2)	Giảm đáng kể glucose lúc đói, giảm triglyceride, cholesterol, LDL; cải thiện cấu trúc gan và giảm thoái hóa mỡ ở gan	Kích hoạt con đường Nrf2 → tăng biểu hiện các enzym chống oxy hóa (SOD, HO-1), giảm NF- κ B (viêm), và tăng PPAR α → giảm stress oxy hóa, viêm và tích mỡ gan [33]

Tính hình nghiên cứu trong nước

Tại Việt Nam, nhiều loại cây thuốc đã và đang được nghiên cứu về tác dụng hạ đường huyết, tiêu biểu là: dây thìa canh (*Gymnema R.Br.*) [34], cỏ ngọt (*Stevia rebaudiana*), sinh địa (*Rehmania glutinosa*), bông ôi (*Lantana camara*) [35], mướp đắng (*Momordica charantia*) [36], ý dĩ (*Coix lachryma jobi*) [36], bằng lăng nước (*Lagerstroemia speciosa* L. Pers.) [37]...

Trong những năm gần đây, các nghiên cứu thực hiện nhằm phát hiện ra các chất ức chế enzyme α -glucosidase có nguồn gốc từ tự nhiên trong chống Đái tháo đường đã nhận được nhiều chú ý vì các hợp chất dồi dào trong tự nhiên và tác động đầy hứa hẹn của chúng. Năm 2019, Dương Thị Thu Thanh Trúc và cộng sự đã sàng lọc hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase đối với 16 loài cây (25 mẫu với nhiều bộ phận khác

nhau) được thu hái ở tỉnh Đồng Nai và 91 loài cây (158 mẫu) được thu hái ở tỉnh Phú Yên. Kết quả nghiên cứu cho thấy có 105/183 mẫu khảo sát có 28 mẫu có tác động ức chế rất mạnh ($IC_{50} < 1 \mu\text{g/mL}$), 48 mẫu có tác động ức chế mạnh ($IC_{50} < 10 \mu\text{g/mL}$), 77 mẫu có $IC_{50} < 50 \mu\text{g/mL}$. Mẫu thân cây Chóp mao (*Salacia chinensis* L.) và mẫu thân cây Quáo (*Mangifera reba* P.) thể hiện hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase rất mạnh ($IC_{50} < 1 \mu\text{g/mL}$)[38].

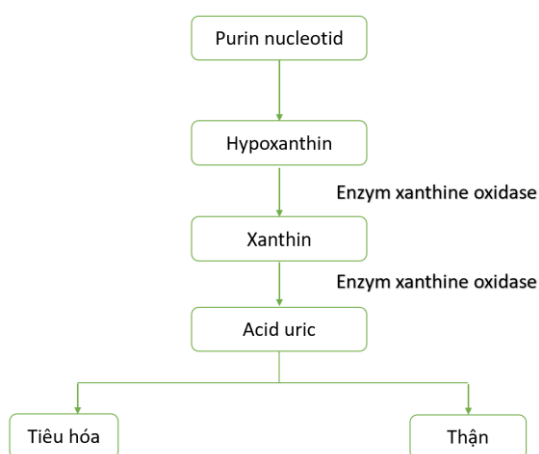
1.2. Tổng quan về bệnh Gout

1.2.1. Định nghĩa

Bệnh Gout, hay còn gọi là thống phong, được định nghĩa là sự rối loạn chuyển hóa purin, dẫn đến tình trạng tăng nồng độ acid uric trong máu. Sự tích tụ các tinh thể natri urat xảy ra trong nhiều loại mô, bao gồm màng hoạt dịch khớp, sụn xương, gân, cũng như tổ chức dưới da. Bệnh đặc trưng bởi những đợt viêm khớp cấp tính tái phát, thường gây ra những cơn đau dữ dội và có khả năng diễn biến thành viêm khớp mạn tính [39].

1.2.2. Cơ chế bệnh sinh của Gout

Acid uric là một trong các sản phẩm chuyển hóa tự nhiên của cơ thể, được tạo thành từ sự giáng hóa các nucleotide chứa nhân purin. Có 3 nguồn cung cấp purin là sự phân hủy acid nucleic từ thức ăn đưa vào, sự phân hủy acid nucleic từ các tế bào bị chết và tổng hợp nội sinh, chuyển hoá purin trong cơ thể nhờ các enzyme đặc hiệu. Các purin được tạo ra đi vào chu trình chuyển hóa để tạo ra acid nucleic và acid uric. Để mức acid uric được cân bằng, acid uric được thải ra ngoài chủ yếu theo đường thận qua nước tiểu, một phần qua hệ thống tiêu hóa. Nguyên nhân nguyên phát (yếu tố di truyền, cơ địa) và thứ phát như thường xuyên ăn nhiều thức ăn chứa nhiều purin (gan, thịt, cá), uống nhiều rượu, bia làm cho quá trình chuyển hóa purin thành acid uric tăng (Hình 1.2)[40; 41].



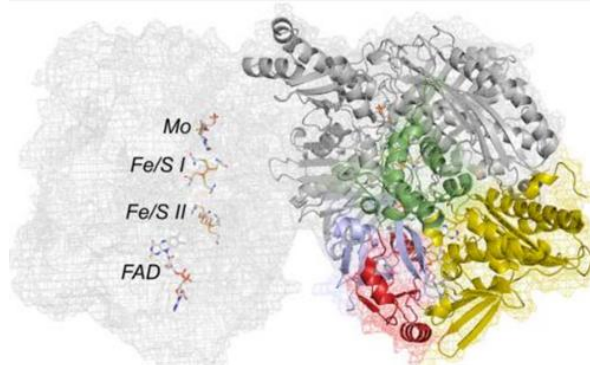
Hình 1.2. Quá trình chuyển hóa purin trong cơ thể

Khi tăng acid uric, huyết tương và dịch ngoại bào bị quá bão hòa acid uric và hình thành tinh thể lắng đọng ở các mô, gọi là các hạt tophi. Sự lắng đọng của các hạt này ở các vị trí khác nhau gây nên những tổn thương khác nhau cho cơ thể. Khi các tophi tại sụn khớp vỡ sẽ khởi phát quá trình viêm gây cơn Gout cấp. Sự lắng đọng vi tinh thể tại khớp, trong màng hoạt dịch, trong mô sụn và mô xương là nguyên nhân gây ra các bệnh lý xương khớp mạn tính liên quan đến Gout. Tinh thể urat lắng đọng tại mô kẽ của thận được xác định có vai trò trong sự hình thành viêm thận kẽ. Đồng thời, nồng độ acid uric tăng cao trong nước tiểu cùng với sự toan hóa môi trường nước tiểu là yếu tố góp phần tạo sỏi tiết niệu trong bệnh Gout [41].

Do đó, một trong những hướng điều trị Gout là phát triển các thuốc có tác dụng ức chế quá trình sản sinh ra acid uric. Các thuốc ức chế sản sinh acid uric chủ yếu thông qua ức chế enzyme chủ chốt là xanthine oxidase.

1.2.3. Tổng quan về enzyme xanthine oxidase (XO)

Xanthine oxidase (XO) (EC 1.17.3.2) và Xanthine dehydrogenase (XD) (EC 1.1.7.1.4) là hai dạng đồng phân có thể chuyển đổi qua lại của enzyme xanthine oxidoreductase (XOR). Enzyme xanthine oxidase được phân lập từ sữa bò là một protein bao gồm 2 tiểu đơn vị giống nhau, khối lượng phân tử 290 kDa. Mỗi tiểu đơn vị gồm 1 nguyên tử molybden, 1 phân tử flavin adenine dinucleotide (FAD) và 2 trung tâm sắt sulfur (2Fe-2S) (**Hình 1.3**). Thành phần acid amin của XO tương tự như của XD mặc dù XO có nhiều lysin và threonin hơn [42].



Hình 1.3. Cấu trúc của enzyme xanthine oxidase (PDB ID: 1FIQ) [43]

Từ đầu N trong tiểu đơn vị bên phải, các miền có màu xanh cho hai cụm [2Fe-2S] (lần lượt là Fe/S II và Fe/S I), màu vàng cho FAD và màu xám cho liên kết molybden phân protein. Vùng liên kết giữa các miền liên kết sắt-lưu huỳnh và FAD có màu đỏ ở phía dưới bên trái của tiểu đơn vị. Tiểu đơn vị bên trái được hiển thị dưới dạng lưới để minh họa cách bố trí không gian của một số trung tâm hoạt động oxi hóa khử trong tiểu đơn vị để minh họa con đường chuyển điện tử $\text{Mo} \rightarrow \text{Fe/S I} \rightarrow \text{Fe/S II} \rightarrow \text{FAD}$. Hai tâm molybden cách nhau 52 Å [43].

Quá trình oxi hóa xanthine thành acid uric diễn ra tại trung tâm molybden của enzyme. Ở trạng thái oxy hóa, trung tâm molybden của enzyme được xây dựng theo mô hình MoVIOS(OH) trong đó L đại diện cho đồng yếu tố pyranopterin, một thành phần phổ biến trong các enzyme có molybden và vonfram đơn nhân. Bước đầu của quá trình xúc tác liên quan đến việc proton từ nhóm MoOH tấn công trung tâm ái nhân của xanthine tại vị trí C-8. Đồng thời, nguyên tử hydro được giải phóng tại vị trí này sẽ được vận chuyển tới nhóm Mo-S, tạo thành sản phẩm trung gian LMoIVO(SH)(OR). Pha trung gian này sau đó bị phá vỡ thông qua sự di chuyển electron giữa các trung tâm oxy hóa khử khác của enzyme, dẫn đến sự giải phóng H⁺ và hình thành cấu trúc LMoVOS(OR). Cuối cùng, nhóm R bị thay thế bởi hydro, đưa enzyme trở lại trạng thái oxy hóa ban đầu với cấu hình LMoVIOS(OH).

Cơ chế này không chỉ đảm bảo tính hiệu quả trong xúc tác mà còn cung cấp cái nhìn sâu sắc về sự phối hợp và điều hòa chức năng giữa các thành phần hóa học trong hệ enzyme [42].

1.2.4. Điều trị bệnh Gout

Nguyên tắc điều trị

Trong trường hợp Gout cấp tính, việc điều trị cần được tiến hành ngay trong vòng 24 giờ đầu sau khi khởi phát. Các phương pháp điều trị phổ biến bao gồm: [44]

- Nhóm thuốc NSAIDS, colchicin
- Steroid đường uống kết hợp với colchicin (áp dụng khi không đáp ứng với NSAIDS).

- Steroid đường tiêm trong các trường hợp không hiệu quả với các phương pháp khác.

Điều trị Gout mãn tính: Mục tiêu chính là phòng ngừa các cơn Gout cấp, đồng thời tránh gây tổn thương cho cơ quan nội tạng. Thông thường, nồng độ acid uric trong máu cần được hạ xuống dưới mức 60 mg/L (360 µM). Để đạt được mục tiêu này, việc tuân thủ chế độ ăn uống lành mạnh kết hợp với sử dụng thuốc đúng cách là rất cần thiết [44]. Các nhóm thuốc điều trị bệnh Gout được trình bày ở **Bảng 1.3**.

Bảng 1.3. Các thuốc điều trị bệnh Gout

Nhóm	Tên thuốc
Thuốc ức chế tổng hợp acid uric	Allopuriol Febuxostat
Thuốc tăng đào thải acid uric	Probenecid (Benemid), Benzbromaron, Lesinurad, Sulfipyrazon (Auran),
Thuốc tiêu acid uric	Uricase, Pegloticase

1.2.5. Tình hình nghiên cứu về cây thuốc có tác dụng hạ acid uric máu

Các sản phẩm tự nhiên làm giảm acid uric cũng được chia thành hai nhóm chính: nhóm ức chế tổng hợp acid uric và nhóm tăng đào thải acid uric [45].

Năm 2000, tại Trung Quốc, Kong LD và cộng sự tiến hành nghiên cứu các dược liệu có khả năng ức chế tổng hợp acid uric bằng cách ức chế enzyme XO. Kết quả cho thấy 69/122 mẫu dịch chiết methanol của các cây dược liệu có khả năng ức chế XO, trong đó 29 mẫu ức chế trên 50%. Trong đó mạnh nhất là Quế chi - *Cinnamomum cassia* (IC₅₀, 18 µg/mL), tiếp theo là Cúc hoa - *Chrysanthemum indicum* (IC₅₀, 22 µg/mL) và lá của Cỏ giấp trâng - *Lycopus europaeus* (IC₅₀, 26 µg/mL)[45].

Năm 2004, ở Việt Nam, Nguyễn Thị Thanh Mai đã tiến hành nghiên cứu với 288 dịch chiết MeOH, MeOH: H₂O (tỉ lệ 1:1) và nước từ 96 cây thuốc được người dân bản địa sử dụng theo y học cổ truyền để điều trị các bệnh thấp khớp, viêm khớp và Gout. Kết quả thu được các dịch chiết MeOH điển hình có tác dụng ức chế XO với giá trị IC₅₀ <20 µg/mL là: Ngải cứu (*Artemisia vulgaris*), Tô mộc (*Caesalpinia sappan*), Đại bi (*Blumea balsamifera*), Cúc hoa trắng (*Chrysanthemum sinense*), Dây chiêu (*Tetracera scandens*) [46].

Tương đối ít nghiên cứu báo cáo các hoạt chất từ cây thuốc có tác dụng trên hệ thống vận chuyển urat ở thận. Quercetin, ở liều 50 và 100 mg/kg, có thể tăng hoạt động OAT1 và ức chế GLUT9 và URAT1 trong thận của chuột tăng acid uric máu. Esculetin và esculin được tìm thấy có tác động cải thiện tình trạng tăng acid uric máu và rối loạn chức năng thận thông qua việc điều chỉnh OAT1. Thông qua việc ức chế GLUT9 hoặc URAT1 trong thận của chuột tăng acid uric máu, fraxetin và fraxin có thể tăng cường bài tiết urat ở một mức độ nào đó [47]. Một số dược liệu có tác động trong hạ acid uric được trình bày trong **Bảng 1.4**.

Bảng 1.4. Một số nghiên cứu về dược liệu có tác động trong hạ acid uric

Dược liệu	Nồng độ	Kết quả nghiên cứu	Cơ chế tác dụng
Hạt nhãn (<i>Dimocarpus longan</i> Lour.)	80 mg/kg trong mô hình tăng uric bằng potassium oxonate/hypoxanthine.	Giảm nồng độ acid uric huyết thanh, ức chế hoạt tính XO tuần hoàn, thay đổi biểu hiện các transporter urate.	Điều hòa transporter urate: tăng GLUT1 (thận), giảm GLUT9 (gan). [48].
Xa tiền (<i>Plantago asiatica</i> L)	Đường uống 0.9375 – 3.75 g/kg trong 28 ngày.	Giảm đáng kể acid uric huyết thanh, giảm hoạt tính xanthine oxidase (XO) trong	Giảm biểu hiện URAT1 và GLUT9 ở thận → tăng thải urate, điều hòa

		huyết thanh và gan, bảo vệ thận: giảm viêm và tổn thương mô	các con đường chuyển hóa liên quan (PPAR, lipid, acid amin). [49].
Trà xanh (<i>Camellia sinensis</i> L.)	300 mg/kg (polyphenol trà xanh) dùng đường uống cho chuột tăng acid uric	Giảm đáng kể nồng độ acid uric huyết thanh ở chuột; giảm hoạt tính XO trong gan và huyết thanh	Ức chế XO để giảm tổng hợp uric acid; điều chỉnh biểu hiện các chất vận chuyển urat ở thận: giảm URAT1, tăng OAT1 và OAT3 [50]
Kim cang lá mỏng (<i>Smilax riparia</i> A.)	Pallidifloside D: 5, 10, 20 mg/kg (chuột)	Giảm nồng độ acid uric huyết thanh theo liều; cải thiện chức năng thận ở chuột tăng acid uric	Giảm biểu hiện URAT1 thận → tăng thải urat; ức chế XOD để giảm sản xuất urat [51]

1.3. Tổng quan về cây Rau đắng đất

1.3.1. Sơ lược về cây Rau đắng đất

1.5.1.1 Vị trí phân loại

Vị trí phân loại của Rau đắng đất (*Glinus oppositifolius*) được xếp như sau (hệ thống phân loại thực vật của Takhtajan 2009 [52])

Ngành Ngọc lan (Magnoliophyta)

Lớp Ngọc lan (Magnoliopsida)

Phân lớp Cẩm chướng (Caryophyllidae)

Bộ Cẩm chướng (Caryophyllales)

Họ Rau đắng (Molluginaceae)

Chi *Glinus* (L.) A. DC.

1.5.1.2. Đặc điểm thực vật và phân bố của cây Rau đắng đất

- Tên gọi

Tên Việt Nam: Rau đắng đất

Tên khoa học: *Glinus oppositifolius* (L.) A. DC.

Đồng danh: *Mollugo opposifolia* L.; *Mollugo spergula* L.

- Đặc điểm thực vật

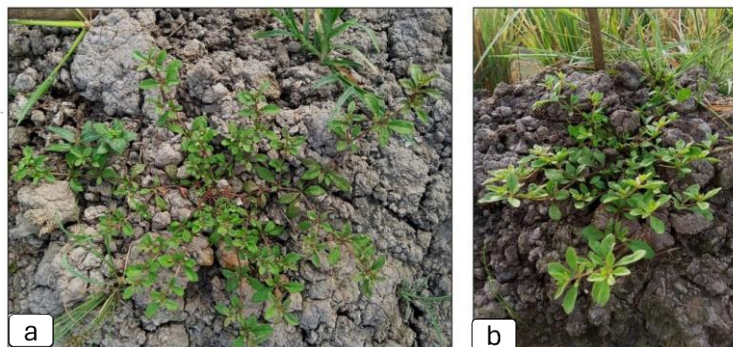
Cây thân thảo sống hàng năm. Thân và cành mảnh, thường mọc gần sát mặt đất. Bề mặt của thân có lông, tiết diện tròn; thân non có màu xanh, trong khi thân già trở nên cứng và chuyển sang màu nâu đỏ. Các mấu trên thân phình to và có màu sắc tương tự. Loài cây này được biết đến với vị rất đắng. Lá đơn mọc theo vòng 3-5 lá, kích thước không đồng đều. Lá lớn nhất có chiều dài từ 1,2 đến 1,7 cm và chiều rộng từ

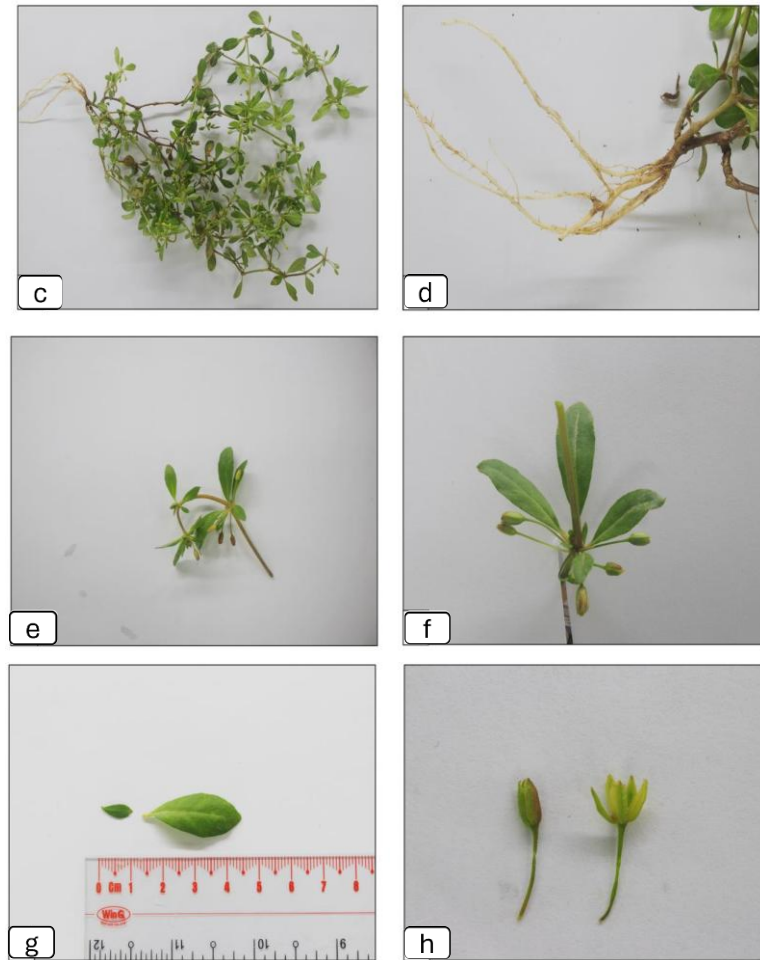
0,4 đến 0,6 cm; lá nhỏ nhất dài khoảng 0,4-0,5 cm và rộng khoảng 0,15-0,2 cm. Lá có hình thon ngược, mũi có răng nhọn, gốc hình chót buồm, mép lá có các răng cưa nhỏ, thưa. Mặt trên của lá có màu xanh đậm, trong khi mặt dưới nhạt hơn và có phủ lông. Cuống lá ngắn khoảng 0,2-0,3 cm với hệ gân gồm một gân chính nổi rõ. Cụm hoa là chụm 3-6 hoa tại nách lá. Hoa lưỡng tính và cấu trúc mẫu 5, không có cánh hoa. Cuống hoa dạng sợi, màu xanh có phủ lông, dài từ 0,9 đến 1,2 cm. Lá đài gồm 5 mảnh đều nhau, hình thuyền với 3 gân nổi rõ; mép lá đài có lông và kích thước khoảng 4×1 mm; cách sắp xếp là tiền khai năm. Hoa có 5 nhị đều nhau, xen kẽ với các lá đài (**Hình 1.4**). Hạt phấn của hoa rời rạc, màu trắng, hình bầu dục hoặc tròn. Lá noãn có cấu trúc gồm 3 mảnh dính liền nhau tạo thành bầu trên chia làm 3 ô. Mỗi ô chứa nhiều noãn với kiểu đính noãn trung trụ. Vòi nhụy 3, ngắn màu vàng nhạt. Quả là dạng quả nang, 3 ô. Hạt khá nhỏ và nhiều, hình thận, màu nâu đỏ; bề mặt vỏ hạt có các vách u lồi đi kèm với phụ bộ ở phần tế [53].

- Phân bố sinh thái

Rau đắng đất là một loài thực vật phổ biến tại các vùng nhiệt đới châu Á, với phân bố trải dài từ Ấn Độ, Malaysia, Campuchia, Việt Nam đến đảo Hải Nam thuộc Trung Quốc. Tại Việt Nam, loài cây này xuất hiện chủ yếu ở các tỉnh ven biển từ Nam Định đến khu vực đồng bằng sông Cửu Long. Đây là loài thực vật ưa ánh sáng, thường phát triển trên đất pha cát ở những ruộng bỏ hoang hoặc các hồ nước nông cạn trong mùa khô. Nhờ khả năng phân nhánh mạnh mẽ, Rau đắng đất thường mọc thành những quần thể lớn, dày đặc, đôi khi lấn át cả các loài cây cỏ khác. Đặc biệt, loài cây này ra hoa và kết quả thường xuyên mỗi năm, với sự tái sinh tự nhiên chủ yếu thông qua hạt giống [54].

Bộ phận dùng: Phần trên mặt đất [53]





(a), (b), (c) toàn cây; (d) rễ; (e) cụm hoa mọc ở nách lá;
(f), (g) hình dạng và vị trí của lá; (h) hoa

Hình 1.4. Cây Rau đắng đất

1.5.1.5. Công dụng theo y học cổ truyền

Công dụng [55]

Rau đắng đất có tác dụng kiện vị, sát trùng, nhuận tràng

Rau đắng đất, từ lâu đã được ghi nhận trong y học dân gian Việt Nam là một vị thuốc thay thế cho rau má trong các bài thuốc cơ bản nhằm hạ sốt, điều trị bệnh gan cũng như các chứng vàng da. Tại Ấn Độ, Rau đắng đất thường được sử dụng dưới hình thức sắc toàn cây lấy nước uống để loại bỏ sản dịch hoặc tán nhuyễn, thêm một chút dầu thầu dầu làm thuốc bôi giảm đau đầu. Dịch chiết từ lá của cây còn được dùng trong điều trị các bệnh ngoài da và ghẻ ngứa. Ở Việt Nam, người dân đôi khi đốt toàn cây thành tro, ngâm lấy nước để làm nước gội đầu.

Cụ thể, trong các bài thuốc dân gian có sử dụng rau đắng đất, phải kể đến những bài thuốc sau:

Đối với bệnh vàng da và triệu chứng khó tiêu: Rau đắng đất được kết hợp với dây cứt quạ với liều lượng tương đương. Cả hai vị thuốc này được nấu chung đến khi nhừ, loại bỏ phần xác, sau đó cô đặc nước để chế thành cao thuốc. Khi cao đạt độ đặc mong muốn, có thể thêm đường hoặc mật gấu nhằm tăng hiệu quả và bảo quản lâu dài. Người bệnh nên sử dụng mỗi ngày ba lần sáng, trưa và tối - mỗi lần một muỗng cà phê. Cao thuốc này có tác dụng điều trị các chứng vàng da, tiêu hóa kém, cùng các bệnh nổi mẩn mày đay và u nhọt

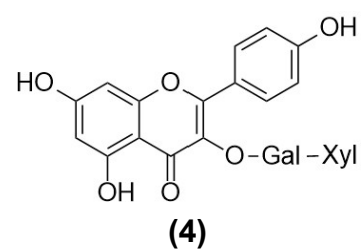
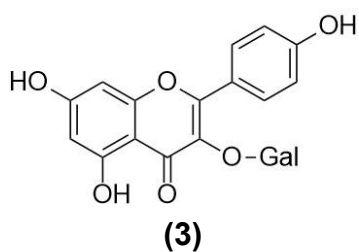
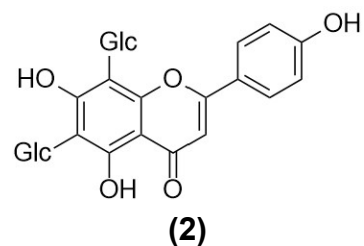
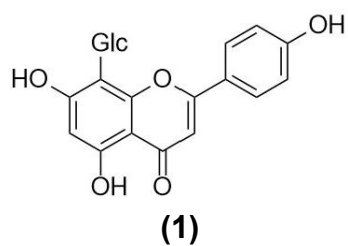
Để thanh lọc gan và giải độc cơ thể: Phối hợp giữa nhiều loại dược liệu gồm rau đắng đất (6 g), rau má (6 g), dành dành (5 g), nhân trần (5 g), cỏ xước (6 g), ké đầu ngựa (6 g), cỏ mực (8 g), dây khở qua (6 g), muồng trâu (6 g), sài đất (6 g) rễ tranh (6 g) và cam thảo (3 g). Các thành phần này có thể được sắc thành nước uống hoặc nghiền thành bột để uống. Công thức này không chỉ giúp giải độc gan mà còn hỗ trợ trong việc cải thiện sức khỏe tổng thể [55].

1.3.2. Thành phần hóa học

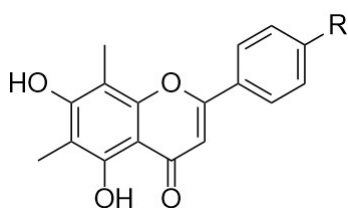
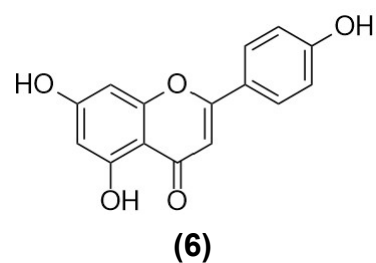
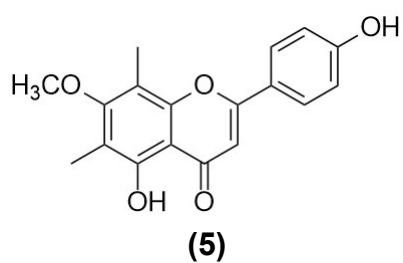
Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng cây Rau đắng đất chứa nhiều thành phần hóa học thuộc các nhóm như flavonoid, saponin, steroid, các hợp chất thơm, dẫn xuất acid acylamin cùng một số hợp chất khác. Trong đó, flavonoid và saponin là hai thành phần chính có nhiều tác dụng dược lý đã được chứng minh trên các mô hình thử nghiệm [56].

1.3.2.1. Flavonoid

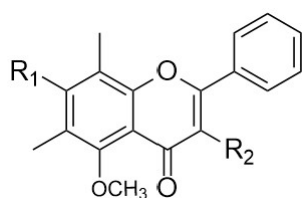
Flavonoid được xem là một trong những nhóm hợp chất phân bố rộng rãi nhất trong tự nhiên, không chỉ được tìm thấy ở thực vật bậc cao mà còn hiện diện ở một số loài thực vật bậc thấp và cả các loại tảo. Nhóm hợp chất này cũng được phân lập nhiều trong loài *G. oppositifolius*. Các hợp chất flavonoid bao gồm: Vitexin (apigenin 8- C - β -D-glucopyranosid) **(1)**; Vicenin-2 (apigenin 6,8-di- C - β -D-glucopyranosid) **(2)**; Kaempferol 3- O -galactopyranosid **(3)**; Isorhamnetin 3- O - β -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-galactopyranosid **(4)**, 5,4'-dihydroxy-7-methoxy-6,8-dimethylflavon **(5)**; 5,7,4'-trihydroxyflavonol **(6)**; 5,7-dihydroxy-6,8-dimethylflavon **(7)**; 6,8-dimethyl-5,7,4'-trihydroxyflavon **(8)**; 5,7-dihydroxy-4'-methoxy-6,8-dimethylflavon **(9)**; 7-hydroxy-5-methoxy-6,8-dimethylflavon **(10)**; 3-hydroxy-5,7-dimethoxy-6,8-dimethylflavon **(11)**; 7-hydroxy-5-methoxy-6-methylflavanon **(12)**; 7-hydroxy-5-methoxy-6,8-dimethylflavanon **(13)**; 5-hydroxy-8-hydroxymethyl-7-methoxy-6-methylflavon **(14)** [57] (**Hình 1.5**).



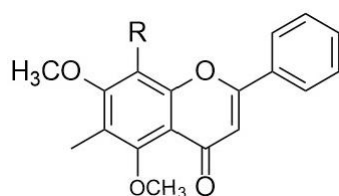
Gal: β -D-galactopyranosyl; **Glc:** β -D-glucopyranosyl; **Xyl:** β -D-xylopyranosyl



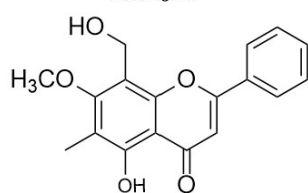
- R**
 (7) H
 (8) OH
 (9) OCH₃



- R₁ R₂**
 (10) OH H
 (11) OCH₃ OH



- R**
 (12) H
 (13) CH₃



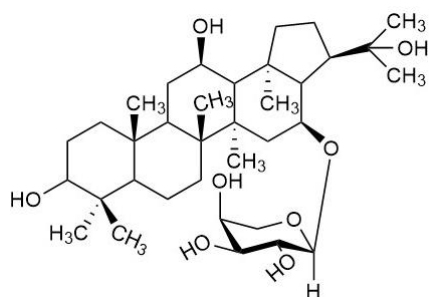
Hình 1.5. Cấu trúc một số flavonoid có trong Rau đắng đất

1.3.2.2. Saponin triterpenoid

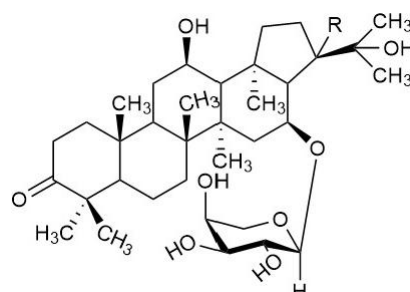
Các nghiên cứu về thành phần hóa học của Rau đắng đất đã chỉ ra rằng, phần lớn saponin có trong loại cây này thuộc nhóm saponin triterpenoid với cấu trúc khung hopan[58; 59]. Các hợp chất saponin triterpenoid đã phân lập được từ loài *G. oppositifolius* bao gồm: glinosid C (16-*O*-(D-glucopyranosyl)-3 β , 12 β , 16 β , 21 α , 22-pentahydroxyhopan) (**15**), glinosid A (16-*O*-(β -arabinopyranosyl)-3-oxo-12, 16 β , 21 β , 22-tetrahydroxyhopan) (**16**), glinosid B (16-*O*-(β -arabinopyranosyl)-3-oxo-12, 16 β , 22-trihydroxyhopan) (**17**) [59], spergulin B (**18**), spergulin A (**19**), spergulagenin A-3-*O*- β -D xylopyranosid (**20**), spergulacin (**21**), spergulacin A (**22**) [60].

Năm 2019, các nhà nghiên cứu Trung Quốc đã phân lập được 21 saponin triterpen mới, đó là các glinusopposid A-U. Một số cấu trúc như glinusopposid K (**23**), glinusopposid B (**24**), glinusopposid M (**25**), glinusopposid L (**26**), glinusopposid Q (**27**), glinusopposid U (**28**), glinusopposid T (**29**) [61].

Từ năm 2021 đến năm 2024, các hợp chất saponin mới được phân lập là glinusopposide V (**30**) [62], traphanosid GO1 (**31**) [63], spergulagenin B (**32**), spergulagenin C (**33**), spergulagenin D (**34**) [64] và mười một saponin triterpenoid gliopposide A-K (gliopposide D (**35**) - J (**36**)) (Hình 1.6) [65].

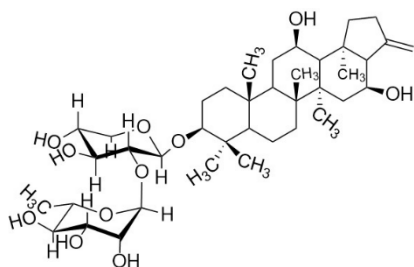


(15)

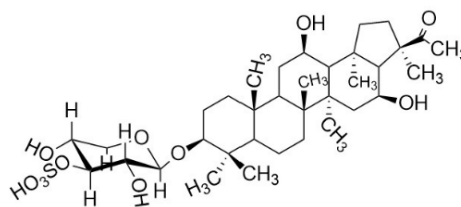


(16) R = OH

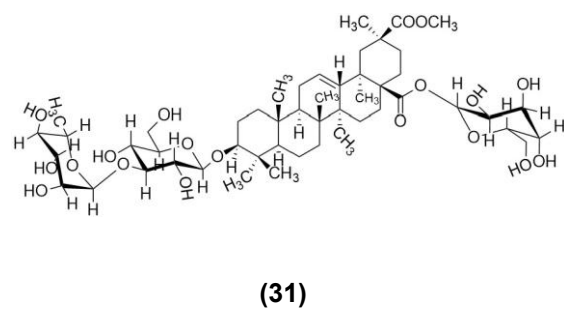
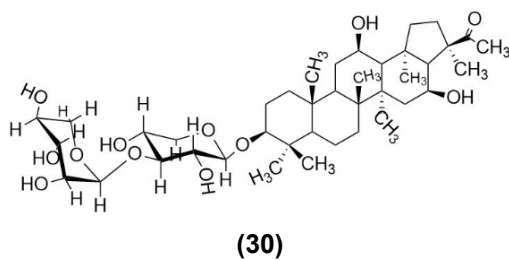
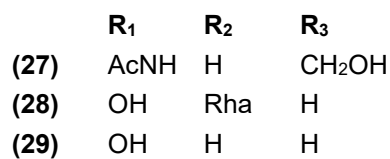
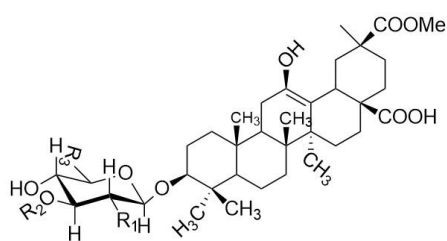
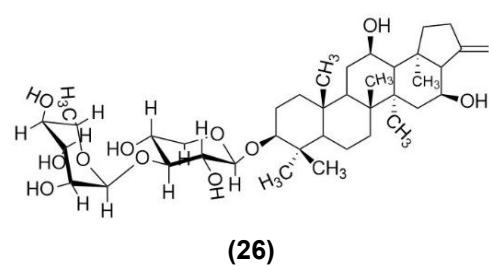
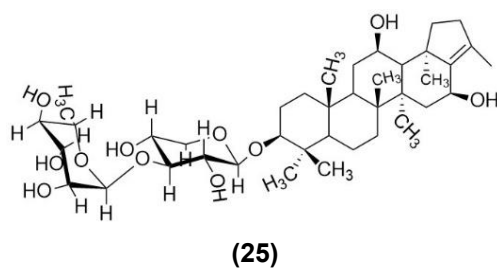
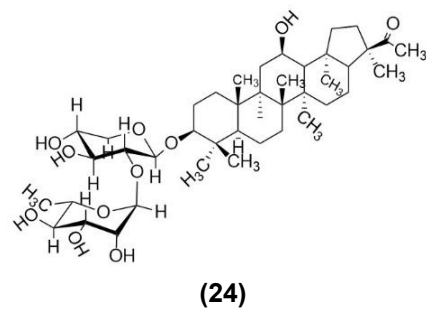
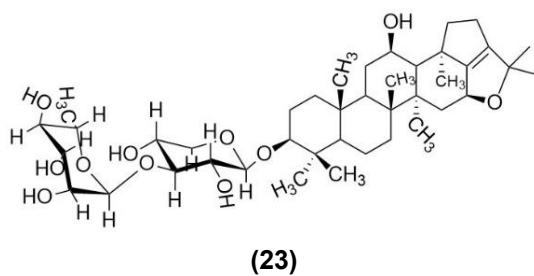
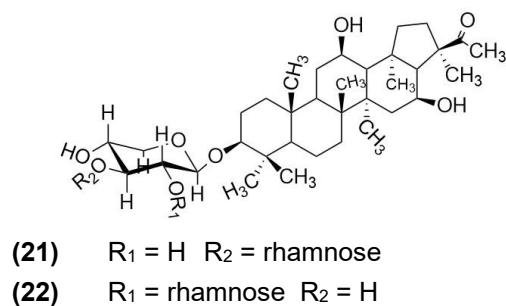
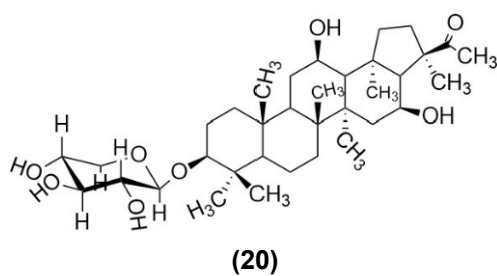
(17) R = H

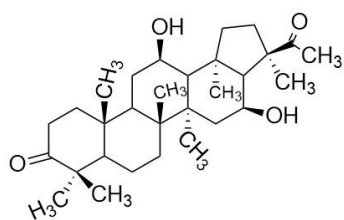


(18)

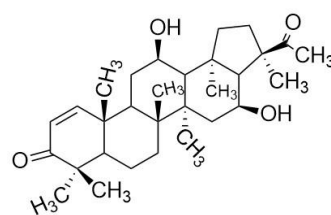


(19)

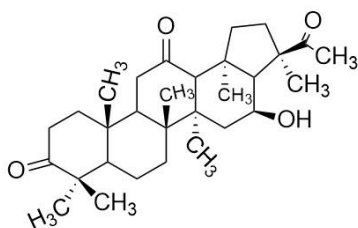




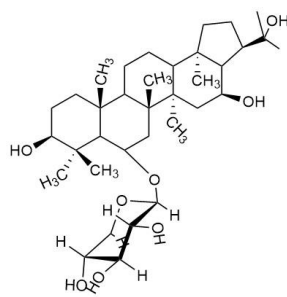
(32)



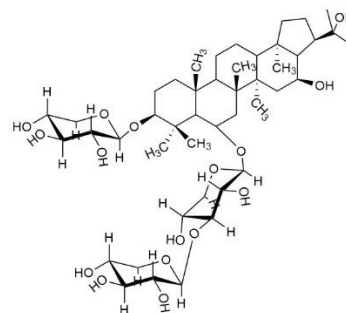
(33)



(34)



(35)



(36)

Hình 1.6. Cấu trúc một số saponin có trong Rau đắng đất

1.3.2.3. Nhóm hợp chất khác

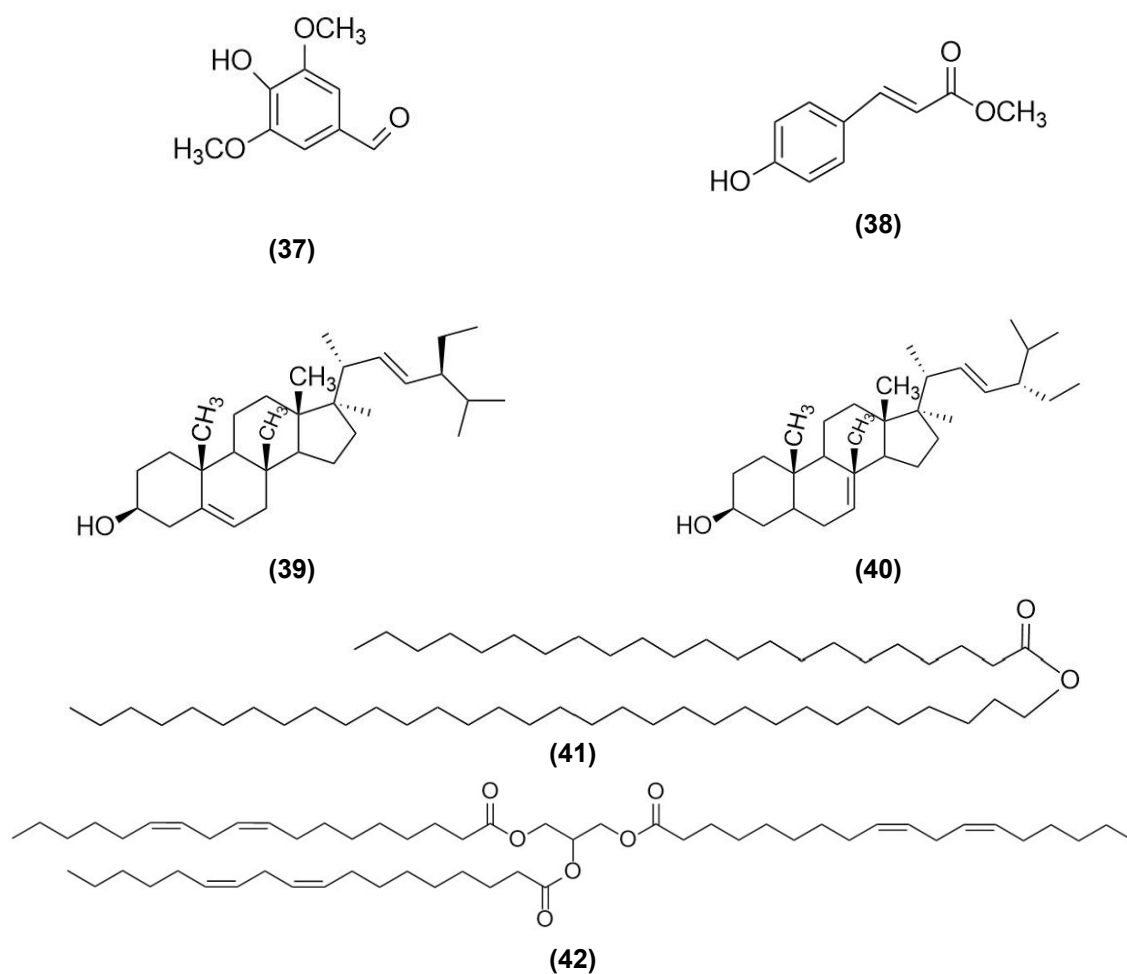
Các hợp chất thơm: 4-hydroxy-3,5-dimethoxy benzaldehyd (**37**), acid methyl 3-(4''-hydroxyphenyl)-(E)-propenoic (**38**)...[57]

Phytosterol: stigmasterol (**39**), spinasterol (**40**) [66]

Các polysaccharid: GOA1 (arabinose, galactose, arabinogalactan típ I (AG-I), típ II (AG-II)); GOA2 (acid galacturonic, rhamnose, arabinose và galactose) [67].

Nucleoside: Adenosine [68]

Hai hợp chất là dotracontyl docosanoat (**41**) và trilinolein (**42**) được phân lập bởi các nhà nghiên cứu ở Bangladesh (**Hình 1.7**) [56].



Hình 1.7. Cấu trúc các hợp chất khác có trong Rau đắng đất

1.3.3. Tác dụng dược lý

○ Tác dụng chống oxy hóa

Nghiên cứu được thực hiện với dịch chiết cồn 70% của toàn cây Rau đắng đất đã được thực hiện nhằm đánh giá khả năng chống oxy hóa thông qua nhiều phương pháp thử nghiệm *in vitro* bao gồm xác định khả năng bắt giữ gốc tự do DPPH, loại bỏ gốc nitric oxide (NO), suy thoái deoxyribose, định lượng hàm lượng phenolic, flavonoid, sử dụng phương pháp thiocyanate, phương pháp phosphomolybdate, tạo phức hợp kim loại, làm nhạt màu β -caroten và đánh giá mức độ tổn thương DNA phụ thuộc bleomycin. Bên cạnh đó, trong nghiên cứu này, mô hình *ex vivo* cũng được triển khai thông qua thí nghiệm peroxid hóa lipid. Để so sánh, các chất đối chứng dương như acid ascorbic, butylated hydroxytoluene (BHT), α -tocopherol, curcumin, quercetin và trolox đã được sử dụng. Kết quả từ cả các thí nghiệm *in vitro* và *ex vivo* cho thấy dịch chiết Rau đắng đất có khả năng loại bỏ gốc tự do và giảm thiểu tổn thương do quá trình oxy hóa gây ra. Điều này khẳng định tiềm năng của Rau đắng đất như một nguồn chất chống oxy hóa tự nhiên [11].

Trong một nghiên cứu khác, dịch chiết methanol từ Rau đắng đất đã được đánh giá về hoạt tính chống oxy hóa thông qua mô hình DPPH và thử nghiệm loại bỏ gốc nitric oxide (NO). Kết quả cho thấy giá trị IC_{50} của dịch chiết là 1000 $\mu\text{g/mL}$ (so với acid ascorbic có $IC_{50} = 14,45 \mu\text{g/mL}$). Trong thử nghiệm loại bỏ gốc nitric oxide, giá trị IC_{50} đạt 269 $\mu\text{g/mL}$ (so với quercetin có $IC_{50} = 5,47 \mu\text{g/mL}$). Thêm vào đó, tổng hàm lượng flavonoid đạt 25,46 mg/g, tương đương với quercetin, trong khi tổng hoạt tính chống oxy hóa được xác định ở mức 79,48 mg/g [69].

Các dịch chiết từ nhiều bộ phận của cây Rau đắng đất (bao gồm rễ, thân và lá) cũng đã được đánh giá khả năng chống oxy hóa thông qua mô hình DPPH. Kết quả chứng minh rằng tất cả các bộ phận đều thể hiện hoạt tính chống oxy hóa [70].

Một số nghiên cứu khác đánh giá hiệu quả của dịch chiết nước và methanol từ Rau đắng đất trong việc loại bỏ các loại gốc tự do khác nhau như ABTS [2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate)], gốc hydroxyl, nitric oxide và các phức sắt kim loại. Kết quả cho thấy cả hai loại dịch chiết này đều có khả năng trung hòa tất cả các gốc tự do được thử nghiệm, khẳng định thêm giá trị của Rau đắng đất như một nguồn chất chống oxy hóa đa dạng [9; 71].

○ Tác dụng bảo vệ gan

Dịch chiết methanol 80% của Rau đắng đất đã được đánh giá so sánh với dịch chiết từ cây Sam biển (*Trianthema decandra*) về hiệu quả bảo vệ gan thông qua một nghiên cứu thực nghiệm trên chuột. Trong nghiên cứu này, paracetamol được sử dụng như tác nhân gây viêm gan trên chuột, sau đó các nhóm được điều trị bằng dịch chiết với liều lượng 250 mg/kg và 500 mg/kg, đồng thời được so sánh với nhóm chứng dương sử dụng silymarin. Hiệu quả bảo vệ gan được đánh giá dựa trên các chỉ số sinh hóa liên quan đến tổn thương gan, bao gồm glutamat oxaloacetat transaminase (SGOT), glutamat pyruvat transaminase (SGPT), alkaline phosphatase (ALP) và bilirubin trực tiếp. Kết quả nghiên cứu cho thấy cả hai loại dịch chiết đều thể hiện tác dụng bảo vệ gan phụ thuộc vào nồng độ sử dụng. Trong đó, dịch chiết từ Rau đắng đất cho thấy hiệu quả vượt trội hơn so với Sam biển. Đặc biệt, ở mức liều 500 mg/kg, dịch chiết Rau đắng đất đã đạt hiệu quả điều trị tương đương với silymarin, một thuốc bảo vệ gan thường được sử dụng trong điều trị bệnh lý liên quan đến gan [8].

Dịch chiết ethanol 80% từ toàn bộ phần trên mặt đất của cây Rau đắng đất đã được tiến hành nghiên cứu nhằm đánh giá hiệu quả bảo vệ gan trên chuột thí nghiệm được gây viêm gan bằng liều cao paracetamol (2 g/kg). Việc quan sát dựa trên sự thay đổi nồng độ các chỉ số sinh hóa bao gồm SGPT, SGOT, ALP, cholesterol và bilirubin giữa nhóm chuột được điều trị bằng dịch chiết và nhóm không điều trị. Kết quả cho

thấy, ở nhóm chuột được điều trị với dịch chiết từ Rau đắng đất ở các mức liều 200 mg/kg và 400 mg/kg, các chỉ số sinh hóa giảm dần và tiến gần đến ngưỡng bình thường. Điều này chứng minh rằng dịch chiết ethanol từ Rau đắng đất có hiệu quả trong việc giảm thiểu tổn thương gan do paracetamol gây ra trên chuột thí nghiệm [72].

○ Tác dụng kháng khuẩn

Các dịch chiết chloroform, ethanol, methanol từ lá và thân cây Rau đắng đất đã được nghiên cứu nhằm đánh giá hoạt tính kháng khuẩn. Quá trình này được thực hiện thông qua các thử nghiệm khuếch tán trên đĩa thạch, xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) và nồng độ diệt khuẩn tối thiểu (MBC). Đồng thời, hiệu quả của các dịch chiết cũng được so sánh với các chất ức chế chuẩn như gentamicin và oxacillin. Nghiên cứu áp dụng trên các chủng vi khuẩn khác nhau để phân tích hiệu quả kháng khuẩn: *Enterococcus* kháng vancomycin, *Staphylococcus aureus* kháng methicillin, *Enterobacteriaceae* sinh men β -lactamase phổ mở rộng, *Enterobacteriaceae* kháng carbapenem và *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* sản sinh enzyme metallo- β -lactamase. Dịch chiết từ lá Rau đắng đất đã cho thấy khả năng ức chế đáng kể sự phát triển của các loại vi khuẩn Gram âm, bao gồm *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae* và *Pseudomonas aeruginosa*. Điều này mở ra tiềm năng sử dụng dịch chiết lá Rau đắng đất làm nguồn kháng sinh mới thay thế, đặc biệt trong việc chống lại các chủng vi khuẩn kháng thuốc và đa kháng thuốc thuộc nhóm Gram âm [73].

○ Tác dụng giảm đau, kháng viêm

Dịch chiết methanol từ toàn cây Rau đắng đất đã được nghiên cứu về khả năng giảm đau và kháng viêm thông qua các mô hình thí nghiệm trên chuột. Cụ thể, tác dụng giảm đau được đánh giá bằng mô hình gây đau quận bụng với acid acetic, trong khi hiệu quả kháng viêm được thử nghiệm trên mô hình gây phù chân chuột bằng carrageenan. Ở liều lượng 200 mg/kg và 400 mg/kg, dịch chiết cho thấy khả năng giảm đau ở cả ngoại vi lẫn trung ương. Ngoài ra, với liều 500 mg/kg, dịch chiết cũng giúp giảm mức độ phù nề ở chân chuột. Những phát hiện này chứng minh rằng cao methanol từ Rau đắng đất có tiềm năng trong việc hỗ trợ giảm đau và chống viêm [74].

○ Tác dụng kháng nấm

Các hợp chất triterpen và glycosid được tìm thấy trong cây Rau đắng đất đã được chứng minh là có tác dụng ức chế mạnh mẽ đối với hai loại nấm gây bệnh, *Microsporum gypseum* và *Trichophyton rubrum*. Trong số đó, các hoạt chất như

glinusopposid Q, glinusopposid T, glinusopposid U và glinusopposid B cho thấy hiệu quả kháng khuẩn vượt trội đối với cả hai loại nấm này. Giá trị MIC₅₀ của các glinusopposid và terbinafin hydrochlorid được thể hiện ở **Bảng 1.5**.

Bảng 1.5. MIC₅₀ của các glinusopposid và terbinafin hydrochlorid

Hoạt chất	MIC ₅₀ (μM) ± SD	
	<i>M. gypseum</i>	<i>T. rubrum</i>
Glinusopposid B	7,1 ± 1,2	14,3 ± 2,1
Glinusopposid Q	6,7 ± 2,1	13,4 ± 1,1
Glinusopposid T	6,8 ± 3,2	11,9 ± 0,3
Glinusopposid U	11,1 ± 2,4	13,0 ± 1,3
Terbinafin hydrochlorid	0,008 ± 0,4	1,647 ± 0,1

Nghiên cứu này chứng minh tiềm năng điều trị các bệnh lý da liễu của các bài thuốc dân gian có thành phần từ Rau đắng đất [61].

Tác dụng kháng ký sinh trùng sốt rét

Nghiên cứu đánh giá khả năng kháng ký sinh trùng sốt rét của hai hợp chất glinosid A và glinosid B được thực hiện trên hai chủng *Plasmodium falciparum*, gồm: 3D7 (nhạy với chloroquin) và W2 (kháng chloroquin), được nuôi cấy liên tục trong môi trường RPMI 1640 bổ sung 40 mM Hepes và 10% huyết thanh người, theo phương pháp nuôi cấy của Trager. Kết quả phân tích dựa trên giá trị IC₅₀ cho thấy phân đoạn chứa cả hai hợp chất glinosid A và glinosid B (IC₅₀ = 31,80 μg/mL) có tác dụng kháng ký sinh trùng sốt rét vượt trội hơn so với phân đoạn chỉ chứa glinosid A (IC₅₀ = 42,30 μg/mL)[59].

○ *Tác dụng trên hệ miễn dịch*

Polysaccharide được phân lập từ dịch chiết nước của phần cây trên mặt đất của Rau đắng đất ở nhiệt độ 50 °C, ký hiệu GOA1 và GOA2, đã chứng minh các đặc tính điều hòa miễn dịch đáng chú ý. Cụ thể, GOA1 kích thích tăng sinh tế bào lympho B và thúc đẩy bài tiết IL-1β bởi các đại thực bào. Đồng thời, GOA2 không chỉ làm tăng sự biểu hiện mRNA liên quan đến tổng hợp interferon gamma (IFN-γ) trong tế bào chết tự nhiên (NK) mà còn cải thiện khả năng phục hồi tổn thương ở tế bào lympho B. Ngoài ra, GOA2 còn kích thích bài tiết các cytokine tiền viêm, góp phần điều hòa đáp ứng miễn dịch [6; 75].

○ *Tác dụng chống ung thư*

Dịch chiết methanol từ Rau đắng đất đã được thử nghiệm trên nhiều dòng tế bào ung thư như lympho B ác tính (REH), ung thư gan (HEP G2), bạch cầu lympho T (MOLT

4), đồng thời so sánh với tế bào máu ngoại vi và chứng minh khả năng ức chế sự tăng sinh một cách hiệu quả. Điều này cho thấy Rau đắng đất là một nguồn nguyên liệu thiên nhiên tiềm năng, có thể được phát triển để sản xuất thuốc chống ung thư [76].

○ *Tác dụng hạ đường huyết*

Saru và các cộng sự đã sử dụng dịch chiết ethanol từ toàn cây trên mặt đất của Rau đắng đất để đánh giá tác dụng hạ đường huyết. Trong nghiên cứu nghiệm pháp dung nạp glucose đường uống (OGTT) được thực hiện trên chuột bình thường và chuột bị gây Đái tháo đường bằng alloxan, kết quả cho thấy dịch chiết được sử dụng với liều lượng 400 mg/kg có khả năng giảm đáng kể chỉ số đường huyết ở chuột Đái tháo đường, lần lượt đạt mức giảm 56,15%. Hiệu quả này tương đương với thuốc glibenclamid, vốn đạt mức giảm 58,67% [77].

Dịch chiết methanol liều dùng 200 mg/kg và 400 mg/kg của toàn cây Rau đắng đất cũng được đánh giá khả năng hạ đường huyết cho kết quả tương đương với metformin [10].

○ *Tác dụng hạ lipid huyết*

Một nghiên cứu đã chỉ ra rằng dịch chiết từ nước và methanol của Rau đắng đất có tác dụng giảm lipid máu ở chuột bị tiểu đường gây ra bởi streptozotocin (STZ). Trong thí nghiệm, chuột được cho sử dụng dịch chiết qua đường uống với liều lượng 200 mg/kg và 400 mg/kg trong khoảng thời gian 14 và 28 ngày [10].

Một nghiên cứu khác đã chứng minh rằng dịch chiết methanol từ Rau đắng đất có khả năng giảm lipid huyết ở chuột bị tăng lipid huyết gây ra bởi Triton. Khi sử dụng dịch chiết với hai mức liều 200 mg/kg và 400 mg/kg bằng đường uống, kết quả đánh giá các chỉ số liên quan đến rối loạn lipid huyết cho thấy dịch chiết này có hiệu quả đáng kể trong việc giảm cholesterol toàn phần, triglycerid, lipoprotein tỷ trọng thấp (LDL) và lipoprotein tỷ trọng rất thấp (VLDL). Đồng thời, nó cũng có tác dụng tăng lipoprotein tỷ trọng cao (HDL) khi so sánh với nhóm đối chứng [78].

○ *Tác dụng an thần, giải lo âu*

Dịch chiết ethanol của lá Rau đắng đất đã chứng minh tiềm năng trong việc an thần và giảm lo âu, mở ra khả năng ứng dụng trong điều trị các rối loạn tâm thần. Kết luận này được rút ra dựa trên các nghiên cứu sử dụng mô hình hành vi khác nhau, bao gồm thử nghiệm mê cung nâng cao (EPM) và hộp sáng-tối (LDB), ở chuột được xử lý với các liều dịch chiết lần lượt là 50, 100 và 200 mg/kg [79].

1.4. Tổng quan về dược lý mạng (Network pharmacology) và docking phân tử

1.4.1. Dược lý mạng - Network pharmacology

1.4.1.1. Tổng quan về dược lý mạng

Khái niệm phát triển thuốc “một thuốc-một mục tiêu-một bệnh” đang phải đối mặt với một số vấn đề về an toàn, hiệu quả và tính bền vững. Trong khi các mục tiêu đơn lẻ có thể chứng minh là một phương pháp tiếp cận hữu ích đối với các rối loạn gen đơn lẻ, tuy nhiên, đối với các bệnh phức tạp do sự tương tác của nhiều gen gây ra, thì các phương pháp tiếp cận một mục tiêu đơn lẻ như vậy không hiệu quả [80]. Một số bệnh lý phức tạp với đa nguyên nhân, đa yếu tố (như ung thư, Đái tháo đường, tăng huyết áp...) không thể được điều trị hiệu quả bằng một loại thuốc nhắm đích mà thường cần phối hợp với nhiều loại thuốc, đặc biệt là các thuốc có khả năng điều trị rộng theo nhiều cơ chế hoạt động trên nhiều đích tác dụng. Hiện tượng này còn được gọi là dược lý đa tác nhân (polypharmacology) [81].

Hệ thống sinh học là mạng lưới các thành phần phụ thuộc lẫn nhau và do đó kết nối với nhau tạo thành một tổng thể thống nhất. Sinh học mạng (network biology) là nghiên cứu về cách các phân tử tương tác và kết hợp với nhau để hình thành các đơn vị chức năng có khả năng thực hiện các hoạt động cần thiết cho các chức năng sinh lý ở cấp độ tế bào và mô/cơ quan. Đây là lĩnh vực liên ngành bao gồm hệ gen, hệ protein, hệ chuyển hóa... sử dụng phương pháp tiếp cận toàn diện [82].

Các khái niệm sinh học mạng (network biology) và dược lý đa tác nhân (polypharmacology) ngày càng trở nên phổ biến như là phương pháp luận để tích hợp dữ liệu gen/protein và phát triển thuốc đa mục tiêu. Hopkins đã nhận ra rằng sinh học mạng và dược lý đa tác nhân có thể làm sáng tỏ hoạt động của thuốc. Dựa trên sự kết hợp của hai khái niệm này, ông đã đưa ra thuật ngữ “dược lý mạng” nghiên cứu các tác động dược lý cùng với tương tác và mức độ bệnh [80].

Dược lý mạng dựa trên sự tích hợp của các nguyên tắc chuyên ngành khác nhau như sinh học phân tử, sinh học sinh hóa và tin sinh học. Dược lý mạng ngày càng phổ biến do tỷ lệ thành công cao trong các thử nghiệm lâm sàng, tác dụng phụ thấp hoặc giá cả phải chăng, hiệu quả thuốc được cải thiện, điều chỉnh con đường truyền tín hiệu với nhiều kênh và tương tác của nhiều gen và protein có thể dễ dàng nhắm mục tiêu để gây bệnh. Hơn nữa, dược lý mạng hỗ trợ xác định vị trí nút bệnh là nút bệnh thiết yếu [83].

1.4.1.2. Ứng dụng của dược lý mạng

Dược lý mạng có thể cung cấp thông tin toàn diện hoặc một phần về lý thuyết mạng lưới và các khái niệm sinh học hệ thống. Người ta có thể tìm thấy các mục tiêu của thuốc và bệnh tật cùng với các con đường cơ học của các mục tiêu này từ cơ sở dữ liệu khổng lồ bằng cách sử dụng dược lý mạng. Phạm vi ứng dụng của dược lý mạng đang được mở rộng và bao gồm việc nghiên cứu các tác động dược lý chung của

thuốc đối với các bệnh và cơ chế chữa bệnh của chúng. Các công cụ được sử dụng trong mạng lưới bao gồm các cơ sở dữ liệu như SwissTargetPrediction, Binding, STITCH (Công cụ tìm kiếm các tương tác hóa học), STRING (Công cụ tìm kiếm để truy xuất các gen/protein tương tác), PubChem, ChemSpider, ChEMBL (Cơ sở dữ liệu hóa học của phòng thí nghiệm sinh học phân tử Châu Âu) cơ sở dữ liệu cho các thành phần hoạt tính, KEGG (Bách khoa toàn thư về gen và bộ gen Kyoto) và DAVID (Cơ sở dữ liệu chú thích, trực quan hóa và khám phá tích hợp) để phân tích làm giàu con đường. Hơn nữa, các cơ sở dữ liệu như OMIM, DisGeNET, GeneCards và MalaCards có thể được sử dụng để truy xuất mục tiêu bệnh, HPRD (Cơ sở dữ liệu tham chiếu protein ở người), BioGRID (Kho lưu trữ sinh học chung cho các tập dữ liệu tương tác), DIP (Cơ sở dữ liệu protein tương tác) cho dữ liệu liên quan đến protein và BIND, DIP, HAPPI (Tương tác protein được chú thích và dự đoán ở người), MINT (Cơ sở dữ liệu tương tác phân tử), STRING và PDZBase cho các tương tác phân tử sinh học. Sau khi thu thập dữ liệu từ các cơ sở dữ liệu này, việc xây dựng và phân tích mạng được thực hiện bằng phần mềm như Cytoscape, Pajek, WIDAS, Patika và Guess. Vì được lý mạng dựa trên sự đa thành phần, đa mục tiêu, nên nó có thể hỗ trợ phát triển các loại thuốc mới cho nhiều bệnh khác nhau bằng cách giảm các hạn chế của liệu pháp mục tiêu đơn lẻ [84].

Bên cạnh phát triển thuốc mới, phân tích dược lý mạng còn góp phần giúp cải thiện an toàn và hiệu quả của các loại thuốc hiện có. Dược lý mạng cũng giữ vai trò quan trọng trong việc dự đoán sự kết hợp thuốc trong điều trị các bệnh lý phức tạp. Đây được coi là một chiến lược hiệu quả giúp hạn chế tình trạng kháng thuốc trên lâm sàng [85].

Dược lý mạng được ứng dụng trong điều trị bệnh bằng y học cổ truyền Trung Hoa. Đơn thuốc theo y học cổ truyền Trung Hoa là đa thành phần, chứa nhiều vị thuốc và có ưu điểm là hệ thống đa mục tiêu, đa kênh và đa liên kết. Tuy nhiên, do thành phần phức tạp nên cơ chế tác động, độc tính, tác dụng phụ không rõ ràng, khó có thể xác định được một cách rõ ràng. Do đó, cần phải kết hợp với dược lý mạng để làm cho các bài thuốc y học cổ truyền được hiệu quả hơn [86]. Với sự phát triển của xã hội loài người và sự thay đổi của môi trường xung quanh, các bệnh của con người đã dần chuyển từ các bệnh truyền nhiễm sang các bệnh mãn tính bao gồm các bệnh tim mạch, Đái tháo đường và khối u. Những bệnh này thường không chỉ do một yếu tố đơn lẻ gây ra mà còn do nhiều yếu tố cùng lúc gây ra, trùng hợp với việc sử dụng đơn thuốc của Y học cổ truyền Trung Quốc. Các đặc điểm chính của Y học cổ truyền Trung Quốc bao gồm quan điểm toàn diện, phương pháp điều trị dựa trên sự phân biệt hội

chứng Y học cổ truyền Trung Quốc và đơn thuốc, phù hợp với các đặc điểm hệ thống chung của dược lý mạng. **Bảng 1.6** chủ yếu liệt kê ứng dụng của dược lý mạng trong điều trị bệnh bằng y học cổ truyền Trung Hoa [87].

Bảng 1.6. Ứng dụng dược lý mạng lưới trong y học Trung Hoa

Ứng dụng	Cơ sở dữ liệu	Bệnh
Nghiên cứu hội chứng Y học cổ truyền Trung Hoa	CBM, PubChem, MetaDrug, David	Viêm khớp dạng thấp (RA); Bệnh hen suyễn dạng ho (CVA)
Khả năng tương thích của Y học cổ truyền Trung Hoa	KEGG, HPRD, BioGRID, PubChem	Thiếu máu cơ tim cấp tính (AMI); Viêm xương khớp (OA)
Phát triển thuốc mới	BioGRID, BIND, DIP, HPRD, MINT, MPDB, TarNet, KEGG, HIT, TCMSP, TCMID	Bệnh Đái tháo đường típ 2 (T2DM); Bệnh Alzheimer (AD)
Công thức thuốc cổ truyền	TCMSP, PharmMapper, UniProtKB, OMIM, STRING, DrugBank TCM Database, Chinese Natural Product Database, TCMSP, TTD	Ung thư vú dương tính với HER2; Bệnh Alzheimer (AD)

1.4.2. Docking phân tử

Docking phân tử là nghiên cứu về cách hai hoặc nhiều cấu trúc phân tử (thuốc, enzyme, protein) phù hợp với nhau. Docking là một kỹ thuật mô hình hóa phân tử được sử dụng để dự đoán cách một protein (enzyme) tương tác với các phân tử nhỏ. Khả năng của một protein (enzyme) và acid nucleic tương tác với các phân tử nhỏ để tạo thành phức hợp siêu phân tử đóng vai trò chính trong động lực học của protein, có thể tăng cường hoặc ức chế chức năng sinh học của nó. Tương tác của các phân tử nhỏ trong khoang liên kết của protein mục tiêu có thể được mô tả bằng docking phân tử. Phương pháp này nhằm xác định vị trí chính xác của các phối tử (ligand) trong khoang liên kết của protein và dự đoán ái lực giữa phối tử và protein [88]. Dựa trên các loại phối tử, docking có thể được phân loại thành

- Docking protein-ligand
- Docking protein-protein
- Docking protein-acid nucleic

Docking protein - ligand đơn giản hơn và có nhiều chương trình có sẵn thực hiện đặc biệt tốt trong việc dự đoán các phân tử có khả năng ức chế protein. Docking protein-

protein thường phức tạp hơn nhiều, vì protein linh hoạt và cấu hình không gian của chúng khá rộng [89].

Một số ứng dụng của docking bao gồm sàng lọc ảo, tối ưu hóa cấu trúc, xử lý sinh học, dự đoán ADMET, mô phỏng động lực học phân tử, làm sáng tỏ cấu trúc.

Sàng lọc ảo

Docking phân tử được sử dụng rộng rãi trong xác định các ứng cử viên thuốc tiềm năng bằng cách dự đoán ái lực liên kết của các phân tử nhỏ với protein hoặc thụ thể quan tâm. Docking có thể được sử dụng để sàng lọc cơ sở dữ liệu lớn các phân tử nhỏ để xác định những phân tử có ái lực liên kết cao với protein quan tâm.

Tối ưu hóa cấu trúc

Sau khi xác định được hợp chất tiềm năng, docking phân tử có thể được sử dụng để tối ưu hóa cấu trúc của hợp chất ban đầu nhằm cải thiện ái lực liên kết và tính chọn lọc của hợp chất đó. Docking cũng có thể được sử dụng để thiết kế các chất tương tự mới bằng cách dự đoán các chế độ liên kết của các cấu trúc đã sửa đổi

Xử lý sinh học

Docking phân tử được sử dụng trong xử lý sinh học để dự đoán ái lực liên kết của các phân tử nhỏ với các enzyme tham gia vào quá trình phân hủy các chất ô nhiễm môi trường. Docking có thể giúp thiết kế các chất ức chế hoặc chất hoạt hóa các enzyme này để tăng cường hiệu quả xử lý sinh học

Dự đoán ADMET

Docking có thể được sử dụng để dự đoán các đặc tính hấp thụ, phân bố, chuyển hóa, bài tiết và độc tính (ADMET) của các phân tử nhỏ. Các đặc tính ADMET dự đoán có thể được sử dụng để sàng lọc các hợp chất có đặc tính bất lợi ngay từ đầu quá trình khám phá thuốc. Một số phần mềm đáng chú ý bao gồm AutoDock Vina, GOLD (Tối ưu hóa di truyền cho ghép phối tử), Glide và Schrödinger Suite. Các phần mềm này cung cấp các thuật toán tiên tiến và kỹ thuật tính toán để mô phỏng ghép phối tử-thụ thể hiệu quả, cho phép dự đoán ái lực liên kết và xác định các ứng cử viên thuốc tiềm năng. Hơn nữa, chúng kết hợp các mô hình dự đoán ADMET, cho phép đánh giá thuốc về khả năng hấp thụ, phân phối, chuyển hóa, thải trừ trong cơ thể và độc tính tiềm ẩn.

Mô phỏng động lực học phân tử

Docking phân tử có thể kết hợp với mô phỏng động lực học phân tử để nghiên cứu động học của phức hợp protein-ligand. Các mô phỏng có thể giúp hiểu được những thay đổi về cấu hình xảy ra với liên kết phối tử và tính ổn định của phức hợp. Một số công cụ phần mềm kết hợp docking phân tử và mô phỏng động lực học bao gồm

AutoDock, Vina, Glide và GOLD. Ngoài docking phân tử, chúng còn cung cấp khả năng thực hiện mô phỏng động lực học phân tử, cho phép khám phá các tương tác protein-ligand theo thời gian và phân tích động học của chúng.

Dự đoán cấu trúc

Cũng có thể sử dụng docking phân tử để dự đoán cấu trúc của các protein có cấu trúc chưa biết. Có thể sử dụng docking để dự đoán các chế độ liên kết của các phân tử nhỏ với protein và tạo ra mô hình tương đồng của protein dựa trên dự đoán chế độ liên kết. Sau đó, có thể tinh chỉnh mô hình được tạo ra bằng cách sử dụng dữ liệu thực nghiệm để có được cấu trúc chính xác của protein [90].

Như vậy, các nghiên cứu công bố về thành phần hóa học của cây Rau đắng đất vẫn còn hạn chế, đặc biệt là về khả năng ức chế enzyme α -glucosidase và xanthine oxidase của các chiết xuất cũng như các hợp chất tinh khiết được phân lập. Trên thế giới, dược lý mạng đang ngày càng đóng vai trò quan trọng không chỉ giúp tiết kiệm thời gian và chi phí trong việc tìm kiếm các hoạt chất mà còn góp phần đẩy nhanh quá trình nghiên cứu và phát triển thuốc. Do đó, việc nghiên cứu chuyên sâu về thành phần hóa học cùng khả năng ức chế enzyme α -glucosidase và xanthine oxidase của cây Rau đắng đất, cũng như tìm hiểu cơ chế tác dụng của loài cây này định hướng điều trị bệnh Đái tháo đường týp 2 và Gout ứng dụng dược lý mạng không chỉ làm phong phú thêm kho tàng hóa học của loài cây này mà còn gia tăng giá trị ứng dụng thực tiễn của chúng.

CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Phần trên mặt đất của cây Rau đắng đất được thu hái tại tỉnh Tây Ninh (tháng 4/2022) và được xác định tên khoa học bởi Tiến sĩ Nguyễn Thụy Vy, Khoa Sinh học – công nghệ sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên Thành phố Hồ Chí Minh. Mẫu tiêu bản được lưu giữ tại Phòng Dược liệu, Khoa Dược, Đại học Nguyễn Tất Thành, Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam.

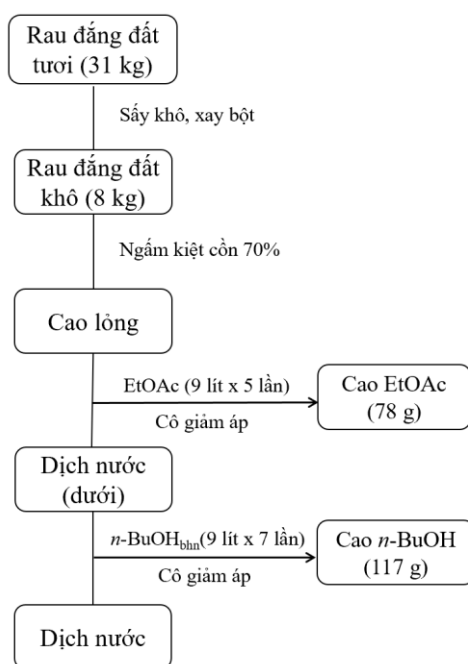


Hình 2.1. Hình ảnh mẫu cây Rau đắng đất (ngày 17/5/2022 – Phòng thực hành dược liệu, Trường Đại học Nguyễn Tất Thành)

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Chiết xuất và phân tách các phân đoạn

Phần trên mặt đất của Rau đắng đất tươi (thân, lá có màu xanh tươi) (31 kg) được sấy khô và xay thành bột thô thu được 8,0 kg bột khô. Bột khô được ngâm kiệt ở nhiệt độ phòng với cồn 70% (30 lít x 4 lần) thu được dịch chiết cồn, thu hồi dung môi ở áp suất giảm thu được cao lỏng (9 lít). Chiết phân bố cao lỏng thu được với EtOAc (9 lít x 5 lần), lớp EtOAc được cô giảm áp thu được cao EtOAc (78 g). Lớp dịch nước còn lại sẽ tiếp tục được chiết phân bố với *n*-BuOH_{bão hòa nước} (9 lít x 7 lần), cô giảm áp thu được cao *n*-BuOH (117 g) (**Hình 2.2**).



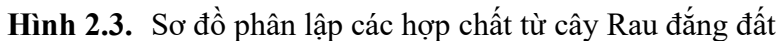
Hình 2.2. Sơ đồ quy trình chiết phân bố

2.2.2. Phân lập các hợp chất

Cao EtOAc (60 g) được tách bằng sắc ký cột silica gel (600 g) và rửa giải bằng hỗn hợp gradient $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (100:0 $\rightarrow$ 60:40, v/v) thu được 9 phân đoạn (E1 – E9). Phân đoạn E1 (98:2, v/v, 15,9 g) tiếp tục được sắc ký trên cột silicagel (150 g) rửa giải bằng $\text{CHCl}_3/\text{EtOAc}$ (80:20 $\rightarrow$ 50:50, v/v) thu được 7 phân đoạn (E1.1-E1.7). Phân đoạn E1.2 (75:25, v/v, 210 mg) được phân tách tiếp trên cột silica gel (30 g) rửa giải bằng $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (90:10 $\rightarrow$ 50:50, v/v), sau đó kết tinh trong MeOH thu được **G-20** (10 mg). Phân đoạn E1.4 (128 mg), E1.5 (100 mg) được tinh chế và kết tinh trong MeOH thu được lần lượt **G-13** (18 mg), **G-14** (13 mg). Phân đoạn E2 (95:5, v/v, 0,96 g) tiến hành tách tiếp trên cột sephadex LH – 20 (50 g) với dung môi methanol thu được **G-8** (13 mg) và **G-16** (20 mg). Phân đoạn E3 (92:8, v/v, 1,65 g) tiến hành tách tiếp trên cột sephadex LH – 20 với dung môi MeOH thu được **G-2** (52 mg) và **G-18** (16 mg). Phân đoạn E4 (17,01 g) tiếp tục được phân lập trên cột pha đảo C-18 bằng hệ dung môi MeOH/ H_2O (0:100 $\rightarrow$ 22:78, v/v) thu được 5 phân đoạn (E4.1-E4.5). Phân đoạn E4.1 (88:12, v/v, 234 mg) tiến hành tách tiếp trên cột sephadex LH – 20 với dung môi MeOH thu được **G-19** (20 mg). Phân đoạn E4.2 (160 mg), E4.4 (85 mg), E4.5 (74 mg) được hòa trong một lượng tối thiểu MeOH, lọc và để lạnh cho kết tinh, lọc và rửa bằng MeOH lạnh, thu được lần lượt **G-3** (50 mg), **G-4** (15 mg), **G-5** (19 mg). Phân đoạn E5 (85:15, v/v, 8,42 g) được phân tách tiếp trên cột sephadex LH – 20 với dung môi MeOH thu được ba phân đoạn (E5.1- E5.3). Phân

đoạn E5.2 (45 mg) được tiếp tục tiến hành tinh chế bằng hệ thống sắc ký lỏng điều chế với pha động là MeOH/H₂O (60:40, v/v) thu được **G-7** (12 mg). Phân đoạn E5.1 (55 mg) được tinh chế và kết tinh trong methanol thu được **G-9** (15 mg). Phân đoạn E5.3 (42 mg) được tinh chế và kết tinh trong methanol thu được **G-10** (20 mg).

Cao BuOH (90 g) được phân tách trên cột silica gel (900 g), rửa giải với hệ dung môi có độ phân cực tăng dần CHCl₃/MeOH (95:5 → 40:60, v/v) thu được 8 phân đoạn (B1-B8). Phân đoạn B3 (90:10, v/v, 7 g) được phân lập bằng cột silica gel với dung môi CHCl₃/EtOAc (90:10 → 50:50, v/v) thu được 6 phân đoạn (B3.1-B3.6). Phân đoạn B3.4 (2 g) được phân tách tiếp trên cột pha đảo C-18 khai triển bằng hệ dung môi MeOH/H₂O (15:85 → 23:77, v/v) thu được 5 phân đoạn (B3.4.1 – B3.4.5). Phân đoạn B3.4.2 (220 mg) được tinh chế tiếp bằng hệ thống sắc ký lỏng điều chế với pha động là ACN/H₂O (20:80, v/v) thu được **G-12** (12 mg). Phân đoạn B3.4.4 (80 mg) được sử dụng để phân lập trên cột Sephadex LH-20 (50 g) với dung môi MeOH thu được **G-15** (16 mg) và **G-11** (13 mg). Phân đoạn B5 (82:18, v/v, 1,8 g) được phân tách tiếp trên cột pha đảo C-18 (100 g) với hệ dung môi MeOH/H₂O (10:90 → 100:0, v/v) thu được 4 phân đoạn (B5.1 – B5.4). Phân đoạn B5.1 (130 mg) được hoà trong lượng methanol tối thiểu, lọc và để lạnh cho kết tinh, lọc và rửa bằng MeOH lạnh, thu được **G-6** (25 mg). Phân đoạn B6 (78:22, v/v, 2,1 g) được phân lập bằng cột pha đảo C-18 với hệ dung môi MeOH/H₂O (10:90 → 80:20) thu được 8 phân đoạn (B6.1-B6.8). Phân đoạn B6.1 (35 mg) được tinh chế tiếp bằng hệ thống sắc ký lỏng điều chế pha động là ACN/H₂O (15:85 (v/v), dung môi pha mẫu acetonitril – nước (15:85, v/v) thu được **G-17** (19 mg). Phân đoạn B6.2 (150 mg) được sử dụng để phân lập trên cột sephadex LH-20 với dung môi là methanol thu được **G-1** (97 mg). Sơ đồ phân lập được tóm tắt trong **Hình 2.3**



2.2.3. Phương pháp xác định cấu trúc hóa học các hợp chất

Cấu trúc hóa học của các hợp chất được xác định thông qua việc áp dụng các phương pháp phổ, đồng thời so sánh và đối chiếu với dữ liệu tham khảo trong tài liệu. Các phương pháp phổ này bao gồm:

Phổ khối lượng (MS): Phổ khối phân giải cao được đo trên máy X500R QTOF, Viện Khoa học vật liệu ứng dụng, Thành phố Hồ Chí Minh

Phổ cộng hưởng từ hạt nhân NMR: Phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) đã được tiến hành đo trên thiết bị BRUKER AV-500 tại Viện Hóa học, trực thuộc Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, Hà Nội. Mẫu thí nghiệm được hòa tan trong dung môi thích hợp, sử dụng TMS làm chất chuẩn nội.

Phổ hồng ngoại (IR) và UV: Phổ IR được đo trên máy Frontier FT-IR/NIR, dùng viên nén KBr. Phổ UV đo trên máy UV-VIS Shimadzu Nhật UV 1900i0001, Trường Đại học Nguyễn Tất Thành

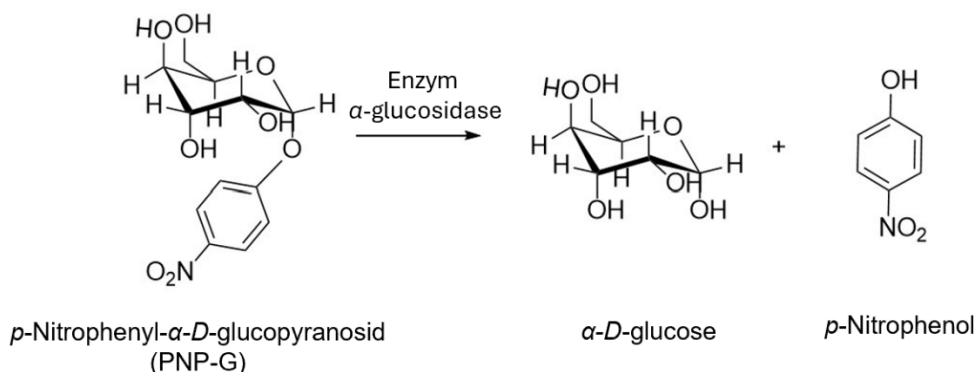
Độ quay cực $[\alpha]_D$: Độ quay cực được đo trên máy phân cực kế Varipol B hãng S+H (Đức).

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

Phương pháp đánh giá hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase được thực hiện tại Phòng thí nghiệm sinh học, Trường Đại học Nguyễn Tất Thành

Nguyên tắc

Để tiến hành khảo sát hoạt tính ức chế α -glucosidase, *p*-nitrophenyl- α -glucopyranosid (pNPG) được sử dụng làm chất nền. Chất nền này bị enzyme α -glucosidase thủy phân, tạo thành hai sản phẩm là *p*-nitrophenol (PNP) và α -D-glucose. Lượng *p*-nitrophenol thu được sau phản ứng được xác định thông qua việc đo độ hấp thụ quang học tại bước sóng 405 nm.



Hình 2.4. Phản ứng thủy phân của enzyme α -glucosidase

Theo phản ứng, lượng glucose được tạo thành tỷ lệ thuận với PNP. Vì vậy, người ta sẽ dựa vào độ hấp thụ của PNP ở bước sóng 405 nm để đánh giá hàm lượng glucose sinh ra [91].

Tiến hành

Hỗn hợp phản ứng trong dung dịch đệm phosphat 0,1 M (pH 6,8), bao gồm 50 μ L dịch chiết ở các nồng độ khảo sát (cao chiết được hòa tan trong DMSO (Merck), sau đó pha loãng thành dãy nồng độ sao cho nồng độ DMSO không quá 2,5%) và 50 μ L dung dịch đệm có chứa α -glucosidase (from *Saccharomyces cerevisiae*, EC.3.2.1.20, Sigma) 0,2 U/mL. Hỗn hợp này được ủ ở 37 °C trong 10 phút, sau đó thêm 50 μ L dung dịch *p*-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside (*p*NPG, Sigma). Hỗn hợp phản ứng tiếp tục được ủ ở 37 °C trong 20 phút, sau đó độ hấp thụ quang của hỗn hợp sau phản ứng được đo ở bước sóng 405 nm bằng máy đọc đĩa Elisa đa năng (Biotek, USA) và so sánh với một mẫu chứng chứa 50 μ L dung môi pha mẫu thay cho mẫu thử. Acarbose (Sigma, $\geq 95\%$ HPLC) được sử dụng làm chứng dương. Mỗi phép đo được lặp lại 3 lần, lấy giá trị trung bình.

Phần trăm ức chế α -glucosidase của mẫu thử được tính theo công thức:

$$I(\%) = \frac{(OD_c - OD_{0c}) - (OD_t - OD_{0t})}{(OD_c - OD_{0c})} \times 100\%$$

Trong đó:

I : Phần trăm ức chế α -glucosidase (%)

OD_c : Mật độ quang của mẫu chứng (có enzyme, không có chất thử)

OD_{0c} : Mật độ quang của mẫu trắng chứng (không có enzyme, không có chất thử)

OD_t : Mật độ quang của mẫu thử (có enzyme, có chất thử)

OD_{0t} : Mật độ quang của mẫu trắng thử (không có enzyme, có chất thử)

Từ kết quả phần trăm ức chế enzyme ở các nồng độ, xác định giá trị IC_{50} của mẫu thử.

2.2.5. Phương pháp đánh giá hoạt tính ức chế enzyme xanthine oxidase

Phương pháp đánh giá hoạt tính ức chế enzyme xanthine oxidase được thực hiện tại Phòng thí nghiệm sinh học, Trường Đại học Nguyễn Tất Thành

Nguyên tắc

XO đóng vai trò xúc tác trong quá trình hình thành acid uric có bước sóng hấp thụ cực đại ở 290 nm. Khi mẫu thử có khả năng ức chế XO cao, quá trình tạo acid uric sẽ bị hạn chế, dẫn đến giảm giá trị mật độ quang đo được. Để đánh giá hiệu quả ức chế XO, mẫu chứa chất thử sẽ được so sánh với mẫu không chứa chất thử [45].

Tiến hành

Hỗn hợp phản ứng ban đầu chứa 200 μL mẫu thử ở các nồng độ khác nhau (mẫu thử được hòa tan trong DMSO (Merck) tuyệt đối, sau đó pha loãng thành dãy nồng độ cần khảo sát sao cho nồng độ DMSO không quá 2,5%), 50 μL XO (EC 1.17.3.2, Sigma) 0,2 U/mL và 950 μL dung dịch đệm natri phosphat (50 mM, pH 7,5), hỗn hợp phản ứng được ủ ở nhiệt độ phòng (25 $^{\circ}\text{C}$) trong 15 phút. Sau đó, phản ứng được bổ sung 400 μL xanthine (Sigma) 1,5 mM, ủ ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Hỗn hợp phản ứng sau đó được đo mật độ quang bằng máy đo quang phổ ở bước sóng 295 nm. Phép đo được lặp lại ba lần. Allopurinol (Sigma) được sử dụng làm chứng dương.

Hoạt tính (% ức chế) của mẫu được tính theo công thức:

$$I(\%) = \frac{(OD_c - OD_{oc}) - (OD_t - OD_{ot})}{(OD_c - OD_{oc})} \times 100\%$$

Trong đó

I : Phần trăm ức chế xanthine oxidase (%)

OD_c : Mật độ quang của mẫu chứng (có enzyme, không có chất thử)

OD_{oc} : Mật độ quang của mẫu trắng chứng (không có enzyme, không có chất thử)

OD_t : Mật độ quang của mẫu thử (có enzyme, có chất thử)

OD_{ot} : Mật độ quang của mẫu trắng thử (không có enzyme, có chất thử)

Từ kết quả phần trăm ức chế enzyme ở các nồng độ, xác định giá trị IC_{50} của mẫu thử.

2.2.6 Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel 2019. Các giá trị được biểu diễn dưới dạng $M \pm SD$, trong đó M là giá trị trung bình và SD là độ lệch chuẩn; mỗi thí nghiệm được lặp lại tối thiểu ba lần ($n \geq 3$). Dữ liệu được kiểm tra sai lệch và loại trừ các giá trị bất thường trước khi phân tích.

Giá trị IC_{50} được xác định bằng phân tích hồi quy phi tuyến dựa trên mối quan hệ giữa nồng độ mẫu thử và phần trăm ức chế, từ đó nội suy giá trị IC_{50} từ đường cong đáp ứng–nồng độ.

Để đánh giá sự khác biệt về IC_{50} giữa các hợp chất hoặc giữa các nhóm hợp chất, dữ liệu được phân tích bằng ANOVA một nhân tố. Khi ANOVA cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa, phép kiểm định hậu nghiệm Tukey được sử dụng để xác định các cặp nhóm khác biệt thống kê. Mức ý nghĩa được xác định tại $p < 0,01$.

2.2.7. Phương pháp phân tích dược lý mạng (network pharmacology)

2.2.7.1. Sàng lọc các thành phần hoạt chất của cây Rau đắng đất và các protein đích liên quan

Nghiên cứu sử dụng dữ liệu hoạt chất từ kết quả phân lập được kết hợp với các chất được xác định thông qua phân tích sắc ký đồ UPLC-MS. Hệ thống UPLC (Acquity UPLC, Water, USA) kết hợp với khối phổ bẫy ion tuyến tính (Q exactive Plus Hybrid Quadrupole Orbitrap Mass (Thermo Fisher Scientific Inc., USA). Cột AcclaimTM RSLC PA2 (2,2 μ m, 120 Å, 2,1 mm x 150) (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA). Tốc độ dòng là 0,3 mL/phút. Chương trình gradient pha động gồm A (nước) và B (MeOH) là 0-3 phút: 5-30 % B; 3-7 phút: 30-60 % B; 7-11 phút: 60-100 % B. Cột được rửa bằng 100% MeOH trong 2 phút và tái cân bằng lại trong 3 phút. Thể tích bơm mẫu là 2 μ L.

Cấu trúc SMILE của mỗi hợp chất cũng được thu thập trên các cơ sở dữ liệu PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>). Công cụ SwissADME (<https://www.swissadme.ch/>) được sử dụng để sàng lọc các thành phần hoạt tính dựa trên quy tắc của Lipinski. Mục tiêu của quy tắc Lipinski là nhận diện các hợp chất có khả năng hấp thu tốt qua đường uống, từ đó hỗ trợ việc tối ưu hóa cấu trúc phân tử trong thiết kế thuốc. Theo quy tắc này, một hợp chất được đánh giá là có tiềm năng sinh khả dụng qua đường uống nếu không vi phạm quá một trong bốn tiêu chí: (i) trọng lượng phân tử không vượt quá 500 Dalton; (ii) số lượng nhóm cho liên kết hydro (bao gồm các nhóm –OH và –NH) không lớn hơn 5; (iii) số lượng nhóm nhận liên kết hydro (gồm các nguyên tử nitơ và oxy) không vượt quá 10; và (iv) logP (hệ số phân bố dầu/nước) không lớn hơn 5.

Tiếp theo, các đích tác dụng trên người của từng hợp chất đạt yêu cầu được thu thập với công cụ SwissTargetPrediction thông qua SMILES của mỗi hợp chất, với lựa chọn loài (species) là Homo sapiens.

Các protein liên quan đến bệnh Đái tháo đường týp 2 và Gout được thu thập từ cơ sở dữ liệu GeneCards (<https://www.genecards.org/>) và cơ sở dữ liệu OMIM

(<https://www.omim.org/>), sử dụng từ khóa tìm kiếm là “type 2 diabetes mellitus”; “Gout”. Danh sách thu được là các đích tác dụng trên người có liên quan đến bệnh sinh và cần nhắm tới trong điều trị bệnh. Các protein đích trùng lặp đã được xác định.

2.2.7.2. Phương pháp xây dựng mạng lưới hoạt chất – đích tác động

Đích tác dụng tiềm năng được xác định là phần giao nhau của tập hợp các gen liên quan đến bệnh và tập hợp các đích tác dụng trên người của các hợp chất có trong cây Rau đắng đất.

Công cụ Draw Venn Diagram (<https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>) được sử dụng để xây dựng biểu đồ ven từ hai tập hợp: “Đích tác dụng trên người của các hợp chất có trong đối tượng nghiên cứu” và “Các gen liên quan đến bệnh”. Từ đó, thu được số lượng và tên các đích tác dụng trong phần giao nhau của hai tập hợp này.

Mạng lưới hoạt chất - đích tác dụng tiềm năng trong điều trị bệnh của Rau đắng đất được xây dựng và phân tích, sử dụng phần mềm Cytoscape 3.10.2.

2.2.7.3. Phương pháp xây dựng mạng lưới tương tác protein -protein (PPI) của các đích tác dụng tiềm năng

Các đích tiềm năng được lấy từ các protein trùng lặp giữa mục tiêu dự đoán của các thành phần hoạt tính và mục tiêu protein cho bệnh. Cơ sở dữ liệu STRING (<https://string-db.org/>) được sử dụng để xây dựng mạng lưới PPI của các đích tác dụng tiềm năng, mỗi đích tác dụng tương ứng với một nút (node) trong mạng lưới. Sơ đồ PPI sau đó được chuyển qua phần mềm Cytoscape 3.10.2 để thực hiện phân tích bằng chương trình CytoNCA tích hợp. Cấu trúc hình học không gian của mạng lưới PPI được phân tích và tính toán các thông số của mỗi nút thành phần, bao gồm: DC (Bậc trung tâm trực tiếp - Degree Centrality) và BC (Bậc trung tâm giữa – Betweenness Centrality), CC (Bậc trung tâm gần - closeness centrality). Những thông số này sẽ được sử dụng để xác định những nút trung tâm có ảnh hưởng lớn đến toàn mạng lưới [92].

2.2.7.4. Phương pháp phân tích GO và con đường KEGG

Nền tảng ShinyGO v0.8 [93] được sử dụng để thực hiện phân tích GO (Gene Ontology) và phân tích con đường KEGG trên các đích tác dụng tiềm năng của cây Rau đắng đất. Tên viết tắt của các đích tác dụng tiềm năng được tải lên ShinyGO v0.8 với lựa chọn loài (species) là Human để tiến hành các phân tích. Các kết quả phân tích được biểu diễn dưới dạng biểu đồ.

Phân tích GO thu thập 20 quá trình có khả năng liên quan cao nhất đến các đích tác dụng tiềm năng, thuộc một trong 3 nhóm: quá trình sinh học (Biological Process),

thành phần tế bào (Cellular Component) và chức năng phân tử (Molecular Function), với giá trị P-value cutoff (FDR) là 0,05.

Phân tích con đường KEGG được thực hiện nhằm dự đoán 20 con đường có khả năng liên quan cao nhất đến các đích tác dụng tiềm năng. Một con đường KEGG cụ thể có liên quan đến bệnh sẽ được lựa chọn để phân tích.

2.2.8. Phương pháp docking phân tử

Phương pháp docking phân tử được sử dụng nhằm mô phỏng tương tác giữa ligand và thụ thể mục tiêu. Cơ sở của phương pháp này dựa trên nguyên lý ổ khóa – chìa khóa, trong đó ligand (chìa khóa) gắn vào vị trí hoạt động của protein (ổ khóa), tạo thành phức hợp có năng lượng liên kết ổn định. Trong nghiên cứu này, phương pháp docking được thực hiện bằng phần mềm AutoDock Vina, cho phép đánh giá và xếp hạng các cấu dạng ligand dựa trên năng lượng liên kết.

Các bước tiến hành

- Chuẩn bị protein: Cấu trúc 3D của protein đích tác động tiềm năng ở dạng phức hợp được tìm kiếm trên ngân hàng dữ liệu RCSB PDB database (<http://www.rcsb.org/>). Protein và ligand đồng kết tinh được tách riêng sử dụng Discovery Studio 2024 (file pdb), sau đó được loại nước, thêm liên kết hydro phân cực, gắn trường lực Kollman bằng Autodock tool 1.5.7 (file pdbqt).
- Chuẩn bị cơ sở dữ liệu: Ligand được tải từ Pubchem hoặc vẽ, tối thiểu hóa năng lượng bằng phần mềm Chem3D 19.0 và chuyển thành tập .pdb bằng PyMOL 3.0.4. Dùng AutodockTool 1.5.7 để chuyển thành tập .pdbqt.
- Redocking: Giá trị độ lệch RMSD (root mean square deviation) của phối tử đồng kết tinh trước và sau khi re-dock vào protein bằng quy trình docking sẽ sử dụng để đánh giá quy trình docking. Nếu giá trị RMSD < 2,0 Å thì quy trình thực hiện đáng tin cậy và có giá trị [92].
- Docking ligand và đánh giá kết quả: Docking phân tử được thực hiện bằng phần mềm Autodock Vina 1.1.2. Kết quả đánh giá dựa trên năng lượng gắn kết (kcal/mol). Năng lượng gắn kết càng âm thì ligand càng gắn kết tốt với protein. Kết quả docking được biểu diễn bởi PyMOL 3.0.4.

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả thử hoạt tính sinh học của các cao phân đoạn

3.1.1. Kết quả thử nghiệm hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase

Cao EtOAc được chứng minh có hiệu quả cao nhất trong việc ức chế enzyme α -glucosidase, với IC_{50} $105,10 \pm 1,56$ $\mu\text{g/mL}$, trong khi cao cồn 70% và phân đoạn n -BuOH có IC_{50} lần lượt là $448,55 \pm 1,86$ $\mu\text{g/mL}$ và $484,99 \pm 4,47$ $\mu\text{g/mL}$. Hoạt tính của phân đoạn EtOAc trong nghiên cứu này cao hơn một số mẫu thực vật khác được báo cáo như cao EtOAc từ vỏ thân cây Núc nác (*Oroxylum indicum*) có IC_{50} $17,20 \pm 1,16$ $\mu\text{g/mL}$ [94], rễ Dâu tằm (*Morus alba*) báo cáo IC_{50} là $5,80 \pm 2,29$ $\mu\text{g/mL}$ [95] và thấp hơn so với cao EtOAc từ lá cây Lan chi (*Chlorophytum comosum*) với IC_{50} là $198,18 \pm 0,25$ $\mu\text{g/mL}$ [96]. Sự khác biệt này có thể do thành phần hóa học, nồng độ các hợp chất hoạt tính, cũng như kỹ thuật chiết tách và điều kiện thử nghiệm.

Kết quả thử nghiệm cho thấy phân đoạn EtOAc của mẫu nghiên cứu là phân đoạn tiềm năng nhất, do đó các phân đoạn có hoạt tính sẽ được tiếp tục phân lập và đánh giá hoạt tính sinh học để xác định khả năng ức chế α -glucosidase. Kết quả được trình bày trong **Bảng 3.1**.

Bảng 3.1. Kết quả hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase của các cao phân đoạn của cây Rau đắng đất

Mẫu thử	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
Cao cồn 70%	$448,55 \pm 1,86$
Cao EtOAc	$105,10 \pm 1,56$
Cao n -BuOH	$484,99 \pm 4,47$
Acarbose	$659,46 \pm 6,97$

3.1.2. Kết quả thử nghiệm hoạt tính ức chế enzyme xanthine oxidase

Qua thử nghiệm hoạt tính ức chế enzyme xanthine oxidase của cao phân đoạn (chất đối chứng dương allopurinol) (**Bảng 3.2**) cho thấy: cao cồn 70% có hoạt tính ức chế enzyme xanthine oxidase với giá trị $IC_{50} = 130,56 \pm 3,79$ $\mu\text{g/mL}$. Cao EtOAc có hoạt tính ức chế mạnh nhất với giá trị $IC_{50} = 29,67 \pm 1,02$ $\mu\text{g/mL}$, tiếp đến là cao n -BuOH với giá trị $IC_{50} = 83,16 \pm 0,27$ $\mu\text{g/mL}$. Kết quả IC_{50} của cao EtOAc thấp hơn so với một số chiết xuất EtOAc được liệu khác như cây Kim cang (*Smilax china*) đạt IC_{50} là $101,04$ $\mu\text{g/mL}$ [97], Đỗ trọng (*Eucommia ulmoides*) với IC_{50} 247 $\mu\text{g/mL}$ [98].

Kết quả này cho thấy *G. oppositifolius* là nguồn thực vật tiềm năng với hoạt tính ức chế XO đáng kể, đặc biệt là phân đoạn EtOAc. Theo hiểu biết của chúng tôi, đây là

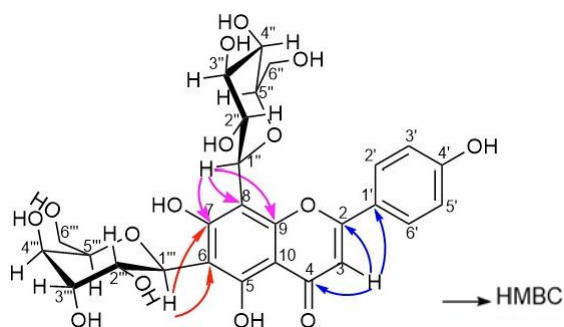
báo cáo đầu tiên về tác dụng ức chế xanthine oxidase (XO) *in vitro* của chiết xuất *G. oppositifolius*. Do đó, hoạt tính ức chế của tất cả các hợp chất phân lập được đối với XO được đánh giá sâu hơn trong *in vitro*. Những kết quả trên sẽ là cơ sở cho việc tìm kiếm các hợp chất trong cây Rau đắng đất có tác dụng ức chế enzyme xanthine oxidase.

Bảng 3.2. Kết quả thử nghiệm hoạt tính ức chế enzyme xanthine oxidase của các cao phân đoạn của cây Rau đắng đất

Mẫu thử	IC ₅₀ (μg/mL)
Cao cồn 70%	130,56 ± 3,79
Cao EtOAc	29,67 ± 1,02
Cao <i>n</i> -BuOH	83,16 ± 0,27
Allopurinol	0,52 ± 0,02

3.2. Xác định cấu trúc hóa học các hợp chất phân lập

3.2.1. Hợp chất **G-1**: Vicenin 2 (*apigenin 6,8-C-di-β-D-glucopyranoside*)



Hình 3.1. Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC chính của hợp chất **G-1**

Hợp chất **G-1** thu được dưới dạng bột vô định hình, màu vàng. Phổ (-) ESI-MS của **G-1** cho đỉnh ion phân tử giả tại $[M-H]^-$ với m/z 593,14, kết hợp với dữ liệu phổ ^{13}C -NMR và HSQC cho phép xác định công thức phân tử $\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{15}$ ($\Omega=13$). Trên phổ ^1H -NMR có 5 tín hiệu proton với δ_{H} trong khoảng 6,81 đến 8,03 ppm của vòng thơm. Ba tín hiệu OH ở vùng trường thấp được xác định là 5-OH (δ 13,76), 7-OH (δ 10,37), 4'-OH (δ 9,36) dựa trên tương tác quan sát thấy trên phổ HMBC. Trên phổ ^{13}C -NMR của **G-1** xuất hiện 27 tín hiệu carbon, trong đó có 15 tín hiệu đặc trưng của flavonoid và 12 tín hiệu của 2 đường hexose. Cấu trúc flavone được xác định thông qua dịch chuyển hóa học của carbon carbonyl vùng trường thấp với δ_{C} 182,3 và sự hiện diện của carbon =CH- được gán cho C3 với δ_{C} 102,6 và δ_{H} 6,81 s. Trong cấu trúc này, vòng B được xác định là đối xứng 1 nhóm thế khi trên phổ ^{13}C -NMR cho 2 tín hiệu

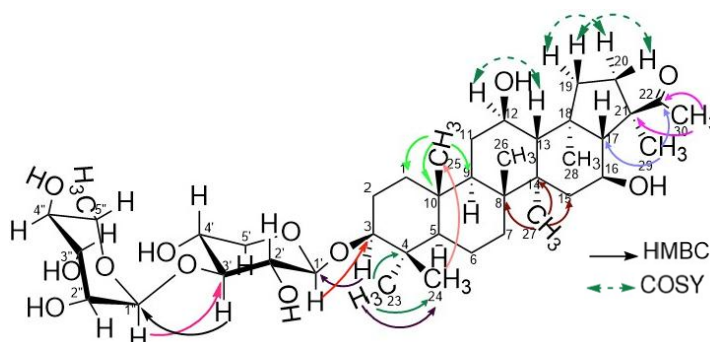
đối xứng ở δ_C 129,0 và 115,9. Trên phổ ^{13}C -NMR, vùng 60-80 ppm cho 12 tín hiệu carbon tương ứng với 2 đường hexose, và việc thiếu đi tín hiệu đặc trưng thường thấy của C6 ~ 98 ppm và C8 ~ 94 ppm trên khung aglycon gợi ý cho cấu trúc của 2 liên kết C-glycosid tại 2 vị trí này. Điều này một lần nữa được chứng minh trên tương tác quan sát thấy trên phổ HMBC của 2 proton anomer H-1'' (4,76 *d*, 10 Hz) với C-8 (105,3 ppm) và H-1''' (4,81 *d*, 9,5 Hz) với C-6 (107,5 ppm). Các dữ liệu phổ của **G-1** được so sánh với dữ liệu phổ tương ứng của hợp chất vicenin 2 cho thấy sự phù hợp [99]. Vì vậy, hợp chất **G-1** được xác định là vicenin 2 – một hợp chất đã được báo cáo trước đây trong loài *G. oppositifolius* và một số loài thuộc chi *Glinus*.

Bảng 3.3. Dữ liệu phổ NMR của **G-1** và vicenin 2

Vị trí	G-1				Vicenin 2	
	(DMSO - <i>d</i> ₆ , 500 MHz)				(DMSO - <i>d</i> ₆ , 400 MHz)	
	δ_C (ppm)	δ_H (ppm) <i>J</i> (Hz)	HMBC (H→C)	COSY	δ_C (ppm)	δ_H (ppm) <i>J</i> (Hz)
2	164,1	-	-		164,1	-
3	102,6	6,81 <i>s</i>	2, 4, 10, 1'		102,6	6,81 <i>s</i>
4	182,3	-	-		182,3	-
5	158,6	-	-		158,6	-
6	107,5	-	-		107,5	-
7	160,8	-	-		161,2	-
8	105,3	-	-		105,3	-
9	155,1	-	-		155,1	-
10	103,9	-	-		103,8	-
1'	121,5	-	-		121,5	-
2'	129,0	8,03 <i>d</i> (9,0)	2, 3', 4'	3'	129,0	8,03 <i>d</i> (8,5)
3'	115,9	6,90 <i>d</i> (9,0)	1', 2', 4'	2'	115,8	6,91 <i>d</i> (8,5)
4'	161,2	-	-		161,2	-
5'	116,0	6,94 <i>d</i> (8,5)	1', 4', 6'	6'	115,8	6,91 <i>d</i> (8,5)
6'	128,7	7,95 <i>d</i> (8,5)	2, 4', 5'	5'	129,0	8,03 <i>d</i> ; 8,5)
Glc- 1''	73,4	4,76 <i>d</i> (10,0)	7, 8, 9		73,8	4,80 <i>d</i> (9,8)
2''	70,9	3,88 <i>m</i>			70,9	3,50 – 3,86 <i>m</i>
3''	78,8	3,20 <i>m</i>			78,8	
4''	70,6	3,45 <i>m</i>			70,6	
5''	81,9	3,30 <i>m</i>			81,8	
6''	59,8	3,60 <i>m</i> 3,65 <i>m</i>			59,8	
Glc- 1'''	74,1	4,81 <i>d</i> (9,5)	6, 7		74,1	4,75 <i>d</i> (9,8)
2'''	72,0	3,50 <i>m</i>			71,9	3,50 – 3,86 <i>m</i>
3'''	77,8	3,30 <i>m</i>			78,8	
4'''	69,1	3,40 <i>m</i>			69,1	

Vị trí	G-1 (DMSO - d_6 , 500 MHz)			Vicenin 2 (DMSO - d_6 , 400 MHz)	
	δ_C (ppm)	δ_H (ppm) J (Hz)	HMBC (H $\rightarrow$ C)	δ_C (ppm)	δ_H (ppm) J (Hz)
5'''	80,9	3,35 <i>m</i>		81,4	
6'''	61,3	3,55 <i>m</i>		61,3	
		3,76 <i>m</i>			
		13,70 <i>s</i>			

3.2.2. Hợp chất G-2: *Spergulacin (spergulagenin A -3-O-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)]- β -D-xylopyranosid)*



Hình 3.2. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC, COSY của **G-2**

Hợp chất **G-2** phân lập là dạng bột vô định hình, màu trắng. Công thức phân tử của **G-2** được xác định là $C_{41}H_{68}O_{12}$ ($\Omega=8$) bằng phương pháp phổ khối phân giải cao (-) HR-APCI-MS dựa vào peak ion phân tử giả tại m/z 797,4670 $[M+HCOO]^-$. Phổ ^{13}C -NMR và DEPT của hợp chất **G-2** cho biết có 41 tín hiệu carbon, trong đó có 30 tín hiệu của aglycon triterpen cùng 5 tín hiệu của đường *O*-pentose và 6 tín hiệu của đường *O*-hexose. Các tín hiệu trên phổ ^{13}C -NMR cũng cho thấy các tín hiệu của khung aglycon hopan, bao gồm: 8 nhóm $-CH_3$ (δ_C 27,4; 16,1; 15,6; 16,6; 18,5; 17,2; 20,1; 25,8 ppm), 6 nhóm C_{IV} với một $>C=O$ (δ_C 213,8 ppm), 8 nhóm $-CH_2-$, 7 nhóm $-CH-$. Hợp chất **G-2** có tín hiệu carbon tại δ_C 52,2 ppm gắn với nhóm methyl C29 (δ_C 20,1 ppm) và điều này được khẳng định vì các proton nhóm methyl H29 (δ_H 1,25 ppm), proton H17 (1,62 ppm) và 2 proton H20 (1,73; 1,49 ppm) có tương tác HMBC với C-21. Tín hiệu của carbon thuộc nhóm $>C=O$ tại δ_C 213,7 ppm được quy cho C22 và điều này cũng được khẳng định do các proton nhóm methyl tại δ_H 2,1 ppm, proton nhóm methyl tại δ_H 1,25 ppm, proton tại δ_H 1,62 ppm và 2 proton (1,73 ; 1,49 ppm) có tương tác HMBC với C-22.

Phổ 1H -NMR của **G-2** cho thấy có 8 tín hiệu dưới dạng peak đơn của 8 nhóm methyl ($-CH_3$) với δ_H lần lượt là 0,95; 0,75; 0,79; 0,95; 0,90; 0,91; 1,25; 2,10 ppm. Các tín hiệu ở vùng trường thấp H-3 (δ_H 3,01), H-12 (δ_H 3,67) và H-16 (δ_H 3,58) cũng như

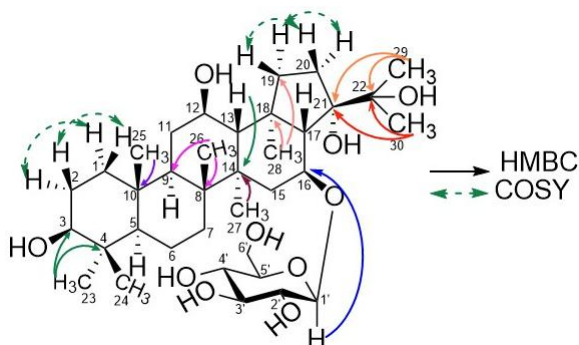
tín hiệu carbon tương ứng C-3 (δ_C 87,9), C-12 (δ_C 67,3) và C-16 (δ_C 64,1). Như vậy có thể nhận định rằng phần aglycon thuộc khung hopan với nhóm methylceton gắn vào C-21, ba nhóm hydroxy gắn tại C-3, C-12 và C-16. So sánh dữ liệu phổ trong tài liệu, khung aglycon của hợp chất **G-2** được xác định là spergulagenin A, một genin của saponin triterpend kiểu hopan có trong cây Rau đắng đất. Ngoài ra, hợp chất **G-2** còn có các tín hiệu đặc trưng của đường D-xylose với δ_C 105,8; 74; 81; 68,2; 65,4 *ppm*. Carbon anomer của đường có δ_C 105,8 *ppm* cho thấy đây là một *O*-glycosid. Trên phổ $^1\text{H-NMR}$, tín hiệu H-1' anomer của đường xylose có tương tác HMBC với C-3 của aglycon chứng tỏ đường D-xylose gắn vào C-3 của aglycon và H-1' có δ_H 4,16 (*d*; 7,5 Hz) cho biết cấu hình β của D-xylose (H-1' và H-2' đều hướng *axial* so với mặt phẳng vòng). Các tín hiệu carbon tại (δ_C 100,5; 70,5; 70,6; 72,1; 68,1; 17,9 *ppm*) cùng thêm tín hiệu tại δ_H 5,0 *s* (H-1'') gắn với carbon anomer đặc trưng cho đường α -L- rhamnose. Trên phổ HMBC, tín hiệu của proton tại δ_H 5,00 *ppm* (H-1'') của carbon anomer (đường L-rhamnose) có tương tác với C-3' và proton tại δ_H 3,30 *ppm* H-3' có tương tác với C-1'' chứng minh đường L-rhamnose gắn vào đường xylose tại vị trí 3'. Các tương tác của các proton kế cận ghi nhận được từ dữ liệu phổ COSY của hợp chất **G-2** cho phép gán các vị trí của các proton này trong cấu trúc. Cấu trúc của các chất **G-2** được xác định một cách chắc chắn bằng các dữ liệu phổ NMR một chiều và hai chiều. So sánh với dữ liệu phổ $^1\text{H-NMR}$ và $^{13}\text{C-NMR}$ trong tài liệu [60], hợp chất **G-2** được xác định là spergulacin (spergulagenin A-3-*O*-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)]- β -D-xylopyranosid) – một hợp chất đã được báo cáo trước đây trong loài *G. oppositifolius* và một số loài thuộc chi *Glinus*.

Bảng 3.4. Dữ liệu phổ NMR của **G-2** và spergulacin

Vị trí	G-2 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 500 MHz)				Spergulacin (DMSO- <i>d</i> ₆ , 500 MHz)	
	δ_C (<i>ppm</i>)	δ_H (<i>ppm</i>) <i>J</i> (Hz)	HMBC (H $\rightarrow$ C)	COSY	δ_C (<i>ppm</i>)	δ_H (<i>ppm</i>) <i>J</i> (Hz)
1	38,2	1,60 <i>m</i> 0,90 <i>m</i>		2	38,2	1,60 <i>m</i>
2	25,8	1,69 <i>m</i> 1,52 <i>m</i>		1	25,8	1,70 <i>m</i>
3	87,9	3,01 <i>dd</i> (3,5; 11,5)	24, 1'		87,8	3,01 <i>dd</i> (11,5; 4,0)
4	38,8	-			38,8	-
5	54,8	0,67 <i>d</i> (10,5)	25	6	54,8	0,67 <i>d</i> (10,5)
6	17,8	1,48 <i>m</i> 1,35 <i>m</i>		5,7	17,8	1,46 <i>m</i>
7	32,8	1,37 <i>m</i> 1,17 <i>m</i>		6	32,8	1,38 <i>m</i>

Vị trí	G-2 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 500 MHz)			COSY	Spergulacin (DMSO- <i>d</i> ₆ , 500 MHz)	
	δ_C (ppm)	δ_H (ppm) <i>J</i> (Hz)	HMBC (H→C)		δ_C (ppm)	δ_H (ppm) <i>J</i> (Hz)
8	44,7	-			44,7	-
9	48,1	1,21 <i>m</i>	26		48,1	
10	36,2	-			36,1	-
11	31,8	1,67 <i>m</i> 1,25 <i>m</i>			31,8	1,65 <i>m</i>
12	67,3	3,67 <i>m</i>		13	67,3	3,68 <i>m</i>
13	54,5	1,30 <i>d</i> (10,5)	8,12,27	12	54,5	1,30 <i>d</i> (10,5)
14	40,9	-			40,9	-
15	44,3	1,38 <i>m</i> 1,16 <i>m</i>	13,16,27		44,3	1,37 <i>m</i>
16	64,1	3,58 <i>m</i>		17	64,0	3,58 <i>m</i>
17	62,9	1,62 <i>d</i> (11,5)	16,18,21,28,2 9	16	62,8	1,62 <i>d</i> (11,5)
18	46,0	-			45,9	-
19	44,6	2,00 <i>dd</i> (7,0; 12,0)	17,18,21,28	20	44,6	2,00 <i>dd</i> (7,0; 12,0)
20	36,7	1,49 <i>m</i> 1,73 <i>m</i>	18,22	19	36,7	1,73 <i>m</i>
21	52,2	-			52,2	-
22	213,8	-			213,6	-
23	27,4	0,95 <i>s</i>	3,4,5,24		27,4	0,95 <i>s</i>
24	16,1	0,75 <i>s</i>	3,4,5,23		16,0	0,75 <i>s</i>
25	15,6	0,79 <i>s</i>	1,5,9,10		15,5	0,79 <i>s</i>
26	16,6	0,95 <i>s</i>	7,8,9,14		16,5	0,95 <i>s</i>
27	18,5	0,90 <i>s</i>	8,13,14,15,28		18,4	0,91 <i>s</i>
28	17,2	0,91 <i>s</i>	13,14,17,19		17,1	0,91 <i>s</i>
29	20,1	1,25 <i>s</i>	17,20,21,22		20,1	1,25 <i>s</i>
30	25,8	2,10 <i>s</i>	21,22		25,7	2,10 <i>s</i>
Xyl - 1'	105,8	4,16 <i>d</i> (7,5)	3		105,6	4,16 <i>d</i> (7,5)
2'	74,0	3,09 <i>m</i>			73,8	3,09 <i>m</i>
3'	81,0	3,30 <i>m</i>	4',1''		81,0	3,30 <i>m</i>
4'	68,2	3,30 <i>m</i>			68,2	3,30 <i>m</i>
5'	65,4	3,09 <i>m</i> 3,68 <i>m</i>			65,3	3,09 <i>m</i> 3,70 <i>m</i>
Rha-1''	100,5	5,00 <i>s</i>	3',2'',5''		100,5	5,00 <i>s</i>
2''	70,5	3,68 <i>m</i>			70,5	3,68 <i>m</i>
3''	70,6	3,48 <i>m</i>			70,6	3,48 <i>m</i>
4''	72,1	3,18 <i>m</i>			72,1	3,18 <i>m</i>
5''	68,1	3,87 <i>m</i>			68,0	3,87 <i>m</i>
6''	17,9	1,08 <i>d</i> (6,0)	4'',5''		17,8	1,08 <i>d</i> (6,0)

3.2.3. Hợp chất G-3: *Glinosid C (16-O-(β-D-glucopyranosyl)- 3β,12β, 16β, 21α, 22-pentahydroxyhopan)*



Hình 3.3. Công thức cấu tạo và tương tác HMBC, COSY của hợp chất **G-3**

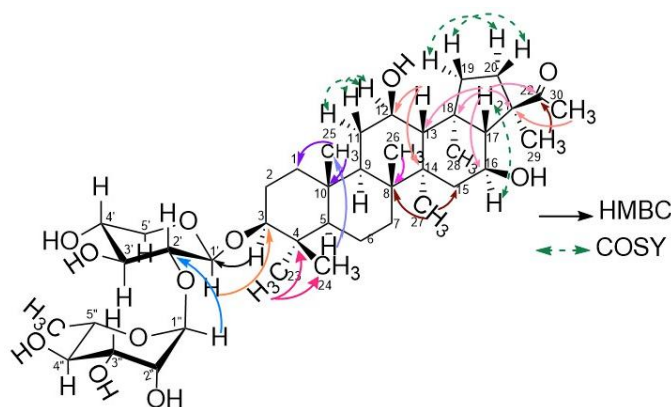
Hợp chất **G-3** thu được dạng bột vô định hình, màu trắng. Phổ (-) APCI-MS của **G-3** cho đỉnh $[M+HCOO]^-$ với m/z 699,4321 phù hợp với công thức $C_{36}H_{62}O_{10}$ ($\Omega=6$). Trên phổ ^{13}C NMR của **G-3** xuất hiện 36 tín hiệu carbon, trong đó có 30 tín hiệu của aglycon triterpend và 6 tín hiệu của đường hexose. Các tín hiệu trên phổ ^{13}C -NMR cũng cho thấy các tín hiệu của khung aglycon hopan, bao gồm: 8 nhóm $-CH_3$ (δ_C 29; 16,5; 16,1; 17,2; 19,9; 17,1; 26,7; 27,5 ppm), 7 nhóm C_{IV} , 8 nhóm $-CH_2-$, 7 nhóm $-CH-$. Phổ 1H -NMR của **G-3** cho thấy có 8 tín hiệu dưới dạng peak đơn của 8 nhóm methyl ($-CH_3$) với δ_H lần lượt là 1,2; 0,98; 0,71; 0,86; 1,08; 1,30; 1,52; và 1,53 ppm. Các tín hiệu ở vùng trường thấp H-3 (δ 3,42), H-12 (δ 4,42) và H-16 (δ 4,47) cũng như tín hiệu carbon tương ứng C-3 (δ 78,2), C-12 (δ 66,9) và C-16 (75,4) cho thấy sự xuất hiện của nhóm oxymethin ($-O-CH-$) trong cấu trúc. Ngoài ra còn có các tín hiệu đặc trưng của đường D- glucose với δ_C 101,7; 75,8; 78,7; 72,5; 78,4; 63,5 ppm. Carbon anomer của đường có δ_C 101,7 ppm cho thấy đây là một O-glycosid. Trên phổ HMBC, tín hiệu H-1' anomer của đường glucose có tương tác với C-16 của aglycon chứng tỏ đường D-glucose gắn vào C-16 của aglycon và H-1' có δ_H 5,07 d (7,5 Hz) cho biết cấu hình β của D- glucose (H-1' và H-2' đều hướng *axial* so với mặt phẳng vòng). Cấu trúc của các chất **G-3** được xác định một cách chắc chắn bằng các dữ liệu phổ NMR một chiều và hai chiều. So sánh với dữ liệu phổ 1H -NMR và ^{13}C -NMR trong tài liệu [58], **G-3** là glinosid C (16-O-(β-D-glucopyranosyl)- 3β,12β, 16β, 21α, 22-penta hydroxy hopan) – một hợp chất có tác dụng ức chế α -glucosidase, đã được báo cáo năm 2012 trong loài *G. oppositifolius*.

Bảng 3.5. Dữ liệu phổ NMR của **G-3** với glinosid C

Vị trí	G-3 (pyridine- <i>d</i> ₅ , 500 MHz)				Glinosid C (pyridine- <i>d</i> ₅ , 600 MHz)	
	δ_c (ppm)	δ_H (ppm) <i>J</i> (Hz)	HMBC (H→C)	COSY	δ_c (ppm)	δ_H (ppm) <i>J</i> (Hz)
1	39,0	1,53 <i>m</i> 0,80 <i>m</i>		2	39,1	1,49 <i>m</i> 0,79 <i>m</i>
2	28,2	1,80 <i>m</i> 1,30 <i>m</i>		1,3	28,6	1,78 <i>m</i> 1,24 <i>m</i>
3	78,2	3,42 <i>m</i>	4,23,24	2	78,4	3,43 <i>m</i>
4	39,6	-			39,8	-
5	56,0	0,71 <i>m</i>	4,25	6	56,0	0,73 <i>m</i>
6	19,0	1,45 <i>m</i> 1,25 <i>m</i>		5,7	19,1	1,49 <i>m</i> 1,29 <i>m</i>
7	33,7	1,20 <i>m</i> 1,35 <i>m</i>	26	6	33,8	1,17 <i>m</i> 1,41 <i>m</i>
8	42,0	-			42,0	-
9	48,9	1,25 <i>m</i>	26		48,9	1,24 <i>m</i>
10	37,6	-			37,6	-
11	27,8	2,25 <i>m</i> 1,50 <i>m</i>	9,12	12	27,9	2,30 <i>m</i> 1,45 <i>m</i>
12	66,9	4,42 <i>m</i>		11	66,9	4,42 <i>m</i>
13	54,4	1,86 <i>d</i> (6,5)	14		54,6	1,86 <i>d</i> (7,8)
14	45,4	-			45,5	-
15	45,8	1,68 <i>m</i> 1,85 <i>m</i>	12,14,16,26, 27		46,0	1,67 <i>m</i> 1,89 <i>m</i>
16	75,4	4,47 <i>m</i>	13,1'		75,4	4,44 <i>m</i>
17	73,7	2,32 <i>d</i> (11,5)	12,13,15,16, 18,21,22		74,1	2,32 <i>d</i> (9,0)
18	47,8	-			47,9	-
19	42,7	1,91 <i>m</i> 2,70 <i>m</i>	12,14,17,18, 21,28	20	42,8	1,91 <i>m</i> 2,69 <i>m</i>
20	37,8	1,80 <i>m</i> 1,90 <i>m</i>	17,18,19,21	19	38,1	1,82 <i>m</i> 1,91 <i>m</i>
21	86,1	-			86,1	-
22	75,7	-			75,8	-
23	29,0	1,20 <i>s</i>	3,4,5,24		29,0	1,21 <i>s</i>
24	16,5	0,98 <i>s</i>	3,4,5,23		16,6	1,00 <i>s</i>
25	16,1	0,71 <i>s</i>	1,5,9,10		16,2	0,71 <i>s</i>
26	17,2	0,86 <i>s</i>	7,8,9,14		17,2	0,84 <i>s</i>
27	19,9	1,08 <i>s</i>	8,13,14,15		20,0	1,09 <i>s</i>
28	17,1	1,30 <i>s</i>	13,17,18,19		17,2	1,32 <i>s</i>
29	26,7	1,52 <i>s</i>	17,21,22		26,9	1,52 <i>s</i>

Vị trí	G-3 (pyridine- <i>d</i> ₅ , 500 MHz)				Glinosid C (pyridine- <i>d</i> ₅ , 600 MHz)	
	δ_C (ppm)	δ_H (ppm) <i>J</i> (Hz)	HMBC (H $\rightarrow$ C)	COSY	δ_C (ppm)	δ_H (ppm) <i>J</i> (Hz)
30	27,5	1,53 <i>s</i>	17,21,22,29		27,6	1,56 <i>s</i>
Glc - 1'	101,7	5,07 <i>d</i> (7,5)	16	2'	102,0	5,13 <i>d</i> (7,8)
2'	75,8	4,03 <i>m</i>			76,0	4,08 <i>m</i>
3'	78,7	4,34 <i>m</i>		4'	79,0	4,35 <i>m</i>
4'	72,5	4,17 <i>m</i>	3',5',6'	5'	72,7	4,25 <i>m</i>
5'	78,4	4,03 <i>m</i>	1',3',4'	1',4',6'	78,4	4,05 <i>m</i>
6'	63,5	4,34 <i>m</i>		5'	63,8	4,40 <i>m</i>
		4,58 <i>m</i>				4,62 <i>m</i>

3.2.4. Hợp chất G-4: Spergulacin A (spergulagenin A-3-O-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)]- β -D-xylopyranosid)



Hình 3.4. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC, COSY của G-4

Hợp chất **G-4** phân lập là dạng bột vô định hình, màu trắng. Phổ (-) APCI-MS của **G-4** cho đỉnh $[M+Cl]^-$ với m/z 787,23 tương ứng với phân tử khối 752 phù hợp với công thức $C_{41}H_{68}O_{12}$ ($\Omega=8$). Phổ ^{13}C -NMR và DEPT của hợp chất **G-4** cho biết có 41 tín hiệu C, trong đó có 30 tín hiệu của aglycon triterpen và 5 tín hiệu của đường pentose và 6 tín hiệu của đường hexose. Các tín hiệu trên phổ ^{13}C -NMR cũng cho thấy các tín hiệu của khung aglycon hopen: 8 nhóm $-CH_3$ (δ_C 27,2; 15,9; 15,7; 16,5; 18,4; 17,2; 20,1; 25,8 ppm), 6 nhóm C_{IV} với một $>C=O$ (δ_C 213,7 ppm), 8 nhóm $-CH_2-$, 7 nhóm $-CH-$. Hợp chất **G-4** có tín hiệu carbon tại δ_C 52,1 ppm gắn với nhóm methyl C29 (δ_C 20,1 ppm) và điều này được khẳng định vì các proton nhóm methyl (δ_H 1,25 ppm), proton (1,61 ppm) và 2 proton (1,74; 1,48 ppm) có tương tác HMBC với C-21. Tín hiệu của carbon thuộc nhóm $>C=O$ tại δ_C 213,7 ppm được quy cho C22 và điều này cũng được khẳng định do các proton nhóm methyl tại δ_H 2,1 ppm, proton nhóm methyl tại δ_H 1,25 ppm, proton tại δ_H 1,61 ppm và 2 proton (1,74; 1,48 ppm) có

tương tác HMBC với C-22. Phổ $^1\text{H-NMR}$ của **G-4** cho thấy có 8 tín hiệu dưới dạng peak đơn của 8 nhóm methyl ($-\text{CH}_3$) với δ_{H} lần lượt là 0,94; 0,74; 0,79; 0,95; 0,91; 0,90; 1,25; 2,10 *ppm*. Các tín hiệu ở vùng trường thấp H-3 (δ_{H} 3,02), H-12 (δ_{H} 3,68) và H-16 (δ_{H} 3,58) cũng như tín hiệu carbon tương ứng C-3 (δ_{C} 87,4), C-12 (δ_{C} 67,2) và C-16 (δ_{C} 64,0) cho thấy sự xuất hiện của nhóm oxymethin ($-\text{O-CH-}$) trong cấu trúc. Như vậy có thể nhận định rằng phần aglycon thuộc khung hopan với nhóm methylceton gắn vào C-21, ba nhóm hydroxy gắn tại C-3, C-12 và C-16. Ngoài ra, hợp chất **G-4** còn có các tín hiệu đặc trưng của đường D-xylose với δ_{C} 104,5; 76,6; 77,7; 69,9; 65,4 *ppm*. Carbon anomer của đường có δ_{C} 104,5 *ppm* cho thấy đây là một *O*-glycosid. Trên phổ HMBC, tín hiệu H-1' anomer của đường D-xylose có tương tác với C-3 của aglycon chứng tỏ D-xylose gắn vào C-3 của aglycon và H-1' có δ_{H} 4,24 (*d*; 7,0 Hz) cho biết cấu hình β của D-xylose (H-1' và H-2' đều hướng *axial* so với mặt phẳng vòng). Các tín hiệu carbon tại (δ_{C} 100,0; 70,2; 70,3; 72,0; 68,1; 17,8) *ppm* cùng với tín hiệu tại δ_{H} 5,22 *s* gắn với H-1'' đặc trưng cho đường L-rhamnose. Trên phổ HMBC, tín hiệu của proton tại δ_{H} 5,22 *ppm* (H-1'') của carbon anomer (đường L-rhamnose) có tương tác với C-2' và proton tại δ_{H} 3,23 *ppm* (H2') có tương tác với C-1'' đã chứng tỏ đường L-rhamnose gắn vào đường D-xylose ở vị trí C-2'. Cấu trúc của các chất **G-4** được xác định một cách chắc chắn bằng các dữ liệu phổ NMR một chiều và hai chiều. So sánh với dữ liệu phổ $^1\text{H-NMR}$ và $^{13}\text{C-NMR}$ trong tài liệu [60], hợp chất **G-4** được xác định là spergulacin A (spergulagenin A-3-*O*-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)]- β -D-xylopyranosid) – một hợp chất đã được báo cáo trước đây trong loài *G. oppositifolius* và một số loài thuộc chi *Glinus*.

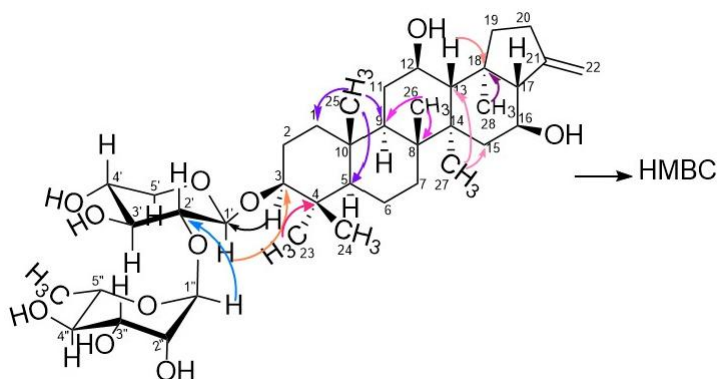
Bảng 3.6. Dữ liệu phổ NMR của **G-4** với spergulacin A

Vị trí	G-4 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 500 MHz)				Spergulacin A (DMSO- <i>d</i> ₆ , 500 MHz)	
	δ_{C} (<i>ppm</i>)	δ_{H} (<i>J= Hz</i>) <i>ppm</i>	HMBC (H $\rightarrow$ C)	COSY	δ_{C} (<i>ppm</i>)	δ_{H} (<i>J= Hz</i>) <i>ppm</i>
1	38,5	1,58 <i>m</i> 0,90 <i>m</i>			38,5	1,57 <i>m</i>
2	26,0	1,70 <i>m</i> 1,55 <i>m</i>		3	26,0	1,70 <i>m</i>
3	87,4	3,02 <i>m</i>	4, 23, 24, 1'	2	87,5	3,02 <i>m</i>
4	38,7	-			38,7	-
5	55,0	0,67 <i>d</i> (10,5)	25	6	55,1	0,67 <i>d</i> (10,8)
6	17,8	1,48 <i>m</i> 1,35 <i>m</i>		5,7	17,9	1,35 <i>m</i>
7	32,8	1,35 <i>m</i>	8	6	32,9	1,35 <i>m</i>

Vị trí	G-4 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 500 MHz)				Spergulacin A (DMSO- <i>d</i> ₆ , 500 MHz)	
	δ_C (ppm)	δ_H (<i>J</i> = Hz) ppm	HMBC (H→C)	COSY	δ_C (ppm)	δ_H (<i>J</i> = Hz) ppm
		1,15 <i>m</i>				
8	44,7	-			44,8	-
9	48,1	1,23 <i>m</i>			48,1	
10	36,1	-			36,2	-
11	31,8	1,65 <i>m</i>	9	12	31,8	1,65 <i>m</i>
		1,23 <i>m</i>				
12	67,2	3,68 <i>m</i>		11,13	67,3	3,71 <i>m</i>
13	54,5	1,30 <i>d</i> (10,5)	12, 14,18,27	12	54,5	1,30 <i>d</i> (10,8)
14	40,9	-			41,0	-
15	44,3	1,38 <i>m</i>	13,8,17,27	16	44,3	1,37 <i>m</i>
		1,17 <i>m</i>				
16	64,0	3,58 <i>m</i>	15,18,22,28,2 9	17,15	64,1	3,59 <i>m</i>
17	62,9	1,61 <i>d</i> (11,0)	13,16,18,21,2 2,28,29	16	62,9	1,61 <i>d</i> (11,5)
18	45,9	-			46,0	-
19	44,6	2,00 <i>dd</i> (7,5; 12,5)	17,18,21,28	20	44,7	2,01 <i>dd</i> (7,3; 12,4)
20	36,7	1,74 <i>m</i>	17,18,21,22,2 9	19	36,8	1,73 <i>m</i>
		1,48 <i>m</i>				
21	52,1	-			52,2	-
22	213,7	-			213,6	-
23	27,2	0,94 <i>s</i>	3,5,24	24	27,3	0,94 <i>s</i>
24	15,9	0,74 <i>s</i>	3,4,5,23	23	16,0	0,74 <i>s</i>
25	15,7	0,79 <i>s</i>	1,5,6,9,10		15,8	0,79 <i>s</i>
26	16,5	0,95 <i>s</i>	7,8,9,14		16,6	0,95 <i>s</i>
27	18,4	0,91 <i>s</i>	8,13,14,26		18,5	0,91 <i>s</i>
28	17,2	0,90 <i>s</i>	13,17		17,2	0,91 <i>s</i>
29	20,1	1,25 <i>s</i>	17,20,21,22		20,1	1,25 <i>s</i>
30	25,8	2,10 <i>s</i>	21,22,29		25,8	2,10 <i>s</i>
Xyl - 1'	104,5	4,24 <i>d</i> (7,0)	3	2'	104,6	4,23 <i>d</i> (7,0)
2'	76,6	3,23 <i>m</i>	1''	1'	76,6	3,23 <i>m</i>
3'	77,7	3,23 <i>m</i>			77,8	3,19 <i>m</i>
4'	69,9	3,25 <i>m</i>		5'	70,0	3,27 <i>m</i>
5'	65,4	3,02 <i>m</i>		4'	65,5	3,02 <i>m</i>
		3,66 <i>m</i>				3,68 <i>m</i>
Rha- 1''	100,0	5,22 <i>s</i>	2''		100,1	5,22 <i>s</i>
2''	70,2	3,69 <i>m</i>		3''	70,3	3,71 <i>m</i>

Vị trí	G-4 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 500 MHz)				Spergulacin A (DMSO- <i>d</i> ₆ , 500 MHz)	
	δ_C (ppm)	δ_H ($J=Hz$) ppm	HMBC (H $\rightarrow$ C)	COSY	δ_C (ppm)	δ_H ($J=Hz$) ppm
3''	70,3	3,48 <i>m</i>		2''	70,4	3,48 <i>m</i>
4''	72,0	3,18 <i>m</i>		5''	72,1	3,14 <i>m</i>
5''	68,1	3,77 <i>m</i>		4''	68,0	3,78 <i>m</i>
6''	17,8	1,06 <i>d</i> (6,5)			17,9	1,06 <i>d</i> (6,2)

3.2.5. Hợp chất G-5: Spergulin B (3-O-[α -rhamnopyranosyl (1 $\rightarrow$ 2)- β -D-xylopyranosyl]-spergulatetriol)



Hình 3.5. Cấu trúc hóa học và một số tương tác HMBC chính của hợp chất **G-5**

Hợp chất **G-5** thu được ở dạng bột vô định hình màu trắng. Phổ (-) APCI-MS của **G-5** cho đỉnh $m/z = 742,78$ $[M+Cl]^-$ phù hợp với công thức phân tử $C_{39}H_{64}O_{11}$ ($M = 707,78$ g/mol). Quan sát trên phổ ^{13}C -NMR và DEPT xuất hiện 39 carbon, trong đó có 28 tín hiệu của khung aglycon bisnor-triterpenoid. Đồng thời trong vùng 60-80 ppm có 8 tín hiệu cùng với 2 tín hiệu có δ_C 105,6 và 101,6 và 1 tín hiệu có δ_C 18,3 gợi ý cấu trúc glycosid với 1 đường pentose và 1 đường hexose. Các tín hiệu trên phổ ^{13}C -NMR của khung aglycon bao gồm: 6 nhóm $-CH_3-$ (15,7; 18,7; 16,7; 15,8; 16,5; 27,7); 9 nhóm $-CH_2-$ (38,8; 26,6; 18,3; 33,2; 32,5; 44,5; 42,6; 29,6; 105,7); 7 nhóm $-CH-$ (88,3; 55,7; 48,9; 69,2; 53,4; 67; 61,6); 5 Carbon $-C_{IV}-$ (36,6; 39,3; 41,4; 45,45) với một $>C=CH_2$ (δ_C 151,8).

Tín hiệu H-16 (δ_H 4,25), H-12 (δ_H 4,10) và H-3 (δ_H 3,19) ở vùng trường thấp, cũng như các tín hiệu carbon tương ứng cho thấy sự xuất hiện của nhóm thế $-OR$ ở C-16, C-12 và C-3. Cùng với 2 proton của C-22 (δ_C 105,7 và δ_H 5,92; 5,01) ở vùng trường thấp cho đỉnh singlet, gợi ý cho cấu trúc exo-methylen và thông qua tương tác trên HMBC H-22 với C-17 và C-20 cho biết có nhóm methylen gắn vào vị trí C-21. Vậy vòng E là methylenecyclopentan. Như vậy có thể nhận định rằng phần aglycon thuộc khung hopan với ba nhóm hydroxyl tại vị trí C-3, C-12, C-16 thường thấy của những

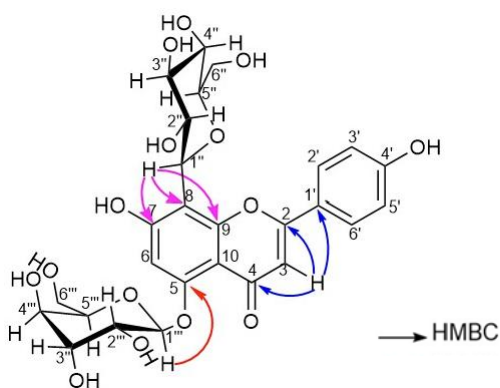
hợp chất có trong cây, và nhóm methylen gắn vào vị trí 21. Trên phổ ^{13}C -NMR của **G-5**, có các tín hiệu đặc trưng của đường D-xylose với δ_{C} 105,6; 77,8; 78,9; 71,1; 66,4. Carbon anomer của đường có δ_{C} 105,6 cho thấy đây là một *O*-glycoside. Trên phổ HMBC, tín hiệu H-1' của đường Xylose có tương tác với C-3 của aglycon chứng tỏ đường D-xylose gắn vào C-3 của aglycon và H-1' có δ_{H} 4,71 *d* (6,5) cho biết cấu hình β của D-xylose. Ngoài ra trên phổ ^{13}C -NMR của **G-5**, còn có các tín hiệu đặc trưng của đường rhamnose với δ_{C} 101,6; 71,9; 72,1; 73,6; 69,5; 18,3. Thêm vào đó trên phổ HSQC có tín hiệu H-1'' có δ_{H} 6,34 *s* gắn với carbon anomer của đường rhamnose cho thấy đây là đặc trưng của đường α -L-rhamnose. Tín hiệu H-1'' (δ_{H} 6,34 *s*) anomer của α -L-rhamnose có tương tác với C-2' δ_{C} 77,8 của D-xylose chứng minh đường α -L-rhamnose gắn vào đường D-xylose tại vị trí C-2'. Các dữ liệu phổ NMR của **G-5** được so sánh với các dữ liệu tương ứng trong tài liệu tham khảo [60], xác định hợp chất **G-5** là spergulin B.

Bảng 3.7. Dữ liệu phổ NMR của **G-5** và spergulin B

C	G-5				Spergulin B	
	Pyridine- <i>d</i> ₅ , 500MHz				Pyridine- <i>d</i> ₅ , 500MHz	
	δ_{H} (ppm) <i>J</i> (Hz)	δ_{H} (ppm) <i>J</i> (Hz)	HMBC (H $\rightarrow$ C)	COSY	δ_{H} (ppm) <i>J</i> (Hz)	δ_{H} (<i>J</i> = Hz) ppm
1	38,8	0,78 <i>m</i> ; 1,50 <i>m</i>		1	39,1	1,50 <i>m</i>
2	26,6	1,99 <i>m</i> ; 1,75 <i>m</i>		2	27,0	1,96 <i>m</i>
3	88,3	3,19 <i>dd</i> (4;11,5)	1'		88,5	3,30 <i>dd</i> (4,1;11,7)
4	39,3	-	-	-	39,6	-
5	55,7	0,62 <i>d</i> (11,5)	1,10,24,25	6	56,0	0,74 <i>d</i> (11,5)
6	18,3	1,23 <i>m</i> ; 1,37 <i>m</i> ,		5	18,72	
7	33,2	1,28 <i>m</i> ; 1,22 <i>m</i>	26		33,6	
8	45,0	-	-	-	45,4	-
9	48,9	1,24 <i>m</i>		11	49,2	
10	36,6	-	-	-	37,0	-
11	32,5	2,00 <i>m</i> ; 1,50 <i>m</i>		9	33,1	
12	69,2	4,10 <i>m</i>			69,3	4,18 <i>t</i> (8,5)
13	53,4	1,74 <i>d</i> (11)	27,18,12		53,9	1,77 <i>d</i> (10,8)
14	41,4	-	-	-	41,8	-
15	44,5	1,80 <i>dd</i> (4;12,5); 1,67 <i>m</i>	13,16,17,2 7		45,1	
16	67,0	4,25 <i>m</i>			67,2	4,30 <i>m</i>
17	61,6	2,07 <i>m</i>	16,18,21, 28		62,2	2,12 <i>m</i>
18	45,0	-	-	-	45,4	-
19	42,6	2,4 <i>m</i> ; 1,7 <i>m</i>	21		43,2	

C	G-5				Spergulin B	
	Pyridine- <i>d</i> ₅ , 500MHz				Pyridine- <i>d</i> ₅ , 500MHz	
	δ_H (ppm) <i>J</i> (Hz)	δ_H (ppm) <i>J</i> (Hz)	HMBC (H $\rightarrow$ C)	COSY	δ_H (ppm) <i>J</i> (Hz)	δ_H (<i>J</i> = Hz) ppm
20	29,6	2,25 <i>m</i> ; 2,29 <i>m</i>	21		29,9	
21	151,8	-	-	-	152,0	-
22	105,7	5,92 <i>s</i> ; 5,01 <i>s</i>	17,20		106,0	
23	27,7	1,16 <i>s</i>	3,4,5,24		28,0	1,25 <i>s</i>
24	16,5	1,05 <i>s</i>	4,5,23		16,9	1,18 <i>s</i>
25	15,8	0,71 <i>s</i>	1,5,9,10		16,2	0,84 <i>s</i>
26	16,7	0,97 <i>s</i>	7,8,14		17,0	1,04 <i>s</i>
27	18,7	1,05 <i>s</i>	8,13,14,15		19,1	1,17 <i>s</i>
28	15,7	0,98 <i>s</i>	17,18,19		16,0	1,07 <i>s</i>
Xyl-1'	105,6	4,71 <i>d</i> (6,5)	3		106,1	4,84 <i>d</i> (6,2)
2'	77,8	4,10 <i>m</i>			78,0	4,23 <i>m</i>
3'	78,9	4,10 <i>m</i>			79,6	4,16 <i>m</i>
4'	71,1	4,10 <i>m</i>		5'	71,5	4,14 <i>m</i>
5'	66,4	4,28 <i>m</i> ; 3,67 <i>m</i>	4'	4'	66,9	4,33 <i>m</i> 3,71 <i>dd</i> (9,6;11)
Rha-1''	101,6	6,34 <i>s</i>	2',2''	2''	101,9	6,52 <i>s</i>
2''	71,9	4,78 <i>m</i>	3'',4''	3''	72,4	4,86 <i>dd</i> (1,4;3,2)
3''	72,1	4,58 <i>dd</i> (3,5;9,5)	4''	2''	72,6	4,67 <i>dd</i> (3,4;9,4)
4''	73,6	4,26 <i>m</i>	5''	5''	74,1	4,33 <i>m</i>
5''	69,6	4,63 <i>m</i>	4'',6''	4''	69,7	4,76 <i>m</i>
6''	18,3	1,61 <i>d</i> (6)	5'',4''		18,7	1,71 <i>d</i> (6,2)

3.2.6. Hợp chất G-6: *Apigenin-5-O- β -D-glucopyranosyl-8-C- β -D-glucopyranosid*
(hợp chất mới)



Hình 3.6. Cấu trúc hóa học và một số tương tác HMBC của **G-6**

Hợp chất **G-6** được phân lập ở dạng bột vô định hình, màu vàng. Phổ UV của **G-6** trong dung môi methanol xuất hiện các cực đại hấp thụ ở 268 nm, 338 nm. Trên phổ

hồng ngoại xuất hiện các đỉnh đặc trưng: 3421 (-OH), 1658 (>C=O), 1575 (Ar), 1075 (C-O-C). Công thức phân tử của **G-6** được xác định là $C_{27}H_{30}O_{15}$ ($\Omega=13$) bằng phương pháp phổ khối phân giải cao (-)-HR-ESI-MS dựa vào peak ion phân tử giả tại m/z 593,1502 $[M-H]^-$ (tính toán lý thuyết cho công thức $[C_{27}H_{29}O_{15}]^-$: 593,1512 ; $\Delta = -1,69$ ppm). Trên phổ ^{13}C -NMR của **G-6** xuất hiện 27 tín hiệu C, trong đó có 15 tín hiệu có độ dịch chuyển vùng C thơm (6-3-6) gợi ý đây là 1 flavonoid. Đồng thời trong vùng 60-80 ppm có 11 tín hiệu kèm 1 tín hiệu δ_C 101,2 gợi ý cấu trúc glycosid với 2 đường hexose. Cấu trúc flavone được xác định thông qua dịch chuyển hóa học của carbon carbonyl vùng trường thấp với δ_C 182,3 và sự hiện diện của carbon =CH – được gán cho C_3 với δ_C 102,5 và δ_H 6,86. Trong cấu trúc này, vòng B được xác định là đối xứng 1 nhóm thế tại vị trí C_4' khi trên phổ ^{13}C -NMR cho 2 tín hiệu cường độ cao ở δ_C 129,2; 115,9 và hai cặp đôi 2H được gán cho H-2',6' và H-3',5' (δ_H 8,06 và 6,90). Hợp chất **G-6** cho thấy các đặc tính của một glycosid flavonoid có khung aglycon là apigenin [100]. Các tín hiệu proton anomer ở δ_H 4,88 (d , 10,0 Hz) và 4,95 (d , 7,5 Hz) xuất hiện trên phổ 1H -NMR chứng tỏ sự tồn tại hai cấu hình β của mỗi đơn vị đường trong cấu trúc của hợp chất **G-6**. Trong phổ HSQC, các tín hiệu proton anomer cho liên kết với hai tín hiệu carbon ở δ_C 73,3 và 101,2 được gán cho các carbon anomer. Dựa trên sự dịch chuyển hóa học của hai nguyên tử carbon này, đã có sự hiện diện của cấu trúc C-glycosid và O-glycosid trong hợp chất **G-6**. Vị trí của các gốc đường trong cấu trúc được xác định thông qua phân tích tương quan HMBC. Mỗi tương quan HMBC giữa δ_H 4,95 với δ_C 160,8 cho thấy đơn vị glucose đầu tiên được liên kết với nhóm hydroxy của aglycone ở C-5; Phổ HMBC cũng cho thấy tương tác giữa một proton anomer khác (δ_H 4,88) với δ_C 107,2, 155,0 và 161,2 trong khung flavone chứng tỏ phân tử glucose thứ hai liên kết với vị trí C-8. Như vậy rất có thể **G-6** là apigenin-5-O- β -D-glucopyranosyl-8-C- β -D-glucopyranosid.

Bảng 3.8. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất **G-6**

Vị trí	G-6			
	(DMSO- d_6 , 500 MHz)			
	δ_C (ppm)	δ_H (ppm) J (Hz)	HMBC (H $\rightarrow$ C)	COSY
2	164,6	-		
3	102,5	6,86 <i>s</i>	4, 2, 1'	
4	182,3	-		
5	160,8	-		
6	98,5	6,61 <i>s</i>	5, 10	
7	161,2	-		

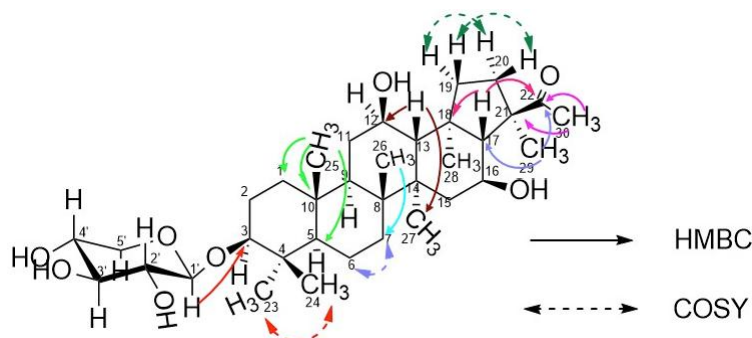
trúc flavonol được xác định bởi sự dịch chuyển của carbon carbonyl δ_C 177,5 và với sự hiện diện nhóm thế oxy được gán cho C-3 với δ_C 133,2. Trong cấu trúc này, vòng B được xác định có tính đối xứng khi trên phổ ^{13}C -NMR cho 2 tín hiệu carbon có cường độ cao gấp đôi và cách nhau 15 ppm ở δ_C 115,0 và 130,9. Trên phổ ^1H -NMR có 4 tín hiệu proton với δ_H trong khoảng 6,20 đến 8,06 ppm của vòng thơm. Phối hợp quan sát dữ liệu phổ **G-7** và tiến hành so sánh với tài liệu tham khảo cho thấy phần aglycon của **G-7** được xác định là kaempferol. Trên phổ ^{13}C -NMR xuất hiện tín hiệu đặc trưng của đường D-galactose với δ_C 101,6; 71,2; 73,1; 67,8; 75,7; 60,1. Carbon anomer của đường có δ_C 101,6 cho thấy đây là một *O*-glycosid. Trên phổ HMBC, H1'' của đường galactose có tương tác với C-3 của aglycon chứng tỏ đường D-galactose gắn vào C-3 của aglycon và H1'' có δ_H 5,39 d (7,5) cho biết cấu hình β của D-galactose. So sánh dữ liệu phổ ^1H -NMR và ^{13}C -NMR trong tài liệu [101], hợp chất **G-7** được xác định là trifolin (kaempferol-3-*O*-galactosid)– một hợp chất đã được báo cáo trước đây trong loài *G. oppositifolius*.

Bảng 3.9. Dữ liệu phổ NMR của **G-7** và trifolin

C	G-7 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 500 MHz)				Trifolin (DMSO- <i>d</i> ₆ , 500 MHz)	
	δ_C (ppm)	δ_H (ppm) <i>J</i> (Hz)	HMBC (H $\rightarrow$ C)	COSY	δ_C (ppm)	δ_H (ppm) <i>J</i> (Hz)
2	156,3	-	-	-	156,6	-
3	133,1	-	-	-	133,6	-
4	177,5	-	-	-	177,7	-
5	161,2	-	-	-	161,1	-
6	98,7	6,20 <i>d</i> (2,0)	5, 8, 10		98,9	6,21 <i>d</i> (2,0)
7	164,0	-	-	-	164,2	-
8	93,7	6,43 <i>d</i> (2,0)	6, 7, 9, 10		93,9	6,43 <i>d</i> (2,0)
9	156,3	-	-	-	156,6	-
10	103,9	-	-	-	104,1	-
1'	120,9	-	-	-	120,9	-
2', 6'	130,9	8,06 <i>d</i> (8,5)	2', 6', 2, 4'	3', 5'	130,1	8,07 <i>d</i> (9,0)
3', 5'	115,0	6,85 <i>d</i> (9,0)	3', 5', 1', 4'	2', 6'	115,5	6,88 <i>d</i> (9,0)
4'	159,9	-	-		159,9	-
Gal-1''	101,6	5,39 <i>d</i> (7,5)	3	2''	101,9	5,25 <i>d</i> (7,0)
2''	71,2	3,54 <i>m</i>		1''	71,4	3,52 <i>m</i>
3''	73,1	3,36 <i>m</i>		4''	73,1	3,37 <i>m</i>
4''	67,8	3,66 <i>m</i>		3''	68,2	3,67 <i>m</i>

C	G-7				Trifolin	
	(DMSO- <i>d</i> ₆ , 500 MHz)				(DMSO- <i>d</i> ₆ , 500 MHz)	
	δ_C (ppm)	δ_H (ppm) <i>J</i> (Hz)	HMBC (H $\rightarrow$ C)	COSY	δ_C (ppm)	δ_H (ppm) <i>J</i> (Hz)
5''	75,7	3,34 <i>m</i>		6''	75,7	3,30 <i>m</i>
6''	60,1	3,46 <i>m</i> 3,28 <i>m</i>		5''	60,3	3,42 <i>m</i>

3.2.8. Hợp chất G-8: 3-O- β -D-Xylopyranosyl-spergulenin A



Hình 3.8. Cấu trúc hóa học và một số tương tác HMBC, COSY của **G-8**

Hợp chất **G-8** thu được ở dạng bột vô định hình, màu trắng. Phổ (-)APCI – MS của **G-8** cho phân mảnh $m/z = 641,83$ $[M+Cl]^-$ cho phép nhận định khối lượng phân tử là $M = 606$, phù hợp với công thức phân tử là $C_{35}H_{58}O_8$ ($M=606,4$ g/mol). Qua quan sát phổ ^{13}C -NMR xuất hiện 35 tín hiệu carbon, trong đó có 5 tín hiệu của đường pentose và 30 tín hiệu của khung aglycon triterpen. Trên phổ NMR cũng cho thấy các tín hiệu của khung aglycon hopan, gồm 8 tín hiệu dưới dạng peak đơn δ_H 0,96 s; 0,74 s; 0,79 s; 0,95 s; 0,91 s; 0,91 s; 1,25 s và 2,10 s) tương ứng lần lượt với các tín hiệu của nhóm methyl ($-CH_3$) nằm ở vùng trường cao lần lượt là δ_C 27,4; 16,1; 15,6; 16,5; 18,4; 17,1; 20,1; 25,8 – Đây là những tín hiệu đặc trưng cho khung saponin triterpen. Ngoài ra xuất hiện các tín hiệu của một $>C=O$ (δ_C 213,7) với 6 nhóm carbon bậc 4 (C_{IV}), 8 nhóm $>CH_2$ và 7 nhóm $>CH-$. Từ tương tác giữa H-29, H-17, H-20 với C-22 và giữa H-30 với C-22 trên HMBC cho biết nhóm methylketon gắn vào C21. Tín hiệu H-3 (δ_H 3,01 *m*), H-12 (δ_H 3,68 *m*) và H16 (δ_H 3,59 *m*) ở vùng trường thấp cũng như các tín hiệu carbon tương ứng cho thấy xuất hiện nhóm C-O ở C-3 (δ_C 87,6), C-12 (δ_C 67,2) và C-16 (δ_C 64,0). C-21 (δ_C 52,1) gắn với nhóm methyl C-29 (δ_C 20,1) và điều này được chứng minh thông qua tương tác quan sát thấy trên phổ HMBC. Như vậy có thể thấy rằng phần aglycon thuộc khung hopan với nhóm methylketon gắn vào C-21, nhóm methyl C-29 gắn vào C-21, ba nhóm hydroxy gắn tại C-3, C-12 và C-16. Dựa vào dữ liệu phổ tham khảo xác định các tín hiệu (δ_C 106,1; 73,7; 76,7; 69,6; 65,5)

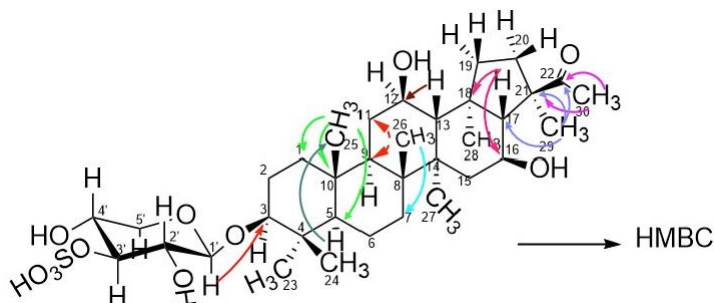
trên phổ ^{13}C -NMR là đường D-xylose. Proton anomer tương tác với C-3 của algycon trên phổ HMBC cho thấy đường D-xylose gắn vào C-3 của khung aglycon và H1' có δ_{H} 4,12 (*d*; 7,5 Hz) cho biết cấu hình β -D-xylose. Carbon anomer của đường có δ_{C} 106,1 thể hiện đây là một *O*-glycosid. Dữ liệu phổ NMR của **G-8** khi so với dữ liệu phổ của 3-*O*-(β -D-xylopyranosyl 3-sulphat)-spergulagenin A thấy rằng độ dịch chuyển C-3' bị giảm hơn so với tín hiệu C-3' của đường xylose có gắn thêm -SO₃H [60]. Vậy có thể kết luận rằng **G-8** là 3-*O*- β -D-xylopyranosyl-spergulenin A.

Bảng 3.10. Dữ liệu phổ NMR của **G-8** và 3-*O*-(β -D-xylopyranosyl 3-sulphat)-spergulagenin A

Vị trí	G-8 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 500 MHz)				3- <i>O</i> -(β -D-Xylopyranosyl 3-sulphat)-spergulagenin A (DMSO- <i>d</i> ₆ , 500 MHz)	
	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm) <i>J</i> (Hz)	HMBC (H $\rightarrow$ C)	COSY	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm) <i>J</i> (Hz)
1	38,1	0,87 <i>m</i> ; 1,60 <i>m</i>			38,2	1,58 <i>m</i> ; 0,91 <i>m</i>
2	25,8	1,69 <i>m</i> ; 1,53 <i>m</i>			25,7	1,68 <i>m</i> ; 1,56 <i>m</i>
3	87,6	3,01 <i>m</i>			87,8	3,04 <i>m</i>
4	39,0	-			38,8	-
5	54,7	0,67 <i>d</i> (10,5)		6	54,8	0,68 <i>d</i> (11,5)
6	17,9	1,49 <i>m</i> ; 1,38 <i>m</i>		5	17,9	1,48 <i>m</i> ; 1,37 <i>m</i>
7	32,8	1,38 <i>m</i> ; 1,16 <i>m</i>			32,8	1,17 <i>m</i> ; 1,41 <i>m</i>
8	44,6	-			44,7	-
9	48,0	1,21 <i>m</i>	25	11	48,1	1,17 <i>m</i>
10	36,1	-			36,2	-
11	31,8	1,67 <i>m</i> ; 1,24 <i>s</i>		9	31,8	1,67 <i>m</i> ; 1,22 <i>t</i>
12	67,2	3,68 <i>m</i>			67,3	3,67 <i>m</i>
13	54,5	1,30 <i>m</i>	8, 12, 19, 27, 28		54,5	1,31 <i>d</i> (10,6)
14	40,9	-			40,9	-
15	44,3	1,38 <i>m</i> ; 1,16 <i>m</i>			44,4	1,17 <i>m</i> ; 1,41 <i>m</i>
16	64,0	3,59 <i>m</i>			64,1	3,59 <i>m</i>
17	62,8	1,62 <i>d</i> (11,5)	17, 18, 19, 22, 28, 29		62,7	1,63 <i>d</i> (11,4)
18	45,9	-			46,0	-
19	44,7	2,01 <i>m</i>	16	20	44,6	1,33 <i>m</i> ; 2,01 <i>dd</i> (7,4; 12,4)
20	36,7	1,76 <i>m</i> ; 1,49 <i>m</i>	18, 22	19	36,7	1,49 <i>m</i> ; 1,76 <i>dd</i> (7,0; 14,3)
21	52,1	-			52,2	-
22	213,7	-			213,6	-

Vị trí	G-8 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 500 MHz)				3-O-(β -D-Xylopyranosyl 3-sulphat)-spergulagenin A (DMSO- <i>d</i> ₆ , 500 MHz)	
	δ_C (ppm)	δ_H (ppm) <i>J</i> (Hz)	HMBC (H $\rightarrow$ C)	COSY	δ_C (ppm)	δ_H (ppm) <i>J</i> (Hz)
23	27,4	0,96 <i>s</i>	3, 5, 24	24	27,3	0,98 <i>s</i>
24	16,1	0,74 <i>s</i>	3, 5, 23	23	16,1	0,73 <i>s</i>
25	15,6	0,79 <i>s</i>	1, 5, 6, 9, 10		15,5	0,80 <i>s</i>
26	16,5	0,95 <i>s</i>	7, 9, 13, 14, 15		16,5	0,96 <i>s</i>
27	18,4	0,91 <i>s</i>	8, 14, 15		18,5	0,92 <i>s</i>
28	17,1	0,91 <i>s</i>	13, 14, 16, 19		17,1	0,92 <i>s</i>
29	20,1	1,25 <i>s</i>	20, 21, 22		20,1	1,26 <i>s</i>
30	25,8	2,10 <i>s</i>	22		25,7	2,10 <i>s</i>
Xyl 1'	106,1	4,12 <i>d</i> (7,5)	3, 2'		105,7	4,23 <i>d</i> (7,0)
2'	73,7	2,97 <i>m</i>	3'		72,3	
3'	76,7	3,07 <i>m</i>	2'		82,6	
4'	69,6	3,25 <i>m</i>			68,4	
5'	65,5	3,64 <i>m</i> , 3,01 <i>m</i>	5'		65,0	

3.2.9. Hợp chất G-9: *Spergulin A* (3-O-(β -D-xylopyranosyl 3-sulphat)-*spergulagenin A*)



Hình 3.9. Cấu trúc hóa học và một số tương tác HMBC của **G-9**

Hợp chất **G-9** thu được dưới dạng tinh thể hình kim màu trắng. Phổ (-)ESI – MS của **G-9** cho đỉnh ion phân tử giả $[M-H]^-$ tại $m/z = 685,16$, kết hợp với dữ liệu phổ ^{13}C -NMR và HSQC cho phép xác định công thức phân là $\text{C}_{35}\text{H}_{58}\text{O}_{11}\text{S}$ ($\Omega = 7$). Tương tự **G-8**, phổ ^{13}C -NMR và DEPT của **G-9** cũng xuất hiện 35 tín hiệu carbon, trong đó có 30 tín hiệu của khung aglycon triterpen và 5 tín hiệu của đường pentose. Các tín hiệu trên phổ ^{13}C -NMR cho thấy các tín hiệu của khung aglycon hopan, bao gồm 8 tín hiệu nhóm methyl ($-\text{CH}_3$) nằm ở vùng trường cao lần lượt là δ_C 27,3; 16,1; 15,6; 16,5; 18,5; 17,2; 20,1; 25,8 (tương ứng lần lượt với các tín hiệu proton dưới dạng peak đơn

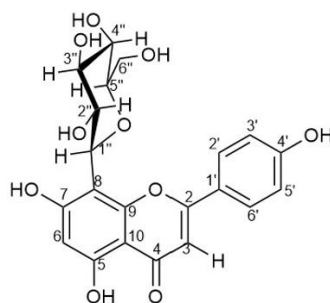
δ_H 0,97 s; 0,73 s; 0,79 s; 0,95 s; 0,91 s; 0,91 s; 1,25 s và 2,10 s) là những tín hiệu đặc trưng cho khung saponin triterpen. Ngoài ra xuất hiện các tín hiệu của 6 nhóm carbon bậc 4 (C_{IV}) với một $>C=O$ (δ_C 213,7), 8 nhóm $>CH_2$ và 7 nhóm $>CH-$. Từ tương tác giữa H-29, H-17, H-20 với C-22 cũng như giữa H-30 với C-21 trên HMBC cho biết nhóm methylketon gắn vào C-21. Tín hiệu H-3 (δ_H 3,04 m), H-12 (δ_H 3,66 m) và H-16 (δ_H 3,58 m) ở vùng trường thấp cũng như các tín hiệu carbon tương ứng cho thấy xuất hiện nhóm -C-O ở C-3 (δ_C 87,8), C-12 (δ_C 67,2) và C-16 (δ_C 64,0). C-21 (δ_C 52,1) gắn với nhóm methyl C-29 (δ_C 20,1) và điều này được chứng minh thông qua tương tác trên phổ HMBC.”Như vậy có thể nhận định rằng phần aglycon thuộc khung hopan với nhóm methylketon và nhóm methyl C-29 gắn vào C-21, ba nhóm hydroxy gắn tại C3, C12 và C16. Phổ ^{13}C -NMR xuất hiện tín hiệu (δ_C 105,8; 72,3; 82,6; 68,4; 65,0) và dựa vào dữ liệu phổ tham khảo xác định đây là đường D-xylose với vị trí C3' gắn nhóm $-HSO_3$ thay cho $-OH$ dẫn đến độ dịch chuyển của C3' bị downfield hơn so với tín hiệu C3' của đường xylose bình thường. Carbon anomer của đường có δ_C 105,8 cho thấy đây là một *O*-glycosid. Kết hợp với phổ HMBC, H1' tương tác với C3 của algycon cho thấy đường D-xylose gắn vào C3 của khung aglycon và H1' có δ_H 4,22 (*d*; 7,5 Hz) cho biết cấu hình β -D-xylose (H1' và H2' đều hướng axial với mặt phẳng vòng). Các tương tác của các proton kề cận ghi nhận được từ dữ liệu phổ COSY của hợp chất **G-9** cho phép gắn các vị trí của các proton này trong cấu trúc. So sánh cho thấy dữ liệu phổ NMR của **G-9** trùng khớp với phổ của spergulin A trong tài liệu [60]. Vậy có thể kết luận rằng **G-9** là spergulin A.

Bảng 3.11. Dữ liệu phổ NMR của **G-9** và spergulin A

Vị trí	G-9				Spergulin A	
	(DMSO- <i>d</i> ₆ , 500 MHz)				(DMSO- <i>d</i> ₆ , 500 MHz)	
	δ_C (ppm)	δ_H (ppm) <i>J</i> (Hz)	HMBC (H $\rightarrow$ C)	COSY	δ_C (ppm)	δ_H (ppm) <i>J</i> (Hz)
1	38,1	1,58 m; 0,91 m			38,2	1,58 m; 0,91 m
2	25,8	1,69 m; 1,53 m			25,7	1,68 m; 1,56 m
3	87,8	3,04 m			87,8	3,04 m
4	38,8	-			38,8	-
5	54,7	0,68 <i>d</i> (10,5)	25	6, 7	54,8	0,68 <i>d</i> (11,5)
6	17,9	1,48 m; 1,38 m		5	17,9	1,48 m; 1,37 m
7	32,8	1,18 m; 1,38 m		5	32,8	1,17 m; 1,41 m
8	44,7	-			44,7	-
9	48,1	1,18 m		11	48,1	1,17 m
10	36,1	-			36,2	-

Vị trí	G-9				Spergulin A	
	(DMSO- <i>d</i> ₆ , 500 MHz)			COSY	(DMSO- <i>d</i> ₆ , 500 MHz)	
	δ_C (ppm)	δ_H (ppm) <i>J</i> (Hz)	HMBC (H→C)		δ_C (ppm)	δ_H (ppm) <i>J</i> (Hz)
11	31,8	1,67 <i>m</i> ; 1,25 <i>m</i>		9	31,8	1,67 <i>m</i> ; 1,22 <i>t</i>
12	67,2	3,66 <i>m</i>			67,3	3,67 <i>m</i>
13	54,5	1,30 <i>d</i> (11,0)	8, 12		54,5	1,31 <i>d</i> (10,6)
14	40,9	-			40,9	-
15	44,3	1,18 <i>m</i> ; 1,38 <i>m</i>	13		44,4	1,17 <i>m</i> ; 1,41 <i>m</i>
16	64,0	3,58 <i>m</i>			64,1	3,59 <i>m</i>
17	62,8	1,62 <i>d</i> (11,5)	16, 21, 22, 28, 29		62,7	1,63 <i>d</i> (11,4)
18	45,9	-			46,0	-
19	44,6	1,33 <i>m</i> ; 2,01 <i>m</i>	17, 21, 28	20	44,6	1,33 <i>m</i> ; 2,01 <i>dd</i> (7,4; 12,4)
20	36,7	1,48 <i>m</i> ; 1,75 <i>m</i>	22	19	36,7	1,49 <i>m</i> ; 1,76 <i>dd</i> (7,0; 14,3)
21	52,1	-			52,2	-
22	213,7	-			213,6	-
23	27,3	0,97 <i>s</i>	3, 5, 24	24	27,3	0,98 <i>s</i>
24	16,1	0,73 <i>s</i>	3, 5, 23	23	16,1	0,73 <i>s</i>
25	15,6	0,79 <i>s</i>	1, 5, 9, 10		15,5	0,80 <i>s</i>
26	16,5	0,95 <i>s</i>	7, 8, 14		16,5	0,96 <i>s</i>
27	18,5	0,91 <i>s</i>	8, 13, 14		18,5	0,92 <i>s</i>
28	17,2	0,91 <i>s</i>	13, 14		17,1	0,92 <i>s</i>
29	20,1	1,25 <i>s</i>	17, 20, 21, 22		20,1	1,26 <i>s</i>
30	25,8	2,10 <i>s</i>	21, 22		25,7	2,10 <i>s</i>
Xyl-1'	105,8	4,22 <i>d</i> (7,5)	3		105,7	4,23 <i>d</i> (7,0)
2'	72,3	3,11 <i>m</i>			72,3	
3'	82,6	3,89 <i>m</i>	2', 4'		82,6	
4'	68,4	3,50 <i>m</i>			68,4	
5'	65,0	3,70 <i>m</i> ; 3,08 <i>m</i>	1', 3', 4'		65,0	

3.2.10. Hợp chất G-10: Vitexin (8-β-D-glucopyranosyl apigenin)



Hình 3.10. Cấu trúc hóa học của hợp chất **G-10**

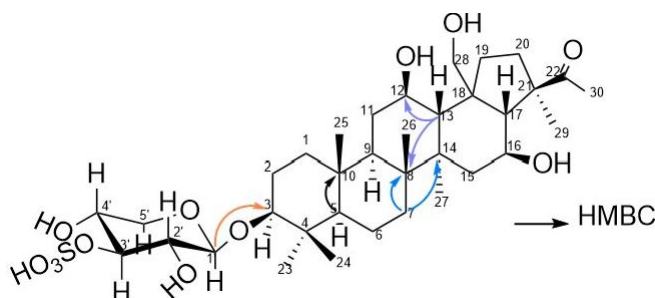
Hợp chất **G-10** được phân lập dưới dạng bột vô định hình màu vàng. Công thức phân tử của **G-10** được xác định là $C_{21}H_{20}O_{10}$ ($M=432,10$ g/mol) bằng phương pháp phổ khối (-)-APCI-MS dựa vào peak ion phân tử giả tại $m/z = 431,05$ $[M-H]^-$. Phổ 1H -NMR của hợp chất **G-10** (trong $DMSO-d_6$) thể hiện các tín hiệu sau: bốn proton thơm của hệ ghép đôi trong vòng B ở δ_H 6,89 (2H, *d*, $J= 8,0$ Hz) và 8,02 (2H, *d*, $J= 8,0$ Hz); hai proton đơn ở δ_H 6,27 (1H, *s*) và 6,77 (1H, *s*) được gán cho flavone aglycon; một proton ở δ_H 4,70 (1H, *d*, $J= 9,5$ Hz), được gán cho một đơn vị đường gắn với C. Phổ ^{13}C -NMR cho thấy tín hiệu của 21 nguyên tử carbon, trong đó có một nguyên tử carbonyl ở δ_C 182,03, 8 nguyên tử carbon không proton hóa ở δ_C 104,59, 104,59, 121,59, 155,98, 160,38, 161,12, 162,68 và 163,91, 11 nguyên tử carbon methine tại δ_C 70,54, 70,84, 73,36, 78,65, 81,80, 98,14, 102,41, 115,80 $\times 2$, 128,92 $\times 2$ và một carbon methylene ở δ_C 61,28. Dữ liệu 1H -và ^{13}C -NMR của **G-10** tương tự dữ liệu của vitexin [102]. Vậy có thể kết luận rằng **G-10** là vitexin.

Bảng 3.12. Dữ liệu phổ NMR của **G-10** và vitexin

C	G-10		Vitexin	
	<i>(DMSO-d_6, 500 MHz)</i>		<i>(DMSO-d_6, 500 MHz)</i>	
	δ_C (ppm)	δ_H (ppm) J (Hz)	δ_C (ppm)	δ_H (ppm) J (Hz)
2	163,9	-	163,9	-
3	102,4	6,77 <i>s</i>	102,4	6,62 <i>s</i>
4	182,3	-	182,0	-
5	161,1	-	161,0	-
6	98,1	6,27 <i>s</i>	98,1	6,26 <i>s</i>
7	162,6	-	162,5	-
8	104,6	-	104,6	-
9	156,0	-	155,9	-
10	104,0	-	104,0	-
1'	121,6	-	121,5	-

C	G-10		Vitexin	
	(DMSO- <i>d</i> ₆ , 500 MHz)		(DMSO- <i>d</i> ₆ , 500 MHz)	
	δ_C (ppm)	δ_H (ppm) <i>J</i> (Hz)	δ_C (ppm)	δ_H (ppm) <i>J</i> (Hz)
2'	128,9	8,02 <i>d</i> (8,0)	128,8	8,01 <i>d</i> (8,4)
3'	115,8	6,89 <i>d</i> (8,0)	115,7	6,89 <i>d</i> (8,4)
4'	160,4	-	160,3	-
5'	115,8	6,89 <i>d</i> (8,0)	115,7	6,89 <i>d</i> (8,4)
6'	128,9	8,02 <i>d</i> (8,0)	128,8	8,01 <i>d</i> (8,4)
Glc-1''	73,4	4,70 <i>d</i> (9,5)	73,3	4,69 <i>d</i> (9,9)
2''	70,8	3,85 <i>m</i>	70,8	3,82 <i>t</i> (9,6)
3''	78,7		78,8	3,24 <i>m</i>
4''	70,5		70,5	3,37 <i>t</i> (9,4)
5''	81,8	3,30 <i>m</i>	81,7	3,21 <i>m</i>
6''	61,3	3,77 <i>d</i> (8,5); 3,53 <i>m</i>	61,3	3,75 <i>dd</i> (11,6; 1,4); 3,51 <i>dd</i> (11,6; 6,7)
		13,16 <i>s</i>		13,14
				10,73
				10,26

3.2.11. Hợp chất G-11: Spergulin C (Hợp chất mới)



Hình 3.11. Cấu trúc hóa học và một số tương tác HMBC của **G-11**

Hợp chất **G-11** được phân lập từ ở dạng bột vô định hình, màu trắng. Phổ UV của **G-11** trong dung môi methanol xuất hiện cực đại hấp thụ ở 203 nm. Trên phổ hồng ngoại xuất hiện các đỉnh đặc trưng: 3480 (-OH), 1700 (>C=O). Công thức phân tử của **G-11** được xác định là C₃₅H₅₈O₁₂S ($\Omega = 7$) bằng phương pháp phổ khối phân giải cao (-)-HR-ESI-MS dựa vào peak ion phân tử giả tại m/z 701,3567 [M-H]⁻ (tính toán lý thuyết cho công thức [C₃₅H₅₇O₁₂S]⁻: 701,3576 ; $\Delta = - 1,28$ ppm). Tương tự **G-9**, phổ ¹³C-NMR và DEPT của **G-11** cũng xuất hiện 35 tín hiệu carbon, trong đó có 30 tín hiệu của khung aglycon triterpen và 5 tín hiệu của đường pentose. Trong đó xuất hiện các tín hiệu của 6 nhóm carbon bậc 4 với một >C=O (δ_C 214,4), 8 nhóm >CH₂ và 7

nhóm >CH-. Từ tương tác giữa H-29, H-17, H-20 với C-22 cũng như giữa H-30 với C-21 trên phổ HMBC cho biết nhóm methylceton gắn vào C-21. Tín hiệu H-3 (δ_H 3,26 *m*), H-12 (δ_H 4,22 *m*) và H-16 (δ_H 4,15 *m*) ở vùng trường thấp cũng như các tín hiệu carbon tương ứng cho thấy xuất hiện nhóm >CH-O ở C-3 (δ_C 88,1), C-12 (δ_C 69,7) và C-16 (δ_C 64,4). C-21 (δ_C 52,8) gắn với nhóm methyl C-29 (δ_C 21,1) và điều này được chứng minh thông qua tương tác trên phổ HMBC. Như vậy có thể nhận định rằng phần aglycon thuộc khung hopan với nhóm acetyl gắn vào C-21, nhóm methyl C-29 gắn vào C-21, ba nhóm hydroxy gắn tại C-3, C-12 và C-16. Các tín hiệu trên phổ ^{13}C -NMR cho thấy 7 tín hiệu nhóm methyl (-CH₃) nằm ở vùng trường cao lần lượt là δ_C 28,0; 16,5; 15,9; 16,5; 17,1; 19,4; 21,1; 26,0 (tương ứng lần lượt với các tín hiệu dưới dạng peak đơn trên phổ ^1H -NMR tại δ_H 1,22 *s*; 0,94 *s*; 0,77 *s*; 1,00 *s*; 1,39 *s*; 1,69 *s*, 2,36 *s*). So sánh với **G-9**, phổ NMR của **G-11** thiếu 1 tín hiệu methyl ở vùng trường cao tương ứng với 1 tín hiệu singlet trên phổ ^1H -NMR nhưng xuất hiện thêm một tín hiệu δ_C 61,4 ; δ_H 4,36 (1H, *d*, 10,8) được gán cho C-28 dựa trên tương tác HMBC với H17 (2,52 *d* (11,5)).

Phổ ^{13}C -NMR xuất hiện tín hiệu của carbon anomer và 4 nhóm oxymethine (δ_C 106,3; 73,6; 83,1; 70,6; 66,1), dựa vào dữ liệu phổ tham khảo xác định đây là đường D-xylose với vị trí C-3' gắn nhóm -HSO₃ thay cho -OH dẫn đến độ dịch chuyển của C-3' bị dịch chuyển về phía từ trường thấp hơn so với tín hiệu C-3' của đường xylose bình thường [60]. Carbon anomer của đường có δ_C 105,8 cho thấy đây là một *O*-glycosid. Kết hợp với phổ HMBC, H1' tương tác với C-3 của aglycon cho thấy đường D-xylose gắn vào C-3 của khung aglycon và H1' có δ_H 4,92 (*d*; 7,0 Hz) cho biết cấu hình β -D-xylose (H1' và H2' đều hướng axial với mặt phẳng vòng). Các tương tác của các proton kề cận ghi nhận được từ dữ liệu phổ COSY của hợp chất **G-11** cho phép gán các vị trí của các proton này trong cấu trúc

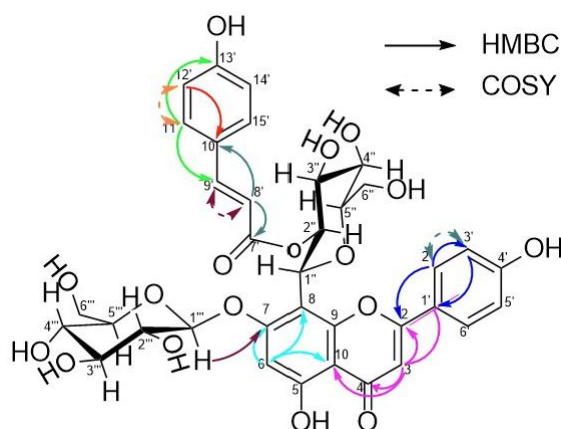
Tiến hành so sánh dữ liệu phổ NMR của **G-11** với **G-9**: spergulin A (3-*O*-(β -D-xylopyranosyl 4-sulphat)-spergulagenin A). Kết quả được trình bày trong **Bảng 3.13**

Bảng 3.13. Dữ liệu phổ NMR của **G-11** và spergulin A

C	G-11				Spergulin A	
	Pyridine- <i>d</i> ₅ , 500MHz				DMSO- <i>d</i> ₆ , 500MHz	
	δ_C (ppm)	δ_H (ppm) <i>J</i> (Hz)	HMBC (H→C)	COSY	δ_C (ppm)	δ_H (ppm) <i>J</i> (Hz)
1	38,5	0,84 <i>m</i>		2	38,1	1,58 <i>m</i> ; 0,91 <i>m</i>
2	26,5	1,8 <i>m</i>		1,3	25,8	1,69 <i>m</i> ; 1,53 <i>m</i>
3	88,1	3,26 <i>m</i>		2	87,8	3,04 <i>m</i>

C	G-11				Spergulin A	
	Pyridine- <i>d</i> ₅ ,500MHz				DMSO- <i>d</i> ₆ ,500MHz	
	δ_c (ppm)	δ_H (ppm) <i>J</i> (Hz)	HMBC (H→C)	COSY	δ_c (ppm)	δ_H (ppm) <i>J</i> (Hz)
4	39,3	-	-		38,8	-
5	55,3	0,68 <i>d</i> (10,7)	10	6	54,7	0,68 <i>d</i> (10,5)
6	18,4	1,28 <i>m</i>		5	17,9	1,48 <i>m</i> ; 1,38 <i>m</i>
7	33,5	1,19 <i>m</i> 1,23 <i>m</i>	8, 14		32,8	1,18 <i>m</i> ; 1,38 <i>m</i>
8	45,7	-	-		44,7	-
9	49,2	1,41 <i>m</i>			48,1	1,18 <i>m</i>
10	36,7	-	-		36,1	-
11	31,5	2,07 <i>m</i>			31,8	1,67 <i>m</i> ; 1,25 <i>m</i>
12	69,7	4,22 <i>m</i>			67,2	3,66 <i>m</i>
13	56,6	1,87 <i>d</i> (11,0)	8, 12, 21		54,5	1,30 <i>d</i> (11,0)
14	41,9	-	-		40,9	-
15	45,5	1,74 <i>m</i>		16	44,3	1,18 <i>m</i> ; 1,38 <i>m</i>
16	64,4	4,15 <i>m</i>		15, 17	64,0	3,58 <i>m</i>
17	63,2	2,52 <i>d</i> (11,5)	16, 21, 22, 28, 29	16	62,8	1,62 <i>d</i> (11,5)
18	52,6	-	-		45,9	-
19	46,1	1,9 <i>m</i>	16, 18		44,6	1,33 <i>m</i> ; 2,01 <i>m</i>
20	37,8	1,83 <i>m</i> 2,09 <i>m</i>	21		36,7	1,48 <i>m</i> ; 1,75 <i>m</i>
21	52,8	-	-		52,1	-
22	214,4	-	-		213,7	-
23	28,0	1,22 <i>s</i>	4, 5		27,3	0,97 <i>s</i>
24	16,5	0,94 <i>s</i>	4,5, 23		16,1	0,73 <i>s</i>
25	15,9	0,77 <i>s</i>	1, 5, 9, 10		15,6	0,79 <i>s</i>
26	17,1	1,00 <i>s</i>	7, 8, 9, 14		16,5	0,95 <i>s</i>
27	19,4	1,39 <i>s</i>	8, 13, 14		18,5	0,91 <i>s</i>
28	61,4	4,36 <i>d</i> (10,8)			17,2	0,91 <i>s</i>
29	21,1	1,69 <i>s</i>	17, 20, 21, 22		20,1	1,25 <i>s</i>
30	26,0	2,36 <i>s</i>	21, 22		25,8	2,10 <i>s</i>
Xyl-1'	106,3	4,92 <i>d</i> (7,0)	3	2'	105,8	4,22 <i>d</i> (7,5)
2'	73,6	4,02 <i>m</i>	1', 3'	1', 3'	72,3	3,11 <i>m</i>
3'	83,1	5,40 <i>m</i>	2', 4'	2'	82,6	3,89 <i>m</i>
4'	70,6	4,7 <i>m</i>			68,4	3,50 <i>m</i>
5'	66,1	4,23 <i>m</i>	3'		65,0	3,70 <i>m</i> ; 3,08 <i>m</i>

3.2.12. Hợp chất **G-12**: 2''-*p*-Coumaroylvitexin 7-glucosid



Hình 3.12. Cấu trúc hóa học và một số tương tác HMBC, COSY của **G-12**

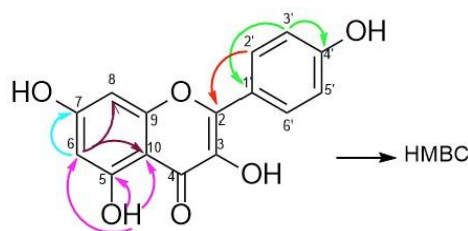
Hợp chất **G-12** được phân lập dưới dạng bột vô định hình màu vàng. Công thức phân tử của **G-12** được xác định là $C_{36}H_{36}O_{17}$ ($\Omega = 19$) bằng phương pháp phổ khối (+)-HR-ESI-MS dựa vào peak ion phân tử giả tại $m/z = 741,2027$ $[M+H]^+$. Trên phổ 1H -NMR của **G-12**, các tín hiệu tại δ_H 6,57 (1H, *s*, H-6), 6,69 (1H, *s*, H-3), 6,97 (2H, *d*, $J = 8,5$ Hz, H-3', 5') và 8,08 (2H, *d*, $J = 9,0$ Hz, H-2', 6'), thể hiện các tín hiệu đặc trưng của apigenin, sự khác biệt được ghi nhận đó là thiếu tín hiệu proton của H-8. Hai proton xuất hiện ở δ 4,84 (1H, *d*, $J = 7,5$ Hz, H-1'') và 5,34 (1H, *d*, $J = 10,0$ Hz, H-1'''), cho thấy có một proton của C-glycosid và một proton của O-glycosid với cấu hình beta tương ứng trong phổ 1H -NMR. Mọi tương quan giữa các tín hiệu ở δ 4,84 (H-1'') và δ 162,8 (C-7) cũng như δ 5,34 (H-1''') và δ 106,4 (C-8) trong phổ HMBC đã xác nhận rằng hai glucopyranosid lần lượt được liên kết với nguyên tử oxygen ở C-7 và liên kết với nguyên tử carbon ở C-8 trên **G-12**. Dựa trên hằng số ghép của H-1'' δ 5,34 (10 Hz) và H-1''' δ 4,84 (7,5 Hz) cho biết cấu hình β của 2 đường D-glucose. Phổ 1H NMR của **G-12** cho thấy sự hiện diện của nhóm *p*-coumaroyl với liên kết đôi cấu hình *trans* khi xét đến hằng số ghép đặc trưng (16 Hz) giữa 2 proton olefin ở δ 6,15 và 7,47 ppm. Phổ ^{13}C NMR cũng xác nhận sự hiện diện của *trans-p*-coumaroyl với δ_C 114,9; 168,4 ppm. Ngoài ra 2 tín hiệu carbon cao gấp đôi tại δ_C 116,7 và δ_C 131,3 đặc trưng cấu trúc đối xứng vòng benzen thế 1,4 được gán cho carbon 11'/15' và 12'/14' ứng với 2 tín hiệu proton 7,44 (2H, *d*, $J = 9,0$ Hz và 6,76 (2H, *d*, $J = 9,0$ Hz)] và điều này được chứng minh thông qua tương tác trên phổ HMBC, COSY. Trên phổ HMBC, H2'' của đường glucose có tương tác với C7' phổ HMBC, COSY. Trên phổ HMBC, H2'' của đường glucose có tương tác với C7' của *trans-p*-coumaroyl chứng tỏ nhánh *trans-p*-coumaroyl gắn vào C2'' của đường

glucose. So sánh với dữ liệu phổ ^1H -NMR và ^{13}C -NMR trong tài liệu [103], hợp chất **G-12** được xác định là 2''-*p*-coumaroylvitexin 7-glucosid – một hợp chất đã được báo cáo trước đây trong loài *G. oppositifolius*.

Bảng 3.14. Dữ liệu phổ NMR của **G-12** và 2''-*p*-coumaroylvitexin 7-glucosid

G-12 (Methanol- d_4 , 500 MHz)					2''- <i>p</i> -coumaroylvitexin 7-glucosid (Methanol- d_6 , 500 MHz)
C	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm) J (Hz)	HMBC (H $\rightarrow$ C)	COSY	δ_{C} (ppm)
2	167,2	-			164,5
3	103,9	6,69 <i>s</i>	4, 1', 2,10		102,4
4	184,4	-			182,2
5	163,2	-			
6	100,0	6,57 <i>s</i>	7,8,10		98,0
7	162,8	-			161,5
8	106,4	-			104,7
9	157,8	-			155,6
10	107,4	-			105,3
1'	123,5	-			121,2
2'/6'	130,3	8,08 <i>d</i> (9,0)	4', 2	3'/5'	129,1
3'/5'	117,0	6,97 <i>d</i> (8,5)	1'	2'/6'	115,9
4'	163,0	-			161,0
7'	168,4	-			168,4
8'	114,9	6,15 <i>d</i> (16,0)	7'; 10'	9'	114,2
9'	146,7	7,47 <i>d</i> (16,0)		8'	144,0
10'	127,3	-			125,2
11'/15'	131,3	7,44 <i>d</i> (9,0)	9', 13'	12'/14'	130,0
12'/14'	116,7	6,76 <i>d</i> (9,0)	10'	11'/15'	115,0
13'	161,2	-			159,6
Glc-1'''	102,8	4,84 <i>d</i> (7,5)	7	2'''	101,2
2'''	74,8	3,61 <i>m</i>	1'''		73,1
3'''	78,1	3,49 <i>m</i>	2''' , 4'''		76,2
4'''	71,1	3,43 <i>m</i>	3''' , 5'''		70,7
5'''	78,3	3,35 <i>m</i>	4'''		77,1
6'''	62,2	3,95 <i>m</i> ; 3,87 <i>m</i>			60,5
1''	73,1	5,40 <i>d</i> (10,0)	7,8,9,2''	2''	70,7
2''	73,9	5,64 <i>m</i>	1'' , 7'		72,0
3''	77,4	3,90 <i>m</i>	2''		74,8
4''	72,3	3,77 <i>m</i>	3''		69,5
5''	83,0	3,59 <i>m</i>	4''		81,7
6''	62,9	4,01 <i>m</i>			61,0

3.2.13. Hợp chất **G-13**: *Kaempferol* (3,4',5,7-tetrahydroxyflavone)



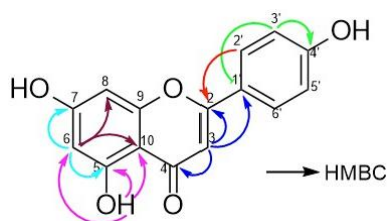
Hình 3.13. Cấu trúc hóa học và một số tương tác HMBC của **G-13**

Hợp chất **G-13** được phân lập dưới dạng bột vô định hình màu vàng. Công thức phân tử của **G-13** được xác định là $C_{15}H_{10}O_6$ ($\Omega = 11$) bằng phương pháp phổ khối (+)-ESI-MS dựa vào peak ion phân tử giả tại $m/z = 285,05$ $[M-H]^-$. Dựa vào thông tin trên phổ 1H -NMR của hợp chất **G-13** cho thấy các tín hiệu của proton vòng thơm, bao gồm có tín hiệu của 2 proton cường độ cao dưới dạng doublet ghép ortho tại δ_H 8,04 (2H, *d*, $J = 8,5$ Hz, H-2'/H-6') và 6,92 (2H, *d*, $J = 9$ Hz, H-3'/H-5'). Thông tin trên phổ ^{13}C -NMR cũng cho thấy được 13 tín hiệu của 15 carbon, trong đó 2 tín hiệu tại δ_C 129,5 (C-2'/C-6') và 115,4 (C-3'/C-5') có cường độ carbon gấp đôi, 1 nhóm carbonyl (C=O) tại 175,9 (C-4), các tín hiệu carbon vòng thơm tại δ_C 163,9 (C-7); 160,7 (C-5); 156,2 (C-9); 129,5 (C-2'/C-6'); 121,7 (C-1'); 115,4 (C-3'/C-5'); 103,0 (C-10); 98,2 (C-6); 93,5 (C-8) và 2 carbon olefin gắn với oxy tại δ_C 146,8 (C-2); 135,6 (C-3). Phổ HMBC của hợp chất **G-13** cũng cho thấy tương tác giữa H-2',6' (δ_H 8,04) với C-1' (δ_C 121,7), C-3',6' (δ_C 115,4); tương tác giữa H-3',5' (δ_H 6,92) với C-2',6' (δ_C 129,5) và C-4' (δ_C 159,2 ppm), H-5' tương tác với C-4' (δ_C 159,2) và C-2',6' (δ_C 129,5); H-6 với C-5 (δ_C 160,7) và C-7 (δ_C 163,9) và H-8 (δ_H 6,44) với C-7 (δ_C 163,9) và C-9 (δ_C 156,2). Tín hiệu dưới dạng singlet tại δ_H 12,46 (1H, *s*, 5-OH) đặc trưng cho nhóm-OH gắn vào vị trí C-5 trên khung flavone. Dựa vào thông tin trên phổ HMBC còn quan sát được tín hiệu proton của nhóm hydroxyl tương quan với carbon tại δ_C 103,0; 98,2 và 160,7 tương ứng vị trí C-5, C-6 và C-10. Ngoài ra còn có sự tương quan giữa hai proton H-6 và H-8 với carbon δ_C 163,9 (C-7), điều này khẳng định carbon này là C-7. Carbon δ_C 156,2 cũng cho tương quan với proton H-8 nên carbon này là C-9. So sánh với dữ liệu phổ 1H -NMR và ^{13}C -NMR trong tài liệu [104], **G-13** được xác định là kaempferol (3,4',5,7-tetrahydroxyflavone)

Bảng 3.15. Dữ liệu phổ NMR của **G-13** và kaempferol“

C	G-13 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 500 MHz)			Kaempferol (DMSO- <i>d</i> ₆ , 500 MHz)	
	δ_C (ppm)	δ_H (ppm) <i>J</i> (Hz)	HMBC (H $\rightarrow$ C)	δ_C (ppm)	δ_H (ppm) <i>J</i> (Hz)
2	146,8	-		146,8	-
3	135,6	-		135,6	-
4	175,9	-		175,9	-
5	160,7	-		160,7	-
6	98,2	6,19 <i>s</i>	7, 8, 9,10	98,2	6,21 <i>s</i>
7	163,9	-		164,0	-
8	93,5	6,44 <i>s</i>	5, 6, 7, 10	93,5	6,46 <i>s</i>
9	156,2	-		156,2	-
10	103,0	-		103,0	-
1'	121,7	-		121,6	-
2', 6'	129,5	8,04 <i>d</i> (8,5)	2, 3', 4', 5'	129,5	8.03 <i>d</i> (8,5)
4'	159,2	-		159,3	-
3', 5'	115,4	6,92 <i>d</i> (9,0)	1', 4'	115,4	6.93 <i>d</i> (9,0)
3-OH		9,39 <i>s</i>			9,34 <i>s</i>
5-OH		12,46 <i>s</i>	5,6,10		12,46 <i>s</i>
7-OH		10,80 <i>s</i>			10.85 <i>s</i>
4'-OH		10,12 <i>s</i>			10,13 <i>s</i>

3.2.14. Hợp chất **G-14**: Apigenin (4',5,7-trihydroxyflavone) ”

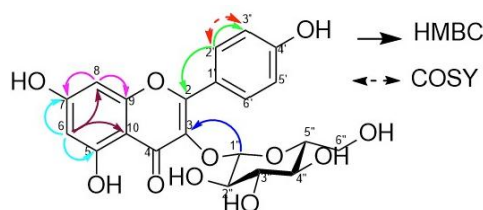


ở δ_C 181,7 ppm (C-4). Năm nguyên tử carbon oxyaryl có thể được quan sát thấy ở mức 157,27; 161,4; 161,13; 163,7 và 164,1, hai nguyên tử carbon sp^2 bậc bốn ở δ_C 103,6; 121,15 và bảy nguyên tử carbon methin sp^2 ở δ_C 93,92; 98,79, 128,42 (2C), 115,92 (2C). Proton olefinic ở δ_H 6,77 cho tương quan HMBC với δ_C 103,66 và 121,15 chỉ ra rằng hợp chất A là nhóm flavone. Mỗi tương quan HMBC giữa δ_H 6,19 với δ_C 161,40, 164,10, 103,56 và 93,92, cùng với các mối tương quan được thể hiện bởi proton δ_H 6,48 với các nguyên tử carbon ở δ_C 157,27, 103,66, 164,10 và 98,79 đã xác nhận vị trí của δ_H 6,19 và 6,47 lần lượt tại H-8 và H-6 của vòng A. Một tập hợp các mối tương quan HMBC khác giữa δ_H 6,92 với carbon sp^2 bậc bốn ở δ_C 121,15 và δ_H 7,92 với carbon sp^2 bậc bốn ở δ_C 161,13 đã xác nhận sự hiện diện của cấu trúc đối xứng trong vòng B. Các dữ liệu phổ NMR của **G-14** được so sánh với các dữ liệu tương ứng trong tài liệu tham khảo [105], xác định hợp chất **G-14** là apigenin.

Bảng 3.16. Dữ liệu phổ NMR của **G-14** và apigenin

C	G-14 (DMSO- d_6 , 500 MHz)				Apigenin (DMSO- d_6 , 500 MHz)	
	δ_C (ppm)	δ_H (ppm) J (Hz)	HMBC (H $\rightarrow$ C)	COSY	δ_C (ppm)	δ_H (ppm) J (Hz)
2	163,70	-	-		163,7	-
3	102,81	6,77 <i>s</i>	2, 4, 10, 1'		102,81	6,75 <i>s</i>
4	181,7	-	-		181,73	-
5	161,40	-	-		161,25	-
6	98,79	6,19 <i>s</i>	5, 7, 8, 10,		98,96	6,15 <i>d</i> (2,0)
7	164,10	-	-		164,57	-
8	93,92	6,48 <i>s</i>	6, 7, 9, 10		94,06	6,44 <i>d</i> (2,0)
9	157,27	-	-		157,37	-
10	103,66	-	-		103,56	-
1'	121,15	-	-		121,17	-
2', 6'	128,42	7,92 <i>d</i> (8,0)	2', 4'	3', 5'	128,51	7,91 <i>d</i> (9,05)
4'	161,13	-	-		161,46	-
3', 5'	115,92	6,92 <i>d</i> (8,5)	1', 4'	2', 6'	116,01	6,90 <i>d</i> (9,05)
5-OH		12,96 <i>s</i>	5, 6, 10			

3.2.15. Hợp chất G-15: Astragalin (kaempferol-3-O- β -D-glucopyranosid) “



Hình 3.15. Cấu trúc hóa học và một số tương tác HMBC và COSY của **G-15**

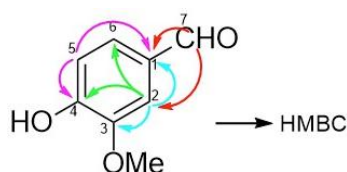
Hợp chất **G-15** thu được ở dạng bột vô định hình màu vàng. Phổ (-)ESI – MS của **G-15** cho đỉnh ion phân tử giả $[M-H]^-$ tại $m/z = 447,09$ ứng với công thức phân tử là $C_{21}H_{20}O_{11}$ ($\Omega = 12$). Trên phổ ^{13}C -NMR xuất hiện 19 tín hiệu carbon (2 tín hiệu đối xứng), trong đó có 14 tín hiệu ở vùng trường thấp (δ_C 93,7 – 177,4). Có 5 tín hiệu carbon xuất hiện ở vùng trường 60-80 ppm đặc trưng cho dấu hiệu của cấu trúc gắn 1 đường. Cấu trúc flavonol của **G15** được xác định bởi tín hiệu carbon carbonyl δ_C 177,4 và tín hiệu δ_H 12,60 (OH, *s*) đặc trưng cho 5-OH. Hai tín hiệu carbon có độ dịch chuyển 93,7 ppm và 98,7 ppm lần lượt là C-8 và C-6 trong cấu trúc flavonol cũng tương ứng với 2 tín hiệu proton δ_H 6,42 (1H; *d*; 2,4 Hz) và δ_H 6,20 (1H; *d*; 2,4 Hz) có $J = 2$ Hz đặc trưng cho ghép *meta*. Ngoài ra trên phổ ^{13}C -NMR còn xuất hiện 2 tín hiệu carbon cao gấp đôi tại δ_C 115,1 và δ_C 130,8 đặc trưng cấu trúc đối xứng của vòng B được gán cho C3',5' và C2',6' ứng với 2 tín hiệu proton δ_H 6,88 (2H; *dd*; 1,8 Hz và 6,6 Hz) và δ_H 8,04 (2H; *dd*; 1,8 Hz và 7,2 Hz). Trên phổ HMBC, H1'' của đường glucose có tương tác với C3 của aglycon chứng tỏ đường D-glucose gắn vào C3 của aglycon và H1'' có δ_H 5,45 *d* (7,8) cho biết cấu hình β của D-glucose. Như vậy, **G15** được xác định là astragalin (kaempferol-3-*O*- β -D-glucopyranosid). Cấu trúc của **G15** được khẳng định khi so sánh với ^{13}C -NMR và 1H -NMR được công bố trước đây [106].

Bảng 3.17. Dữ liệu phổ NMR của **G-15** và astragalin

C	G-15 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 600 MHz)				Astragalin (DMSO- <i>d</i> ₆ , 600 MHz)	
	δ_C (ppm)	δ_H (ppm) <i>J</i> (Hz)	HMBC (H $\rightarrow$ C)	COSY	δ_C (ppm)	δ_H (ppm) <i>J</i> (Hz)
2	156,2	-	-	-	156,5	-
3	133,2	-	-	-	133,9	-
4	177,4	-	-	-	178,1	-
5	161,2	-	-	-	161,3	-
6	98,7	6,20 <i>d</i> (2,4)	5, 7, 8, 10	8	99,8	6,44 <i>d</i> (2,0)
7	164,4	-	-	-	163,3	-
8	93,7	6,42 <i>d</i> (2,4)	6, 7, 9, 10	6	94,9	6,78 <i>d</i> (2,0)
9	156,4	-	-	-	157,3	-
10	103,9	-	-	-	105,9	-
1'	120,9	-	-	-	121,1	-
2', 6'	130,8	8,04 <i>dd</i> (1,8; 7,2)	2, 3', 4', 5'	3', 5'	131,4	8,06 <i>d</i> (8,6)
4'	159,9	-	-	-	160,6	-
3', 5'	115,1	6,88 <i>dd</i> (1,8; 6,6)	4', 1', 2', 6'	2', 6'	115,6	6,90 <i>d</i> (8,6)

C	G-15				Astragalin	
	(DMSO- <i>d</i> ₆ , 600 MHz)				(DMSO- <i>d</i> ₆ , 600 MHz)	
	δ_C (ppm)	δ_H (ppm) <i>J</i> (Hz)	HMBC (H $\rightarrow$ C)	COSY	δ_C (ppm)	δ_H (ppm) <i>J</i> (Hz)
Glc-1''	100,9	5,45 <i>d</i> (7,8)	3, 5'', 2''	2''	101,2	5,48 <i>d</i> (7,2)
2''	74,2	3,18 <i>d</i> (7,2)	1'', 3'', 4''	1''	74,6	3,15 <i>m</i>
3''	76,4	3,22 <i>m</i>	6, 2'', 4''		76,9	3,30 <i>m</i>
4''	69,9	3,08 <i>d</i> (4,8)	3'', 5''		70,4	3,10 <i>m</i>
5''	77,5	3,08 <i>d</i> (4,8)	3''		78,0	3,10 <i>m</i>
6''	60,8	3,56 <i>d</i> (11,4)			61,3	3,55 <i>m</i>
	12,60s					

3.2.16. Hợp chất G-16: Vanilin (4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyde)



Hình 3.16. Cấu trúc hóa học và một số tương tác HMBC của **G-16**

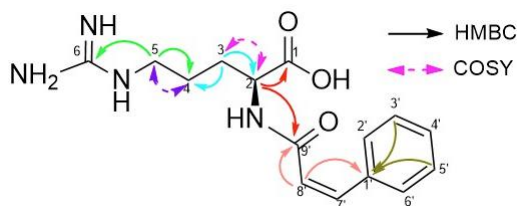
Hợp chất **G-16** thu được dưới dạng bột vô định hình, màu trắng. Phổ (-)HR-ESI-MS của **G-16** cho đỉnh $[M-H]^-$ với m/z 151,0386, kết hợp với dữ liệu phổ ^{13}C -NMR và HSQC cho phép xác định công thức phân tử $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3$ ($\Omega = 5$). Phổ ^1H -NMR cho thấy tín hiệu của hợp chất phenolic aldehyd với tín hiệu aldehyd ở δ_H 9,82 (1H, *s*, H-7), tín hiệu của proton thơm ở δ_H 7,42 (2H, *m*, H-2, H-6) và 7,04 (1H, *d*, $J = 8,5$ Hz, H-5). Hơn nữa, tín hiệu của các nhóm hydroxyl và methoxy lần lượt được thể hiện ở δ_H 6,58 (1H, *s*, OH), 3,95 (3H, *s*, OMe).” Phổ ^{13}C -NMR cho thấy tín hiệu của 8 nguyên tử carbon bao gồm nhóm aldehyd ở δ_C 191,0 (C-7), 6 nguyên tử carbon thơm và một nhóm methoxy ở δ_C 56,1 (OMe). Vì vậy, **G-16** được xác định là vanillin. Cấu trúc của **G-16** được khẳng định khi so sánh với ^{13}C -NMR và ^1H -NMR được công bố trước đây [107].

Bảng 3.18. Dữ liệu phổ NMR của **G-16** và vanilin

C	G-16				Vanilin	
	(Chloroform- <i>d</i> ₁ , 600 MHz)				(Chloroform- <i>d</i> ₁ , 500 MHz)	
	δ_C (ppm)	δ_H (ppm) <i>J</i> (Hz)	HMBC (H $\rightarrow$ C)	COSY	δ_C (ppm)	δ_H ($J = \text{Hz}$) ppm
1	129,8	-			129,9	-
2	109,0	7,42 <i>m</i>	1, 3, 4, 6		108,8	7,43 <i>m</i>
3	151,9	-			151,7	-
4	147,3	-			147,1	-

C	G-16				Vanilin	
	(Chloroform- d_1 , 600 MHz)				(Chloroform- d_1 , 500 MHz)	
	δ_C (ppm)	δ_H (ppm) J (Hz)	HMBC (H $\rightarrow$ C)	COSY	δ_C (ppm)	δ_H ($J=Hz$) ppm
5	114,5	7,04 <i>d</i> (8,4)	1, 3, 4	6	114,4	7,04 <i>d</i> (8,5)
6	127,5	7,42 <i>m</i>	1, 3, 4, 6	5	127,4	7,43 <i>m</i>
7	191,0	9,82 <i>s</i>	1, 2, 4		190,8	9,83 <i>s</i>
OMe	56,1	3,95 <i>s</i>			56,1	3,97 <i>s</i>

3.2.17. Hợp chất G-17: L-(-)-(N-cis-Cinnamoyl)-arginin (hợp chất mới)



Hình 3.17. Cấu trúc hóa học và một số tương tác HMBC, COSY của **G-17**

Hợp chất **G-17** được phân lập ở dạng bột vô định hình, màu vàng. Phổ UV của **G-17** trong dung môi methanol xuất hiện cực đại hấp thụ ở 256 nm. Trên phổ hồng ngoại xuất hiện các đỉnh đặc trưng: 3348, 3119 cm^{-1} (N-H); 1681 cm^{-1} (C=O); 1608, 1503, 1493 và 1450 cm^{-1} (C=N, phenyl C=C). Công thức phân tử của **G-17** được xác định là $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_3$ ($\Omega=8$) bằng phương pháp phổ khối phân giải cao (-)-HR-ESI-MS dựa vào peak ion phân tử giả tại m/z 303,1442 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (tính toán lý thuyết cho công thức $[\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{N}_4\text{O}_3]^-$: 303,1457; $\Delta = -4,9$ ppm) và m/z 305,1597 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (tính toán lý thuyết cho công thức $[\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{N}_4\text{O}_3]^+$: 305,1608; $\Delta = -3,6$ ppm). Phổ ^1H -NMR xuất hiện một bộ năm proton tương ứng với một vòng thơm ở δ_H 7,27 (2H), 7,30 (1H) và 7,47 (2H), ngoài ra còn có hai proton olefin ở δ_H 6,77 *d* và 6,08 *d* đặc trưng cho cấu trúc cinnamoyl. Cấu hình cis của nối đôi được xác định từ hằng số ghép với $J = 12,5$ Hz. Sự hiện diện của nhóm *cis*-cinnamoyl được xác nhận thêm bằng tương quan ^1H - ^1H COSY của H-7'/H-8', cùng với các tương quan HMBC từ H-7'/H-8' đến C-9' (δ_C 169,1), từ H-8' đến C-1' (δ_C 136,8), từ H-7' đến C-2'/C-6' (δ_C 130,2), từ H-2'/H-6' đến C-7' (δ_C 138,0) và các tương quan khác của vòng benzen. Phổ ^{13}C -NMR cho thấy 13 tín hiệu carbon, trong đó 9 tín hiệu thuộc khung *cis*-cinnamoyl. Các tín hiệu carbon còn lại thuộc về ba methylen (δ_C 26,1; 30,9; 42,1), một methin (δ_C 55,3) và hai carbon bậc bốn (δ_C 158,6, 178,1) phù hợp với các tín hiệu của amino acid arginin. Cấu trúc arginine được làm sáng tỏ bằng các tương quan của H-2/H-3/H-4/H-5 trong phổ COSY ^1H - ^1H và các tương quan HMBC từ H-2 đến C-1/C-3/C-4, từ H-3 đến C-2/C-4, và từ H-5 đến C-4. Do đó, hợp chất này được dự đoán là dẫn xuất *cis*-cinnamoyl của arginin.

Trên phổ HMBC, mối tương quan được quan sát giữa δ_H 4,29 (H-2) và δ_C 169,1 (C-9'), cho thấy rằng một trong các nguyên tử hydro của nhóm α -amino đã được thay thế bằng cinnamoyl. Độ quay cực của **G-17** $[\alpha]_D^{27} - 16.7^\circ$ nên cấu hình tuyệt đối ở vị trí C-2 được kết luận là (*S*). Khi so sánh phổ NMR của **G-17** với hợp chất L-(-)-(N-*trans*-cinnamoyl)-arginin cho thấy sự khác biệt ở cấu hình đồng phân *cis* (C7'=C8'), kết hợp với dữ liệu phổ MS cho phép xác định **G-17** là L-(-)-(N-*cis*-cinnamoyl)-arginin [68].

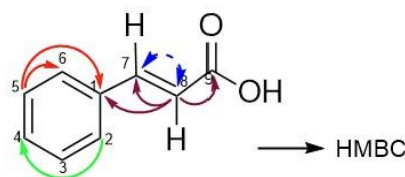
Tính toán năng lượng tự do của hợp chất **G-17** cho kết quả $E = -1028.30954661$, trong khi hợp chất L-(-)-(N-*trans*-cinnamoyl)-arginin có $E = -1028.42410089$.

Điều này cho thấy cấu hình *trans* sẽ bền hơn ở dạng tinh thể rắn, còn dạng *cis* (**G-17**) bền khi ở dạng dung dịch hơn.

Bảng 3.19. Dữ liệu phổ NMR của **G-17** và L-(-)-(N-*trans*-cinnamoyl)-arginin

C	G-17 (Methanol- <i>d</i> ₆ , 500 MHz)				L-(-)-(N- <i>trans</i> -Cinnamoyl)- arginin (DMSO- <i>d</i> ₆ , 400 MHz)	
	δ_C (ppm)	δ_H (ppm) <i>J</i> (Hz)	HMBC (H $\rightarrow$ C)	COSY	δ_C (ppm)	δ_H (ppm) <i>J</i> (Hz)
Amino acid						
1	178,1	-			176,6	-
2	55,3	4,31 <i>t</i> (6,5)	1,3,4,9'	3	54,3	4,13 <i>m</i>
3	30,9	1,67 <i>m</i> 1,81 <i>m</i>	2, 4	2	30,2	1,62 <i>m</i> 1,75 <i>m</i>
4	26,1	1,51 <i>m</i>		5	25,5	1,48 <i>m</i>
5	42,1	3,13 <i>m</i>	4	4	40,8	3,05 <i>m</i>
6	158,6	-			157,7	-
2-NH						8,21 <i>d</i> (8)
cinnamoyl						
1'	136,8	-			135,5	-
2', 6'	130,2	7,49 <i>d</i> (9,0)	4', 7'		127,8	7,43 <i>dd</i> (8,0; 1,7)
3', 5'	129,3	7,27 <i>m</i>	1', 5'		129,2	7,32 <i>m</i>
4'	129,5	7,30 <i>m</i>	1', 5'		129,6	7,35 <i>m</i>
7'	138,0	6,79 <i>d</i> (12,5)	6', 9'	8'	138,4	7,28 <i>d</i> (15,8)
8'	125,1	6,09 <i>d</i> (12,5)	1', 9'	7'	123,3	6,74 <i>d</i> (15,8)
9'	169,1	-			164,7	-

3.2.18. Hợp chất **G-18**: Acid cinnamic (*trans*-3-phenylacrylic acid)



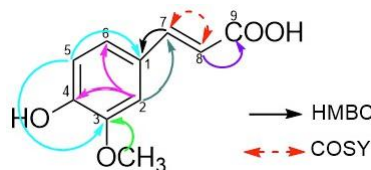
Hình 3.18. Cấu trúc hóa học và một số tương tác HMBC, COSY của **G-18**

Hợp chất **G-18** thu được dưới dạng bột vô định hình, màu vàng nhạt. Phổ (-)ESI – MS của **G-18** cho đỉnh ion phân tử giả $[M-H]^-$ tại $m/z = 147,0438$, phù hợp với công thức phân tử là $C_9H_8O_2$ ($\Omega = 6$). Trên phổ 1H -NMR của hợp chất **G-18** có sự xuất hiện tín hiệu của 5 proton thơm ở vùng trường thấp [δ_H 7,56 (2H; *m*; H-2, H-6)], [δ_H 7,41 (3H; *m*; H-3, H-4, H-5)] cho thấy hợp chất **G-18** có một vòng benzen có 1 nhóm thế. Ở vùng trường thấp xuất hiện tín hiệu cộng hưởng 2 proton olefin ghép *trans* với nhau [δ_H 7,80 (1H; *d*; $J = 16,2$ Hz; H-7)], [δ_H 6,46 (1H; *d*; $J = 16,2$ Hz; H-8)].”Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất **G-18** có tín hiệu của 9 carbon. Ở vùng trường thấp xuất hiện 1 carbon carbonyl của nhóm acid [δ_C 171,9; C-9]; 1 carbon thơm bậc 4 [δ_C 134,1; C-1]; 5 carbon thơm bậc 3 [δ_C 128,4; C-2, C-6], [δ_C 129,0; C-3, C-5], [δ_C 130,8; C-4]; 2 carbon olefin bậc 3 [δ_C 147,1; C-7], [δ_C 117,3; C-8]. Tiến hành so sánh dữ liệu phổ của hợp chất **G-18** với hợp chất cinnamic acid [108] cho thấy có sự tương hợp. Vậy hợp chất **G-18** là acid cinnamic.

Bảng 3.20. Dữ liệu phổ NMR của **G-18** và acid cinnamic

C	G-18 (Chloroform- <i>d</i> ₁ , 600 MHz)				Acid cinnamic (Chloroform - <i>d</i> ₁ , 400 MHz)	
	δ_C (ppm)	δ_H (ppm) J (Hz)	HMBC (H→C)	COSY	δ_C (ppm)	δ_H (ppm) J (Hz)
1	134,1	-			134,0	-
2/ 6	128,4	7,56 <i>m</i>	4, 7		128,4	7,57 <i>m</i>
3/5	129,0	7,41 <i>m</i>	1, 2/6		129,0	7,42 <i>m</i>
4	130,8	7,41 <i>m</i>			130,8	7,42 <i>m</i>
7	147,1	7,80 <i>d</i> (16,2)	9,1, 2/6, 8	8	147,1	7,81 <i>d</i> (16,0)
8	117,3	6,46 <i>d</i> (16,2)	1, 7, 9	7	117,2	6,47 <i>d</i> (16,0)
9	171,9	-			172,1	-

3.2.19. Hợp chất G-19: Acid *trans*-ferulic (*trans*-4-Hydroxy-3-methoxycinnamic acid)



Hình 3.19. Cấu trúc hóa học và một số tương tác HMBC, COSY của **G-19**

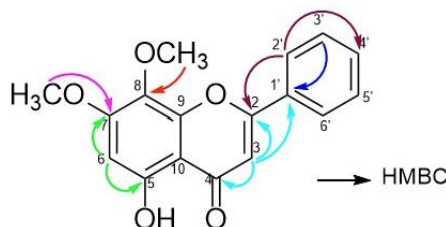
Hợp chất **G-19** thu được ở dạng bột vô định hình màu trắng. Công thức phân tử của **G-19** được xác định là $C_{10}H_{10}O_4$ ($\Omega = 6$) bằng phương pháp phổ khối (-)-ESI-HRMS dựa vào peak ion phân tử giả tại $m/z = 193,0493 [M-H]^-$. Phổ 1H -NMR cho thấy sự có mặt của hai proton olefin ở δ 7,62 (*d*, $J = 16,2$ Hz, 1H, H-7) và 6,33 (*d*, 11, $J = 15,6$ Hz, 1H, H-8), và ba proton vòng thơm ở δ 7,19 (*d*, $J = 1,8$ Hz, 1H, H-2), 7,08 (*dd*, $J = 8,4, 1,8$ Hz, 1H, H-6) và 6,83 (*d*, $J = 7,8$ Hz, 1H, H-5), và một methoxyl ở δ 3,91 (*s*, 3H, 3-OCH₃). Phổ ^{13}C -NMR của **G-19** cho thấy hai nguyên tử carbon olefin ở δ 146,9 (C-7), 116,0 (C-8) và sáu nguyên tử carbon thơm ở δ 127,8 (C-1), 111,7 (C-2), 149,4 (C-3), 150,5 (C-4), 116,5 (C-5) và 124,0 (C-6), và một carbon methoxy ở δ 56,5, cũng như một carbon cacboxyl ở δ 171,0 (C-9). Hằng số ghép của proton olefinic giữa C-7 và C-8 là 15,6; 16,2 Hz cho phép xác định liên kết đôi của **G-19** dưới dạng *trans*. Dựa trên sự so sánh những dữ liệu này với dữ liệu được công bố trong tài liệu [109], hợp chất **G-19** được xác định là acid *trans*-ferulic.

Bảng 3.21. Dữ liệu phổ NMR của **G-19** và acid *trans*-ferulic

C	G-19 (Methanol- <i>d</i> ₄ , 600 MHz)				acid <i>trans</i> -ferulic (Methanol- <i>d</i> ₄ , 400 MHz)	
	δ_C (ppm)	δ_H (ppm) J (Hz)	HMBC (H $\rightarrow$ C)	COSY	δ_C (ppm)	δ_H (ppm) J (Hz)
1	127,8	-			127,8	-
2	111,7	7,19 <i>d</i> (1,8)	4, 6, 7		111,6	7,18 <i>d</i> (1,93)
3	149,4	-			149,9	-
4	150,5	-			151,5	-
5	116,5	6,83 <i>d</i> (7,8)	1, 3		116,5	6,82 <i>d</i> (8,23)
6	124,0	7,08 <i>dd</i> (1,8; 8,4)	2, 4, 7		124,0	7,07 <i>dd</i> (1,93; 8,23)
7	146,9	7,62 <i>d</i> (16,2)	1, 2, 6, 8, 9	8	147,0	7,59 <i>d</i> (15,88)
8	116,0	6,33 <i>d</i> (15,6)	1, 9	7	116,0	6,31 <i>d</i> (15,88)
9	171,0	-			171,2	-

C	G-19 (Methanol- <i>d</i> ₄ , 600 MHz)				acid <i>trans</i> -ferulic (Methanol- <i>d</i> ₄ , 400 MHz)	
	δ_C	δ_H (ppm)	HMBC	COSY	δ_C	δ_H (ppm)
	(ppm)	<i>J</i> (Hz)	(H $\rightarrow$ C)		(ppm)	<i>J</i> (Hz)
OCH ₃	56,5	3,91 <i>s</i>	3		56,5	3,89 <i>s</i>

3.2.20. Hợp chất G-20: 7-*O*-Methylwogonin (5-hydroxy-7,8-dimethoxyflavone)



Hình 3.20. Cấu trúc hóa học và một số tương tác HMBC chính của **G-20**

Hợp chất **G-20** được phân lập dưới dạng bột vô định hình màu vàng. Phổ (+)HR-ESI – MS của **G-20** cho peak ion phân tử giả tại $m/z = 299,0916$ $[M+H]^+$, “phù hợp với công thức phân tử là $C_{17}H_{14}O_5$ ($\Omega = 11$). Phổ ^{13}C -NMR cho thấy tín hiệu của 15 nguyên tử carbon, trong đó có nhóm carbonyl ở δ_C 182,3 (C-4), 5 nguyên tử carbon mang oxy ở δ_C 163,3 (C-2), 158,6 (C-7), 156,6 (C-5), 148,8 (C-9) và 128,5 (C-8), hai nguyên tử carbon bậc 4 ở δ_C 130,7 (C-1') và 104,1 (C-10), và bảy nguyên tử oxymethin carbon ở δ_C 132,1 (C-4'), 126,3 (C-2'/C-6'), 129,2 (C-3'/C-5'), 96,1 (C-6) và 105,0 (C-3) và hai nhóm methoxy ở δ_C 56,5 (7- OCH₃) và 61,1 (8-OCH₃) cho thấy hợp chất **G-20** là khung C6-C3-C6 của flavonoid **Bảng 3.22**.

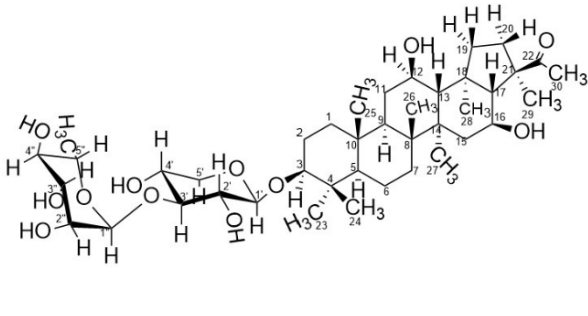
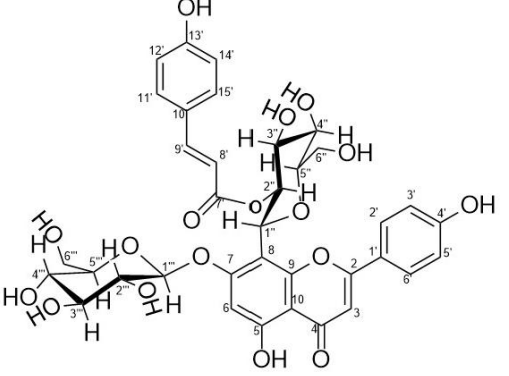
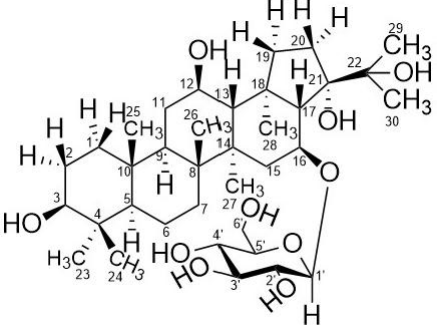
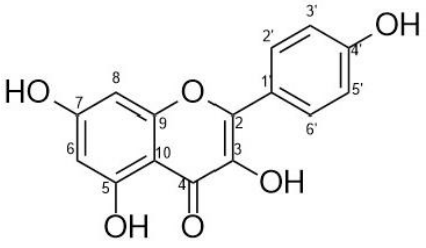
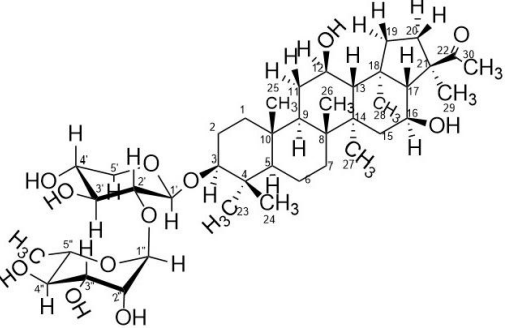
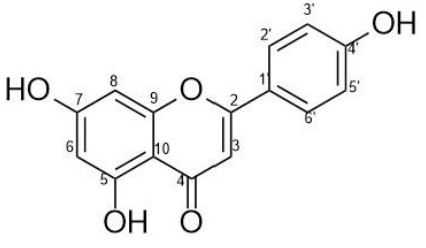
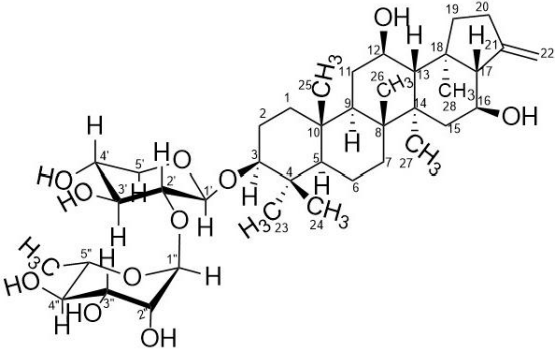
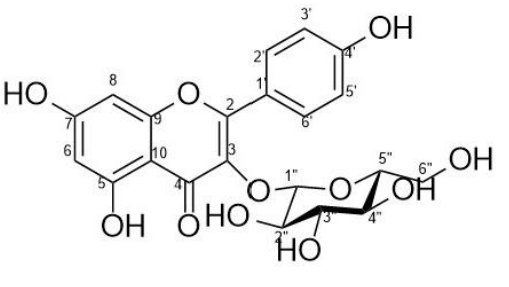
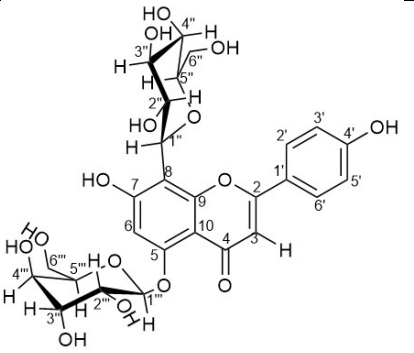
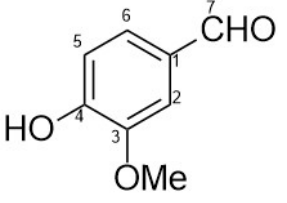
Phổ 1H -NMR thể hiện 5 tín hiệu proton thơm liên tiếp của vòng B và tín hiệu proton đơn của H-3 (δ_H 7,02 *s*) và H-6 (δ_H 6,61 *s*). Ngoài ra, phổ 1H -NMR thể hiện tín hiệu đơn của nhóm 5-OH tại δ_H 12,63 và tín hiệu của hai nhóm methoxy tại δ_H 3,93 (3H, *s*, 7-OCH₃) và 3,86 (3H, *s*, 8-OCH₃). Phổ HMBC cho thấy mối tương quan từ 5-OH đến C-5/C-6/C-10, từ H-6 đến C-5/C-7/C-8/C-10, từ H-3 đến C-2/C-4/C-10/C-1', từ H-2'/H-6' đến C-2/ C-4', và từ H-3'/H-5' đến C-1'. Dựa trên sự so sánh những dữ liệu này với dữ liệu được công bố trong tài liệu [110], hợp chất **G-20** được xác định là 7-*O*-methylwogonin (5-hydroxy-7,8-dimethoxyflavone) - Đây là lần đầu tiên phân lập được hợp chất này trong cây.

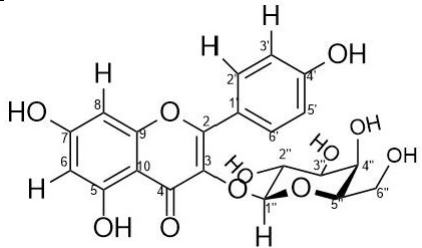
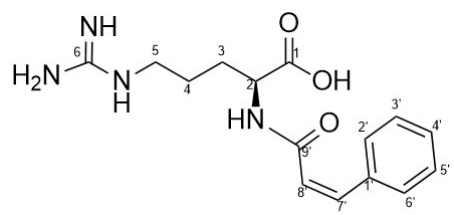
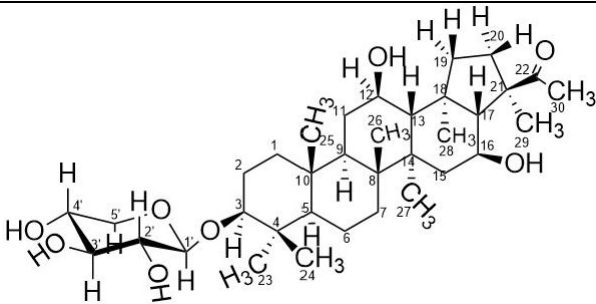
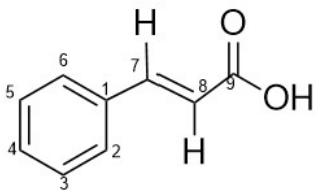
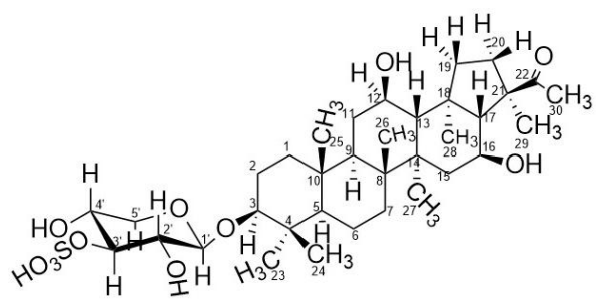
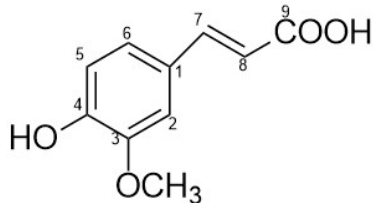
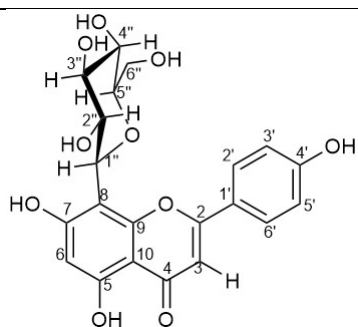
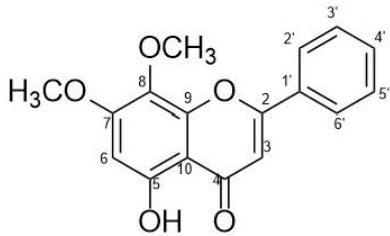
Bảng 3.22. Dữ liệu phổ NMR của **G-20** và 7-O-methylwogonin

C	DEPT	G-20 (DMSO- <i>d</i> ₅ , 600 MHz)		HMBC (H→C)	7-O-methylwogonin (DMSO- <i>d</i> ₅ , 300 MHz)	
		δ_C (ppm)	δ_H (<i>J</i> = Hz) ppm		δ_C (ppm)	δ_H (<i>J</i> = Hz) ppm
2	C _{IV}	163,3	-		164,7	-
3	CH	105,0	7,02 <i>s</i>	2, 4, 10, 1'	105,8	7,01 <i>s</i>
4	C _{IV}	182,3	-		183,5	-
5	C _{IV}	156,6	-		159,4	-
6	CH	96,1	6,61 <i>s</i>	5, 7, 8, 10	96,7	6,60 <i>s</i>
7	C _{IV}	158,6	-		160,0	-
8	C _{IV}	128,5	-		132,3	-
9	C _{IV}	148,8	-		150,3	-
10	C _{IV}	104,1	-		105,4	-
1'	C _{IV}	130,7	-		130,0	-
2'/6'	CH	126,3	8,08 <i>m</i>	2, 4'	127,2	8,10 <i>m</i>
4'	CH	132,1	7,63 <i>m</i>	2', 6'	132,8	7,61 <i>m</i>
3'/5'	CH	129,2	7,61 <i>m</i>	1'	130,1	
7-OMe	CH ₃	56,5	3,93 <i>s</i>	7	56,8	3,98 <i>s</i>
8-OMe	CH ₃	61,1	3,86 <i>s</i>	8	61,6	3,87 <i>s</i>
5-OH	-	-	12,63 <i>s</i>	5, 6, 10	-	12,65 <i>s</i>

Bảng 3.23. Tổng hợp cấu trúc các hợp chất phân lập được

Ký hiệu	Cấu trúc hóa học	Ký hiệu	Cấu trúc hóa học
G-1		G-11	

G-2		G-12	
G-3		G-13	
G-4		G-14	
G-5		G-15	
G-6		G-16	

G-7		G-17	
G-8		G-18	
G-9		G-19	
G-10		G-20	

3.3. Kết quả thử hoạt tính sinh học của các hợp chất phân lập được

3.3.1. Kết quả thử hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase của các hợp chất phân lập được

Kết quả thử hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase của các hợp chất phân lập được từ loài *Glinus oppositifolius* được thể hiện ở **Bảng 3.24**.

Bảng 3.24. Kết quả thử hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase của các hợp chất phân lập được từ cây Rau đắng đất

Mẫu thử	IC ₅₀ (μ M)	Mẫu thử	IC ₅₀ (μ M)
G-1	1247,21 $\pm$ 2,15 ^j	G-12	222,22 $\pm$ 3,71

G-2	310,51 ± 1,38 ^h	G-13	9,52 ± 0,19 ^a
G-3	ND	G-14	10,28 ± 0,05 ^b
G-4	ND	G-15	80,27 ± 1,50 ^d
G-5	ND	G-16	ND
G-6	257,90 ± 1,00 ^g	G-17	ND
G-7	380,71 ± 5,43 ⁱ	G-18	ND
G-8	13,99 ± 0,33 ^c	G-19	ND
G-9	ND	G-20	94,92 ± 1,85 ^e
G-10	193,60 ± 2,47 ^f	Acarbose	1021,47 ± 10,79 ^k
G-11	31,23 ± 0,45 ^c		

ND: không phát hiện được hoạt tính. Các chữ cái khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các giá trị theo phép kiểm Tukey ở mức tin cậy 99% ($p < 0,01$).

Theo kết quả thử hoạt tính như trên cho thấy các hợp chất **G-1**, **G-2**, **G-6**, **G-7**, **G-8**, **G-10**, **G-11**, **G-12**, **G-13**, **G-14**, **G-15**, **G-20** có khả năng ức chế enzyme α -glucosidase so với chứng dương acarbose ($IC_{50} = 1021 \pm 10,79$ (μ M)). Các hợp chất **G-13**, **G-14**, **G-8**, **G-11**, **G-15**, **G-20** cho hoạt tính ức chế mạnh enzyme α -glucosidase với IC_{50} theo thứ tự lần lượt là $9,52 \pm 0,19$ μ M, $10,28 \pm 0,05$ μ M, $13,99 \pm 0,33$ μ M, $31,23 \pm 0,45$ μ M, $80,27 \pm 1,50$ μ M, $94,92 \pm 1,85$ μ M. Trong đó, hợp chất **G-13** ($IC_{50} = 9,52 \pm 0,19$ μ M) thể hiện hoạt tính mạnh nhất. Các hợp chất **G-12**, **G-6**, **G-2**, **G-7**, **G-10** cho hoạt tính ức chế yếu hơn ($IC_{50} < 400$ μ M) với IC_{50} lần lượt là $222,22 \pm 3,71$ μ M, $257,90 \pm 1,00$ μ M, $310,51 \pm 1,38$ μ M, $380,71 \pm 5,43$ μ M, $193,60 \pm 2,47$ μ M. Hợp chất **G-1** có hoạt tính ức chế yếu nhất với $IC_{50} = 1247,21 \pm 2,15$ μ M. Các hợp chất còn lại không cho hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase.

Thảo luận:

Acarbose là chất ức chế cạnh tranh và hồi phục với enzyme α -glucosidase ở tế bào bàn chải của ruột, làm chậm tiêu hóa, hấp thu carbohydrate và kết quả là glucose máu tăng chậm hơn sau ăn. Acarbose được sử dụng phổ biến nhất trong nhóm thuốc ức chế enzyme α -glucosidase. Do đó, acarbose được sử dụng làm thuốc đối chứng dương trong thử nghiệm. Tuy nhiên, hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase của acarbose có giá trị dao động khác nhau với khoảng IC_{50} từ 46 μ g/mL đến 4687,06 μ g/mL [111] [112] [113]. Điều này có thể do acarbose hoạt động trên người tốt hơn nấm men, trong khi enzyme α -glucosidase sử dụng có nguồn gốc từ nấm men, và có thể do nguồn cung cấp acarbose (hãng sản xuất, nguồn gốc enzyme...), quy trình thực hiện. Trong thử nghiệm cũng cho kết quả IC_{50} (μ g/mL) của acarbose nằm trong khoảng giá trị như các báo cáo đã công bố. Kết quả thử hoạt tính trên cao phân đoạn cho thấy các

cao phân đoạn đều thể hiện hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase với giá trị IC_{50} thấp hơn so với acarbose. Đặc biệt, cao EtOAc cũng ghi nhận một giá trị ý nghĩa với $IC_{50} = 105,10 \pm 1,56 \mu\text{g/mL}$. Các phân đoạn có hoạt tính được tiếp tục tiến hành phân lập và xác định hoạt tính *in vitro*. Từ cao EtOAc đã phân lập được 14 hợp chất và 6 hợp chất từ phân đoạn BuOH (**G-1** – **G-20**). Các hợp chất được tiến hành thử nghiệm hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase *in vitro*.

Lần đầu tiên 3 hợp chất **G-6**, **G-11**, **G-17** được phân lập trong tự nhiên và thử hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase. Kết quả cho thấy hợp chất **G-11** (spergulin C) có hoạt tính mạnh với $IC_{50} = 31,23 \pm 0,45 \mu\text{M}$, **G-6** (apigenin-5-*O*- β -D-glucopyranosyl-8-*C*- β -D - glucopyranosid) ức chế yếu với $IC_{50} = 257,90 \pm 1,00 \mu\text{M}$ và **G-17** (L-(-)-(N-*cis*-cinnamoyl)-arginin) không có hoạt tính. Lần đầu tiên hợp chất **G-20** (7-*O*-methylwogonin) được phân lập từ loài *Glinus oppositifolius* và thử hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase. Kết quả cho thấy hoạt tính ức chế mạnh với $IC_{50} = 94,92 \pm 1,85 \mu\text{M}$.

Trong nghiên cứu hiện tại, kết quả hoạt tính ức chế của hợp chất **G-2** ($IC_{50} = 310,51 \pm 1,38 \mu\text{M}$) và **G-8** ($IC_{50} = 13,99 \pm 0,33 \mu\text{M}$) mạnh hơn nhiều so với báo cáo trước đây (tương ứng IC_{50} là $628,80 \pm 80 \mu\text{M}$ và $1654 \pm 170 \mu\text{M}$) [58]. Kumar và cộng sự (2013) đã báo cáo tác động ức chế enzyme α -glucosidase của các hợp chất phân lập từ loài *Glinus oppositifolius* như là glinosid C, spergulacin A, spergulin B, spergulin A với IC_{50} lần lượt là $127 \pm 30 \mu\text{M}$, $694 \pm 60 \mu\text{M}$, $1783 \pm 290 \mu\text{M}$, $143 \pm 20 \mu\text{M}$. Tuy nhiên những hợp chất này (**G-3**, **G-4**, **G-5**, **G-9**) không thể hiện hoạt tính ức chế trong nghiên cứu này. Các hợp chất **G-16** (vanilin), **G-18** (acid cinnamic), **G-19** (acid *trans*-ferulic) không cho thấy hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase ở các nồng độ khảo sát, điều này phù hợp với các báo cáo trước đây của các hợp chất này [114; 115; 116].

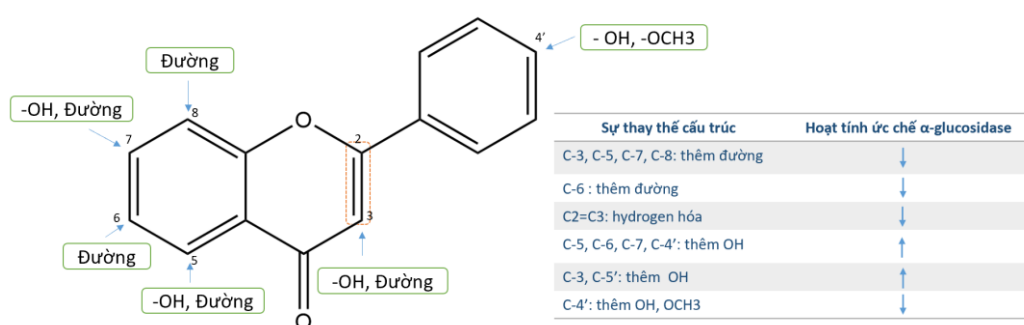
Những nghiên cứu gần đây đã chỉ ra rằng các dẫn chất glycosid flavone như vicenin 2, vitexin, astragalin có hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase. Trong thử nghiệm của chúng tôi, các hợp chất **G-1** (vicenin 2), **G-10** (vitexin), **G-6** (apigenin-5-*O*- β -D-glucopyranosyl-8-*C*- β -D-glucopyranosid), **G-15** (astragalin) đều thể hiện hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase. Tuy nhiên kết quả của nghiên cứu hơi khác so với báo cáo trước đây, điều này có thể là do điều kiện thực hiện phản ứng khác nhau như thời gian ủ, nồng độ của enzyme và thuốc thử, tất cả những điều kiện này có thể tác động đến IC_{50} . Giá trị IC_{50} của vicenin 2 ($1247,21 \pm 2,15 \mu\text{M}$), vitexin ($193,60 \pm 2,47 \mu\text{M}$), astragalin ($80,27 \pm 1,50 \mu\text{M}$) trong nghiên cứu này cao hơn so với vicenin 2 ($270,53$

$\pm 6,23 \mu\text{M}$) [99], vitexin ($52,80 \pm 1,65 \mu\text{M}$) [117], astragalin ($33,09 \pm 0,68 \mu\text{M}$) [118] đã được báo cáo trước đây. Theo hiểu biết của chúng tôi, đây là lần đầu tiên thử nghiệm hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase của các hợp chất **G-7** (trifolin), **G-12** (2''-*p*-coumaroylvitexin 7-glucosid), và kết quả cho thấy chúng có hoạt tính ức chế yếu với IC_{50} lần lượt là $380,71 \pm 5,43 \mu\text{M}$; $222,22 \pm 3,71 \mu\text{M}$. Các hợp chất **G-13** (kaempferol), **G-14** (apigenin), **G-20** (7-*O*-methylwogonin) – các aglycon flavone – đều thể hiện hoạt tính mạnh ức chế enzyme α -glucosidase với IC_{50} lần lượt là $9,52 \pm 0,19 \mu\text{M}$; $10,28 \pm 0,05 \mu\text{M}$; $94,92 \pm 1,85 \mu\text{M}$. Kết quả này tương đương với báo cáo nghiên cứu trước đó [119]. Đặc điểm cấu trúc liên kết đôi $\text{C2}=\text{C3}$, các nhóm 5-OH và 3-OH và nhóm 4-oxo trên vòng C, giải thích cho tác dụng ức chế α -glucosidase mạnh của kaempferol, apigenin [120]. Hiện chưa tìm thấy báo cáo về hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase của 7-*O*-methylwogonin.

Các hợp chất **G-13** (kaempferol, $\text{IC}_{50} = 9,52 \mu\text{M}$), **G-14** (apigenin, $\text{IC}_{50} = 10,28 \mu\text{M}$), **G-8** ($\text{IC}_{50} = 13,99 \mu\text{M}$), và **G-11** ($\text{IC}_{50} = 31,23 \mu\text{M}$) có hoạt tính ức chế α -glucosidase vượt trội so với acarbose ($\text{IC}_{50} = 1021,47 \mu\text{M}$), chứng tỏ tiềm năng rõ rệt. Những flavonoid này chứa các nhóm hydroxy tại vị trí 5, 7 và 4' của khung flavone, vốn đã được chứng minh là các yếu tố cấu trúc chủ đạo trong mô hình pharmacophore của chất ức chế α -glucosidase [121; 122]. Nhóm OH ở C-4' đóng vai trò then chốt trong hình thành liên kết hydro với Asp214 và Glu276 tại vị trí xúc tác của enzyme [123; 124]. Các hợp chất như **G-6**, **G-7**, **G-10** dù có IC_{50} cao hơn (từ 193–380 μM), vẫn thể hiện hoạt tính tương đối và phù hợp với cấu trúc của flavonoid glycoside, nơi nhóm đường làm tăng độ tan và ổn định sinh học [125].

Tiềm năng ức chế α -glucosidase của flavonoid đã được nghiên cứu và báo cáo rộng rãi. Hoạt động ức chế của các hợp chất bị ảnh hưởng đáng kể bởi các nhóm thế trong cấu trúc flavonoid. Thông qua phân tích tổng hợp dựa trên kết quả thử nghiệm và các báo cáo trước đây, chúng tôi đã thiết lập mối quan hệ cấu trúc-tác động (SAR) của chúng. Việc khử hoặc thay thế các nhóm hydroxyl tự do, nhóm olefin $\Delta^{2(3)}$ và nhóm ketone C-4 ảnh hưởng trực tiếp đến sự ức chế α -glucosidase, góp phần làm giảm tác dụng của chúng. Hydro hóa liên kết đôi C-2=C-3 hoặc khử/thay thế nhóm ketone C-4 đều làm giảm hoạt động ức chế α -glucosidase. Các nhóm hydroxy tại các vị trí C-3, C-5, C-6, C-7, C-8, C-3', C-4', C-5' của khung flavonoid đóng vai trò quan trọng trong việc tạo ra các hoạt động ức chế mạnh đối với α -glucosidase. Ngoài ra, gắn thêm nhóm methoxy của các vị trí đã đề cập ở trên của khung flavonoid làm giảm tác dụng ức chế đối với α -glucosidase. Sự tạo thành C-Glycosyl ở các vị trí C-3, C-6, C-

thực nghiệm cho thấy flavone ở dạng aglycon như hợp chất **G-13** (kaempferol), **G-14** (apigenin) có hoạt tính ức chế mạnh hơn khi so sánh với dạng glycosid của chúng (**G-1**, **G-6**, **G-7**, **G-10**, **G-12**, **G-15**). Bên cạnh đó, hợp chất **G-1** (vicenin 2) có tác dụng ức chế yếu đối với α -glucosidase ($IC_{50} = 1247,21 \pm 2,15 \mu M$) sau khi gắn đường tại vị trí C-6 của vòng A so với các hợp chất **G-6**, **G-10**, **G-12** thể hiện hoạt tính ức chế α -glucosidase tốt hơn với giá trị IC_{50} lần lượt là $257,90 \pm 1,00 \mu M$, $193,60 \pm 2,47 \mu M$, $222,22 \pm 3,71 \mu M$. Những kết quả này phù hợp với việc thiết lập trước đây của SAR giữa số nhóm hydroxy thơm và hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase của 7 và C-8 của khung flavonoid làm giảm mạnh tác dụng ức chế [126; 127]. Từ kết quả flavonoid (**Hình 3.21**).



Hình 3.21. Liên quan cấu trúc - tác dụng ức chế enzyme α -glucosidase

3.3.2. Kết quả thử hoạt tính ức chế enzyme xanthine oxidase của các hợp chất phân lập được

Kết quả thử hoạt tính ức chế enzyme xanthine oxidase của các hợp chất phân lập được từ cây Rau đắng đất được thể hiện ở **Bảng 3.25**

Bảng 3.25. Kết quả thử hoạt tính ức chế emzym xanthine oxidase của các hợp chất phân lập được từ cây Rau đắng đất

Mẫu thử	IC_{50} (μM)	Mẫu thử	IC_{50} (μM)
G-1	$56,82 \pm 1,95^d$	G-12	$127,51 \pm 2,33^g$
G-2	$288,68 \pm 1,94^j$	G-13	$26,18 \pm 0,78^c$
G-3	ND	G-14	$10,26 \pm 0,55^b$
G-4	ND	G-15	$144,65 \pm 0,17^h$
G-5	ND	G-16	$5,37 \pm 0,33^a$
G-6	ND	G-17	$178,02 \pm 1,65^i$
G-7	ND	G-18	$106,69 \pm 3,55^f$
G-8	ND	G-19	$87,40 \pm 1,96^e$
G-9	$394,42 \pm 1,35^k$	G-20	ND
G-10	$927,49 \pm 4,48^l$	Allopurinol	$3,84 \pm 0,11^k$

G-11**ND**

ND: không phát hiện được hoạt tính. Các chữ cái khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các giá trị theo phép kiểm Tukey ở mức tin cậy 99% ($p < 0,01$).

Theo kết quả thử hoạt tính như trên cho thấy các hợp chất **G-1, G-2, G-9, G-10, G-12, G-13, G-14, G-15, G-16, G-17, G-18, G-19** có khả năng ức chế enzyme xanthine oxidase so với chứng dương allopurinol ($IC_{50} = 3,84 \pm 0,11 \mu M$). Các hợp chất **G-1, G-13, G-14, G-16, G-19** cho hoạt tính ức chế mạnh ($IC_{50} < 100 \mu M$) enzyme xanthine oxidase với IC_{50} lần lượt là $56,82 \pm 1,95 \mu M$, $26,18 \pm 0,78 \mu M$, $10,26 \pm 0,55 \mu M$, $5,37 \pm 0,33 \mu M$, $87,40 \pm 1,96 \mu M$. Trong đó, hợp chất **G-16** ($5,37 \pm 0,33 \mu M$) thể hiện hoạt tính mạnh nhất. Các hợp chất **G-9, G-2, G-17, G-15, G-12, G-18** cho hoạt tính ức chế yếu hơn với IC_{50} lần lượt là $394,42 \pm 1,35 \mu M$, $288,68 \pm 1,94 \mu M$, $178,02 \pm 1,65 \mu M$, $144,65 \pm 0,17 \mu M$, $127,51 \pm 2,33 \mu M$, $106,69 \pm 3,55 \mu M$. Hợp chất **G-10** thể hiện hoạt tính ức chế yếu nhất với IC_{50} là $927,49 \pm 4,48 \mu M$. Các hợp chất còn lại không cho hoạt tính ức chế enzyme xanthine oxidase.

Thảo luận:

Kết quả thử nghiệm hoạt tính của các cao phân đoạn thể hiện tác động ức chế enzyme xanthine oxidase đáng kể với giá trị IC_{50} từ $29,67 \pm 1,02 \mu g/mL$ đến $130,56 \pm 3,79 \mu g/mL$. Đặc biệt, các phân đoạn EtOAc và BuOH cho thấy hoạt động ức chế XO mạnh hơn (giá trị IC_{50} lần lượt là $29,67 \pm 1,02$ và $83,16 \pm 0,27 \mu g/mL$) so với cao cồn 70% (giá trị IC_{50} là $130,56 \pm 3,79 \mu g/mL$). Nói cách khác, tất cả các cao phân đoạn (cao cồn 70%, các phân đoạn EtOAc và *n*-BuOH) đều cho thấy khả năng có ức chế enzyme XO có ý nghĩa. Theo hiểu biết của chúng tôi, đây là báo cáo đầu tiên về tác dụng ức chế xanthine oxidase *in vitro* của các cao chiết loài *Glinus oppositifolius*. Do đó, hoạt động ức chế của các hợp chất được phân lập chống lại XO đã được đánh giá thêm.

Lần đầu tiên 3 hợp chất **G-6, G-11, G-17** được phân lập trong tự nhiên và thử hoạt tính ức chế enzyme XO. Kết quả cho thấy hợp chất **G-17** có tác động ức chế yếu với IC_{50} là $178,02 \pm 1,65 \mu M$, còn hợp chất **G-6, G-11** không thể hiện hoạt tính. Lần đầu tiên hợp chất **G-20** (7-*O*-methylwogonin) được phân lập từ loài *Glinus oppositifolius* và thử hoạt tính ức chế enzyme XO cho thấy không có hoạt tính ức chế ở các nồng độ thử nghiệm.

Các hợp chất saponin **G-2** (spergulacin), **G-3** (glinosid C), **G-4** (spergulacin A), **G-5** (spergulin B), **G-8** (3-*O*- β -D-xylopyranosyl-spergulagenin A), **G-9** lần đầu được tiến hành thử nghiệm hoạt tính ức chế enzyme XO cho kết quả hợp chất **G-2, G-9** có tác

động ức chế yếu với IC_{50} lần lượt là $288,68 \pm 1,94 \mu M$, $394,42 \pm 1,35 \mu M$. Các hợp chất **G-3**, **G-4**, **G-5**, **G-8** không thể hiện hoạt tính ở các nồng độ khảo sát.

Hợp chất **G-16** (vanilin) thể hiện hoạt tính ức chế enzyme XO mạnh nhất với $IC_{50} = 5,37 \pm 0,33 \mu M$. Hợp chất **G-18** (acid cinnamic), **G-19** (acid *trans*-ferulic) cũng cho thấy hoạt tính ức chế tốt với IC_{50} lần lượt là $106,69 \pm 3,55 \mu M$, $87,40 \pm 1,96 \mu M$. Báo cáo của Chang và cộng sự (2007) đã chứng minh rằng các phenylpropanoid là các chất ức chế cạnh tranh mạnh với enzyme XO [128]. Kết quả thử nghiệm *in vitro* của báo cáo đã cho thấy hoạt tính ức chế của các phenylpropanoid phụ thuộc vào nhóm phenethyl, carbonyl và hydroxy. Trong cấu trúc của acid cinnamic bị thiếu đi nhóm hydroxy gắn vào vòng benzen, dẫn đến giảm ái lực với enzyme XO. Điều này phù hợp với kết quả nghiên cứu của đề tài khi $IC_{50 \text{ acid cinnamic}} > IC_{50 \text{ acid trans-ferulic}}$ ($106,69 \pm 3,55 \mu M > 87,40 \pm 1,96 \mu M$).

Một số nghiên cứu đã báo cáo rằng loài *Mentha longifolia* L.[129], *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth. [130] chứa một flavonoid quan trọng là vicenin 2 có tác động ức chế XO. Kết quả của đề tài cũng cho thấy **G-1** (vicenin 2) thể hiện hoạt tính mạnh với $IC_{50} = 56,82 \pm 1,95 \mu M$. Một nghiên cứu của Watanabe [131] đã chứng minh rằng vitexin không ức chế hoạt động của XO, còn nghiên cứu hiện tại cho thấy vitexin (**G-10**) có tác dụng ức chế XO rất yếu ($IC_{50} = 927,49 \pm 4,48 \mu M$). Trong nghiên cứu hoạt tính ức chế XO từ lá *Alsophila spinulosa* (Hook) Tryon. [132], hợp chất astragalin phân lập được cho kết quả $IC_{50} = 49,46 \mu M$ thấp hơn so với giá trị $IC_{50} = 144,65 \pm 0,17 \mu M$ thu được từ đề tài. Điều này có thể là do điều kiện thực hiện phản ứng khác nhau như thời gian ủ, nồng độ của enzyme và thuốc thử.

Kaempferol (**G-13**) và apigenin (**G-14**) là hai flavone ở dạng aglycon có hoạt tính ức chế enzyme XO rất mạnh (IC_{50} lần lượt là $26,18 \pm 0,78 \mu M$ và $10,26 \pm 0,55 \mu M$) phù hợp với nghiên cứu trước đây của hai hợp chất này [133; 134]. Các nhóm hydroxy (đặc biệt là meta hydroxy C5 và C7) trong kaempferol, apigenin được cho là đóng vai trò quan trọng trong tác dụng ức chế, tạo điều kiện cho sự tiếp cận vào vùng lân cận của khoang kỵ nước của XO (vị trí hoạt động của XO) thông qua liên kết hydro và tương tác tĩnh điện [135].

Hoạt tính ức chế XO nổi bật được ghi nhận ở các hợp chất **G-14** (apigenin, $IC_{50} = 10,26 \mu M$), **G-13** (kaempferol, $IC_{50} = 26,18 \mu M$), **G-16** (vanillin, $IC_{50} = 5,37 \mu M$), và **G-18/19** (acid cinnamic/*trans*-ferulic acid, $IC_{50} \sim 87\text{--}106 \mu M$), cho thấy vai trò tiềm năng của các nhóm phenol đơn giản và flavonoid trong điều hòa sản xuất acid uric. Đặc biệt, apigenin và kaempferol – hai hợp chất cùng thể hiện hoạt tính cao trên cả hai enzyme – đã được báo cáo trước đó là ức chế kép α -glucosidase/XO, với cơ chế

tương tác thông qua vùng hydroxyl và hệ liên hợp π giúp gắn vào túi xúc tác và ổn định phức chất enzyme–chất nền [136; 137].

Phân tích cấu trúc – hoạt tính

- Nhóm flavonoid aglycon (**G-13**, **G-14**): Thể hiện hoạt tính mạnh nhờ khung C6-C3-C6, OH-5, OH-7, OH-4' và hệ π liên hợp $\rightarrow$ phù hợp với mô hình pharmacophore của cả hai enzym.
- Flavonoid glycoside (**G-6**, **G-7**, **G-10**): Mặc dù IC_{50} cao hơn, song vẫn giữ đặc tính cấu trúc cốt lõi – có thể đóng vai trò prodrug hoặc tương tác đa đích (multi-target) [125].
- Phenolic acid (**G-18**, **G-19**): Dẫn xuất acid hydroxycinnamic như acid ferulic được chứng minh có khả năng tương tác tại vùng flavin–molibden của XO [138].
- Hợp chất **G-17** (L-(-)-(N-*cis*-cinnamoyl)-arginin) bao gồm nhóm guanidinium tích điện (arginin) và vòng thơm liên hợp (cinnamoyl). Theo mô hình tương tác hóa học – phân tử, cấu trúc này có thể tạo liên kết ion và H-bond (qua guanidinium và các acid amin mang điện âm trong vùng hoạt động của XO) đồng thời sử dụng tương tác cation– π giữa vòng thơm và aromatic pocket trong enzym.
- Mô hình tương tác này được hỗ trợ bằng giả lập DFT giữa guanidinium và vòng thơm của amino acid như phenylalanine, cho thấy tương tác kép (H-bond + cation– π)[139]. Bất chấp không thuộc cấu trúc purine, cơ chế này phù hợp với các dạng non-purine XO inhibitors như febuxostat, vốn được phát triển dựa trên các tương tác phức tạp tại vùng xúc tác XO.

Ngoài các đặc điểm cơ bản về hydroxyl và vòng thơm, một số báo cáo gần đây cũng nhấn mạnh vai trò của nhóm methoxy ($-OCH_3$), đường glycoside, hoặc liên kết không gian giữa vòng A–C–B trong ổn định cấu hình liên kết với enzyme [122; 140]. Trong số các hợp chất phân lập, cấu trúc của **G-14** và **G-13** cho thấy mức độ phù hợp gần như tối ưu với các yếu tố này, góp phần giải thích cho hoạt tính sinh học vượt trội.

Bên cạnh các hợp chất flavonoid, hai triterpenoid saponin phân lập được là **G-8** và **G-11** cũng thể hiện hoạt tính ức chế α -glucosidase khá mạnh (IC_{50} lần lượt là 13,99 và 31,23 μ M). Đây là nhóm hợp chất có cấu trúc khung oleanane pentacyclic, với các nhóm hydroxyl tại C-3 và C-28 hoặc C-21 – những đặc điểm đã được xác định là thành phần quan trọng trong mô hình pharmacophore của các chất ức chế α -glucosidase không phải flavonoid.

Các nghiên cứu gần đây đã chỉ ra rằng nhóm $-OH$ tại vị trí C-3 có vai trò tạo liên kết hydro với Asp518 và Arg600 trong túi hoạt động của enzym, trong khi nhóm carboxyl tại C-28 tạo tương tác ion hóa với vùng phân cực gần trung tâm xúc tác [140]. Sự kết

hợp giữa phần khung triterpen kỵ nước và các nhóm chức phân cực tạo ra cơ chế ức chế đa điểm (multi-point inhibition), giúp tăng cường độ bền của phức enzyme–chất ức chế [122]. Điều này giải thích cho hoạt tính ức chế cao của **G-8** và **G-11**, và phù hợp với các đặc trưng đã được ghi nhận trong các mô hình pharmacophore của triterpen saponin.

Tổng kết

Các hợp chất phân lập từ *Glinus oppositifolius*, đặc biệt là hai flavonoid aglycon (**G-13**, **G-14**), thể hiện hoạt tính ức chế mạnh trên cả hai enzyme mục tiêu. Phân tích mối liên hệ cấu trúc – hoạt tính (SAR) cho thấy, các nhóm hydroxyl tại vị trí C-3 và C-7 có khả năng hình thành liên kết hydro với các amino acid tại tâm hoạt động của enzyme, góp phần tăng cường ái lực liên kết. Hệ thống vòng thơm với khả năng tương tác π - π giúp ổn định phức hợp enzyme–chất ức chế, trong khi sự hiện diện của phần đường C-glycosid có thể ảnh hưởng đến độ tan và định hướng tương tác của phân tử trong túi hoạt động. Ngoài ra, khung saponin kiểu oleanane được ghi nhận có vai trò trong việc duy trì tương tác kỵ nước với vùng hoạt động chứa nước của enzyme. Sự tương thích giữa các hợp chất này với mô hình pharmacophore đã công bố càng khẳng định vai trò của các nhóm chức và khung cấu trúc nói trên như những đặc điểm then chốt quyết định hoạt tính sinh học.

Trên cơ sở kết quả phân lập, xác định cấu trúc hóa học và đánh giá hoạt tính sinh học *in vitro*, nghiên cứu đã bước đầu xác định được một số hợp chất có tiềm năng ức chế enzyme α -glucosidase và xanthine oxidase – hai enzyme quan trọng liên quan đến bệnh lý đái tháo đường 2 và gout. Tuy nhiên, các kết quả này mới phản ánh tác động đơn đích trong điều kiện *in vitro* và chưa thể giải thích đầy đủ cơ chế tác dụng đa mục tiêu, đa cơ chế của dược liệu trong thực tiễn sử dụng. Việc kết hợp phân tích SAR cùng mô phỏng docking và dược lý mạng là hướng tiếp cận cần thiết để làm sáng tỏ cơ chế tác động toàn diện của các hợp chất hoạt tính từ *Glinus oppositifolius*. Do đó, để mở rộng và làm sâu sắc thêm các nhận định từ phần thực nghiệm, nghiên cứu tiếp tục triển khai phân tích dược lý mạng (network pharmacology) kết hợp mô phỏng docking phân tử. Phương pháp này cho phép tích hợp dữ liệu hóa học (bao gồm cả các hợp chất đã phân lập và các hợp chất được phát hiện qua phân tích phổ HRMS) với dữ liệu sinh học hệ thống, nhằm xác định các đích phân tử liên quan, bản đồ hóa mạng tương tác protein (PPI), và nhận diện các con đường sinh học (KEGG pathways) tiềm năng. Đây là bước tiếp cận theo hướng “đa đích – đa con đường”, phù hợp với bản chất phức tạp của các bệnh chuyển hóa như Đái tháo đường và Gout.

Việc sàng lọc và mô phỏng tương tác giữa các hợp chất và các đích bệnh học qua docking phân tử còn đóng vai trò như một công cụ kiểm chứng bổ sung, giúp đánh giá khả năng tương tác tại vị trí hoạt động, từ đó nâng cao độ tin cậy cho các phát hiện từ *in vitro*. Ngược lại, các kết quả từ được lý mạng cũng hỗ trợ làm sáng tỏ cơ chế tác động sâu hơn của các hợp chất đã được chứng minh có hoạt tính sinh học, đồng thời gợi ý thêm các mục tiêu phân tử mới và hướng nghiên cứu phát triển tiếp theo.

Như vậy, phần phân tích được lý mạng và docking không chỉ đóng vai trò hỗ trợ mà còn là bước phát triển tất yếu nhằm kết nối, hệ thống hóa và nâng cao giá trị khoa học của các kết quả nghiên cứu hóa học và sinh học, góp phần hoàn chỉnh bức tranh toàn diện về tiềm năng dược lý của cây *Glinus oppositifolius*.

3.4. Dự đoán cơ chế tác dụng và hoạt chất quan trọng của Rau đắng đất trong điều trị bệnh Đái tháo đường típ 2

3.4.1. Sàng lọc hợp chất và xây dựng mạng lưới hoạt chất – đích tác động (Compound–Target Network)

Thông qua phân tích UPLC-HRMS phát hiện được 32 hợp chất kết hợp với dữ liệu thực nghiệm giúp xác định được tổng cộng 43 hợp chất có trong cây Rau đắng đất.

Bảng 3.26 cho thấy thời gian lưu, các giá trị m/z thử nghiệm và tính toán, công thức phân tử, sai số tính bằng phần triệu (ppm). Sai số khối lượng của tất cả các hợp chất được xác định là nhỏ hơn 5 ppm.

Sau khi áp dụng tiêu chí sàng lọc theo quy tắc Lipinski, 34 hợp chất được chọn là các hợp chất có tiềm năng dược lý (**Bảng 3.27**). Quy tắc Lipinski được xây dựng dựa trên các tiêu chí liên quan đến trọng lượng phân tử, phân bố dầu/nước (LogP), và khả năng hình thành liên kết hydro (số lượng nhóm cho và nhận liên kết hydro). Trong khi đó, các hợp chất dạng glucosid thường có trọng lượng phân tử lớn hơn (do có thêm phần đường), đồng thời chứa nhiều nhóm hydroxyl, làm tăng số lượng nhóm cho/nhận liên kết hydro, từ đó dễ dẫn đến vi phạm các tiêu chí của quy tắc này. Do vậy, trong quá trình sàng lọc *in silico*, phần lớn các hợp chất glycosid bị loại bỏ vì không đạt chuẩn, trong khi các aglycon – với cấu trúc nhỏ gọn, ít phân cực hơn – lại thỏa mãn tốt các tiêu chí và được giữ lại để phân tích tiếp theo.

Dựa trên nền tảng SwissTargetPrediction, từ 34 hợp chất này, 831 đích tác động tiềm năng được dự đoán. Khi đối chiếu với 2446 đích liên quan đến bệnh Đái tháo đường típ 2 (thu thập từ GeneCards và OMIM), 326 đích trùng khớp được xác định là các đích tác động tiềm năng (Biểu đồ Venn -**Hình 3.22**).

Mạng lưới hoạt chất – đích tác động được xây dựng bao gồm:

- 360 nút: 34 nút hợp chất (hình thoi, màu cam) và 326 nút đích tác động (hình tròn, màu xanh lá).
- 1545 cạnh thể hiện mối tương tác giữa hợp chất và đích tác động (**Hình 3.23**).

Ba hợp chất có độ trung tâm cao nhất trong mạng là:

1. Acid 3-oxo-olean-12-ene-28,30-dioic (DC = 57, BC = 0,0651, CC = 0,3925)
2. 6,8-Dimethyl-5,7,4'-trihydroxyflavone (DC = 54, BC = 0,0334, CC = 0,3897)
3. 7-Hydroxy-5-methoxy-6,8-dimethylflavone (DC = 54, BC = 0,0327, CC = 0,3897)

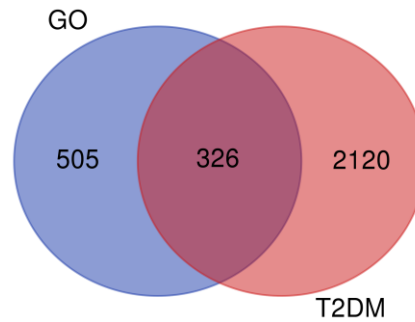
Bảng 3.26. Các hợp chất trong cây Rau đắng đất được xác định từ UPLC – HRMS

STT	Thời gian (phút)	Mảnh ion	<i>m/z</i>	Sai số	Tên hợp chất	CTPT	Các phân mảnh
1	1,25	$[\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3+\text{H}]^+$	153,0541	-3,47	Acid p-anisic	$\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3$	107,0495 $[\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3-\text{COOH}]^+$
2	1,27	$[\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_2-\text{H}]^-$	121,0287	2,35	Acid benzoic	$\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_2$	93,0335 $[\text{C}_6\text{H}_5\text{O}]^-$
3	2,66	$[\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_2+\text{H}]^+$	166,0865	-0,81	L-Phenylalanin	$\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_2$	120,0809 $[\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}]^+$ 103,0546 $[\text{C}_8\text{H}_7]^+$
4	2,79	$[\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_2+\text{H}]^+$	137,0596	-0,55	4-Hydroxy acetophenol	$\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_2$	119,0492 $[\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_2-\text{OH}]^+$
5	4,83	$[\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_3-\text{H}]^-$	303,1465	4,56	L-(-)-(N-cinnamoyl)-arginin	$\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_3$	131,0493 $[\text{C}_9\text{H}_7\text{O}]^-$
6	5,29	$[\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{15}-\text{H}]^-$	593,1517	2,65	Vicenin 2	$\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{15}$	473,1096 $[\text{C}_{23}\text{H}_{21}\text{O}_{11}]^-$ 325,0714 $[\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{O}]^-$
7	5,41	$[\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_4-\text{H}]^-$	193,0504	4,22	Acid <i>trans</i> -ferulic	$\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_4$	178,0267 $[\text{C}_9\text{H}_6\text{O}_4]^-$ 149,0601 $[\text{C}_9\text{H}_9\text{O}_2]^-$ 134,0366 $[\text{C}_8\text{H}_6\text{O}_2]^-$
8	5,37	$[\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_2+\text{H}]^+$	149,0598	0,70	Acid cinnamic	$\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_2$	132,0524 $[\text{C}_9\text{H}_8\text{O}]^+$ 103,0546 $[\text{C}_8\text{H}_7]^+$
9	5,93	$[\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{10}-\text{H}]^-$	431,0984	2,52	Vitexin	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{10}$	283,0615 $[\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{O}_5]^-$ 161,0240 $[\text{C}_9\text{H}_5\text{O}_3]^-$ 117,0335 $[\text{C}_8\text{H}_5\text{O}]^-$
10	6,94	$[\text{C}_{36}\text{H}_{36}\text{O}_{17}+\text{H}]^+$	741,2020	-0,75	2''- <i>p</i> -Coumaroylvitexin 7-glucosid	$\text{C}_{36}\text{H}_{36}\text{O}_{17}$	579,1498 $[\text{C}_{30}\text{H}_{27}\text{O}_{12}]^+$ 271,0601 $[\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{O}_5]^+$
11	8,51	$[\text{C}_{35}\text{H}_{58}\text{O}_{11}\text{S}+\text{HCOO}]^-$	731,3681	0,68	Spergulin A	$\text{C}_{35}\text{H}_{58}\text{O}_{11}\text{S}$	685,3633 $[\text{C}_{35}\text{H}_{58}\text{O}_{11}-\text{H}]^-$
12	8,75	$[\text{C}_{36}\text{H}_{58}\text{O}_8+\text{H}]^+$	619,4220	1,55	Glinusopposid H	$\text{C}_{36}\text{H}_{58}\text{O}_8$	601,4116 $[\text{C}_{36}\text{H}_{58}\text{O}_8-\text{OH}]^+$
13	8,79	$[\text{C}_{36}\text{H}_{62}\text{O}_{10}-\text{H}]^-$	653,4276	2,58	Glinosid C	$\text{C}_{36}\text{H}_{62}\text{O}_{10}$	491,3741 $[\text{C}_{30}\text{H}_{51}\text{O}_5]^-$
14	8,80	$[\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_4+\text{H}]^+$	181,0500	2,40	Acid caffeic	$\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_4$	163,0394 $[\text{C}_9\text{H}_7\text{O}_3]^+$ 135,0444 $[\text{C}_8\text{H}_7\text{O}_2]^+$
15	8,94	$[\text{C}_{33}\text{H}_{52}\text{O}_6\text{Na}]^+$	567,3662	0,60	Glinusopposid N	$\text{C}_{33}\text{H}_{52}\text{O}_6$	545,3851 $[\text{C}_{33}\text{H}_{52}\text{O}_6+\text{H}]^+$

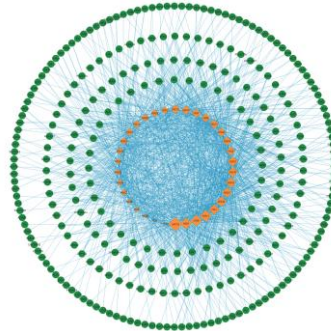
STT	Thời gian (phút)	Mảnh ion	m/z	Sai số	Tên hợp chất	CTPT	Các phân mảnh
16	9,00	$[C_{18}H_{18}O_4+H]^+$	299,1270	-2,49	7-Hydroxy-5-methoxy-6,8-dimethylflavanon	$C_{18}H_{18}O_4$	281,1159 $[C_{18}H_{18}O_4-OH]^+$
17	9,03	$[C_{19}H_{18}O_5+H]^+$	327,1220	-3,24	3-Hydroxy-5,7-dimethoxy-6,8-dimethylflavone	$C_{19}H_{18}O_5$	309,1107 $[C_{19}H_{18}O_5-OH]^+$
18	9,17	$[C_{30}H_{50}O_4+H]^+$	475,3792	2,22	Spergulagenin-A	$C_{30}H_{50}O_4$	457,3687 $[C_{30}H_{50}O_4-OH]^+$
19	9,20	$[C_{17}H_{16}O_4+H]^+$	285,1126	1,66	7-Hydroxy-5-methoxy-6-methylflavanon	$C_{17}H_{16}O_4$	267,1004 $[C_{17}H_{16}O_4-OH]^+$
20	9,79	$[C_{17}H_{14}O_5+H]^+$	299,0926	4,08	6,8-Dimethyl-5,7,4'-trihydroxyflavone	$C_{17}H_{14}O_5$	283,0613 $[C_{16}H_{11}O_5]^+$ 207,0663 $[C_{11}H_{11}O_4]^+$
21	10,15	$[C_{18}H_{16}O_4+H]^+$	297,1114	-2,61	7-Hydroxy-5-methoxy-6,8-dimethylflavon	$C_{18}H_{16}O_4$	279,1024 $[C_{18}H_{16}O_4-OH]^+$
22	10,77	$[C_{40}H_{56}O_2+H]^+$	569,4379	3,51	Lutein	$C_{40}H_{56}O_2$	205,1590 $[C_{14}H_{21}O]^+$
23	10,80	$[C_{17}H_{14}O_4+H]^+$	283,0970	0,57	5,7-Dihydroxy-6,8-dimethylflavone	$C_{17}H_{14}O_4$	267,0656 $[C_{16}H_{11}O_4]^+$ 79,0550 $[C_6H_7]^+$
24	11,14	$[C_{30}H_{44}O_5-H]^-$	483,3125	4,07	3-Oxo-olean-12-ene-28,30-dioic acid	$C_{30}H_{44}O_5$	439,3221 $[C_{29}H_{43}O_3]^-$
25	11,24	$[C_{30}H_{46}O_4+H]^+$	471,3477	1,64	Spergulagenin-C	$C_{30}H_{46}O_4$	453,3347 $[C_{30}H_{46}O_4-OH]^+$ 425,3417 $[C_{30}H_{46}O_4-COOH]^+$
26	11,27	$[C_{18}H_{16}O_5+H]^+$	313,1062	-2,72	5,4'-Dihydroxy-7-methoxy-6,8-dimethylflavone	$C_{18}H_{16}O_5$	295,0953 $[C_{18}H_{16}O_5-OH]^+$
27	11,61	$[C_{29}H_{48}O_5+H]^+$	477,3578	0,40	3 β ,12 β ,16 β ,21 β ,22-Pentahydroxyhopan	$C_{29}H_{48}O_5$	459,3466 $[C_{29}H_{48}O_5-OH]^+$ 431,3515 $[C_{29}H_{48}O_5-COOH]^+$
28	12,17	$[C_{30}H_{48}O_4+H]^+$	473,3615	-2,29	Spergulagenin-B	$C_{30}H_{48}O_4$	455,3502 $[C_{30}H_{48}O_4-OH]^+$ 427,3567 $[C_{30}H_{48}O_4-COOH]^+$
29	12,62	$[C_{29}H_{46}O_5+H]^+$	475,3402	-1,59	12 β , 16 β , 21 β , 22-Tetrahydroxyhopan-3-on	$C_{29}H_{46}O_5$	457,3289 $[C_{29}H_{46}O_5-OH]^+$ 429,3346 $[C_{29}H_{46}O_5-COOH]^+$
30	13,15	$[C_{29}H_{50}O+H-2H]^+$	413,3770	-2,04	Beta-sistosterol	$C_{29}H_{50}O$	411,3619 $[C_{29}H_{47}O]^+$ 397,3820 $[C_{29}H_{49}]^+$
31	13,14	$[C_8H_8O_3-H]^-$	151,0403	4,50	Vanilin	$C_8H_8O_3$	136,0167 $[C_7H_4O_3]^-$ 108,0214 $[C_6H_4O_2]^-$
32	14,36	$[C_{30}H_{50}+H]^+$	411,3974	-2,74	Squalen	$C_{30}H_{50}$	111,1171 $[C_8H_{15}]$

Bảng 3.27. Danh sách 34 hợp chất của cây Rau đắng đất được dự đoán đích tác động

Kí hiệu	Tên chất
HG 1	7- <i>O</i> -methyl wogonin
HG 2	Kaempferol
HG 3	Apigenin
HG 4	Vitexin (apigenin 8- <i>C</i> - β -D-glucopyranoside)
HG 5	Vicenin-2 (apigenin 6,8-di- <i>C</i> - β -D-glucopyranoside)
HG 6	6,8-Dimethyl-5,7,4'-trihydroxyflavone
HG 7	5,7-Dihydroxy-6,8-dimethylflavone
HG 8	5,4'-Dihydroxy-7-methoxy-6,8-dimethylflavone
HG 9	7-Hydroxy-5-methoxy-6,8-dimethylflavanone
HG 10	3-Hydroxy-5,7-dimethoxy-6,8-dimethylflavone
HG 11	7-Hydroxy-5-methoxy-6,8-dimethylflavone
HG 12	7-Hydroxy-5-methoxy-6-methylflavanone
HG 13	3- <i>O</i> - β -D-xylopyranosyl-spergulenin A
HG 14	Spergulenin-A
HG 15	Spergulenin-B
HG 16	Spergulenin-C
HG 17	3 β ,12 β ,16 β ,21 β ,22-Pentahydroxyhopan
HG 18	12 β , 16 β , 21 β , 22-Tetrahydroxyhopan-3-on
HG 19	Acid 3-oxo-olean-12-ene-28,30-dioic
HG 20	Glinusopposide H
HG 21	Glinusopposide N
HG 22	4-Hydroxy acetophenol
HG 23	Squalen
HG 24	Lutein
HG 25	Acid caffeic
HG 26	Acid benzoic
HG 27	Vanillin
HG 28	Acid cinnamic
HG 29	L-(-)-(N- <i>cis</i> -cinnamoyl)-arginin
HG 30	Acid <i>trans</i> -ferulic
HG 31	Acid <i>p</i> -anisic
HG 32	Beta sisterol
HG 33	L-Phenylalanin
HG 34	L-(-)-(N- <i>trans</i> -Cinnamoyl)-arginin



Hình 3.22. Biểu đồ Venn của *Glinus oppositifolius* và Đái tháo đường típ 2



Hình 3.23. Mạng lưới hoạt chất – đích tác động. Trong đó, nút kim cương màu cam đại diện cho 34 hoạt chất, sự thay đổi kích thước theo số cạnh liên kết, 326 nút tròn xanh lá đại diện cho 326 đích tiềm năng.

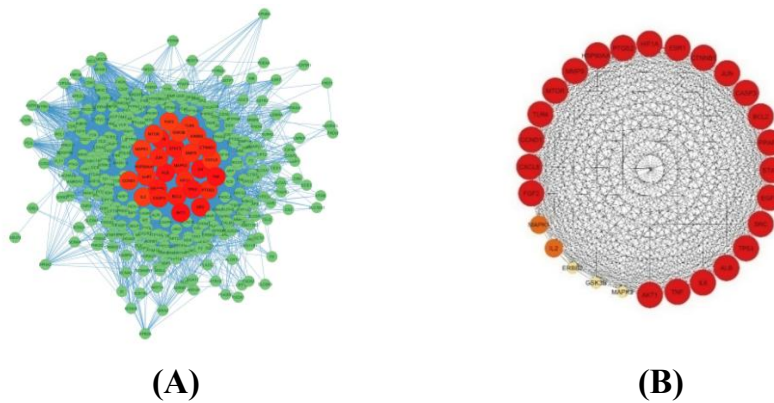
3.4.2. Xây dựng mạng lưới Tương tác Protein – Protein (PPI, Protein – Protein interaction)

Từ 326 đích tác động tiềm năng, mạng PPI được xây dựng sử dụng cơ sở dữ liệu STRING-db với độ tin cậy cao. Kết quả ban đầu thu được mạng gồm:

- 326 nút (đại diện cho protein)
- 7297 cạnh (tương tác giữa các protein) – **Hình 3.24A**

Mạng này sau đó được phân tích bằng Cytoscape 3.10.2 và plugin CytoNCA. Dựa trên các chỉ số độ trung tâm (DC > 100, BC > 0,0049, CC > 0,59), 28 protein trung tâm được chọn để xây dựng mạng PPI rút gọn với 374 cạnh (**Hình 3.24B**).

Các protein trung tâm nổi bật gồm: AKT1, TNF, IL6, ALB, TP53, SRC, EGFR, STAT3, PPARG. Đây là các đích quan trọng trong cơ chế tác động của hợp chất từ Rau đắng đất.



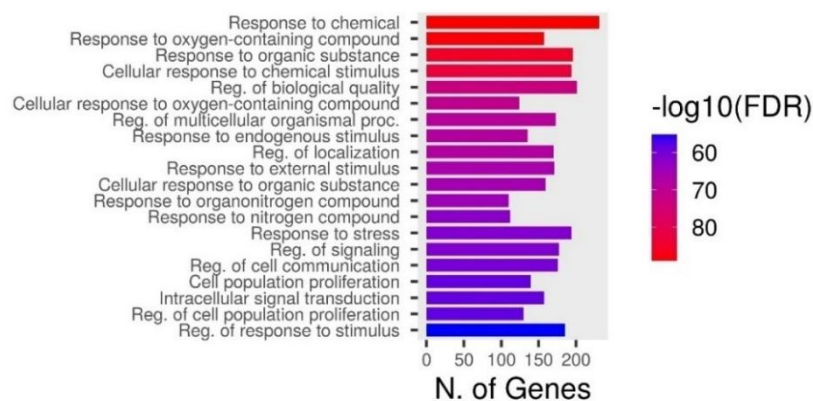
Hình 3.24. Mạng PPI Rau đắng đất – Đái tháo đường tít 2 bao gồm mạng (A) được xây dựng từ các protein tiềm năng thu được từ cơ sở dữ liệu STRING-db gồm 326 nút và 7297 cạnh. Trong đó, các cạnh đều được tô màu theo loại tương tác đã được xác minh (biểu diện trong hình). Mạng (B) được lọc từ mạng (A) dựa trên giá trị DC, BC, CC, mạng gồm 28 nút và 374 cạnh. Nút có giá trị DC càng lớn thì càng có màu đỏ hơn và kích thước lớn hơn.

3.4.3. Phân tích chức năng Gene Ontology (GO)

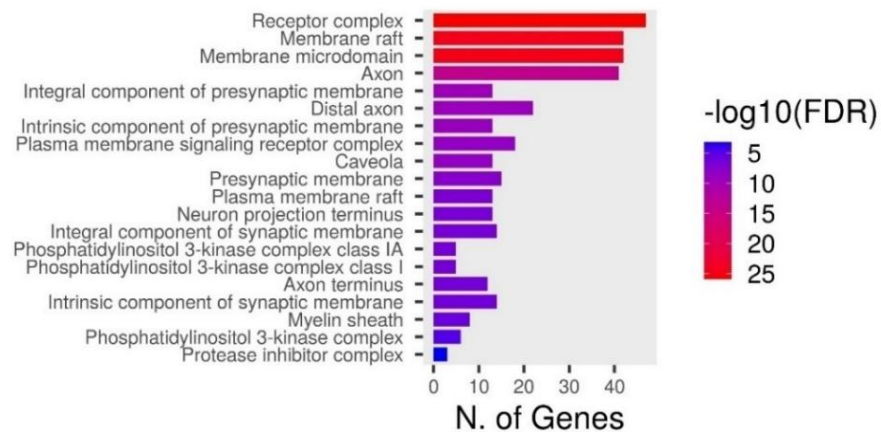
Phân tích GO được thực hiện trên 326 đích tiềm năng, chia thành ba nhóm:

- **BP (Biological Process):** phản ứng với hóa chất (GO:0042221), phản ứng với hợp chất chứa oxy (GO:1901700), đáp ứng với kích thích (GO:0070887)...
- **CC (Cellular Component):** màng vi miền (GO:0098857), phức hợp thụ thể (GO:0043235)...
- **MF (Molecular Function):** hoạt động của thụ thể protein tyrosine kinase (GO:0004714), hoạt động thụ thể nhân (GO:0004879)...

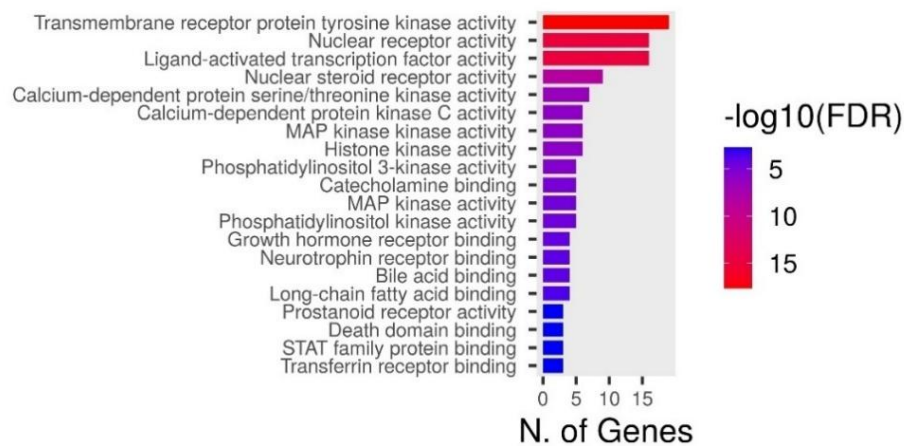
Tổng cộng có 1120 chức năng GO có ý nghĩa thống kê ($FDR < 0,05$). 20 chức năng nổi bật nhất của mỗi nhóm được biểu diễn bằng biểu đồ cột (**Hình 3.25A, B, C**), cho thấy vai trò chủ đạo của các đích trong phản ứng với stress, viêm và truyền tín hiệu.



(A)



(B)



(C)

Hình 3.25. Biểu đồ phân tích chức năng GO các gen tiềm năng của Rau đắng đất trong điều trị Đái tháo đường type 2. Theo thứ tự hình (A) là biểu đồ của các chức năng GO-BP, hình (B) là biểu đồ của các chức năng GO-CC và hình (C) là biểu đồ của các chức năng GO-MF. Mỗi biểu đồ bao gồm 20 chức năng quan trọng nhất dựa trên số gen tiềm năng.

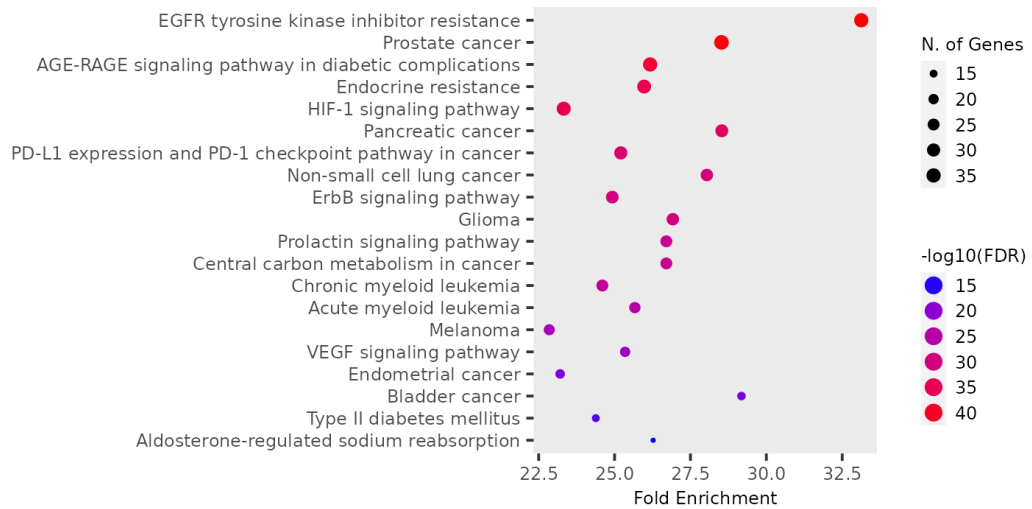
3.4.4. Phân tích con đường sinh hóa KEGG

Phân tích KEGG xác định 239 con đường sinh hóa có liên quan ($FDR < 0,05$). 20 con đường hàng đầu được thể hiện trong biểu đồ bong bóng (**Hình 3.26**). 5 con đường nổi bật nhất gồm:

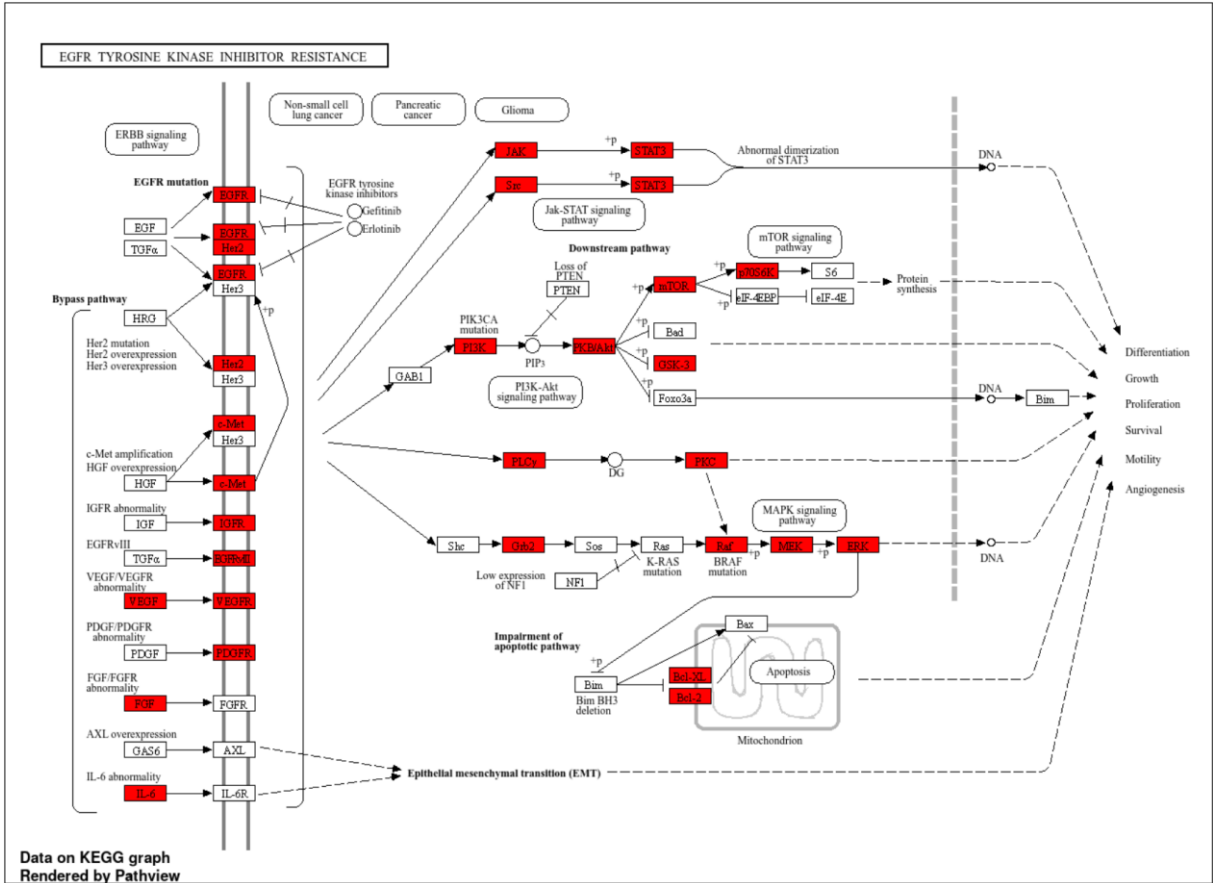
1. EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance (hsa01521)
2. Prostate cancer
3. AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications
4. Endocrine resistance
5. HIF-1 signaling pathway

Trong đó, sơ đồ chi tiết con đường EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance với các gen đích của Rau đắng đất được tô đỏ được trình bày ở **Hình 3.27**.

Các con đường này liên quan đến đề kháng insulin, viêm và stress oxy hóa – là những cơ chế bệnh sinh chính của bệnh Đái tháo đường típ 2.



Hình 3.26. Biểu đồ 20 con đường sinh hóa khi phân tích Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG). Trục x biểu thị giá trị Fold Enrichment, giá trị này càng lớn thể hiện khả năng đại diện cho con đường tương ứng của các đích tác dụng tiềm năng càng cao. Màu sắc của chấm tròn đại diện cho con đường biểu thị giá trị $-\log_{10}(\text{FDR})$, $-\log_{10}(\text{FDR})$ càng lớn, khả năng phát hiện con đường càng chính xác. Chấm tròn trên trục đại diện mỗi con đường thể hiện số lượng gen liên quan đến con đường.



Hình 3.27. Sơ đồ con đường đề kháng ức chế tyrosine kinase EGFR (hsa01521, EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance) các nút được bôi đỏ là các gen đích của thành phần hoạt chất Rau đắng đất trong điều trị Đái tháo đường típ 2

3.4.5. Phân tích docking phân tử

Docking phân tử được tiến hành giữa 3 hợp chất chính với 9 protein đích trung tâm nhằm xác nhận ái lực liên kết. Quy trình docking được đánh giá là đáng tin cậy với RMSD từ 0,835–1,244 Å ($\text{RMSD} < 2 \text{ Å}$).

Các tổ hợp có năng lượng liên kết mạnh nhất:

- Acid 3-Oxo-olean-12-ene-28,30-dioic – ALB: -10.1 kcal/mol
- 7-Hydroxy-5-methoxy-6,8-dimethylflavone – TNF: -9.9 kcal/mol
- Acid 3-Oxo-olean-12-ene-28,30-dioic – SRC: -9.4 kcal/mol

Kết quả chi tiết thể hiện ở **Bảng 3.28**, và các cấu trúc liên kết nổi bật minh họa tại **Hình 3.28**.

Trong số các tổ hợp ligand–protein, phức hợp giữa acid 3-oxo-olean-12-ene-28,30-dioic và albumin (ALB) thể hiện năng lượng liên kết thấp nhất, phản ánh ái lực tương tác mạnh giữa ligand và protein đích. Albumin là protein vận chuyển chính trong huyết tương, đồng thời có vai trò điều hòa nồng độ acid uric – một yếu tố chuyển hóa có liên quan đến đề kháng insulin và Đái tháo đường týp 2 [141]. Ligand này hình

thành năm liên kết hydro ổn định với các gốc acid amin LYS A:195, LYS A:199, ASP A:451, TYR A:452 và ARG A:222, giúp cố định cấu trúc phân tử tại vùng gắn. Bên cạnh đó, các tương tác Van der Waals với các acid amin như TRP A:214, ARG A:218, GLU A:292, VAL A:343... góp phần gia tăng độ ổn định của phức hợp. Đáng chú ý, sự hiện diện của tương tác alkyl với CYS A:448 nhấn mạnh vai trò của lực kỵ nước trong việc duy trì cấu trúc liên kết. Tập hợp các tương tác mạnh – yếu và sự phù hợp về mặt điện tích với các acid amin tích điện dương như ARG và LYS chứng tỏ khả năng gắn đích hiệu quả và bền vững của ligand này với ALB.

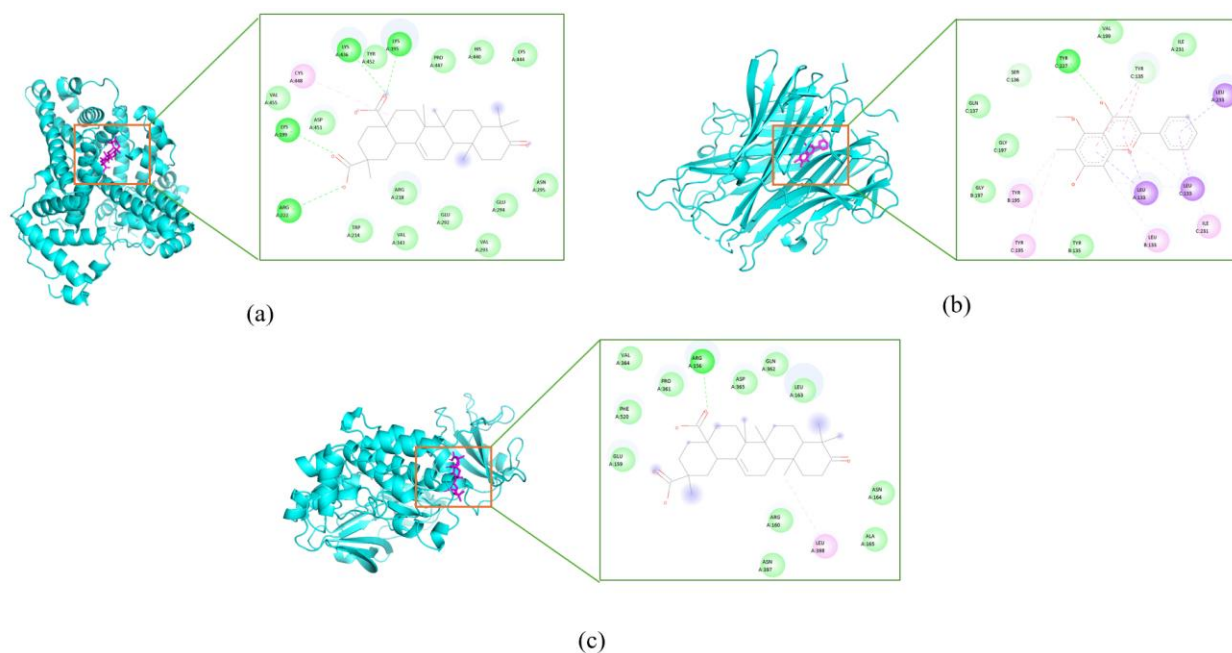
Đối với hợp chất 7-hydroxy-5-methoxy-6,8-dimethylflavone, kết quả docking với TNF (Tumor Necrosis Factor) – một cytokine viêm liên quan đến cơ chế bệnh sinh của Đái tháo đường týp 2 – cho thấy ligand chủ yếu tương tác qua các lực kỵ nước và các π -tương tác giữa nhân thơm của ligand với các acid amin có chuỗi bên aliphatic và vòng thơm. Liên kết hydro duy nhất hình thành với TYR C:227 đóng vai trò neo giữ phân tử tại vị trí gắn. Các tương tác π - π và π -alkyl phong phú, đặc biệt với LEU 133, TYR 135 và ILE 231 (thuộc các chuỗi A, B, C), gợi ý khả năng gắn vào một vùng hoạt động liên chuỗi, cho thấy tiềm năng điều hòa TNF thông qua ức chế tương tác hoặc ổn định cấu trúc protein. Những đặc điểm này mở ra triển vọng phát triển flavonoid này như một tác nhân chống viêm có liên quan đến điều hòa đáp ứng insulin [142].

Ngoài ra, phức hợp giữa acid 3-oxo-olean-12-ene-28,30-dioic với SRC kinase – một protein tyrosine kinase tham gia vào con đường tín hiệu viêm và chuyển hóa – cũng cho thấy tương tác đáng chú ý [143]. Ligand tạo một liên kết hydro bền vững với ARG A:156, tương tác alkyl với LEU A:398, cùng hệ thống van der Waals dày đặc với các acid amin bao quanh vùng gắn. Những tương tác này thể hiện sự tương thích về không gian và hóa học, hỗ trợ khả năng ức chế SRC kinase. Trong bối cảnh bệnh lý viêm mạn tính và kháng insulin, đây có thể là một hướng tiếp cận tiềm năng trong thiết kế thuốc điều trị Đái tháo đường týp 2 hoặc bệnh liên quan.

Bảng 3.28. Năng lượng gắn kết giữa hoạt chất quan trọng và đích tác động tiềm năng

Protein đích (PDB ID)	Hợp chất tiềm năng	Năng lượng gắn kết (kcal/mol)
AKT1 (4GV1)	Acid 3-Oxo-olean-12-en-28,30-dioic	-9,1
	6,8-Dimethyl-5,7,4'-trihydroxyflavone	-8,1
	7-Hydroxy-5-methoxy-6,8-dimethylflavone	-8,1
TNF (7JRA)	Acid 3-Oxo-olean-12-en-28,30-dioic	-8,3
	6,8-Dimethyl-5,7,4'-trihydroxyflavone	-8,5

IL6 (1ALU)	7-Hydroxy-5-methoxy-6,8-dimethylflavone	-9,9
	Acid 3-Oxo-olean-12-en-28,30-dioic	7,9
	6,8-Dimethyl-5,7,4'-trihydroxyflavone	-6,7
ALB (4E99)	7-Hydroxy-5-methoxy-6,8-dimethylflavone	-6,4
	Acid 3-Oxo-olean-12-en-28,30-dioic	-10,1
	6,8-Dimethyl-5,7,4'-trihydroxyflavone	-8,3
TP53 (5AB9)	7-Hydroxy-5-methoxy-6,8-dimethylflavone	-8,0
	Acid 3-Oxo-olean-12-en-28,30-dioic	-8,7
	6,8-Dimethyl-5,7,4'-trihydroxyflavone	-7,6
SRC (2H8H)	7-Hydroxy-5-methoxy-6,8-dimethylflavone	-7,7
	Acid 3-Oxo-olean-12-en-28,30-dioic	-9,4
	6,8-Dimethyl-5,7,4'-trihydroxyflavone	-9,4
EGFR (3W33)	7-Hydroxy-5-methoxy-6,8-dimethylflavone	-9,3
	Acid 3-Oxo-olean-12-en-28,30-dioic	-7,9
	6,8-Dimethyl-5,7,4'-trihydroxyflavone	-8,8
STAT3 (6NUQ)	7-Hydroxy-5-methoxy-6,8-dimethylflavone	-8,9
	Acid 3-Oxo-olean-12-en-28,30-dioic	-7,9
	6,8-Dimethyl-5,7,4'-trihydroxyflavone	-7,3
PPARG (8SC9)	7-Hydroxy-5-methoxy-6,8-dimethylflavone	-6,9
	Acid 3-Oxo-olean-12-en-28,30-dioic	-9,3
	6,8-Dimethyl-5,7,4'-trihydroxyflavone	-7,9
	7-Hydroxy-5-methoxy-6,8-dimethylflavone	-7,9



Hình 3.28. Các tư thế gắn kết của phức hợp protein – ligand có năng lượng liên kết mạnh nhất. (a) 3-oxo-olean-12-ene-28,30-dioic acid – ALB (b) 7-hydroxy-5-methoxy-6,8-dimethylflavon – TNF (c) 3-oxo-olean-12-ene-28,30-dioic acid – SRC (Nét xanh lá: liên kết hydro, nét tím: liên kết π - σ , nét hồng đậm: liên kết π - π , nét hồng nhạt: liên kết alkyl, π -alkyl)

3.4.6. Tổng kết cơ chế tác dụng tiềm năng

Các kết quả phân tích mạng cho thấy cơ chế tác dụng tiềm năng của Rau đắng đất trong điều trị Đái tháo đường týp 2 là:

- **Giảm đề kháng insulin** thông qua tác động đến AKT1, PPARG và con đường EGFR resistance.[144; 145; 146]
- **Giảm biến chứng Đái tháo đường** thông qua tác động đến con đường AGE-RAGE, HIF-1, và STAT3. [147; 148; 149]
- **Kháng viêm – chống oxy hóa:** nhắm đến các đích TNF, IL6, TP53. [150; 151; 152]

Tác động dược lý của Rau đắng đất là kết quả của sự kết hợp giữa các flavonoid và triterpenoid. Cả hai nhóm chất này đều có bằng chứng khoa học hỗ trợ tác dụng điều hòa glucose, kháng viêm và bảo vệ tế bào beta tụy.

Ba hợp chất quan trọng nhất là:

1. Acid 3-Oxo-olean-12-en-28,30-dioic (triterpenoid)
2. 6,8-Dimethyl-5,7,4'-trihydroxyflavon (flavonoid)

3. 7-Hydroxy-5-methoxy-6,8-dimethylflavon (flavonoid)

Các hợp chất này đều có ái lực liên kết tốt với đích đích trung tâm và góp phần giải thích rõ cơ chế tác động tiềm năng của Rau đắng đất trong điều trị Đái tháo đường týp 2.

3.5. Dự đoán cơ chế tác dụng và hoạt chất quan trọng của Rau đắng đất trong điều trị bệnh Gout

3.5.1. Sàng lọc hợp chất và xây dựng mạng lưới hoạt chất – đích tác động (Compound–Target Network)

Thông qua phân tích UPLC-HRMS và thực nghiệm, đã xác định được tổng cộng 43 hợp chất có trong cây Rau đắng đất. Sau khi áp dụng tiêu chí sàng lọc theo quy tắc Lipinski, 34 hợp chất được chọn là các hợp chất có tiềm năng dược lý (**Bảng 3.27**)

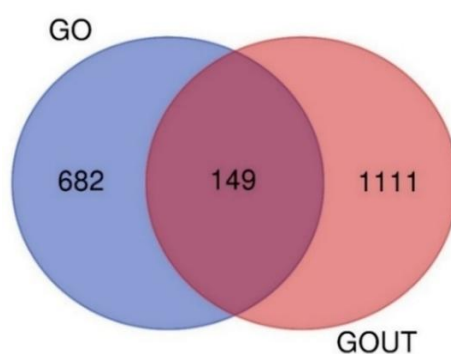
Dựa trên nền tảng SwissTargetPrediction, từ 34 hợp chất này, 831 đích tác động tiềm năng được dự đoán. Khi đối chiếu với 1260 đích liên quan đến bệnh Gout (thu thập từ GeneCards và OMIM), 149 đích trùng khớp được xác định là các đích tác động tiềm năng (Biểu đồ Venn –**Hình 3.29**).

Mạng lưới hoạt chất – đích tác động được xây dựng bao gồm:

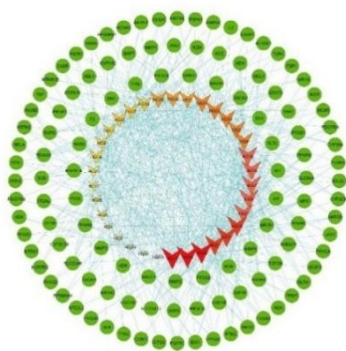
- 183 nút: 34 nút hợp chất (hình chữ V màu cam) và 149 nút đích tác động (hình tròn màu xanh lá).
- 751 cạnh thể hiện mối tương tác giữa hợp chất và đích tác động (**Hình 3.30**).

Ba hợp chất có độ trung tâm cao nhất trong mạng là:

1. Acid *trans*-ferulic (DC = 30, BC = 0,0794, CC = 0,4217)
2. 7-hydroxy-5-methoxy-6,8-dimethylflavon (DC = 30, BC = 0,0419, CC = 0,4217)
3. Lutein (DC = 30, BC = 0,0728, CC = 0,4193)



Hình 3.29. Biểu đồ Venn của *Glinus oppositifolius* và Gout



Hình 3.30. Mạng lưới hoạt chất – đích tác động. Trong đó, nút chữ v màu cam đại diện cho 34 hoạt chất, sự thay đổi kích thước theo số cạnh liên kết, 149 nút tròn xanh lá đại diện cho 149 đích tiềm năng.

Kết quả phân tích mạng tương tác giữa hợp chất – đích – bệnh cho thấy acid *trans*-ferulic có kết nối với số lượng đích tác động nhiều nhất so với các hợp chất khác trong mẫu nghiên cứu, bao gồm các enzyme và protein điều hòa quá trình chuyển hóa purin, phản ứng viêm và stress oxy hóa – những yếu tố trung tâm trong cơ chế gây bệnh Gout.

Đáng chú ý, acid *trans*-ferulic không chỉ được dự đoán là hợp chất đa đích trên lý thuyết, mà còn đã được phân lập và đánh giá thực nghiệm về khả năng ức chế enzyme xanthine oxidase – enzyme then chốt trong con đường sinh tổng hợp acid uric. Kết quả thử nghiệm *in vitro* cho thấy acid *trans*-ferulic có hoạt tính ức chế mạnh, với giá trị IC_{50} đạt $87,40 \pm 1,96 \mu M$. Đây là một kết quả ức chế mạnh, đặc biệt khi so sánh với các hợp chất thiên nhiên khác, và cho thấy khả năng gắn kết hiệu quả giữa hợp chất này với trung tâm hoạt động của enzyme mục tiêu.

Sự kết hợp giữa bằng chứng lý thuyết (*in silico*) và thực nghiệm (*in vitro*) củng cố vai trò tiềm năng của acid *trans*-ferulic như một hợp chất tiềm năng trong định hướng phát triển thuốc điều trị Gout có nguồn gốc tự nhiên. Hơn nữa, với cấu trúc đơn giản, ổn định và khả năng tồn tại phổ biến trong các loài thực vật, acid *trans*-ferulic có thể được khai thác hiệu quả và tối ưu hóa về dược động học và độc tính trong các nghiên cứu tiếp theo.

3.5.2. Xây dựng mạng lưới tương tác Protein – Protein (PPI, Protein – Protein interaction)

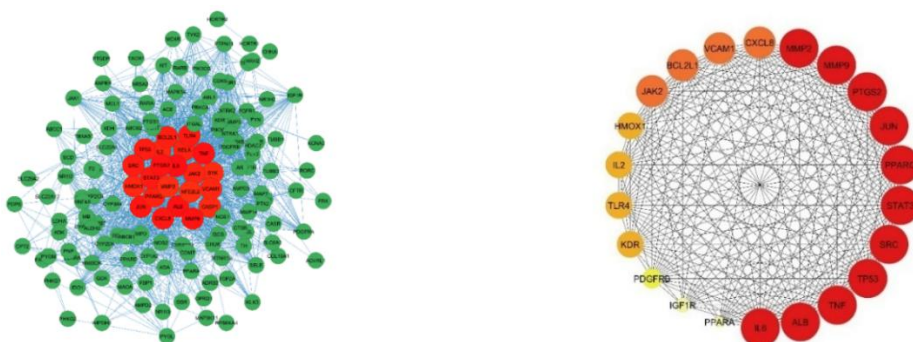
Từ 149 đích tác động tiềm năng, mạng PPI được xây dựng sử dụng cơ sở dữ liệu STRING-db. Sau khi loại bỏ 3 đích không có tương tác (GLRA2, PLAA, GLRA1), mạng ban đầu thu được:

- 146 nút
- 1808 cạnh – **Hình 3.31 A**

Mạng được xử lý bằng Cytoscape 3.10.2 và plugin CytoNCA. Sau lọc các đích trung tâm ($DC > 40$, $BC > 0.0029$, $CC > 0.5513$), mạng PPI rút gọn gồm:

- 22 nút và 218 cạnh (**Hình 3.31 B**).

Các đích trung tâm nổi bật: IL6, ALB, TNF, TP53, SRC.



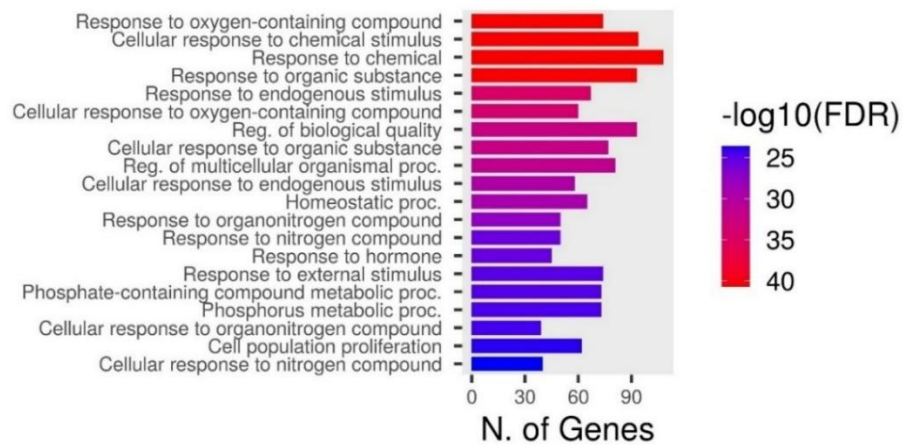
Hình 3.31. Mạng PPI Rau đắng đất –Gout bao gồm Mạng (A) được xây dựng từ các gen tiềm năng thu được từ cơ sở dữ liệu STRING-db gồm 146 nút và 1808 cạnh. Trong đó, các cạnh đều được tô màu theo loại tương tác đã được xác minh (biểu diễn trong hình). Mạng (B) được lọc từ mạng (B) dựa trên giá trị DC, BC, CC, mạng gồm 22 nút và 218 cạnh. Nút có giá trị DC càng lớn thì càng có màu đỏ hơn và kích thước lớn hơn.

3.5.3. Phân tích chức năng Gene Ontology (GO)

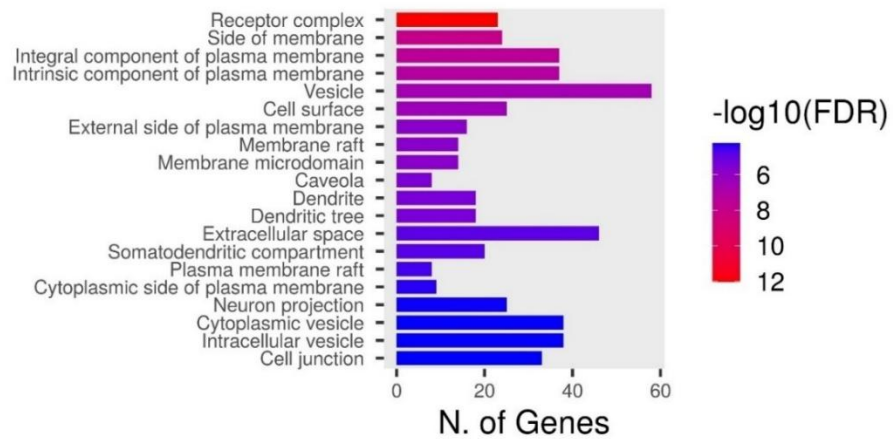
Phân tích GO được thực hiện trên 146 đích tiềm năng, chia thành ba nhóm:

- **BP (Biological Process):** phản ứng với hợp chất chứa oxy (GO:1901700), phản ứng của tế bào với kích thích hóa học (GO:0070887), phản ứng với chất hữu cơ (GO:0010033)...
- **CC (Cellular Component):** phức hợp thụ thể (GO:0043235), màng sinh chất (GO:0005886), mặt bên của màng (GO:0098552)...
- **MF (Molecular Function):** liên kết phân tử nhỏ (GO:0036094), hoạt động protein tyrosine kinase (GO:0004713)...

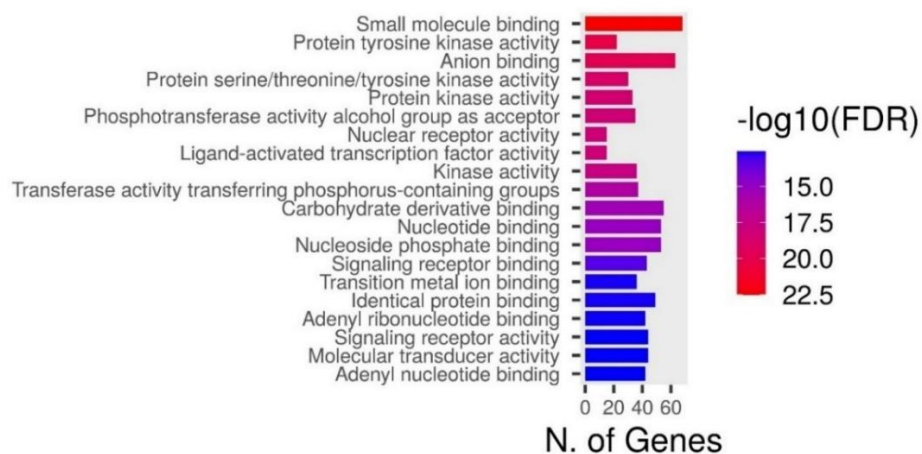
Tổng cộng có 862 chức năng GO có ý nghĩa thống kê ($FDR < 0,05$). 20 chức năng nổi bật nhất của mỗi nhóm được trình bày bằng biểu đồ cột (**Hình 3.32 A, B, C**).



(B)



(B)



(C)

Hình 3.32. Biểu đồ phân tích chức năng GO các gen tiềm năng của Rau đắng đất trong điều trị Gout. Theo thứ tự hình (A) là biểu đồ của các chức năng GO-BP, hình (B)

là biểu đồ của các chức năng GO-CC và hình (C) là biểu đồ của các chức năng GO-MF.

Mỗi biểu đồ bao gồm 20 chức năng quan trọng nhất dựa trên số gen tiềm năng.

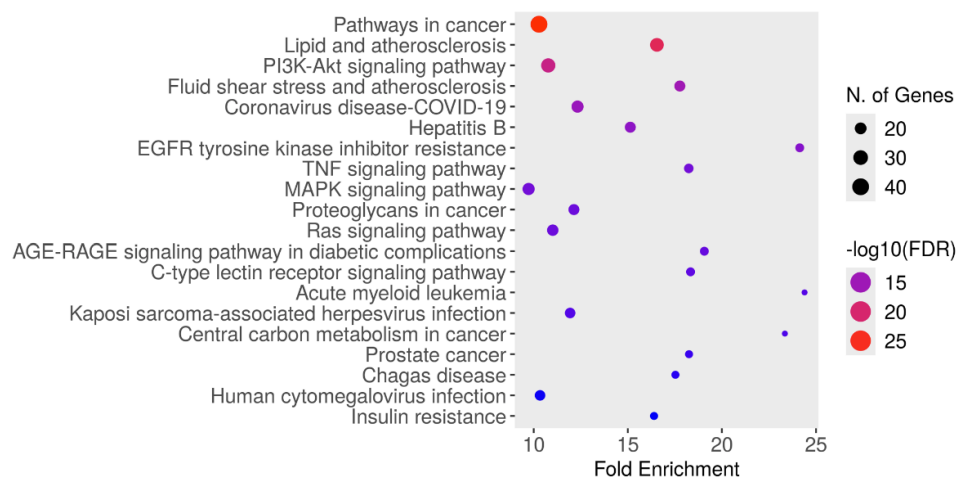
3.5.4. Phân tích con đường sinh hóa KEGG

Phân tích KEGG xác định 200 con đường sinh hóa có liên quan ($FDR < 0,05$). 20 con đường hàng đầu được thể hiện trong biểu đồ bong bóng (**Hình 3.33**). 3 con đường nổi bật nhất gồm:

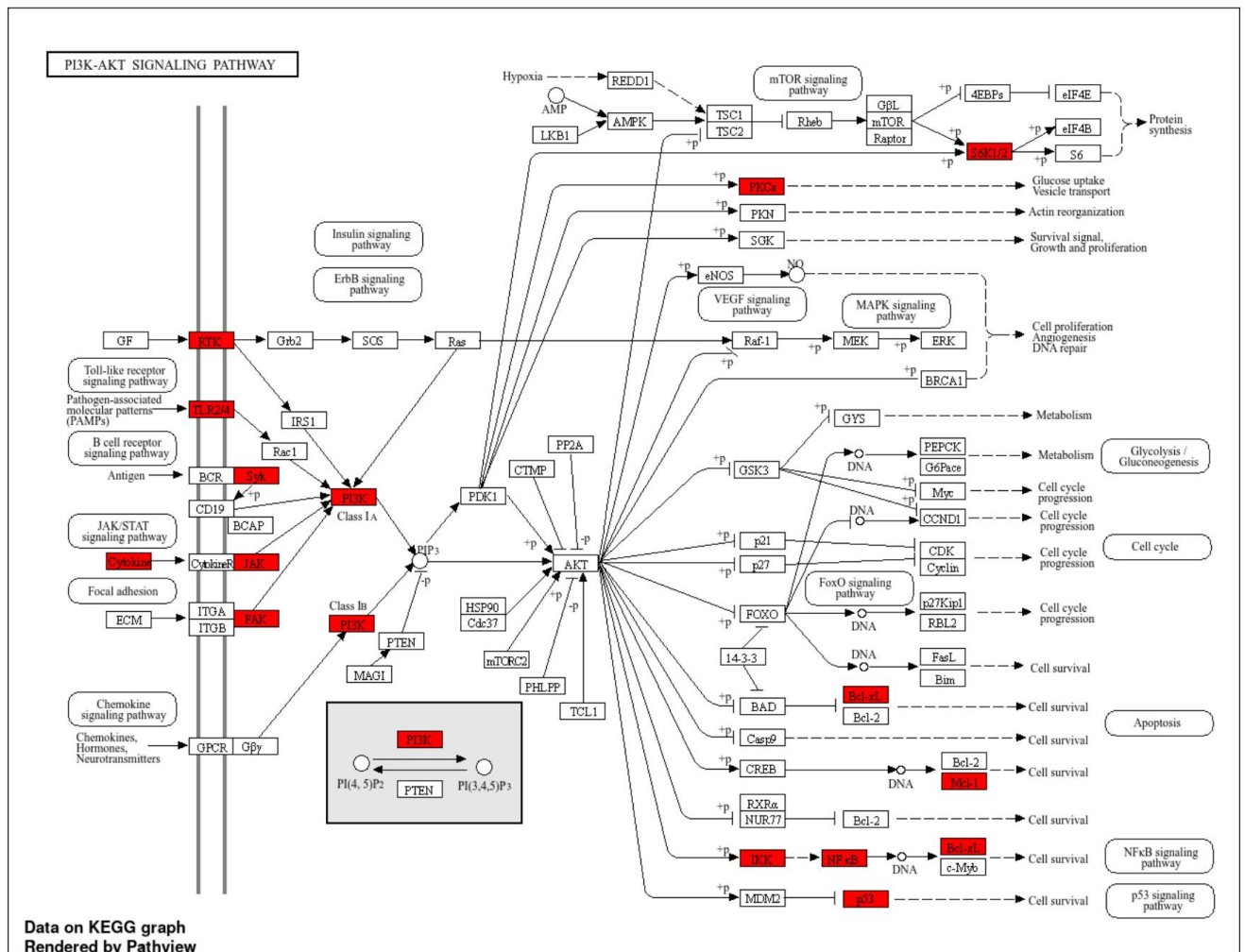
1. Pathways in cancer (hsa05200)
2. Lipid and atherosclerosis (hsa05417)
3. PI3K-Akt signaling pathway (hsa04151)

Trong đó, sơ đồ chi tiết con đường PI3K-Akt với các gen đích của Rau đắng đất được tô đỏ được trình bày ở **Hình 3.34**.

Các con đường này liên quan đến viêm mạn tính, rối loạn lipid máu, và chuyển hóa acid uric – là các yếu tố bệnh sinh chính của Gout.



Hình 3.33. Biểu đồ 20 con đường sinh hóa khi phân tích Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG). Trục x biểu thị giá trị Fold Enrichment, giá trị này càng lớn thể hiện khả năng đại diện cho con đường tương ứng của các đích tác dụng tiềm năng càng cao. Màu sắc của chấm tròn đại diện cho con đường biểu thị giá trị $-\log_{10}FDR$, $-\log_{10}FDR$ càng lớn, khả năng phát hiện con đường càng chính xác. Chấm tròn trên trục đại diện mỗi con đường thể hiện số lượng gen liên quan đến con đường.



Hình 3.34. Sơ đồ con đường tín hiệu PI3K-Akt (hsa04151, PI3K-Akt signaling pathway) các nút được bôi đỏ là các gen đích của thành phần hoạt chất Rau đắng đất trong điều trị Gout

3.5.5. Phân tích docking phân tử

Docking phân tử được thực hiện giữa 3 hợp chất chính với 5 protein đích trung tâm. Kết quả được trình bày chi tiết trong **Bảng 3.29** và **Hình 3.35**.

Các tổ hợp có năng lượng liên kết mạnh nhất:

- 7-Hydroxy-5-methoxy-6,8-dimethylflavon – TNF: -9,9 kcal/mol
- 7-Hydroxy-5-methoxy-6,8-dimethylflavon – SRC: -9,3 kcal/mol
- Lutein – SRC: -8,5 kcal/mol

Trong số ba tổ hợp được khảo sát, 7-hydroxy-5-methoxy-6,8-dimethylflavon tương tác với TNF- α cho thấy ái lực liên kết mạnh nhất với năng lượng tự do liên kết đạt -9.9 kcal/mol, phản ánh khả năng gắn kết cao của hợp chất này với TNF- α – một cytokine đóng vai trò then chốt trong quá trình viêm của bệnh Gout. Phân tích mô hình tương tác cho thấy hợp chất hình thành liên kết hydro bền vững với gốc Tyr227,

từ đó góp phần ổn định phức hợp ligand–protein. Ngoài ra, sự hiện diện của nhiều tương tác π -alkyl và π -sigma với các acid amin kỵ nước như Leu133, Leu233 và Ile231 cùng với các tương tác van der Waals không đặc hiệu với Gly197, Ser136 và Gln137 đã làm tăng cường độ ổn định và tính ái lực của phức hợp. Những đặc điểm này cho thấy hợp chất có khả năng tương tác hiệu quả tại vùng hoạt động của TNF- α , gợi ý tiềm năng ứng dụng như một chất ức chế quá trình viêm [142].

Trong tổ hợp thứ hai, 7-Hydroxy-5-methoxy-6,8-dimethylflavone gắn với SRC kinase, năng lượng liên kết ghi nhận ở mức -9.3 kcal/mol, tiếp tục phản ánh khả năng gắn kết mạnh của hợp chất. Mặc dù không hình thành liên kết hydro đặc hiệu, mô hình tương tác cho thấy ligand có khả năng tham gia vào mạng lưới tương tác π -alkyl và π -sigma với các acid amin kỵ nước như Leu273, Val281, Leu393 và Ala293, cũng như tương tác van der Waals với Gly344, Ser345 và Thr338. Điều này cho thấy vai trò quan trọng của các tương tác kỵ nước trong việc duy trì độ ổn định của phức hợp, đồng thời củng cố giả thuyết rằng hợp chất có thể đóng vai trò là chất ức chế tiềm năng của SRC kinase – một kinase liên quan đến cơ chế viêm và rối loạn chuyển hóa purin trong bệnh Gout [153; 154].

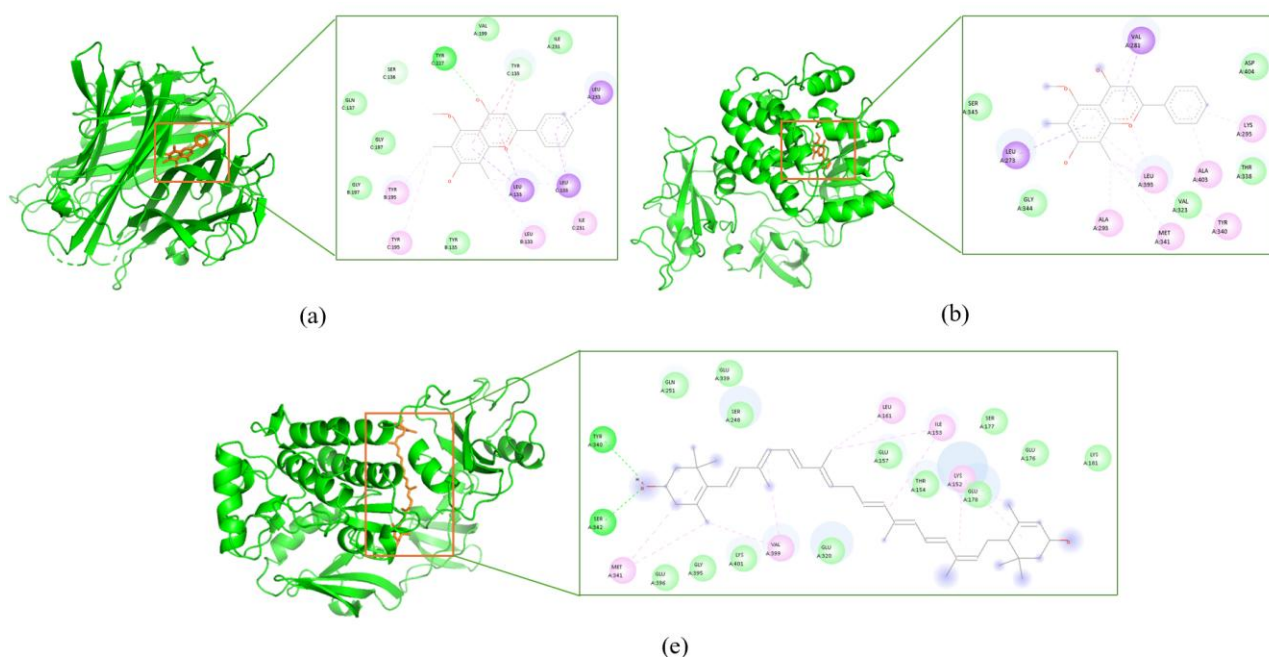
Tổ hợp thứ ba giữa Lutein và SRC kinase thể hiện năng lượng liên kết -8.5 kcal/mol, thấp hơn so với hai tổ hợp trước nhưng vẫn nằm trong ngưỡng tương tác mạnh. Hình ảnh tương tác cho thấy lutein hình thành liên kết hydro với Tyr340 và Ser342, góp phần nâng cao tính chọn lọc và độ bền của phức hợp. Ngoài ra, ligand còn tham gia vào các tương tác alkyl và van der Waals với các acid amin như Leu153, Ile153, Val399 và Met341. Đáng chú ý, cấu trúc kéo dài của lutein phù hợp với rãnh hoạt động của SRC kinase, giúp duy trì vị trí gắn kết bền vững. Dù ái lực liên kết thấp hơn so với flavonoid cùng khảo sát, lutein vẫn cho thấy tiềm năng tương tác đa điểm với protein đích, hỗ trợ vai trò như một ứng viên ức chế enzyme trong điều trị Gout.

Điều này củng cố kết quả được lý mạng và xác nhận độ tin cậy của các đích tác động được dự đoán.

Bảng 3.29. Năng lượng gắn kết giữa hoạt chất quan trọng và đích tác động tiềm năng

Protein đích (PDB ID)	Hợp chất tiềm năng	Năng lượng gắn kết (kcal/mol)
TNF (7JRA)	Acid <i>trans</i> -ferulic	-7,0
	7-Hydroxy-5-methoxy-6,8-dimethylflavon	-9,9
	Lutein	-7,8
IL6 (1ALU)	Acid <i>trans</i> -ferulic	-5,7
	7-Hydroxy-5-methoxy-6,8-dimethylflavon	- 6,4

ALB (4E99)	Lutein	-7,8
	Acid <i>trans</i> -ferulic	-6,7
	7-Hydroxy-5-methoxy-6,8-dimethylflavon	-8,0
TP53 (5AB9)	Lutein	-8,2
	Acid <i>trans</i> -ferulic	-5,6
	7-Hydroxy-5-methoxy-6,8-dimethylflavon	-7,7
SRC (2H8H)	Lutein	-7,7
	Acid <i>trans</i> -ferulic	-6,6
	7-Hydroxy-5-methoxy-6,8-dimethylflavon	-9,3
	Lutein	-8,5



Hình 3.35. Các tư thế gắn kết của phức hợp protein – ligand có năng lượng liên kết mạnh nhất. (a) 7-hydroxy-5-methoxy-6,8-dimethylflavone – TNF (b) 7-hydroxy-5-methoxy-6,8-dimethylflavone – SRC (c) Lutein – SRC (Nét xanh lá: liên kết hydro, nét tím: liên kết π - σ , nét hồng đậm: liên kết π - π , nét hồng nhạt: liên kết alkyl, π -alkyl)

3.5.6. Tổng kết cơ chế tác dụng tiềm năng

Cơ chế tác dụng tiềm năng của Rau đắng đất trong điều trị Gout bao gồm:

- **Giảm viêm mạn tính:** thông qua các đích IL6, TNF, TP53 và con đường PI3K-Akt [82; 155; 156]
- **Chống oxy hóa – giảm acid uric:** qua tác động đến TP53 và điều hòa hoạt động SLC2A9 [156].

- **Giảm rối loạn lipid máu và nguy cơ biến chứng tim mạch:** thông qua con đường lipid và xơ vữa động mạch. [157; 158]

Ba hợp chất chính:

1. Acid *trans*-ferulic (phenolic)
2. 7-hydroxy-5-methoxy-6,8-dimethylflavon (flavonoid)
3. Lutein (carotenoid)

Các chất này đều có khả năng điều hòa các quá trình viêm, stress oxy hóa và chuyển hóa acid uric – đóng vai trò then chốt trong điều trị và phòng ngừa biến chứng của bệnh Gout.

Các kết quả thu được phù hợp với nghiên cứu trước đây về hoạt tính chống oxy hóa, hạ đường huyết và ức chế xanthine oxidase của cây Rau đắng đất. Đồng thời cũng cho thấy tác dụng của Rau đắng đất không chỉ liên quan đến một chất mà là tác động hiệp đồng của nhiều thành phần. Nghiên cứu cung cấp cơ sở cho việc phát triển sản phẩm từ Rau đắng đất, với các hợp chất chính là marker kiểm soát chất lượng. Kết quả dự đoán cơ chế tác dụng và hoạt chất quan trọng của Rau đắng đất trong điều trị bệnh Đái tháo đường type 2 và Gout được tổng kết trong **Bảng 3.30**.

Bảng 3.30. Tóm tắt kết quả dự đoán cơ chế tác dụng và hoạt chất quan trọng của Rau đắng đất trong điều trị bệnh Đái tháo đường type 2 và Gout

Tiêu chí	Đái tháo đường type 2	Gout
Hợp chất chủ đạo	Acid 3-oxo-olean-12-ene-28,30-dioic; 6,8-dimethyl-5,7,4'-trihydroxyflavon; 7-hydroxy-5-methoxy-6,8-dimethylflavon	Acid <i>trans</i> ferulic; 7-hydroxy-5-methoxy-6,8-dimethylflavon; Lutein
Số đích chung	326	149
Đích trung tâm	AKT1, TNF, IL6, ALB, TP53, SRC, EGFR, STAT3, PPARG.	IL6, ALB, TNF, TP53, SRC
Con đường sinh hóa chính	EGFR resistance; AGE-RAGE; HIF-1	PI3K-Akt; Lipid and atherosclerosis
Cơ chế tác dụng chính	Tăng nhạy cảm insulin, chống viêm	Chống viêm, hỗ trợ đào thải acid
Hợp chất có docking mạnh	Acid 3-oxo-olean-12-ene-28,30-dioic – ALB: -10.1 kcal/mol	7-hydroxy-5-methoxy-6,8-dimethylflavon – TNF: -9.9 kcal/mol

CHƯƠNG 4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

4.1. Kết luận

Sau quá trình nghiên cứu, đề tài đã thu được kết quả như sau:

- Phân lập và xác định cấu trúc 20 hợp chất (**G-1**→**G-20**) từ phần trên mặt đất của loài *Glinus oppositifolius*, bao gồm 9 hợp chất thuộc nhóm flavonoid (**G-1** (vicenin 2), **G-6** (apigenin-5-*O*- β -D-glucopyranosyl-8-*C*- β -D-glucopyranoside), **G-7** (trifolin), **G-10** (vitexin), **G-12** (2''-*p*-coumaroylvitexin 7-glucosid), **G-13** (kaempferol), **G-14** (apigenin), **G-15** (astragalin), **G-20** (7-*O*-methylwogonin)); 7 hợp chất thuộc nhóm saponin (**G-2** (spergulacin), **G-3** (glinosid C), **G-4** (spergulacin A), **G-5** (spergulin B), **G-8** (3-*O*- β -D-xylopyranosyl-spergulagenin A), **G-9** (spergulin A), **G-11** (spergulin C)) và 4 hợp chất khác (**G-16** (vanilin), **G-18** (acid cinnamic), **G-17** (L-(-)-(N-*cis*-cinnamoyl)-arginin), **G-19** (acid *trans*-ferulic)). Trong đó có 3 hợp chất mới là **G-6** (apigenin-5-*O*- β -D-glucopyranosyl-8-*C*- β -D-glucopyranoside), **G-11** (spergulin C), **G-17** (L-(-)-(N-*cis*-cinnamoyl)-arginin) và 1 hợp chất lần đầu được phân lập trong cây là **G-20** (7-*O*-methylwogonin).
- Cao cồn 70%, và các cao phân đoạn của cây đều có tác động ức chế α -glucosidase, Trong đó cao EtOAc có hoạt tính mạnh nhất ($IC_{50} = 105,10 \pm 1,56 \mu\text{g/mL}$). Trong số 20 hợp chất phân lập được, các hợp chất **G-8**, **G-11**, **G-13**, **G-14**, **G-15**, **G-20** cho hoạt tính ức chế mạnh enzyme α -glucosidase với $IC_{50} = 9,52 \sim 94,92 \mu\text{M}$. Trong đó, hợp chất **G-13** ($IC_{50} = 9,52 \pm 0,19 \mu\text{M}$) thể hiện hoạt tính mạnh nhất. Các hợp chất **G-10**, **G-2**, **G-6**, **G-7** cho hoạt tính ức chế yếu hơn với $IC_{50} = 193,60 \sim 380,71 \mu\text{M}$. Hợp chất **G-1** có hoạt tính ức chế yếu nhất với $IC_{50} = 1247,21 \pm 2,15 \mu\text{M}$. Các hợp chất còn lại không cho hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase.
- Cao cồn 70%, và các cao phân đoạn của cây đều có tác động ức chế enzyme xanthine oxidase. Trong đó, cao EtOAc có hoạt tính ức chế mạnh nhất với giá trị $IC_{50} = 29,67 \pm 1,02 \mu\text{g/mL}$. Trong số 20 hợp chất phân lập được, các hợp chất **G-1**, **G-13**, **G-14**, **G-16**, **G-19** cho hoạt tính ức chế mạnh enzyme xanthine oxidase với $IC_{50} = 5,37 \sim 87,40 \mu\text{M}$. Trong đó, hợp chất **G-16** ($5,37 \pm 0,33 \mu\text{M}$) thể hiện hoạt tính mạnh nhất. Các hợp chất **G-2**, **G-9**, **G-10**, **G-12**, **G-15**, **G-17**, **G-18** cho hoạt tính ức chế yếu hơn với $IC_{50} = 106,69 \sim 394,42 \mu\text{M}$. Hợp chất **G-10** thể hiện hoạt tính ức chế yếu nhất với $IC_{50} = 927,49 \pm 4,48 \mu\text{M}$. Các hợp chất còn lại không cho hoạt tính ức chế enzyme xanthine oxidase.
- Từ phân tích dược lý mạng và docking phân tử cho thấy cây Rau đắng đất có tác dụng trên bệnh Đái tháo đường type 2 với cơ chế giảm đề kháng insulin (thông qua tác động đến AKT1, PPAR γ và con đường EGFR resistance), giảm biến chứng Đái tháo

đường (thông qua tác động đến con đường AGE-RAGE, HIF-1, và STAT3), kháng viêm – chống oxy hóa (nhắm đến các đích TNF, IL6, TP53). 3 hợp chất tiềm năng là acid 3-oxo-olean-12-ene-28,30-dioic; 6,8-Dimethyl-5,7,4'-trihydroxyflavon; 7-hydroxy-5-methoxy-6,8-dimethylflavon.

- Từ phân tích dược lý mạng và docking phân tử cho thấy cây Rau đắng đất có thể tham gia hỗ trợ điều trị bệnh Gout thông qua cơ chế giảm viêm mạn tính (thông qua các đích IL6, TNF, TP53 và con đường PI3K-Akt), chống oxy hóa – giảm acid uric (qua tác động đến TP53 và điều hòa hoạt động SLC2A9), giảm rối loạn lipid máu và nguy cơ biến chứng tim mạch. 3 hợp chất tiềm năng là acid *trans* ferulic; 7-hydroxy-5-Methoxy-6,8-dimethylflavon; lutein.

4.2. Kiến nghị

- Tiến hành thêm các thử nghiệm hạ đường huyết và hạ acid uric *in vivo* để củng cố thêm cho kết quả đã thu được.
- Tiếp tục nghiên cứu thành phần hoá học và tác dụng sinh học hướng tới việc làm sáng tỏ hơn công dụng của Rau đắng đất.
- Tiếp tục kết hợp các phần mềm mô phỏng và dự đoán dược động học khác nhằm làm sáng tỏ hơn cơ chế tác động và tiềm năng dược lý của các hợp chất chứa phần glycol trong cây Rau đắng đất.
- Nghiên cứu các dạng bào chế thích hợp từ cây Rau đắng đất để đánh giá tác dụng trên lâm sàng theo hướng tác dụng hạ đường huyết và hạ acid uric.

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ

1. **Nguyen Thi Thu Hien**, Huynh Tran Quoc Dung, Bui Hoang Minh, Tran Van Chen, Nguyen Trong Tuan, Le Tien Dung, 2023, A New Flavonoid Derivative and Inhibitory Effects on Xanthine Oxidase and α -glucosidase from *Glinus oppositifolius*, *Current Organic Chemistry*, **27**(5), pp. 1371-1379.
2. **Nguyen Thi Thu Hien**, Dung Huynh Tran Quoc, Phuong Vu Luu, Tuan Nguyen Trong, Dung Le Tien, 2025, Acylamino Acid from Aerial Parts of *Glinus oppositifolius* Aug. DC. and Its Xanthine Oxidase, α -glucosidase Inhibitory Activities, *Natural product research*, 15(9), pp. 1-14
3. **Nguyen Thi Thu Hien**, Dung Huynh Tran Quoc, Chen Tran Van, Tran Le Viet Ha, Tuan Nguyen Trong, Dung Le Tien, Characterization of a Novel Triterpenoid Saponin from *Glinus oppositifolius* Aerial Parts with Enzyme Inhibitory Potential, *Current Organic Chemistry*, 27(7), pp. 624-629

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyen M. T. T., & Nguyen N. T., 2013, A new lupane triterpene from *Tetracera scandens* L., xanthine oxidase inhibitor, *Natural Product Research*, 27(1), pp. 61-67.
2. Xu C., Liu S., Song F., & Liu Z., 2015, Xanthine oxidase inhibitors and the analytical methods to screen them: A review, *Current Traditional Medicine*, 1(1), pp. 41-50.
3. Duong N. T., Vinh P. D., Thuong P. T., Hoai N. T., Bach T. T., Nam N. H., & Anh N. H., 2017, Xanthine oxidase inhibitors from *Archidendron clypearia* (Jack.) IC Nielsen: Results from systematic screening of Vietnamese medicinal plants, *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 10(6), pp. 549-556.
4. Teo D. B., & Teng G. G., 2020, Diabetes mellitus and gout. In *Diabetes Mellitus* (pp. 317-343): Elsevier.
5. Minh T. N., Van T. M., Andriana Y., Vinh L. T., Hau D. V., Duyen D. H., & Guzman-Gelani C. d., 2019, Antioxidant, xanthine oxidase, α -amylase and α -glucosidase inhibitory activities of bioactive compounds from *Rumex crispus* L. root, *Molecules*, 24(21), pp. 3899.
6. Inngjerdingen K. T., Kiyohara H., Matsumoto T., Dirk P., Michaelsen T. E., Diallo D., Paulsen B. S., 2007, An immunomodulating pectic polymer from *Glinus oppositifolius*, *Phytochemistry*, 68(7), pp. 1046-1058.
7. Sahu S. K., Das D., & Tripathy N. K., 2012, Hepatoprotective activity of aerial part of *Glinus oppositifolius* L. against Paracetamol-induced Hepatic Injury in Rats, *Asian Journal of Pharmacy Technology*, 2(4), pp. 154-156.
8. Gupta M., Mazumder U., Halder P., Manikandan L., Senthilkumar G., & Kandar C., 2007, Hepatoprotective activity of methanol extracts of *Glinus oppositifolius* and *Trianthema decandra* against paracetamol induced liver damage, *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*, 7(1), pp. 74-78.
9. Diallo D., Marston A., Terreaux C., Toure Y., Smestad Paulsen B., & Hostettmann K., 2001, Screening of Malian medicinal plants for antifungal, larvicidal, molluscicidal, antioxidant and radical scavenging activities, *Phytotherapy research*, 15(5), pp. 401-406.
10. Behera G. M., Satish Kumar B., Malay Baidya M., & Panigrahi G., 2010, Antihyperglycemic, antihyperlipidemic and antioxidant activity of *Glinus oppositifolius* (L.) Aug, *Pharmacologyonline*, 3, pp. 915-936.
11. AsokKumar K., UmaMaheswari M., Sivashanmugam A., SubhadraDevi V., Subhashini N., & Ravi T., 2009, Free radical scavenging and antioxidant activities of *Glinus oppositifolius* (carpet weed) using different *in vitro* assay systems, *Pharmaceutical Biology*, 47(6), pp. 474-482.
12. Chandran U., Mehendale N., Patil S., Chaguturu R., & Patwardhan B., 2017, Network pharmacology, *Innovative approaches in drug discovery*, pp. 127.
13. Association A. D., 2021, Standards of medical care in diabetes—2021 abridged for primary care providers, *Clinical Diabetes*, 39(1), pp. 14-43.
14. Ilonen J., Lempainen J., & Veijola R. J. N. R. E., 2019, The heterogeneous pathogenesis of type 1 diabetes mellitus, *Nature Reviews Endocrinology*, 15(11), pp. 635-650.

15. Giwa A. M., Ahmed R., Omidian Z., Majety N., Karakus K. E., Omer S. M., Hamad A. R., 2020, Current understandings of the pathogenesis of type 1 diabetes: Genetics to environment, *World journal of diabetes*, 11(1), pp. 13.
16. Taylor R., 2012, Insulin resistance and type 2 diabetes, *Diabetes*, 61(4), pp. 778.
17. Eckel R. H., Kahn S. E., Ferrannini E., Goldfine A. B., Nathan D. M., Schwartz M. W., Smith S. R., 2011, Obesity and type 2 diabetes: what can be unified and what needs to be individualized?, *The Journal of Clinical Endocrinology*, 96(6), pp. 1654-1663.
18. Kahn S. E., Hull R. L., & Utzschneider K. M., 2006, Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes, *Nature*, 444(7121), pp. 840-846.
19. Van Beers E. H., Büller H. A., Grand R. J., Einerhand A. W., & Dekker J., 1995, Intestinal brush border glycohydrolases: structure, function, and development, *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 30(3), pp. 197-262.
20. Sim L., Quezada-Calvillo R., Sterchi E. E., Nichols B. L., & Rose D. R., 2008, Human intestinal maltase–glucoamylase: crystal structure of the N-terminal catalytic subunit and basis of inhibition and substrate specificity, *Journal of Molecular Biology*, 375(3), pp. 782-792.
21. Ren L., Qin X., Cao X., Wang L., Bai F., Bai G., & Shen Y., 2011, Structural insight into substrate specificity of human intestinal maltase-glucoamylase, *Protein Cell*, 2, pp. 827-836.
22. Zhang L., Chen Q., Li L., Kwong J. S., Jia P., Zhao P., Sun X., 2016, Alpha-glucosidase inhibitors and hepatotoxicity in type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis, *Scientific Reports*, 6(1), pp. 32649.
23. Dirir A. M., Daou M., Yousef A. F., & Yousef L. F., 2022, A review of alpha-glucosidase inhibitors from plants as potential candidates for the treatment of type-2 diabetes, *Phytochemistry Reviews*, 21(4), pp. 1049-1079.
24. Derosa G., & Maffioli P., 2012, α -Glucosidase inhibitors and their use in clinical practice, *Archives of medical science: AMS*, 8(5), pp. 899.
25. Balaji R., Duraisamy R., & Kumar M., 2019, Complications of diabetes mellitus: A review, *Drug Invention Today*, 12(1), pp. 128-136.
26. Lotfy M., Adeghate J., Kalasz H., Singh J., & Adeghate E., 2017, Chronic complications of diabetes mellitus: a mini review, *Current diabetes reviews*, 13(1), pp. 3-10.
27. Ang E., Lawrence M. K., Heilmann C. R., Ferguson J. A., Tobian J. A., Webb D. M., & Berclaz P.-Y., 2009, Safety and efficacy of AIR inhaled insulin compared with subcutaneous insulin in patients having diabetes and asthma: A 12-month, randomized, noninferiority trial, *Diabetes technology & therapeutics*, 11(S2), pp. S-35-S-44.
28. Patel D., Prasad S. K., Kumar R., & Hemalatha S., 2012, An overview on antidiabetic medicinal plants having insulin mimetic property, *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, 2(4), pp. 320-330.
29. Hegazy G. A., Alnoury, A. M., & Gad, H. G. , 2013, The role of Acacia Arabica extract as an antidiabetic, antihyperlipidemic, and antioxidant in streptozotocin-induced diabetic rats., *Saudi medical journal*, 34(7), pp. 727-733.

30. Ansari P., Islam, S. S., Akther, S., Khan, J. T., Shihab, J. A., & Abdel-Wahab, Y. H. A., 2023, Insulin secretory actions of ethanolic extract of *Acacia arabica* bark in high fat-fed diet-induced obese Type 2 diabetic rats., *Bioscience reports*, 43(5), pp. 20230329.
31. Kuczmánová A., Balažová, A., Račanská, E., Kameníková, M., Fialová, S., Majerník, J., Nagy, M., Gál, P., & Mučaji, P. , 2016, *Agrimonia eupatoria* L. and *Cynara cardunculus* L. Water Infusions: Comparison of Anti-Diabetic Activities, *Molecules*, 21(5), pp. 564.
32. Pillai S. S., & Mini, S. , 2016, Hibiscus rosa sinensis Linn. Petals Modulates Glycogen Metabolism and Glucose Homeostasis Signalling Pathway in Streptozotocin-Induced Experimental Diabetes., *Plant foods for human nutrition*, 71(1), pp. 42-48.
33. Alshareef N. S., AlSedairy, S. A., Al-Harbi, L. N., Alshammari, G. M., & Yahya, M. A. , 2024, *Carthamus tinctorius* L. (Safflower) Flower Extract Attenuates Hepatic Injury and Steatosis in a Rat Model of Type 2 Diabetes Mellitus via Nrf2-Dependent Hypoglycemic, Antioxidant, and Hypolipidemic Effects, *Antioxidants*, 13(9), pp. 1098.
34. Đinh Thị Thu Thủy, 2014, Đánh giá tác dụng hạ glucose máu của dịch chiết lá các loài trong chi *Gymnema* R.Br. ở Việt Nam, *Khóa luận tốt nghiệp dược sĩ, Trường Đại học Dược Hà Nội*.
35. Vũ Ngọc Lộ, 2005, Những dược liệu có tác dụng hạ glucose máu điều trị bệnh tiểu đường, *Tạp chí dược học*, Số 9, tr 6,7,8.
36. Nguyễn Thị Đông, 2013, Nghiên cứu tác dụng hạ glucose huyết trên động vật thực nghiệm của phân đoạn dịch chiết chloroform từ thân cây ý dĩ, *Luận văn thạc sĩ dược học Trường đại học Dược Hà Nội*.
37. Phùng Thanh Hương, 2010, Nghiên cứu tác dụng hạ glucose huyết và ảnh hưởng trên chuyển hóa glucose của dịch chiết lá bằng lã nước (*Lagerstroemia speciosa* L. Pers.) ở Việt Nam, *Luận án tiến sĩ dược học, Trường Đại học Dược Hà Nội*.
38. Truc T.T. Duong P. H. D., Hai X. Nguyen, Mai T.T. Nguyen, Nhan T. Nguyen 2017, A study on α -Glucosidase inhibitory activity of medicinal plants from Dong Nai provine, *Vietnam Journal of Chemistry*, 55 (5e3,4), pp. 537-540.
39. Trần Ngọc Ân, 2000, *Bách khoa thư bệnh học*: NXB Từ điển bách khoa, Hà Nội, tr. 24-26.
40. Ragab G., Elshahaly M., & Bardin T., 2017, Gout: An old disease in new perspective—A review, *Journal of advanced research*, 8(5), pp. 495-511.
41. Kasper D., Fauci A., Hauser S., Longo D., Jameson J., & Loscalzo J., 2015, *Harrison's principles of internal medicine*, 19e (Vol. 1): McGraw-hill New York, NY, USA; , tr.
42. Choi E.-Y., Stockert A. L., Leimkühler S., & Hille R., 2004, Studies on the mechanism of action of xanthine oxidase, *Journal of inorganic biochemistry*, 98(5), pp. 841-848.
43. Hille R., Hall J., & Basu P., 2014, The mononuclear molybdenum enzymes, *Chemical reviews*, 114(7), pp. 3963-4038.

44. FitzGerald J. D., Dalbeth N., Mikuls T., Brignardello-Petersen R., Guyatt G., Abeles A. M., King C., 2020, 2020 American College of Rheumatology guideline for the management of gout, *Arthritis Rheumatology*, 72(6), pp. 879-895.
45. Kong L., Zhang Y., Pan X., Tan R., & Cheng C., 2000, Inhibition of xanthine oxidase by liquiritigenin and isoliquiritigenin isolated from *Sinofranchetia chinensis*, *CMLS Cellular and Molecular Life Sciences*, 57, pp. 500-505.
46. Nguyen M. T. T., Awale S., Tezuka Y., Le Tran Q., Watanabe H., & Kadota S., 2004, Xanthine oxidase inhibitory activity of Vietnamese medicinal plants, *Biol. Pharm. Bull*, 27(9), pp. 1414-1421.
47. Hao S., Zhang C., & Song H., 2016, Natural products improving hyperuricemia with hepatorenal dual effects, *Evidence – based complementary and alternative medicine*, 2016(1), pp. 7390504.
48. Hou C. W., Lee, Y. C., Hung, H. F., Fu, H. W., & Jeng, K. C., 2012, Longan seed extract reduces hyperuricemia via modulating urate transporters and suppressing xanthine oxidase activity., *The American journal of Chinese medicine*, 40(5), pp. 979–991.
49. Liu T., Wang, L., Ji, L., Mu, L., Wang, K., Xu, G., Wang, S., & Ma, Q., 2024, Plantaginis Semen Ameliorates Hyperuricemia Induced by Potassium Oxonate., *International journal of molecular sciences*, 25(15), pp. 8548.
50. Chen G., Tan, M. L., Li, K. K., Leung, P. C., & Ko, C. H., 2015, Green tea polyphenols decreases uric acid level through xanthine oxidase and renal urate transporters in hyperuricemic mice, *Journal of ethnopharmacology*, 175(1), pp. 4-20.
51. Wu X. H., Ruan, J. L., Zhang, J., Wang, S. Q., & Zhang, Y. W. , 2014, Pallidifloside D, a saponin glycoside constituent from *Smilax riparia*, resist to hyperuricemia based on URAT1 and GLUT9 in hyperuricemic mice, *Journal of ethnopharmacology*, 157(1), pp. 201-205.
52. Takhtajan A., 2009, *Flowering plants*: Springer Netherlands, pp. 141.
53. Chi V. V., 2012, “*Rau đắng đất*”, *Từ điển cây thuốc Việt Nam I*: Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, tr. 511-512.
54. Trương Thị Đẹp, L. H. M. T., 2004, *Phân loại thực vật*: Bộ môn thực vật, Đại học Y Dược TP. Hồ Chí Minh, tr. 67-68.
55. Viện dược liệu, 2004, *Rau đắng đất*, *Cây thuốc và động vật làm thuốc II* (Vol. 579): Nhà xuất bản khoa học và kỹ thuật.
56. Chhanda S. A., Muslim T., & Rahman M. A., 2014, Phytochemical Studies on *Glinus oppositifolius* (L.) Aug. DC, *The Dhaka University Journal of Science*, 62(1), pp. 45-48.
57. Sheu S. Y., Yao C. H., Lei Y. C., & Kuo T. F., 2014, Recent progress in *Glinus oppositifolius* research, *Pharma. Biol*, 52(8), pp. 1079-1084.
58. Kumar D., Shah V., Ghosh R., & Pal B. C., 2013, A new triterpenoid saponin from *Glinus oppositifolius* with α -glucosidase inhibitory activity, *Nat. Prod. Res*, 27(7), pp. 624-630.
59. Traore F., Faure R., Ollivier E., Gasquet M., Azas N., Debrauwer L., Balansard G., 2000, Structure and antiprotozoal activity of triterpenoid saponins from *Glinus oppositifolius*, *Planta Medica*, 66(04), pp. 368-371.

60. Sahu N. P., Koike K., Banerjee S., Achari B., & Nikaido T., 2001, Triterpenoid saponins from *Mollugo spergula*, *Phytochemistry*, 58(8), pp. 1177-1182.
61. Zhang D., Fu Y., Yang J., Li X.-N., San M. M., Oo T. N., Yang X., 2019, Triterpenoids and their glycosides from *Glinus oppositifolius* with antifungal activities against *Microsporum gypseum* and *Trichophyton rubrum*, *Molecules*, 24(12), pp. 2206.
62. Phan T. T., Do L. T., Phung T. V., Nguyen T. T. H., Huynh V. N., Ngo D. T. T., Nguyen T. T. A., 2021, A new triterpenoid saponin from *Glinus oppositifolius*, *Nat. Prod. Res*, 36(1), pp. 171-176.
63. Ha D. T., Thu N. T., Ha T. T., Thuy V. H., Van N. H., Luc T. Q., & Hue N. T. V., 2021, Traphanoside GO1, a new triterpenoid saponin from the aerial parts of *Glinus oppositifolius* with the inhibitory effect on PGE2 production in LPS-induced HepG2 cells, *Natural Product Research*, 35(23), pp. 5125-5131.
64. Chen J.-J., Yang C.-S., Chen Y.-H., Chao C.-Y., Chen Y.-C., & Kuo Y.-H., 2023, New triterpenoids and anti-inflammatory constituents from *Glinus oppositifolius*, *Molecules*, 28(7), pp. 2903.
65. Phi K.-H., Park M.-H., Lee S., Koo M. H., Suh S. S., & Youn U. J., 2024, New anti-adipogenic triterpenoid saponins from the aerial parts of *Glinus oppositifolius*, *Biomedicine Pharmacotherapy*, 176, pp. 116851.
66. Ragasa C. Y., Espineli D. L., Mandia E. H., Don M.-J., & Shen C.-C., 2012, A new triterpene from *Glinus oppositifolius*, *Chinese journal of natural medicines*, 10(4), pp. 284-286.
67. Inngjerdingen K. T., Debes S. C., Inngjerdingen M., Hokputsa S., Harding S. E., Rolstad B., Paulsen B. S., 2005, Bioactive pectic polysaccharides from *Glinus oppositifolius* (L.) Aug. DC., a Malian medicinal plant, isolation and partial characterization, *Journal of ethnopharmacology*, 101(1-3), pp. 204-214.
68. Sahakitpichan P., Disadee W., Ruchirawat S., & Kanchanapoom T., 2010, L-(-)-(N-trans-Cinnamoyl)-arginine, an Acylamino Acid from *Glinus oppositifolius* (L.) Aug. DC, *Molecules*, 15(9), pp. 6186-6192.
69. Hoque N., Imam M. Z., Akter S., Mazumder M. E. H., Hasan S. R., Ahmed J., & Rana M. S., 2011, Antioxidant and antihyperglycemic activities of methanolic extract of *Glinus oppositifolius* leaves, *Journal of Applied Pharmaceutical Science*(Issue), pp. 50-53.
70. Martin-Puzon J. J. R., & Rivera W. L., 2015, Free-radical scavenging activity and bioactive secondary metabolites from various extracts of *Glinus oppositifolius* (L.) Aug. DC.(Molluginaceae) roots, stems and leaves, *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 5(9), pp. 711-715.
71. Vasincu A., Paulsen B. S., Diallo D., Veronica B., & Miron A., 2014, Antioxidant activities and phenolic contents of extracts from *Glinus oppositifolius* aerial parts, *The Medical-Surgical Journal*, 118(2), pp. 564-570.
72. Sahu S., Das D., Tripathy N., & Technology, 2012, Hepatoprotective activity of aerial part of *Glinus oppositifolius* L. against Paracetamol-induced Hepatic Injury in Rats, *Asian Journal of Pharmacy*, 2(4), pp. 154-156.
73. Martin-Puzon J. J. R., Valle Jr D. L., & Rivera W. L., 2015, TLC profiles and antibacterial activity of *Glinus oppositifolius* L. Aug. DC.(Molluginaceae) leaf and

stem extracts against bacterial pathogens, *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 5(7), pp. 569-574.

74. Hoque N., Habib R. M., Imam M. Z., Ahmed J., & Rana S. M., 2011, Analgesic and anti-inflammatory potential of methanolic extract of *Glinus oppositifolius* L., *Australian Journal of basic applied sciences*, 5(8), pp. 729-733.

75. Inngjerdingen K. T., Patel T. R., Chen X., Kenne L., Allen S., Morris G. A., Yamada H., 2007, Immunological and structural properties of a pectic polymer from *Glinus oppositifolius*, *Glycobiology*, 17(12), pp. 1299-1310.

76. Chakraborty T., Basak A. P., Mridha A., Gopal P. K., & Paul S., 2017, Anti-cancer and anti-oxidant potential of Indian carpet weed *Glinus oppositifolius* (L.) Aug. DC, *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 6(5), pp. 464-468.

77. Sahu S., Das D., Tripathy N., Dinda S., & Sundeep Kumar H., 2012, Evaluation of hypoglycemic activity of *Mollugo pentaphylla* and *Glinus oppositifolius* (L), *Rasayan J Chem*, 5(1), pp. 57-62.

78. Panigrahi G., Mishra U., Mahapatra S., Panda C., Pasa G., & Hati D., 2012, Hypoglycemic and hypolipidemic activities of methanolic extract of *Glinus oppositifolius*, *International Journal of Pharmaceutics*, 2(3), pp. 491-497.

79. Moniruzzaman M., Sharoti Bhattacharjee P., Rahman Pretty M., & Sarwar Hossain M., 2016, Sedative and Anxiolytic-Like Actions of Ethanol Extract of Leaves of *Glinus oppositifolius* (Linn.) Aug. DC, *Evidence-Based Complementary Alternative Medicine*, 2016(1), pp. 8541017.

80. Bonthu S., & Pulichintha S., 2023, Network Pharmacology Approach for Herbal Drugs Intended for the Therapy of Diseases: A Comprehensive Review, *Asian Journal of Biology*, 19(2), pp. 63-72.

81. Noor F., Tahir ul Qamar M., Ashfaq U. A., Albutti A., Alwashmi A. S., & Aljasir M. A., 2022, Network pharmacology approach for medicinal plants: review and assessment, *Pharmaceutics*, 15(5), pp. 572.

82. Zha X., Yang B., Xia G., & Wang S., 2022, Combination of uric acid and pro-inflammatory cytokines in discriminating patients with gout from healthy controls, *Journal of Inflammation Research*, pp. 1413-1420.

83. Zhang P., Zhang D., Zhou W., Wang L., Wang B., Zhang T., & Li S., 2024, Network pharmacology: towards the artificial intelligence-based precision traditional Chinese medicine, *Briefings in bioinformatics*, 25(1), pp. bbad518.

84. Dagar N., Kale A., Jadhav H. R., & Gaikwad A. B., 2023, Nutraceuticals and network pharmacology approach for acute kidney injury: A review from the drug discovery aspect, *Fitoterapia*, 168, pp. 105563.

85. Muhammad J., Khan A., Ali A., Fang L., Yanjing W., Xu Q., & Wei D.-Q., 2018, Network pharmacology: exploring the resources and methodologies, *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 18(12), pp. 949-964.

86. Jarrell J. T., Gao L., Cohen D. S., & Huang X., 2018, Network medicine for Alzheimer's disease and traditional Chinese medicine, *Molecules*, 23(5), pp. 1143.

87. Zhou Z., Chen B., Chen S., Lin M., Chen Y., Jin S., Zhang Y., 2020, Applications of network pharmacology in traditional Chinese medicine research, *Evidence-Based Complementary Alternative Medicine*, 2020(1), pp. 1646905.

88. Kirkpatrick P., 2004, Gliding to success, *Nature Reviews Drug Discovery*, 3(4), pp. 299-299.
89. Roy K., Kar S., & Das R. N., 2015, Other related techniques, *Understanding the basics of QSAR for applications in pharmaceutical sciences risk assessment*, pp. 357.
90. Agu P., Afiukwa C., Orji O., Ezech E., Ofoke I., Ogbu C., Aja P., 2023, Molecular docking as a tool for the discovery of molecular targets of nutraceuticals in diseases management, *Scientific Reports*, 13(1), pp. 13398.
91. Tung B.T. T. D. K., Hai P.T. , Hai N.T., 2018, Evaluation of α -glucosidase inhibitory activity of fractions from *Punica granatum* Linn fruits (in Vietnamese), *Journal of Traditional Vietnamese Medicine and Pharmacy*, 5(18), pp. 59.
92. Zhou P., Zhou R., Min Y., An L.-P., Wang F., & Du Q.-Y., 2022, Network pharmacology and molecular docking analysis on pharmacological mechanisms of astragalus membranaceus in the treatment of gastric ulcer, *Evidence-Based Complementary Alternative Medicine*, 2022(1), pp. 9007396.
93. Ge S. X., Jung D., & Yao R., 2020, ShinyGO: a graphical gene-set enrichment tool for animals and plants, *Bioinformatics*, 36(8), pp. 2628-2629.
94. Hồ Thị Thạch Thuý, Đ. T. A. T., 2025, Đánh giá hoạt tính ức chế α -glucosidase của các phân đoạn và chất phân lập từ Núc nác (*Oroxylum indicum*), *Tạp chí khoa học Đại học quốc tế Hồng bàng*, 35(1), pp. 45-52.
95. Hsu J. H., Yang, C. S., & Chen, J. J. , 2022, Antioxidant, Anti- α -Glucosidase, Antityrosinase, and Anti-Inflammatory Activities of Bioactive Components from *Morus alba*, *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 11(11), pp. 2222.
96. Kavya P., Theijeswini R. C., & Gayathri M., 2024, Phytochemical analysis, identification of bioactive compounds using GC-MS, in vitro and in silico hypoglycemic potential, in vitro antioxidant potential, and in silico ADME analysis of *Chlorophytum comosum* root and leaf, *Frontiers in Chemistry*, 12(1), pp. 1458505. doi:10.3389/fchem.2024.1458505
97. Li X., Liu, S., Jin, W., Zhang, W., & Zheng, G. , 2023, Identification of the Constituents of Ethyl Acetate Fraction from *Smilax china* L. and Determination of Xanthine Oxidase Inhibitory Properties, *International journal of molecular sciences*, 24(6), pp. 5158.
98. Fu G T. H., Zeng H, Zou B, Chai J, Zhang L, Xie M, Chen F, Wan Y., 2018, Antioxidant and xanthine oxidase inhibitory activity of *Eucommia ulmoides* Oliver leaf extracts., *Pak J Pharm Sci.*, 31(4), pp. 1333-1339.
99. Islam M. N., Ishita I. J., Jung H. A., Choi J. S. F., & toxicology c., 2014, Vicenin 2 isolated from *Artemisia capillaris* exhibited potent anti-glycation properties, *Food Chem. Toxicol* 69(2014), pp. 55-62.
100. Tavakoli S., Khalighi-Sigaroodi F., Dehaghi N. K., Yaghoobi M., Hajiaghace R., Gholami A., & Ghafarzadegan R., 2022, Isolation and purification of apigenin, quercetin and apigenin 7-O-glycoside from *Apium graveolens* L., *Petroselinum crispum* (Mill.) Fuss, *Allium cepa* L., respectively, *J. Medicinal Plants*, 21(83), pp. 62-76.
101. Liu C., Chen J., & Wang J., 2009, A novel kaempferol triglycoside from flower buds of *Panax quinquefolium*, *Chemistry of natural compounds*, 45, pp. 808-810.

102. Lin Y. L., Kuo Y. H., Shiao M. S., Chen C. C., & Ou J. C., 2000, Flavonoid glycosides from *Terminalia catappa* L., *J Chin Chem Soc*, 47(1), pp. 253-256.
103. J. Chopin G. D., K. R. Markham, A.G. Ramachandran and R. Gunasegaran, 1984, 2"-*p*-coumaroylvitexin 7-glucoside from *Mollugo oppositifolia*, *Phytochemistry*, 23(9), pp. 2106-2108.
104. Bui T. T., Nguyen K. P. T., Nguyen P. P. K., Le D. T., & Nguyen T. L. T., 2022, Anti-Inflammatory and α -Glucosidase Inhibitory Activities of Chemical Constituents from *Bruguiera parviflora* Leaves, *Journal of Chemistry*, 2022(1), pp. 3049994.
105. Fajriah S., Megawati M., & Darmawan A., 2016, Apigenin, an anticancer isolated from *Macaranga gigantifolia* leaves, *Journal of tropical life science*, 6(1), pp. 7-9.
106. Wan C., Yu Y., Zhou S., Tian S., & Cao S., 2011, Isolation and identification of phenolic compounds from *Gynura divaricata* leaves, *Pharmacognosy magazine*, 7(26), pp. 101.
107. Thanh L. N., Thu N. A., Oanh V. T. K., Hue V. T., Minh N. T., Minh N. P. N., Lien N. T. P., 2023, Chemical constituents and cytotoxicity of *Lepidotrigona ventralis* propolis, *Vietnam Journal of Chemistry*, 61(1), pp. 74-79.
108. Liu R., Li A., & Sun A., 2004, Preparative isolation and purification of hydroxyanthraquinones and cinnamic acid from the Chinese medicinal herb *Rheum officinale* Baill. by high-speed counter-current chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1052(1-2), pp. 217-221.
109. Prachayasittikul S., Suphamong S., Worachartcheewan A., Lawung R., Ruchirawat S., & Prachayasittikul V., 2009, Bioactive metabolites from *Spilanthes acmella* Murr, *Molecules*, 14(2), pp. 850-867.
110. Mohammed A., Chiruvella K. K., Rao Y. K., Geethangili M., Raghavan S. C., & Ghanta R. G., 2015, In vitro production of echioidinin, 7-*O*-methywogonin from callus cultures of *Andrographis lineata* and their cytotoxicity on cancer cells, *PLoS One*, 10(10), pp. e0141154.
111. Laoufi H., Benariba N., Adjdir S., & Djaziri R., 2017, In vitro α -amylase and α -glucosidase inhibitory activity of *Ononis angustissima* extracts, *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 7(2), pp. 191-198.
112. Jiménez-Suárez V., Nieto-Camacho A., Jiménez-Estrada M., & Alvarado Sanchez B., 2016, Anti-inflammatory, free radical scavenging and α -glucosidase inhibitory activities of *Hamelia patens* and its chemical constituents, *Pharmaceutical Biology*, 54(9), pp. 1822-1830.
113. Dej-Adisai S., Rais I. R., Wattanapiromsakul C., & Pitakbut T., 2021, Alpha-glucosidase inhibitory assay-screened isolation and molecular docking model from *Bauhinia pulla* active compounds, *Molecules*, 26(19), pp. 5970.
114. Liu Y., Zhu J., Yu J., Chen X., Zhang S., Cai Y., & Li L., 2021, A new functionality study of vanillin as the inhibitor for α -glucosidase and its inhibition kinetic mechanism, *Food Chemistry*, 353, pp. 129448.
115. Adisakwattana S., Sookkongwaree K., Roengsumran S., Petsom A., Ngamrojnvanich N., Chavasiri W., Yibchok-anun S., 2004, Structure–activity relationships of trans-cinnamic acid derivatives on α -glucosidase inhibition, *Bioorganic medicinal chemistry letters*, 14(11), pp. 2893-2896.

116. Zheng Y., Tian J., Yang W., Chen S., Liu D., Fang H., Ye X., 2020, Inhibition mechanism of ferulic acid against α -amylase and α -glucosidase, *Food Chemistry*, 317, pp. 126346.
117. Ni M., Hu X., Gong D., & Zhang G., 2020, Inhibitory mechanism of vitexin on α -glucosidase and its synergy with acarbose, *Food Hydrocoll*, 105, pp. 105824.
118. Jin D. X., He J. F., Zhang K. Q., Luo X. G., & Zhang T. C., 2021, α -Glucosidase inhibition action of major flavonoids identified from *Hypericum attenuatum* Choisy and their synergistic effects, *Chemistry & Biodiversity*, 18(10), pp. e2100244.
119. Zeng L., Zhang G., Lin S., & Gong D., 2016, Inhibitory mechanism of apigenin on α -glucosidase and synergy analysis of flavonoids, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 64(37), pp. 6939-6949.
120. Abou Baker D. H., 2022, An ethnopharmacological review on the therapeutical properties of flavonoids and their mechanisms of actions: A comprehensive review based on up to date knowledge, *Toxicology reports*, 9, pp. 445-469.
121. Kenjiro T., Yuji M., Kouta T., & Tomoko M., 2006, Inhibition of α -Glucosidase and α -Amylase by Flavonoids, *Journal of Nutritional Science Vitaminology*, 52(2), pp. 149-153.
122. Xiao J., Kai G., Yamamoto K., & Chen X., 2013, Advance in dietary polyphenols as α -glucosidases inhibitors: a review on structure-activity relationship aspect, *Critical reviews in food science nutrition*, 53(8), pp. 818-836.
123. Sadeghi M., & Zarei M. A., 2020, Molecular docking studies of some flavone analogues as α -Glucosidase inhibitors, *Journal of Medicinal Plants*, 19(75), pp. 55-64.
124. Pan J., Zhang Q., Zhang C., Yang W., Liu H., Lv Z., Jiao Z., 2022, Inhibition of dipeptidyl peptidase-4 by flavonoids: Structure–activity relationship, kinetics and interaction mechanism, *Frontiers in Nutrition*, 9, pp. 892426.
125. Choi C. W., Choi Y. H., Cha M.-R., Yoo D. S., Kim Y. S., Yon G. H., Ryu S. Y., 2010, Yeast α -glucosidase inhibition by isoflavones from plants of Leguminosae as an *in vitro* alternative to acarbose, *Journal of agricultural food chemistry*, 58(18), pp. 9988-9993.
126. Sarian M. N., Ahmed Q. U., Mat So'ad S. Z., Alhassan A. M., Murugesu S., Perumal V., Latip J., 2017, Antioxidant and antidiabetic effects of flavonoids: A structure-activity relationship based study, *Biomed Res. Int*, 2017.
127. Şöhretoğlu D., & Sari S., 2020, Flavonoids as alpha-glucosidase inhibitors: Mechanistic approaches merged with enzyme kinetics and molecular modelling, *Phytochemistry Reviews*, 19(5), pp. 1081-1092.
128. Chang Y.-C., Lee F.-W., Chen C.-S., Huang S.-T., Tsai S.-H., Huang S.-H., & Lin C.-M. J. F. R. B., 2007, Structure-activity relationship of C6-C3 phenylpropanoids on xanthine oxidase-inhibiting and free radical-scavenging activities, 43(11), pp. 1541-1551.
129. Farzaei M. H., Bahramsoltani R., Ghobadi A., Farzaei F., & Najafi F., 2017, Pharmacological activity of *Mentha longifolia* and its phytoconstituents, *J Tradit Chin Med*, 37(5), pp. 710-720.

130. Liu F., Deng C., Cao W., Zeng G., Deng X., & Zhou Y., 2017, Phytochemicals of *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth. aqueous extract: Their xanthine oxidase inhibitory activities, *Biomed. Pharmacother*, 89, pp. 544-548.
131. Watanabe M., & biochemistry, 2007, An anthocyanin compound in buckwheat sprouts and its contribution to antioxidant capacity, *Biosci. Biotechnol. Biochem*, 71(2), pp. 579-582.
132. Chiang H.-C., Lo Y.-J., & Lu F.-J., 1994, Xanthine oxidase inhibitors from the leaves of *Alsophila spinulosa* (Hook) Tryon, *Journal of Enzyme inhibition*, 8(1), pp. 61-71.
133. Wang Y., Zhang G., Pan J., & Gong D., 2015, Novel insights into the inhibitory mechanism of kaempferol on xanthine oxidase, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 63(2), pp. 526-534.
134. Lin S., Zhang G., Liao Y., Pan J., Gong D., & chemistry f., 2015, Dietary flavonoids as xanthine oxidase inhibitors: Structure–affinity and structure–activity relationships, *J. Agric. Food Chem*, 63(35), pp. 7784-7794.
135. Xue H., Xu M., Gong D., & Zhang G., 2023, Mechanism of flavonoids inhibiting xanthine oxidase and alleviating hyperuricemia from structure–activity relationship and animal experiments: A review, *Food Frontiers*, 4(4), pp. 1643-1665.
136. Lin C.-M., Chen C.-S., Chen C.-T., Liang Y.-C., & Lin J.-K., 2002, Molecular modeling of flavonoids that inhibits xanthine oxidase, *Biochemical Biophysical Research Communications*, 294(1), pp. 167-172.
137. Cos P., Ying L., Calomme M., Hu J. P., Cimanga K., Van Poel B., . . . Berghe D. V., 1998, Structure– activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers, *Journal of natural products*, 61(1), pp. 71-76.
138. Lou Y., Gao Q., Fan M., Waleed A.-A., Wang L., Li Y., & Qian H., 2023, Ferulic acid ameliorates hyperuricemia by regulating xanthine oxidase, *International Journal of Biological Macromolecules*, 253, pp. 126542.
139. Trujillo C., Rodriguez-Sanz A. A., & Rozas I., 2015, Aromatic amino acids-guanidinium complexes through cation- π interactions, *Molecules*, 20(5), pp. 9214-9228.
140. Liu L., Zhang L., Ren L., & Xie Y., 2020, Advances in structures required of polyphenols for xanthine oxidase inhibition, *Food Frontiers*, 1(2), pp. 152-167.
141. Gremese E., Bruno D., Varriano V., Perniola S., Petricca L., & Ferraccioli G., 2023, Serum albumin levels: a biomarker to be repurposed in different disease settings in clinical practice, *Journal of Clinical Medicine*, 12(18), pp. 6017.
142. Hasikova L., Pavlikova M., Hulejova H., Kozlik P., Kalikova K., Mahajan A., Zavada J., 2019, Serum uric acid increases in patients with systemic autoimmune rheumatic diseases after 3 months of treatment with TNF inhibitors, *Rheumatology International*, 39(10), pp. 1749-1757.
143. Sato H., Nagashima K., Ogura M., Sato Y., Tahara Y., Ogura K., Tatsuoka H., 2016, Src regulates insulin secretion and glucose metabolism by influencing subcellular localization of glucokinase in pancreatic β -cells, *Journal of diabetes investigation*, 7(2), pp. 171-178.

144. Zhang Z., Liu H., & Liu J., 2019, Akt activation: A potential strategy to ameliorate insulin resistance, *Diabetes research clinical practice*, 156, pp. 107092.
145. Bermudez V., Finol F., Parra N., Parra M., Pérez A., Penaranda L., Velasco M., 2010, PPAR- γ agonists and their role in type 2 diabetes mellitus management, *American journal of therapeutics*, 17(3), pp. 274-283.
146. Inngjerdingen K. T., Kiyohara H., Matsumoto T., Petersen D., Michaelsen T. E., Diallo D., Paulsen B. S., 2007, An immunomodulating pectic polymer from *Glinus oppositifolius*, *Phytochemistry*, 68(7), pp. 1046-1058.
147. Yamagishi S.-i., Maeda S., Matsui T., Ueda S., Fukami K., & Okuda S., 2012, Role of advanced glycation end products (AGEs) and oxidative stress in vascular complications in diabetes, *Biochimica et Biophysica Acta -General Subjects*, 1820(5), pp. 663-671.
148. Zhu D., Wei W., Zhang J., Zhao B., Li Q., & Jin P., 2024, Mechanism of damage of HIF-1 signaling in chronic diabetic foot ulcers and its related therapeutic perspectives, *Heliyon*.
149. Mashili F., Chibalin A. V., Krook A., & Zierath J. R., 2013, Constitutive STAT3 phosphorylation contributes to skeletal muscle insulin resistance in type 2 diabetes, *Diabetes*, 62(2), pp. 457-465.
150. Rehman K., Akash M. S. H., Liaqat A., Kamal S., Qadir M. I., & Rasul A., 2017, Role of interleukin-6 in development of insulin resistance and type 2 diabetes mellitus, *Critical Reviews™ in Eukaryotic Gene Expression*, 27(3), pp.
151. Coulouarn C., Lefebvre G., Derambure C., Lequerre T., Scotte M., Francois A., Salier J. P., 2004, Altered gene expression in acute systemic inflammation detected by complete coverage of the human liver transcriptome, *Hepatology*, 39(2), pp. 353-364.
152. Sliwinska A., Kasznicki J., Kosmalski M., Mikołajczyk M., Rogalska A., Przybyłowska K., Drzewoski J., 2017, Tumour protein 53 is linked with type 2 diabetes mellitus, *Indian Journal of Medical Research*, 146(2), pp. 237-243.
153. Ge M.-M., Zhou Y.-Q., Tian X.-B., Manyande A., Tian Y.-K., Ye D.-W., & Yang H., 2020, Src-family protein tyrosine kinases: A promising target for treating chronic pain, *Biomedicine Pharmacotherapy*, 125, pp. 110017.
154. Page T. H., Smolinska M., Gillespie J., Urbaniak A. M., & Foxwell B. M., 2009, Tyrosine kinases and inflammatory signalling, *Current molecular medicine*, 9(1), pp. 69-85.
155. Zhang Z., Wang P., Xiong Q., Xu S., Kang D., He Z., . . . Jian G., 2024, Advancements in the study of IL-6 and its receptors in the pathogenesis of gout, *Cytokine*, 182, pp. 156705.
156. Nyce J. W., 2020, A lex naturalis delineates components of a human-specific, adrenal androgen-dependent, p53-mediated ‘kill switch’ tumor suppression mechanism, *Endocrine-related cancer*, 27(2), pp. R51-R65.
157. Ancrile B., Lim K.-H., Counter C. M., & development, 2007, Oncogenic Ras-induced secretion of IL6 is required for tumorigenesis, *Genes*, 21(14), pp. 1714-1719.
158. Krishnan E., 2010, Inflammation, oxidative stress and lipids: the risk triad for atherosclerosis in gout, *Rheumatology International*, 49(7), pp. 1229-1238.