

# Khảo sát vi học và phân lập hợp chất từ cao có hoạt tính chống oxi hóa của lá cây Nho rừng *Vitis heyneana* Roem. & Schult. Vitaceae

Nguyễn Hoàng Khánh Linh, Trần Thị Kim Ngân, Trần Việt Tân, Nguyễn Thanh Tú

Khoa Dược, Đại học Nguyễn Tất Thành  
nhklinh@nttu.edu.vn

## Tóm tắt

Nho rừng (*Vitis heyneana* Roem. & Schult. Vitaceae) đã được sử dụng trong dân gian như một vị thuốc: lá Nho rừng dùng trị bệnh lỵ, mụn nhọt sưng lở, rết dùng trị viêm phế quản; vỏ rễ được dùng trị kinh nguyệt không đều và bạch đới; toàn cây dùng trị bệnh sởi và một số tác dụng khác. Các đặc điểm thực vật (hình thái, vi học) đã được nghiên cứu bằng phương pháp vi phẫu nhằm góp phần vào tiêu chuẩn nhận diện loài. Sau khi tiến hành sơ bộ hóa thực vật, đã xác định được một số nhóm hợp chất trong cây bao gồm: stilbenoid, megastigman glycosid, triterpenoid cũng như thông qua các kỹ thuật sắc ký và tinh khiết hóa bằng kỹ thuật kết tinh lần hai thu được chất tinh khiết  $\beta$ -sitosterol -3-O-glucosid (Daucosterol) ở phân đoạn ethyl acetat.

Nhận 17/06/2022  
Được duyệt 27/10/2022  
Công bố 02/11/2022  
Từ khóa  
*Vitis heyneana*, Nho rừng, chống oxi hóa, DPPH,  $\beta$ -Sitosterol-3-O-glucosid, Daucosterol, kết tinh lần hai

© 2022 Journal of Science and Technology - NTTU

## 1 Đặt vấn đề

Nho rừng có tên khoa học là *Vitis heyneana* Roem. & Schult. Vitaceae, từ lâu được dùng để chữa bệnh ở Việt Nam cũng như nhiều quốc gia trên thế giới. Tại Việt Nam, Nho rừng mọc hoang trên đá vùng núi ở Lạng Sơn, Vĩnh Phúc, Ninh Bình và Bình Thuận, thường mọc trong rừng, cây bụi, sườn đồi, thung lũng [1].

Thành phần hóa học của Nho rừng: piceid, 2-r-viniferin, betulifol A, vitisinol C, (-) - trans- $\epsilon$ -viniferin,  $\alpha$ -viniferin, shoreaketon, amurensin B, vitisinol B và cis-vitisin B, resveratrol, (3S,5R,6R,9R)-megastigman-3, 5, 6, 9-tetrol 9-O- $\beta$ -D-glucopyranosid và 4 megastigman glucosid là actinidioionsid, (6S,9R)-roseosid, icarisid B5 và icarisid B1, 25,26,27-trinor-3 $\beta$ , 24-dihydroxycycloartan và cycloartan triterpenoid là cycloart-23-en-3 $\beta$ , 25-diol. Trong đó, resveratrol có tác dụng kháng viêm bằng cách ức chế sự biểu hiện COX-2 do LPS gây ra trong tế bào Raw 264,7 và tác dụng chống oxi hóa [2,3].

Trong dân gian, lá Nho rừng dùng trị bệnh lỵ, mụn nhọt sưng lở; rễ dùng trị viêm phế quản; vỏ rễ được dùng trị

kinh nguyệt không đều và bạch đới; toàn cây dùng trị bệnh sởi và một số tác dụng khác [4].

Hiện nay, các nghiên cứu về thành phần hóa học của loài *V. heyneana* tại Việt Nam còn rất ít. Dân gian hay sử dụng phần dưới mặt đất của cây để làm thuốc, vì vậy trong nghiên cứu này chỉ khảo sát phần trên mặt đất để góp phần phong phú hơn về loài Nho rừng.

“Khảo sát vi học và phân lập hợp chất từ cao có hoạt tính chống oxi hóa của lá cây Nho rừng (*Vitis heyneana* Roem. & Schult. Vitaceae)” được thực hiện với các mục tiêu chính như sau:

- Khảo sát vi học và sơ bộ thành phần hóa học.
- Chiết xuất, phân lập và thử hoạt tính chống oxi hóa.

## 2 Nguyên vật liệu và phương pháp nghiên cứu

### 2.1 Nguyên liệu

Lá cây Nho rừng (*Vitis heyneana* Roem. & Schult.) thu hái tại núi Tam Đảo, Vĩnh Phúc vào tháng 8 năm 2020. Nguyên liệu được phơi khô, xay nhỏ đến độ mịn cần thiết. Chất lượng được đánh giá qua các chỉ tiêu: hình thái, độ ẩm và độ tro.

Hóa chất, dung môi: methanol, cloroform, nước cất, ethyl acetat dùng cho phân tích, silica gel GF254 bản nhôm tráng sẵn (Merck) dùng trong sắc kí lớp mỏng, silica gel, cỡ hạt (40-63)  $\mu\text{m}$  của Merck dùng cho sắc kí cột.

Trang thiết bị: cột sắc kí các loại, máy cô quay Rotavapor R-200 (Buchi), đèn UV 2 bước sóng (Vilber Lourmat), bồn siêu âm Sonorex RK-1208H (Bandelin).

## 2.2 Phương pháp nghiên cứu

### 2.2.1 Khảo sát vi học

Dùng phương pháp nhuộm vi phẫu thực vật, quan sát dưới kính hiển vi.

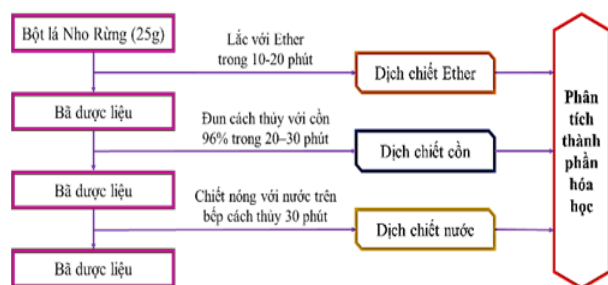
Mẫu khảo sát: lá tươi, không quá già hoặc quá non.

Cắt vi phẫu: dùng lưỡi lam cắt theo phẫu thức ngang (lát cắt nằm trong mặt phẳng vuông góc với trục mẫu cắt), lấy đoạn 1/3 gân giữa kể từ nơi tiếp giáp với cuống và có một phần phiến lá ở hai bên sau đó cắt thành các lát mỏng.

Tiến hành nhuộm mẫu theo tuần tự như sau:

- Ngâm lát cắt vào dung dịch javel (15-30) phút cho đến khi lát cắt trở nên trắng, rửa bằng nước nhiều lần.
- Ngâm lát cắt vào dung dịch acid acetic (1-3) % trong 2 phút để tẩy javel còn sót lại, rửa lại bằng nước cất.
- Ngâm tiếp lát cắt trong phẩm nhuộm kép (15-30) phút. Rửa bằng nước cất cho đến khi dịch rửa hết màu.
- Ngâm lát cắt vi phẫu đã nhuộm trong nước.
- Lên lame và quan sát: quan sát vi phẫu dưới kính hiển vi quang học (Primo star Zeiss, Olympus CX22 led) trong môi trường nước, độ phóng đại 10X và 40X.

### 2.2.2 Khảo sát thành phần hóa học



**Hình 1** Sơ đồ chuẩn bị các dịch chiết sơ bộ thành phần hóa học lá Nho rừng

**Bảng 1** Sơ bộ các hợp chất hóa học

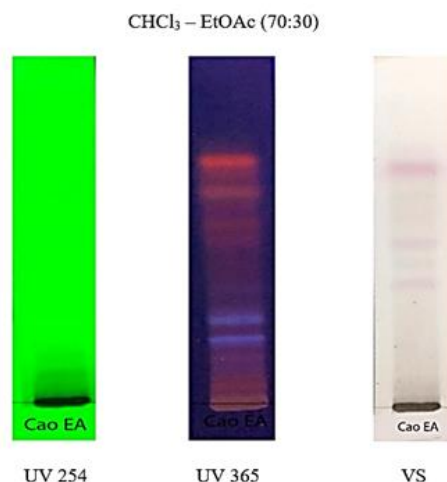
| Nhóm hợp chất      | Thuốc thử/ Cách thực hiện |
|--------------------|---------------------------|
| Chất béo           | Nhỏ dung dịch lên giấy    |
| Carotenoid         | $\text{H}_2\text{SO}_4$   |
| Tinh dầu           | Bốc hơi tới cạn           |
| Triterpenoid tự do | Liebermann-Burchard       |
| Alkaloid           | Tt chung alkaloid         |
| Coumarin           | Phát quang trong kiềm     |

|               |                           |
|---------------|---------------------------|
| Antraglycosid | KOH 10 %                  |
| Flavonoid     | Mg/HCl đậm đặc            |
| Tanin         | Dung dịch $\text{FeCl}_3$ |
|               | Dung dịch gelatin muối    |
| Saponin       | Lắc mạnh dung dịch nước   |
| Acid hữu cơ   | $\text{Na}_2\text{CO}_3$  |

### 2.2.3 Chiết xuất, phân lập

Phân lập chất tinh khiết theo định hướng chống oxi hóa

Tiến hành khảo sát nhiều hệ dung môi khác nhau bằng sắc kí lớp mỏng, hệ dung môi  $\text{CHCl}_3 - \text{EtOAc}$  (70:30) được chọn làm hệ dung môi phân tích định tính cho các thành phần hóa học có trong phân đoạn cao EtOAc có  $R_f = 0,8$  (hệ tách tốt, không kéo vệt).



**Hình 2** Sắc kí đồ phân đoạn EtOAc

Dùng phương pháp sắc kí cột nhanh cùng với hệ dung môi đã khảo sát để tách phân đoạn etyl acetat thành các phân đoạn nhỏ hơn.

- Cột sắc kí: cột thủy tinh, có lưới xếp G-3, kích thước cột (8  $\times$  50) cm.
- Pha tĩnh: 72 g silica gel hạt trung bình (40-63)  $\mu\text{m}$ .
- Pha động: hệ dung môi  $\text{CHCl}_3 - \text{EtOAc}$
- Khối lượng mẫu: 9 g cao EtOAc đã được hoạt hóa với silica gel.
- Thể tích hứng: 500 mL.

Kiểm tra và gộp các phân đoạn: các phân đoạn được kiểm tra bằng SKLM khai triển với hệ dung môi đã được chọn  $\text{CHCl}_3 - \text{MeOH}$  (80:20), phát hiện bằng UV 254 nm, UV 365 nm và thuốc thử VS. Gộp chung các phân đoạn có sắc kí đồ tương tự, cô thu hồi dung môi và cân xác định khối lượng cần khô.

Tinh khiết hóa

- Dùng dung môi thích hợp để kết tinh lại.
- Dùng các phương pháp loại tạp thích hợp: than hoạt tính, lọc rửa, sắc kí cột để làm sạch rồi kết tinh lại.

Xác định cấu trúc các chất phân lập được

•Kiểm tra độ tinh khiết của chất phân lập được bằng sắc kí lớp mỏng với 3 hệ dung môi có độ phân cực khác nhau:

✓CHCl<sub>3</sub> – MeOH (60:40)

✓EtOAc – MeOH – H<sub>2</sub>O (100:17:13)

✓CHCl<sub>3</sub> – MeOH (90:10)

•Xác định các hằng số vật lí, phổ UV.

•Dựa trên các dữ liệu phổ IR, MS và các phổ NMR 1 chiều, 2 chiều (<sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR, DEPT, HSQC, HMBC, COSY). Phổ NMR được thực hiện tại Trung tâm Khoa học Tự nhiên và Công nghệ Quốc gia, độ dịch chuyển hóa học (δ) được tính theo thang ppm. Dung môi đo là MeOD, CDCl<sub>3</sub>, DMSO.

#### 2.2.4 Thử tác dụng chống oxi hóa trên mô hình DPPH *Nguyên tắc của phương pháp DPPH*

Các chất nghiên cứu có tác dụng chống oxi hóa thể hiện qua cơ chế đánh giá bất gốc tự do, làm giảm màu của DPPH, sự giảm màu đó sẽ được xác định bằng cách đo quang ở bước sóng 517 nm [5].

##### *Pha dung dịch thử*

Mẫu là các cao chiết được pha trong methanol, pha loãng trong bình định mức 10 mL. Nồng độ 1 mg/mL. Nếu cao chiết ít tan thì pha trong DMSO để trợ tan.

• Chuẩn bị: pha thuốc thử DPPH nồng độ (0,2-1) mM MeOH, pha xong dùng ngay, đựng trong lọ thủy tinh màu.

Pha dung dịch thử và dung dịch đối chiếu Trolox ở các nồng độ: (1,25; 2,5; 5; 10 và 20) µg/mL trong methanol để xác định IC<sub>50</sub> (nồng độ ức chế 50 % đối tượng thử) và so sánh kết quả.

• Mẫu đo: thực hiện phản ứng trong ống nghiệm theo Bảng 2. Các phản ứng phải được thực hiện ở chỗ tối, sau 30 phút đến khi ổn định thì đo quang ở bước sóng 517 nm.

**Bảng 2** Cách pha mẫu đo của phương pháp DPPH

| Ống   | Dung dịch thử (mL) | Dung dịch MeOH (mL) | Dung dịch DPPH (mL) |
|-------|--------------------|---------------------|---------------------|
| Trắng | 0                  | 4,5                 | 0                   |
| Chứng | 0                  | 0,5                 | 4                   |
| Thử   | 0,5                | 0                   | 4                   |

•Tính toán kết quả: hoạt tính chống oxi hóa (HTCO) của dung dịch thử được tính theo công thức:

$$HTCO (\%) = [(Abs_{chứng} - Abs_{thử}) / (Abs_{chứng} - Abs_{trắng})] \times 100.$$

Abs: độ hấp thu ở bước sóng 517 nm.

Các số kết quả thử nghiệm được biểu thị bằng trị số của 3 lần đo khác nhau.

•Cách tính giá trị IC<sub>50</sub>: pha một giai mẫu có ít nhất 5 nồng độ (1 000, 500, 100, 50 và 10) µg/mL, trong đó phải bao hàm nồng độ cho HTCO 50 %, vẽ đồ thị biểu diễn sự phụ thuộc của HTCO (%) theo nồng độ chất khảo sát bằng phần mềm Excel. Từ đồ thị, nội suy ra giá trị nồng độ có HTCO 50 % tức là IC<sub>50</sub>, từ phương trình đường cong có dạng  $y = ax^2$ , thế  $y = 50$  vào để suy ra IC<sub>50</sub>. IC<sub>50</sub> cũng có thể được tính bằng phần mềm chuyên dụng Minitab hoặc Graphpat Prism.

### 3 Kết quả và bàn luận

#### 3.1 Kiểm nghiệm vi học

Vi phẫu lá Nho rừng

##### *Mô tả*

Gân giữa: mặt trên hơi lõm, mặt dưới lồi lên hình cung. Từ dưới lên gồm:

• Biểu bì dưới là 1 lớp tế bào sống, hình tròn, kích thước không đều nhau, xếp cạnh nhau, được phủ 1 lớp cutin mỏng, đôi khi có lông che chở đơn bào.

• Mô dày dưới phân bố toàn bộ mặt của gân dưới khoảng 3 hàng tế bào, vách dày lên đều đặn xung quanh tế bào.

• Mô mềm đạo gồm các tế bào hình tròn, kích thước lớn, xếp lộn xộn để hở ra khoảng gian bào.

• Mô dẫn tạo thành bó, bó lớn nhất nằm ở dưới biểu bì trên, gồm libe nằm trên gỗ nằm dưới. Libe 1 gồm những tế bào hình đa giác xếp lộn xộn. Gỗ 1 là những tế bào đa giác, vách hóa gỗ, xếp thành từng dãy, mạch nhỏ ở trên, mạch lớn ở dưới.

• Mô cứng gồm (2-3) hàng tế bào, hình đa giác, vách dày hóa gỗ, nằm trên libe.

• Mô dày trên tập trung thành đám, khoảng 8 hàng tế bào, vách dày lên đều đặn xung quanh tế bào.

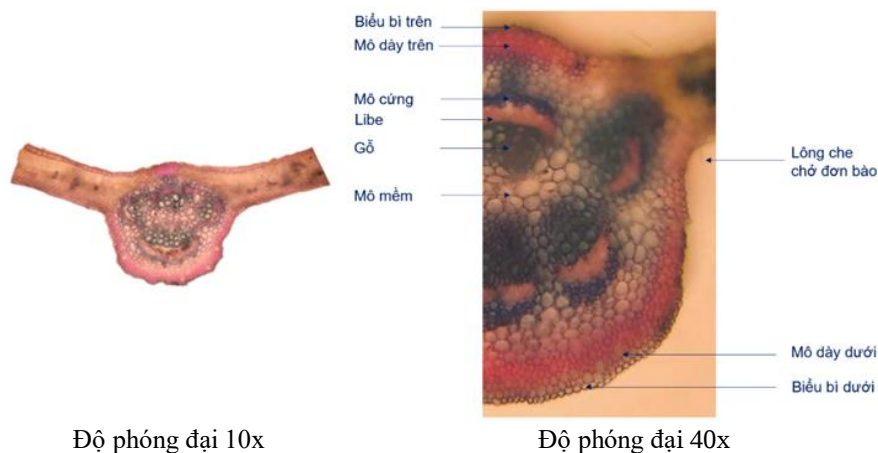
• Biểu bì trên gồm 1 lớp tế bào hình tròn, kích thước, không đều xếp sát nhau.

Phiến lá: cấu tạo bởi 1 hàng biểu bì trên và biểu bì dưới.

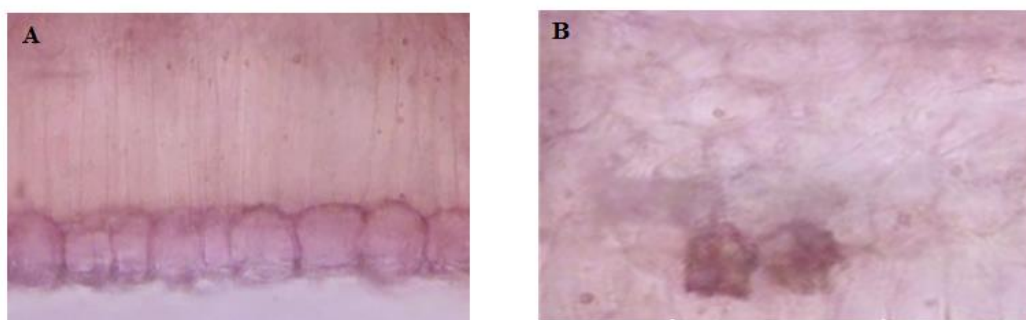
• Tế bào biểu bì trên to, hình đa giác gần tròn xếp khít nhau. Biểu bì dưới tế bào nhỏ hơn, hình đa giác dẹt.

• Mô mềm giậu gồm 1 hàng tế bào hình chữ nhật, dài, hẹp, xếp sát nhau và vuông góc với lớp biểu bì.

• Mô mềm khuyết gồm những tế bào có kích thước không đều, hình đa giác, để hở những khoảng gian bào lớn, rỗng, chứa đầy khí, trong đó rải rác có các tinh thể calci oxalat hình cầu gai.



**Hình 3** Cấu tạo vi phẫu lá cây Nho rừng



**Hình 4** Các thành phần trong vi phẫu lá Nho rừng (độ phóng đại 40X)

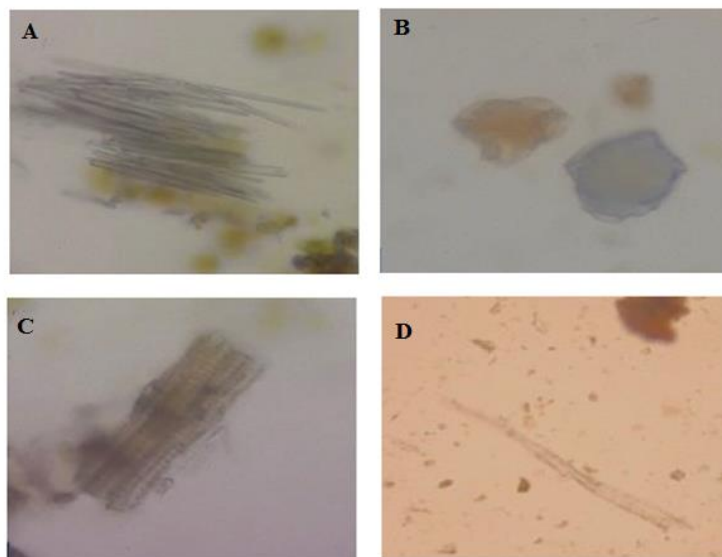
A. Biểu bì trên và mô mềm giàu B. Tinh thể calci oxalat hình cầu gai và mô mềm khuyết

### 3.2 Soi bột dược liệu:

Mô tả bột lá Nho rừng

Bột lá màu xám, mịn, không mùi, không vị

- Thành phần gồm: tinh thể calci oxalat hình kim và hình cầu gai, mạch điểm, lông che chở đơn bào.



**Hình 5** Các thành phần trong bột lá Nho rừng. A. Tinh thể calci oxalat hình kim B. Tinh thể calci oxalat hình cầu gai C. Mạch điểm D. Lông che chở đơn bào

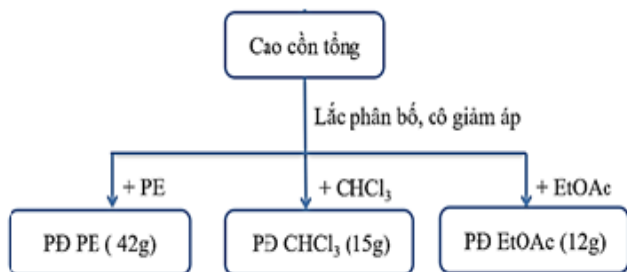
### 3.3 Kết quả sơ bộ hóa thành phần hóa học thực vật

**Bảng 3** Kết quả sơ bộ thành phần hóa học của Nho rừng

| Nhóm hợp chất      | Kết quả định tính trên các dịch chiết           |                |                 | Kết quả                                |
|--------------------|-------------------------------------------------|----------------|-----------------|----------------------------------------|
|                    | Dịch chiết ether                                | Dịch chiết cồn | Dịch chiết nước |                                        |
| Chất béo           | —                                               |                |                 | —                                      |
| Carotenoid         | —                                               |                |                 | —                                      |
| Tinh dầu           | +                                               |                |                 | +                                      |
| Triterpenoid tự do | +                                               |                |                 | +                                      |
| Alkaloid           | —                                               | —              | —               | —                                      |
| Coumarin           | —                                               | —              | —               | —                                      |
| Antraglycosid      | —                                               | —              | —               | —                                      |
| Flavonoid          | —                                               | —              | —               | —                                      |
| Tanin              |                                                 | +              | +               | +                                      |
| Saponin            |                                                 | +              | +               | +                                      |
| Acid hữu cơ        |                                                 | —              | —               | —                                      |
|                    | Không có mặt của nhóm hợp chất trong dịch chiết |                |                 | (+) Có<br>(-) Không có<br>(±) Nghi ngờ |

Kết quả phân tích sơ bộ thành phần hóa học cho thấy được liệu chứa: tinh dầu, triterpenoid tự do, saponin, tanin (polyphenol).

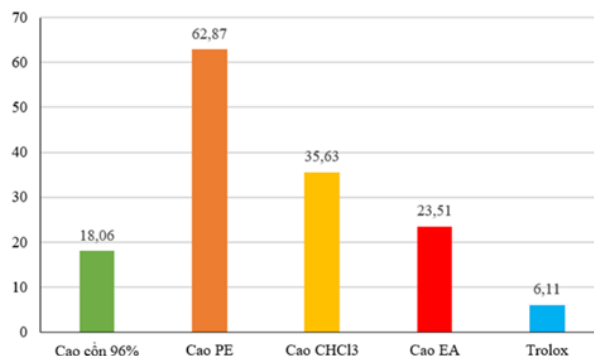
### 3.4 Chiết xuất



**Hình 6** Kết quả lắc phân bố cao cồn tổng

Dược liệu được chiết bằng phương pháp ngâm kiệt ở nhiệt độ phòng với cồn 96 %. Thu hồi dung môi ở áp suất giảm để thu cao lỏng. Cao cồn toàn phần được lắc phân bố với ethyl acetat (EtOAc). Cát thu hồi dung môi dưới giảm áp thu hồi dung môi thu được cao EtOAc.

**3.5 Kết quả khảo sát hoạt tính chống oxi hóa của các cao**  
Sau khi sử dụng phương pháp DPPH để tiến hành khảo sát hoạt tính chống oxi hóa của các cao phân đoạn. Kết quả được nêu như Hình 7



**Hình 7** Giá trị IC<sub>50</sub> về hoạt tính dập tắt gốc tự do DPPH các cao phân đoạn

Qua thử nghiệm, phân đoạn EtOAc có IC<sub>50</sub> thấp (23,51 µg/mL) nên hoạt tính dập tắt gốc tự do DPPH cao.

Kết luận: qua thử nghiệm trên, phân đoạn EtOAc được lựa chọn làm đối tượng nghiên cứu tiếp theo hướng phân lập các hoạt chất có hoạt tính chống oxi hóa.

### 3.6 Phân lập và tính chế

#### 3.6.1 Tiến hành sắc kí cột nhanh với cao EtOAc

Kết quả trình bày trong Bảng 4

**Bảng 4** Các phân đoạn từ sắc kí cột nhanh

| Phân đoạn | Tỉ lệ dung môi (CHCl <sub>3</sub> -EtOAc) | Bình số | Khối lượng (g) |
|-----------|-------------------------------------------|---------|----------------|
| 1         | 70:30                                     | 1-3     | 0,38           |
| 2         | 70:30                                     | 4-10    | 0,75           |
| 3         | 60:40                                     | 11-20   | 0,92           |

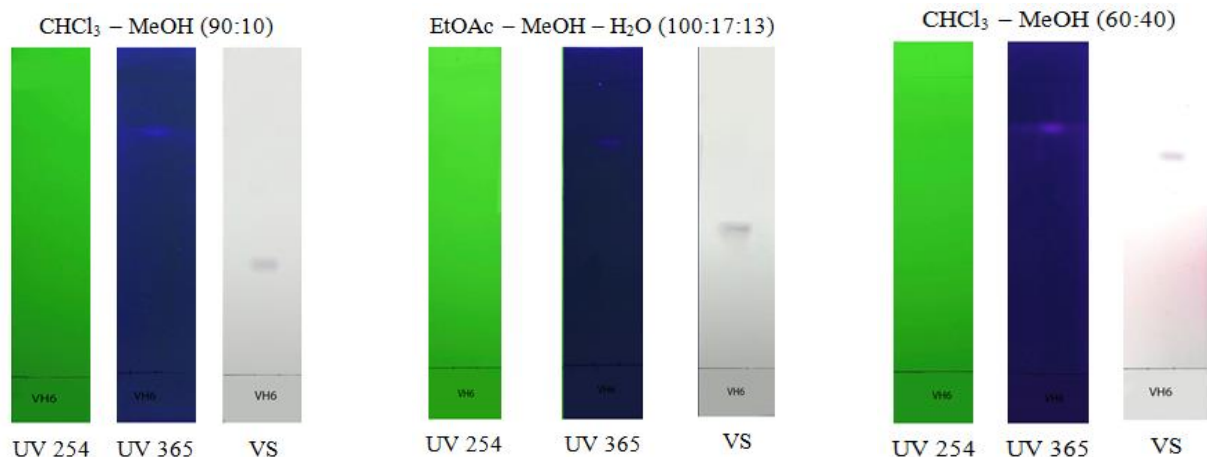
|   |       |       |      |
|---|-------|-------|------|
| 4 | 50:50 | 21-33 | 2,28 |
| 5 | 40:60 | 34-39 | 0,56 |
| 6 | 30:70 | 40-69 | 2,39 |
| 7 | 30:70 | 70-81 | 1,12 |
| 8 | 20:80 | 82-87 | 0,60 |

Phân đoạn 4 được hòa trong một lượng tối thiểu methanol, lọc, để lạnh từ (2-8) °C trong 24 giờ cho kết

thịnh. Lọc và rửa bằng MeOH lạnh, thu được tủa vô định hình màu trắng, đặt tên là VH-6 (28 mg) được kiểm tra trên sắc kí lớp mỏng (SKLM) với 3 hệ dung môi khác nhau trước khi tiến hành xác định cấu trúc.

### 3.6.2 Kiểm tra độ tinh khiết của VH-6 bằng SKLM

Kiểm tra độ tinh khiết VH-6 bằng SKLM với 3 hệ dung môi đã khảo sát. Phát hiện vết bằng UV 254 nm, 365 nm và thuốc thử vanilin sulfuric (VS).

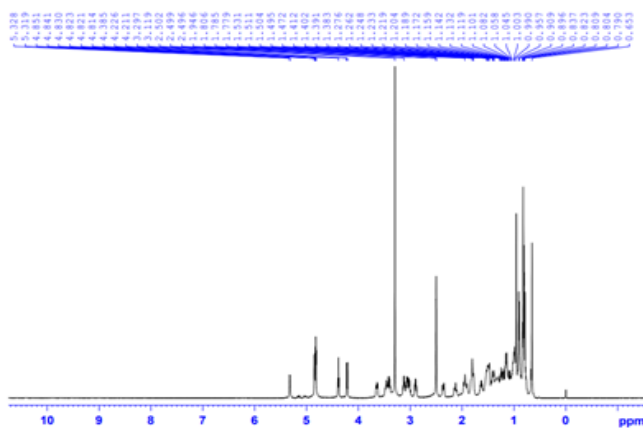


**Hình 7** Sắc kí đồ tinh khiết của VH-6

VH-6 không hấp thụ UV 254 nm, phát quang dưới UV 365 nm, hiện màu tím khi nhúng thuốc thử vanilin sulfuric (VS). Vết của VH-6 trên 3 bản mỏng gọn và không xuất hiện vết nào khác, sơ bộ kết luận VH-6 tinh khiết trên SKLM.

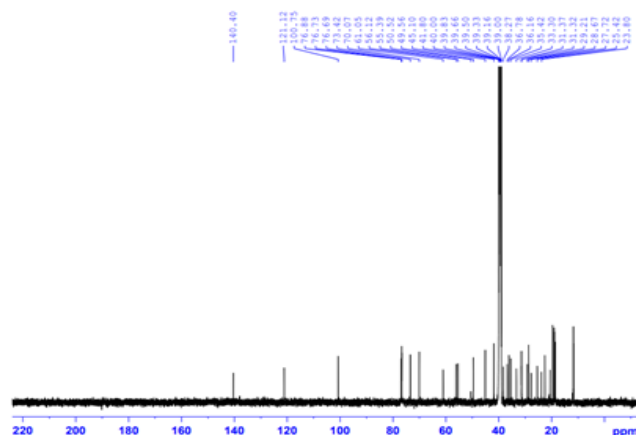
### 3.6.3 Xác định cấu trúc VH-6

VH-6 được phân lập từ cao EtOAc của lá cây Nho rừng, ở dạng tinh thể màu trắng. SKLM cho thấy VH-6 không hấp thụ UV 254 nm, phát quang dưới UV 365 nm, hiện màu tím khi nhúng thuốc thử VS.



**Hình 8** Phổ  $^1\text{H}$ -NMR của hợp chất VH-6 (DMSO – d<sub>6</sub>)

Trên phổ  $^{13}\text{C}$ -NMR xuất hiện 35 tín hiệu cacbon. Trong đó, có 29 tín hiệu của khung aglycon stigmastan. Đồng thời, trong vùng từ (60-80) ppm có 5 tín hiệu cùng với 1 tín hiệu có  $\delta$ c 100,8 gợi ý cấu trúc glycosid với 1 đường hexose.



**Hình 9** Phổ  $^{13}\text{C}$ -NMR của hợp chất của VH-6 (DMSO – d<sub>6</sub>)

Tín hiệu trên phổ  $^{13}\text{C}$ -NMR của khung aglycon gồm:

- 6 nhóm  $\text{CH}_3$ – (11,7; 19,6; 18,9; 18,6; 19,0 và 11,6)
- 11 nhóm  $-\text{CH}_2-$  (36,8; 29,2; 38,3; 31,3; 20,5; 39; 23,8; 27,7; 33,3; 25,4 và 22,6)

• 9 nhóm =CH– (76,9; 121,1; 31,4; 49,6; 56,1; 55,4; 35,4; 45,1 và 28,7)

• 3 nhóm CIV (140,4; 36,2 và 41,8)

Tín hiệu 3-H ( $\delta$ H 3.47) ở vùng trường thấp cũng như tín hiệu cacbon tương ứng cho thấy sự xuất hiện nhóm thế –OR ở C3. Cùng với 2 tín hiệu carbon ở vùng olefin ( $\delta$ c 140,4; 121,1) gợi ý cấu trúc nối đôi trong công thức. Trên phổ  $^{13}\text{C}$ -NMR xuất hiện 35 tín hiệu cacbon. Trong đó, có 29 tín hiệu của khung aglycon stigmastan. Đồng thời, trong vùng từ (60-80) ppm có 5 tín hiệu cùng với 1 tín hiệu có  $\delta$ c 100,8 gợi ý cấu trúc glycosid với 1 đường hexose.

Các tín hiệu trên phổ  $^{13}\text{C}$ -NMR của khung aglycon bao gồm:

• 6 nhóm CH<sub>3</sub>– (11,7; 19,6; 18,9; 18,6; 19,0 và 11,6)

• 11 nhóm –CH<sub>2</sub>– (36,8; 29,2; 38,3; 31,3; 20,5; 39; 23,8; 27,7; 33,3; 25,4 và 22,6)

• 9 nhóm =CH– (76,9; 121,1; 31,4; 49,6; 56,1; 55,4; 35,4; 45,1 và 28,7)

• 3 nhóm CIV (140,4; 36,2 và 41,8)

Tín hiệu 3-H ( $\delta$ H 3.47) ở vùng trường thấp cũng như tín hiệu cacbon tương ứng cho thấy sự xuất hiện nhóm thế –OR ở C3. Cùng với 2 tín hiệu carbon ở vùng olefin ( $\delta$ c 140,4; 121,1) gợi ý cấu trúc nối đôi trong công thức.

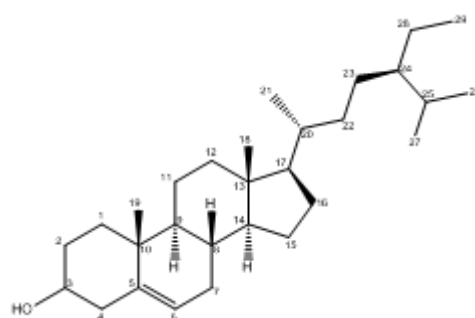
**Bảng 3** Phổ NMR của hợp chất VH-6

| C  | Dữ liệu phổ NMR của VH-6 |                                      |                                             |                                           |                                                 |
|----|--------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------------|
|    | DEPT                     | $^{13}\text{C}$<br>( $\delta$ c ppm) | $^1\text{H}$ + HSQC<br>( $\delta$ h ppm, J) | HMBC<br>(H $\rightarrow$ C <sub>n</sub> ) | COSY<br>( $^1\text{H} \rightarrow ^1\text{H}$ ) |
| 1  | –CH <sub>2</sub> –       | 36,8                                 | 1,04 m;<br>1,79 m                           | –                                         | H-1 $\alpha$ ,<br>H-1 $\beta$                   |
| 2  | –CH <sub>2</sub> –       | 29,2                                 | 1,50 m;<br>1,81 m                           | 3                                         | H-2 $\alpha$ ,<br>H-2 $\beta$                   |
| 3  | =CH–                     | 76,9                                 | 3,47 m                                      | –                                         | –                                               |
| 4  | –CH <sub>2</sub> –       | 38,3                                 | 2,13 m;<br>2,36 m                           | 3, 5, 6                                   | H-4 $\alpha$ ,<br>H-4 $\beta$                   |
| 5  | CIV                      | 140,4                                | –                                           | –                                         | –                                               |
| 6  | =CH–                     | 121,1                                | 5,32 d 5(Hz)                                | 7, 10                                     | H-7                                             |
| 7  | –CH <sub>2</sub> –       | 31,3                                 | 1,44 m;<br>1,95 m                           | –                                         | H-6                                             |
| 8  | =CH–                     | 31,4                                 | 1,40 m                                      | –                                         | –                                               |
| 9  | =CH–                     | 49,6                                 | 0,89 m                                      | –                                         | –                                               |
| 10 | CIV                      | 36,2                                 | –                                           | –                                         | –                                               |
| 11 | –CH <sub>2</sub> –       | 20,5                                 | 1,41 m;<br>1,51 m                           | –                                         | H-12                                            |
| 12 | –CH <sub>2</sub> –       | 39,0                                 | 1,97 m;<br>1,14 m                           | 9, 14                                     | H-11                                            |
| 13 | CIV                      | 41,8                                 | –                                           | –                                         | –                                               |
| 14 | =CH–                     | 56,1                                 | 0,99 m                                      | –                                         | H-14, H-15                                      |
| 15 | –CH <sub>2</sub> –       | 23,8                                 | 1,05 m;                                     | –                                         | –                                               |

|    |                    |       |                   |             |                                           |
|----|--------------------|-------|-------------------|-------------|-------------------------------------------|
|    |                    |       | 1,53 m            |             |                                           |
| 16 | –CH <sub>2</sub> – | 27,7  | 1,21 m;<br>1,78 m | –           | H-16 $\alpha$ ,<br>H-16 $\beta$           |
| 17 | =CH–               | 55,4  | 1,11 m            | 13, 21      | –                                         |
| 18 | CH <sub>3</sub> –  | 11,6  | 0,65 s            | 12, 13, 14  | –                                         |
| 19 | CH <sub>3</sub> –  | 19,0  | 0,96 s            | 1, 5, 9, 10 | –                                         |
| 20 | =CH–               | 35,4  | 1,38 m            | –           | –                                         |
| 21 | CH <sub>3</sub> –  | 18,6  | 0,90 d<br>6,5(Hz) | 17, 20, 22  | –                                         |
| 22 | –CH <sub>2</sub> – | 33,3  | 1,27 m;<br>1,00 m | 23, 24      | H-22 $\alpha$ ,<br>H-22 $\beta$           |
| 23 | –CH <sub>2</sub> – | 25,4  | 1,17 m            | 24, 25      | –                                         |
| 24 | =CH–               | 45,1  | 0,91 m            | –           | –                                         |
| 25 | =CH–               | 28,7  | 1,63 m            | 24, 26      | –                                         |
| 26 | CH <sub>3</sub> –  | 18,9  | 0,80 d 7(Hz)      | 24, 25      | –                                         |
| 27 | CH <sub>3</sub> –  | 19,6  | 0,81 d 7(Hz)      | 25          | –                                         |
| 28 | –CH <sub>2</sub> – | 22,6  | 1,19 m;<br>1,24 m | 23, 24, 25  | –                                         |
| 29 | CH <sub>3</sub> –  | 11,7  | 0,82 m            | 24, 28      | –                                         |
| 1' | =CH–               | 100,8 | 4,22 d<br>7,5(Hz) | 3           | H-2'                                      |
| 2' | =CH–               | 73,4  | 2,98 m            | 1', 3'      | H-1'                                      |
| 3' | =CH–               | 76,7  | 3,12 m            | 2'          | –                                         |
| 4' | =CH–               | 70,1  | 3,02 m            | 5'          | –                                         |
| 5' | =CH–               | 76,7  | 3,06 m            | 4'          | H-6'                                      |
| 6' | –CH <sub>2</sub> – | 61,1  | 3,65 m;<br>3,41 m | 5'          | H-6' $\alpha$ ,<br>H-6' $\beta$ ,<br>H-5' |

Nhận xét:

Các tương tác trên phổ HMBC và COSY, cho thấy phần aglycon của VH-6 là một hợp chất steroid khung stigmastan với 1 nhóm thế OR tại vị trí C-3, và 1 nối đôi tại vị trí C5=C6. Kết hợp với dữ liệu phổ đã công bố trước đây có thể khẳng định khung aglycon chính là  $\beta$ -sitosterol có cấu trúc như Hình 11 [6].



**Hình 11** Công thức cấu tạo VH-6 ( $\beta$ -sitosterol)

#### 4 Kết luận

Kết quả nghiên cứu cho thấy tiềm năng chống oxy hóa của cao EtOAc là khả quan. Từ phân đoạn EtOAc, thông qua sắc ký cột nhanh đã phân tách thành 8 phân đoạn đơn giản. Phân đoạn 4 đã được kết tinh trong MeOH lạnh thu được tinh thể có màu trắng và được định danh 28mg VH-6 ( $\beta$ -Sitosterol-3-O-glucosid hay Daucosterol).

Cần phân lập thêm các hợp chất có trong cao EtOAc, CHCl<sub>3</sub> từ lá cây Nho rừng. Thử tác dụng dược lý kháng viêm trên các cao phân đoạn và các chất phân lập được.

#### Lời cảm ơn

Nghiên cứu được tài trợ bởi Quỹ Phát triển Khoa học và Công nghệ – Đại học Nguyễn Tất Thành, mã đề tài 2019.01.66/HĐ-KHCN.

#### Tài liệu tham khảo

1. Bộ môn Dược liệu (2012), *Phương pháp nghiên cứu dược liệu*, Trường Đại học Y Dược Tp. Hồ Chí Minh.
2. Bộ môn Miễn dịch – Sinh lý bệnh (2012), *Sinh lý bệnh học*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, tr. 209-224.
3. Phùng Thanh Long và cs. (2017), Các hợp chất oligostilbenoid phân lập từ phân đoạn ethyl acetat của phần trên mặt đất cây Nho rừng, *Tạp chí Dược liệu*, tập 22(6), tr. 352-360.
4. Võ Văn Chi (2012), *Từ điển cây thuốc Việt Nam*, tập 2, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, tr. 353-358.
5. Yan-sheng, Z. H. E. N. G. (2008), Antioxidation Effect of Proanthocyanidins from Seeds of Wild Vitis quinquangularis, *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2008, pp. 18.
6. Bernstein, s., & wallis, e. S. (1937). The structure of  $\beta$ -sitosterol, and its preparation from stigmasterol. *The Journal of Organic Chemistry*, 2(4), 341-345

#### Study on chemical components of *Bacopa monnieri* (L.) Wettst. Scrophulariaceae

Nguyen Hoang Khanh Linh, Tran Thi Kim Ngan, Tran Viet Tan, Nguyen Thanh Tu  
Department of Pharmacy, Nguyen Tat Thanh University  
nhklinh@nttu.edu.vn

**Abstract** Wild grapes (*Vitis heyneana* Roem. & Schult. Vitaceae) have been used in folk medicine as a medicine: the leaves of the wild grapes are used to treat dysentery, boils and sores, and the roots are used to treat bronchitis; its root bark is used to treat irregular menstruation and leukoplakia and the whole plant is used to treat measles and some other effects. The plant characteristics (morphology, microbiology) have been studied by microsurgery to contribute to the standard of species identification in nature. In addition, after conducting preliminary plant chemistry, the topic has identified a number of groups of compounds in plants including: stilbenoid, megastigman glycoside, triterpenoid, as well as through chromatographic and technical purification techniques, then recrystallized to obtain pure  $\beta$ -sitosterol -3-O-glucoside (Daucosterol) in the Ethyl acetate fraction.

**Keywords** vitis heyneana, wild grapes, antioxidant, DPPH,  $\beta$ -Sitosterol-3-O-glucoside, Daucosterol, recrystallization