

# Acid asiatic phân lập từ cây sắn thuyền (*Syzygium resinsum* Gagnep.) và tác dụng của nó lên vi khuẩn *Streptococcus mutans*

Nguyễn Quang Huy<sup>1</sup>, Phan Tuấn Nghĩa<sup>1</sup>

Ngô Văn Quang<sup>2</sup>, Phan Văn Kiệm<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên,  
Đại học Quốc gia Hà Nội

<sup>2</sup>Viện Hoá học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam

<sup>3</sup>Viện Hoá học các Hợp chất Thiên nhiên  
Viện KH&CN Việt Nam

## Đặt vấn đề

Cây sắn thuyền có tên khoa học là *Syzygium resinsum* (Gagnep.) Merr. et Perry (Myrtaceae) còn có tên đồng nghĩa là *Syzygium polyanthum* (Wight) Walp., là cây gỗ nhỏ cao chừng 5-7 m, ưa khí hậu nhiệt đới nóng ẩm, mọc nhiều ở miền Trung và miền Nam nước ta. Cây được nhân giống tự nhiên bằng hạt. Theo Đỗ Huy Bích và cs [1] thì thành phần hoá học của lá sắn thuyền bao gồm tinh dầu, chất nhựa, chất nhầy và tanin. Quả có chứa các phenol, các glycosid của petulidin và malvidin, trong hoa chứa kaempferol và các hợp chất tritecpen. Những nghiên cứu về tác dụng dược lý của cây thuốc này cho thấy lá cây có tác dụng ức chế sự phát triển của vi khuẩn *Staphylococcus aureus*, *Bacillus pyogenies*, *Bacillus proteus*. Lá cây còn có tác dụng chống nhiễm khuẩn, làm se vết thương, làm tiêu viêm, và làm vết thương mau lành. Lá cây sắn thuyền dùng chữa bệnh kiết lỵ, tiêu chảy [1, 2]. Gần đây, chúng tôi cũng đã phát hiện thấy dịch chiết ethanol từ lá sắn thuyền có tác dụng diệt vi khuẩn gây sâu răng *Streptococcus mutans* tại pH thấp và ức chế quá trình sinh acid của chúng [4, 5]. Tuy vậy, cho đến nay, chưa có nghiên cứu nào về thành phần hoá học và hoạt tính sinh học của các hợp chất từ cây thuốc này ở Việt Nam. Bài báo này thông báo những kết quả nghiên cứu của chúng tôi về việc phân lập và xác định cấu trúc của hợp chất acid asiatic từ lá cây sắn thuyền và tác dụng của nó lên vi khuẩn gây sâu răng *S. mutans*.

## Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

### Nguyên liệu

Lá cây sắn thuyền *Syzygium resinsum* (Gagnep.) Merr. et Perry (Myrtaceae) được thu hái

vào tháng 6 năm 2005 tại vườn Thuốc Đông y ở Trung Văn, Từ Liêm, Hà Nội. Mẫu tiêu bản được lưu giữ tại Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội.

Chủng *Streptococcus mutans* GS-5 là quà tặng của GS. Robert E. Marquis, Đại học Tổng hợp Rochester (Mỹ). Chủng vi khuẩn được giữ và cấy chuyển hàng tuần trên môi trường thạch đĩa, tế bào được nuôi cấy lắc ở 37°C trong môi trường chứa 3% trypton, 0,5% dịch chiết nấm men và 1% glucose.

### Phương pháp nghiên cứu

Lá cây sắn thuyền (0,5 kg) được rửa sạch, phơi khô, nghiền nhỏ thành bột sau khi chiết với ethanol, methanol thu được 15 g dịch cô. Dịch cô methanol được bổ sung vào 1 lít nước cất và chiết lần lượt bằng hexan, cloroform, ethyl acetat và n-butanol thu được 1,5 g dịch cô hexan, 6,0 g dịch cô cloroform, 2,5 g dịch cô ethyl acetat và 2,0 g dịch cô n-butanol.

Điểm nóng chảy đo trên máy Kofler micro-hot-stage. Phổ khối lượng phun mù điện tử (Electrospray Ionization mass, ESI-MS) được đo trên máy AGILENT 1100 LC-MSD Trap. Phổ 1D-NMR và 2D-NMR được đo trên máy Bruker AM500 FT-NMR với chất chuẩn nội là tetramethyl silan (TMS).

Sắc ký lớp mỏng được thực hiện trên bản mỏng trắng sẵn DC-Alufolien 60 F<sub>254</sub> (Merck 1,05715), RP<sub>18</sub> F<sub>254s</sub> (Merck). Phát hiện chất bằng đèn tử ngoại ở hai bước sóng 254 nm và 368 nm hoặc dùng thuốc thử là dung dịch H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10% được phun đều lên bản mỏng, sấy khô rồi hơ nóng từ từ đến khi hiện màu.

Sắc ký cột được tiến hành với chất hấp phụ là Silica gel pha thường và pha đảo. Silica gel pha

## ● Nghiên cứu - Kỹ thuật

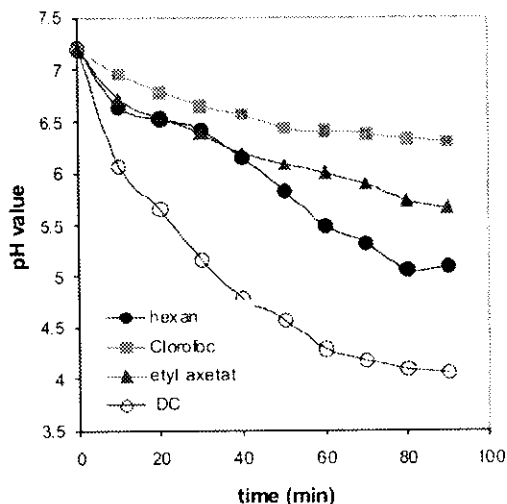
thường có cỡ hạt là 0,040-0,063 mm (240-430 mesh). Silica gel pha đảo ODS hoặc YMC (30-50 m, FujiSilisa Chemical Ltd.).

Khả năng ức chế sự sinh acid của *S. mutans* GS-5 được xác định theo Ma và cộng sự [3] và tác dụng gây chết *S. mutans* GS-5 được xác định theo Phan và cộng sự [7].

### Kết quả và thảo luận

Dựa trên kết quả nghiên cứu trước đây của chúng tôi cho thấy dịch chiết từ lá sắn thuyền có khả năng ức chế mạnh sự sinh acid của *S. mutans* [4, 5], do vậy, trong quá trình tách chiết chúng tôi đã tiến hành thử khả năng ức chế sự sinh acid của *S. mutans* trong phân đoạn thu được từ các dung môi. Kết quả cho thấy các thành phần dịch chiết trong các dung môi đều có tác dụng ức chế việc sinh acid từ *S. mutans* GS-5.

Thành phần các chất trong phân đoạn của dịch chiết cloroform có hoạt tính mạnh nhất. Giá trị pH cuối cùng trong dịch chiết này là 6,3 cao hơn so với phân đoạn chiết bằng hexan, ethyl acetat và mẫu đối chứng là 5,08; 5,66 và 4,02 (hình 1) mặt khác khối lượng phần dịch chiết trong cloroform cũng cao hơn gấp hai lần so với dịch chiết từ các dung môi khác.



**Hình 1.** Khả năng ức chế sự sinh acid của *S. mutans* GS-5 của lá sắn thuyền ở các phân đoạn chiết bằng dung môi khác nhau

Từ căn chiết bằng cloroform (6,0 g) của lá sắn thuyền thu được ở trên được tiếp tục tiến hành phân tách bằng các sắc ký cột lặp lại với chất hấp phụ là silica gel thu được các hợp chất ký hiệu là **1a** và **1b** (11,0 mg) dưới dạng chất kết tinh không màu.

**Acid asiatic (2,3,23-trihydroxy-12-ursen-28-oiic acid (1a)):** Tinh thể hình kim không màu. Nhiệt

độ nóng chảy 302-303°C.

Độ quay cực  $[\alpha]_D^{20}$  53,0° (MeOH, c : 1,0).

ESI-MS m/z: 489,2  $[M+H]^+$  (positive), 487,4  $[M-H]^-$  (negative),  $C_{30}H_{48}O_5$ .

Số liệu phổ  $^1H$ -NMR (500 MHz,  $CD_3OD$ ) và  $^{13}C$ -NMR (125 MHz,  $CD_3OD$ ): xem bảng 1

Phổ NMR của hợp chất **1a** và **1b** từ lá cây sắn thuyền có dạng phổ của một hợp chất triterpen có 5 vòng sáu cạnh với những tín hiệu của 30 carbon trên phổ  $^{13}C$ -NMR. Trong đó từ phổ DEPT 90 và 135 đã xác định được hợp chất này gồm có 9  $CH_2$ , 8 CH, 6  $CH_3$ . Sự có mặt của nhóm acid được xác định bởi tín hiệu tại  $\delta_C$  181,57, một nối đôi thế 3 vị trí tại  $\delta_C$  126,65/ $\delta_H$  5,28 (1H, t,  $J = 3,5$  Hz) và tại  $\delta_C$  139,78, hai carbon methyl nối với oxi tại  $\delta_C$  69,66/ $\delta_H$  3,72 (1H, dd,  $J = 4,5, 9,5$  Hz) và  $\delta_C$  78,22/ $\delta_H$  3,38 (1H, d,  $J = 9,5$  Hz), một nhóm  $CH_2$  nối với oxi tại  $\delta_C$  66,38/ $\delta_H$  3,29 (1H, d,  $J = 11,0$  Hz) và 3,52 (1H, d,  $J = 11,0$  Hz). Trên phổ cũng cho thấy sự có mặt của 6 nhóm methyl tại  $\delta_C$  24,17, 21,5, 17,84, 17,69, 17,67, 913,92, trong đó hai tín hiệu doublet của hai nhóm methyl trên phổ  $^1H$ -NMR tại  $\delta_H$  0,91 (3H, d,  $J = 6,5$  Hz) và 1,00 (3H, d,  $J = 6,5$  Hz) cho thấy hợp chất này có thể có dạng khung Ursane. Những kết quả phổ NMR đã khẳng định **1a** và **1b** có một nhóm acid, một nối đôi tại C-12/C-13, hai nhóm metin nối với oxi và ngoài ra còn có một nhóm  $CH_2$  nối với oxi. Với những giá trị phổ khá đặc trưng tại C-2, C-3, C-4 và C-23 có thể sơ bộ dự đoán được hai ba nhóm hydroxy nối với C-2, C-3 và C-23 [8], nhóm acid nối với C-28. Những dự đoán này dẫn tới sự so sánh các kết quả phổ của **1** với các kết quả tương ứng của asiaticosid [8] cho sự phù hợp hoàn toàn ở cả 29 vị trí carbon (Bảng 1). Riêng giá trị  $\delta_C$  tại C-28 có sự khác nhau đó là do hợp chất **1a** có liên kết este tại C-28, còn ở hợp chất **1a**, tại đây là một nhóm acid tự do. Ngoài sự phù hợp hoàn toàn các giá trị phổ giữa hai hợp chất **1a** và **1b**, chúng tôi còn đo thêm các phổ HMQC và HMBC để khẳng định thêm cấu trúc của phân tử cũng như vị trí của các nhóm thế nêu trên.

Các tương tác trên phổ HSQC cho phép xác định các giá trị độ dịch chuyển hoá học tương ứng của proton và carbon. Kết quả này được nêu ra trên Bảng 1. Trên phổ HMBC, các tương tác của H-3 với C-2/C-4 và với C-23, cũng như tương tác của H-23 với C-3, C-4, C-5, tương tác của H-24 với C-3, C-4, C-5, C-23 cho thấy hai nhóm hydroxy phải nối với carbon C-2 và C-3, nhóm hydroxy thứ ba nối với C-23 là hoàn toàn chính xác. Hoá học lập thể của hai nhóm OH tại C-2 và C-3 cũng được chứng minh tương ứng là và trước tiên nhờ vào kết quả so sánh

## ● Nghiên cứu - Kỹ thuật

các giá trị phổ NMR của **1a** với **1b**, ngoài ra, hằng số tương tác  $J_{2,3} = 9,5$  Hz chứng tỏ cả hai nhóm hydroxy này đều chiếm vị trí equatorial, tức là 2-OH và 3-OH. Tương tác của H-18 với C-28 cũng cho thấy nhóm acid nằm tại C-28. Các tương tác HMBC khác cũng được mô tả chi tiết trên hình 3. Như vậy, hợp chất **1a** là acid asiatic với công thức phân tử là

$C_{30}H_{48}O_5$ . Kết quả này còn được khẳng định thêm bằng phổ khối lượng, với sự xuất hiện các pic ion tại  $m/z$  489,2  $[M+H]^+$  (positive), 487,4  $[M-H]^-$  (negative) trên phổ ESI-MS. Đây là lần đầu tiên hợp chất này được phát hiện ở cây sắn thuyền *Syzygium resinum* G.

**Bảng 1.** Số liệu phổ NMR của hợp chất **1a** phân lập từ cây sắn thuyền

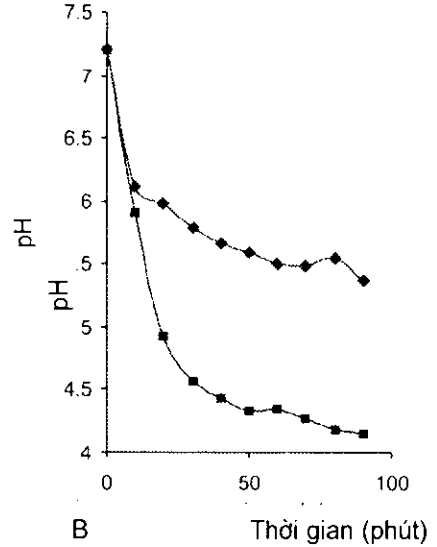
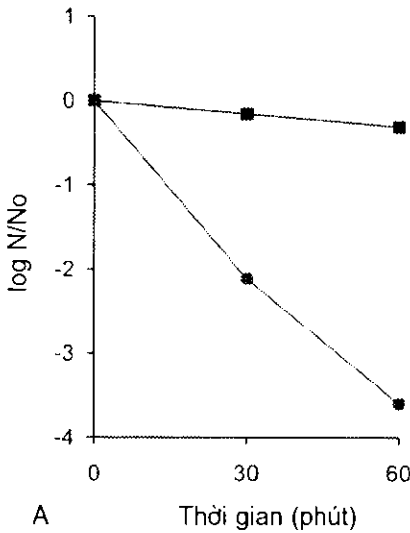
C	$\delta_C^{a,d}$	<b>1a</b>		
		$\delta_C^{a,b}$	DEPT	$\delta_H^{a,c}$
1	48,3	48,00	CH <sub>2</sub>	0,93 / 1,98
2	69,7	69,66	CH	3,72 (1H, dd, $J = 4,5, 9,5$ Hz)
3	78,2	78,22	CH	3,38 (1H, d, $J = 9,5$ Hz)
4	44,1	44,09		-
5	48,4	48,20	CH	1,31
6	19,1	19,07	CH <sub>2</sub>	1,42/1,50
7	33,6	33,63	CH <sub>2</sub>	1,34/1,67
8	41,0	40,78		-
9	49,3	49,00	CH	1,68
10	39,0	38,97		-
11	24,5	24,45	CH <sub>2</sub>	2,00
12	127,0	126,65	CH	5,28 (1H, t, $J = 3,5$ Hz)
13	139,3	139,78		-
14	43,0	43,37		-
15	29,3	29,15	CH <sub>2</sub>	1,12/1,95
16	25,3	25,29	CH <sub>2</sub>	1,66/2,67
17	49,5	49,17		-
18	54,1	54,32	CH	2,23 (1H, br d, $J = 11,5$ Hz)
19	40,2	40,38	CH	1,02 (1H, m)
20	40,4	40,38	CH	1,40 (1H, m)
21	31,5	31,75	CH <sub>2</sub>	1,38/1,54
22	37,6	38,07	CH <sub>2</sub>	1,66/1,72
23	66,4	66,38	CH <sub>2</sub>	3,29 (1H, d, $J = 11,0$ Hz) 3,52 (1H, d, $J = 11,0$ Hz)
24	14,0	13,92	CH <sub>3</sub>	0,72 (3H, s)
25	17,9	17,69	CH <sub>3</sub>	1,06 (3H, s)
26	18,1	17,84	CH <sub>3</sub>	0,84 (3H, s)
27	24,0	24,17	CH <sub>3</sub>	1,15 (3H, s)
28	178,0	181,57		-
29	17,6	17,67	CH <sub>3</sub>	0,91 (3H, d, $J = 6,5$ Hz)
30	21,6	21,59	CH <sub>3</sub>	1,00 (3H, d, $J = 6,5$ Hz)

<sup>a</sup>Đo trong CD<sub>3</sub>OD, <sup>b</sup><sub>125</sub> MHz, <sup>c</sup><sub>500</sub> MHz, <sup>d</sup> $\delta_C$  của phần aglycon của asiaticosid [8]

## ● Nghiên cứu - Kỹ thuật

Kết quả thí nghiệm cho thấy acid asiatic từ lá sắn thuyền có tác dụng diệt vi khuẩn *S. mutans* GS-5 rất rõ rệt. Ở nồng độ 0,015% chỉ sau 15 phút tới pH 4,0 có tới 90% số tế bào vi khuẩn *S. mutans* GS-5 bị giết chết (tương ứng với giá trị log N/No bằng -1) (hình 4A). Trong môi trường dư thừa glucose, giá trị pH của huyền dịch *S. mutans* GS-5 sau 90

phút là 4,08 trong khi đó với sự có mặt của 0,015% acid asiatic, giá trị pH là 5,37, cao hơn rõ rệt so với mẫu đối chứng (hình 4B). Các kết quả nghiên cứu này cho thấy acid asiatic có tác dụng ức chế sự sinh acid và diệt vi khuẩn *S. mutans* GS-5 tương đương dịch chiết thô từ sắn thuyền hay vỏ măng cụt đã được nghiên cứu trước đây [4, 6].



Hình 2. Tác dụng diệt *S. mutans* GS-5 ở pH 4,0 (A) và tác dụng ức chế sự sinh acid của *S. mutans* GS-5 (B) của acid asiatic của sắn thuyền  
Mẫu nghiên cứu (◆), mẫu đối chứng (■)

### Kết luận

Từ dịch chiết cloroform của lá cây sắn thuyền, hợp chất acid asiatic đã được phân tách và xác định cấu trúc hoá học bằng các phương pháp phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) và phổ khối lượng (ESI-MS). Đây là lần đầu tiên hợp chất acid asiatic được phân tách từ cây sắn thuyền *Syzygium resinum* G. Với nồng độ 0,015% acid asiatic giết chết 90% tổng số vi khuẩn *S. mutans* sau thời gian 15 phút. acid asiatic cũng ức chế sự sinh acid của *S. mutans* GS-5, gợi ý về tác dụng chống sâu răng của hợp chất này. Tuy nhiên, để ứng dụng acid asiatic từ cây sắn thuyền vào các sản phẩm bảo vệ răng miệng cần có các nghiên cứu sâu hơn về tác dụng của chúng lên các chủng vi khuẩn gây sâu răng.

### Summary

**Asiatic acid from *Syzygium resinum* Gagnep and inhibitory effects on *Streptococcus mutans***

From the chloroform extract of the leaf of *Syzygium resinum* (Gagnep.) Merr. et Perry (Myrtaceae), asiatic acid ( $C_{30}H_{48}O_5$ ) was isolated

by chromatography on silica gel columns. Its chemical structure was identified from analyses of the NMR (1D-, 2D-NMR) and ESI-MS spectra in comparison with previous data. This is the first report on the presence and isolation of asiatic acid from *S. resinum*. Asiatic acid from *S. resinum* was shown to strongly inhibit acid production of *S. mutans* GS-5 cells and kill the cells in an acidified medium.

### Tài liệu tham khảo

1. Đỗ Huy Bích, Đặng Quang Chung, Bùi Xuân Chương, Nguyễn Thượng Đông, Đỗ Trung Đàm, Phạm Văn Hiến, Vũ Ngọc Lộ, Phạm Duy Mai, Phạm Kim Mân, Đoàn Thị Nhu, Nguyễn Tập, Trần Toàn. Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam, Nhà xuất bản Khoa học và kỹ thuật Hà Nội, (2004), Tập II, trang 687-688.

2. Đỗ Tất Lợi, (2001), Cây thuốc và vị thuốc Việt Nam, Nhà xuất bản Y học.

3. Ma Y, Curran TM, Marquis RE, Rapid produce for acid adaptation of oral lactic acid bacteria and further characterization

(Xem tiếp trang 18)