

KHẢO SÁT THÀNH PHẦN HÓA HỌC VÀ TÁC DỤNG KHÁNG KHUẨN CỦA LÁ GIANG (*Aganonerion polymorphum* Pierre ex Spire) Ở BÌNH ĐỊNH

Đến tòa soạn 10-12-2022

Diệp Thị Lan Phương, Nguyễn Thị Nghĩa, Hoàng Nữ Thùy Liên, Võ Thị Thanh Tuyền*

Trường Đại học Quy Nhơn

*Email: vothithanhtuyen@qnu.edu.vn

SUMMARY

INVESTIGATION OF CHEMICAL CONSTITUENTS AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF *Aganonerion polymorphum* Pierre ex Spire LEAVES IN BINH DINH PROVINCE

Aganonerion polymorphum leaves are one of the popular vegetables in Binh Dinh province. By characteristic reactions, it was found that the leaves contain triterpenoid, alkaloids, steroids, cardiac glycosides, saponins, phenolic compounds and coumarins but no flavonoids. By chromatographic method, ursolic acid (**G4**) was isolated from ethyl acetate extract. The structure of this compound has been elucidated by modern spectroscopic method: MS, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, HSQC, HMBC and being compared to results published articles. Ursolic acid is a compound isolated for the first time from the *Aganonerion polymorphum* leaves. In addition, ethyl acetate extract has the ability to inhibit the growth of *Staphylococcus aureus* at $\text{IC}_{50} = 195.82 \pm 1.55$ ($\mu\text{g/mL}$) and *Lactobacillus fermentum* at $\text{IC}_{50} = 186.47 \pm 3.50$ ($\mu\text{g/mL}$).

Keywords: *Aganonerion polymorphum*, ursolic acid, isolation of substance

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Lá giang hay còn gọi là dây giang, giang chua, có tên khoa học *Aganonerion polymorphum* Piere ex Spire, thuộc họ Trúc Đào (Apocynaceae). Nó thuộc loại dây leo, phân bố nhiều ở Campuchia, Lào và Việt Nam [1, 2]. Lá giang không chỉ là loại rau quen thuộc trong các bữa ăn của người Việt Nam mà nó còn là loại cây dược liệu dùng để giải độc, lợi tiểu, chữa viêm đường tiết niệu, viêm thận mạn tính, ăn không tiêu, đau nhức xương khớp, chống ho, long đờm, chữa mụn nhọt, lở ngứa ngoài da ...[3, 4, 5].

Trong những thập niên gần đây, lá giang được một số nhà khoa học quan tâm nghiên cứu và các công bố này chủ yếu về ứng dụng của lá giang. Ở Campuchia, lá giang được dùng để điều trị đau lưng, bong, cảm lạnh, ho, tiêu chảy, đau đầu, sốt rét, bong gân, đau bụng và điều trị

vết thương [6]. Ngoài tác dụng dùng chữa bệnh, dịch chiết ethyl acetate của lá giang còn được dùng trong gia công kim loại đồng để chống lại sự ăn mòn điện hóa [7], dùng ức chế sự ăn mòn thép trong nhiên liệu ethanol [8] hay kết hợp với các hạt nano titania làm tăng cường độ bám dính của màng bảo vệ, tăng độ ổn định nhiệt và giảm đáng kể sự ăn mòn thép [9].

Hiện nay, lá giang được trồng chuyên làm nguồn rau sạch ăn giải nhiệt, nấu canh chua, chữa viêm đường tiết niệu, ăn không tiêu... và là đặc sản ở một số vùng miền, trong đó có Bình Định. Lá giang là một loại cây trồng rất phổ biến của tỉnh nhà và là cây dược liệu thông dụng. Tuy nhiên, cho tới nay vẫn chưa có nhiều nghiên cứu về thành phần, xác định cấu trúc hóa học của hợp chất phân lập từ lá giang. Trong bài báo này, chúng tôi trình bày kết quả định tính các nhóm

chất cũng như phân lập, xác định cấu trúc hợp chất và hoạt tính kháng vi sinh vật của cao chiết ethyl acetate từ mẫu lá giang khô ở Bình Định.

2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu

Nguyên liệu dùng trong nghiên cứu là lá của cây lá giang trồng ở huyện Tuy Phước, tỉnh Bình Định, được thu hái vào tháng 4 năm 2022. Mẫu lá giang được Ths. Phan Hoài Vỹ - bộ môn Sinh học ứng dụng - Nông nghiệp, Khoa Khoa học Tự nhiên, trường ĐH Quy Nhơn xác định tên khoa học là *Aganonerion polymorphum* Piere ex Spire. Số hiệu của mẫu là 20220401, được lưu tại Phòng thí nghiệm Thực vật, trường ĐH Quy Nhơn. Mẫu thu hái về được loại bỏ các lá sâu, rửa sạch, phơi khô, rồi xay nhỏ thành bột.

2.2. Thiết bị nghiên cứu

- Máy cô quay chân không N-1200AV-WD Eyela.
- Sắc ký lớp mỏng (SKLM) được thực hiện trên bản mỏng tráng sẵn để nhôm pha thường silica gel 60 F254. (Merck), hiện màu bằng đèn tử ngoại bước sóng 254 nm hay thuốc thử $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$.
- Sắc ký cột được thực hiện trên silica gel pha thường, cỡ hạt 0,040-0,063 mm (Merck).
- Phổ khối lượng phun mù điện tử (ESI-MS) được đo trên máy sắc ký lỏng ghép khối phổ (LC/MS) Agilent 1260 tại Viện Hóa sinh biển, Viện Hàn Lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.
- Phổ cộng hưởng từ hạt nhân ^1H -NMR, ^{13}C -NMR, DEPT, HSQC và HMBC được đo trong dung môi CD_3OD trên máy Bruker Avance 500 MHz tại viện Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Định tính các nhóm chất có trong lá của cây lá giang

Bột lá giang khô được ngâm trong dung môi ethanol (EtOH), sau đó tiến hành lọc và cất loại dung môi ở áp suất thấp thu được cao chiết EtOH. Cao chiết này được phân tích định tính bằng các phản ứng đặc trưng để phát hiện các

nhóm chất triterpenoid, alkaloid, flavonoid, steroid, glycoside tim, saponin, hợp chất phenol và coumarin [10].

2.3.2. Phân lập và xác định cấu trúc chất

Bột lá giang khô (499,486 g) được ngâm với EtOH 90% ở nhiệt độ phòng trong 72 giờ (3 lần $\times$ 1200 mL, 1 ngày/1 lần). Gộp các dịch chiết EtOH, cô quay ở áp suất thấp thu được 81,090 g cao chiết tổng EtOH. Tiếp đến, thêm 150 ml nước vào cao chiết tổng rồi chiết lần lượt với dung môi hexane và ethyl acetate (EtOAc). Phần dịch chiết EtOAc đem cất loại dung môi ở áp suất thấp thu được 9,428 g cao chiết EtOAc. Cao chiết EtOAc được phân tách trên cột silica gel, sử dụng hệ dung môi rửa giải là hexane : EtOAc (100:1 đến 0:1, v/v). Quá trình chạy cột được kiểm tra bằng sắc ký lớp mỏng (SKLM) với hệ dung môi hexane : EtOAc : methanol = 2 : 0,4 : 0,05. Gộp các lọ có cùng thành phần lại thu được 5 phân đoạn (A1-A5). Phân đoạn A3 (0,320 g) tiếp tục phân lập trên cột silica gel, rửa giải với hệ dung môi hexane: EtOAc = 2 : 0,1 thu được 3 phân đoạn A3.1-A3.3. Phân đoạn A3.2 (35 mg) được tinh chế trên cột silica gel, rửa giải bằng $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (99/1, v/v) thu được chất sạch (**G4**, 14 mg). Dựa trên kết quả đo phổ và so sánh với tài liệu đã công bố để quy kết cấu trúc chất phân lập.

2.3.3. Thử hoạt tính kháng khuẩn và kháng nấm của lá giang

Cao chiết EtOAc lá của cây lá giang được đem thử hoạt tính với các chủng vi khuẩn Gram (+), vi khuẩn Gram (-) và nấm *Candida albican* theo phương pháp pha loãng đa nồng độ trên môi trường lỏng tại Phòng Hóa sinh ứng dụng, Viện Hóa học, Viện Hàn lâm khoa học và công nghệ Việt Nam.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả định tính các nhóm chất có trong lá của cây lá giang

Cao chiết EtOH được sử dụng để định tính các nhóm chất hữu cơ có trong lá giang.

Bảng 1. Kết quả định tính các nhóm chất hữu cơ có trong lá của cây lá giang trồng ở Bình Định

STT	Nhóm chất	Phản ứng định tính	Hiện tượng	Kết quả	Kết luận
1	Triterpenoid	Phản ứng Liebermann - Burchard	Màu xanh lục	+	Có
2	Alkaloid	Thuốc thử Wagner	Kết tủa nâu	+	Có
3	Flavonoid	Phản ứng cyanidin	Không chuyển sang vàng hoặc đỏ	-	Không
4	Steroid	Phản ứng Salkowski	Màu xanh	+	Có
5	Glycoside tim	Phản ứng Baljet	Màu đỏ da cam	+	Có
6	Saponin	Quan sát hiện tượng tạo bọt	Có tạo bọt trắng	+	Có
7	Hợp chất phenol	FeCl ₃	Màu xanh đen	+	Có
8	Coumarin	NaOH, HCl	Kiểm hóa thu được dung dịch màu vàng trong suốt, tiếp tục acid hóa thì dung dịch bị vẩn đục.	+	Có

Có rất nhiều phương pháp và các loại thuốc thử để định tính các nhóm chất hữu cơ có mặt trong thực vật [10]. Trong thực nghiệm này, thuốc thử dùng để định tính là các thuốc thử thông dụng, đặc trưng riêng cho từng nhóm chất, hạn chế dùng các thuốc thử cho kết quả của nhóm chất này cũng cho kết quả dương tính với nhóm chất khác. Việc định tính này giúp xác định thành phần hóa học cũng như định hướng cho việc tách chất ra khỏi thực vật. Bằng các thuốc thử đặc trưng riêng của từng nhóm chất, chúng tôi đã xác định được các nhóm chất có mặt trong lá giang trồng ở tỉnh Bình Định. Kết quả định tính được thể hiện ở bảng 1.

Kết quả định tính thành phần hóa học của lá cây lá giang trồng ở Bình Định cho thấy sự có mặt của các nhóm chất triterpenoid, alkaloid, steroid, glycoside tim, saponin, hợp chất phenol và coumarin nhưng không có flavonoid.

3.2. Xác định cấu trúc của hợp chất phân lập từ lá giang

Chất **G4** phân lập được từ cao chiết ethyl acetate có dạng bột màu trắng.

Dữ liệu phổ của hợp chất phân lập **G4**:

Phổ khối lượng ESI-MS xuất hiện peak ion giả phân tử ở m/z $[M-H]^- = 455$, gợi ý cho công thức phân tử $C_{30}H_{48}O_3$ ($M = 456$).

1H -NMR (500 MHz, CD_3OD) δ_H (ppm) : 5,13 (1H, t, $J = 3,5$ Hz, H-12), 3,06 (1H, dd, $J = 5$ Hz, 11,5 Hz, H-3), 2,10 (1H, d, $J = 10,5$ Hz, H-18), 1,92 và 1,55 (2H, m, H-16), 1,82 (2H, dd, $J = 3,5$ Hz và 9,0 Hz, H-11), 1,82 và 0,98 (2H, m, H-15), 1,52 và 1,48 (2H, m, H-2), 1,62 và 1,55 (2H, m, H-22), 1,58 và 0,98 (2H, m, H-1), 1,48 (1H, m, H-9), 1,45 và 1,32 (2H, m, H-6), 1,41 và 1,25 (2H, m, H-7), 1,40 và 1,25 (2H, m, H-21), 1,30 (1H, m, H-19), 0,83 (1H, m, H-20), 1,02 (3H, s, H-27), 0,88 (3H, s, H-23), 0,87 (3H, s, H-25), 0,86 (3H, d, $J = 6,5$ Hz, H-30), 0,79 (3H, d, $J = 6,5$ Hz, H-29), 0,75 (3H, s, H-26), 0,68 (3H, s, H-24), 0,65 (1H, d, $J = 11$ Hz, H-5).

^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD) δ_C (ppm): 181,7 (C-28), 139,7 (C-13), 126,9 (C-12), 79,7

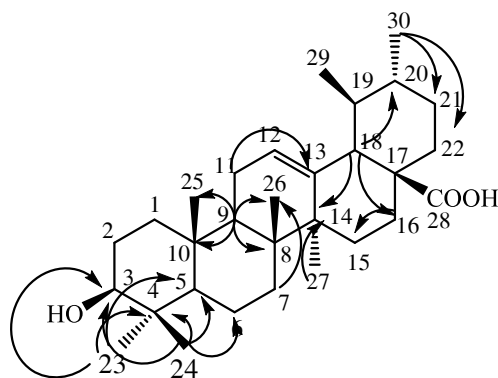
(C-3), 56,8 (C-5), 54,4 (C-18), 49,3 (C-17), 49,2 (C-9), 43,3 (C-14), 40,8 (C-8), 40,4 (C-19, C-20), 40,0 (C-1), 39,8 (C-4), 38,1 (C-10, C-22), 34,3 (C-7), 31,8 (C-21), 29,2 (C-15), 28,8 (C-23), 27,9 (C-2), 25,3 (C-16), 24,4 (C-11), 24,0 (C-27), 21,6 (C-30), 17,8 (C-26), 17,6 (C-29), 16,4 (C-24), 16,0 (C-25).

Ở phổ $^1\text{H-NMR}$ của chất **G4** có tín hiệu proton của 2 nhóm methine, gồm một tín hiệu proton của nhóm methine mang liên kết đôi $-\text{CH}=\text{C}-$ ở δ_{H} 5,13 (1H, t, 3,5 Hz) và một tín hiệu proton của nhóm methine liên kết với nhóm hydroxyl $>\text{CH}-\text{OH}$ ở δ_{H} 3,06 (1H, dd, 5 Hz, 1,5 Hz). Mặt khác, trên phổ $^1\text{H-NMR}$ còn xuất hiện tín hiệu proton của các nhóm methylene $-\text{CH}_2-$ chồng chéo nhau ở δ_{H} 0,98 - 1,92 và 7 tín hiệu proton của nhóm methyl $-\text{CH}_3$ ở δ_{H} 1,02; 0,88; 0,87; 0,86, 0,79; 0,75 và 0,68.

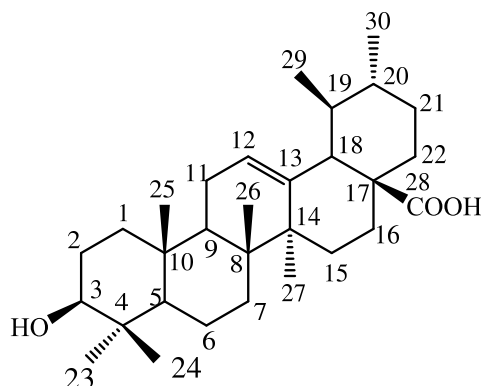
Kết hợp phổ $^{13}\text{C-NMR}$ và DEPT 90, 135 của chất **G4** cho thấy chất **G4** có 30 nguyên tử carbon gồm: 7 nguyên tử carbon methyl, 9 nguyên tử carbon methylene, 7 nguyên tử carbon methine và 7 nguyên tử carbon bậc 4. Mặt khác kết hợp với phổ 2 chiều HSQC, chúng ta có thể phát hiện các tín hiệu carbon vùng trường thấp gồm tín hiệu nguyên tử carbon bậc 4 ở độ chuyển dịch δ_{C} 181,7 ppm đặc trưng cho carbon của nhóm $-\text{COOH}$; tín hiệu của các nguyên tử carbon olefin $-\text{CH}=\text{C}-$ ở δ_{C} 126,9 và $>\text{C}=\text{C}-$ ở δ_{C} 139,7. Ngoài ra còn có tín hiệu của 6 nguyên tử carbon methine (sp^3), trong đó có 1 nguyên tử carbon methine liên kết trực tiếp với nhóm hydroxyl $>\text{CH}-\text{OH}$ ở δ_{C} 79,7; tín hiệu của 5 nguyên tử carbon bậc 4 (sp^3) C-10, C-4, C-8, C-14, C-17 ở δ_{C} lần lượt là 38,1; 39,8; 40,8; 43,3; 49,3.

Xuất hiện trên phổ 2 chiều HMBC là các tương tác của H-23 đến C-3, C-4, C-5; H-24 đến C-3, C-4, C-5, C-6; H-30 đến C-21, C-22. Mặt khác, chúng ta còn thấy tương tác của H đến các carbon mà trong phổ HSQC không cho thấy được, như H-9 đến các carbon bậc 4 C-8, C-10;

H-27, H-18 đến C-14. Ngoài ra, các tương tác còn thể hiện trên hình 1.



Hình 1. Các tương tác trong phổ HMBC



Hình 2. Ursolic acid ($\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3$)

Dựa vào các phân tích phổ ở trên và kết hợp so sánh với các dữ liệu phổ trong các bài báo đã công bố [11, 12] cho phép xác định hợp chất **G4** là ursolic acid có công thức trên hình 2.

3.3. Kết quả thử hoạt tính kháng khuẩn và kháng nấm cao chiết ethyl acetate của lá giang

Cao chiết ethyl acetate lá của cây lá giang được đem thử hoạt tính với chủng vi khuẩn Gram (+) gồm *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus fermentum*; chủng vi khuẩn Gram (-) gồm *Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* và nấm *Candida albicans*. Kết quả thử hoạt tính kháng khuẩn và kháng nấm cao chiết ethyl acetate lá của cây lá giang trồng ở Bình Định được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Kết quả thử hoạt tính kháng khuẩn và kháng nấm cao chiết ethyl acetate của lá giang ở Bình Định

Tên mẫu	Nồng độ (µg/ml)	% ức chế các chủng vi sinh vật và nấm kiểm định						
		Gram (+)			Gram (-)			Nấm
		<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Salmonella enterica</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Candida albican</i>
Cao EtOAc	256	65,5	27	73	2	13	3	4
	64	16	11	9,5	0	0	0	0
	16	0	0	2	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0
	IC ₅₀	195,82±1,55	>256	186,47±3,50	>256	>256	>256	>256
	MIC	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256
Ampicillin	IC ₅₀	0,02±0,005	3,62±0,15	1,03±0,07				
	MIC	0,125±0,0	32±0,0	32±0,0				
Cefotaxime	IC ₅₀				0,43±0,05	0,007±0,002	4,34±0,15	
	MIC				32±0,0	0,5±0,0	8±0,0	
Nystatin	IC ₅₀							1,32±0,05
	MIC							8±0,0

Từ bảng 2 cho thấy cao chiết ethyl acetate của lá giang có khả năng ức chế được 50% vi khuẩn *Staphylococcus aureus* tại nồng độ 195,82±1,55 (µg/mL) và vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* tại nồng độ 186,47±3,50 (µg/mL); còn đối với vi khuẩn *Bacillus subtilis*, *Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* và nấm *Candida albicans* thì không bị ức chế ở các nồng độ nghiên cứu.

Kết quả thử hoạt tính kháng khuẩn và kháng nấm cao chiết ethyl acetate của lá giang góp phần giải thích việc dùng lá giang để chữa một số bệnh do nhiễm khuẩn.

4. KẾT LUẬN

Bằng các phản ứng đặc trưng đã phát hiện trong lá của cây lá giang trồng ở Bình Định có chứa triterpenoid, alkaloid, steroid, glycoside tim, saponin, hợp chất phenol và coumarin nhưng không có flavonoid.

Mặt khác, bằng phương pháp sắc ký đã phân lập được hợp chất ursolic acid từ cao chiết ethyl acetate lá của cây lá giang (*Aganonerion polymorphum* Piere ex Spire) ở Bình Định. Cấu trúc của hợp chất phân lập được xác định bằng cách phân tích các phổ MS, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, DEPT, HSQC, HMBC và so sánh với các

bài báo đã công bố. Ursolic acid là hợp chất lần đầu tiên được phân lập từ cây lá giang.

Ngoài ra, bằng phương pháp loãng đa nồng độ đã xác định được giá trị IC₅₀ (µg/mL) của cao chiết ethyl acetate lá của cây lá giang đối với vi khuẩn *Staphylococcus aureus* là 195,82±1,55 và vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* là 186,47±3,50.

Lời cảm ơn:

Nghiên cứu này được thực hiện trong khuôn khổ đề tài khoa học công nghệ cấp cơ sở của Trường Đại học Quy Nhơn với mã số T2022.753.09. Nhóm tác giả xin cảm ơn Ths. Phan Hoài Vỹ - Bộ môn Sinh học ứng dụng - Nông nghiệp, Khoa Khoa học Tự nhiên, trường ĐH Quy Nhơn đã xác định tên khoa học của cây lá giang.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Middleton D.J. & Regalado J.C. Jr, *Adansonia*, (2005). Nomenclatural notes on species of *Apocynaceae* described from Cambodia, Laos and Vietnam, **27 (2)**, 291-308.
- [2] Lưu Hồng Trường, Lý Ngọc Sâm, Nguyễn Vinh Hiền, (2007). *Thực vật hữu ích chọn lọc từ núi Tà Kóu, khu BTTN Tà Kóu*. NXB Tổng hợp TP Hồ Chí Minh, 8-9.

- [3] Võ Văn Chi, (1998). *Cây rau làm thuốc*. NXB Tổng hợp Đồng Tháp.
- [4] Pornkamon Sakong, Tueanjit Khampitak, Ubon Cha'on, Chadamas Pinitsoontorn, Pote Sriboonlue, Puangrat Yongvanit and Patcharee Boonsiri, (2011). Antioxidant activity and bioactive phytochemical contents of traditional medicinal plants in northeast Thailand. *Journal of Medicinal Plants Research* **5(31)**, 6822-6831.
- [5] Thidarat Somdee, Udomsak Mahaweerawat, Methin Phadungkit and Suneerat Yangyuen, (2016). Antioxidant Compounds and Activities in Selected Fresh and Blanched Vegetables from Northeastern Thailand. *Chiang Mai J. Sci*, **43(4)**, 834-844.
- [6] Smell Keo, Bunsethkimteang Chrin, Dane Dim, Bunlaph Buth, Soklin Chea, Rothpisey Chan, Vanda Ly, Visessakseth So, Channeth Meng, Sophearom Chhea, Sorida Prak, Sin Chea, (2018). Ethnobotanical survey of medicinal plants used by traditional healers in Kampong Speu province, Cambodia. *Asian Journal of Pharmacognosy*, **2(1)**, 21-32.
- [7] L. T. Dai, H. T. Anh, M. Vaka, D. T. Ngan, N. D. Nam, (2017). An investigation of *Aganoeirion Polymorphum* leaf extract as a copper working fluids' additive. *Vietnam Journal of Science and Technology*, **55 (5B)**, 236-245.
- [8] Nguyen Si Hoai Vu, Pham Van Hien, Tran Van Man, Vu Thi Hanh Thu, Mai Dinh Tri and Nguyen Dang Nam, (2018). A Study on Corrosion Inhibitor for Mild Steel in Ethanol Fuel Blend. *Materials*, **11**, 59, 12.
- [9] Nguyen Si Hoai Vu, Pham Van Hien, Motilal Mathesh, Vu Thi Hanh Thu, and Nguyen Dang Nam, (2019). Improved Corrosion Resistance of Steel in Ethanol Fuel Blend by Titania Nanoparticles and *Aganonerion polymorphum* Leaf Extract. *ACS Omega*, **4**, 146-158.
- [10] Nguyễn Kim Phi Phụng, (2007). *Phương pháp cô lập hợp chất hữu cơ*. NXB ĐHQG TP Hồ Chí Minh
- [11] Ara Deani Somantri, Dikdik Kurnia, Achmad Zainuddin, Hendra Dian Adhita Dharsono, and Mieke Hemiawati Satari, (2021). Action mode of ursolic acid as a natural antioxidant and inhibitor of superoxide dismutase: In vitro and in silico study. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology and Research*, **12(4)**, 389-394.
- [12] Nargis Jamila, Melati Khairuddean, Sadiq Noor Khan, Naeem Khan and Hasnah Osman, (2014). Phytochemicals from the Bark of *Garcinia hombroniana* and Their Biological Activities. *Rec. Nat. Prod*, **8(3)**, 312-316.