

## THỬ NGHIỆM HOẠT TÍNH SINH HỌC CỦA HAI HỢP CHẤT FLAVONOL GLUCOSIDE PHÂN LẬP ĐƯỢC TỪ NHỊ HOA MAI VÀNG

Huỳnh Phương Vinh<sup>1</sup>, Quách Kim Huỳnh Hoa<sup>1</sup> và Tôn Nữ Liên Hương<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Sinh viên Hóa dược K44, Khoa Khoa học Tự Nhiên, Trường Đại học Cần Thơ

<sup>2</sup>Khoa học Tự Nhiên, Trường Đại học Cần Thơ

\*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Tôn Nữ Liên Hương (email: tnluong@ctu.edu.vn)

### Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 22/05/2022

Ngày nhận bài sửa: 22/06/2022

Ngày duyệt đăng: 22/06/2022

### Title:

Bioassay on two glucoside flavonol compounds isolated from *Ochna integerrima*'s stamens

### Từ hóa:

Hoạt tính gây độc tế bào, hoạt tính kháng khuẩn, *Ochna integerrima* (Lour.) Merr.

### Keywords:

Antibacterial activity, cytotoxic activity, *Ochna integerrima* (Lour.) Merr.

### ABSTRACT

From dichloromethane extract of stamens of flowers of *Ochna integerrima* (Lour.) Merr. collected in Can Tho, two compounds were isolated including 6- $\gamma,\gamma$ -dimethyl allylkaempferol 7-O- $\beta$ -D-glucopyranoside (1) and (2S,3S) 4'-methoxy-6- $\gamma,\gamma$ -dimethylallyl dihydro kaempferol 7-O- $\beta$ -D-glucopyranoside (2). The chemical structures of these compounds have been elucidated by modern spectral data: <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR, DEPT, HMBC, HSQC and compared with some previously reported data. Compound (2) expresses inhibition activity on both lung cancer cell lines A549 (IC<sub>50</sub> 152,00±8,5  $\mu$ g/mL) and breast cancer cell MCF-7 (245,13±12,6  $\mu$ g/mL). Furthermore, both substances have antibacterial activities against Gram positive (+) bacteria, *Staphylococcus aureus*, with the IC<sub>50</sub> value of 61,47±0,67  $\mu$ g/mL for compound (1) and 194,6±5,38  $\mu$ g/mL for compound (2).

### TÓM TẮT

Từ cao chiết dichloromethane của nhị hoa mai vàng, *Ochna integerrima* (Lour.) Merr. đã phân lập được hai hợp chất là 6- $\gamma,\gamma$ -dimethylallylkaempferol 7-O- $\beta$ -D-glucopyranoside (1) và (2S,3S) 4'-methoxy-6- $\gamma,\gamma$ -dimethylallyldihydro kaempferol 7-O- $\beta$ -D-glucopyranoside (2). Cấu trúc của hai hợp chất này được xác định bằng các phương pháp phổ nghiệm hiện đại như <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR, DEPT, HMBC, HSQC và so sánh với tài liệu đã được công bố trước đó. Hợp chất (2) thể hiện hoạt tính ức chế trên cả hai dòng tế bào ung thư vú MCF7 và ung thư phổi A549 với giá trị IC<sub>50</sub> lần lượt là 152,00±8,5  $\mu$ g/mL và 245,13±12,6  $\mu$ g/mL. Hơn nữa, cả hai hợp chất đều thể hiện hoạt tính kháng khuẩn Gram (+), *Staphylococcus aureus* với giá trị IC<sub>50</sub> của hợp chất (1) là 61,47±0,67  $\mu$ g/mL và của hợp chất (2) là 194,6±5,38  $\mu$ g/mL.

## 1. GIỚI THIỆU

Trong thời đại tiến bộ của khoa học công nghệ hiện nay, ngày càng có nhiều thành tựu nghiên cứu phân lập chất có hoạt tính sinh học từ các loài thực vật đem lại lợi ích cho cuộc sống. Một số kết quả phân lập hợp chất tự nhiên từ cây mai vàng và những

cây cùng chi *Ochna* cho thấy chi này chứa rất nhiều flavonoid, anthranoid (Bandi et al., 2012), ngoài ra còn có triterpenoid, steroid và acid béo (Reutrakul et al., 2007), (Traisathit & Seephonkai, 2021). Với hàm lượng flavonoid lớn và đa dạng từ flavon, flavonol, flavan, biflavon, glycoside tương ứng, chi

mai có tính kháng oxy hóa nổi bật (Seephonkai et al., 2021). Tại Thái Lan, một nghiên cứu về hoạt tính sinh học công bố chi tiết dịch chiết ethanol của loài *Ochna integerrima* có khả năng kháng oxy hóa mạnh (Buranasudja et al., 2022). Tại Việt Nam, chỉ có một ít công trình nghiên cứu về phân lập thành phần hóa học của loài mai vàng này. Vì thế, việc nghiên cứu phân lập hợp chất từ hoa cây mai vàng (*Ochna integerrima*) là cần thiết và mang tính thời sự. Kết quả của nghiên cứu này là phân lập và khảo sát hoạt tính hai hợp chất từ cao chiết dichloromethane của nhị hoa mai vàng.

## 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Quy trình thí nghiệm chung

Dung môi hữu cơ được sử dụng trong nghiên cứu hiệu Chemsol (Việt Nam). Silica gel 60 (0,063-0,200 mm, Merck, Đức) được dùng cho sắc ký cột. Sắc ký lớp mỏng sử dụng bản silica gel tráng sẵn F<sub>254</sub> (Merck). Hóa chất thử hoạt tính kháng oxy hóa DPPH, DMSO (dimethyl sulfoxide), methanol (Merck).

Phổ <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz) và <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz) và các tương quan hai chiều được ghi lại bằng máy cộng hưởng từ nhân Bruker Avance 500 MHz. Phổ khối HRESI-MS được ghi bằng máy VG 7070, 70 eV. Các thiết bị phân tích phổ được thực hiện tại Viện Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Acid ascorbic được mua từ Viện Kiểm nghiệm thuốc, thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam.

#### Nguyên liệu

Nguyên liệu là nhị hoa mai vàng (*Ochna integerrima* L.) thu tại địa bàn tỉnh Sóc Trăng (tháng 02/2021) được xử lý thành dạng bột mịn. Tên khoa học của loài được định danh bởi TS. Đặng Văn Sơn, Viện Sinh học nhiệt đới thuộc Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

**Chiết xuất và phân lập chất:** Nguyên liệu hoa tươi sau khi thu hái được rửa sạch, phơi trong bóng râm, sấy khô ở nhiệt độ 50°C và xay thành bột mịn (700 g). Bột mịn được cho vào các túi vải trắng (10×20 cm), buộc kín miệng và đặt vào bình thủy tinh lớn có nắp đậy. Methanol được rót vào bình sao cho mực dung môi cao hơn các túi chứa bột mẫu, đậy kín bình. Sau khi ngâm chiết trong 24 giờ, dung môi được lọc qua giấy lọc, cô quay thu hồi methanol. Methanol thu hồi tiếp tục cho vào bình chiết, quá trình chiết được lặp đi lặp lại nhiều lần cho đến khi chiết kiệt các chất trong nguyên liệu (Phung, 2007).

Cao MeOH (cao tổng) thu được sau khi cô quay thu hồi dung môi có dạng sệt, khối lượng là 60 g, hòa tan trong một lượng nước cất vừa phải xấp xỉ 1:1 (v/v) thu được cao MeOH/H<sub>2</sub>O, tiến hành phương pháp chiết lỏng-lỏng với các dung môi có độ phân cực tăng và cô đặc dung dịch thu được các cao chiết gồm cao petroleum ether (PE), cao dichloromethane (DC), cao ethyl acetate (EA) và cao methanol còn lại. Cao DC thu được có khối lượng 23 g. Nhị hoa mai vàng được tiến hành sắc ký cột pha thường cao DC với hệ dung môi rửa giải Hex:EA tăng dần độ phân cực với các tỉ lệ 7:3, 5:5; 3:7; 0:100 và EA:Me với các tỉ lệ 100:0; 95:5, 9:1, 85:15, 7:3, 0:100. Quá trình rửa giải được theo dõi bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng (SKLM) thu được 11 phân đoạn lần lượt từ DC1-11. Phân đoạn DC5 (0,7 g) được chọn để tiếp tục khảo sát bằng sắc ký cột nhiều lần với hệ dung môi Hex:C:Me (1:5:0,05), tăng dần độ phân cực bằng Me, theo dõi bằng SKLM, hiện hình bằng thuốc thử vanillin trong H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5%, gia nhiệt. Tăng hệ dung môi Hex:C:Me đến (1:5:1) thu được 2 chất sạch là hợp chất (1) (10 mg, bột màu vàng) và hợp chất (2) (5,8 mg, tinh thể không màu).

Thử nghiệm kháng vi sinh vật kiểm định, hoạt tính gây độc tế bào trên *in-vitro* được thực hiện tại phòng Hoá Sinh ứng dụng, Viện Hoá học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

### 2.2. Khảo sát hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định

Phương pháp pha loãng nồng độ trên môi trường lỏng được sử dụng trong thử nghiệm hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định, đánh giá mức độ kháng khuẩn mạnh yếu của các mẫu thử thông qua độ đục của môi trường nuôi cấy (Miliauskas et al., 2004). Các giá trị thể hiện hoạt tính là IC<sub>50</sub> (50% Inhibitor Concentration: nồng độ ức chế 50%), MIC (Minimum Inhibitor Concentration: nồng độ ức chế tối thiểu) (Hadacek & Greger, 2000; Cos et al., 2006, 2007).

#### Cách tiến hành:

##### Pha loãng mẫu thử

Mẫu ban đầu được pha loãng 2 bước trong MeOD 100% và nước cất tiệt trùng thành một dãy 4 đến 10 nồng độ. Nồng độ thử cao nhất trong thử nghiệm là 256 µg/mL với dịch chiết và 128 µg/mL chất sạch. Trường hợp đặc biệt thì pha mẫu theo yêu cầu.

#### Thử hoạt tính

Vi sinh vật kiểm định được lưu giữ ở nhiệt độ - 80°C. Trước khi thí nghiệm, vi sinh vật kiểm định được hoạt hóa bằng môi trường nuôi cấy sao cho nồng độ vi khuẩn đạt  $5 \times 10^5$  CFU/mL; nồng độ nấm đạt  $1 \times 10^3$  CFU/mL.

Mười  $\mu$ L dung dịch mẫu được thử ở các nồng độ vào đĩa 96 giếng, thêm 190  $\mu$ L dung dịch vi khuẩn và nấm đã được hoạt hóa ở trên, ủ ở nhiệt độ 37°C trong thời gian từ 16 đến 24 giờ.

#### Xử lý kết quả

Giá trị MIC được xác định tại giếng có nồng độ chất thử thấp nhất ức chế hoàn toàn sự phát triển của vi sinh vật.

Giá trị IC<sub>50</sub> được xác định thông qua giá trị % ức chế vi sinh vật phát triển và phần mềm máy tính Rawdata.

$$(\%) \text{ Ức chế tế bào} = \frac{OD_{\text{chứng (+)}} - OD_{\text{mẫu thử}}}{OD_{\text{chứng (+)}} - OD_{\text{chứng (-)}}} \times 100\%$$

$$IC_{50} = \frac{High_{Conc}}{(High_{Inh\%} - 50) \times (High_{Conc} - Low_{Conc})} \times (High_{Inh\%} - Low_{Inh\%})$$

(Trong đó, High<sub>Conc</sub>/Low<sub>Conc</sub>: chất thử ở nồng độ cao/chất thử thấp ở nồng độ thấp; High<sub>Inh%</sub>/Low<sub>Inh%</sub>: % ức chế ở nồng độ cao/% ức chế ở nồng độ thấp).

### 2.3. Khảo sát hoạt tính gây độc tế bào trên in-vitro

#### Nguyên lý của phương pháp

Hoạt tính gây độc tế bào được thực hiện dựa trên phương pháp thử nghiệm so màu muối (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium) (MTT) được mô tả bởi Mosman (1983). Đây là phương pháp đánh giá khả năng sống sót của tế bào qua khả năng khử MTT (màu vàng) thành một phức hợp formazan (màu tím) bởi hoạt động của enzyme dehydrogenase trong ty thể. Sản phẩm formazan được hòa tan bằng DMSO và đo mật độ quang (OD) ở bước sóng 540 nm. Giá trị thể hiện hoạt tính là IC<sub>50</sub> (nồng độ chất thử ức chế 50% sự phát triển của tế bào) (Mosmann, 1983; Scudiero et al., 1988; Malacrida et al., 2019).

#### Chuẩn bị thí nghiệm

Dòng tế bào ung thư ung thư phổi SK-LU-1 (HTB - 57TM), ung thư vú MCF-7 (HTB - 22TM) có nguồn gốc từ Bảo tàng giống chuẩn Hoa Kỳ (ATCC) được lưu giữ trong nitơ lỏng. Sau đó, tế bào được hoạt hóa và duy trì trong các môi trường dinh

dưỡng như DMEM (Dulbeccos Modified Eagle Medium) hoặc MEME (Minimum Essential Medium with Eagle salt) có bổ sung 7 - 10% FBS (Fetal Bovine Serum) và một số thành phần thiết yếu khác. Tế bào được nuôi trong các điều kiện tiêu chuẩn (5% CO<sub>2</sub>, độ ẩm 98%, nhiệt độ 37°C, vô trùng tuyệt đối). Tế bào phát triển sẽ được sử dụng để thử độc tính.

#### Pha loãng mẫu thử

Mẫu thử được hòa tan bằng dung môi DMSO với nồng độ ban đầu là 20 mg/mL. Tiến hành pha loãng 2 bước trên đĩa 96 giếng thành 5 dãy nồng độ từ cao xuống thấp lần lượt là 2564, 640, 160, 40 và 10  $\mu$ g/mL. Nồng độ chất thử trong đĩa thử nghiệm tương ứng là 128, 32, 8, 2 và 0,5  $\mu$ g/mL. Chất tham chiếu Ellipticine pha trong DMSO với nồng độ 0,01 mM.

#### Tiến hành thí nghiệm

Trypsin hóa tế bào thí nghiệm để làm rời tế bào và đếm trong buồng đếm tế bào. Tiếp đó, tế bào được pha bằng môi trường sạch và điều chỉnh mật độ phù hợp thí nghiệm (khoảng  $1-3 \times 10^4$  tế bào/mL tùy theo từng dòng tế bào).

Mỗi giếng được lấy vào 10  $\mu$ L chất thử đã chuẩn bị ở trên và 190  $\mu$ L dung dịch tế bào. Đối chứng dương của thí nghiệm là môi trường có chứa tế bào, đối chứng âm chỉ có môi trường nuôi cấy.

Đĩa thí nghiệm được ủ ở điều kiện tiêu chuẩn.

Sau 72 giờ, mỗi giếng thí nghiệm được tiếp tục ủ với 10  $\mu$ L MTT (5 mg/mL) trong 4h. Sau khi loại bỏ môi trường, tinh thể formazan được hòa tan bằng 100  $\mu$ L DMSO 100%.

Kết quả thí nghiệm được xác định bằng giá trị OD đo ở bước sóng 540 nm trên máy quang phổ Biotek. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

#### Xử lý kết quả

Giá trị IC<sub>50</sub> được xác định thông qua giá trị % ức chế tế bào phát triển và phần mềm máy tính Rawdata.

$$(\%) \text{ Ức chế tế bào} = \frac{OD_{\text{chứng (+)}} - OD_{\text{mẫu thử}}}{OD_{\text{chứng (+)}} - OD_{\text{chứng (-)}}} \times 100\%$$

$$IC_{50} = \frac{High_{Conc}}{(High_{Inh\%} - 50) \times (High_{Conc} - Low_{Conc})} \times (High_{Inh\%} - Low_{Inh\%})$$

(Trong đó, High<sub>Conc</sub>/Low<sub>Conc</sub>: chất thử ở nồng độ cao/chất thử thấp ở nồng độ thấp; High<sub>Inh%</sub>/Low<sub>Inh%</sub>: % ức chế ở nồng độ cao/% ức chế ở nồng độ thấp).

Đánh giá hoạt tính

Giá trị  $IC_{50} \leq 20 \mu\text{g/mL}$  (với dịch chiết thô) và  $IC_{50} \leq 4 \mu\text{g/mL}$  (với chất sạch) được đánh giá là có hoạt tính gây độc tế bào.

### 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Xác định cấu trúc và định danh hợp chất (1)

Hợp chất (1) có dạng bột màu vàng, tan tốt trong hệ dung môi C:Me (9:1). Sắc ký lớp mỏng giải ly trong hệ dung môi EA:Me (9:1) cho một vết tròn có giá trị  $R_f = 0,58$ .

Phổ  $^1\text{H-NMR}$  (600 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta_H$  ppm, J Hz) của hợp chất (1) cho thấy:

Sáu tín hiệu proton nhóm olefine (=CH-), trong đó có hai mũi ghép *ortho* với  $\delta_H$  lần lượt là:  $\delta_H$  8,06 (2H; *d*;  $J = 6,6$  Hz) và  $\delta_H$  6,93 (2H; *d*;  $J = 6,6$  Hz) cho thấy 4 proton này cùng nằm trên một vòng thơm và đối xứng nhau. Một tín hiệu tại  $\delta_H$  6,86 (1H; *s*) nằm trên một vòng thơm khác. Hai tín hiệu proton của nhóm methyl (-CH<sub>3</sub>) ở  $\delta_H$  1,60 (3H, *s*) và  $\delta_H$  1,71 (3H, *s*). Hai tín hiệu proton nhóm methylene (-CH<sub>2</sub>-) tại  $\delta_H$  3,23 (2H; *m*) và 3,44 (2H; *m*).

Ngoài ra, năm tín hiệu proton nhóm oxymethine (>CH-O) trong vùng  $\delta_H$  3,03 – 3,32 một tín hiệu oxymethylene tại vùng  $\delta_H$  3,73 (2H, *dd*,  $J_1 = 10,2$  Hz,  $J_2 = 5,4$  Hz); cùng tín hiệu mũi đôi tại  $\delta_H$  5,03 (1H, *d*,  $J = 7,2$  Hz) là các tín hiệu đặc trưng của đường hexose, khớp với cấu trúc đường  $\beta$ -glucopyranose.

Ở vùng từ trường thấp có sự xuất hiện của hai tín hiệu proton ở  $\delta_H$  9,48 (1H; *s*) và  $\delta_H$  10,17 (1H; *s*) dự đoán là tín hiệu của proton (-OH) của phenol, một tín hiệu ở  $\delta_H$  12,7 (1H; *s*) dự đoán là tín hiệu của proton chelate.

Phổ  $^{13}\text{C-NMR}$  (150 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta_C$  ppm) với phổ DEPT cho thấy có 24 tín hiệu đại diện cho 26 carbon, trong đó 2 tín hiệu carbon bậc một, 2 tín hiệu carbon bậc hai, 11 tín hiệu carbon bậc ba và 11 tín hiệu carbon bậc bốn.

Một tín hiệu carbon nhóm olefine (=CH-) ở  $\delta_C$  122,2, một tín hiệu carbon bậc bốn mang nối đôi (>C=) ở  $\delta_C$  130,9 và tín hiệu nhóm methylene (-CH<sub>2</sub>-) ở  $\delta_C$  21,3 kết hợp với 2 tín hiệu carbon nhóm methyl (-CH<sub>3</sub>) tại  $\delta_C$  17,8;  $\delta_C$  25,6. Đây là tín hiệu đặc trưng của nhóm prenyl (-CH<sub>2</sub>-CH=C-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

Năm tín hiệu carbon methine (>CH-) liên kết với nguyên tố có độ âm điện mạnh như oxy tại  $\delta_C$  100,4; 73,5; 76,8; 69,8; 77,3 và một tín hiệu carbon của nhóm methylene (-CH<sub>2</sub>-) liên kết với oxy tại  $\delta_C$  60,8, đây là những tín hiệu đặc trưng cho phân tử

đường glucose với carbon anomer tại  $\delta_C$  100,4 phù hợp với dữ liệu phổ proton. Ngoài ra, căn cứ vào hằng số ghép cặp  $^3J_{aa} = 7,2$  Hz của proton anomer tại  $\delta_H$  5,03, proton ở vị trí trục và nhóm hydroxyl (-OH) ở vị trí xích đạo, xác nhận phân tử đường  $\beta$ -D-glucose.

Ba tín hiệu đại diện cho 5 carbon nhóm olefine (=CH-), trong đó có 2 tín hiệu có cường độ gấp đôi tại  $\delta_C$  115,6 (2C); 129,7 (2C) ppm đây là tín hiệu 2 cặp carbon đối xứng nhau. Một tín hiệu ở  $\delta_C$  93,2 thuộc một vòng thơm khác. Chín tín hiệu carbon bậc bốn mang nối đôi (=C<) tại  $\delta_C$  104,5; 111,9; 121,7; 136,0; 147,5; 154,1; 156,8; 159,4; 160,7. Một tín hiệu carbon carbonyl (>C=O) tại  $\delta_C$  176,2.

Các dữ liệu của phổ 1D-NMR dự đoán ban đầu hợp chất (1) thuộc khung flavonol và mang hai nhóm thế là đường  $\beta$ -D-glucose và prenyl.

Xét phổ HSQC, sự tương tác giữa tín hiệu proton với carbon nối trục tiếp với nhau được thể hiện trong Bảng 1.

Tín hiệu proton tại  $\delta_H$  6,86 (1H; *s*) (H-8) tương tác với tín hiệu carbon tại  $\delta_C$  93,2 (C-8) đây là tín hiệu thuộc khung flavonol. Tín hiệu proton tại  $\delta_H$  6,93 (2H, *d*,  $J = 6,6$  Hz) (H-3'; H-5') tương tác với tín hiệu carbon tại  $\delta_C$  115,6 (C-3'; C-5') và tín hiệu proton tại  $\delta_H$  8,06 (2H, *d*,  $J = 6,6$  Hz) (H-2'; H-6') tương tác với tín hiệu tại  $\delta_C$  129,7 (C-2'; C-6') thuộc khung flavonol, đề nghị là kaempferol.

Hai tín hiệu proton nhóm methyl (-CH<sub>3</sub>) ở  $\delta_H$  1,74 (3H, *s*) (H-5'') và  $\delta_H$  1,61 (3H, *s*) (H-4'') tương tác lần lượt với hai tín hiệu carbon tại  $\delta_C$  17,8 (C-5'');  $\delta_C$  25,6 (C-4''), một tín hiệu proton nhóm olefine (=CH-) ở  $\delta_H$  5,23 (1H, *m*) (H-2'') tương tác với carbon tại  $\delta_C$  122,2 (C-2''), kết hợp với 2 tín hiệu proton tại  $\delta_H$  3,23 (3H, *m*);  $\delta_H$  3,44 (*m*) (H-1'') tương tác với tín hiệu carbon tại  $\delta_C$  21,3 (C-1'') thuộc nhóm prenyl.

Xét phổ HMBC, tín hiệu proton tại  $\delta_H$  1,74 (3H, *s*) (H-5'') tương tác với carbon tại các vị trí  $\delta_C$  122,2 (C-2''),  $\delta_C$  130,9 (C-3''),  $\delta_C$  25,6 (C-4''). Đồng thời, tín hiệu proton tại  $\delta_H$  1,61 (3H, *s*) (H-4'') tương tác với carbon tại các vị trí  $\delta_C$  17,9 (C-5''),  $\delta_C$  122,2 (C-2''),  $\delta_C$  130,9 (C-3''). Ngoài ra, proton tại  $\delta_H$  3,23 (*m*) (H-1'') và  $\delta_H$  1,74 (3H, *s*) (H-5'') cũng cho tương tác với  $\delta_C$  111,9 (C-6), chứng tỏ nhóm prenyl (-CH<sub>2</sub>-CH=C-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) gắn vào khung flavonol tại vị trí C-6.

Sự tương tác của tín hiệu proton tại  $\delta_H$  5,23 (1H, *m*) (H-2'') của prenyl tương tác với carbon anomer phân tử đường  $\beta$ -D-glucose tại  $\delta_C$  100,4 (C-1'''), kết hợp với sự tương tác của proton tại  $\delta_H$  3,19 (2H; *m*)

(H-4''' thuộc đường  $\beta$ -D-glucose) với tín hiệu carbon tại  $\delta_C$  122,2 (C-2'') của prenyl. Ngoài ra, không thấy được sự tương tác nào khác của các tín hiệu đường, nên có thể kết luận rằng phân tử đường  $\beta$ -D-glucose gắn vào vị trí kế cận với nhóm prenyl và bị prenyl tạo chướng ngại lập thể với khung flavonol, vậy đường  $\beta$ -D-glucose sẽ nối *O*-glycoside với khung flavonol tại vị trí C-7.

Tín hiệu proton tại  $\delta_H$  6,86 (1H, *s*) (H-8) tương tác với carbon tại các vị trí  $\delta_C$  154,1 (C-9),  $\delta_C$  111,9 (C-6),  $\delta_C$  104,5 (C-10),  $\delta_C$  160,7 (C-7).

Tín hiệu proton tại  $\delta_H$  8,06 (2H, *d*, 6,6 Hz) (H-2', H-6') tương tác với carbon tại các vị trí  $\delta_C$  147,5 (C-4'),  $\delta_C$  159,4 (C-2).

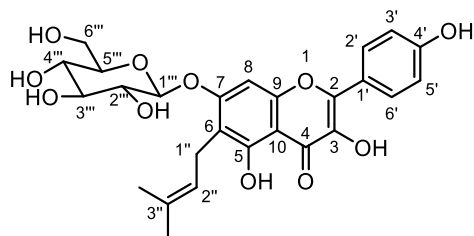
Tín hiệu proton tại  $\delta_H$  6,94 (2H, *d*, *J* = 6,6 Hz) (H-3', H-5') tương tác với carbon tại các vị trí  $\delta_C$  121,7 (C-1'),  $\delta_C$  159,4 (C-2).

Tiến hành lập bảng so sánh dữ liệu phổ (Bảng 1) để định danh hợp chất (1). Hợp chất được chọn có những dữ liệu NMR phù hợp biện luận trên là 6-( $\gamma,\gamma$ -Dimethylallyl)kaempferol 7-*O*- $\beta$ -D-glucoside.

**Bảng 1. So sánh dữ liệu phổ NMR của hợp chất (1) và 6-( $\gamma,\gamma$ -Dimethylallyl)kaempferol 7-*O*- $\beta$ -D-glucoside  $\delta$  (ppm)**

Vị trí C	Hợp chất (1) (600 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> )		6-( $\gamma,\gamma$ -Dimethylallyl)kaempferol 7- <i>O</i> - $\beta$ -D-glucoside (400 MHz, Methanol- <i>d</i> <sub>4</sub> )	
	$\delta_C$	$\delta_H$ (số H, dạng mũi, <i>J</i> Hz)	$\delta_C$	$\delta_H$ (số H, dạng mũi, <i>J</i> Hz)
2	159,4	-	160,6	-
3	136,0	-	137,5	-
4	176,2	-	177,5	-
5	156,8	-	158,5	-
6	111,9	-	114,0	-
7	160,7	-	162,2	-
8	93,2	6,86 (1H, <i>s</i> )	94,2	6,81 (1H, <i>s</i> )
9	154,1	-	155,9	-
10	104,5	-	106,0	-
1'	121,7	-	123,7	-
2'	129,7	8,06 (2H, <i>d</i> , 6,6)	130,9	8,11 ( <i>d</i> , 8,6)
3'	115,6	6,93 (2H, <i>d</i> , 6,6)	116,3	6,89 ( <i>d</i> , 8,6)
4'	147,5	-	148,6	-
5'	115,6	6,93 (2H, <i>d</i> , 6,6)	116,3	6,89 ( <i>d</i> , 8,6)
6'	129,7	8,06 (2H, <i>d</i> , 6,6)	130,9	8,11 ( <i>d</i> , 8,6)
1''	21,3	3,23 ( <i>m</i> ); 3,44 ( <i>m</i> )	22,4	3,43 ( <i>m</i> ); 3,34 ( <i>m</i> )
2''	122,2	5,23 ( <i>m</i> )	122,5	5,26 ( <i>br t</i> , 7,1)
3''	130,9	-	132,2	-
4''	25,6	1,61 (3H, <i>s</i> )	25,9	1,64 ( <i>s</i> )
5''	17,8	1,74 (3H, <i>s</i> )	18,1	1,79 ( <i>s</i> )
1'''	100,4	5,03 (1H, <i>d</i> ; 7,2)	101,7	5,1 ( <i>d</i> , 7,0)
2'''	73,5	3,32 (1H, <i>m</i> )	75,0	3,55 ( <i>t</i> , 9,2)
3'''	76,8	3,31 (1H, <i>m</i> )	78,3	3,51 ( <i>t</i> , 8,3)
4'''	69,8	3,19 (1H, <i>m</i> )	71,4	3,40 ( <i>t</i> , 9,1)
5'''	77,3	3,31 (1H, <i>m</i> )	78,4	3, 51 ( <i>m</i> )
6'''	60,8	3,73 (2H, <i>dd</i> , 10,2, 5,4)	62,2	3,95 ( <i>brd</i> , 11,9); 3,71 ( <i>dd</i> , 11,9, 6,1)

Thông qua bảng so sánh dữ liệu phổ của hợp chất (1) và hợp chất 6-( $\gamma,\gamma$ -dimethylallyl)kaempferol 7-*O*- $\beta$ -D-glucoside, (Bảng 1), số liệu khá tương hợp với nhau (dung môi ghi phổ khác biệt), hợp chất (1) được nhận danh là 6-( $\gamma,\gamma$ -dimethylallyl)kaempferol 7-*O*- $\beta$ -D-glucoside, có cấu trúc hóa học như Hình 1.



**Hình 1. Cấu trúc hoá học của hợp chất (1) 6-( $\gamma,\gamma$ -Dimethylallyl)kaempferol 7-*O*- $\beta$ -D-glucoside**

### 3.2. Xác định cấu trúc hợp chất (2)

Hợp chất (2) dạng tinh thể không màu, tan trong hệ dung môi C:Me (9:1), khi giải ly bán mỏng trong hệ dung môi EA:Me (9:1) cho vết duy nhất màu đỏ với thuộc hiện hình vaniline trong H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, R<sub>f</sub> = 0,4, hấp thụ UV 254 nm.

Phổ <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ<sub>H</sub> ppm, J Hz) của **2** cho thấy các tín hiệu trong vùng từ trường cao và trung bình: Hai tín hiệu đại diện cho proton nhóm methyl (-CH<sub>3</sub>) tại δ<sub>H</sub> 1,60 (3H, *s*) và 1,71 (3H, *s*) ppm. Một tín hiệu đại diện cho proton nhóm methyl (-CH<sub>3</sub>) liên kết với nguyên tố có độ âm điện mạnh như oxy tại δ<sub>H</sub> 3,62 ppm (3H, *s*) dự đoán là nhóm methoxy (-OCH<sub>3</sub>). Một tín hiệu proton nhóm methylene (-CH<sub>2</sub>) tại δ<sub>H</sub> 5,28 ppm (1H, *d*, J = 5,4 Hz).

Các tín hiệu đại diện cho proton thuộc vòng thơm, dựa trên hai mũi đôi ghép cặp với nhau lần

lượt là δ<sub>H</sub> 7,32 ppm (2H, *d*, J = 9); 6,79 ppm (2H, *d*, J = 9). Cho thấy 4 proton này cùng nằm trên một vòng thơm và đối xứng nhau. Một tín hiệu tại δ<sub>H</sub> 6,21 ppm (1H, *s*) là proton thuộc một vòng thơm khác. Ở vùng từ trường thấp có một tín hiệu proton δ<sub>H</sub> 12,02 ppm (1H, *s*) dự đoán là của proton chelate. Đây là tín hiệu điển hình cho khung hợp chất flavonol.

Phổ <sup>13</sup>C-NMR kết hợp với phổ DEPT (150 Hz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) cho thấy có 25 tín hiệu, đại diện cho 27 carbon, gồm 3 tín hiệu carbon bậc một, 2 tín hiệu carbon bậc hai, 11 tín hiệu carbon bậc ba và 9 tín hiệu carbon bậc bốn. Có hai tín hiệu carbon nhóm methyl (-CH<sub>3</sub>) tại δ<sub>C</sub> 17,8 và 25,6 pp, đồng thời có một tín hiệu carbon methylene (-CH<sub>2</sub>-) tại δ<sub>C</sub> 21,0 ppm, một tín hiệu carbon nhóm olefin (=CH-) tại δ<sub>C</sub> 122,5 ppm cùng với một tín hiệu carbon bậc bốn (>C<) tại δ<sub>C</sub> 130,6 ppm, nên dự đoán tồn tại nhóm prenyl (-CH<sub>2</sub>-CH=C-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

**Bảng 2.** So sánh dữ liệu phổ NMR của hợp chất (2) và 6-(γ,γ-Dimethylallyl) dihydrokaempferol 7-O-β-D-glucoside δ (ppm)

Vị trí C	Hợp chất (2) (600 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> )		6-(γ,γ-Dimethylallyl) dihydrokaempferol 7-O-β-D-glucoside (400 MHz, Acetone- <i>d</i> <sub>6</sub> )	
	δ <sub>C</sub>	δ <sub>H</sub> (số H, dạng mũi, J Hz)	δ <sub>C</sub>	δ <sub>H</sub> (số H, dạng mũi, J Hz)
2	83,2	-	84,5	5,11 ( <i>d</i> , 11,7)
3	71,8	-	73,3	4,70 ( <i>dd</i> , 4,2; 11,7)
4	199,1	-	199,2	-
5	160,6	-	160,9	-
6	109,9	-	111,4	-
7	163,2	-	164,6	-
8	94,1	6,21 ( <i>s</i> )	95,2	6,30 ( <i>s</i> )
9	159,5	-	162,0	-
10	101,8	-	102,7	-
1'	127,5	-	129,0	-
2'	129,6	7,31 (2H, <i>d</i> , 9)	130,3	7,43 ( <i>d</i> , 8,5)
3'	115,1	6,79 (2H, <i>d</i> , 9)	115,9	6,91 ( <i>d</i> , 8,5)
4'	157,9	-	158,9	-
5'	115,1	6,79 (2H, <i>d</i> , 9)	115,9	6,91 ( <i>d</i> , 8,5)
6'	129,6	7,31 (2H, <i>d</i> , 9)	130,3	7,43 ( <i>d</i> , 8,5)
1''	21,0	-	21,8	3,41 ( <i>dd</i> , 14,0; 7,6); 3,25 ( <i>dd</i> , 14,0; 7,6)
2''	122,5	5,28 (1H, <i>d</i> , 5,4)	123,5	5,28 ( <i>br t</i> , 7,3)
3''	130,6	-	131,4	-
4''	25,6	1,60 (3H, <i>s</i> )	25,8	1,64 ( <i>s</i> )
5''	17,8	1,71 (3H, <i>s</i> )	17,9	1,77 ( <i>s</i> )
1'''	100,1	4,9 (1H, <i>d</i> , 7,8)	101,4	5,08 ( <i>d</i> , 7,5)
2'''	74,0	-	74,6	3,57 ( <i>m</i> )
3'''	77,4	-	78,0	3,55 ( <i>m</i> )
4'''	69,7	-	71,1	3,78 ( <i>m</i> )
5'''	77,2	-	77,8	3,59 ( <i>m</i> )
6'''	61,3	-	62,5	3,87 ( <i>m</i> ); 3,69 ( <i>m</i> )

Trong hợp chất (2) có tín hiệu tại  $\delta_C$  51,6 ppm dự đoán là của carbon nhóm methoxy (-OCH<sub>3</sub>).

Khung flavonol được thể hiện qua các carbon (=CH-) của vòng thơm ở vùng từ trường trung bình tại  $\delta_C$  94,1; 115,1 (2C); 129,6 (2C) ppm; bảy tín hiệu carbon tứ cấp (>C<) của vòng thơm trong đó có bốn tín hiệu carbon liên kết với nguyên tố có độ âm điện mạnh như oxy tại  $\delta_C$  157,9; 159,5; 160,6; 163,2 ppm và một tín hiệu không liên kết với oxy tại  $\delta_C$  101,8 ppm; một tín hiệu carbon carbonyl (>C=O) tại  $\delta_C$  199,1 ppm. Nhưng với sự hiện diện đồng thời của 2 carbon oxymethine (>CH-O) tại  $\delta_C$  71,8; 83,2 ppm có thể dự đoán hợp chất (2) thuộc khung dihydroflavonol.

Năm tín hiệu carbon nhóm oxymethine (>CH-O) liên kết với nguyên tố có độ âm điện mạnh như oxy tại  $\delta_C$  100,1; 74,0; 77,4; 69,7; 77,2 ppm và một tín hiệu carbon của nhóm oxymethylene (-CH<sub>2</sub>-O) tại  $\delta_C$  61,3 ppm là những tín hiệu đặc trưng cho phân tử đường glucose với carbon anomer tại  $\delta_C$  100,1 ppm. Ngoài ra, căn cứ vào hằng số ghép cặp  $^3J_{aa} = 7,8$  Hz của proton anomer tại  $\delta_H$  4,9 ppm (1H, *d*, 7,8) cho thấy proton ở vị trí trục và nhóm hydroxy (-OH) ở vị trí xích đạo, dự đoán là phân tử đường  $\beta$ -D-glucose.

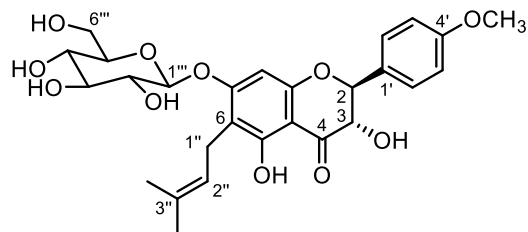
Hợp chất so sánh được chọn có dữ liệu phổ NMR phù hợp với biện luận trên là 6- $\gamma$ , $\gamma$ -Dimethylallyldihydrokaempferol 7-O- $\beta$ -D-glucoside. Từ những phân tích trên kết hợp so sánh chất đã công bố, (Bảng 2), nhìn chung các dữ liệu phổ tương hợp với nhau, có thể xác định cấu trúc hợp chất (2).

Thông qua Bảng 2 có thể thấy được các tín hiệu của hai hợp chất hoàn toàn trùng khớp với nhau. Tuy nhiên, hợp chất (2) có thêm 1 tín hiệu nhóm methoxy (-OCH<sub>3</sub>)  $\delta_C$  51,6 ppm và không thấy xuất hiện tín hiệu proton nhóm hydroxyl (-OH) phenol nào khác ngoại trừ proton chelate nên dự đoán nhóm methoxy sẽ gắn tại C4' là cấu trúc của hợp chất (2) hoàn chỉnh.

Tiến hành đo độ quay cực  $[\alpha]_D^{31}$  của hợp chất (2) cho kết quả  $[\alpha]_D^{31}$ : +14° (c 0,1, MeOH). Về tính phân cực quang học, hợp chất so sánh 6- $\gamma$ , $\gamma$ -Dimethylallyldihydrokaempferol 7-O- $\beta$ -D-glucoside có độ quay cực  $[\alpha]_D^{25}$ : -18 (c 0,1, MeOH) ở dạng lập thể là (2*R*,3*R*), nên hợp chất (2) được đề

nghị là đối phân của chất so, cấu dạng lập thể (2*S*,3*S*).

Vì vậy, đề nghị cấu trúc của hợp chất (2) là (2*S*,3*S*) 4'-Methoxy-6- $\gamma$ , $\gamma$ -dimethylallyldihydrokaempferol 7-O- $\beta$ -D-glucoside.



Hình 2. Công thức cấu tạo lập thể của hợp chất (2)

### 3.3. Kết quả thử hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định

Hiệu quả ức chế các chủng vi sinh vật kiểm định được trình bày ở Bảng 3.

Kết quả cho thấy cả hai mẫu đều thể hiện hoạt tính kháng khuẩn tốt đối với các chủng vi khuẩn Gram (+), chưa tốt với các chủng Gram (-) và không có khả năng kháng nấm. Như các mẫu thử khác, giá trị kháng khuẩn vẫn còn thấp hơn so với chất đối chứng thương mại là Ampicillin.

Trong đó, hợp chất (1) diệt tụ cầu khuẩn *S. aureus* rất tốt với  $IC_{50} = 61,47 \pm 0,67$   $\mu$ g/mL cao hơn hợp chất (2) gấp 3,2 lần với  $IC_{50} = 194,6 \pm 5,38$   $\mu$ g/mL. Sự chênh lệch này liên quan đến sự khác nhau về cấu trúc của hợp chất (1) và (2). Các nhóm phenol trong flavonoid quy định hoạt tính kháng khuẩn và hoạt tính này tăng lên khi flavonoid có nhiều nhóm phenol. Hợp chất (1) là flavonol nên kháng khuẩn tốt, còn ở hợp chất (2) là hợp chất flavan ít nhóm phenol hơn và nhóm phenol tại C-4' đã bị thay thế bằng nhóm methoxy nên cho hoạt tính kháng khuẩn kém hơn so với hợp chất (1) (Hương, 2017).

Điều này cho thấy hợp chất (1) có tiềm năng được sử dụng như chất bổ trợ để phối hợp với nhiều loại kháng sinh khác dùng điều trị các chứng liên quan đến *Staphylococcus aureus*. Bên cạnh đó, cả hai hợp chất (1) và hợp chất (2) cũng thể hiện khả năng kháng khuẩn vi khuẩn *B. subtilis* nhưng ở nồng độ lớn hơn 256  $\mu$ g/mL.

**Bảng 3. Hoạt tính kháng vi sinh vật và nấm kiểm định của hợp chất (1) và hợp chất (2)**

Tên mẫu	Giá trị (µg/mL)	% ức chế các chủng vi khuẩn Gram (+)			% ức chế các chủng vi khuẩn Gram (-)			Nấm
		<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>L. fermentum</i>	<i>S. enterica</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	
Hợp chất (1)	256	73	27	17	3	2	1	0
	64	52,5	19	0	0	0	0	0
	16	5	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0
	IC <sub>50</sub>	<b>61,47±0,67</b>	>256	>256	>256	>256	>256	>256
MIC	<b>&gt;256</b>	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256
Hợp chất (2)	256	66,5	37	20	8	2	0	0
	64	15	30	3	5	0	0	0
	16	3	16	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0
	IC <sub>50</sub>	<b>194,6±5,38</b>	>256	>256	>256	>256	>256	>256
MIC	<b>&gt;256</b>	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256
Ampicillin	IC <sub>50</sub>	0,02±0,005	3,62±0,15	1,03±0,07				
	MIC	0,125±0,0	32±0,0	32±0,0				

**3.4. Kết quả thử hoạt tính gây độc tế bào**

Ở nồng độ mẫu thử 256 µg/mL, phần trăm ức chế dòng tế bào ung thư vú MCF-7 của hợp chất (2) cao hơn hợp chất (1) gấp 2,2 lần, cũng như gấp 2,3 lần đối với tế bào ung thư phổi A549; còn ở nồng độ nhỏ (64 µg/mL) hợp chất (1) không thể hiện hoạt tính đối với cả hai dòng tế bào.

Kết quả thử nghiệm là hợp chất (1) không thể hiện hoạt tính ở mức nồng độ ứng dụng, hợp chất (2) ức chế tốt đối với cả hai dòng tế bào ung thư, xác định được các giá trị IC<sub>50</sub> lần lượt là 152,00±8,5 µg/mL (đối với tế bào ung thư vú MCF7) và 245,13±12,6 µg/mL (đối với dòng tế bào ung thư phổi A549).

**Bảng 4. Giá trị trung bình phần trăm (%) ức chế dòng tế bào ung thư vú MCF7 và ung thư phổi A549**

Tên mẫu	Giá trị (µg/mL)	Phần trăm ức chế dòng tế bào ung thư vú MCF7 (%) theo nồng độ (µg/mL)	Phần trăm ức chế dòng tế bào ung thư phổi A549 (%) theo nồng độ (µg/mL)
Hợp chất (1)	256	28	23
	64	0	0
	16	0	0
	4	0	0
	IC <sub>50</sub>	>256	>256
Hợp chất (2)	256	63	53
	64	39	0
	16	0	0
	4	0	0
	IC <sub>50</sub>	<b>152,00±8,5</b>	<b>245,13±12,6</b>

Nguyên nhân ức chế tế bào ung thư trội hơn có nhiều lý do tùy thuộc nhóm chất, không thể chỉ dự đoán một chiều, mà cần xét trên tổng thể với nhiều khía cạnh. Tuy vậy, giả thuyết khả năng kháng ung thư của hợp chất (2) có thể liên quan đến khung dihydrokaempferol. Theo công bố từ nghiên cứu của Chunhakant & Chaicharoenpong (2019) hợp chất (+)-dihydrokaempferol có hoạt tính gây độc tế bào mạnh ở tế bào ung thư biểu mô vú (BT474) với IC<sub>50</sub>

= 11,66 ± 0,42 µg/mL và tế bào ung thư biểu mô phế quản phổi (Chago-K1) với IC<sub>50</sub> = 12,32 ± 0,73 µg/mL và nghiên cứu của Rho et al. (2011) cho thấy hợp chất Kaempferol không cho hoạt tính gây độc tế bào.

**4. KẾT LUẬN**

Hai hợp chất phân lập được từ cao dichloromethane của nhị hoa mai vàng *Ochna integerrima* L. và định danh là 6-(γ,γ-



dimethylallyl)kaempferol 7-*O*- $\beta$ -D-glucoside (**1**) và (2*S*, 3*S*) 4'-methoxy-6- $\gamma$ , $\gamma$ -dimethylallyldihydrokaempferol 7-*O*- $\beta$ -D-glucoside (**2**). Cả hai thể hiện khả năng kháng khuẩn tốt với chủng khuẩn Gram dương *Staphylococcus aureus* hợp chất (**1**) diệt khuẩn mạnh hơn với IC<sub>50</sub> = 61,47±0,67  $\mu$ g/mL, bên cạnh đó, hợp chất (**2**) có IC<sub>50</sub> 194,6±5,38  $\mu$ g/mL. Hơn nữa hợp chất (**2**) thể

hiện ức chế mạnh ở dòng tế bào ung thư vú MCF7 (IC<sub>50</sub> = 152,00±8,5  $\mu$ g/mL) và gây độc khá tốt ở dòng tế bào ung thư phổi A549 (IC<sub>50</sub> = 245,13±12,6  $\mu$ g/mL). Các khảo sát từ nhị hoa của cây mai, vốn là một nguồn phế phẩm sau mùa hoa Tết, lại hứa hẹn là nguồn dược liệu tiềm năng, cung cấp kháng sinh và kháng ung bướu tốt có thể ứng dụng vào đời sống.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ania, O. P., Arranz, J. C. E., Beaven, M., Cos, P., Macedo, M. B., Maury, G. L., Miladis, I. C. P., Renato P. R., Tavares, J. F., Silva, M. S. D., & Yordania, M. G. (2017). Bioassay-guided-in vitro study of the antimicrobial and cytotoxic properties of the leaves from *Excoecaria lucida* S.; *Pharmacognosy Res.*, 9(4), 396-400. [https://doi.org/10.4103/pr.pr\\_124\\_16](https://doi.org/10.4103/pr.pr_124_16)
- Bandi, A. K. R., Lee, D. U., Tih, R. G., Gunasekar, D., & Bodo, B. (2012). Phytochemical and biological studies of *Ochna* species. *Chemistry & Biodiversity*, 9(2), 251-271. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201100164>
- Buranusudja, V., Kobtrakul, K., Vimolmangkang, S., Binalee, A., Sanookpan, K., Thien-Y. Vu, Long, H. V. K., Bao, L., Huy, N. T., Kiep, Đ. M., Son, Đ. V., & Hien, N. M. (2022). Some Antioxidant Properties of Components from the Flower of *Ochna integerrima* and Their Beneficial Effects on HaCaT Keratinocytes and *in Silico* Analysis on Tyrosinase. *Chemistry & Biodiversity*, 19(4). <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/cbdv.202100882>.
- Cos, P., Vlietinck, A. J., Berghe, D. V. and Maes, L. (2005). Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. *106*(3), 290-302.
- Cos, P., Maes, L., Sindambiwe, J. B., & Vlietinck, A. J. (2006). Bioassays for antibacterial and antifungal activities. In. *Biological screening of plant constituents: training manual/Gupta, Mahabir P.*[edit.]. 19-28.
- Chunhakant, S., & Chaicharoenpong, C. (2019). Antityrosinase, antioxidant, and cytotoxic activities of phytochemical constituents from *Manilkara zapota* L. Bark. *Molecules*, 24(15), 2798. <https://doi.org/10.3390/molecules24152798>
- Hadacek, F., & Greger, H. (2000). Test of antifungal natural products: Methodologies, comparability of results and assay choice, *Phytochemical Analysis*, 11(3), 137-147. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1565\(200005/06\)11:3%3C137::AID-PCA514%3E3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1565(200005/06)11:3%3C137::AID-PCA514%3E3.0.CO;2-I)
- Huong, T. N. L (2017). *Hóa học hợp chất thiên nhiên*. NXB Đại học Cần Thơ. 162-163.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1-2), 55-63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
- Miliauskas, G., Venskutonis, P., & Van Beek, T. (2004). Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food chemistry*, 85(2), 231-237. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.05.007>
- Malacrida, A., Cavalloro, V., Martino, E., Cassetti, A., Nicolini, G., Rigolio, R., & Miloso, M. (2019). Anti-multiple myeloma potential of secondary metabolites from *Hibiscus sabdariffa*. *Molecules*, 24(13), 2500. <https://doi.org/10.3390/molecules24132500>
- Reutrakul, V., Ningnuek, N., Pohmakotr, M., Yoosook, C., Napaswad, C., Kasisit, J., Santisuk, T., & Tuchinda, P. (2007). Anti HIV-1 flavonoid glycosides from *Ochna integerrima*. *Planta Med.*, 73(07), 683-688. <https://doi.org/10.1055/s-2007-981538>
- Rho, H. S., Ghimeray, A. K., Yoo, D. S., Ahn, S. M., Kwon, S. S., Lee, K. H., & Cho, J. Y. (2011). Kaempferol and kaempferol rhamnosides with depigmenting and anti-inflammatory properties. *Molecules*, 16(4), 3338-3344. <https://doi.org/10.3390/molecules16043338>
- Scudiero, D. A., Shoemaker, R. H., Paull, K. D., Monks, A., Tierney, S., Nofziger, T. H., & Boyd, M. R. (1988). Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer research*, 48(17), 4827-4833.
- Seephonkai, P., Mongkolsiri, N., Thiabphet, W., Traisathit, R., Selak, S., Wongpakam, K., & Sangdee, A. (2021). Antioxidant, xanthine oxidase inhibitory and antibacterial activities of selected galactogogue Thai medicinal plant water and ethyl acetate extracts. *Journal of Research in Pharmacy (online)*, 25(4), 519-530. <https://doi.org/10.29228/jrp.42>
- Traisathit, R., & Seephonkai, P. (2021). Chemical composition profile and antioxidant activity of Thai medicinal plant-derived galactogogues extracts (Doctoral dissertation, Mahasarakham University).