



KHẢO SÁT HOẠT TÍNH SINH HỌC MỘT HỢP CHẤT FLAVONOID GLUCOSIDE PHÂN LẬP TỪ CAO ETHYL ACETATE HOA MAI VÀNG (*Ochna integerrima* (LOUR.) MERR.)

Huỳnh Thị Tú Đào¹, Trần Thanh Thảo², Phùng Kim Ngân¹, Nguyễn Ý Nhi¹, Nguyễn Huỳnh Phú¹ và Tôn Nữ Liên Hương^{3*}

¹Sinh viên Hóa dược K44, Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ

²Học viên cao học Hóa hữu cơ K27, Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ

³Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ

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

ABSTRACT

From the flowers of *Ochna integerrima*, a dihydroflavonol glucoside was isolated and studied its biological activities. The ethyl acetate extract (EA-extract) of this material displayed very good biological activities as the antioxidant with the IC_{50} value of 2.27 $\mu\text{g/mL}$, (two times better than the control ascorbic acid), and as the inhibitor of α -glucosidase enzyme with the value of $IC_{50} = 0.22 \pm 0.05 \mu\text{g/mL}$, (over 800 times stronger than the control acarbose). Moreover, the EA-extract well inhibited a Gram-positive strain ($IC_{50} = 136.0 \pm 3.09 \mu\text{g/mL}$). The chemical structure of an isolated compound from the EA-extract was elucidated as 6- γ , γ -dimethylallyldihydrokaempferol 3-O- β -D-glucopyranoside based on spectroscopic analysis of NMR, HR-MS data and in comparison with the published reliable articles. This is the new compound that has never been published for the *Ochna* genus. This compound expressed good antioxidant activity ($IC_{50} = 7.34 \mu\text{g/mL}$, in DPPH testing), weak inhibitory activities for microorganism and acetylcholinesterase enzyme ($IC_{50} > 256 \mu\text{g/mL}$). In the test on acetylcholinesterase enzyme, the EA-extract expressed better inhibitory concentration ($IC_{50-EA\text{-extract}} = 128.00 \pm 9.67 \mu\text{g/mL}$) than the isolated compound. In addition, both the EA-extract and the compound showed weak inhibition on the cancer cell lines of KB and Hep-G2 ($IC_{50} > 256 \mu\text{g/mL}$).

TÓM TẮT

Từ hoa mai vàng, một dihydroflavonol glucoside đã được phân lập và khảo sát các hoạt tính sinh học. Cao ethyl acetate (cao EA) của hoa mai vàng có hoạt tính sinh học rất tốt như là chất kháng oxy hóa với IC_{50} là 2,27 $\mu\text{g/mL}$, (gấp 2 lần chất đối chứng acid ascorbic) và ức chế enzyme α -glucosidase với giá trị $IC_{50} = 0,22 \pm 0,05 \mu\text{g/mL}$ (mạnh hơn 800 lần chất đối chứng Acarbose). Cao EA ức chế một chủng vi khuẩn Gram dương ($IC_{50} = 136,0 \pm 3,09 \mu\text{g/mL}$). Cấu trúc hóa học của hợp chất phân lập từ cao EA được làm sáng tỏ bằng phân tích phổ nghiệm NMR và HR-MS và so sánh với các bài báo đã xuất bản, là 6- γ , γ -dimethylallyldihydrokaempferol 3-O- β -D-glucopyranoside. Tìm hiểu tổng quan xác nhận đây là một hợp chất mới trong chi *Ochna*. Hợp chất thể hiện tính kháng oxy hóa tốt ($IC_{50} = 7,34 \mu\text{g/mL}$), nhưng lại yếu trong ức chế vi sinh vật và enzyme acetylcholineesterase ($IC_{50} > 256 \mu\text{g/mL}$). Trong thử nghiệm trên enzyme acetylcholinesterase gây bệnh Alzheimer, cao EA có nồng độ ức chế tốt hơn của hợp chất ($IC_{50-EA\text{-extract}} = 128,00 \pm 9,67 \mu\text{g/mL}$). Ngoài ra, cao và hợp chất đều ức chế yếu trên các dòng tế bào ung thư KB và Hep-G2.

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 21/05/2022

Ngày nhận bài sửa: 22/06/2022

Ngày duyệt đăng: 28/06/2022

Title:

Surveying the biological activities of an isolated glucoside flavonoid from the ethyl acetate extract of flowers of the species *Ochna integerrima* (Lour.) Merr.

Từ khóa:

Kháng oxy hóa, kháng vi sinh vật kiểm định, *Ochna integerrima* L. Merr., α -glucosidase

Keywords:

Antioxydant, antimicroorganism, *Ochna integerrima* L. Merr., α -glucosidase

1. GIỚI THIỆU

Trong thời đại tiến bộ của khoa học công nghệ hiện nay, ngày càng có nhiều nghiên cứu để tìm thêm những hoạt chất sinh học trong các loài được liệu đem lại lợi ích cho cuộc sống. Hiện nay, trên thế giới, nghiên cứu phân lập các hợp chất tự nhiên từ cây mai vàng và những cây cùng chi *Ochna* đã cho thấy chi này chứa nhiều flavonoid, anthranoid, triterpenoid, steroid và acid béo (Reutrakul et al., 2007). Thêm vào đó, kết quả nghiên cứu về hoạt tính sinh học ở Thái Lan cho thấy dịch chiết ethanol của loài này có khả năng kháng oxy hóa mạnh (Seephonkai et al., 2019). 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* L.) là cần thiết và mang tính thời sự. Trong bài viết này, kết quả phân lập hợp chất từ cao chiết ethyl acetate của hoa mai vàng được đề cập, sau khi tiến hành khảo sát các hoạt tính sinh học trên cao chiết, đồng thời khảo sát lại hoạt tính của hợp chất được phân lập.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Quy trình thí nghiệm chung

Dung môi hữu cơ 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 F₂₅₄ (Merck). Hóa chất thử hoạt tính kháng oxy hóa DPPH, DMSO (dimethyl sulfoxide), methanol (Merck).

Phổ ¹H-NMR (600 MHz) và ¹³C-NMR (150 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 (Merk) được mua từ Viện Kiểm nghiệm thuốc, thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam.

Nguyên liệu

Nguyên liệu là cánh hoa mai vàng (*Ochna integerrima* L.) thu tại địa bàn tỉnh Sóc Trăng, 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: Sau khi thu hái, nguyên liệu hoa tươi được rửa sạch, phơi trong bóng

râm và sấy khô ở nhiệt độ 60°C. Sau đó, nguyên liệu được xay thành bột mịn (4,8 kg) cho vào các túi vải trắng (10×20 cm), buộc kín miệng và đặt vào bình thủy tinh lớn có nắp đậy. Túi bột hoa mai vàng được ngâm trong bình chứa methanol với mực dung môi cao hơn các túi chứa bột mẫu, các bình được đậy kín. Sau 24 giờ, dung môi sau khi ngâm chiết được lọc qua giấy lọc, cô quay thu hồi methanol. Tiếp theo, Methanol thu hồi được cho vào bình chiết, quá trình chiết được lặp đi lặp lại nhiều lần cho đến khi chiết kiệt các chất trong nguyên liệu (Phụng, 2007).

Cao MeOH (cao tổng) thu được sau khi cô quay thu hồi dung môi có dạng sệt, khối lượng là 411 g. Cao tổng hòa tan trong một lượng nước cất vừa phải xấp xỉ 1:1 (v/v) thu được cao MeOH/H₂O, được chiết lỏng-lỏng với các dung môi có độ phân cực tăng lần lượt là *n*-hexane (Hex), ethyl acetate (EA) (Phụng, 2007), rồi cô quay để có các cao phân cực khác biệt. Cao ethyl acetate thu được có khối lượng 50 g. Tiến hành sắc ký cột pha thường với hệ dung môi Hex:EA và EA:MeOH theo độ phân cực tăng dần thu được 12 phân đoạn, lần lượt từ EA1-12. Phân đoạn EA3 (7,6 g) tiếp tục được sắc ký cột với hệ dung môi CHCl₃:MeOH tăng dần thu được 6 phân đoạn nhỏ EA3.1-3.6. Tiếp tục sắc ký cột phân đoạn EA3.3 với hệ dung môi rửa giải CHCl₃:MeOH tăng dần tính phân cực thu được hợp chất HOAOI-EA03 dạng bột màu trắng.

Thử nghiệm kháng oxy hóa được thực hiện tại Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ

Thử nghiệm kháng vi sinh vật kiểm định theo phương pháp pha loãng nồng độ trên môi trường lỏng, hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase, hoạt tính ức chế enzyme acetylcholinesterase, hoạt tính gây độc tế bào trên *in-vitro* thực hiện tại phòng Hóa Sinh ứng dụng, Viện Hóa học, Viện Hàn Lâm Khoa học Công nghệ Việt Nam.

2.2. Khảo sát khả năng kháng oxy hóa bằng phương pháp trung hòa gốc tự do DPPH

Hoạt tính trung hòa gốc tự do được khảo sát theo phương pháp 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH). Khả năng kháng oxy hóa của chất HOAOI-EA03 và cao EA được xác định theo miêu tả của Tailor Chandra Shekhar và Goyal Anju (2014). Hỗn hợp phản ứng gồm 0,5 mL DPPH (0,1 mM) và 1,5 mL chất EA3.3.4 và cao EA (ở các nồng độ 0, 10, 20, 30, 40, 50 μ g/mL). Hỗn hợp phản ứng được ủ trong tối ở nhiệt độ phòng trong thời gian 30 phút. Sau đó, độ hấp thụ quang phổ của DPPH được đo ở bước sóng 517 nM. Chất đối chứng được sử dụng là acid ascorbic ở các nồng độ khảo sát: 0; 1,5; 3; 4,5;

6 và 7,5 µg/mL. Tỷ lệ giảm độ hấp thụ quang phổ của DPPH ở bước sóng 517 nM khi có và không có chất oxy hóa được xác định để tính hiệu suất phản ứng. Hiệu quả kháng oxy hóa 50% (IC₅₀) được tính dựa vào đường chuẩn $y=ax + b$. Hoạt tính kháng oxy hóa của mẫu càng cao, thể hiện qua giá trị IC₅₀ loại bỏ gốc tự do càng nhỏ.

2.3. Khảo sát hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định

Các chủng vi sinh vật kiểm định: *Bacillus subtilis* (ATCC 6633): là trực khuẩn gram (+), sinh bào tử, thường không gây bệnh. *Staphylococcus aureus* (ATCC 13709): cầu khuẩn gram (+), gây mụn các vết thương, vết bỏng, gây viêm họng, nhiễm trùng có mụn trên da và các cơ quan nội tạng. *Lactobacillus fermentum* (N4): vi khuẩn gram (+), là loại vi khuẩn đường ruột lên men có ích, thường có mặt trong hệ tiêu hóa của người và động vật.

Escherichia coli (ATCC 25922): vi khuẩn gram (-), gây một số bệnh về đường tiêu hóa như viêm dạ dày, viêm đại tràng, viêm ruột, viêm lý trực khuẩn. *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442): vi khuẩn gram (-), trực khuẩn mũ xanh, gây nhiễm trùng huyết, các nhiễm trùng ở da và niêm mạc, gây viêm đường tiết niệu, viêm màng não, màng trong tim, viêm ruột. *Salmonella enterica*: vi khuẩn gram (-), vi khuẩn gây bệnh thương hàn, nhiễm trùng đường ruột ở người và động vật. *Candida albicans* (ATCC 10231): nấm men, thường gây bệnh tưa lưỡi ở trẻ em và các bệnh phụ khoa.

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. Các giá trị thể hiện hoạt tính là IC₅₀ (50% Inhibitor Concentration: nồng độ ức chế 50%), MIC (Minimum Inhibitor Concentration: nồng độ ức chế tối thiểu), MBC (Minimum Bactericidal Concentration: nồng độ diệt khuẩn tối thiểu) và MFC (Minimum Fungicidal Concentration: nồng độ diệt nấm tối thiểu), (Hadacek and Greger, 2000; Cos et al., 2006; Cos et al., 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 4-10 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 5x10⁵ CFU/mL và nồng độ nấm đạt 1x10³ CFU/mL.

Ta lấy 10µL dung dịch mẫu thử ở các nồng độ vào đĩa 96 giếng, thêm 190 µL dung dịch vi khuẩn và nấm đã được hoạt hóa ở trên, ủ ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 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 MBC/MFC được xác định bằng cách cấy dung dịch tại giếng có đã xác định giá trị MIC lên đĩa thạch và không có vi sinh vật kiểm định nào mọc trở lại sau 24 giờ. Giá trị IC₅₀ được xác định thông qua giá trị % ức chế vi sinh vật phát triển và phần mềm máy tính Rawdata.

$$(\%) \text{ Ức chế tế bào} = \frac{OD_{\text{chứng (+)}} - OD_{\text{mẫu thử}}}{OD_{\text{chứng (+)}} - OD_{\text{chứng (-)}}} \times 100\% \quad (1)$$

$$IC_{50} = High_{\text{Conc}} - \frac{(High_{\text{Inh}\%} - 50) \times (High_{\text{Conc}} - Low_{\text{Conc}})}{High_{\text{Inh}\%} - Low_{\text{Inh}\%}} \quad (2)$$

(Trong đó, HighConc/LowConc: chất thử ở nồng độ cao/chất thử thấp ở nồng độ thấp; HighInh%/LowInh%: % ức chế ở nồng độ cao/% ức chế ở nồng độ thấp).

Đánh giá hoạt tính: dịch chiết có IC₅₀ < 100 µg/mL, chất sạch có IC₅₀ < 25 µM. Hoặc, mẫu thô có MIC ≤ 200 µg/mL, chất sạch có MIC ≤ 50 µg/mL.

2.4. Khảo sát hoạt tính ức chế enzyme α-glucosidase

α-glucosidase là enzyme then chốt trong quá trình thủy phân carbohydrate tạo glucose trong cơ thể người. Do đó, các chất ức chế α-glucosidase có thể làm chậm quá trình giải phóng và hấp thụ glucose, qua đó không làm tăng đường huyết sau ăn. Vì vậy, một số chất ức chế α-glucosidase như Acarbose và Miglitol đã được sử dụng rộng rãi trong điều trị tiểu đường type 2.

Dựa trên phản ứng phân cắt cơ chất p-nitrophenyl-α-D-glucopyranoside nhờ tác động của enzyme α-glucosidase, qua đó giải phóng sản phẩm là p-nitrophenol có màu vàng. Độ hấp thụ của hỗn

hợp phản ứng tại bước sóng 410 nM ở thời điểm 30 phút sau phản ứng, phản ánh lượng sản phẩm *p*-Nitrophenol sinh ra, qua đó phản ánh hoạt độ của enzyme α -glucosidase. (Haimin et al., 2004; Kim et al., 2004; Li et al., 2005; Hakamata et al., 2009)

Cách tiến hành:

Phương pháp xác định hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase được thực hiện trên đĩa 96 giếng với tổng thể tích phản ứng là 200 μ L/giếng.

Mẫu thử được pha loãng bằng MEOD 100% hoặc nước cất vô trùng đến nồng độ cuối cùng trong phản ứng là 256, 64, 16, 4, 1 và 0,25 μ g/mL. Acarbose được sử dụng làm chất tham khảo.

Các thành phần phản ứng bao gồm: Đệm phosphate 100 mM, pH 6,8; α -glucosidase 0,4 U/mL; mẫu thử và *p*-nitrophenyl α -D-glucopyranoside 2,5 mM.

Ở mẫu đối chứng âm, mẫu thử được thay bằng đệm phản ứng. Thí nghiệm được ủ ở nhiệt độ 37°C. Sau 30 phút, phản ứng được dừng bằng 100 μ L Na₂CO₃. Độ hấp thụ của phản ứng được xác định trên máy Tecan GENios với bước sóng 405 nM (A).

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

$$\text{Độ ức chế (\%)} = \frac{A_{(\text{đối chứng âm})} - A_{(\text{mẫu thử})}}{A_{(\text{đối chứng âm})}} \times 100\% \quad (3)$$

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

2.5. Khảo sát hoạt tính ức chế enzyme acetylcholinesterase (AChE)

Acetylcholine (ACh) là một trong những chất dẫn truyền xung điện giữa các tế bào thần kinh, đây là enzyme thủy phân cầu nối ester trong phân tử ACh để tạo ra choline và acid acetic. Ở bệnh nhân Alzheimer, nồng độ chất dẫn truyền thần kinh ACh giảm trầm trọng và ảnh hưởng đến khả năng nhận thức của người bệnh. Do đó, những chất có tác dụng ức chế AChE sẽ làm tăng nồng độ ACh và kéo dài thời gian hoạt động của ACh ở synap thần kinh, từ đó cải thiện triệu chứng của bệnh. Donepezil ức chế hoạt động của acetylcholinesterase trong hồng cầu người, tăng nồng độ acetylcholine ngoại bào trong vỏ não và hồi hải mã của chuột.

Nguyên tắc của phương pháp: cơ chất acetylthiocholin iodide (ATCI) bị thủy phân nhờ xúc tác của AChE tạo thiocholin. Sản phẩm thiocholine phản ứng với thuốc thử acid 5-5'-dithiobis-2-nitrobenzoic (DTNB) tạo thành hợp chất acid 5-thio-2-nitrobenzoic có màu vàng. Lượng hợp chất màu được tạo thành này tỷ lệ thuận với hoạt động của AChE. Dựa vào cường độ màu của mẫu thử ở bước sóng 412 nM để đánh giá hoạt tính của AChE của chất thử. (Ellman et al., 1961; Min et al., 2010; Gauresh et al., 2015)

Cách tiến hành:

Thí nghiệm được thực hiện trên đĩa 96 giếng với tổng thể tích là 200 μ L:

Dung dịch được lần lượt thêm vào hỗn hợp, gồm có: dung dịch đệm tris-HCl (pH=8), mẫu thử và dung dịch enzyme 0,25 IU/mL vào từng giếng của đĩa 96 giếng.

Hỗn hợp các dung dịch này được trộn đều và ủ trong thời gian 15 phút ở nhiệt độ 25°C.

Sau đó, dung dịch thuốc thử DTNB 2,4 mM và dung dịch cơ chất ATCI 2,4 mM lần lượt được thêm vào hỗn hợp và trộn đều.

Tiếp tục, hỗn hợp được ủ trong thời gian 15 phút ở nhiệt độ 25°C và đo độ hấp thụ ở bước sóng 412 nM.

Mỗi mẫu thử được tiến hành làm lặp lại 3 lần. Chất tham chiếu là Donepezil.

Xử lý kết quả thực nghiệm

Số liệu thực nghiệm được tổng hợp và xử lý bằng phương pháp thống kê thường dùng trong y sinh học với sự trợ giúp của phần mềm Microsoft Excel 2007.

Hoạt tính ức chế AChE của mẫu thử được tính theo công thức:

$$\text{(\%)} \text{ Ức chế} = \frac{A_{(\text{đối chứng})} - A_{(\text{mẫu thử})}}{A_{(\text{đối chứng})}} \times 100\% \quad (4)$$

IC₅₀ là nồng độ chất thử ức chế 50% hoạt động của enzyme được tính bằng phần mềm Tablecurve dựa vào % ức chế.

Đánh giá hoạt tính của chất thử bằng cách so sánh với chất tham chiếu.

Kết quả thí nghiệm được biểu thị bằng giá trị trung bình cộng/trừ độ lệch chuẩn, ký hiệu: $\bar{X} \pm SD$. Trong đó, độ lệch chuẩn (SD) được tính theo công thức:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum(X_i - \bar{X})^2}{n - 1}} \quad (5)$$

2.6. Khảo sát hoạt tính gây độc tế bào trên *in-vitro*

Hoạt tính gây độc tế bào được thực hiện dựa trên phương pháp MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium), được mô tả lần đầu tiên bởi Mosman et al. (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 MEOD và đo mật độ quang (OD) ở bước sóng 540 nM. Giá trị thể hiện hoạt tính là IC₅₀ (nồng độ chất thử ức chế 50% sự phát triển của tế bào) (Mosman, 1983; Scudiero et al., 1988; Malacrida et al., 2019).

Chất đối chiếu Ellipticine là chất có thể được chiết xuất từ lá cây hoa hồng. Ellipticine tiêu diệt hiệu quả tế bào ung thư thông qua việc phá hủy deoxyribonucleic acid.

Cách tiến hành:

Trypsin hóa tế bào thí nghiệm để làm rời tế bào và đếm trong buồng đếm tế bào. Tiếp đó, pha tế bào bằng môi trường sạch và điều chỉnh mật độ cho phù hợp với thí nghiệm (khoảng 1-3x10⁴ tế bào/mL tùy theo từng dòng tế bào).

Ta lấy 10 µL chất thử đã chuẩn bị ở trên và 190 µL 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 µL MTT (5 mg/mL) trong 4 giờ. Sau khi loại bỏ môi trường, tinh thể formazan được hòa tan bằng 100 µL MEOD 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 IC₅₀ được xác định thông qua giá trị % ức chế tế bào phát triển và phần mềm máy tính Rawdata.

$$\% \text{ Ức chế tế bào} = \frac{OD_{\text{chứng (+)}} - OD_{\text{mẫu thử}}}{OD_{\text{chứng (+)}} - OD_{\text{chứng (-)}}} \times 100\% \quad (6)$$

$$IC_{50} = High_{Conc} - \frac{(High_{Inh\%} - 50) \times (High_{Conc} - Low_{Conc})}{High_{Inh\%} - Low_{Inh\%}} \quad (7)$$

(Trong đó, High_{Conc}/Low_{Conc}: chất thử ở nồng độ cao/chất thử thấp ở nồng độ thấp; High_{Inh%}/Low_{Inh%}: % ức chế ở nồng độ cao/% ức chế ở nồng độ thấp).

Đánh giá hoạt tính

Giá trị IC₅₀ ≤ 20 µg/mL (với dịch chiết thô) và IC₅₀ ≤ 4 µg/mL (với chất sạch) được đánh giá là có hoạt tính gây độc tế bào.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Xác định cấu trúc và định danh hợp chất

Phổ ¹H-NMR (600 MHz, MeOD, δ_H ppm, J Hz) của HOAOI-EA03 cho thấy các tín hiệu đa số trong vùng từ trường trung bình. Các tín hiệu proton oxymethine (>CH-O) tại δ_H (ppm) 3,53 (1H, m), 3,52 (1H, m), 3,69 (1H, m), 3,54 (1H, m), proton của nhóm oxymethylene (-CH₂-O) tại 3,88 (1H, d), 3,86 ppm (1H, d, J=12 Hz) và proton anomer tại δ_H 5,01 ppm (1H, d, J=7,8). Các tín hiệu được dự đoán là của phân tử đường glucose, cấu dạng β.

Các tín hiệu tại δ_H (ppm) 7,38 (2H, d, J = 8,4) và 6,86 (2H, d, J = 8,5) được dự đoán là proton của vòng thơm trong khung flavon có nhóm thế vị trí para. Ngoài ra, có 1 tín hiệu proton thơm tại 6,30 (1H, s) của vòng thơm khác có 5 vị trí thế trong hợp chất. Thêm hai tín hiệu proton của nhóm oxymethine (>CH-O) tại δ_H 5,03 (1H, t) và 4,60 (1H, s), chứng tỏ khung chất có dạng dihydroflavon.

Các tín hiệu proton của hai nhóm methyl tại δ_H (ppm) 1,66 (3H, s), 1,79 (3H, s), proton nhóm methylene tại [3,41 (1H, m), 3,28 ppm (1H, m)] cùng với một proton olefine tại 5,24 (1H, m) cho phép nhận dạng nhóm prenyl.

Phổ ¹³C-NMR (150 MHz, MeOD, δ_C ppm) kết hợp với phổ DEPT cho thấy hợp chất HOAOI-EA03 có 26 tín hiệu carbon bao gồm 2 nhóm methyl, 2 nhóm methylene, 11 nhóm methine và 11 carbon bậc 4 cụ thể như sau:

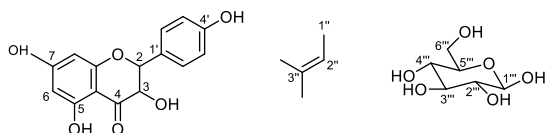
Các tín hiệu carbon thuộc vòng thơm: Hai tín hiệu có cường độ gấp đôi tại δ_C 130,4 ppm và 116,2 ppm, là của hai cặp carbon đối xứng nhau. Hai tín hiệu carbon của nhóm oxymethine (>CH-O) tại δ_C (ppm) 95,3 và 85,2; tín hiệu carbon carbonyl (>C=O) tại δ_C 199,6 chứng tỏ khung dihydroflavon.

Có hai tín hiệu carbon nhóm methyl (-CH₃) tại δ_C (ppm) 18,0 và 25,9 cùng một carbon methylene

(-CH₂-) tại 22,1. Thêm các tín hiệu của 1 carbon methine tại δ_C 123,5, một carbon bậc 4 tại 132,0 ppm. Từ đó, kết quả được dự đoán có 1 nhóm prenyl (-CH₂-CH=C(CH₃)₂).

Có bốn tín hiệu carbon của nhóm methine liên kết với nguyên tố có độ âm điện lớn như oxy (>CHOH-) tại δ_C 78,2; 74,8; 71,2 ppm và tín hiệu carbon của một nhóm methylene (-CH₂O-) liên kết với oxy tại δ_C 62,4 ppm, đây là những tín hiệu đặc trưng cho phân tử đường glucose với carbon anomer tại δ_C 101,3 ppm phù hợp với dữ liệu phổ proton. Ngoài ra, căn cứ vào hằng số ghép cặp ³J_{aa} = 7,8 Hz của proton anomer tại δ_H 5,03 ppm cho thấy proton ở vị trí trục và nhóm hydroxy (-OH) ở vị trí xích đạo. Vì vậy, kết quả được dự đoán là phân tử đường β-D-glucose.

Phổ khối HRESI-MS (positive) có mũi ion phân tử giả [M+H⁺] với m/z = 519,1863, suy ra [M]⁺ = 518,1783 amu tương ứng với công thức phân tử (C₂₆H₃₀O₁₁), số liệu lý thuyết: M = 518,1779 amu, vậy độ chênh lệch khối lượng phân tử rất bé, đạt 4‰.



Hình 1. Các thành phần cấu trúc dự đoán của hợp chất HOAOI-EA03

Phổ HSQC (δ ppm) cho thấy những tín hiệu tương tác của proton trực tiếp với carbon, tạo nên khung hợp chất (Bảng 1). Hai tín hiệu proton nhóm methine (>CH-) tại δ_H 4,60 ppm (1H, s) (H-3) và δ_H 5,03 ppm (1H, t, 12 Hz) (H-2) tương quan lần lượt với các tín hiệu carbon tại δ_C 73,9 ppm (C-3) và 85,2 ppm (C-2). Một tín hiệu proton tại δ_H 6,3 ppm (1H, s) (H-8) tương quan với tín hiệu carbon thơm tại δ_C 95,3 ppm (C-8) thuộc khung flavan. Hai tín hiệu proton nhóm olefine (=CH-) tại δ_H 7,38 ppm (2H, dd, 8,4 Hz) (H-2', H-6'); 6,86 ppm (2H, d, 8,5 Hz) (H-3', H-5') tương quan lần lượt với các tín hiệu

carbon tại δ_C 130,41 ppm (C-2', -6') và δ_C 116,2 ppm (C-3', C-5') thuộc khung flavan.

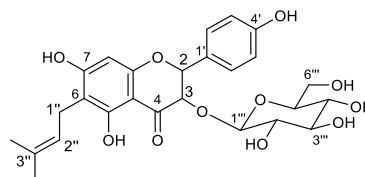
Hai tín hiệu của nhóm methyl (-CH₃-) tại δ_H 1,67 (3H, s) (H-4'') và 1,79 (3H, s) (H-5'') tương quan với các tín hiệu carbon tại δ_C 25,9 ppm (C-4'') và δ_C 18,0 ppm (C-5''). Hai tín hiệu proton nhóm methylene (-CH₂-) tại δ_H 3,28 ppm (1H, dd, 13,2 Hz, 7,2 Hz) (H-1''); δ_H 3,41 ppm (1H, dd, 13,2 Hz; 7,2 Hz) tương quan với tín hiệu carbon tại δ_C 22,1 ppm (C-1'') thuộc nhóm prenyl.

Các tín hiệu tương quan đặc trưng của phân tử đường glucose cũng được trình bày trong Bảng 1.

Quan sát phổ HMBC tương quan giữa proton với các carbon gần kề được trình bày tóm tắt trong Bảng 1. Trong đó, các mối tương quan nổi bật quan sát được là tín hiệu proton tại δ_H 3,21 và 3,48 (H-1'') đến tín hiệu carbon tại δ_C 112,2 ppm (C-6) của khung dihydroflavonol. Tín hiệu proton anomer tại δ_H 5,03 ppm (1H, t, 7,8 Hz) tương tác HMBC với tín hiệu carbon tại δ_C 73,9 ppm (C-3) và δ_C 85,2 ppm (C-2) cho thấy vị trí kết nối của đường vào C-3 của khung aglycon.

Từ những dữ liệu phổ vừa phân tích, hợp chất HOAOI-EA03 có công thức phân tử là C₂₆H₃₀O₁₁ có cấu trúc của một dihydroflavonol với một nhóm prenyl gắn với khung tại vị trí C-6 và liên kết glycoside tại C-3 cùng một phân tử đường β-D-glucose. Vậy nên, hợp chất HOAOI-EA03 được đề nghị có công thức như Hình 2.

Khi so sánh số liệu phổ của hợp chất với các tài liệu tham khảo đã công bố (Reutrakul et al., 2007), HOAOI-EA03 là hợp chất chưa được công bố trước đây.



6-γ,γ-Dimethylallyldihydrokaempferol 3-O-β-D-glucopyranoside

Hình 2. Cấu trúc hợp chất HOAOI-EA03

Bảng 1. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất HOAOI-EA03

Vị trí C	HOAOI-EA03 (600 MHz - phổ ¹ H, 150 MHz - phổ ¹³ C, MeOD)		
	δ _H (ppm), J (Hz)	δ _C (ppm)	HMBC ¹ H → ¹³ C
2	5,03 (1H, t, 12)	85,2	C-9, C-2''', C3''', C2', C-7, C-4
3	4,6 (1H, s)	73,9	C-2, C-1', C-4
4	-	199,6	
5	-	161,2	
6	-	112,2	
7	-	164,9	
8	6,3 (1H, s)	95,3	C-1'', C-10, C-6, C-9, C-7
9	-	162,4	
10	-	103,2	
1'	-	129,2	
2'	7,38 (1H, dd, 8,4; 2,4)	130,4	C-3', C-2', C-4', C-2
3'	6,86 (1H, d, 8,5)	116,2	C-5', C-1', C-4'
4'	-	159,2	
5'	6,86 (1H, d, 8,5)	116,2	C-5', C-1', C-4'
6'	7,38 (1H, dd, 8,4; 2,4)	130,4	C-3', C-2', C-4', C-2
1''	3,41 (1H, dd, 13,2; 7,2); 3,28 (1H, dd, 13,2; 7,2)	22,1	
2''	5,24 (1H, m)	123,6	C-6, C-2'', C-3'', C-5, C-7 C-5'', C-4''
3''	-	132,0	
4''	1,67 (3H, s)	25,9	C-6, C-2'', C-3'', C-5''
5''	1,79 (3H, s)	18,0	C-6, C-2'', C-3'', C-4''
1'''	5,01 (1H, t, 7,8)	101,3	C-2, C-3, C-2''', C-3''', C-4
2'''	3,53 (1H, m)	74,8	C-1''', C-3''', C-5'''
3'''	3,52 (1H, m)	78,2	C-1''', C-3''', C-5'''
4'''	3,69 (1H, m)	71,2	C-4''', C-3'''
5'''	3,54 (1H, m)	78,2	C-1''', C-3'''
6'''	3,88 (1H, dd, 12,0; 2,4)	62,4	C-4'''

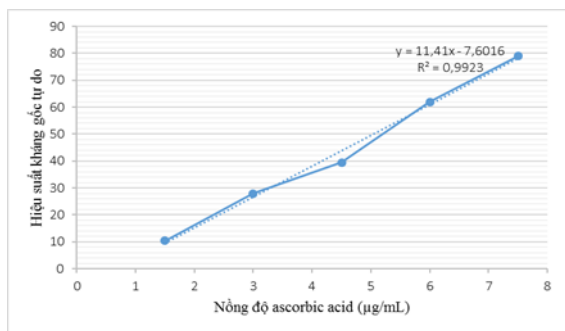
3.2. Kết quả hoạt tính kháng oxy hóa

Kết quả trung hòa gốc tự do DPPH của acid ascorbic được trình bày ở Hình 2. Đường chuẩn được xây dựng dựa trên phần trăm làm sạch gốc tự do theo nồng độ thử nghiệm, có dạng $y = 11,41x + 7,6016$ ($R^2 = 0,9923$). Hoạt tính kháng oxy hóa của ascorbic acid, cao ethyl acetate và hợp chất HOAOI-EA03 được trình bày ở Bảng 2. Cao chiết và chất

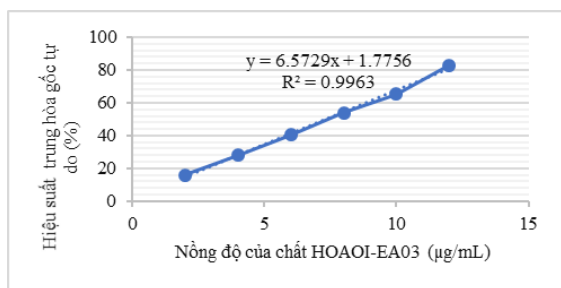
tinh khiết được tiến hành xác định khả năng trung hòa gốc tự do DPPH bằng cách xây dựng đồ thị mối quan hệ giữa nồng độ của mẫu thử theo phần trăm trung hòa gốc tự do DPPH. Kết quả cho thấy, hợp chất được phân lập thể hiện hoạt tính kháng oxy tốt, với IC₅₀ là 7,34 µg/mL, so với chất đối chứng acid ascorbic (giá trị IC₅₀ là 5,05 µg/mL). Trong khi đó, cao EA có hoạt tính kháng oxy hóa mạnh với IC₅₀ 2,27 µg/mL, gấp 2 lần so với acid ascorbic.

Bảng 2. Hiệu suất trung hòa gốc tự do DPPH của cao EA, HOAOI-EA03 và ascorbic acid

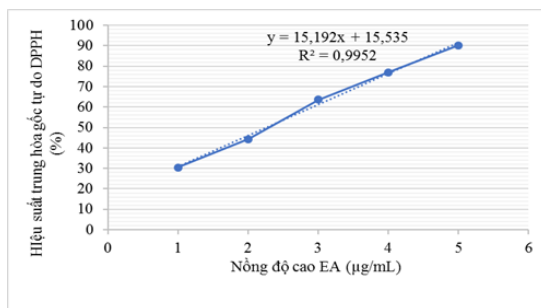
Cao EA		HOAOI-EA03		Acid ascorbic	
Nồng độ	% ức chế	Nồng độ	% ức chế	Nồng độ	% ức chế
0	0	0	0	0	0
1	30,4759	2	15,8776	1,5	10,3799
2	44,3667	4	28,1531	3	27,9594
3	63,6110	6	40,5204	4,5	39,4876
4	76,9770	8	53,8980	6	61,9258
5	90,1330	10	65,3776	7,5	78,9753



Hình 3. Đường chuẩn ascorbic acid trong phương pháp DPPH



Hình 4. Đường chuẩn đánh giá khả năng trung hòa gốc tự do DPPH của chất HOAOI-EA03



Hình 5. Đường chuẩn đánh giá khả năng trung hòa gốc tự do DPPH của cao EA

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

Hiệu quả ức chế các chủng vi sinh vật kiểm định của cao EA và hợp chất HOAOI-EA03 được trình bày ở Bảng 3. Kết quả cho thấy cao EA có hoạt tính kháng khuẩn tốt trên một vi khuẩn Gram (+). Cụ thể, cao EA kháng tốt loài vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* với $IC_{50} = 136.00 \pm 3.09 \mu\text{g/mL}$ trong khi chất HOAOI-EA03 kháng khuẩn *Bacillus subtilis* ở nồng độ 256 $\mu\text{g/mL}$ đạt khoảng 42%.

Bảng 3. Hoạt tính kháng vi sinh vật của chất HOAOI-EA03 và cao EA

Tên mẫu	Nồng độ	% ức chế các chủng vi sinh vật Gram (+)			% ức chế các chủng vi sinh vật Gram (-)			Năm
		<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>L. fermentum</i>	<i>S. enterica</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	
HOAOI-EA03	265	12	42	21	18	5	1	0
	64	0	19	10	9	2	0	0
	16	0	2	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0
	IC_{50}				>265			
MIC				>265				
Cao EA	265	24	41	77,5	29	7	0	16
	64	0	16	33,5	0	15	0	0
	16	0	1	19	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0
	IC_{50}	>265		136.00±3.09		>265		
MIC				>265				

3.4. Kết quả hoạt tính ức chế enzym α -glucosidase

Ngoài ra, việc khảo sát hoạt tính ức chế enzym α -glucosidase được thực hiện trên chất HOAOI-EA03 và cao chiết EA, thu được kết quả như đã trình

bày ở Bảng 4. Từ kết quả trên cho thấy khả năng ức chế enzym α -glucosidase của chất HOAOI-EA thấp, nhưng đối với cao chiết EA là rất tốt, với giá trị $IC_{50} = 0.22 \pm 0.05 \mu\text{g/mL}$, mạnh hơn chất đối chứng Acarbose hơn 817 lần đo trong cùng điều kiện.

Bảng 4. Kết quả hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase của chất HOAOI-EA03 và cao chiết EA

Tên mẫu	Nồng độ thử ($\mu\text{g/mL}$)	Phần trăm ức chế (%)	Giá trị IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
HOAOI-EA03	256	10	>256
	64	0	
	16	0	
	4	0	
	1	0	
Cao EA	256	100	0.22 \pm 0.05
	64	100	
	16	100	
	4	100	
	1	99	
	0.25	55	
Acarbose	0.063	25	179.65 \pm 6.02
	256	84	
	64	27	
	16	0	
	4	0	

3.5. Kết quả hoạt tính ức chế enzyme acetylcholinesterase

Hợp chất HOAOI-EA03 và cao EA được tiến hành đánh giá khả năng hoạt tính ức chế enzyme AChE bằng cách so sánh với chất tham chiếu Donepezil. Theo Bảng 5, chất HOAOI-EA03 chỉ ức chế yếu enzyme AChE với giá trị IC_{50} lớn hơn 256

$\mu\text{g/mL}$. Ngược lại, cao EA có tác dụng ức chế enzyme AChE gây bệnh suy giảm trí nhớ. Khi khảo sát ở mức nồng độ khác nhau theo cấp số nhân, thăm dò được phần trăm ức chế khác nhau. Trong đó, mức độ mà nồng độ mẫu thử là 256 $\mu\text{g/mL}$ ức chế 68% enzyme và với $\text{IC}_{50} = 128,00 \pm 9,67 \mu\text{g/mL}$, cho thấy hoa mai vàng là một dược liệu có tiềm năng trong việc điều trị bệnh suy giảm trí nhớ hiện nay.

Bảng 5. Kết quả hoạt tính ức chế enzyme acetylcholinesterase của chất HOAOI-EA03 và cao chiết EA

Tên mẫu	Nồng độ, % ức chế tương ứng					Giá trị IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	
	$\mu\text{g/mL}$	265	64	16	4		1
HOAOI-EA03	%	0	0	0	0	0	>256
Cao EA	%	68	41	20	0	0	128,00 \pm 9,67
Donepezil							0,024 \pm 0,006

3.6. Kết quả hoạt tính ức chế gây độc tế bào in-vitro

Cao EA và hợp chất HOAOI-EA03 được tiến hành thử nghiệm khảo sát hoạt tính gây độc trên 2 dòng tế bào KB và Hep-G2 với mẫu đối chứng Ellipticine (IC_{50} là 0,29 \pm 0,01 $\mu\text{g/mL}$ đối với KB và

0,35 \pm 0,05 $\mu\text{g/mL}$ đối với Hep-G2). Từ kết quả ở Bảng 6, cao EA chỉ có khả năng ức chế ở dòng tế bào KB. Ngược lại, hợp chất hợp chất HOAOI-EA03 có khả năng ức chế cả 2 dòng tế bào KB, Hep-G2. Phần trăm ức chế thấp hơn mẫu đối chứng Ellipticine.

Bảng 6. Kết quả hoạt tính gây độc tế bào của chất hợp chất HOAOI-EA03 và cao chiết EA

Nồng độ mẫu thử ($\mu\text{g/mL}$)	Phần trăm ức chế các dòng tế bào ung thư			
	KB		Hep-G2	
	HOAOI – EA03	Cao EA	HOAOI – EA03	Cao EA
256	41	11	42	0
64	0	0	0	0
16	0	0	0	0
4	0	0	0	0
IC_{50}	>256	>256	>256	>256
Ellipticine	IC_{50}	0.29 \pm 0.01		0.35 \pm 0.05

4. KẾT LUẬN

Cao ethyl acetate và hợp chất 6- γ , γ -dimethylallyldihydrokaempferol 3-O- β -D-

glucopyranoside được phân lập từ cao có khả năng kháng oxy hóa rất tốt. Ngoài ra, cao EA có hoạt tính kháng khuẩn rất tốt đối với vi khuẩn Gram (+), cụ

thê trên vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* với $IC_{50} = 136.00 \pm 3.09 \mu\text{g/mL}$. Về khả năng ức chế enzyme α -glucosidase, cao chiết EA mạnh hơn chất đối chứng Acarbose trên 817 lần. Cao EA ức chế enzyme AChE với nồng độ mẫu thử là $256 \mu\text{g/mL}$ ức chế enzyme AchE 68% và $IC_{50} =$

$128,00 \pm 9,67 \mu\text{g/mL}$. Hợp chất 6- γ , γ -dimethylallyldihydrokaempferol 3-O- β -D-glucopyranoside không có khả năng kháng khuẩn nhưng có thể ức chế các dòng tế bào ung thư như KB, Hep-G2. Kết quả cho thấy hoa mai vàng là một nguồn dược liệu tiềm năng cần được nghiên cứu tiếp tục.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Chandra, S. T., & Anju, G. (Jan. 2014). Antioxidant activity by DPPH radical scavenging method of *Ageratum conyzoides* Linn. Leaves. *American Journal of Ethnomedicine*, 1(4), 244–249.
- Chen, H., Yan, X., Lin, W., Zheng, Li., & Zhang, W. (2004). A new method for screening α -glucosidase inhibitors and application to marine microorganisms. *Pharmaceutical Biology*, 42(6), 416–421. <https://doi.org/10.1080/13880200490885987>
- Cos, P., Vlietinck, A. J., Vanden, B. D., & Maes, L. (2006). Anti-infective potential of nature products: How to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. *Journal of Ethnopharmacology*, 106(3), 290-302. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.04.003>
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., & Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* 7(2), 88-95. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)
- Hadacek, F., & Greger, H. (2000). Test of antifungal natural products methodologies, comparability of results and assay choice. *Phytochemical Analysis*, 90, 137-147. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)10991565\(200005/06\)11:3%3C137::AID-PCA514%3E3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/(SICI)10991565(200005/06)11:3%3C137::AID-PCA514%3E3.0.CO;2-I)
- Hakamata, W., Kurihara, M., Okuda, H., Nishio, T., & Oku, T. (2009). Design and screening strategies for α -glucosidase inhibitors based on enzymological information. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 9(1), 3-12. <https://doi.org/10.2174/156802609787354306>
- Kim, Y. M., Wang, M. H., Rhee., & H. I. (2004). A novel α -glucosidase inhibitor from pine bark. *Carbohydr Research*, 339, 715–717. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2003.11.005>
- Li, T., Zhang, X. D., Song, Y. W., & Liu, J. W. (2005). A microplate-based screening method for α -glucosidase inhibitors. *Chinese Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 10(10), 1128–1134.
- Malacrida, A., Cavalloro, V., Martino, E., Cassetti, A., Nicolini, G., Rigolio, R., Cavaletti, G., Mannucci, B., Vasile, F., Giacomo, M. D., Collina, S., & Miloso, M. (2019). Anti-Multiple Myeloma Potential of Secondary Metabolites from *Hibiscus sabdariffa*. *Molecules*, 24(13), 2500. <https://doi.org/10.3390/molecules24132500>
- Min, B. S., Cuong, T. D., Lee, J. S., Shin, B. S., Woo, M. H., & Hung, T. M. (2010). Cholinesterase inhibitors from *Cleistocalyx operculatus* Buds. *Archives Pharmacal Research*, 33(10), 1665-1670. <https://doi.org/10.1007/s12272-010-1016-5>
- Mosman, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. *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)
- Phụng, N. K. P. (2007). Phương pháp cô lập hợp chất hữu cơ, Nhà xuất bản Đại học Quốc gia thành phố Hồ Chí Minh.
- Pual, C., Louis, M., Jean-Bosco, S., Arnold, J. V., & Dirk, V. B. (2005). Bioassay for antibacterial and antifungal activities. Laboratory for Microbiology, Parasitology and Hygien, Faculty of Pharmaceutical, Biomedical and Veterinary Sciences, University of Antwerp, Belgium, 1-13.
- 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 Medica*, 73(07), 683-688. <https://doi.org/10.1055/s-2007-981538>
- Scudiero, D. A., Shoemaker, R. H., Paull, K. D., Monks, A., Tierney, S., Nofziger, T. H., Currens, M. J., Seniff, D., & 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., Sedlak, S., Wongpakam, K., & Sangdee, A. (2019). Antioxidant and antibacterial activities of selected Thai medicinal plant-derived Galactogogue extracts. *Planta Med*, 85(18), 130. <https://doi.org/10.1055/s-0039-3399855>
- Somani, G., Kulkarni, C., Shinde, P., Shelke, R., Laddha, K., & Sathaye, S. (2015). In vitro acetylcholinesterase inhibition by psoralen using molecular docking and enzymatic studies. *Journal of pharmacy & bioallied sciences*, 7(1), 32–36. <https://doi.org/10.4103%2F0975-7406.148775>