

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

VIỆN DƯỢC LIỆU



VŨ DUY HỒNG

**NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM THỰC VẬT, THÀNH PHẦN HÓA  
HỌC VÀ MỘT SỐ TÁC DỤNG SINH HỌC  
CỦA CÂY BAN HOOKER  
(*Hypericum hookerianum* Wight. and Arn.,  
Họ Ban - Hypericaceae)**

**LUẬN ÁN TIẾN SĨ DƯỢC HỌC**

**HÀ NỘI - 2023**

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

VIỆN DƯỢC LIỆU



VŨ DUY HỒNG

**NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM THỰC VẬT, THÀNH PHẦN HÓA  
HỌC VÀ MỘT SỐ TÁC DỤNG SINH HỌC  
CỦA CÂY BAN HOOKER**

*(Hypericum hookerianum* Wight. and Arn.,  
**Họ Ban - Hypericaceae)**

**Chuyên ngành: Dược liệu - Dược học cổ truyền**

**Mã số: 972.02.06**

**LUẬN ÁN TIẾN SĨ DƯỢC HỌC**

**NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:**

**PGS.TS. Nguyễn Mạnh Tuyên**

**PGS.TSKH. Nguyễn Minh Khởi**

**HÀ NỘI – 2023**

## MỤC LỤC

### DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, TỪ VIẾT TẮT

### DANH MỤC BẢNG

### DANH MỤC HÌNH

### ĐẶT VẤN ĐỀ ..... 1

### CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN..... 3

#### 1.1. TỔNG QUAN VỀ CHI *Hypericum* L. .... 3

##### 1.1.1. Phân loại thực vật..... 3

##### 1.1.2. Số loài thuộc chi *Hypericum* L. và phân bố của chúng ..... 4

##### 1.1.3. Thành phần hóa học của các loài trong chi *Hypericum* L. .... 5

##### 1.1.4. Tác dụng sinh học của cao chiết và các hợp chất phân lập được từ một số loài thuộc chi *Hypericum* L. .... 9

##### 1.1.5. Công dụng của một số loài thuộc chi *Hypericum* L. .... 16

#### 1.2. TỔNG QUAN VỀ CÂY BAN HOOKER ..... 18

##### 1.2.1. Vị trí phân loại, đặc điểm thực vật, phân bố và sinh thái của cây Ban hooker ..... 18

##### 1.2.2. Thành phần hóa học của cây Ban hooker ..... 20

##### 1.2.3. Tác dụng sinh học của cây Ban hooker ..... 24

#### 1.3. MỘT SỐ PHƯƠNG PHÁP THỬ TÁC DỤNG SINH HỌC PHỔ BIẾN TRONG NGHIÊN CỨU DƯỢC LIỆU ..... 25

##### 1.3.1. Các thử nghiệm đánh giá tác dụng chống oxy hóa in vitro ..... 25

##### 1.3.2. Các phương pháp thử khả năng bảo vệ gan ..... 29

##### 1.3.3. Đánh giá tác dụng bảo vệ tế bào thần kinh..... 35

### CHƯƠNG 2. NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU..... 39

#### 2.1. NGUYÊN VẬT LIỆU NGHIÊN CỨU ..... 39

##### 2.1.1. Nguyên liệu nghiên cứu ..... 39

##### 2.1.2. Động vật thí nghiệm ..... 39

##### 2.1.3. Máy móc, trang thiết bị và dụng cụ ..... 40

##### 2.1.4. Hóa chất, dung môi, thuốc thử..... 41

#### 2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU ..... 42

2.2.1. Nghiên cứu đặc điểm thực vật để xác định tên khoa học .....	42
2.2.2. Nghiên cứu về thành phần hóa học.....	43
2.2.3. Nghiên cứu tác dụng sinh học.....	44
2.3. ĐỊA ĐIỂM NGHIÊN CỨU .....	51
<b>CHƯƠNG 3. THỰC NGHIỆM VÀ KẾT QUẢ.....</b>	<b>52</b>
3.1. ĐẶC ĐIỂM THỰC VẬT VÀ GIÁM ĐỊNH TÊN KHOA HỌC CÂY BAN HOOKER.....	52
3.1.1. Đặc điểm hình thái thực vật.....	52
3.1.2. Xác định tên khoa học mẫu nghiên cứu.....	55
3.1.3. Đặc điểm vi phẫu cây Ban hooker .....	55
3.1.4. Đặc điểm bột cây Ban hooker.....	57
3.2. THÀNH PHẦN HÓA HỌC .....	59
3.2.1. Định tính các nhóm hợp chất hữu cơ.....	59
3.2.2. Chiết xuất và phân lập các hợp chất .....	60
3.2.3. Xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất phân lập từ phần trên mặt đất cây Ban hooker.....	65
3.3. TÁC DỤNG SINH HỌC CỦA CÂY BAN HOOKER.....	111
3.3.1. Mẫu nghiên cứu dùng trong các thử nghiệm tác dụng sinh học.....	111
3.3.2. Tác dụng chống oxy hóa.....	112
3.3.3. Tác dụng bảo vệ gan.....	112
3.3.4. Tác dụng bảo vệ tế bào thần kinh .....	115
<b>CHƯƠNG 4. BÀN LUẬN .....</b>	<b>122</b>
4.1. VỀ ĐẶC ĐIỂM THỰC VẬT VÀ TÊN KHOA HỌC CÂY BAN HOOKER .....	122
4.2. VỀ THÀNH PHẦN HÓA HỌC CỦA CÂY BAN HOOKER.....	123
4.2.1. Kết quả định tính.....	124
4.2.2. Kết quả phân lập và xác định cấu trúc của các hợp chất .....	124
4.3. VỀ TÁC DỤNG SINH HỌC CỦA CÂY BAN HOOKER.....	135
4.3.1. Tác dụng chống oxy hóa.....	135
4.3.2. Tác dụng bảo vệ gan.....	138
4.3.3. Tác dụng bảo vệ tế bào thần kinh .....	142

<b>KẾT LUẬN</b> .....	<b>147</b>
1. Về đặc điểm thực vật .....	147
2. Về thành phần hóa học.....	147
3. Về tác dụng sinh học.....	147
<b>KIẾN NGHỊ</b> .....	<b>148</b>

## DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, TỪ VIẾT TẮT

Tên viết tắt	Tên Tiếng Anh	Dịch nghĩa
6-OHDA	6-hydroxydopamine	6-hydroxydopamin
ABTS	2,2-azino-bis (3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulphonic acid) diammonium salt	Muối diammonium 2,2-azino-bis (3-ethylbenzo-thiazolin-6-sulphonic acid)
ALT	Alanine aminotransferase	Alanin aminotransferase
Apoptosis		Chết tế bào theo chương trình
AST	Aspartate aminotransferase	Aspartat aminotransferase
BHA	Butylated hydroxyanisole	Hydroxyanisol butyl hóa
BHB		Cao <i>n</i> -butanol cây Ban hooker
BHH		Cao <i>n</i> -hexan cây Ban hooker
BHE		Cao ethyl acetat cây Ban hooker
BHM		Cao methanol cây Ban hooker
BHW		Cao nước cây Ban hooker
BuOH	<i>n</i> -butanol	<i>n</i> -butanol
CCl <sub>4</sub>	Carbon tetrachloride	Clorua carbon 4
CD	Circular Dichroism	Phổ lưỡng sắc tròn
CI	Confidence Interval	Khoảng tin cậy
COSY	Homonuclear Correlated Spectroscopy	Phổ COSY (Phổ tương quan hai chiều H-H)
COX-2	Cyclooxygenase-2	Cyclooxygenase-2
CTC <sub>50</sub>	Common Toxicity Criteria 50	Tiêu chí độc tính chung 50% (Nồng độ thuốc để ức chế 50% tế bào ung thư phát triển hoặc tiêu diệt 50% tế bào ung thư)
CuSO <sub>4</sub>	Copper sulphate	Đồng sulphat
CYP <sub>450</sub>	Cytochrome P <sub>450</sub>	Cytochrom P <sub>450</sub>
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer	Phổ DEPT
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxide	Dimethylsulfoxid
DPBS	Dulbecco's phosphate-buffered saline	Dulbecco's phosphat-buffer salin
DPPH	1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl	1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl
EC <sub>50</sub>	Effective Concentration 50%	Nồng độ tác dụng 50%

Tên viết tắt	Tên Tiếng Anh	Dịch nghĩa
EDTA	Acid Ethylene Diamine Tetraacetic	Acid Ethylen Diamin Tetraacetic
ESI-MS	Electron Spray Ionization Mass Spectrometry	Phổ khối lượng ion hóa phun điện tử
EtOAc	Ethyl acetate	Ethyl acetat
EtOH	Ethanol	Ethanol
FBS	Fetal Bovine Serum	Huyết thanh thai bê (bò)
FST	Forced Swim Test	Thử nghiệm bơi cưỡng bức (chuột)
GABA <sub>A</sub>	<i>Gamma</i> -Aminobutyric acid A	<i>Gamma</i> -Aminobutyric acid A
GC	Gas Chromatography	Sắc ký khí
GSH	Glutathione	Glutathion
HCl	Hydrochloric acid	A xit Clohidric
HIV	Human Immunodeficiency Virus	Vi rút làm suy giảm miễn dịch ở người
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation	Phổ tương tác di hạt nhân qua nhiều liên kết
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence	Phổ tương tác trực tiếp H-C
Hx	<i>n</i> -hexane	<i>n</i> -hexan
IC <sub>50</sub>	Inhibitory Concentration 50%	Nồng độ ức chế 50%
iNOS	Inducible Nitric Oxide Synthase	Inducible Nitric Oxid Synthase
KCl	Potassium chloride	Kali clorid
LDH	Lactate Dehydrogenase	Lactat Dehydrogenase
LDL	Low Density Lipo-protein	Lipo-protein trọng lượng phân tử thấp
LPO	Lipid peroxidation	Sự peroxid hóa lipid
LPS	Lipopolysaccharide	Lipopolysaccharid
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase	Mitogen-Activated Protein Kinase
MDA	Malondialdehyde	Malondialdehyd
MIC	Minimum Inhibitory Concentration	Nồng độ ức chế tối thiểu
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid

<b>Tên viết tắt</b>	<b>Tên Tiếng Anh</b>	<b>Dịch nghĩa</b>
MeOH	Methanol	Methanol
NAPQI	N-Acetyl-p-benzoquinonimine	N-Acetyl-p-benzoquinonimin
NCIM	National Collection of Industrial Microorganism - Pune, India	Trung tâm lưu trữ quốc gia về vi sinh vật công nghiệp – Pune, Ấn Độ
NaCMC	Natri carboxymethylcellulose	Natri carboxymethylcellulose
NF-kB	Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activate B	Yếu tố hạt nhân tăng cường chuỗi nhẹ kappa của các tế bào B hoạt động
NMR	Nuclear Magnetic Resonance	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân
NO	Nitric Oxide	O xit ni tơ
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Superoxide	Gốc tự do superoxid
OD	Optical Density	Mật độ quang học
P/ư		Phản ứng
PAR	Paracetamol	Paracetamol
p-NDA	p-nitroso dimethyl aniline	p-nitroso dimethyl anilin
PPAPs	Polycyclic Polyprenylated Acylphloroglucinols	Các acylphloroglucinol đa vòng mang các nhóm prenyl
ROS	Reactive Oxygen Species	Các dạng oxy hóa hoạt động
SOD	Superoxide dismutase	Superoxid dismutase
TLR	Tall-Like Receptor	Tall-Like Receptor
TNF-alpha	Tumor Necrosis Factor-alpha	Yếu tố hoại tử khối u alpha
TST	Tail-Suspension Test	Thử nghiệm treo đuôi (chuột)
USP7	Ubiquitin-specific protease 7	Ubiquitin-specific protease 7
XIAP	X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein	Protein ức chế chết tế bào theo chương trình



## DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1. Ghi nhận về sự phân bố của các loài Ban thuộc chi <i>Hypericum</i> .....	4
Bảng 3.1. Kết quả định tính các nhóm chất chính trong phần trên mặt đất cây Ban hooker .....	59
Bảng 3.2. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất <b>HH1</b> .....	65
Bảng 3.3. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất <b>HH2</b> .....	67
Bảng 3.4. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất <b>HH3</b> .....	70
Bảng 3.5. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất <b>HH4</b> .....	72
Bảng 3.6. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất <b>HH5</b> .....	74
Bảng 3.7. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất <b>HH6</b> .....	76
Bảng 3.8. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất <b>HH7</b> .....	78
Bảng 3.9. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất <b>HH8</b> .....	79
Bảng 3.10. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất <b>HH9</b> .....	80
Bảng 3.11. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất <b>HH10</b> .....	82
Bảng 3.12. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất <b>HH11</b> .....	83
Bảng 3.13. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất <b>HH12</b> .....	85
Bảng 3.14. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất <b>HH13</b> .....	87
Bảng 3.15. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất <b>HH14</b> .....	89
Bảng 3.16. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất <b>HH15</b> .....	91
Bảng 3.17. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất <b>HH16</b> .....	92
Bảng 3.18. Số liệu phổ <sup>13</sup> C-NMR (125 MHz) của các chất <b>HH17–HH26</b> (δC ppm) .....	95
Bảng 3.19. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất <b>HH27</b> .....	101
Bảng 3.20. Số liệu phổ <sup>13</sup> C-NMR (125 MHz) của các chất <b>HH28–HH34</b> (δC ppm) .....	104
Bảng 3.21. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất <b>HH35</b> .....	107
Bảng 3.22. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất <b>HH36</b> .....	108
Bảng 3.23. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất <b>HH37</b> .....	110
Bảng 3.24. Tác dụng dọn gốc tự do của các mẫu chiết từ cây Ban hooker .....	112
Bảng 3.25. Ảnh hưởng của các cao chiết cây Ban hooker trong mô hình gây tổn thương gan cấp bằng paracetamol .....	114
Bảng 4.1. Sự thay đổi đặc điểm thực vật theo phân bố địa lý của loài <i>H.</i> <i>hookerianum</i> và loài <i>H. hookerianum</i> so với các loài khác trong chi <i>Hypericum</i> .....	123
Bảng 4.2. Danh mục 37 hợp chất phân lập được từ cây Ban hooker .....	126

## DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1. Năm hợp chất được phân lập từ <i>H. hookerianum</i> .....	20
Hình 1.2. Cấu trúc của các adamantan PPAPs từ loài <i>H. hookerianum</i> .....	21
Hình 1.3. Hợp chất plukenetion A và otogirinin A.....	21
Hình 1.4. Cấu trúc của 29 hợp chất PPAPs được phân lập từ <i>H. hookerianum</i> .....	22
Hình 1.5. Cấu trúc của 11 hợp chất PPAPs được phân lập từ <i>H. hookerianum</i> .....	23
Hình 1.6. Phản ứng dọn gốc tự do DPPH.....	26
Hình 2.1 Sơ đồ thiết kế nghiên cứu .....	42
Hình 3.1. Hình ảnh cây Ban hooker tại Xã Sa Pả, Huyện Sa Pa – Lào Cai (Ảnh chụp ngày 18/6/2016) .....	52
Hình 3.2. Cơ quan sinh dưỡng của cây Ban hooker .....	53
Hình 3.3. Cơ quan sinh sản của cây Ban hooker .....	54
Hình 3.4. Vi phẫu lá cây Ban hooker.....	56
Hình 3.5. Vi phẫu thân cây Ban hooker.....	57
Hình 3.6. Vi phẫu rễ cây Ban hooker .....	57
Hình 3.7. Đặc điểm bột lá cây Ban hooker .....	58
Hình 3.8. Đặc điểm bột thân cây Ban hooker.....	58
Hình 3.9. Đặc điểm bột rễ cây Ban hooker.....	59
Hình 3.10. Sơ đồ chiết xuất, phân đoạn các chất từ cây Ban hooker .....	61
Hình 3.11. Sơ đồ phân lập các chất từ phân đoạn n-hexan cây Ban hooker .....	63
Hình 3.12. Sơ đồ phân lập các hợp chất từ phân đoạn ethyl acetat cây Ban hooker	63
Hình 3.13. Cấu trúc hóa học của hợp chất <b>HH1</b> .....	66
Hình 3.14. Cấu trúc hóa học của hợp chất <b>HH2</b> .....	69
Hình 3.15. Cấu trúc hóa học ( <b>A</b> ) và các tương tác HMBC chính ( <b>B</b> ) của hợp chất <b>HH3</b> .....	71
Hình 3.16. Cấu trúc hóa học của hợp chất <b>HH4</b> .....	73
Hình 3.17. Cấu trúc hóa học ( <b>A</b> ) và các tương tác HMBC chính ( <b>B</b> ) của hợp chất <b>HH5</b> .....	75
Hình 3.18. Cấu trúc hóa học ( <b>A</b> ) và các tương tác HMBC chính ( <b>B</b> ) của hợp chất <b>HH6</b> .....	77
Hình 3.19. Cấu trúc hóa học ( <b>A</b> ) và các tương tác HMBC chính ( <b>B</b> ) của hợp chất <b>HH7</b> .....	78
Hình 3.20. Cấu trúc hóa học của hợp chất <b>HH8</b> .....	80
Hình 3.21. Cấu trúc hóa học của hợp chất <b>HH9</b> .....	81
Hình 3.22. Cấu trúc hóa học của hợp chất <b>HH10</b> .....	82
Hình 3.23. Cấu trúc hóa học ( <b>A</b> ) và các tương tác HMBC chính ( <b>B</b> ) của hợp chất <b>HH11</b> .....	83
Hình 3.24. Cấu trúc hóa học ( <b>A</b> ) và các tương tác HMBC chính ( <b>B</b> ) của hợp chất <b>HH12</b> .....	85

Hình 3.25. Cấu trúc hóa học (A) và các tương tác HMBC chính (B) của hợp chất <b>HH13</b> .....	88
Hình 3.26. Cấu trúc hóa học của hợp chất <b>HH14</b> .....	90
Hình 3.27. Cấu trúc hóa học của hợp chất <b>HH15</b> .....	92
Hình 3.28. Cấu trúc hóa học của hợp chất <b>HH16</b> .....	93
Hình 3.29. Công thức cấu tạo của các hợp chất <b>HH17–HH26</b> .....	97
Hình 3.30. Các tương tác HMBC chính của <b>HH20</b> và <b>HH25</b> .....	100
Hình 3.31. Cấu trúc hóa học của hợp chất <b>HH27</b> .....	102
Hình 3.32. Cấu trúc hóa học của các hợp chất <b>HH28–HH34</b> .....	106
Hình 3.33. Cấu trúc hóa học của hợp chất <b>HH35</b> .....	108
Hình 3.34. Cấu trúc hóa học (A) và các tương tác HMBC chính (B) của hợp chất <b>HH36</b> .....	109
Hình 3.35. Cấu trúc hóa học của hợp chất <b>HH37</b> .....	110
Hình 3.36. Mối tương quan giữa nồng độ và tác dụng dọn gốc tự do của các cao chiết từ cây Ban hooker .....	113
Hình 3.37. Tác dụng bảo vệ tế bào thần kinh HT <sub>22</sub> của các cao chiết trên mô hình gây độc bởi glutamat 5mM.....	115
Hình 3.38. Tác dụng bảo vệ tế bào thần kinh HT <sub>22</sub> của các hợp chất trên mô hình gây độc bởi glutamat.....	117
Hình 3.39. Giá trị EC <sub>50</sub> của các hợp chất <b>HH12</b> , <b>HH18</b> , <b>HH31</b> và <b>HH36</b> với tác dụng bảo vệ tế bào thần kinh HT <sub>22</sub> trên mô hình gây độc bởi glutamat .....	118
Hình 3.40. Tác dụng bảo vệ tế bào thần kinh SH-SY5Y của các hợp chất trên mô hình gây độc bởi 6-OHDA.....	120
Hình 3.41. Giá trị EC <sub>50</sub> của các hợp chất <b>HH1</b> , <b>HH15</b> và <b>HH16</b> với tác dụng bảo vệ tế bào thần kinh SH-SY5Y trên mô hình gây độc bởi 6-OHDA .....	121

## ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong vài thập kỷ trở lại đây, xu hướng sử dụng các sản phẩm thuốc và thực phẩm chức năng có nguồn gốc thảo dược để phòng và điều trị bệnh trở nên phổ biến ở trên thế giới. Việt Nam có hệ sinh thái thực vật rất đa dạng và phong phú với khoảng 5.000 loài được sử dụng làm thuốc. Mặc dù cây cỏ đã được người dân sử dụng từ rất lâu trong phòng và chữa bệnh ở nước ta, tuy nhiên việc sử dụng chủ yếu theo kinh nghiệm dân gian, nhiều cây thuốc chưa được nghiên cứu khoa học để nâng cao giá trị và hiệu quả sử dụng.

Chi *Hypericum*, họ Ban (Hypericaceae) là một chi lớn với khoảng hơn 600 loài, phân bố rộng rãi trên khắp thế giới [1-4], các loài thuộc chi *Hypericum* đã được sử dụng nhiều trong các bài thuốc y học cổ truyền từ hàng trăm năm nay [3], [4]. Bên cạnh tác dụng chống trầm cảm đã được biết, sử dụng thường xuyên và thương mại hóa dưới dạng các sản phẩm hỗ trợ điều trị (thực phẩm chức năng), các loài thuộc chi *Hypericum* còn có hoạt tính chống viêm, làm lành vết thương, chống oxy hóa, ức chế sự phát triển của các vi sinh vật, chống ung thư... [1], [2], [4].

Cây Ban hooker là một loài thuộc chi *Hypericum*, phân bố chủ yếu tại một số vùng của Trung Quốc, Nepal, Ấn Độ. Ở Việt Nam cây Ban hooker được tìm thấy ở Sa Pa (Lào Cai) [5], [6]. Loài *H. hookerianum* đã được sử dụng trong y học cổ truyền của Ấn Độ và Trung Quốc để làm lành vết thương, điều trị viêm bàng quang [5], [6]. Tại Việt Nam, cây Ban hooker mọc hoang rất nhiều ở vùng núi Sa Pa (Lào Cai), tuy nhiên chưa được sử dụng nhiều trong y học, đồng bào miền núi thường dùng lá cây Ban hooker để chữa đau mắt cho gia súc [5].

Trên thế giới, một số nghiên cứu (phần lớn của tác giả Trung Quốc) đã công bố về thành phần hóa học và tác dụng chống oxy hóa, kháng khuẩn của loài *H. hookerianum* [3], [4]. Theo đó, hai nhóm hợp chất chính có trong loài *H. hookerianum* là phloroglucinol và xanthon [3], [4].

Dược liệu nói chung cũng như cây Ban hooker nói riêng khi sinh trưởng và phát triển trong các môi trường thổ nhưỡng và khí hậu khác nhau thì thành phần hóa học cũng như tác dụng sinh học sẽ có sự khác biệt. Theo tra cứu, ở Việt Nam chưa

có nghiên cứu nào về thành phần hóa học và tác dụng sinh học của loài Ban hooker được báo cáo. Ngoài ra, theo bản mô tả gốc cũng như các tài liệu về phân loại, cây Ban hooker có nhiều đặc điểm hình thái khá giống với các loài khác thuộc chi *Hypericum*. Do đó, xác định tên khoa học của cây Ban hooker là việc cần thiết để làm cơ sở khoa học cho các nghiên cứu về hóa học và tác dụng sinh học của loài cây này.

Nhằm cung cấp thêm các thông tin khoa học, tạo cơ sở cho nghiên cứu, nâng cao hiệu quả và giá trị sử dụng cho một cây thuốc dân gian ở Việt Nam, đề tài: **Nghiên cứu đặc điểm thực vật, thành phần hóa học và một số tác dụng sinh học của cây Ban hooker (*Hypericum hookerianum* Wight. and Arn., họ Ban - Hypericaceae)** được tiến hành thực hiện với các mục tiêu sau:

1. Mô tả đặc điểm thực vật, xác định tên khoa học và đặc điểm vi học của cây Ban hooker.

2. Chiết xuất, phân lập và xác định được cấu trúc một số hợp chất từ cây Ban hooker.

3. Đánh giá *in vitro* hoạt tính chống oxy hóa và bảo vệ tế bào thần kinh, khảo sát *in vivo* tác dụng bảo vệ gan của cao chiết tổng, phân đoạn và các hợp chất tinh sạch có tiềm năng từ cây Ban hooker.

## CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN

### 1.1. TỔNG QUAN VỀ CHI *Hypericum* L.

#### 1.1.1. Phân loại thực vật

Theo Takhtajan, A.L., (1997) và Nguyễn Tiến Bân (1997) [7], [8], các loài Ban cũng như loài Ban hooker cùng chi Ban (*Hypericum*) thuộc họ Ban (Hypericaceae), trong các bậc phân loại của nhóm thực vật hạt kín hai lá mầm, cụ thể như sau:

- Giới thực vật - Plantae
  - Ngành Ngọc lan- Magnoliophyta ≈ Ngành Thực vật Hạt kín- Angiospermae
    - Lớp Ngọc lan- Magnoliopsida ≈ Lớp Hai lá mầm- Dicotyledone
      - Bộ Chè- Theales
        - Họ Ban- Hypericaceae
          - Chi Ban- *Hypericum*

Đặc điểm hình thái: Các loài thuộc chi *Hypericum* là cây bụi hoặc nửa bụi, sống lâu năm, không có lông hoặc có lông đơn giản. Lá mọc đối (hoặc vòng) không cuống hoặc cuống ngắn, gân lông chim hoặc chân vịt (hiếm khi rẽ đôi), mép nguyên hoặc có tuyến ở mép lá. Cụm hoa xim, hoa lưỡng tính, hoa hình sao hoặc hình cốc. Đài mẫu 5, tiền khai hoa năm điểm, hiếm khi bốn, xếp chữ thập, không đều hoặc đều, tràng liền một phần hoặc rời. Tràng mẫu 4 hoặc 5, xếp xoắn ốc, màu vàng hoặc vàng chanh (hiếm khi trắng) mặt dưới thường màu nhạt hoặc có gân đỏ, không rụng hoặc sớm rụng sau nở hoa, thường không đối xứng [9]. Nhị hoa chùm 4 hoặc 5, rời và dính vào họng tràng, có thể dính với nhau thành 3 hoặc 4 bó nhị, dính vào đài hoặc không, không rụng hoặc rụng sớm, mỗi bó nhị có thể lên đến 70 nhị, chỉ nhị mảnh, rời nhau hoặc dính 2/3, bao phần nhỏ dính lưng hoặc có thể dính gốc, mở dọc, có tuyến liên kết, nhị vô tính bị khuyết (rất hiếm). Bầu nhụy 3-5 khoang, dính noãn trung trụ hoặc chỉ một khoang với 2-3-5 hợp điểm dính noãn bên, mỗi hợp điểm có từ 2 đến nhiều noãn, thân noãn 2 hoặc 3-5, rời nhau hoặc dính một phần đến hoàn toàn, đầu nhụy nhỏ, bè hoặc không. Quả nang chẻ ô hoặc hiếm khi tự mở, vỏ quả thường chứa dầu. Hạt nhỏ, hình chum hoặc có cánh hẹp, vỏ hạt hình đa

dạng, không có áo hạt (rất hiếm khi có mồng). Cây mầm nhọn, thẳng với một lá mầm nhọn [9].

### 1.1.2. Số loài thuộc chi *Hypericum* L. và phân bố của chúng

Theo một số tài liệu đã công bố, chi *Hypericum* trên thế giới có khoảng 660 loài, phân bố rải rác từ vùng ôn đới ẩm xuống vùng cận nhiệt đới và nhiệt đới. Riêng ở Trung Quốc đã công bố có 64 loài, trong đó có tới 33 loài được coi là đặc hữu [10]. Ở Việt Nam, năm 1909, F. Gagnepain mô tả chi *Hypericum* (trong Flore Generale de L'Indochine, tập I) có 2 loài *Hypericum japonicum* Thunb. và *H. sampsonii* Hance [11]. Phạm Hoàng Hộ (1999) trong bộ “*Cây cỏ Việt Nam*” tập I, đã bổ sung chi này ở nước ta có 7 loài [6]. Con số này cũng được Nguyễn Tiến Bản (2003) ghi nhận lại trong “*Danh lục các loài thực vật Việt Nam*”, tập II: *Hypericum ascyron* L.; *H. hookerianum* Wight et Arn.; *H. japonicum* Thunb.; *H. napaulense* Choisy; *H. petiolulatum* Hook. f. et Thoms. ex Dyer; *H. sampsonii* Hance; *H. uralum* Buch-Ham. ex D. Don [12]. Năm 2006, một nhóm nghiên cứu ở Viện Dược liệu, bổ sung 1 loài Ban mọc tự nhiên cũng được dùng làm thuốc là *Hypericum wightianum* Wall. ex Wight et Arn. [13]. Đến năm 2017, có thêm thông tin về một loài Ban nhập nội, tạm gọi là Ban âu (*Hypericum perforatum*) khi đem trồng ở huyện Bắc Hà tỉnh Lào cai [14]. Như vậy, tính đến năm 2017, chi Ban (*Hypericum*) thuộc họ ban (Hypericaceae) ở Việt Nam đã có chín loài (tám loài mọc tự nhiên và một loài nhập nội). Căn cứ vào các tài liệu đã công bố, chín loài này được hệ thống sơ bộ về sự phân bố ở nước ta, trong Bảng 1.1 sau:

Bảng 1.1. Ghi nhận về sự phân bố của các loài Ban thuộc chi *Hypericum* ở Việt Nam

Stt	Tên theo tiếng Việt	Tên khoa học	Ghi nhận phân bố	Tài liệu trích dẫn
1	Ban sỏi	<i>Hypericum japonicum</i> Thunb.	Sơn La, Sa Pa (Lào Cai), Huế, Đà Lạt (Lâm Đồng), Bắc Giang, Vĩnh Phúc...	[12], [15], [6], [11]
2	Ban có cuống	<i>Hypericum petiolatum</i> Hook.f. et Thoms. ex Dyer	Dựa Rạch, Sông Đà (Hòa Bình), Lai Châu	[6]
3	Ban hooker	<i>Hypericum hookerianum</i> Wight et Arn.	Sa Pa (Lào Cai)	[6]
4	Ban lá dĩnh	<i>Hypericum sampsonii</i> Hance	Tân Lạc (Hòa Bình), Na Hang (Tuyên Quang), Ba	[12] [15], [6], [11]

Stt	Tên theo tiếng Việt	Tên khoa học	Ghi nhận phân bố	Tài liệu trích dẫn
			BỂ (Bắc Kạn)	
5	Ban nê pan	<i>Hypericum napaulense</i> Choisy	Vùng núi phía Bắc, Pia Oác (Cao Bằng)	[6]
6	Ban rỗ	<i>Hypericum ascyron</i> L.	Sa Pa (Lào Cai)	[6]
7	Ban vỏ lúa	<i>Hypericum uralum</i> Buch.-Ham. ex D.Don	Lai Châu (Phong Thổ), Lào Cai (Sa Pa, Ô Quý Hồ), Yên Bái, Cao Bằng...	[12]
8	Ban wight	<i>Hypericum wightianum</i> Wall. ex Wight et Arn.	Phó Bảng – Đồng Văn (Hà Giang); Sìn Hồ (Lai Châu)	[13]
9	Ban âu	<i>Hypericum perforatum</i> L.	Cây nhập trồng ở Sa Pa, Bắc Hà (Lào Cai); Mộc Châu (Sơn La)	[14]

Trong bảng trên, có thể thấy số loài đã biết thuộc chi *Hypericum* ở Việt Nam ít hơn nhiều so với Trung Quốc (9/64 loài). Về phân bố của các loài Ban kể trên cũng cho thấy chỉ có loài Ban sởi (*Hypericum japonicum* Thunb.) phân bố rộng rãi nhất, bao gồm hầu hết các tỉnh ở phía bắc và vào đến tận các tỉnh Miền trung và ở Tây Nguyên. Hầu hết các loài phân bố rải rác ở vùng núi cao phía bắc (loài số 2,3,4,5,6,8). Ở các tỉnh phía nam, bên cạnh loài Ban sởi (số 1), chỉ còn 1 loài nữa (số 7- Ban vỏ lúa (*Hypericum uralum* Buch.-Ham. ex D.Don) ghi nhận được ở Đà Lạt (Lâm Đồng).

### 1.1.3. Thành phần hóa học của các loài trong chi *Hypericum* L.

Thành phần hóa học của các loài thuộc chi *Hypericum* phần lớn được công bố bởi các nhà khoa học Trung Quốc. Cho đến nay, gần 700 hợp chất đã được phân lập từ các loài thuộc chi *Hypericum*. Các hợp chất tinh khiết đã phân lập được thuộc các nhóm phloroglucinol, anthraquinon, xanthon, flavonoid và một số nhóm chất khác. Sau đây là mô tả chi tiết các nhóm chất này.

#### 1.1.3.1. Các hợp chất phloroglucinol

Phloroglucinol là nhóm hợp chất phenolic có khung cơ bản 1,3,5-benzotriol, là nhóm hợp chất chính và có nhiều tác dụng sinh học đã được tìm thấy trong thành phần hóa học của các loài thuộc chi *Hypericum*. Phần lớn các hợp chất phloroglucinol trong tự nhiên được phân lập từ chi *Hypericum* [1], [4]. Nhóm hợp chất phloroglucinol trong *Hypericum* được chia thành 05 phân nhóm



bao gồm các phloroglucinol mang nhóm prenyl và/hoặc có khung chroman, chromen (Phân nhóm 1); các acylphloroglucinol dime (Phân nhóm 2); các acylphloroglucinol đa vòng mang các nhóm prenyl (Polycyclic Polyprenylated Acylphloroglucinols – PPAPs - Phân nhóm 3); các benzophenon đơn giản (Phân nhóm 4); các hợp chất phloroglucinol-terpen (Phân nhóm 5). Tên và cấu trúc của các phloroglucinol đã phân lập được từ các loài thuộc chi *Hypericum* được trình bày trong **Phụ lục 1** [1-3], [16-81].

Đến nay, các nghiên cứu đã chỉ ra có 503 phloroglucinol (số thứ tự **1-503** trong **Phụ lục 1**) với cấu trúc đa dạng đã được phân lập từ các loài thuộc chi *Hypericum*. Các loài được nghiên cứu nhiều chủ yếu ở Trung Quốc, bao gồm *H. perforatum*, *H. japonicum*, *H. monogynum*, *H. sampsonii*, *H. papuanum*, *H. roeperianum*...[4]. Các phloroglucinol chủ yếu được tìm thấy trong phần trên mặt đất của các loài nghiên cứu. Trong số 503 hợp chất phloroglucinol có 101 phloroglucinol mang các nhóm prenyl và/hoặc có khung chroman (số thứ tự **1-101** trong **Phụ lục 1**), 35 acylphloroglucinol dime (số thứ tự **102-136** trong **Phụ lục 1**), 307 acylphloroglucinol đa vòng mang các nhóm prenyl (PPAPs) (số thứ tự **137-443** trong **Phụ lục 1**), 27 benzophenon đơn giản (số thứ tự **444-470** trong **Phụ lục 1**), 33 hợp chất phloroglucinol-terpen (số thứ tự **471-503** trong **Phụ lục 1**).

Con đường sinh tổng hợp tạo thành các hợp chất phloroglucinol trong chi *Hypericum* được trình bày trong **Phụ lục 1**. Theo đó, ba CoA-thioester bao gồm isobutyryl-CoA; 2-methylbutyryl-CoA; benzoyl-CoA (**I**) được xúc tác bởi các enzym tổng hợp polyketid loại III sẽ kết hợp với 03 phân tử malonyl-CoA để hình thành 03 chuỗi polyketid (**II**). Các chuỗi polyketid này trải qua quá trình ngưng tụ nội phân tử Claisen để tạo ra các chất trung gian thơm phloroisobutyrophenon, 2-methylbutanoylphloroglucinol, phlorbenzophenon (**III**) [1]. Sự đa dạng và mới lạ trong cấu trúc của các hợp chất phloroglucinol từ chi *Hypericum* được tạo thành từ phản ứng của các chất trung gian thơm (**III**) với một hoặc nhiều nhóm prenyl (**IV**). Các hợp chất prenyl này sẽ trải qua các chuỗi phản ứng như đóng vòng nội phân tử, epoxy hóa, methyl hóa, dime hóa, phản ứng hetero-Diels-Alder cycloaddition... để tạo ra 05 phân nhóm phloroglucinol trong chi *Hypericum* [1], [2], [4].

### 1.1.3.2. Các dẫn xuất anthraquinon.

Các dẫn xuất anthraquinon đã phân lập từ chi *Hypericum* và công thức cấu tạo của chúng được liệt kê chi tiết trong **Phụ lục 2** [2], [82-84]

Hypericin (số thứ tự **504** trong **Phụ lục 2**), một naphthodiantron, dẫn xuất của anthraquinon là một hợp chất chính có nhiều hoạt tính sinh học như chống trầm cảm, điều hòa miễn dịch, kháng u, kháng khuẩn... đã được tìm thấy trong thành phần hóa học của loài *H. perforatum* và một số loài khác thuộc chi *Hypericum* [2], [82]. Bên cạnh hypericin, sáu hợp chất naphthodiantron khác (số thứ tự **505–510** trong **Phụ lục 2**) và năm hợp chất bianthraquinon (số thứ tự **511–515** trong **Phụ lục 2**) cũng đã được phân lập từ chi *Hypericum*.

### 1.1.3.3. Các hợp chất xanthon

Kết quả những nghiên cứu đã cho thấy, các loài thuộc chi *Hypericum* có chứa nhiều các hợp chất xanthon. Một số loài đã được nghiên cứu bao gồm *H. ellipticum*, *H. monogynum*, *H. scabrum*, *H. beanii*, *H. perforatum*, *H. geminiflorum*, *H. sampsonii*, *H. hookerianum*... Tên và cấu trúc của các xanthon đã phân lập được từ các loài thuộc chi *Hypericum* được trình bày trong **Phụ lục 3** [2], [77, 85-96]

Cho đến nay đã có 131 hợp chất xanthon (số thứ tự **516–646** trong **Phụ lục 3**) đã được tìm thấy trong thành phần hóa học của các loài thuộc chi *Hypericum*. Trong số này có 82 hợp chất xanthon mang khung cơ bản 9H-Xanthen-9-on với các nhóm thế methoxy, hydroxy, và prenyl (số thứ tự **516–597** trong **Phụ lục 3**), hai xanthon mang nhóm thế sulfonat phân lập từ loài *H. sampsonii* (số thứ tự **598–599** trong **Phụ lục 3**) [93], năm xanthon tồn tại dưới dạng glycosid (số thứ tự **599, 600–602, 620** trong **Phụ lục 3**). Ngoài những hợp chất xanthon có khung cơ bản, ba xanthon dime cũng đã được phân lập từ phần trên mặt đất của loài *H. japonicum* (số thứ tự **644–646** trong **Phụ lục 3**) [92], [96] và 10 hợp chất xanthonolignoid (số thứ tự **634–643** trong **Phụ lục 3**) - một nhóm hợp chất có khung phenylpropan liên kết với ortho-dihydroxyxanthon bằng một vòng dioxan - cũng đã được tìm thấy trong thành phần hóa học của một số loài thuộc chi *Hypericum* [2], [4]. Đây là một nhóm hợp chất không thường gặp trong tự nhiên.

Cũng giống như nhóm phloroglucinol, các hợp chất xanthon trong chi

*Hypericum* chủ yếu được phân lập từ phần trên mặt đất của các loài nghiên cứu.

#### **1.1.3.4. Các hợp chất flavonoid**

Flavonoid là nhóm hợp chất phổ biến có trong nhiều loài thực vật, chúng là thành phần chính trong hầu hết các loài *Hypericum* đã nghiên cứu [2], [4], tồn tại cả dưới dạng aglycon và dạng glycosid với hai khung chính là flavonol và flavanonol. Tên và cấu trúc của các flavonoid đã phân lập từ chi *Hypericum* được trình bày trong **Phụ lục 4** [2], [97-102].

#### **1.1.3.5. Các nhóm hợp chất khác**

Bên cạnh các nhóm hợp chất chính đã nêu ở trên, trong thành phần hóa học của các loài thuộc chi *Hypericum* còn có nhiều nhóm chất khác như các acid phenolic, dẫn xuất dibenzo-1,4-dioxan, spiro lacton, triterpenoid, meroterpenoid... được trình bày trong **Phụ lục 5** [2], [25], [90], [100], [103-112].

Một số hợp chất acid phenolic quen thuộc như acid caffeic (số thứ tự **689** trong **Phụ lục 5**), acid chlorogenic (số thứ tự **690** trong **Phụ lục 5**), acid syringic (số thứ tự **691** trong **Phụ lục 5**), acid ferulic (số thứ tự **692** trong **Phụ lục 5**), acid *p*-coumaric (số thứ tự **693** trong **Phụ lục 5**) cũng đã được tìm thấy trong thành phần hóa học của các loài thuộc chi *Hypericum* [108]. Ba hợp chất meroterpenoid mới là biyoulacton A-C số thứ tự (số thứ tự **671–673** trong **Phụ lục 5**) và một hợp chất thân dầu biyouyanagin A (số thứ tự **678** trong **Phụ lục 5**) có khả năng ức chế sự nhân lên của HIV trong tế bào lympho H9 ( $EC_{50}=0,798 \mu\text{g/mL}$ ) là những hợp chất có cấu trúc độc đáo đã được phân lập từ loài *H. monogynum*.

Tại Việt Nam, năm 2006, tác giả Nguyễn Quốc Thức đã nghiên cứu thành phần hóa học của hai loài thuộc chi *Hypericum* được dùng làm thuốc phổ biến ở nước ta là Ban tròn (*H. patulum*) và Ban nọc sỏi (*H. japonicum*). Kết quả cho thấy, thành phần các chất chính trong hai loài ban này tương đối giống nhau; gồm flavonoid, tinh dầu, hợp chất coumarin, saponin, đường khử và các hợp chất phenolic (bao gồm flavonoid). Trong số các nhóm chất, phenolic là nhóm hợp chất có hàm lượng lớn nhất [113].

Năm 2011, Viện Dược liệu đã nghiệm thu đề tài cấp Bộ “Nghiên cứu di thực và quy trình trồng trọt cây ban *Hypericum perforatum* L. để chiết xuất sản phẩm

chứa hypericin”. Kết quả của đề tài đã cho thấy hàm lượng hypericin trong cây *Hypericum perforatum* (Ban Âu) đạt trên 0,1% - một kết quả khá cao so với tiêu chuẩn Dược điển châu Âu là 0,08% và Dược điển Mỹ 25 là 0,04%. Kết quả này cũng phù hợp với các nghiên cứu trên thế giới trước đây cho rằng cây Ban Âu càng được dịch chuyển vùng trồng về gần đường xích đạo của trái đất thì hàm lượng hypericin càng cao do được thuận lợi trong quá trình quang hợp để sinh tổng hợp hoạt chất hypericin [114].

Những kết quả nghiên cứu nêu trên đã cho thấy thành phần hóa học của các loài thuộc chi *Hypericum* rất đa dạng, phong phú, hứa hẹn khả năng ứng dụng trong nhiều lĩnh vực của khoa học và đời sống.

#### **1.1.4. Tác dụng sinh học của cao chiết và các hợp chất phân lập được từ một số loài thuộc chi *Hypericum* L.**

Tác dụng sinh học của cao chiết các loài *Hypericum* và các hợp chất phân lập được đã được nghiên cứu trên một số mô hình thực nghiệm [2], [4], được thực hiện trên mẫu cao chiết của các loài *H. perforatum*, *H. canariense*, *H. faberi*, *H. patulum*, *H. mysoreense*, *H. brasiliense*... Trong số các tác dụng sinh học đã được báo cáo, tác dụng chống trầm cảm của loài *H. perforatum* được quan tâm nghiên cứu nhiều nhất, cả trên *in vitro*, *in vivo* và thử nghiệm lâm sàng. Hợp chất chính được xác định có tác dụng là hypericin (số thứ tự **504** trong **Phụ lục 2**) - một naphthodianthron [3], [4]. Ngoài tác dụng chống trầm cảm, các loài thuộc chi *Hypericum* và các hợp chất phân lập được cũng đã được chứng minh có tác dụng làm lành vết thương, tác dụng chống ung thư, chống oxy hóa, chống viêm, kháng khuẩn, kháng nấm [4].

##### **1.1.4.1. Tác dụng chống trầm cảm**

###### **a. Tác dụng chống trầm cảm của *H. perforatum***

Loài *H. perforatum* đã được sử dụng từ thời kỳ trung đại và là một phương thuốc để chống trầm cảm, làm lành vết thương, điều trị chứng khó tiêu và chống ung thư.

Từ cuối những năm 1990, loài *H. perforatum* đã được sử dụng phổ biến ở Mỹ như một thuốc chống trầm cảm, đặc biệt khi được phối hợp với ephedrin [115], [116]. Bệnh tâm thần thường gặp bao gồm trầm cảm, kích thích thần kinh trung

ương (phản kích bất thường, dễ xúc động), rối loạn tâm thần lưỡng cực (bipolar); trạng thái dao động giữa trầm cảm và kích thích thần kinh trung ương. Bệnh trầm cảm xuất hiện là do sự suy giảm hàm lượng hoặc giảm hiệu năng của các chất dẫn truyền xung động thần kinh bao gồm norepinephrin và serotonin. Một số phương pháp điều trị trầm cảm dùng chất ức chế tái hấp thu enzym Monoamin oxidase (MAO), qua đó làm tăng nồng độ của chất dẫn truyền thần kinh trong hệ thần kinh trung ương và làm giảm tình trạng bệnh [117], [118].

Năm 1984, Suzuki O và cộng sự đã tiến hành thử tác dụng kháng MAO của các hợp chất xanthan (là nhóm hợp chất thường gặp trong họ Clusiaceae/Guttiferae và Gentianaceae). Kết quả cho thấy, các hợp chất này ức chế cả hai loại Monoamin oxidase A và B (MAO<sub>A</sub> và MAO<sub>B</sub>) [119]. Nhóm nghiên cứu của Suzuki O cũng chứng minh, hợp chất hypericin trong *H. perforatum* có khả năng ức chế không phục hồi MAO<sub>A</sub> và MAO<sub>B</sub> *in vivo* [119], [120].

Cao chiết của *H. perforatum* chuẩn hóa theo hypericin cũng đã được đánh giá tác dụng chống trầm cảm trên các loài động vật. Mẫu thử có tác dụng kéo dài giấc ngủ (dùng một liều độc lập) và kháng reserpin [121].

Hypericin và pseudohypericin (số thứ tự **505** trong **Phụ lục 2**) có trong *H. perforatum* và một số loài thuộc chi *Hypericum* đã được chứng minh là có tác dụng đối với bệnh nhân trầm cảm thể nhẹ và trung bình ở Châu Âu. Ngoài 02 hợp chất này, tác dụng chống trầm cảm của cao chiết *H. perforatum* cũng có thể do các thành phần khác như flavonoid mang lại [2]. Nghiên cứu của Baureithel KH. trên tác dụng ức chế sự liên kết [3H]flumazenil vào vị trí gắn của benzodiazepin trên thụ thể GABA<sub>A</sub> trong tế bào não chuột của cao chiết hoa các loài *H. perforatum*, *H. hirsutum*, *H. patulum* và *H. olympicum* và các hợp chất đã phân lập cho thấy, các cao chiết đều có tác dụng tốt trên mô hình thử nghiệm với giá trị IC<sub>50</sub> lần lượt là 6,83; 6,97; 13,2 và 6,14 µg/mL. Các hoạt chất như hypericin, các flavonoid (bao gồm quercetin, luteolin, rutin, hyperosid và quercitrin), I3,II8-biapigenin không có tác dụng ở nồng độ 1 µM. Ngược lại, amentoflavon thể hiện tác dụng tốt với giá trị IC<sub>50</sub> là 14,9 ± 1,9 nM trong mô hình thử nghiệm. Phân tích hàm lượng hypericin và amentoflavon trong các cao

chiết của các loài thuộc chi *Hypericum* cho thấy sự tương quan giữa nồng độ amentoflavon và khả năng ức chế sự gắn của flumazenil với GABA<sub>A</sub>, trong khi đó không thấy được mối tương quan này ở hypericin [122].

Để xác định tác dụng chống trầm cảm của *H. perforatum*, năm 1996, nhóm nghiên cứu của Trường đại học Ludwig- Munich đã tiến hành thí nghiệm so sánh tác dụng của *H. perforatum* với thuốc chống trầm cảm imipramin trên tổng số 1.008 bệnh nhân ngoại trú. Kết quả cho thấy, cao chiết *H. perforatum* có hiệu quả so với giả dược (mạnh gấp 2,67 lần, độ tin cậy 95,0%, khác biệt có ý nghĩa thống kê) và tác dụng tương đương với tác dụng của imipramin. Có 19,8% số bệnh nhân dùng cao chiết *H. perforatum* xuất hiện tác dụng phụ trong khi con số này đối với bệnh nhân dùng imipramin là 52,8% [117]. Nghiên cứu thực nghiệm trên các bệnh nhân trầm cảm từ 6-16 tuổi cũng cho thấy, *H. perforatum* có tác dụng trên các thể trầm cảm ở thanh thiếu niên [123].

Tác dụng chống trầm cảm của *H. perforatum* cũng đã được báo cáo trên những bệnh nhân trầm cảm nhẹ và trung bình trong nghiên cứu của Gaster B. và cộng sự tiến hành năm 2000. Theo đó, phân tích này bao gồm tám thử nghiệm lâm sàng ngẫu nhiên, có đối chứng, mù đôi, bốn nghiên cứu với đối chứng giả dược và bốn nghiên cứu so sánh với thuốc chống trầm cảm ba vòng. Kết quả phân tích cho thấy chế phẩm từ cao chiết *H. perforatum* có hiệu quả tốt hơn so với giả dược từ 22-55% trong điều trị các bệnh nhân trầm cảm mức độ nhẹ và trung bình, tuy nhiên thấp hơn 6-18% so với thuốc chống trầm cảm ba vòng. Chế phẩm *H. perforatum* có ưu điểm là giá thành thấp và ít tác dụng không mong muốn khi so với thuốc chống trầm cảm ba vòng. Có thể thấy cao chiết *H. perforatum* là một lựa chọn điều trị cho bệnh nhân trầm cảm mức độ nhẹ và trung bình mà không thể dung nạp các tác dụng không mong muốn của thuốc chống trầm cảm ba vòng hoặc bệnh nhân có khó khăn về tài chính [124].

Muller D. và cộng sự đã thử nghiệm và chứng minh tác dụng chống trầm cảm thể rối loạn kết hợp bồn chồn của *H. perforatum*, hỗn hợp cao *H. perforatum* và cây nữ lang (*Valeriana officinalis*). Nghiên cứu được tiến hành trên 2.500 bệnh nhân cho thấy sử dụng hỗn hợp hai cao chiết có tác dụng tốt hơn khi so với chỉ sử

dụng cao chiết *H. perforatum* [125].

*b. Tác dụng chống trầm cảm của một số loài Hypericum khác*

Ngoài *H. perforatum*, một số các loài khác thuộc chi *Hypericum* cũng đã được nghiên cứu, đánh giá tác dụng chống trầm cảm. Năm 2002, Sanchez-Mateo CC. và cộng sự đã nghiên cứu tác dụng trên hệ thần kinh trung ương của cao chiết methanol phân trên mặt đất (thu hái lúc đang ra hoa) của các loài *H. canariense*, *H. grandifolium*, *H. reflexum*. Kết quả cho thấy, chỉ có mẫu chiết từ loài *H. reflexum* ở hai mức liều 500 mg/kg thể trọng và 1.000 mg/kg thể trọng có tác dụng đến khả năng vận động, ổn định thân nhiệt và thay đổi thời gian của giấc ngủ. Các cao chiết đều không gây giãn cơ hay kháng cholinergic, có tác dụng chống sa mi mắt hoặc chống trầm cảm vận động (motor depression) do tetrabenazin gây ra. Các mẫu thử cũng đã được chứng minh có khả năng làm giảm thời gian bất động trong thí nghiệm bơi bắt buộc [126].

Năm 2003, Wan D. và cộng sự đã sử dụng mô hình bơi cưỡng bức và mô hình treo đuôi chuột để đánh giá tác dụng của cao chiết ethanol từ ba loài thuộc chi *Hypericum*. Theo đó, cao chiết từ hai loài *H. perforatum* và *H. faberi* làm giảm thời gian bất động trong mô hình bơi cưỡng bức và thời gian bất động trong mô hình treo đuôi chuột [127].

**1.1.4.2. Tác dụng làm lành vết thương**

Mới đây, điều làm cho các nhà khoa học chú ý là những người dân ở vùng Nilgiris, Tamilnadu, Ấn Độ đã dùng lá của cây *H. patulum* như một thuốc làm mau lành vết thương, tương tự như loài *H. perforatum*. Trên cơ sở này, một nghiên cứu trên động vật đã được tiến hành nhằm đánh giá tác dụng làm lành vết thương của cao chiết lá cây này với kết quả như sau:

Đối với vết thương mất mảng, quá trình lành vết thương bởi cao chiết lá *H. patulum* (loại 5% và 10%) thể hiện qua quan sát thấy nhanh hơn so với nhóm chứng (nhóm bôi dầu tá dược – không có hoạt chất). Nhóm bôi dầu *H. patulum* 10% có vết thương được hàn gắn sau  $\geq 4$  ngày. Kết quả này tương đương với dạng thuốc tiêu chuẩn hay dùng để hàn gắn vết thương là nitrofurazon. Thời gian liền vết thương ngắn hơn, tỉ lệ hàn vết thương cũng nhanh hơn ở nhóm được bôi dầu *H. patulum*

10% ( $18 \pm 2$  ngày để đóng hoàn toàn 100% vết thương) và tương đương với nhóm dùng nitrofurazon. Nhóm được bôi dầu 5% *H. patulum* có vết thương được liền đáng kể là  $\geq 8$  ngày và lành hoàn toàn là  $20 \pm 2$  ngày.

Đối với vết rách, sức căng (lực vừa đủ làm rách lại vết thương đã liền) đo được của nhóm được bôi dầu *H. patulum* 10% so với nhóm có bôi nitrofurazon là tương đương. Nhóm được bôi dầu *H. patulum* 5% có sức căng giảm hơn so với nhóm bôi nitrofurazon, nhưng lớn hơn hẳn so với nhóm chứng. Như vậy, các nhóm được bôi *H. patulum* ở cả hai nồng độ đều có kết quả đo sức căng tại vết thương tăng lên sau 10 ngày điều trị. Cùng với đó, kết quả phân tích hình ảnh mô tại vùng bị tổn thương của các nhóm chuột thí nghiệm được điều trị với cao chiết *H. patulum* 5% và 10%, nitrofurazon 0,2% và chỉ bôi dầu tá được cho thấy: sự tái tạo tổ chức mô ban đầu rộng hơn trong nhóm sử dụng dầu *H. patulum* và nhóm sử dụng dầu nitrofurazon. Không có vết nào có biểu hiện phù nề, sung huyết, hay viêm. Trong vết thương của nhóm bôi nitrofurazon xuất hiện nhiều xơ với những mạng lưới trong biểu bì hơn so với vết thương của nhóm được điều trị bằng dầu *H. patulum* 5% và 10% [2].

#### **1.1.4.3. Tác dụng kháng vi khuẩn – vi nấm**

Tác dụng chống vi khuẩn của hai loài *Hypericum* ở Ấn Độ đã được Mukherjee PK. và cộng sự nghiên cứu năm 2002. Theo đó, cao chiết ether dầu hỏa, aceton, chloroform và methanol của lá, thân loài *H. mysorensis* và *H. patulum* được thử đồng thời tác dụng trên sáu chủng vi khuẩn và nấm bằng phương pháp đĩa thạch và đo diện tích vùng vô khuẩn. Kết quả cho thấy cao chiết của cả hai loài đều có phổ kháng khuẩn khá rộng. Các cao chiết chloroform và methanol của cả hai loài có tác dụng kháng nấm tương đương với griseofulvin - một hợp chất kháng nấm tiêu chuẩn [128].

Nghiên cứu của tác giả Lyles JT. và cộng sự cho thấy tinh dầu chiết xuất từ *H. perforatum* có khả năng ức chế vi khuẩn *Staphylococcus aureus*, ức chế sự hình thành của biofilm ở nồng độ 0,004 - 0,016%, ức chế sự truyền tín hiệu giữa các vi khuẩn ở nồng độ 0,064 - 0,512% [129].



#### 1.1.4.4. Tác dụng chống ung thư và gây độc tế bào

Cao chiết methanol lá và thân của hai loài *H. mysorensis* và *H. patulum* đã được Vijayan P. và cộng sự đánh giá tác dụng ức chế sự phát triển của ba dòng tế bào HEP-2, RD và DLA. Kết quả cho thấy cao chiết của *H. patulum* có tác dụng tốt với giá trị IC<sub>50</sub> lần lượt là 1,71; 1,53 và 2,23 µg/mL. Loài *H. mysorensis* thể hiện tác dụng trung bình trên các dòng tế bào thử nghiệm [130].

Nhóm tác giả Madunic J. và cộng sự đã tiến hành sàng lọc tác dụng gây độc tế bào của dịch chiết ethanol 16 loài *Hypericum* trên hai dòng tế bào ung thư người, bao gồm tế bào ung thư não A1235 và ung thư vú MDA MB-231. Kết quả nghiên cứu cho thấy các dịch chiết không có tác dụng gây độc lên tế bào MDA MB-231. Tuy nhiên, đối với dòng tế bào A1235, tám loài *Hypericum* có khả năng ức chế tế bào sau 24 giờ với tỷ lệ từ 8,0% (với *H. patulum*) đến 21,7% (với *H. oblongifolium*). Sau 72 giờ, dịch chiết ethanol của các loài *H. androseum*, *H. balearicum*, *H. delphilum* và *H. densiflorum* có tác dụng ức chế mạnh trên dòng tế bào A1235. Cơ chế được xác định thông qua sự chết tế bào theo chương trình [131].

Loài *H. brasiliense* cũng đã được Franca HS. và cộng sự nghiên cứu tác dụng chống ung thư. Theo đó, cao chiết *n*-hexan của loài này có tác dụng chống tăng sinh trên các dòng tế bào OVCAR-03 (ung thư cổ tử cung), NCI-ADR/RES (ung thư cổ tử cung kháng trị) và UACC-62 (ung thư da). Hợp chất uliginosin B có hoạt tính mạnh nhất trong các dẫn xuất phloroglucinol với giá trị IC<sub>50</sub> lần lượt là 1,49; 0,72 và 3,91 µg/mL trên ba dòng tế bào OVCAR-03, NCI-ADR/RES và UACC-62 [132].

Năm 2017, tác giả Brito L. và cộng sự đã báo cáo tổng quan về một số thành phần có hoạt tính chống ung thư phân lập từ chi *Hypericum*, tập trung vào các hợp chất hypericin, hyperforin, hypocrellin A và hypocrellin B. Theo đó, hypericin là một trong những hoạt chất được quan tâm và có hàm lượng đáng kể trong một số loài *Hypericum* [133]. Hypericin đã được sử dụng nhiều trong các liệu pháp quang hóa điều trị ung thư với cơ chế đề xuất do tấn công vào các mạch máu nuôi khối u, làm giảm nuôi dưỡng khối u; gây chết tế bào theo chương trình và/hoặc các tổn thương hoại tử; hoạt hóa đáp ứng miễn dịch chống ung thư của cơ thể. Bên cạnh đó,

hyperforin cũng là một hoạt chất có khả năng gây độc tế bào, được đề cập trong nhiều nghiên cứu trước đây. Tuy nhiên, hyperforin có tính ổn định thấp nên việc ứng dụng trong lâm sàng gặp khó khăn. Cuối cùng, hai hợp chất hypocrellin A và B có tác dụng chống ung thư, đã được đánh giá trên các dòng tế bào ung thư vòm họng TW0-1 và CNE2 [133].

Bên cạnh khả năng chống ung thư khi sử dụng đơn lẻ, nhóm tác giả Zhang HB. đã tiến hành nghiên cứu tìm hiểu tác dụng của cao chiết *H. japonicum* khi phối hợp với 5-fluorouracil trên mô hình gây ung thư gan ở chuột. Kết quả nghiên cứu cho thấy, *H. japonicum* có khả năng hiệp đồng tác dụng chống ung thư cũng như làm giảm tác dụng không mong muốn của 5-fluorouracil. Khi sử dụng phối hợp 5-fluorouracil và cao chiết *H. japonicum* ở hai mức liều 6 g/kg/ngày và 12 g/kg/ngày trên chuột bị ung thư gan có khả năng kéo dài thời gian sống 41% và 60% so với nhóm chuột chỉ điều trị bằng 5-fluorouracil (23 và 26 ngày so với 16 ngày). Đồng thời nhóm chuột sử dụng cao chiết *H. japonicum* có số lượng bạch cầu, khả năng thực bào tốt hơn so với nhóm chỉ sử dụng 5-fluorouracil [134].

#### **1.1.4.5. Tác dụng chống viêm, giảm đau và chống oxy hóa**

Dịch chiết methanol của một số loài *Hypericum* gồm *H. perforatum*, *H. empetrifolium* và *H. triquetrifolium* đã được Zhang H. B. và cộng sự báo cáo có hoạt tính chống viêm. Tác dụng của mẫu thử có thể do các thành phần hypericin, pseudohypericin, hợp chất phenolic hoặc flavonoid, thông qua việc ức chế enzym myeloperoxidase (MPO) của tế bào bạch cầu. Các kết quả nghiên cứu góp phần chứng minh tác dụng chống viêm cũng như giải thích cơ chế chống viêm của 03 loài nêu trên thuộc chi *Hypericum* [135].

Bên cạnh tác dụng làm lành vết thương và chống viêm, cao chiết của loài *H. perforatum* đã được Pabuccuglu A. và cộng sự chứng minh có tác dụng giảm đau. Cao chuẩn *H. perforatum* (0,3% hypericin và 4-5% hyperforin) có tác dụng giảm đau trên một số các mô hình gồm mô hình mâm nóng, mô hình kích thích đuôi chuột bằng dòng điện, mô hình gây đau quặn bằng acid acetic, mô hình gây đau bằng formalin [136]. Tác dụng giảm đau của cao *H. perforatum* cũng đã được thử nghiệm trên người trong một số nghiên cứu. Theo đó, cao chiết *H. perforatum* có tác dụng

giảm đau trên trẻ em bị viêm tai giữa và trên bệnh nhân herpes da [2], [136].

Nghiên cứu của tác giả Ozturk N. và cộng sự công bố năm 2009 đánh giá hoạt tính chống oxy hóa của cao chiết ba loài *H. organifolium*, *H. montbretii* và *H. perforatum*. Theo đó, hoa và lá của các loài *Hypericum* được chiết trong các dung môi methanol, ethyl acetat, nước; sau đó xác định hàm lượng phenolic, flavonoid và flavonol toàn phần của các mẫu cao chiết. Tác dụng chống oxy hóa của các cao chiết được đánh giá bằng thử nghiệm dọn gốc tự do DPPH và phương pháp Racimat với chất đối chứng butylated hydroxytoluene (BHT). Kết quả cho thấy, có mối liên quan giữa hàm lượng polyphenol toàn phần và khả năng chống oxy hóa của các cao chiết. Cao chiết ethyl acetat của ba loài *Hypericum* đều có giá trị  $IC_{50}$  nhỏ hơn so với chất đối chứng butyllated hidroxy toluene trên thử nghiệm DPPH [111].

Tại Việt Nam, hoạt tính chống oxy hóa của hai hoạt chất euxantron và quercetin phân lập từ cao phân đoạn ethyl acetat của loài *H. samponii* và đã được chứng minh trên thử nghiệm dọn gốc tự do DPPH [137] bởi tác giả Vũ Thị Cẩm Tú. Theo đó, quercetin có hoạt tính dọn gốc tự do tự do tốt thể hiện ở giá trị  $IC_{50} = 3.51 \mu\text{g/mL}$ , trong khi đó thử nghiệm với euxantron chưa thể tính được giá trị  $IC_{50}$  do cả năm nồng độ thử đều cho kết quả dọn gốc tự do DPPH dưới 25% [137].

#### **1.1.5. Công dụng của một số loài thuộc chi *Hypericum* L.**

Chi *Hypericum* đã được sử dụng rộng rãi trong y học cổ truyền ở nhiều quốc gia, đặc biệt là Trung Quốc. Các loài thuộc chi này bắt đầu được sử dụng vào những năm 200 - thời nhà Hán ở Trung Quốc và được ghi chép trong cuốn sách kinh điển về y học dân gian “Thần nông bản thảo kinh” [138]. Một số loài *Hypericum* như *H. attenuatum*, *H. erectum*, *H. japonicum*, *H. monogynum*, *H. sampsonii*, *H. wightianum* là các loại thuốc thảo dược truyền thống của Trung Quốc, bộ phận sử dụng thường là toàn cây. Ngoài việc sử dụng làm thuốc của người Hán, các loài *Hypericum* đã được sử dụng phổ biến ở các dân tộc thiểu số ở Tây Nam Trung Quốc [139]. Hầu hết các loài *Hypericum* có vị đắng, tính hàn hoặc trung tính được sử dụng để điều trị ung thư, kinh nguyệt không đều, chứng khó tiêu, viêm gan, viêm vú cấp tính, vàng da, mụn nhọt, ho ra máu, chảy máu cam, đau bụng kinh, rắn cắn, bỏng, xuất huyết, làm lành vết thương, vết bầm tím. [4], [138].

Loài *H. hookerianum* cũng đã được sử dụng trong y học cổ truyền của Trung Quốc, Ấn Độ để làm lành vết thương và điều trị viêm bàng quang [5], [6]. Y học cổ truyền Việt Nam chưa ghi nhận có sử dụng cây Ban hooker làm thuốc hay dược liệu. Tuy nhiên, trong dân gian, đồng bào miền núi phía Bắc nước ta thường dùng lá cây Ban hooker để chữa đau mắt cho gia súc [5].

Trong số các loài thuộc chi *Hypericum*, loài *H. perforatum* được ghi nhận có nhiều công dụng và đã được bào chế ra nhiều sản phẩm lưu hành rộng rãi khắp thế giới, đặc biệt ở Mỹ và châu Âu. *H. perforatum* tại châu Âu và Mỹ được biết đến với tên thông thường là cỏ thánh John (St. John's wort), được sản xuất, đóng gói dưới dạng viên nang, viên nén, siro dùng để chữa trầm cảm. Tra cứu cụm "*Hypericum perforatum*" trên trang [Dailymed.nlm.nih.gov](http://Dailymed.nlm.nih.gov) (trang web công bố thông tin sản phẩm được trình lên Cơ quan quản lý thực phẩm và dược phẩm Hoa Kỳ - U.S. FDA) được 604 kết quả, các sản phẩm đều đã được cấp mã sản phẩm dược quốc gia (National Drug Code - NDC).

Một số sản phẩm có thể tìm thấy trên thị trường Mỹ và Châu Âu được sản xuất từ cao chiết St. John's wort chuẩn hóa theo Hypericin hoặc hyperforin gồm:

- **St. John's Wort NOW:** NOW FOODS. 395 S. Glen Ellyn Rd., Bloomington, IL 60108, USA. Lọ 250 viên 300 mg cao chiết St. John's wort chuẩn hóa 0,3% Hypericin, có tác dụng cải thiện sức khỏe thần kinh.

- **Nova Nutritions St. John's Wort:** Nova Nutritions. Scotch Plains, New Jersey 07076. Lọ 180 viên nang 300mg cao chiết St. John's wort chuẩn hóa 0,3% Hypericin, có tác dụng cải thiện cảm xúc, cải thiện sức khỏe thần kinh, hỗ trợ cải thiện cảm xúc ở phụ nữ tiền mãn kinh.

- **St. John's Wort Gaia Herbs:** Gaia Herbs. Brevard, North Carolina, United States. Lọ 60 hoặc 180 viên nang 1000mg cao chiết St. John's wort chứa 1,35 mg Hypericin, tác dụng hỗ trợ giảm stress, cải thiện cảm xúc.

- **St. John's Wort California Gold Nutrition:** California Gold Nutrition. Irving, California, United States. Lọ 60 hoặc 180 viên nang 300mg cao chiết St. John's wort chuẩn hóa 0,3% Hypericin, có tác dụng cải thiện cảm xúc.

- **Jarsin® 300: Lichtwer Pharma/Wallenroder Strasse 8-14/13435 Berlin/Germany.** Viên nén bao phim 300 mg cao chiết St. John's wort chuẩn hóa 0,3% hypericin toàn phần

- **Neuroplant®: Dr. Wilmar Schwabe GmbH & Co/International Division/Willmar Schwabe Str. 4/D-76227 Karlsruhe/Germany.** Viên nang 300 mg cao chiết St. John's wort chuẩn hóa 5% hyperforin.

## 1.2. TỔNG QUAN VỀ CÂY BAN HOOKER

### 1.2.1. Vị trí phân loại, đặc điểm thực vật, phân bố và sinh thái của cây Ban hooker

Ban hooker được được nhà thực vật học Thụy sĩ Jacque Denys Choisy (viết tắt là Choisy) xác định từ năm 1824 là *Hypericum leschenaultii* Choisy, 1824. Đến năm 1834, hai nhà thực vật học Scotland là Robert Wight (viết tắt là Wight) và George Amott Walker Arnott (viết tắt là Arn.) xác định lại, với tên khoa học là *Hypericum hookerianum* Wight. et Arn. Định ngữ trong tên loài được chọn là “*hookerianum*” nhằm tôn vinh nhà thực vật học người Anh William Jakson Hooker (viết tắt là Hook.) – người đã có công thu thập và mô tả sơ bộ loài này đầu tiên ở Ấn Độ [8]. Tuy nhiên, đến năm 1840, chính Robert Wight lại chuyển đổi loài *Hypericum hookerianum* Wight. et Arn. sang chi *Norysca*, với tên khoa học là *Norysca hookeriana* (Wight et Arn.) Wight, 1840. Mặc dù vậy, *Hypericum hookerianum* Wight et Arn. vẫn được coi là tên khoa học hợp danh pháp của loài Ban hooker. Còn *Hypericum leschenaultii* Choisy, 1824 và *Norysca hookeriana* (Wight et Arn.) Wight, 1840 chỉ là 2 đồng danh (synonym) của loài mà thôi [7], [10].

Như vậy, loài Ban hooker (*Hypericum hookerianum* Wight et Arn.) được khẳng định thuộc chi *Hypericum* L., họ Hypericaceae. Tuy nhiên, việc phân loại chi và họ thực vật này cũng có vài quan điểm khác nhau.

Quan điểm thứ nhất, không tách riêng họ Hypericaceae, chi *Hypericum* vẫn thuộc họ Clusiaceae (hay Guttiferae). Theo quan điểm này, có các nhà Thực vật học Takhtajan, A.L., (1987), *Clusiaceae: Systema Magnoliophorum*, Leningrad (Tiếng Nga); Li Xi-wen & Li Yan-hui (1990), *Guttiferae, in Flora Reipublicae Popularis*

*Sinicae*, 50 (2) (tiếng Trung Quốc); Li Xi-wen & Norman K.B. Robson (2007), *Clusiaceae*, in *Flora of China*, Vol. 13 [11], [140], [10].

Quan điểm thứ hai, tách các đại diện thuộc chi *Hypericum*, *Cratoxylum*, *Triadenum* ...với các đặc điểm trong vỏ không có nhựa mủ màu vàng; ngọn và cành non có tiết diện vuông; hoa lưỡng tính; hạt nhỏ, không có tử y – thành họ Hypericaceae riêng. Các đại diện còn lại thuộc chi *Garcinia*, *Calophyllum*, *Mammea*, *Mesua* ...với các đặc điểm vỏ có nhựa mủ vàng, ngọn và cành non tròn; hoa đơn tính; hạt lớn và có tử y – thì vẫn thuộc họ Clusiaceae/Guttiferae. Theo quan điểm này có F. Gagnepain (1909), *Hypericaceae*, dans: *Flore Generale de L'Indochine*, Tom I: 284 - 285; Takhtajan, A.L., (1996), *Hypericaceae in Diversity of flowering Plants*. Columbia University Press; Nguyễn Tiên Bân (1997), *Hypericaceae trong Cẩm nang tra cứu và nhận biết các họ thực vật hạt kín ở Việt Nam*; nhà xuất bản Nông nghiệp, Hà Nội [7], [12], [11], [8]. Ở Việt Nam, trong các tài liệu về Thực vật học, Dược học hay cây thuốc xuất bản gần đây đều theo quan điểm thứ hai này [7], [12], [15], [6].

Về đặc điểm thực vật, trong cuốn “Cây cỏ Việt Nam”, tác giả Phạm Hoàng Hộ mô tả cây Ban hooker: Cây cỏ, cao 1 m, thân có 4 cạnh tròn. Lá có phiến không cuống, thon, dài 6-7 cm, có đốm trong đen đen, gân phụ 5-6 cặp. Hoa 3 ở ngọn, trên cuống dài đến 2 cm, rộng 4 cm; lá dài 5, cao 1 cm; cánh hoa 5-7, cao 2 cm. Nang cao 12 mm; hạt nhiều, nhỏ [6].

Tài liệu “Từ điển cây thuốc Việt Nam”, tác giả Võ Văn Chi mô tả cây Ban hooker: Cây thảo cao 1 m; thân có 4 cạnh tròn, đỏ đỏ. Lá không cuống; phiến thuôn, dài 6-7 cm, có đốm trong. Hoa ở ngọn, rộng 4 cm, trên cuống dài 2 cm, thường xếp ba cái một; cánh hoa 5, cao 2 cm; nhị 5 bó; bầu 5 cạnh. Quả nang, cao 12 mm [5].

Cuốn sách “Danh lục Thực vật Việt Nam” mô tả cây Ban hooker: Cây cỏ, cao 1 m, nhị chia thành 5 bó [12].

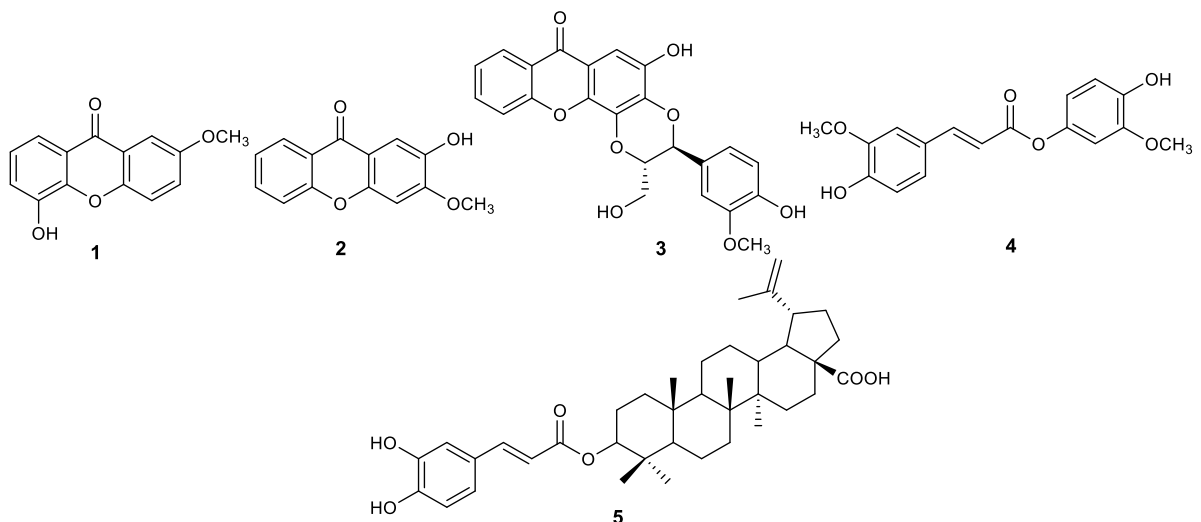
Về phân bố, loài Ban hooker (*Hypericum hookerianum* Wight et Arn.) mọc hoang trong rừng, ở độ cao 1.500 đến 1.900 mét so với mực nước biển. Ở Việt Nam, đến nay mới ghi nhận được 1 điểm phân bố tại huyện Sa Pa cũ gồm thị trấn Sa Pa và Ô Quý Hồ (nay là thị xã Sa Pa), tỉnh Lào Cai [12]. Trên thế giới, loài này

có ở Bangladesh, Bhutan, Ấn Độ, Nepal. Myanmar, bắc Thái Lan và Trung Quốc [12], [6], [10]. Tại Trung quốc, Ban hooker chỉ ghi nhận ở nam và đông - nam tỉnh Xizang [10].

### 1.2.2. Thành phần hóa học của cây Ban hooker

Các nghiên cứu về thành phần hóa học của loài *H. hookerianum* trên thế giới cho đến nay chưa có nhiều. Các nhóm chất đã được tìm thấy trong thành phần hóa học của cây Ban hooker bao gồm phloroglucinol, xanthon, acid phenolic, triterpen (đã được đề cập tại **Mục 1.1.3** của luận án này).

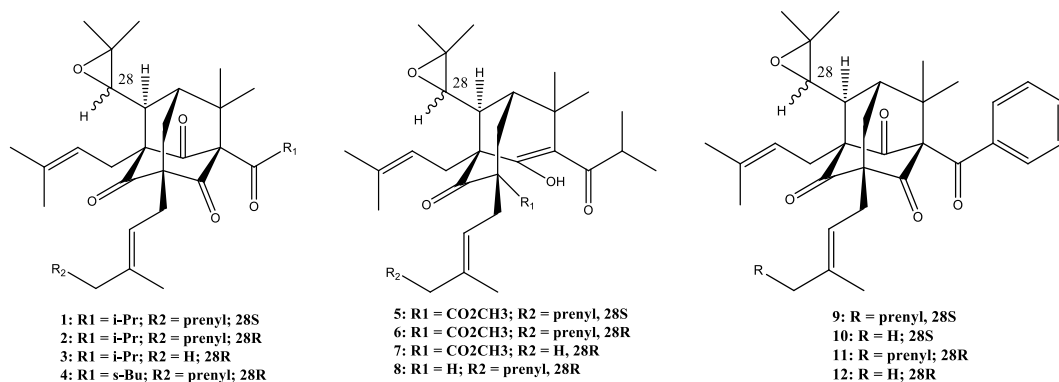
Nghiên cứu đầu tiên về thành phần hóa học của cây Ban hooker được công bố vào năm 2005. Theo đó, từ phần trên mặt đất của loài *H. hookerianum* thu hái tại Chiang Mai, Thái Lan, Wilairat R và cộng sự đã phân lập được năm hợp chất, lần lượt được xác định là 5-Hydroxy-2 methoxyxanthon (**1**), 2-hydroxy-3-methoxyxanthon (**2**), *trans*-kielcorin (**3**), 4-hydroxy-3-methoxyphenyl ferulat (**4**) và acid  $3\beta$ -*O*-caffeoylbetulinic (**5**) (Hình 1.7) [90]. Các hợp chất này được đánh giá tác dụng ức chế sự phát triển của 03 dòng tế bào ung thư người bao gồm MCF-7, NCI-H460, SF-268. Trong số các hợp chất thử nghiệm, 4-hydroxy-3-methoxyphenyl ferulat (**4**) và acid  $3\beta$ -*O*-caffeoylbetulinic (**5**) thể hiện tác dụng tốt nhất với giá trị  $IC_{50} < 20 \mu M$  [90].



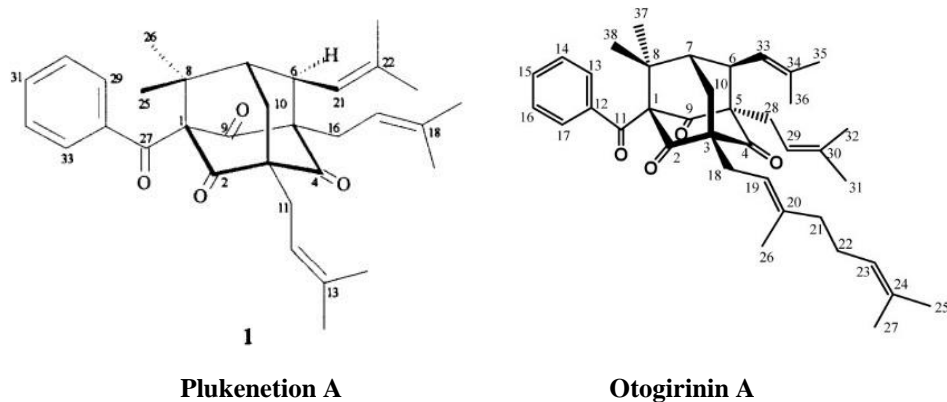
Hình 1.1. Năm hợp chất được phân lập từ *H. hookerianum* thu hái tại Chiang Mai, Thái Lan [90]

Trong năm hợp chất trên, đến năm 2006, hợp chất 2-hydroxy-3-methoxyxanthon (**2**) cũng được công bố bởi Fu P. và cộng sự tìm thấy trong một loài khác của chi *Hypericum* là *H. japonicum* [89].

Năm 2016, Ye Y. và cộng sự đã công bố tám hợp chất adamantan acylphloroglucinol đa vòng mang các nhóm prenyl (PPAPs) mới hookerion A–D (**1–8**) cùng với sáu hợp chất đã biết, bao gồm hai hợp chất otogirinin A và plukenetion A (Hình 1.7 và 1.8) từ phần trên mặt đất của loài *H. hookerianum* thu hái ở Vân Nam, Trung Quốc [47].



Hình 1.2. Cấu trúc của các adamantan PPAPs từ loài *H. hookerianum* [47]



Hình 1.3. Hợp chất plukenetion A [141] và otogirinin A [46]

Đến nay, 04 trong số 14 hợp chất trên cũng đã được công bố bởi các tác giả khác tìm được trong một số loài của chi *Hypericum*, cụ thể:

- Otogirinin A được công bố bởi Ishida Y. và cộng sự năm 2010, được tìm thấy trong loài *H. erectum* [46].

- Sampsonion J (**11**) được Hu Lihong và Sim Keng-Yeow công bố năm 2000, tìm thấy trong loài *H. sampsonii* [58].

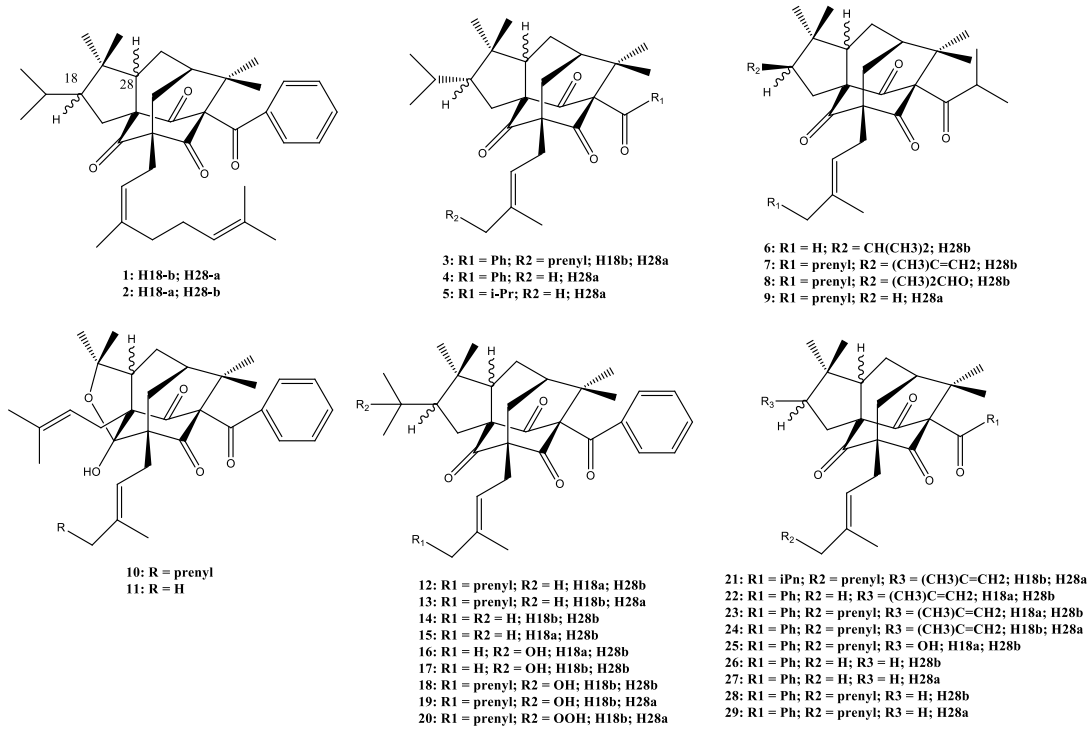
- Sampsonion Q (**10**) được Bridi H. và cộng sự công bố năm 2018, tìm thấy



trong loài *H. sampsonii* [1].

- Hyperisampsin G (**9**) được Bridi H., và cộng sự công bố năm 2018, tìm thấy trong loài *H. sampsonii* [1].

Năm 2019, nhóm nghiên cứu của Ye Y tiếp tục báo cáo thêm 09 hợp chất homo-Adamantan PPAPs mới hookerion I-Q (**1–9**) từ loài *H. hookerianum* cùng với 20 hợp chất đã biết (Hình 1.9).



Hình 1.4. Cấu trúc của 29 hợp chất PPAPs được phân lập từ *H. hookerianum* [50]

Trước đó, 19 trong số 29 hợp chất trên cũng đã được công bố bởi các tác giả khác tìm được trong một số loài của chi *Hypericum*, cụ thể:

- Hyperattenin H (**25**) được Li Dongyan và cộng sự công bố năm 2015, tìm thấy trong loài *H. attenuatum* [49].

- Hypercohon A (**21**), Hypercohon C (**23**) được Zhao j và cộng sự công bố năm 2015, tìm thấy trong loài *H. cohaerens* [2].

- Hyphenron P (**15**), Hyphenron Q (**14**) được Bridi H. và cộng sự công bố năm 2018, tìm thấy trong loài *H. henryi* [1].

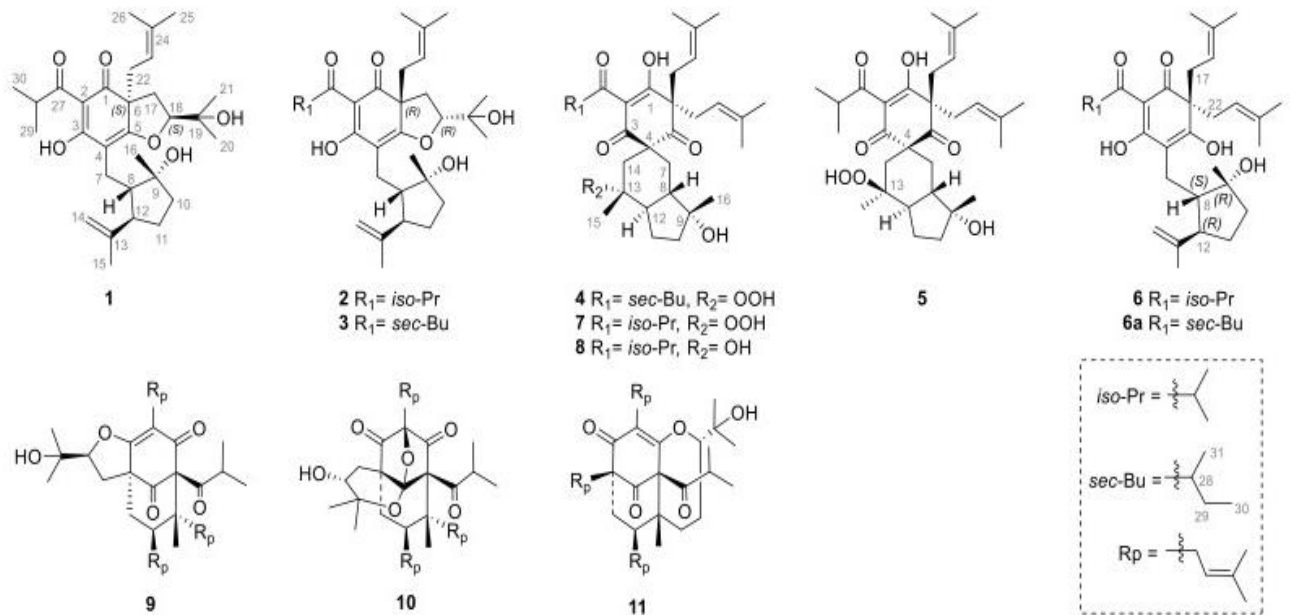
- Sampsonion A (**10**), Sampsonion D (**24**) và Sampsonion G (**16**), Sampsonion H (**28**) được Hu Lihong và cộng sự công bố năm 2000, tìm thấy trong

loài *H. sampsonii* [58].

- Hypersampson A (**10**) và Hypersampson D (**13**), Hypersampson F (**20**) được Lin Yun-Lian và cộng sự công bố năm 2003, tìm thấy trong loài *H. sampsonii* [59].

- Hypersampson I (**29**), Hypersampson M (**27**) và Hypersampson P (**26**) được Bridi H. và cộng sự công bố năm 2018, tìm thấy trong loài *H. sampsonii* [1].

Gần đây nhất, năm 2020, Wang Q. Q. và cộng sự đã phân lập được năm hợp chất PPAPs mới (1 – 5) và sáu hợp chất PPAPs đã biết (Hình 1.10) từ phần trên mặt đất của loài *H. hookerianum*. Các hợp chất mới ở nồng độ 10  $\mu$ M đều không thể hiện tác dụng ức chế enzyme USP7, một enzyme liên quan đến sự phát triển ung thư [35].



Hình 1.5. Cấu trúc của 11 hợp chất PPAPs được phân lập từ *H. hookerianum* [35]

Trước đó, 04 trong số 11 hợp chất trên cũng đã được công bố bởi các tác giả khác tìm được trong một số loài của chi *Hypericum*, cụ thể:

- Tomoeon A (**8**) và Tomoeon C (**7**) được Bridi H. và cộng sự công bố năm 2018, tìm thấy trong loài *H. ascyron* [1].

- Oxepahyperforin (**11**) được Bridi H. và cộng sự công bố năm 2018, tìm thấy trong loài *H. perforatum* [1].

- Hyphenron T (**10**) được Bridi H. và cộng sự công bố năm 2018, tìm thấy

trong loài *H. henryi* [1].

Ở Việt Nam, cho đến nay chưa có nghiên cứu nào về thành phần hóa học của loài *Ban hooker* được công bố.

### **1.2.3. Tác dụng sinh học của cây *Ban hooker***

Đến nay đã có một số nghiên cứu về tác dụng sinh học của loài *H. Hookerianum* được công bố. Các báo cáo cho thấy một số cao chiết từ loài *H. hookerianum* có tác dụng chống oxy hóa, kháng virus, ức chế tế bào ung thư, kháng khuẩn và làm lành vết thương.

#### **1.2.3.1. Tác dụng chống oxy hóa**

Năm 2009, Raghu Chandrashekhar H. và cộng sự đã tiến hành đánh giá tác dụng chống oxy hóa *in vitro* của cao chiết methanol lá, rễ, hoa và phần trên mặt đất loài *H. hookerianum* bằng cách thực hiện đồng thời trên tám thử nghiệm dọn gốc tự do khác nhau; nghiên cứu này cũng làm thực nghiệm ước tính tổng hàm lượng flavonoid và hàm lượng polyphenol của các mẫu cao chiết. Kết quả nghiên cứu cho thấy, trong số các mẫu thử nghiệm, cao chiết methanol lá và hoa có tác dụng chống oxy hóa tốt nhất [142].

Sau đó, cao chiết methanol lá (ở hai mức liều 100 và 200 mg/kg) tiếp tục được đánh giá tác dụng chống oxy hóa *in vivo* theo hướng bảo vệ gan trên mô hình gây độc tế bào gan chuột bởi  $\text{CCl}_4$  với chất đối chứng là silymarin. Kết quả nghiên cứu cho thấy, khi cho chuột uống mẫu thử ở hai nồng độ thử nghiệm làm tăng đáng kể hàm lượng superoxide dismutase (SOD), enzym catalase (CAT) và giảm lipid peroxidation (LPO) khi so với nhóm chứng bệnh lý chỉ tiêm  $\text{CCl}_4$ . Tác dụng chống oxy hóa của cao chiết được nhóm nghiên cứu cho rằng có thể do nhóm flavonoid và polyphenol đóng góp chính [142], [143].

#### **1.2.3.2. Tác dụng gây độc tế bào**

Năm 2003, Vijayan P. và cộng sự đã tiến hành đánh giá tác dụng ức chế sự phát triển đối với một số dòng tế bào ung thư của cao chiết methanol lá, thân và phần trên mặt đất từ loài *H. hookerianum*. Kết quả cho thấy cao chiết tổng methanol thân của loài *H. hookerianum* có tác dụng gây độc trên hai dòng tế bào ung thư thanh quản biểu mô người (HEP-2) và RD với giá trị  $\text{CTC}_{50}$  lần lượt là 2,02 và

10,25  $\mu\text{g/mL}$  [144]. Trong số các cao phân đoạn từ thân của loài *H. hookerianum*, cao phân đoạn ete dầu hòa và cloroform có tác dụng tốt hơn so với cao phân đoạn ethyl acetat [144].

### **1.2.3.3. Tác dụng kháng khuẩn – kháng virus**

Các cao chiết methanol, aceton, cloroform của lá và thân loài *H. hookerianum* đã được Mukherjee PK. và cộng sự nghiên cứu đánh giá tác dụng kháng khuẩn trên 06 dòng vi khuẩn cả gram âm và gram dương bao gồm *Pseudomonas cepacia* NCIM 2106, *Bacillus subtilis* NCIM 2039, *Bacillus megaterium* NCIM 2087, *Bacillus coagulans* NCIM 2323, *Staphylococcus aureus* NCIM 2492, *Escherichia coli* NCIM 2345; chất đối chứng là tetracyclin 100  $\mu\text{g/mL}$ . Tất cả các mẫu thử đều thể hiện tác dụng kháng khuẩn, trong đó các cao chiết methanol ở nồng độ 400  $\mu\text{g/mL}$  thể hiện tác dụng tốt nhất [145].

Nghiên cứu của P. Vijayan và cộng sự tại Đại học Dược JSS, Tamil Nadu, Ấn Độ cho thấy cao chiết methanol phần trên mặt đất của loài *H. hookerianum* có tác dụng kháng virus đối với virus *Herpes simplex* typ I (HSV-1) ở nồng độ không gây độc với tế bào chủ. Theo đó, nồng độ ức chế 50% ( $\text{IC}_{50}$ ) của mẫu thử là 50  $\mu\text{g/mL}$  [146].

Tại Việt Nam, cho đến nay chưa có nghiên cứu nào về tác dụng sinh học của cây *Ban hooker* được công bố.

## **1.3. MỘT SỐ PHƯƠNG PHÁP THỬ TÁC DỤNG SINH HỌC PHỔ BIẾN TRONG NGHIÊN CỨU DƯỢC LIỆU**

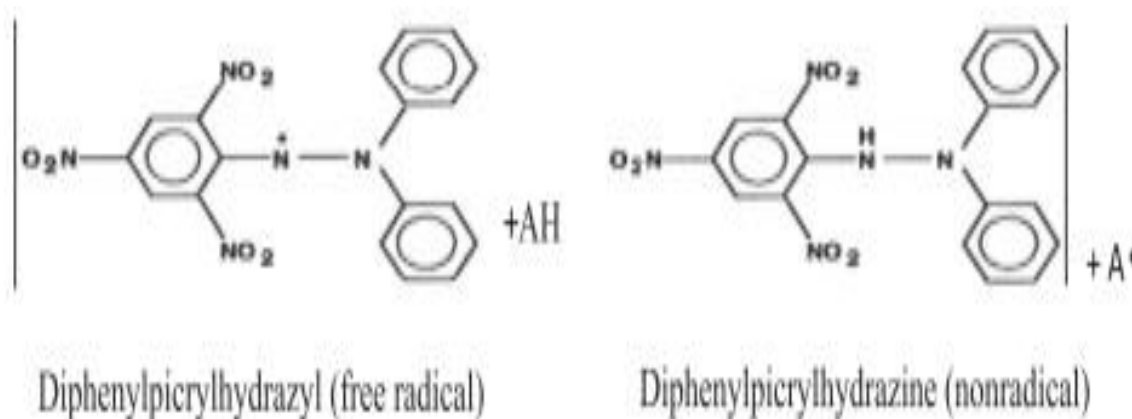
### **1.3.1. Các thử nghiệm đánh giá tác dụng chống oxy hóa in vitro [147-149]**

Có nhiều phương pháp thử khả năng chống oxy hóa, mỗi mô hình thử khả năng chống oxy hóa của một mẫu thử khác nhau ở rất nhiều khía cạnh, do vậy cần kết hợp nhiều phương pháp thử *in vitro* để đánh giá hoạt tính chống oxy hóa của mỗi mẫu thử. Mặt khác, cũng không thể so sánh mô hình này với mô hình khác một cách hoàn chỉnh. Thông thường, các biện pháp thử tác dụng chống oxy hóa thông qua việc dọn gốc tự do là những mô hình khá đơn giản để thực hiện.

#### **Phương pháp dọn gốc tự do 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)**

DPPH là một gốc tự do bền màu tím, không bị dimer hóa như phần lớn các

gốc tự do khác, hấp thụ cực đại ở bước sóng 517nm trong dung môi methanol. Khi DPPH phản ứng với chất thử (AH trong Hình 1.6) sẽ nhường nguyên tử hydro chưa ghép đôi (trên nguyên tử nitơ) làm giảm màu, dẫn đến giảm độ hấp thụ ở bước sóng này. Khả năng khử DPPH của một chất chống oxy hóa thể hiện ở tỷ lệ giảm màu (giảm độ hấp thụ quang) của dung dịch DPPH trong hỗn hợp phản ứng so với mẫu trắng, được xác định bằng cách đo độ hấp thụ quang ở bước sóng  $\lambda_{max} = 517 \text{ nm}$  sau phản ứng.



Hình 1.6. Phản ứng dọn gốc tự do DPPH [147]

#### **Phương pháp dọn gốc tự do superoxid ( $O_2^{\bullet}$ )**

Mặc dù anion  $O_2^{\bullet}$  là chất oxy hóa tương đối yếu, tuy nhiên nó có thể tạo ra gốc tự do hydroxyl cũng như oxy nguyên tử, đều có vai trò quan trọng trong stress oxy hóa. Khả năng dọn gốc tự do superoxid của các mẫu nghiên cứu thường được đánh giá bằng phương pháp đo độ hấp thụ quang, nguyên lý của phương pháp như sau: Superoxid ( $O_2^{\bullet}$ ) được tạo ra do oxy hóa xanthin có mặt xúc tác xanthin oxidase, gốc  $O_2^{\bullet}$  phản ứng với nitro blue tetrazolium (NBT) tạo sản phẩm màu tím nhạt trong môi trường DMSO, hấp thụ cực đại ở bước sóng 560 nm. Mẫu thử dọn gốc tự do superoxid sẽ làm giảm màu của hỗn hợp phản ứng. Khả năng dọn gốc tự do của mẫu thử được xác định bằng tỷ lệ giảm mật độ quang (giảm màu so với mẫu trắng trong quá trình phản ứng) ở bước sóng 560 nm.

#### **Phương pháp dọn gốc tự do hydro peroxyd ( $H_2O_2$ )**

Cơ thể người tiếp xúc với  $H_2O_2$  một cách gián tiếp thông qua môi trường khoảng 0.28 mg/kg/ngày, chủ yếu là sinh ra từ việc tiêu hóa lá của các loài thực vật.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> có thể xâm nhập vào cơ thể thông qua đường hô hấp, qua mắt hoặc tiếp xúc da. Khi vào cơ thể, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sẽ nhanh chóng phân hủy thành oxy và nước, trong quá trình này có thể sinh ra gốc tự do hydroxyl (OH<sup>•</sup>) dẫn đến sự peroxid hóa lipid và gây tổn thương ADN.

Khả năng dọn gốc tự do hydro peroxyd của cao chiết từ thực vật có thể được tính thông qua phương pháp của Ruch (1989): Dung dịch hydro peroxyd (40 mM) trong đệm phosphat (50 nM, pH 7,4) hấp thụ cực đại tại bước sóng 230 nm. Dung dịch chất thử được hòa tan ở nồng độ 20 – 60 µg/mL sau phản ứng với hydro peroxyd được đo độ hấp thụ quang ở bước sóng 230 nm sau 10 phút để tính tỷ lệ giảm mật độ quang.

#### ***Phương pháp dọn gốc tự do nitric oxid (NO)***

Nitric oxid được sinh ra từ các mô trong cơ thể với sự có mặt của nitric oxid synthetase, NO có chức năng chuyển hóa arginin thành citrulin, đồng thời sinh ra gốc nitroxyl (NO<sup>•</sup>) thông qua phản ứng chuyển dịch electron. Trong môi trường *in vitro*, natri nitroprussid có khả năng thủy phân trong dung dịch nước ở pH 7,2 sinh ra NO<sup>•</sup>. Trong môi trường hiếu khí, NO<sup>•</sup> phản ứng với oxy tạo thành các sản phẩm bền (nitrate hoặc nitrit), có thể được định lượng bằng thuốc thử Griess. Để thử tính chống oxi hóa bằng phương pháp dọn gốc nitric oxid, lấy 2 mL Natri nitroprussid 10 nM pha loãng trong 0.5 mL đệm photphat pH 7,4 và 0,5 mL mẫu thử ở nồng độ 0,2 – 0,8 mg/mL, ủ hỗn hợp phản ứng trong 150 phút ở 25°C. Sau đó lấy 0,5 mL dung dịch thử với 0,5 dung dịch thuốc thử Griess, ủ trong 30 phút và đo độ hấp thụ ở 546 nm để tính tỷ lệ ức chế gốc tự do nitric oxid.

#### ***Phương pháp dọn gốc tự do peroxy nitrit***

Gốc tự do peroxy nitrit (ONOO<sup>•</sup>) có khả năng gây ung thư với đặc tính oxy hóa mạnh đối với nhiều thành phần trong tế bào, bao gồm cả sulfhydryl, lipid, aminoacid, nucleotid và có thể gây chết tế bào; peroxy hóa lipid, sinh ung thư và lão hóa tế bào. Nó được hình thành trong môi trường *in vivo* bởi tế bào nội mô, tế bào Kupffer, bạch cầu trung tính và đại thực bào. Gốc peroxy nitrit tương đối ổn định so với các gốc tự do khác, tuy nhiên một khi đã được proton hóa thành acid peroxy nitrous (ONOOH) sẽ trở nên rất hoạt động, phân hủy với thời gian bán thải

rất ngắn (1,9 giây) ở 37°C để hình thành nhiều chất độc tế bào và có thể gây oxy hóa gốc thiol (-SH) của protein, nitrat hóa tyrosin, peroxy hóa lipid và gây các phản ứng nitro hóa khác, làm ảnh hưởng đến chuyển hóa tế bào và hệ thống dẫn truyền tín hiệu. Thậm chí, nó có thể gây tổn thương tế bào và mô do đứt gãy chuỗi ADN, gây chết tế bào theo chương trình. Sự hình thành quá mức hợp chất này có liên quan đến một số bệnh lý ở người như Alzheimer, viêm khớp dạng thấp, ung thư và xơ hóa. Do không có enzym bất hoạt, sự hình thành các gốc ONOO<sup>•</sup> trong cơ thể được coi là vấn đề nghiêm trọng. Có thể sử dụng dung dịch dihydrorhodamin 123 (DHR 123 5 mM) trong dimethylformamid, bảo quản ở -80°C (chỉ được lấy ra ngay trước phản ứng), phản ứng với dung dịch đệm phosphat pH 7,4/90 mM NaCl, 5 mM KCl và 100 µg DTPA (acid diethylenetriaminepentaacetic). Khả năng thu dọn gốc tự do ONOO<sup>•</sup> được đánh giá thông qua sự oxy hóa DHR 123, được đo bằng sự phát huỳnh quang ở bước sóng 530 nm sau khi kích thích bởi bước sóng 485nm ở nhiệt độ phòng.

#### ***Phương pháp Oxygen radical absorbance capacity (ORAC)***

Phương pháp ORAC là một phương pháp mới rất tiên bộ, có thể được sử dụng để thử khả năng chống oxy hóa của thực phẩm và các hợp chất hóa học khác. Có thể sử dụng beta-phycoerythrin (beta-PE) hoặc fluorescein là phân tử đích, tuy nhiên, các nghiên cứu công bố từ 2005 về sau thường sử dụng fluorescein thay cho beta-PE. Phương pháp này được tiến hành sử dụng Trolox làm chất chuẩn và tính ra hoạt tính chống oxy hóa tương đương với Trolox.

Phương pháp được tiến hành bằng cách sử dụng 2,2-azobis 2-amidopropane dihydrochloride (AAPH) để tạo gốc tự do peroxyd và đo sự giảm phát huỳnh quang khi có mặt gốc tự do. Sau khi bổ sung AAPH vào dung dịch thử (chứa chất thử và phân tử đích), sau đó ghi lại khả năng phát huỳnh quang. Có thể tiến hành như sau: trên đĩa 96 giếng, ở pH 7,0 với Trolox (nồng độ lần lượt là 6,25; 12,5; 25; 50 µM với chất thân dầu và 12,5; 25; 50; 100 µM đối với chất thân nước) là chất chuẩn và đệm phosphat 75 mM là chất trắng. Sau khi bổ sung AAPH, các đĩa được đưa lên đến 37°C và lắc tròn trong 10 giây, đọc kết quả phát huỳnh quang mỗi 1 phút, trong 35 phút với bước sóng kích thích 485 nm và phát xạ tương ứng 520 nm. Tính diện

tích dưới đường cong (Area under the curve – AUC) cho mỗi mẫu, từ đó tính hoạt tính chống oxy hóa tương đương với Trolox.

### **1.3.2. Các phương pháp thử khả năng bảo vệ gan [150]**

#### ***Mô hình in vitro***

Trong các mô hình *in vitro*, tế bào gan tươi, mẫu cấy tế bào gan và các dòng tế bào bất tử thường được sử dụng để đánh giá tác dụng bảo vệ tế bào gan. Các mô hình này có thể giúp xác định cơ chế tác dụng, được sử dụng để tầm soát và xác định các hợp chất có tác dụng bảo vệ gan tiềm năng, có thể thể hiện tác dụng ở mức độ phân tử và tế bào. Mẫu cấy tế bào gan có khả năng thể hiện các đặc tính chuyển hoá của tế bào gan bình thường, nhưng không giữ được trong thời gian dài. Ngược lại, các dòng tế bào bất tử ổn định trong thời gian dài và có thể trữ đông, tuy nhiên có thể có một số đặc tính sinh học và chuyển hoá khác biệt so với tế bào bình thường.

Để xác định khả năng bảo vệ gan, cần đo lường các thông số như: sự giải phóng các transaminase, sự nhân lên của tế bào, hình thái học tế bào, sự hình thành tế bào khổng lồ, mức độ tiêu thụ oxy của tế bào.

Ưu điểm của mô hình *in vitro* là tiến hành nhanh chóng (có thể thực hiện 2 – 3 lần/ngày), cần một lượng chất thử nhỏ (khoảng mg) và các điều kiện thí nghiệm được kiểm soát chặt chẽ; có thể tiến hành một thí nghiệm lên nhiều mẫu thử khác nhau, chi phí thấp và biến thiên nhỏ. Trong trường hợp sử dụng mẫu cấy hoặc tế bào gan tươi, số lượng động vật thí nghiệm được sử dụng thấp hơn so với các mô hình *in vivo*.

Nhược điểm: trong cơ thể, các tế bào không hoạt động độc lập trong một cơ quan mà tạo thành một hệ thống phức tạp có ảnh hưởng lẫn nhau, điều này không xảy ra trong các thử nghiệm *in vitro*. Các tế bào độc lập cũng như các dòng tế bào có tốc độ biệt hoá nhanh hơn do không còn nằm trong môi trường tự nhiên của cơ thể. Đồng thời, các chất được thử không trải qua quá trình hấp thu và phân bố xảy ra trong cơ thể. Tất cả những điều này cần được tính đến khi phân giải kết quả thí nghiệm *in vitro* và cần được xác nhận lại ở thí nghiệm *in vivo*.

#### ***Mô hình ex vivo***



Lát cắt gan chính xác (Precision cut liver slices - PCLS) là một mô *ex vivo* có thể mô phỏng tính chất đa bào của cơ quan trong *in vivo*. Các tương tác giữa tế bào và không gian phẳng vẫn được giữ nguyên trong mô hình này, do vậy có thể làm nghiên cứu về hình thái học. Lát cắt gan vẫn còn chức năng chuyển hoá enzym và các vi ống mật. Mô hình *ex vivo* đã được chứng minh có thể sử dụng để nghiên cứu về chuyển hoá và các tổn thương gan, là cầu nối giữa *in vitro* và *in vivo*.

Một mô hình *ex vivo* khác là gan phân lập được tưới máu, là mô hình kết hợp tính chất của *in vitro* với điều kiện *in vivo*. Các mô hình đầu tiên sử dụng gan lợn và sau đó là các động vật nhỏ hơn (chuột, thỏ,..). Mô hình này lưu giữ cấu trúc ba chiều của gan cũng như tương tác tế bào và có thể thu lấy mật trong thời gian thực. Nếu sử dụng máu thể làm dung dịch tưới, các thông số huyết động có thể được nghiên cứu.

Ưu điểm: mô phỏng được môi trường *in vivo* với chi phí thấp và khả năng lặp lại tốt. Trong mô hình PCLS số lượng động vật thí nghiệm được giảm thiểu, hoặc có thể sử dụng gan người.

Nhược điểm: với PCLS, dòng mật và các thông số chức năng như tốc độ dòng tại hệ tĩnh mạch cửa không thể được xác định, oxy nuôi dưỡng không thể được tưới đầy đủ ở các tế bào sâu bên trong, kể cả với các phương pháp lấy mẫu mới, các lát cắt chỉ sống được trong thời gian ngắn (8 – 10 ngày). Ở các phòng thí nghiệm nhỏ, do không có diện tích và kinh phí, chỉ có thể thực hiện trên gan chuột, có sự khác biệt đáng kể về chức năng, kích thước và cấu trúc so với gan người.

### ***Mô hình in vivo***

Mô hình *in vivo* đã được sử dụng rộng rãi trong nghiên cứu, có thể xác định được cơ chế bảo vệ gan của mẫu thử. Các tổn thương trên mô hình động vật dựa trên một liều gây độc đã được biết với nhiều loại độc tố khác nhau. Cách xác định mức độ tổn thương và/hoặc bảo vệ thông qua các thông số sinh hoá và chuyển hoá, cũng như các biểu hiện bệnh học cũng đã được biết rõ.

Ưu điểm: Các mô hình *in vivo* có mức độ tương quan cao nhất với những gì xảy ra trong cơ thể người và các thông số sinh hoá cũng như bệnh học có thể đo

lượng được. Đồng thời cho phép tính đến ảnh hưởng của hệ miễn dịch và hệ thần kinh trung ương đến sự hình thành tổn thương gan.

Nhược điểm: cần số lượng động vật thí nghiệm lớn, kéo dài làm ảnh hưởng đến các khía cạnh đạo đức và chi phí nghiên cứu. Có sự khác biệt giữa các cá thể và vẫn có khác biệt về cơ chế bệnh sinh ở mức độ phân tử so với cơ thể người. Sử dụng cỡ mẫu lớn để thực hiện thí nghiệm có thể là yếu tố hạn chế, đặc biệt đối với một số sản phẩm tự nhiên.

### ***Các chất gây độc gan thường dùng trong các mô hình thử nghiệm và cơ chế tác dụng của chúng***

#### ***Carbon tetrachlorid (CCl<sub>4</sub>)***

CCl<sub>4</sub> là một chất độc phụ thuộc liều và thời gian tiếp xúc. Ở liều thấp, CCl<sub>4</sub> gây ra sự mất cân bằng Ca<sup>2+</sup> nội môi, peroxid hoá lipid, giải phóng các cytokin và có thể gây chết tế bào theo chương trình, sau đó có thể kèm theo sự tái tạo tế bào gan. Ở liều cao hoặc tiếp xúc kéo dài, các tác hại nghiêm trọng hơn, có thể gây tổn thương trong thời gian dài hơn, có thể phát sinh xơ gan hoặc thậm chí ung thư gan.

CCl<sub>4</sub> được chuyển hoá bởi cytochrome P<sub>450</sub> phụ thuộc monooxygenase, chủ yếu thông qua CYP<sub>2E1</sub> trong lưới nội mô và ty thể. Độc tính với gan được hình thành bởi sự tạo thành gốc tự do CCl<sub>3</sub> có tác dụng mạnh. Những gốc tự do này tấn công hệ thống chống oxy hoá, phản ứng với protein, tấn công các acid béo không bão hoà sinh ra sự peroxid hoá lipid, làm hao hụt lượng P<sub>450</sub>, dẫn đến suy chức năng gan với hậu quả là giảm protein, tích lũy triglycerid, thay đổi cân bằng nước – điện giải cùng với sự tăng hoạt độ enzym gan trong huyết thanh.

Sự peroxid hoá lipid có thể gây phản ứng dây chuyền như phá huỷ màng lipid, phát sinh độc tố nội sinh, làm trầm trọng hơn tổn thương gan và các bất thường chức năng chuyển hoá. Sự ức chế gốc CCl<sub>3</sub> là mấu chốt để giảm thiểu tổn thương, do vậy, CCl<sub>4</sub> được sử dụng rộng rãi trong các mô hình để đánh giá mức độ bảo vệ gan và tính chống oxy hoá của các dược chất và sản phẩm tự nhiên.

#### ***Acetaminophen (Paracetamol – PAR)***

Acetaminophen là một chất có tác dụng giảm đau – hạ sốt – chống viêm, liều cao acetaminophen gây tổn thương gan cấp dẫn đến hoại tử tế bào gan. Chất này được sử dụng rộng rãi trong các mô hình thí nghiệm và có vai trò quan trọng trong các mô hình gây độc gan bởi thuốc.

Ở liều điều trị, PAR được chuyển hoá chủ yếu thành glucuronic hoặc sulfate hoá, phần còn lại thành các chất chuyển hoá thứ cấp và được thải trừ bằng cách liên hợp với glutathion. Khi quá liều, phần dư bị oxy hoá bởi cytochrom P<sub>450</sub> (chủ yếu là CYP<sub>2E1</sub>) thành N-acetyl-p-benzoquinone (NAPQI) và ngay lập tức gắn với glutathion. Trong điều kiện quá dư NAPQI và thiếu hụt glutathion, nó gắn cộng hoá trị với protein, hình thành chất không tan, gây suy ty thể và stress oxy hoá. Kết quả là sự hoại tử, chết tế bào gan và giải phóng các men gan AST và ALT vào máu, đồng thời tạo ra các sản phẩm là MDA cùng các gốc tự do superoxid. Do vậy, xác định hoạt độ AST, ALT trong huyết thanh; hàm lượng MDA, GSH và hoạt độ SOD trong mô gan sẽ đánh giá được quá trình gây tổn thương tế bào gan của PAR liều cao [151], [152].

### *Ethanol*

Gan là cơ quan dễ bị nhiễm độc nhất bởi ethanol. Cơ chế gây hại do quá trình chuyển hóa ethanol bởi đồng dạng CYP<sub>2E1</sub> của cytochrom P<sub>450</sub> gây stress oxy hóa với việc tạo ra các loại oxy phản ứng và tăng peroxid hóa lipid, dẫn đến sự thay đổi thành phần phospholipid của màng tế bào. Quá trình peroxid hóa lipid màng dẫn đến mất cấu trúc và tính toàn vẹn của nó, làm tăng nồng độ glutamyl-transpeptidase trong huyết thanh (một loại enzyme liên kết màng). Các gốc tự do được tạo ra bởi ethanol ức chế hoạt động của các enzym chống oxy hóa như glutathion peroxidase, làm giảm hoạt động của catalase và superoxid dismutase. Ngoài ra, tác động trực tiếp của acetaldehyde (một sản phẩm chuyển hóa của ethanol) cũng gây ức chế hoạt động của các enzym nói trên.

### *D-Galactosamine*

Chất độc này tạo ra tổn thương tương tự virus viêm gan ở cả hình thái học và chức năng gan. Một liều duy nhất cũng có thể gây hoại tử tế bào gan và làm gan

nhễm mỡ. Nó gây ra sự thiếu hụt uracil nucleotid, dẫn đến ức chế sinh tổng hợp ARN và dẫn đến ức chế tổng hợp protein. Cơ chế gây độc do sự mất hoạt động của các bơm ion và tăng tính thấm màng tế bào, dẫn đến giải phóng enzym và tăng  $\text{Ca}^{2+}$  nội bào, được coi là nguyên nhân dẫn đến tình trạng chết tế bào.

#### *Tert-Butyl hydroperoxid (t-BuOOH)*

Tert-Butyl hydroperoxid chuyển hoá thành gốc tự do bởi  $\text{P}_{450}$  trong tế bào gan gây ra sự peroxid hoá lipid, giảm nồng độ glutathion, làm giảm chức năng màng ty thể và gây tổn thương tế bào và mô. Ngoài ra, t-BuOOH có thể được chuyển hóa bởi glutathion peroxidase thành rượu tetr-butyl và glutathione disulfide (GSSG). GSSG được chuyển thành glutathion khử (GSH) bởi GSSG reductase, tạo ra quá trình oxy hóa các nucleotid pyridin (NAPD). Tất cả quá trình trên làm thay đổi cân bằng nội môi của  $\text{Ca}^{2+}$ , được coi là một nguyên nhân quan trọng tạo ra các tổn thương trên màng sinh chất và do đó gây tổn thương tế bào.

#### *Thioacetamid*

Là một chất hữu cơ chứa sulfur, có thể gây tổn thương gan cấp hoặc mạn tính thông qua tác động lên sự tổng hợp protein, ADN, ARN, gây tác dụng quá mức của gamma-glutamyl transpeptidase (GGT).

Thioacetamid được hoạt hoá sinh học bởi  $\text{CYP}_{450}$  và/hoặc hệ monooxygenase có chứa flavin, chuyển hợp chất này thành sulfine (một hợp chất dạng sulfoxid) và sau đó thành hợp chất dạng sulfon. Sulfine gây tăng thể tích nhân tế bào, kích thích hạt nhân, tăng nồng độ  $\text{Ca}^{2+}$  nội bào, thay đổi tính thấm màng tế bào và suy chức năng ty thể. Các hợp chất dạng sulfon gây giải phóng nitric oxid synthetase và yếu tố nhân kappa B, phi tự nhiên hoá protein và peroxid hoá lipid

#### ***Các chỉ dấu đánh giá chức năng gan***

##### *Transaminase và Aminotranferase*

Transaminase và Aminotranferase là các enzym chuyển vận nhóm amino từ amino acid sang acid alpha-acetat. Đây là một quá trình quan trọng trong chuyển hoá của amino acid. Aspartat aminotranferase (AST) và alanin aminotranferase (ALT) đã được sử dụng rộng rãi trong nghiên cứu và thực tế, sự gia tăng hoạt độ

các enzym này trong máu có liên quan đến bất thường ở gan. ALT tăng trong các bệnh lý về thận hoặc gan, trong khi AST có ở tim, gan, cơ xương. Trong nhồi máu cơ tim, AST bắt đầu tăng sau 3 – 9 giờ và đạt đỉnh ở ngày thứ 2, quay về mức bình thường sau 4 – 6 ngày. Trong trường hợp viêm gan, các em zym có thể tăng 7 – 12 lần so với bình thường, thậm chí có thể lên đến 100 lần.

### *Phosphatase*

Các enzym này thuộc nhóm hydrolase và được biết có khả năng thủy phân các hợp chất phosphat hữu cơ, hình thành ion phosphat và rượu. Các phosphatase có ý nghĩa lâm sàng là phosphatase acid và phosphatase kiềm (ALP). ALP được sản xuất chủ yếu ở gan và xương. Khi không có bệnh lý về xương, ALP tăng có liên quan đến các bệnh lý gan mật và đặc hiệu trong bệnh tắc nghẽn ống mật.

### *Gamma-glutamin transpeptidase (GGT)*

Enzym này gắn với màng tế bào chất, thủy phân nhóm gamma-glutamin của peptid. GGT chủ yếu nằm trong tế bào gan, tuy nhiên nó còn có ở ống lượn gần của nephron, tế bào biểu mô ruột non và tuyến tiền liệt. Nồng độ GGT tăng trong các trường hợp nhiễm trùng gan, tụy. Tính đặc hiệu của GGT tương đối thấp, tuy nhiên do không có liên quan đến xương, nó có tác dụng hỗ trợ cho xét nghiệm ALP để đánh giá tổn thương gan.

### *Bilirubin*

Bilirubin là chất chuyển hoá quan trọng từ nhóm heme trong hemoglobin, myoglobin và cytochrom. Nó không tan trong nước và được vận chuyển bởi albumin. Gan có tác dụng loại bỏ bilirubin bằng cách chuyển hoá thành các hợp chất dễ tan hơn. Đây là một trong những xét nghiệm quan trọng nhất về khả năng chuyển hoá của gan. Tuy nhiên, nó chỉ thực hiện được ở mô hình *in vivo*

### *Protein toàn phần*

Gan tổng hợp đa số các protein trong máu, trong hầu hết các bệnh lý gan thì nồng độ protein trong máu giảm. Albumin, alpha-1 anti trypsin, ceruloplasmin và alpha-fetoprotein là các protein có liên hệ đến tổn thương gan cấp.

### *Lactato dehydrogenase (LDH)*

LDH là enzym có trong tế bào chất, nó xúc tác cho phản ứng chuyển lactat thành pyruvat. Việc tăng LDH có thể do sự chết hoặc phá hủy màng tế bào. Enzym này không đặc hiệu với gan và được sử dụng rộng rãi trong mô hình *in vitro* do có mặt trong hầu hết các dòng tế bào. AST, ALT, ALP được sử dụng phổ biến trong phân tích tất cả các mô hình bảo vệ gan, trong khi định lượng protein và LDH sử dụng chủ yếu trong mô hình gây độc *in vitro*.

### **1.3.3. Đánh giá tác dụng bảo vệ tế bào thần kinh**

Các nghiên cứu đánh giá tác dụng bảo vệ thần kinh dựa vào cơ sở tế bào và phân tử của bệnh thoái hóa thần kinh đã được nghiên cứu trong nhiều thập kỷ. Tuy nhiên, so với các cơ quan khác, hệ thần kinh trung ương (Central Nervous System - CNS) rất khó nghiên cứu, chủ yếu là do não người và tế bào thần kinh sống không thể tiếp cận được trong cơ thể hoặc trong ống nghiệm. Để khắc phục những thách thức này, có thể thực hiện các nghiên cứu bảo vệ tế bào thần kinh bằng các mô hình tế bào khác nhau:

#### ***Mô hình sử dụng dòng tế bào bất tử (Immortalized cell models)***

Tầm soát với các dòng tế bào bất tử, không biệt hóa là bước đầu tiên để thử tác dụng của các mẫu thử, khi nó tiếp xúc trực tiếp với các tế bào. Đây là bước rất quan trọng dù nó đã được thử độc tính trước đó. Một hợp chất cần phải có độc tính tế bào tối thiểu và tỷ lệ sống của tế bào thử càng cao càng tốt để có thể tiếp tục được nghiên cứu sâu thêm sau đó.

Thử *in vitro* trên các dòng tế bào bất tử có nhiều ưu điểm như: tính sẵn có, dễ dàng xử lý và thí nghiệm, liên tục phân chia nên có thể tiến hành thí nghiệm rất nhiều lần và có chi phí tương đối thấp. Hơn nữa, nhiều dòng tế bào có nguồn gốc từ người giúp làm tăng khả năng tương quan với hiệu quả thực tế đối với những kết quả thu được.

Các dòng tế bào hay được sử dụng nhất trong nghiên cứu về thần kinh trung ương là SH-SY5Y. Dòng tế bào này dưới dạng không biệt hóa rất giống với các neuron thần kinh giao cảm do nó thể hiện cấu trúc của sợi trục và có các marker neuron chưa trưởng thành. Do vậy, SH-SY5Y ưu việt hơn so với các dòng tế bào

không phải tế bào thần kinh khác trong nghiên cứu các bệnh thoái hóa thần kinh như HeLa, HEK293 hay tế bào PC-12 từ chuột.

Việc tiếp xúc với các chất độc thần kinh gây chết tế bào, tương tự như trên sự thoái hóa thần kinh *in vivo*, ví dụ như thêm A-beta-oligomer để mô phỏng Alzheimer hoặc 6-OHDA, MPTP hoặc rotenon để mô phỏng bệnh Parkinson. Chất độc thần kinh 6-OHDA có cấu trúc tương tự như dopamin có thể gây tổn thương một cách chọn lọc các neuron dopaminergic [153]. Khi ở bên trong tế bào thần kinh, 6-OHDA tích tụ, trải qua quá trình tự động oxy hóa, từ đó thúc đẩy sự hình thành các dạng oxy hóa hoạt động (ROS) và ức chế các phức hợp ty thể I và IV gây thiếu hụt adenosine triphosphate [154-157]. Các rối loạn chức năng đó của ty thể có thể dẫn đến vỡ màng ngoài ty thể và giải phóng các protein pro-apoptotic từ nhân tế bào dẫn đến chết tế bào thông qua sự kích hoạt con đường apoptosis nội sinh [154], [158].

### ***Sử dụng các tế bào biệt hóa kiểu hình***

Sự biệt hóa tế bào là một quá trình phức tạp, trong đó các tế bào đang phân chia thay đổi chức năng cũng như kiểu hình. Tế bào thần kinh của người có thể biệt hóa thành nhiều loại khác nhau như cholinergic, adrenergic, dopaminergic, serotonergic hoặc GABAergic. Các dòng tế bào có thể biệt hóa thành các kiểu hình đặc trưng cho bệnh có thể kể đến PC-12, LUHMES và SH-SY5Y. LUHMES biệt hóa thành dòng dopaminergic, tế bào PC-12 mô phỏng lại các hạch giao cảm còn tế bào SH-SY5Y có thể biệt hóa thành nhiều kiểu hình khác nhau. Sự biệt hóa được tiến hành bằng cách thêm một số hóa chất vào dung dịch nuôi cấy, ví dụ như phorbol-12-myristate-13-acetat kích thích các dopaminergic markers (như tyrosine hydroxylase và dopamin transporter) ở tế bào SH-SY5Y, acid retinoic phối hợp với các neurotrophins có thể kích thích sản xuất các kiểu hình cholinergic, trong khi dibutyryl AMP vòng kích thích kiểu hình adrenergic.

Một trong những ưu điểm khác khi sử dụng tế bào SH-SY5Y biệt hóa là chúng có hệ sợi trục kéo dài, biểu hiện các marker thần kinh trưởng thành có tỷ lệ tăng sinh thấp hơn, giúp chúng có hình thái tương tự như các neuron vùng vỏ ở

người. Tuy nhiên, chúng không có các đặc tính điện lý và điện hóa như neuron trưởng thành.

Sau khi biệt hóa, các tác nhân gây độc được bổ sung vào môi trường nuôi cấy để gây tổn thương hoặc chết tế bào. Các chất độc thần kinh chọn lọc trên dòng dopaminergic (6-OHDA, rotenon và MPTP) được sử dụng trên các tế bào SH-SY5Y biệt hóa dopaminergic để gây chết tế bào theo chương trình và mô phỏng bệnh Parkinson. Do vậy các tế bào biệt hóa mô phỏng neuron là một công cụ quan trọng trong sàng lọc các hợp chất bảo vệ thần kinh.

### ***Mô hình sử dụng tế bào gốc vạn năng “cảm ứng” người (Human Induced-Pluripotent Stem cells – hiPSC)***

Mô hình hiPSC là một công nghệ mới trong mô hình hóa các bệnh thoái hóa thần kinh, bằng cách lập trình lại các tế bào sinh dưỡng (có thể là nguyên bào sợi từ da, các tế bào máu ngoại vi hoặc nang tóc) thành các tế bào gốc vạn năng “cảm ứng” (Induced-Pluripotent Stem cells - iPSC) với phương pháp của Yamakana. Quá trình này chuyển các tế bào sinh dưỡng thành các iPSC, từ đó chúng có thể biệt hóa thành các dòng tế bào khác nhau, trong đó có các tế bào thần kinh cũng có các kiểu hình khác nhau. Ngoài tế bào sinh dưỡng, các loại tế bào bao gồm cả tế bào thần kinh cũng có thể được biệt hóa từ tế bào gốc phôi thai người (Human embryonic Stem cells - hESC).

Các neuron hiPSC ưu việt hơn so với các mô hình tế bào bắt tử trong nghiên cứu các bệnh thoái hóa thần kinh. Các tế bào sinh dưỡng được dùng để tạo iPSC có thể được lấy từ các bệnh nhân có triệu chứng bệnh thoái hóa thần kinh, từ đó hệ gene của bệnh được tích hợp vào mô hình tế bào. Và cũng như mô hình sử dụng tế bào bắt tử, các tế bào thần kinh biệt hóa từ iPSC cũng có thể mô phỏng các bệnh lý thoái hóa thần kinh bằng cách cho phơi nhiễm với các chất độc tế bào, từ đó đánh giá khả năng bảo vệ tế bào thần kinh in vitro của các hợp chất hoặc phân tử nghiên cứu.

### ***Mô hình tế bào ba chiều (3D)***

Các bằng chứng mới cho thấy vai trò quan trọng của các tế bào không phải thần kinh và tình trạng viêm trong bệnh sinh của các bệnh thoái hóa thần kinh. Độ



phức tạp của các mô hình tế bào có thể được tăng cường nhờ sử dụng nhiều loại tế bào khác nhau trong một mô hình duy nhất, được biệt hóa từ hiPSC. Nuôi cấy các tế bào này trên các hệ matrix ba chiều nhân tạo có thể mô phỏng các hệ thống ngoại bào, làm mô hình bệnh thoái hóa thần kinh trở nên chi tiết hơn nữa. Những mô hình này thể hiện sự phụ thuộc giữa các neuron và vi môi trường của chúng, điều này không thể thấy được trên các mô hình 2D. Các mô hình 3D từ PSC sinh ra các cấu trúc tương tự cơ quan, có thể phát triển trên các hệ thống kênh dẫn vi lưu (microfluidic), điều này giúp phát triển và nuôi dưỡng các cấu trúc tương tự não kể cả trong giai đoạn non và trưởng thành để nghiên cứu bệnh thoái hóa thần kinh. Điều kiện 3D giúp kiểm soát nhiều điều kiện giữa các tế bào cũng như giữa tế bào với môi trường, giúp điều chỉnh chức năng sinh lý của tế bào như gene, biểu hiện protein cũng như tăng sinh và biệt hóa. Các mô hình 3D có tương quan tốt trên thực tế hơn các mô hình tế bào 2D, phủ lấp khoảng trống hiện có giữa mô hình in vitro và in vivo, tuy nhiên còn cần cải tiến và hoàn thiện để có thể áp dụng rộng rãi trong thực tế [153].

#### ***Mô hình gây độc bởi glutamat trên tế bào thần kinh hải mã chuột HT<sub>22</sub>***

Với những người mắc bệnh Alzheimer, các tế bào hồi hải mã nằm trong số các tế bào thần kinh đầu tiên của não bị thoái hóa do hai tác nhân gây stress oxy hóa: tác nhân gây ra gốc tự do amyloid b-protein, gây độc cho các tế bào thần kinh hồi hải mã và glutamat gây chết tế bào HT<sub>22</sub> thông qua sự gia tăng peroxid nội bào [159].

Glutamat là một chất dẫn truyền thần kinh kích thích nội sinh trong hệ thần kinh trung ương, khi nồng độ glutamat quá cao trong hệ thống thần kinh trung ương sẽ gây ra độc tố kích thích và gây stress oxy hóa, từ đó dẫn đến thoái hóa các tế bào thần kinh [160], [161], [162]. Glutamat còn gây ra sự tích tụ các dạng oxy hóa hoạt động (ROS) nội bào và giảm hàm lượng GSH thông qua ức chế sự hấp thu cysteine vào tế bào [163]. Stress oxy hóa do glutamat có khả năng kích hoạt các đường dẫn tín hiệu bao gồm c-Jun N-terminal kinase (JNK) và Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK), từ đó ảnh hưởng đến quá trình viêm, tăng sinh và chết của tế bào [164], [159].

## CHƯƠNG 2. NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. NGUYÊN VẬT LIỆU NGHIÊN CỨU

#### 2.1.1. Nguyên liệu nghiên cứu

##### *Mẫu nghiên cứu đặc điểm thực vật*

Toàn cây Ban hooker (lá, thân, rễ, hoa, quả) được thu hái tại Xã Sa Pả, huyện Sa Pa, tỉnh Lào Cai vào các ngày 18/6/2016 và ngày 22/10/2016. Cây Ban hooker thu hái ngày 18/6/2016 có nhiều hoa, chưa có quả; cây Ban hooker thu hái ngày 22/10/2016 không còn hoa, có nhiều quả. Mẫu cây để giám định tên khoa học được lấy vào ngày 18/6/2016. Các tiêu bản mẫu cây hiện còn được lưu tại Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (số tiêu bản HH20160619).

##### *Mẫu nghiên cứu hóa học, tác dụng sinh học*

Phần trên mặt đất của cây Ban hooker (lá, thân, hoa, quả) thu hái tháng 06/2016 và 10/2016 tại Xã Sa Pả, huyện Sa Pa, tỉnh Lào Cai được rửa sạch, sấy khô ở nhiệt độ 50°C, xay nhỏ. Mẫu dược liệu được lưu tại khoa Hóa phân tích-Tiêu chuẩn, Viện Dược liệu.

Mẫu Ban hooker đã sấy khô (5,0 kg) được nghiền thành bột nhỏ, ngâm chiết với 15 lít methanol ở nhiệt độ phòng (chiết 3 lần, mỗi lần 4 ngày). Dịch chiết được gộp lại và cất thu hồi methanol dưới áp suất giảm thu được 487 g cao khô methanol (BHM). Cao BHM được phân tán vào nước cất (0,5 lít) thành hỗn dịch rồi lắ, chiết phân đoạn lần lượt với *n*-hexan (0,5 lít × 3 lần), ethyl acetat (0,5 lít × 3 lần), *n*-butanol (0,5 lít × 3 lần). Các dịch chiết *n*-hexan, ethyl acetat và *n*-butanol được tách riêng, cất thu hồi dung môi dưới áp suất giảm thu được các phần cao khô tương ứng: 89 g cao phân đoạn *n*-hexan (BHH), 78 g cao phân đoạn ethyl acetat (BHE), 86 g cao phân đoạn *n*-butanol (BHB) và 96 g cao nước (BHW).

Các cao khô thu được được sử dụng một phần để thử tác dụng sinh học, phần còn lại để nghiên cứu về thành phần hóa học (phân lập các hợp chất bằng sắc ký cột sau đó xác định cấu trúc bằng các loại phổ).

#### 2.1.2. Động vật thí nghiệm

Chuột nhắt trắng chủng Swiss, giống đực, khỏe mạnh, cân nặng  $20 \pm 2$ g do

Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương cung cấp. Động vật thí nghiệm được chăm sóc làm quen với điều kiện thí nghiệm trước 3-5 ngày nghiên cứu và trong suốt quá trình nghiên cứu tại Phòng nuôi động vật thí nghiệm của Bộ môn Dược lực, Đại học Dược Hà Nội.

### **2.1.3. Máy móc, trang thiết bị và dụng cụ**

Kính hiển vi Axioskop 40 (Carl Zeiss Light Microscopy - Đức) của Khoa Hóa Phân tích - Tiêu chuẩn, Viện Dược liệu.

Máy đo phổ khối lượng ion hóa phun điện tử (ESI-MS) Agilent 1100 LC-MSD Trap (Agilent – Mỹ) của Viện Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam và máy Agilent 1260 Series Single Quadrupole LC/MS Systems (Agilent – Mỹ) của Viện Hóa Sinh biển, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Máy đo phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) Bruker AM500 FT-NMR Spectrometer và Bruker AM600 FT-NMR Spectrometer (Bruker – Đức) của Viện Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Máy đo pH (EUTECH), hệ thống ELISA gồm máy đọc khay vi tinh thể (Biotek – Mỹ) và máy ủ lắc khay (Awareness – Mỹ), máy sinh hóa bán tự động TC 3300 Plus (Teco Diagnostics – Mỹ) của Trường đại học Dược Hà Nội.

Hệ thống Operetta CLS High - Content Analysis (Perkin Elmer – Mỹ) của Viện Khoa học và Công nghệ Hàn Quốc (Korea Institute of Science and Technology - KIST), Hàn Quốc.

Cân kỹ thuật Sartorius, cân phân tích Precisa XT 220A.

Hệ thống chiết hồi lưu dung tích bình cầu 10 lít, máy cất quay.

Dụng cụ thủy tinh: các loại cột sắc ký đường kính từ 1-10 cm, dài từ 30-100 cm; bình cầu ngoại dung tích 50-2000 ml; ống nghiệm, ống đựng mẫu NMR, pipet chính xác.

Bản mỏng silica gel F254 và RP-18 F254S tráng sẵn trên tấm nhôm (Merck – Đức).

Bột silica gel pha thường cỡ hạt 40-200  $\mu\text{m}$  (Merck – Đức); pha đảo RP-18 cỡ hạt 30-50  $\mu\text{m}$  (FuJisilisa Chemical Ltd. – Nhật), gel Sephadex LH-20 (Amersham

Biosciences – Anh).

Đĩa thực hiện thí nghiệm 96 giếng (Costar Corning – Mỹ)

#### **2.1.4. Hóa chất, dung môi, thuốc thử**

##### ***Hóa chất:***

Hoá chất cho nghiên cứu tác dụng dọn gốc tự do: DPPH, DMSO (Merck – Đức); nitroblue tetrazolium - NBT, xanthin oxidase từ sữa bò (0,8 U/mg protein, 13 mg protein/ml), xanthin  $\geq 99\%$  (Sigma Aldrich – Mỹ);

Bộ kit định lượng AST, ALT (Biosystems – Tây Ban Nha).

Hoá chất để định lượng GSH, SOD trong gan: Thuốc thử Ellman, đệm carbonat, đệm phosphat (Merck – Đức).

Các hóa chất nghiên cứu để xác định hàm lượng MDA trong gan: Acid thiobarbituric, kali clorid, acid tricloacetic (Merck – Đức).

##### ***Dung môi:***

Dung môi dùng để chiết dược liệu: Methanol (Ghtech - Trung Quốc).

Các dung môi chiết phân đoạn: Ethyl acetat (Duksan- Hàn Quốc), *n*-hexan và *n*-butanol (Ghtech - Trung Quốc).

Các dung môi tinh khiết phân tích (PA) dùng trong sắc ký lớp mỏng, sắc ký cột: Methanol, Ethylacetat, Dicloromethan, *n*-butanol, *n*-hexan, Aceton, Cloroform (Merck – Đức); Acid sulfuric 10% (Ghtech - Trung Quốc), Ethanol (Việt Nam).

Dung môi đo phổ NMR: Aceton- $d_6$ ,  $CD_3OD$ ,  $CDCl_3$ , DMSO- $d_6$ , DMSO- $d_6$  (Sigma Aldrich – Mỹ).

Dung môi nghiên cứu tác dụng bảo vệ tế bào thần kinh DMSO (Sigma Aldrich – Mỹ)

##### ***Thuốc thử:***

Glutamat, môi trường DMEM-High Glucose (Cytiva HyClone – Mỹ ); 6-OHDA, *n*-Acetyl-L-Cysteine (Sigma – Mỹ);

Thuốc nhuộm Calcein AM (Thermo Fisher scientific– Mỹ);

Đệm Dulbecco's phosphate-buffered saline – DPBS (Thermo Fisher scientific– Mỹ).

##### ***Chứng dương, tế bào:***

Quercetin 90,32% (Viện kiểm nghiệm thuốc Trung ương).

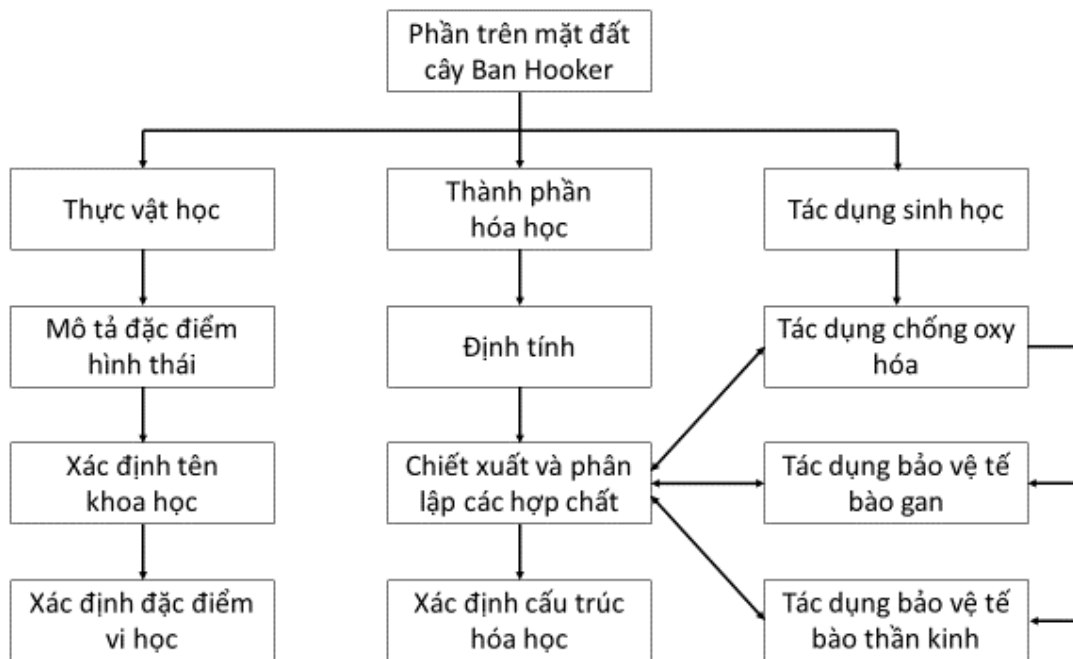
Sylimarin (tên thương mại: Legalon 70, Giấy phép lưu hành VN-19329-15; Nhà sản xuất: Madaus/Đức; Nhà phân phối: MEDA Pharma - Bỉ), hàm lượng 86,50 – 93,35 mg cao khô của cây *Sylibum marianum* (36-44:1), tương ứng với 54.1mg silymarin (HPLC), được tính dưới dạng silibinin (dung môi chiết: ethyl acetat).

Paracetamol tiêu chuẩn phân tích (Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương).

Tế bào thần kinh hải mã chuột HT<sub>22</sub> và tế bào u nguyên bào thần kinh SH-SY5Y mua từ Ngân hàng dòng tế bào Hàn Quốc - Seoul, Hàn Quốc (The Korean Cell Line Bank - Seoul, South Korea).

## 2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Toàn bộ quá trình nghiên cứu của luận án được thể hiện trong sơ đồ thiết kế nghiên cứu trong Hình 2.1. dưới đây.



Hình 2.1 Sơ đồ thiết kế nghiên cứu

### 2.2.1. Nghiên cứu đặc điểm thực vật để xác định tên khoa học

Quan sát và mô tả đặc điểm hình thái thực vật của cây tại thực địa (Xã Sa Pả, huyện Sa Pa, tỉnh Lào Cai) và tại phòng thí nghiệm.

Thu hái, làm tiêu bản mẫu cây và lưu giữ tiêu bản [165].

Xác định tên khoa học của mẫu nghiên cứu trên cơ sở phân tích đặc điểm

hình thái thực vật, so sánh với các khóa phân loại chi *Hypericum* trong các tài liệu Cây cỏ Việt Nam của Phạm Hoàng Hộ [6], Từ điển cây thuốc Việt Nam [5], Thực vật chí Trung Quốc [9]. Song song với việc phân tích, xác định và đối chiếu với các khóa phân loại, mẫu nghiên cứu được so sánh với một số mẫu tiêu bản có tên Ban hooker đang được lưu trữ tại Phòng Tiêu bản Thực vật của Khoa Tài nguyên Dược liệu, Viện Dược liệu và Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam với sự giúp đỡ của các chuyên gia phân loại thực vật Đỗ Văn Hải - Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Nghiên cứu đặc điểm vi học: cắt, làm tiêu bản vi phẫu lá, thân, đặc điểm bột của lá, thân, cây Ban hooker, quan sát các đặc điểm, mô tả và chụp ảnh tiêu bản dưới kính hiển vi Axioskop 40 [166].

## **2.2.2. Nghiên cứu về thành phần hóa học**

### ***2.2.2.1. Phương pháp định tính***

Chiết xuất, phân tích sơ bộ các nhóm chất có trong dược liệu bằng các phản ứng hóa học đặc trưng [167].

### ***2.2.2.2. Phương pháp phân lập các hợp chất***

Phân lập các hợp chất trong phần trên mặt đất của cây Ban hooker bằng phương pháp sắc ký cột, sắc ký lỏng HPLC điều chế, theo dõi các phân đoạn bằng sắc ký lớp mỏng [167]. Cột sắc ký được chuẩn bị như sau:

- Pha tĩnh: dùng hạt silica gel pha thuận cỡ hạt 63-200  $\mu\text{m}$  cho cột to (đường kính 6 - 10 cm), dùng hạt cỡ 40-63  $\mu\text{m}$  cho cột có đường kính 5 cm trở xuống; silica gel pha đảo cỡ hạt 30 - 50  $\mu\text{m}$ .

- Phương pháp nạp cột và đưa mẫu lên cột: hạt silica gel được nạp vào cột theo phương pháp nạp cột ướt, sử dụng hỗn hợp dung môi là pha động để rửa giải.

- Lựa chọn pha động rửa giải căn cứ vào bản mỏng sắc ký.

- Mẫu phân lập được đưa lên cột bằng cách đưa thẳng dung dịch hòa tan mẫu hoặc phân tán mẫu trong silica gel, sau đó làm khô silica gel, nghiền mịn rồi đưa lên cột.

- Húng và gom dịch rửa giải bằng ống thủy tinh, dịch rửa giải trong các ống được gom lại dựa vào kết quả phân tích sắc ký lớp mỏng.

- Sắc ký lớp mỏng dùng để theo dõi vết các chất từ dịch chiết phân đoạn và kiểm tra độ tinh khiết của các chất phân lập, được thực hiện trên bản mỏng tráng sẵn silica gel F<sub>254</sub>, RP<sub>18</sub> F<sub>254</sub>S. Phát hiện chất bằng đèn tử ngoại ở hai bước sóng 254 nm và 365 nm hoặc dùng thuốc thử là H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10% trong ethanol.

### ***2.2.2.3. Phương pháp xác định cấu trúc hóa học các hợp chất***

Xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất phân lập được dựa trên các phương pháp phổ bao gồm: phổ khối lượng, phổ cộng hưởng từ hạt nhân [167], [168]. Nhận dạng cấu trúc các hợp chất dựa vào dữ liệu phổ đo được và đối chiếu với dữ liệu phổ trong các tài liệu tra cứu.

## **2.2.3. Nghiên cứu tác dụng sinh học**

### ***2.2.3.1. Đánh giá khả năng dọn gốc tự do DPPH***

*Tiến hành thực nghiệm [148]:*

Pha dung dịch DPPH nồng độ 100 $\mu$ M trong MeOH trước khi tiến hành thí nghiệm.

Pha mẫu thử: Mẫu thử và chất đối chứng quercetin được hòa tan trong dung môi dimethyl sulfoxid (DMSO) tạo dung dịch gốc nồng độ 10 mg/ml. Dung dịch gốc trong DMSO sau đó được pha loãng bằng methanol để thu được các dung dịch thử có nồng độ thích hợp.

Phản ứng được thực hiện trên đĩa 96 giếng. Lần lượt cho vào các giếng hỗn hợp gồm có: 20  $\mu$ L dung dịch mẫu thử (chỉ là MeOH nếu là mẫu chứng), 180  $\mu$ L dung dịch DPPH đã pha. Lắc đều, để yên 30 phút trong bóng tối ở nhiệt độ thường. Dung dịch sau khi phản ứng được đo mật độ quang (OD) ở bước sóng 517 nm (có thể chọn trong khoảng 515-520 nm). Song song với mỗi mẫu chứng và mẫu thử, có một mẫu trắng của chứng và thử được tiến hành trong cùng điều kiện nhưng thay dung dịch DPPH bằng methanol. Chất đối chứng dương được sử dụng là quercetin.

*Đánh giá kết quả:*

Khả năng dọn gốc tự do DPPH của mẫu thử và chứng dương được tính theo công thức:

$$IC (\%) = [(\Delta OD_{ch} - \Delta OD_{th}) / \Delta OD_{ch}] \times 100$$

*Trong đó:*

- IC (%): Khả năng dọn gốc tự do DPPH của mẫu thử.
- $\Delta OD_{ch} = OD_{chứng} - OD_{trắng}$ ;  $\Delta OD_{th} = OD_{thử} - OD_{trắng}$
- $OD_{chứng}$ ,  $OD_{thử}$ ,  $OD_{trắng}$ : Mật độ quang của mẫu chứng, mẫu thử (hoặc chứng dương), mẫu trắng.

### **2.2.3.2. Đánh giá khả năng dọn gốc tự do superoxid ( $O_2^{\cdot-}$ )**

*Tiến hành thực nghiệm [149]:*

Pha mẫu thử: Các mẫu thử và chứng dương được pha trong DMSO để được dung dịch gốc 10mg/ml, từ dung dịch gốc này pha loãng bằng dung dịch đệm carbonat (50 mM, pH 10,2) để thu được các dung dịch thử có nồng độ thích hợp.

Phản ứng được thực hiện trên đĩa 96 giếng. Lần lượt cho vào các giếng hỗn hợp gồm: 40  $\mu$ L đệm carbonat pH=10,2 (50 mM) có chứa acid ethylenediaminetetraacetic (EDTA) 0,1 mM; 20  $\mu$ L mẫu thử hoặc chất đối chiếu quercetin pha trong DMSO với các nồng độ thích hợp (chỉ là DMSO nếu là mẫu chứng); 100  $\mu$ L dung dịch xanthin 200  $\mu$ M (pha trong đệm carbonat); 20  $\mu$ L dung dịch nitro blue tetrazolium (NBT) 100  $\mu$ M pha trong đệm carbonat; 20  $\mu$ L enzym xanthinoxidase. Trộn đều hỗn hợp trong khoảng 1 phút rồi để yên trong 5 phút ở nhiệt độ phòng cho phản ứng xảy ra. Theo dõi động học của phản ứng bằng cách đo mật độ quang (OD) của hỗn hợp ở bước sóng 560 nm, tần suất 30 giây 1 lần, trong 5 phút. Chất đối chứng dương được sử dụng là quercetin.

*Đánh giá kết quả:*

Khả năng dọn gốc tự do superoxid của mẫu thử và chứng dương được tính theo công thức:



$$IC (\%) = [(\Delta OD_{ch} - \Delta OD_{th}) / \Delta OD_{ch}] \times 100$$

*Trong đó:*

- IC (%): Khả năng dọn gốc tự do  $O_2^{\cdot-}$  của mẫu thử.
- $\Delta OD_{ch} = OD_{chứng} - OD_{trắng}$ ;  $\Delta OD_{th} = OD_{thử} - OD_{trắng}$
- $OD_{chứng}$ ,  $OD_{thử}$ ,  $OD_{trắng}$ : Mật độ quang của mẫu chứng, mẫu thử (hoặc chứng dương), mẫu trắng.

Khả năng dọn gốc tự do DPPH và  $O_2^{\cdot-}$  được biểu diễn bằng giá trị  $IC_{50}$  là nồng độ tại đó mẫu thử ức chế 50% lượng gốc tự do. Giá trị  $IC_{50}$  được tính toán theo phương pháp hồi quy phi tuyến tính với mô hình log nồng độ trên phần mềm Graphpad Prism 8.4.

### **2.2.3.3. Đánh giá tác dụng bảo vệ gan**

*Tiến hành thực nghiệm [151], [152]:*

Sylimarín và cao BHE được phân tán trong dung dịch NaCMC (Natri carboxymethylcellulose) 0,5%. Cao BHM được phân tán trong nước cất theo các mức liều 250mg/kg cân nặng và 500mg/kg cân nặng.

Chuột thí nghiệm được chia ngẫu nhiên thành 7 lô, mỗi lô 8 con.

- Lô 1 (chứng sinh lý): uống nước cất hàng ngày với thể tích 0,1ml/10g cân nặng.
- Lô 2 (chứng bệnh lý): uống nước cất hàng ngày với thể tích 0,1ml/10g cân nặng.
- Lô 3 (chứng dương): uống silymarin với liều hàng ngày 100 mg/kg cân nặng.
- Lô 4 (lô thử): uống cao BHM, liều hàng ngày 250mg/kg cân nặng.
- Lô 5: uống cao BHM, liều hàng ngày 500mg/kg cân nặng.
- Lô 6: uống cao BHE, liều hàng ngày 250mg/kg cân nặng.
- Lô 7: uống cao BHE, liều hàng ngày 500mg/kg cân nặng.

Cho chuột uống các chế phẩm thử hàng ngày trong vòng 7 ngày. Vào ngày thứ 8, sau khi cho chuột sử dụng thuốc 1 giờ, động vật thí nghiệm ở các lô 2 - 7 được cho uống paracetamol ở mức liều 400 mg/kg cân nặng, động vật thí nghiệm ở lô 1 (chứng sinh lý) được uống nước. Sau 24 giờ kể từ khi gây độc (uống paracetamol), chuột ở các lô thí nghiệm được lấy máu từ xoang tĩnh mạch xoang hốc mắt (một lần duy nhất) trong điều kiện gây tê toàn phần, kỹ thuật lấy máu như sau:

- Thuốc gây tê nhãn khoa tại chỗ được bôi vào mắt trước khi lấy máu;
- Lấy một mao quản đưa vào giữa hốc mắt (chéch góc 30 độ so với mũi);
- Đẩy nhẹ ngón tay cái đủ để đâm thủng tổ chức mô và đi vào vị trí xoang hốc mắt. Khi xoang bị chọc thủng, máu sẽ chảy qua ống mao quản vào ống nghiệm;
- Sau khi lấy đủ lượng máu cần thiết, ống mao mạch được rút ra một cách nhẹ nhàng và lau bằng bông vô trùng. Có thể cầm máu bằng cách áp ngón tay nhẹ nhàng vào mắt;
- Ba mươi phút sau khi lấy máu, kiểm tra các tổn thương của động vật.

Thể tích mỗi lần lấy khoảng 0,70 ml máu, thu được 0,35 ml huyết thanh để xác định hoạt độ hai enzym AST, ALT trong huyết thanh và lấy mô gan để định lượng MDA, GSH dạng khử và hoạt độ SOD trong gan.

Việc nghiên cứu trên chuột được thực hiện tối đa theo nguyên tắc 3R: thay thế động vật với các mẫu phi động vật (*Replacement*), giảm số lượng động vật (*Reduction*) và hoàn thiện các quy trình thí nghiệm để giảm đau đớn tới mức tối đa cho động vật (*Refinement*).

*Đánh giá kết quả:*

#### *a. Hoạt độ AST, ALT huyết thanh*

Hoạt độ AST, ALT huyết thanh: sử dụng 50 µl huyết thanh và 1,0 mL thuốc thử tương ứng, đưa vào máy để theo dõi sự thay đổi động học mật độ quang ở 37°C, bước sóng 340 nm. Hoạt độ các enzym được xác định bằng tốc độ thay đổi mật độ quang trung bình trong 1 phút theo công thức:

\* Hoạt độ AST (U/L) = (Tốc độ thay đổi mật độ quang trung bình/phút)  $\times$  3333

\* Hoạt độ ALT (U/L) = (Tốc độ thay đổi mật độ quang trung bình/phút)  $\times$  3333

#### *b. Hàm lượng MDA trong gan*

Định lượng MDA trong dịch nghiền đồng thể gan theo quy trình trong tài liệu [169]. Mẫu gan được nghiền đồng thể trong dung dịch KCl 0,15M theo tỷ lệ 1:10 (khối lượng/thể tích) ở nhiệt độ 0-4°C. Sau khi ly tâm (10.000 vòng/phút trong 10 phút, 0°C), tách phần dịch nổi để định lượng MDA. Hỗn hợp phản ứng bao gồm: 150  $\mu$ L dịch nghiền đồng thể, 1ml nước cất và 1ml dung dịch acid thiobarbituric 0,5% (pha trong acid acetic 50%). Đun cách thủy hỗn hợp trên ở 95-100°C trong 1 giờ. Sau khi để nguội về nhiệt độ phòng, thêm 25  $\mu$ L HCl 5N vào hỗn hợp sau phản ứng và chiết phức màu tạo thành bằng 3,5 ml *n*-butanol. Tách lớp *n*-butanol và đo mật độ quang ở bước sóng 532 nm. Hàm lượng MDA (nmol/g mô) được tính theo phương trình hồi quy tuyến tính với chất chuẩn tetramethoxypropan.

#### *c. Hàm lượng GSH trong gan*

Hàm lượng GSH trong gan được định lượng bằng thuốc thử Ellman [170]. Mẫu gan được nghiền đồng thể trong dung dịch đệm phosphat (100 mM, pH=8) theo tỷ lệ 1:10 (khối lượng/thể tích) ở nhiệt độ 0-4°C. Sau khi ly tâm (10.000 vòng/phút trong 10 phút, 0°C), trộn đồng lượng phần dịch nổi với dung dịch acid sulfosalicylic 4%, để lắng 1 giờ ở nhiệt độ 0-4°C, sau đó ly tâm để loại bỏ tủa protein. Phần dịch trong sau ly tâm được sử dụng để định lượng GSH. Hỗn hợp phản ứng trong mỗi giếng bao gồm: 20  $\mu$ L dịch nghiền đồng thể đã loại protein, 160  $\mu$ L đệm phosphat và 20  $\mu$ L dung dịch 5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoic acid) 10 mM. Đo mật độ quang ở bước sóng 412 nm. Hàm lượng GSH trong gan (nmol/g mô) được xác định dựa trên giá trị mật độ quang đo được, sử dụng hệ số hấp thụ phân tử  $13,6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

#### *d. Hoạt độ SOD trong gan*

Đo hoạt độ SOD trong gan theo quy trình trong tài liệu [171]. Mẫu gan được nghiền đồng thể trong dung dịch đệm carbonat (50 mM, pH=10,2) theo tỷ lệ 1:10 (khối lượng/thể tích) ở nhiệt độ 0-4°C. Sau khi ly tâm (10.000 vòng/phút trong 20

phút, 0°C), tách phần dịch nổi để đo hoạt độ SOD. Hỗn hợp phản ứng trong mỗi giếng bao gồm: 20  $\mu$ L dịch nghiền đồng thể (được pha loãng bằng đệm carbonat với tỷ lệ thích hợp) hoặc dung dịch đệm carbonat (đối với giếng chứng), 140  $\mu$ L dung dịch xanthin 142 mM (pha trong đệm carbonat pH=10,2), 20  $\mu$ L dung dịch xanh nitrotetrazolium clorid (NBT) và 20 $\mu$ L xanthine oxidase (nồng độ được điều chỉnh để tốc độ thay đổi mật độ quang của giếng chứng khoảng 0,016/phút). Theo dõi động học của phản ứng bằng cách đo mật độ quang của các giếng ở bước sóng 560 nm với tần suất 20 giây/lần trong thời gian 3 phút ở nhiệt độ 25°C. Tỷ lệ ức chế gốc tự do superoxid của mẫu thử được tính theo công thức:

$$\% \text{ ỨC CHẾ SUPEROXID} = [(\Delta\text{OD}_{\text{ch}} - \Delta\text{OD}_{\text{th}})/\Delta\text{OD}_{\text{ch}}] \times 100$$

Hoạt độ SOD trong gan được biểu diễn dưới dạng số đơn vị hoạt độ (U/mg mô), trong đó một đơn vị hoạt độ SOD được định nghĩa là lượng enzym cần thiết để ức chế 50% tốc độ khử NBT.

Các thông số của nghiên cứu đánh giá tác dụng bảo vệ gan được xử lý bằng phần mềm Excel Microsoft 2013 và SPSS 20.0; biểu diễn dưới dạng trung bình  $\pm$  độ lệch chuẩn. Tiến hành các so sánh thống kê với kiểm định *t*-test cho 2 mẫu độc lập cho biến liên tục có phân phối chuẩn và kiểm định phi tham số Mann-Whitney U cho biến liên tục có phân phối không chuẩn, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê khi  $p < 0,05$ .

#### **2.2.3.4. Đánh giá tác dụng bảo vệ tế bào thần kinh**

##### *a. Mô hình gây độc bởi glutamat trên tế bào thần kinh hải mã chuột HT<sub>22</sub>*

*Tiến hành thực nghiệm và đánh giá kết quả [160], [161]:*

##### **\* Thử nghiệm với các cao chiết**

Pha mẫu thử: Các mẫu thử và chứng dương được pha trong DMSO 0,5% để được dung dịch gốc 100 $\mu$ g/mL, từ dung dịch gốc này tiếp tục pha loãng bằng DMSO 0,5% để được các nồng độ giảm dần cho thử nghiệm.

Tế bào HT<sub>22</sub> được nuôi cấy trong môi trường DMEM hoàn chỉnh (môi trường DMEM bổ sung 10% FBS, 1% Penicillin-Streptomycin) ở 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Tế bào HT<sub>22</sub> được đưa vào đĩa 96 giếng, mật độ 3.000 tế bào/giếng (tương ứng 100  $\mu$ L

mỗi giếng), nuôi trong tủ ấm ở 37°C và 5 % CO<sub>2</sub> trong 16-18 giờ.

- Ủ tế bào với mẫu nghiên cứu ở các nồng độ khác nhau trong 2 giờ (làm lặp lại thí nghiệm 03 lần).

- Thêm 30 µL dung dịch glutamat 5 mM trong môi trường DMEM không có FBS vào mỗi giếng.

- Ủ trong 12 giờ, sau đó loại bỏ môi trường, nhuộm tế bào bằng 100 µL dung dịch calcein AM 0,5 µM trong DPBS. Chụp ảnh và xác định số tế bào sống trên thiết bị Operetta CLS High-Content Analysis System (Perkin Elmer, USA) sử dụng kênh GFP (ex/em, 488 nm/514 ± 15) và phần mềm Harmony 3.5 (Perkin Elmer, USA). Chứng dương được sử dụng là *N*-acetylcystein (NAC) 1 mM.

**\* Thử nghiệm với các hợp chất phân lập được.**

Pha mẫu thử: Các mẫu thử và chứng dương được pha trong DMSO 0,5% để được dung dịch gốc 100µM, từ dung dịch gốc này tiếp tục pha loãng bằng DMSO 0,5% để được các nồng độ giảm dần cho thử nghiệm.

Các bước tiếp theo làm như trong thử nghiệm với các cao chiết.

*b. Mô hình gây độc bởi 6-hydroxydopamin trên tế bào u nguyên bào thần kinh SH-SY5Y [156], [157]*

*Tiến hành thực nghiệm và đánh giá kết quả:*

Pha mẫu thử: Các mẫu thử được pha trong DMSO 0,5% để được dung dịch gốc 100 µM, từ dung dịch gốc này tiếp tục pha loãng bằng DMSO 0,5% để được các nồng độ giảm dần cho thử nghiệm.

Tế bào SH-SY5Y được nuôi cấy trong môi trường DMEM hoàn chỉnh (môi trường DMEM bổ sung 10% FBS, 1% Penicillin-Streptomycin) ở 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Tế bào SH-SY5Y được đưa vào đĩa 96 giếng, mật độ 50.000 tế bào/giếng và nuôi trong tủ ấm ở 37°C và 5 % CO<sub>2</sub> trong 24 giờ.

- Ủ tế bào với mẫu nghiên cứu ở các nồng độ khác nhau trong 2 giờ (làm lặp lại thí nghiệm 03 lần).

- Thêm 30 µL 6-OHDA 50 µM vào mỗi giếng.

- Ủ trong 24 giờ, sau đó loại bỏ môi trường, nhuộm tế bào bằng calcein AM 0,5  $\mu$ M. Chụp ảnh và xác định số tế bào sống trên thiết bị Operetta CLS High-Content Analysis System (Perkin Elmer, USA) sử dụng kênh GFP (ex/em, 488 nm/514  $\pm$  15) và phần mềm Harmony 3.5 (Perkin Elmer, USA).

Các thông số của nghiên cứu đánh giá tác dụng bảo vệ tế bào thần kinh HT<sub>22</sub> và SH-SY5Y được xử lý bằng phần mềm Excel Microsoft 2013 và Graphpad Prism 8.4; biểu diễn dưới dạng trung bình  $\pm$  độ lệch chuẩn. So sánh thống kê với kiểm định *t*-test cho 2 mẫu độc lập cho biến liên tục có phân phối chuẩn, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê khi  $p < 0,05$ .

### **2.3. ĐỊA ĐIỂM NGHIÊN CỨU**

Nghiên cứu về thực vật được thực hiện tại Xã Sa Pả, Huyện Sa Pa, tỉnh Lào Cai; Khoa Tài nguyên Dược liệu, Viện Dược liệu; Khoa Hóa phân tích - Tiêu chuẩn, Viện Dược liệu; Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Nghiên cứu về hóa học được thực hiện tại Khoa Hóa phân tích - Tiêu chuẩn, Viện Dược liệu; Viện Hóa học và Viện Hóa Sinh biển, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Nghiên cứu thử tác dụng bảo vệ gan, tác dụng chống oxy hóa được thực hiện tại Bộ môn Dược lực, Đại học Dược Hà Nội.

Nghiên cứu thử tác dụng bảo vệ tế bào thần kinh được thực hiện tại Trung tâm nghiên cứu sản phẩm tự nhiên, Viện Khoa học và Công nghệ Hàn Quốc (Korea Institute of Science and Technology - KIST), Gangneung, Hàn Quốc.

### CHƯƠNG 3. THỰC NGHIỆM VÀ KẾT QUẢ

#### 3.1. ĐẶC ĐIỂM THỰC VẬT VÀ GIÁM ĐỊNH TÊN KHOA HỌC CÂY BAN HOOKER

##### 3.1.1. Đặc điểm hình thái thực vật



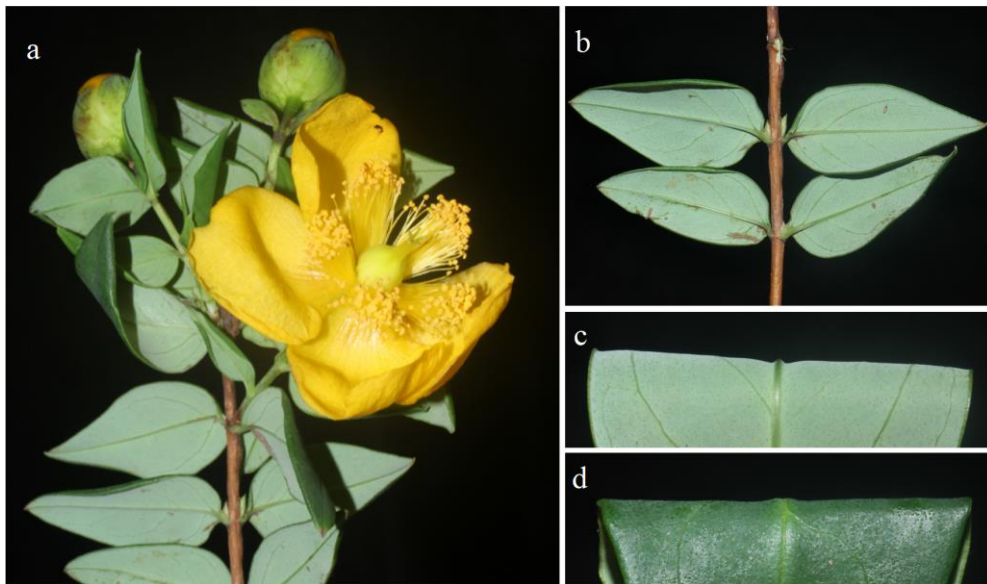
Hình 3.1. Hình ảnh cây Ban hooker tại Xã Sa Pả, Huyện Sa Pa – Lào Cai  
(Ảnh chụp ngày 18/6/2016)

Đối tượng nghiên cứu của luận án là loài Ban hooker (*Hypericum hookerianum* Wihgt., and Arn.), họ Ban (Hypericaceae). Theo các tài liệu đã công bố (Nguyễn Tiến Bản, 2003; Phạm Hoàng Hộ, 1999) và theo chỉ dẫn của các cán bộ nghiên cứu ở khoa Tài nguyên dược liệu – Viện Dược liệu, chúng tôi đã tiến hành hai lần thu thập mẫu nghiên cứu (gồm mẫu dược liệu để nghiên cứu thành phần hóa học và tác dụng sinh học) kèm theo mẫu tiêu bản thực vật để kiểm định, khẳng định tên khoa học các mẫu đã thu thập vào tháng 6 và tháng 10 năm 2016.

Ban hooker là cây bụi, cao đến 1,5 m; thân 4 cạnh hoặc có 2 gờ dạng cánh khi còn non, cành già hình trụ màu nâu đỏ, chia đốt dài 1–3 cm, ngắn hơn lá, phần thân già có những nốt sần đường kính khoảng trên dưới 1 cm. Lá có cuống dài 1–4 mm; phiến lá hình mác hẹp tới thuôn–hình mác hoặc hình trứng rộng, cỡ 1,5–5 x 0,6–2 cm, mặt dưới lá nhợt hoặc ± có phấn; phiến lá có tuyến dạng sọc ngắn hoặc điểm; phiến lá mặt dưới có tuyến dày tới thưa hoặc không có; gân bên 2 - 4 cặp, không thấy gân hình mạng cấp 3; gốc lá hình nêm hẹp tới gần hình tim, chóp lá

nhọn đến tròn; cuống lá dài 1–4 mm (Hình 3.1).

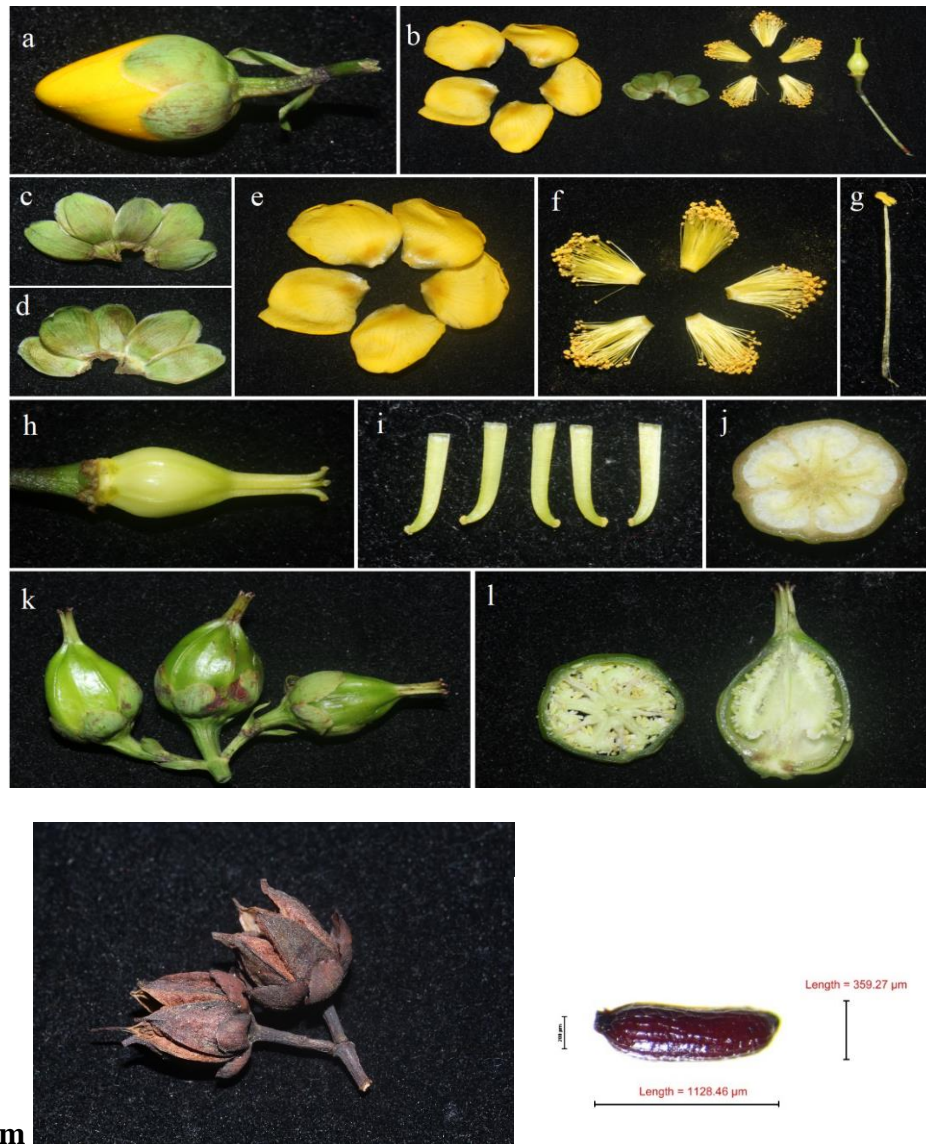
Cụm hoa 1 - 5 hoa ở đỉnh cành, gân máu ở ngọn, đỉnh gân tròn; lá bắc sớm rụng, hình giáo hoặc thuôn hẹp tới trứng ngược–thìa. Cuống 3–15 mm. Đường kính hoa 2–5 cm, dạng chén sâu; nụ hình trứng rộng đến gần cầu, đỉnh tù rộng đến tròn. Đài hoa trải ra uốn cong lại, trứng ngược hoặc trứng ngược–thìa tới gần tròn hoặc elip hoặc thuôn – elip, gần bằng nhau, 5 – 10 x 4 – 8 mm; phiến có tuyến dạng sọc, đôi khi bị gián đoạn/ngắt quãng ở đỉnh, thường trở nên đậm rõ (đài hoa dường như có gân), mép nguyên hoặc hiếm khi dạng gặm – răng nhỏ, đỉnh tròn hoặc hiếm khi tròn có mũi nhọn hoặc tù. Cánh hoa màu vàng kim đậm hay vàng nhạt, hình trứng ngược rộng tới gần tròn, 1,5–3 × 1,5–2,5 cm, dài bằng 3 lần đài; mép nguyên, không có tuyến, có mũi tù, tròn hoặc không có. Nhị thành bó, mỗi bó 60–80 nhị, dài nhất 5–9 mm, ngắn hơn cánh hoa. Bầu hình trứng rộng, 5–7 (–8) × 4–5 (–6) mm; vòi nhụy 2–4 (–7) mm, xẻ nhiều thùy và uốn cong (lồi) dần về phía đỉnh. Quả nang hình trứng hoặc trứng–nón, 0,9–1,7 cm × 7–12 mm. Hạt cỡ 0,7–1 mm, không có hoặc có gờ bề mặt; bề mặt hình mạng lưới (Hình 3.2 và 3.3).



a. Cụm hoa; b. Thân và lá; c. Mặt dưới lá; d. Mặt trên lá

Hình 3.2. Cơ quan sinh dưỡng của cây *Ban hooker*





**a.** Nụ hoa; **b.** Cấu tạo hoa; **c,d.** Đài hoa; **e.** Cánh hoa; **f,g.** Nhị hoa; **h.** Nhụy; **i.** Vòi nhụy;  
**j,k,l,m.** Quả; **n.** Hạt

*Hình 3.3. Cơ quan sinh sản của cây Ban hooker*

Mẫu Ban hooker nghiên cứu có những đặc điểm chung của chi *Hypericum* như cây bụi, hoa màu vàng, quả nang, hạt nhỏ. Tuy nhiên, trong nghiên cứu này chúng tôi đã xác định được một số đặc điểm khác nhau để phân biệt loài Ban hooker với các loài khác cùng chi *Hypericum* [5], [6], [12], [9] (Bảng 3.1).

### 3.1.2. Xác định tên khoa học mẫu nghiên cứu.

Kết quả sau khi phân tích các bộ phận (thân, cành, lá, hoa; các bộ phận của hoa, quả và hạt), đối chiếu với khóa phân loại các loài thuộc chi *Hypericum* trong “Flora of China”, Vol. 13 xuất bản năm 2007, trang 2-4 và bản mô tả đặc điểm hình thái bên ngoài ở trang 10. Chúng tôi thấy mẫu nghiên cứu thu thập ở Xã Sa Pa, Huyện Sa Pa, Tỉnh Lào Cai trùng khớp với loài *Hypericum hookerianum* Wihgt. and Arn., họ Ban (Hypericaceae).

Để có cơ sở khẳng định chắc chắn về “tính đúng” tên khoa học loài của mẫu nghiên cứu, chúng tôi đã gửi mẫu thực vật (có đủ hoa, quả) đến Phòng Thực vật chí, Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật – Viện hàn lâm Khoa học tự nhiên và Công nghệ Quốc gia để thực hiện giám định.

Kết quả nghiên cứu được giám định bởi chuyên gia Đỗ Văn Hải, Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam và các chuyên gia của Khoa Tài nguyên Dược liệu, Viện Dược đã khẳng định mẫu cây Ban hooker thu thập ở Xã Sa Pa, Huyện Sa Pa, Tỉnh Lào Cai số HH20160619 (19/6/2016) có tên khoa học là *Hypericum hookerianum* Wihgt. and Arn., Hypericaceae (**Phụ lục 6 và 7** – Phiếu giám định tên khoa học; mẫu tiêu bản). Tiêu bản giám định số HH20160619 hiện được lưu giữ tại Bảo tàng thực vật, Phòng Thực vật chí, Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật – Viện hàn lâm Khoa học tự nhiên và Công nghệ Quốc gia.

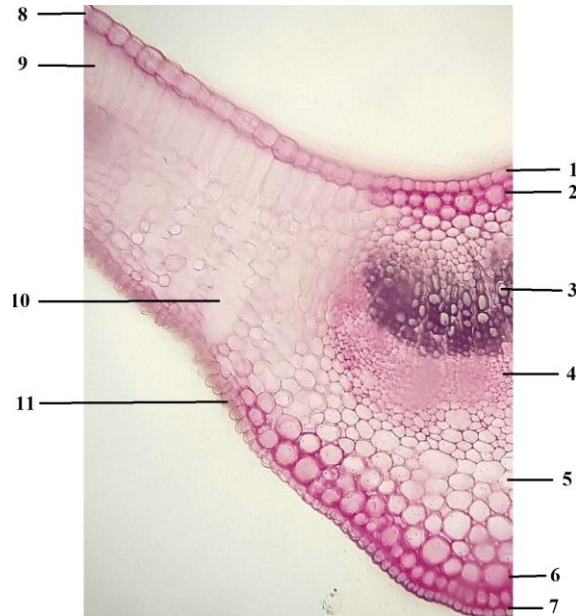
### 3.1.3. Đặc điểm vi phẫu cây Ban hooker

#### 3.1.3.1. Đặc điểm vi phẫu lá

Gân lá có cấu tạo lồi ở mặt dưới và lõm ở mặt trên. Ngoài cùng là lớp biểu bì trên (1) và lớp biểu bì dưới (7). Ngay sát lớp biểu bì là các tế bào mô dày trên gồm 2 hàng tế bào dày (2) và mô dày dưới gồm 3 hàng tế bào dày (6). Mô mềm gồm các tế bào thành mỏng, hình đa giác, sắp xếp lộn xộn với nhau (5). Bó libe gỗ xếp thành hình cung gồm gỗ ở phía trong (3) và libe ở phía ngoài (4).

Phiên lá: Ngoài cùng là biểu bì trên (8) và biểu bì dưới (11). Ngay sát biểu bì

trên là mô giậu gồm 1 hàng tế bào hình chữ nhật xếp sát với nhau (9). Mô khuyết là những khoảng trống xen kẽ giữa các tế bào mô mềm lá (10) gồm các tế bào không đều, để hở những khoảng trống chứa khí (Hình 3.4).

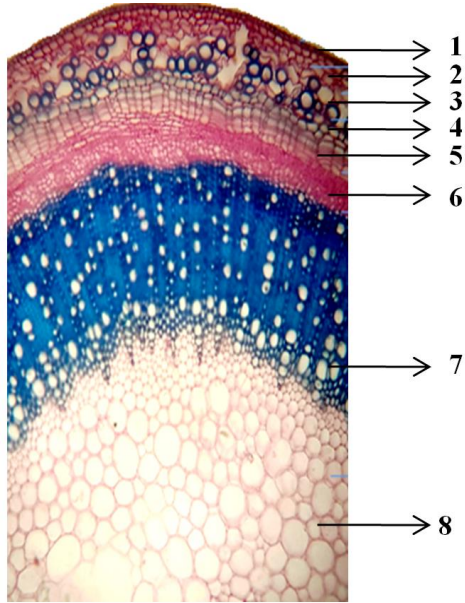


1. Biểu bì trên gân lá; 2. Mô dày trên gân lá; 3. Gỗ gân lá; 4. Libe gân lá; 5. Mô mềm gân lá; 6. Mô dày dưới gân lá; 7. Biểu bì dưới gân lá; 8. Biểu bì trên phiến lá; 9. Mô giậu phiến lá; 10. Mô khuyết phiến lá; 11. Biểu bì dưới phiến lá

Hình 3.4. Vi phẫu lá cây *Ban hooker*

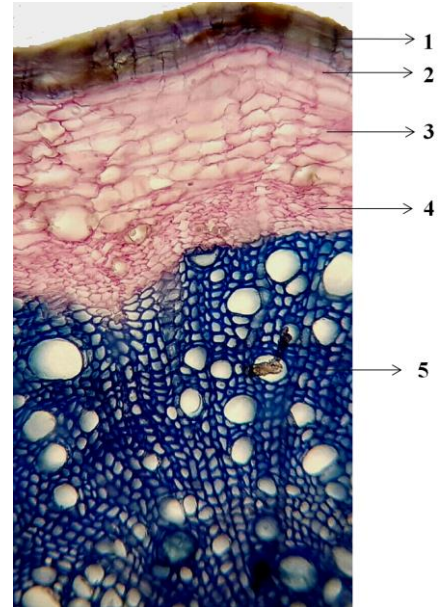
### 3.1.3.2. Đặc điểm vi phẫu thân

Vi phẫu thân cây có cấu tạo hình tròn. Ngoài cùng là biểu bì (1) gồm một hàng tế bào xếp đều đặn nhau bên ngoài phủ 1 lớp cutin mỏng. Mô dày cấu tạo bởi 2 hàng tế bào thành dày lên ở các góc (2). Mô mềm cấu tạo bởi các tế bào hình đa giác xếp lộn xộn (3); (4,5) là tầng sinh bản lục bì gồm nhiều hàng tế bào hình chữ nhật sắp xếp thẳng hàng với nhau. Libe – gỗ xếp thành vòng tròn khép kín quanh thân với libe ở phía ngoài (6) và gỗ ở phía trong (7). Trong cùng là mô mềm ruột với các tế bào to, hình đa giác sắp xếp lộn xộn, ở giữa tạo thành các khoảng gian bào (8) (Hình 3.5).



1. Biểu bì; 2. Mô dày; 3. Mô mềm vỏ; 4,5. Tầng sinh bản lục; 6. Libe; 7. Gỗ; 8. Mô mềm ruột

*Hình 3.5. Vi phẫu thân cây Ban hooker*



1. Bản; 2. Tầng sinh bản lục bì; 3. Mô mềm vỏ; 4. Libe; 5. Gỗ

*Hình 3.6. Vi phẫu rễ cây Ban hooker*

### 3.1.3.3. Đặc điểm vi phẫu rễ

Vi phẫu rễ có cấu tạo hình tròn hay gần tròn. Ngoài cùng là lớp bản (1) cấu tạo bởi khoảng 5 lớp tế bào hình chữ nhật xếp thẳng hàng nhau. Ngay sát lớp bản là tầng phát sinh bản lục bì gồm 1 hàng tế bào (2). Mô mềm vỏ cấu tạo bởi nhiều lớp tế bào thành mỏng, hình đa giác, sắp xếp lộn xộn với nhau (3). Bó libe gỗ tạo thành vòng tròn khép kín gồm libe ở phía ngoài (4), gỗ ở phía trong và hóa gỗ hết đến tận trong ruột (5); (Hình 3.6).

### 3.1.4. Đặc điểm bột cây Ban hooker

#### 3.1.4.1. Đặc điểm bột lá

Bột màu nâu nhạt, soi trên kính hiển vi thấy các đặc điểm sau (Hình 3.7): mảnh biểu bì mang lỗ khí (1); mảnh biểu bì trên phiến lá (2,3); mạch vòng (4,5); mảnh mô giậu (6).



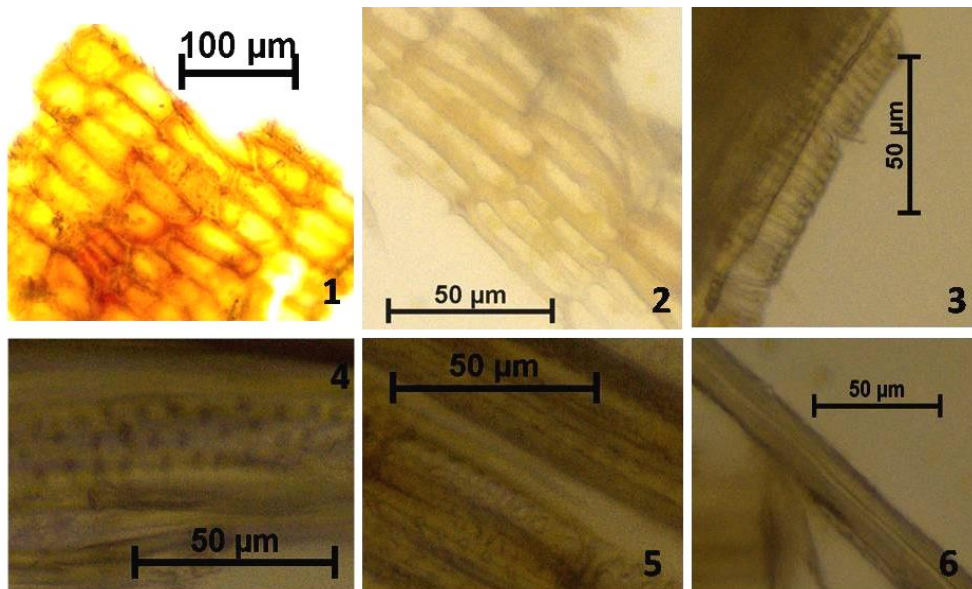


1- Lỗ khí; 2- Mảnh biểu bì; 3- Mảnh mô mềm; 4- Bó mạch;  
5- Mạch xoắn; 6- Mảnh mô giậu

Hình 3.7. Đặc điểm bột lá cây *Ban hooker*

#### 3.1.4.2. Đặc điểm bột thân

Bột màu trắng ngà, không vị, soi dưới kính hiển vi (Hình 3.8) thấy: mảnh bản gồm các tế bào hình chữ nhật xếp thẳng hàng nhau (1,2); sợi gỗ (6); mảnh mạch vòng (3) và nhiều mạch điểm (4,5).

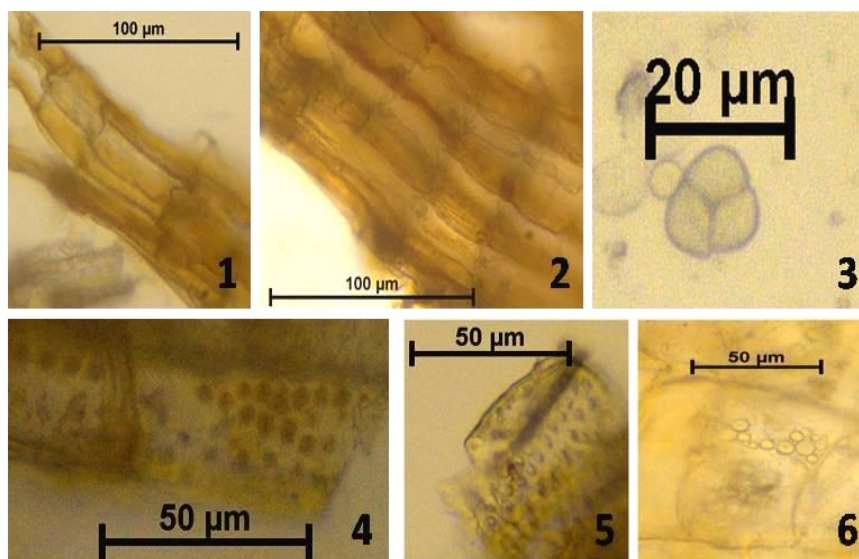


1,2. Mảnh bản; 3. Mạch vòng; 4,5. Mạch điểm; 6. Sợi gỗ

Hình 3.8. Đặc điểm bột thân cây *Ban hooker*

### 3.1.4.3. Đặc điểm bột rễ

Bột màu vàng nâu, không vị, soi trên kính hiển vi (Hình 3.9) thấy có các đặc điểm sau: mảnh bần gồm các tế bào hình chữ nhật (1,2); mảnh mô mềm cấu tạo bởi các tế bào hình nhiều cạnh, thành mỏng, bên trong có chứa các hạt tinh bột đơn và hạt tinh bột kép 3 (3, 6); mảnh mạch điểm (4,5).



1,2. Mảnh bần; 3. Tinh bột; 4,5. Mảnh mạch điểm; 6. Mảnh mô mềm chứa tinh bột

Hình 3.9. Đặc điểm bột rễ cây *Ban hooker*

## 3.2. THÀNH PHẦN HÓA HỌC

### 3.2.1. Định tính các nhóm hợp chất hữu cơ

Định tính sự có mặt của các nhóm hợp chất hữu cơ trong phần trên mặt đất (thân và lá) của cây *Ban hooker* bằng các phản ứng hóa học với các thuốc thử đặc trưng, kết quả được trình bày trong bảng 3.1.

Bảng 3.1. Kết quả định tính các nhóm chất chính trong phần trên mặt đất cây *Ban hooker*

TT	Nhóm chất	Phản ứng định tính	Kết quả	Kết luận
1	Alcaloid	Phản ứng Mayer	-	Không có
		Phản ứng Dragendorff	-	
		Phản ứng Bouchardat	-	

TT	Nhóm chất	Phản ứng định tính	Kết quả	Kết luận
2	Phytosterol	Phản ứng Liebermann-Burchard	+	Có ít
3	Flavonoid	Phản ứng Cyanidin	+++	Có
		Phản ứng với FeCl <sub>3</sub> 5%	+++	
4	Coumarin	Phản ứng đóng, mở vòng lacton	-	Không có
		Phản ứng với TT Diazo	-	
		Quan sát huỳnh quang	-	
5	Anthranoid	Phản ứng Borntraeger	-	Không có
		Phản ứng vi thăng hoa	-	
6	Saponin	Phản ứng tạo bọt	++	Có
		Phản ứng Salkowski	+	
		Phản ứng Liebermann – Burchardat	+	
		Phản ứng Rosenthaler	-	
7	Polysaccharid	Phản ứng với thuốc thử Lugol	++	Có
8	Acid hữu cơ	Phản ứng với bột Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	++	Có
9	Tanin	P/ư với dung dịch FeCl <sub>3</sub> 5%	+++	Có
		P/ư với dung dịch chì acetat 10%	+	
		P/ư với dung dịch gelatin 1%	+	
10	Acid amin	P/ư với thuốc thử Ninhydrin	++	Có

(-): Phản ứng âm tính

(+): Phản ứng dương tính nhẹ

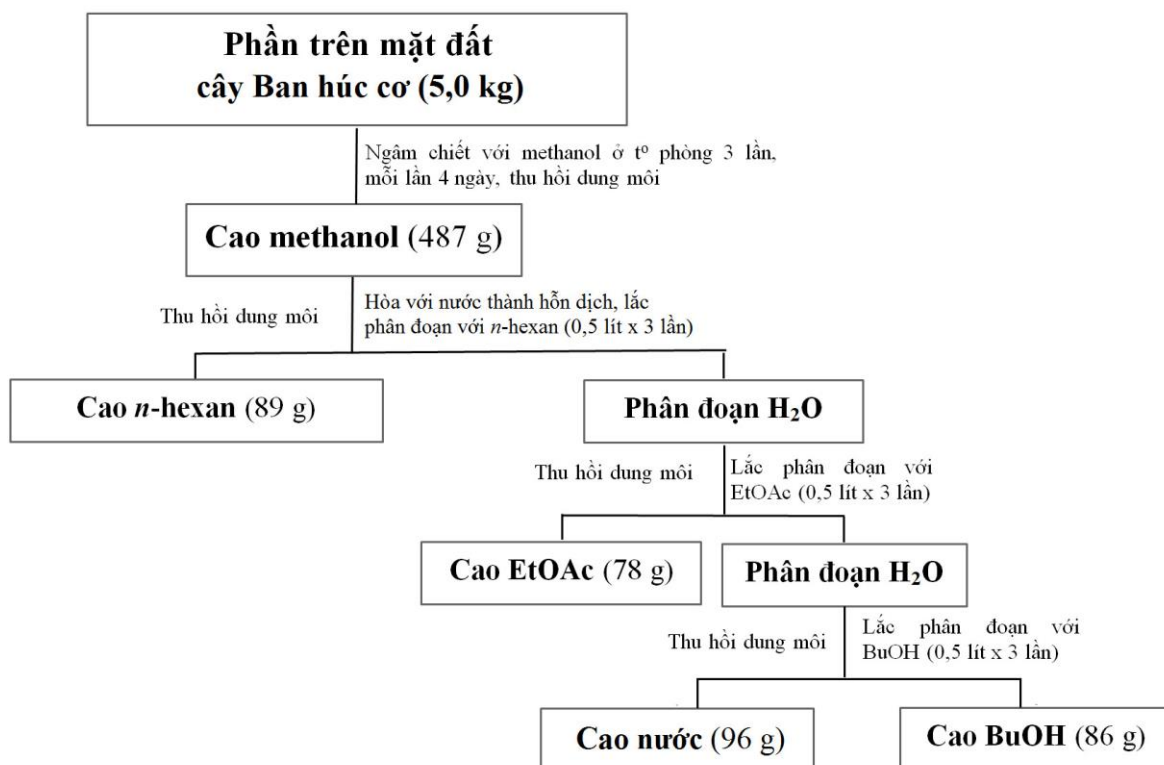
(++): Phản ứng dương tính rõ

(+++): Phản ứng dương tính rất rõ

Dựa vào kết quả định tính trong bảng 3.1, sơ bộ kết luận trong phần trên mặt đất cây Ban hooker có flavonoid, polysaccharid, acid hữu cơ, acid amin, các hợp chất phenolic (do cao chiết cho phản ứng dương tính với FeCl<sub>3</sub>) và tanin.

### 3.2.2. Chiết xuất và phân lập các hợp chất

Sơ đồ chiết xuất, phân đoạn các chất từ phần trên mặt đất cây Ban hooker đã được chuẩn bị mẫu tại Mục 2.1.1 được trình bày trong Hình 3.10



Hình 3.10. Sơ đồ chiết xuất, phân đoạn các chất từ cây Ban hooker

Cao phân đoạn BHH (89 g) được đưa qua cột sắc ký silica gel pha thường, sử dụng hệ dung môi *n*-hexan/EtOAc với tỷ lệ EtOAc tăng dần từ 0 đến 100% thu được 07 phân đoạn: PĐH1-PĐH7. Phân đoạn PĐH2 (7,2 g) được phân tách trên cột silica gel pha đảo RP-18 với hệ dung môi MeOH/H<sub>2</sub>O (2/1; 3/1; 4/1; 5/1) thu được 05 phân đoạn PĐH2.1-PĐH2.5. Phân đoạn PĐH2.3 được phân tách trên cột silica gel pha đảo RP-18 sử dụng hệ dung môi MeOH/H<sub>2</sub>O (3/1; 4/1) thu được các hợp chất **HH1** (8 mg), **HH2** (12 mg) và **HH4** (11 mg). Các hợp chất **HH31** (3 mg) và **HH32** (4 mg) được tinh chế từ phân đoạn PĐH2.1 trên cột silica gel pha đảo RP-18 với hệ dung môi MeOH/H<sub>2</sub>O (2/1; 3/1).

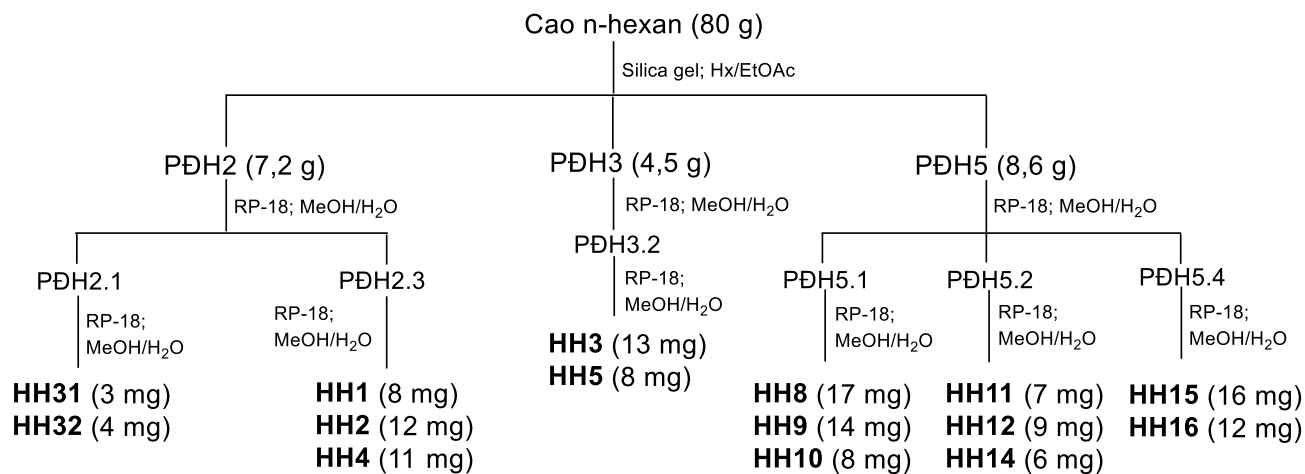
Phân đoạn PĐH3 (4,5 g) được đưa lên cột silica gel pha đảo RP-18 với hệ dung môi MeOH/H<sub>2</sub>O (2/1; 3/1; 4/1) thu được 03 phân đoạn PĐH3.1-PĐH3.3. Các hợp chất **HH3** (13 mg) và **HH5** (8 mg) được phân lập từ phân đoạn PĐH3.2 sau khi đưa qua cột silica gel pha đảo RP-18 sử dụng hệ dung môi MeOH/H<sub>2</sub>O (3/1; 4/1).

Phân đoạn PĐH5 (8,6 g) được phân đoạn trên cột silica gel pha đảo RP-18 với hệ dung môi MeOH/H<sub>2</sub>O (1/2; 1/1; 2/1; 3/1) thu được 06 phân đoạn PĐH5.1-

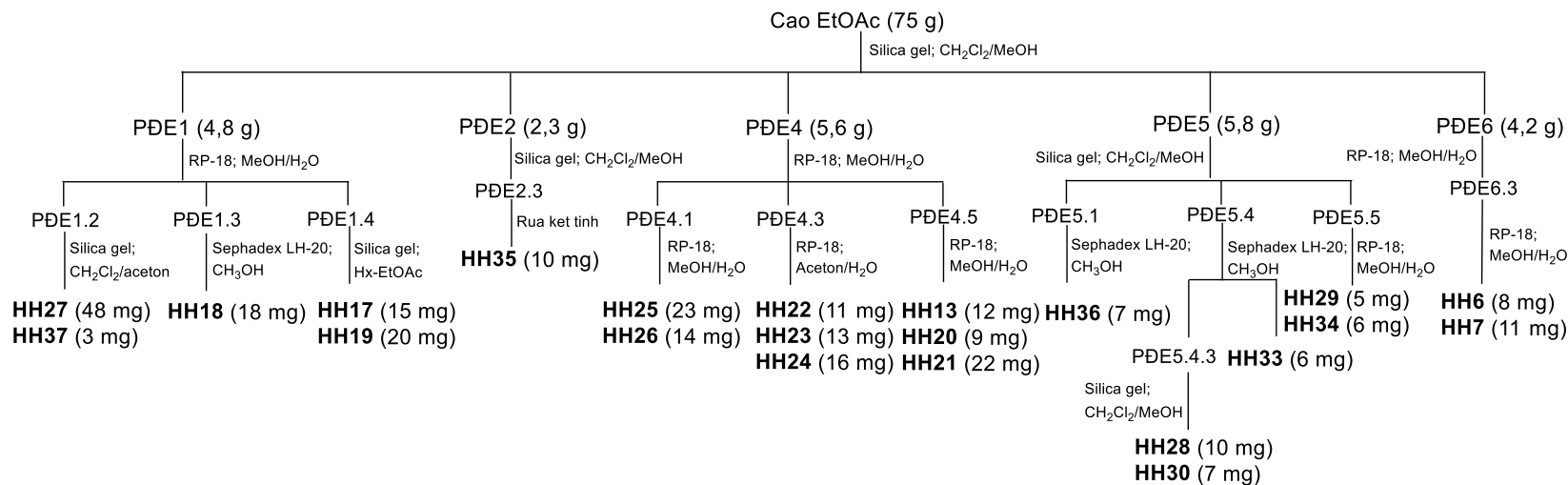


PĐH5.6. Phân đoạn PĐH5.1 được tinh chế trên cột silica gel pha đảo RP-18 với dung môi pha động MeOH/H<sub>2</sub>O (1/2; 1/1) thu được các hợp chất **HH8** (17 mg), **HH9** (14 mg) và **HH10** (8 mg). Các hợp chất **HH11** (7 mg), **HH12** (9 mg) và **HH14** (6 mg) được phân lập từ phân đoạn PĐH5.2 sau khi đưa qua cột silica gel pha đảo RP-18 rửa giải với hệ dung môi MeOH/H<sub>2</sub>O (1/1; 2/1). Cuối cùng, 02 hợp chất **HH15** (16 mg) và **HH16** (12 mg) được tinh chế từ phân đoạn PĐH5.4 sau khi đưa qua cột silica gel pha đảo RP-18 với dung môi pha động MeOH/H<sub>2</sub>O (2/1; 3/1).

Sơ đồ phân lập các chất từ cao phân đoạn BHH được trình bày trong Hình 3.11.



Hình 3.11. Sơ đồ phân lập các chất từ phân đoạn n-hexan cây *Ban hooker*



Hình 3.12. Sơ đồ phân lập các hợp chất từ phân đoạn ethyl acetat cây *Ban hooker*

Cao BHE (78 g) được đưa qua cột sắc ký silica gel pha thường, rửa giải bằng hệ dung môi  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  với tỷ lệ methanol tăng dần từ 0 đến 100% thu được 09 phân đoạn: PĐE1-PĐE9. Phân đoạn PĐE6 (4,2 g) được đưa qua cột silica gel pha đảo RP-18 với hệ dung môi  $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  (1/2; 1/1; 2/1) thu được 03 phân đoạn PĐE6.1-PĐE6.3. Các hợp chất **HH6** (8 mg) và **HH7** (11 mg) được tinh chế từ phân đoạn PĐE6.3 trên cột silica gel pha đảo RP-18 với hệ dung môi  $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  (1/1; 2/1).

Phân đoạn PĐE1 (4,8 g) tiếp tục được phân tách bằng cột silica gel pha đảo RP-18 rửa giải gradient với hệ dung môi  $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  (1/2; 1/1; 2/1) thu được 05 phân đoạn (PĐE1.1-PĐE1.5). **HH17** (15 mg) và **HH19** (20 mg) được tinh sạch từ phân đoạn PĐE1.4 sử dụng cột silica gel pha thường với hệ dung môi rửa giải *n*-hexan/ethyl acetat (2/1; 1/1; 1/2). Hợp chất **HH18** (18 mg) thu được từ phân đoạn PĐE1.3 sau khi đưa qua cột Sephadex LH-20 sử dụng dung môi  $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  (1/1). Phân đoạn PĐE1.2 được đưa lên cột silica gel pha thường rửa giải bằng pha động  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{aceton}$  (5/1; v/v) thu được **HH27** (48 mg) và **HH37** (3 mg).

Phân đoạn PĐE4 (5,6 g) được phân tách trên cột silica gel pha đảo RP-18 với dung môi gradient  $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  (1/3; 1/2; 1/1; 2/1) thu được 06 phân đoạn (PĐE4.1-PĐE4.6). Phân đoạn PĐE4.5 được làm sạch trên cột silica gel pha đảo RP-18 sử dụng hệ dung môi  $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  (1/1; 2/1) thu được **HH13** (12 mg), **HH20** (9 mg) và chất số **HH21** (22 mg). Các hợp chất **HH22** (11 mg), **HH23** (13 mg) và **HH24** (16 mg) thu được từ phân đoạn PĐE4.3 khi đưa lên cột silica gel pha đảo RP-18 với dung môi  $\text{aceton}/\text{H}_2\text{O}$  (1/2; 1/1). Phân đoạn PĐ4.1 được tinh chế trên cột silica gel pha đảo RP-18 sử dụng dung môi  $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  (1/2) thu được **HH25** (23 mg) và **HH26** (14 mg).

Phân đoạn PĐE5 (5,8 g) được đưa qua cột silica gel sử dụng hệ dung môi  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  (5/1; 3/1; 1/1) làm pha động thu được 06 phân đoạn (PĐE5.1-PĐE5.6). Phân đoạn PĐE5.5 được phân lập trên cột silica gel pha đảo RP-18 với hệ dung môi  $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  (1/3; 1/2; 1/1) thu được **HH29** (5 mg) và **HH34** (6 mg). Phân đoạn PĐE5.4 được đưa qua cột Sephadex LH-20 rửa giải bằng  $\text{MeOH}$  thu được chất số **HH33** (6 mg) và phân đoạn PĐE5.4.3. Các hợp chất **HH28** (10 mg) và **HH30** (7 mg) được phân tách từ phân đoạn PĐE5.4.3 bằng cột silica gel pha thường với hệ dung môi  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  (5/1; 2/1; 1/1). **HH36** (7 mg) được tinh chế từ phân đoạn PĐE5.1 sau khi đưa qua cột Sephadex LH-20 với dung môi rửa giải  $\text{MeOH}$ .

Phân đoạn PĐE2 (2,3 g) được phân tách bằng cột silica gel rửa giải bằng hệ dung môi  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  (15/1; 10/1; 6/1) thu được 05 phân đoạn (PĐE2.1-PĐE2.5).

Rửa kết tinh phân đoạn PĐE2.3 thu được **HH35** (10 mg). Sơ đồ phân lập các chất từ phân đoạn BHE được trình bày trong Hình 3.12.

### 3.2.3. Xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất phân lập từ phần trên mặt đất cây Ban hooker

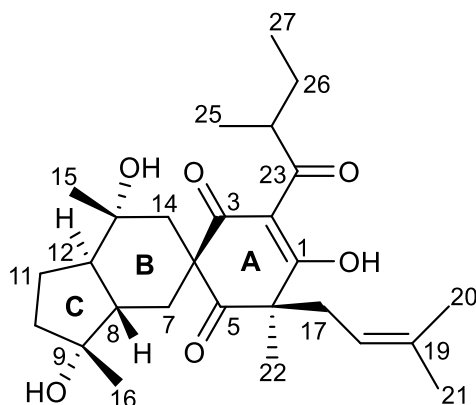
#### 3.2.3.1. Hợp chất HH1:

Bột màu trắng ngà, độ tinh khiết 88% (tính theo diện tích pic HPLC, UV 210 nm). Phổ ESI-MS ( $m/z$ ) 459  $[M-H]^-$ . Phổ  $^1H$ -NMR ( $CDCl_3$ ; 600 MHz) và phổ  $^{13}C$ -NMR ( $CDCl_3$ ; 125 MHz): xem bảng 3.2.

Bảng 3.2. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất **HH1**

Vị trí C	* $\delta_C$	$\delta_C^{a,b}$	Nhóm carbon	$\delta_H^{a,c}$ (độ bội, $J = Hz$ )
1	199,4	199,6	C	-
2	112,4	112,6	C	-
3	196,4	196,6	C	-
4	66,5	66,6	C	-
5	207,9	207,7	C	-
6	56,4	56,6	C	-
7	23,2	23,4	CH <sub>2</sub>	1,92 (t, 12,6) 1,79 (m)
8	47,8	48,0	CH	1,64 (m)
9	79,3	79,4	C	-
10	39,5	39,8	CH <sub>2</sub>	1,78 (m)
11	21,6	21,7	CH <sub>2</sub>	1,35 (m) 1,76 (m)
12	52,0	52,2	CH	1,75 (m)
13	73,4	73,6	C	-
14	51,1	51,2	CH <sub>2</sub>	1,45 (m) 2,39 (dd, 1,8; 12,6)
15	20,3	20,6	CH <sub>3</sub>	0,98 (s)
16	26,7	26,9	CH <sub>3</sub>	1,42 (s)
17	40,4	40,6	CH <sub>2</sub>	2,40 (dd, 7,2; 13,2) 2,68 (dd, 7,2; 13,2)
18	117,1	117,3	CH	4,57 (t, 7,2)
19	137,3	137,5	C	-
20	17,5	17,7	CH <sub>3</sub>	1,40 (s)
21	25,8	26,0	CH <sub>3</sub>	1,50 (s)
22	22,4	22,6	CH <sub>3</sub>	1,51 (s)
23	205,1	205,3	C	-
24	41,9	42,1	CH	3,18 (m)
25	19,5	19,6	CH <sub>3</sub>	1,24 (d, 7,2)
26	25,3	25,5	CH <sub>2</sub>	1,78 (m)
27	12,3	13,0	CH <sub>3</sub>	0,85 (t, 7,8)

\* $\delta_C$  của chipericumun D đo trong  $CDCl_3$  [26]; <sup>a</sup>Đo trong  $CDCl_3$ , <sup>b</sup>125 MHz, <sup>c</sup>600 MHz.



Hình 3.13. Cấu trúc hóa học của hợp chất **HH1**

Hợp chất **HH1** thu được dưới dạng bột màu trắng. Phổ  $^1\text{H-NMR}$  của **HH1** xuất hiện tín hiệu của 01 proton olefin ở  $\delta_{\text{H}}$  4,57 (1H, t,  $J = 7,2$  Hz), 07 nhóm methyl trong đó có 05 nhóm xuất hiện dưới dạng singlet ở  $\delta_{\text{H}}$  0,98; 1,40; 1,42; 1,50; 1,51, 01 nhóm dưới dạng doublet với hằng số ghép cặp  $J = 7,2$  Hz ở  $\delta_{\text{H}}$  1,24, 01 nhóm dưới dạng triplet ở  $\delta_{\text{H}}$  0,85 (1H, t,  $J = 7,8$  Hz). Phổ  $^{13}\text{C-NMR}$  của **HH1** cho biết tín hiệu của 27 carbon bao gồm 04 carbon ở trường thấp ( $\delta_{\text{C}}$  196,6; 199,6; 205,3; 207,7), 03 carbon thuộc vùng của liên kết đôi C=C ( $\delta_{\text{C}}$  112,6; 117,3; 137,5), 02 nhóm carbon liên kết với ôxy ở  $\delta_{\text{C}}$  73,6; 79,4. Dựa vào các dữ liệu phổ NMR của **HH1** và so sánh với đặc điểm cấu trúc của các hợp chất đã được phân lập từ chi *Hypericum* xác định, **HH1** là 01 hợp chất phloroglucinol mang 03 vòng 6,6,5, trong đó vòng 05 cạnh (Vòng C) và vòng 06 cạnh (Vòng B) gắn với nhau bởi liên kết C<sub>8</sub>-C<sub>12</sub>, trong khi vòng 6 cạnh còn lại (Vòng A) liên kết với vòng B bởi spiro carbon C-4 [1], [2]. Các tín hiệu của khung phloroglucinol (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) trong cấu trúc của **HH1** bao gồm 01 nhóm keton ( $\delta_{\text{C}}$  207,7; C-5), 01 nhóm keton liên hợp ( $\delta_{\text{C}}$  196,6; C-3), một nhóm enol ( $\delta_{\text{C}}$  199,6; C-1,  $\delta_{\text{C}}$  112,6; C-2), 02 carbon không liên kết với hydro ( $\delta_{\text{C}}$  66,6; C-4,  $\delta_{\text{C}}$  56,6; C-6). Ngoài khung phloroglucinol, sự xuất hiện của 01 nhóm monotерpen (với các tín hiệu C<sub>7</sub>-C<sub>16</sub>), 01 nhóm 2-methylbutanoyl [ $\delta_{\text{C}}$  205,3 (C-23);  $\delta_{\text{C}}$  42,1 (C-24);  $\delta_{\text{H}}$  1,24 (d,  $J = 7,2$  Hz; H-25),  $\delta_{\text{C}}$  19,6 (C-25);  $\delta_{\text{C}}$  25,5 (C-26);  $\delta_{\text{H}}$  0,85 (t,  $J = 7,8$  Hz; H-27),  $\delta_{\text{C}}$  13,0 (C-27)], 01 nhóm prenyl [ $\delta_{\text{C}}$  40,6 (C-17);  $\delta_{\text{H}}$  4,57 (t,  $J = 7,2$  Hz; H-18),  $\delta_{\text{C}}$  117,3 (C-18);  $\delta_{\text{C}}$  137,5 (C-19);  $\delta_{\text{H}}$  1,40 (s; H-20),  $\delta_{\text{C}}$  17,7 (C-20);  $\delta_{\text{H}}$  1,51 (s; H-21),  $\delta_{\text{C}}$  26,0 (C-21)], 01 nhóm methyl [ $\delta_{\text{H}}$  1,51 (s; H-21),  $\delta_{\text{C}}$  26,0 (C-21)] trong cấu trúc của **HH1** cũng được thể hiện trên phổ NMR

[52], [26]. Công thức phân tử của **HH1** được xác định là  $C_{27}H_{40}O_6$  dựa trên pic ion  $m/z$  459  $[M-H]^-$  trên phổ ESI-MS kết hợp với các dữ liệu phổ  $^{13}C$ -NMR. Các đặc điểm cấu trúc đã phân tích của **HH1** cho thấy đây có thể là hợp chất chipericumín D, một phloroglucinol đã được phân lập từ loài *Hypericum monogynum* và có công thức phân tử  $C_{27}H_{40}O_6$  [26]. So sánh phổ NMR của **HH1** và chipericumín D thấy hoàn toàn trùng khớp (Bảng 3.3) cho phép khẳng định **HH1** là hợp chất **chipericumín D** [26].

### 3.2.3.2. Hợp chất **HH2**:

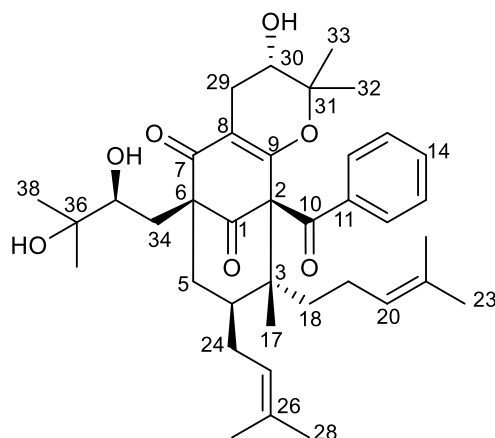
Bột màu trắng ngà, độ tinh khiết 92% (tính theo diện tích pic HPLC, UV 210 nm). Phổ ESI-MS ( $m/z$ ) 643  $[M+Na]^+$ . Phổ  $^1H$ -NMR ( $CDCl_3$ ; 600 MHz) và phổ  $^{13}C$ -NMR ( $CDCl_3$ ; 125 MHz): xem bảng 3.3.

Bảng 3.3. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất **HH2**

Vị trí C	* $\delta_C$	$\delta_C^{a,b}$	Nhóm carbon	$\delta_H^{a,c}$ (độ bội, $J = Hz$ )
1	210,2	210,2	C	-
2	73,6	73,6	C	-
3	50,2	50,2	C	-
4	44,3	44,3	CH	1,83 (m)
5	42,5	42,4	CH <sub>2</sub>	1,44 (t, 13,2) 1,99 (dd, 3,6; 13,2)
6	63,8	63,8	C	-
7	194,8	194,8	C	-
8	111,8	111,7	C	-
9	166,3	166,3	C	-
10	194,0	194,0	C	-
11	137,9	137,8	C	-
12	128,3	128,3	CH	7,67 (d, 7,2)
13	128,2	128,2	CH	7,30 (t, 7,2)
14	132,2	132,2	CH	7,42 (t, 7,2)
15	128,2	128,2	CH	7,30 (t, 7,2)
16	128,3	128,3	CH	7,67 (d, 7,2)
17	13,6	13,2	CH <sub>3</sub>	1,22 (s)
18	38,4	38,4	CH <sub>2</sub>	1,40 (t, 13,2)

Vị trí C	* $\delta_C$	$\delta_C^{a,b}$	Nhóm carbon	$\delta_H^{a,c}$ (độ bội, $J = \text{Hz}$ )
				2,10 (m)
19	26,2	26,0	CH <sub>2</sub>	2,01 (m) 2,26 (m)
20	124,8	124,8	CH	5,03 (t, 7,2)
21	131,5	131,6	C	-
22	25,8	25,8	CH <sub>3</sub>	1,67 (s)
23	18,1	18,1	CH <sub>3</sub>	1,63 (s)
24	28,1	28,1	CH <sub>2</sub>	1,74 (m) 2,18 (dd, 3,6; 13,2)
25	122,5	122,0	CH	4,95 (t, 7,2)
26	133,7	133,8	C	-
27	25,9	25,9	CH <sub>3</sub>	1,68 (s)
28	18,0	18,0	CH <sub>3</sub>	1,56 (s)
29	25,4	25,7	CH <sub>2</sub>	2,26 (m) 2,59 (t, 4,2)
30	68,0	68,0	CH	3,57 (m)
31	82,6	82,5	C	-
32	25,3	25,3	CH <sub>3</sub>	1,19 (s)
33	24,3	24,3	CH <sub>3</sub>	0,53 (s)
34	32,8	32,8	CH <sub>2</sub>	1,67 (m) 2,09 (m)
35	74,9	74,9	CH	3,54 (m)
36	73,1	73,2	C	-
37	23,9	23,8	CH <sub>3</sub>	1,24 (s)
38	22,3	22,4	CH <sub>3</sub>	1,21 (s)

\* $\delta_C$  của uralion D đo trong CDCl<sub>3</sub> [56]; <sup>a</sup>Đo trong CDCl<sub>3</sub>, <sup>b</sup>125 MHz, <sup>c</sup>600 MHz.



Hình 3.14. Cấu trúc hóa học của hợp chất **HH2**

Hợp chất **HH2** phân lập được dưới dạng bột màu trắng và cũng được xác định là một hợp chất PPAPs tương tự như hợp chất **HH1**. Phổ  $^1\text{H-NMR}$  cho biết sự có mặt của 01 nhóm thế phenyl bao gồm các tín hiệu ở  $\delta_{\text{H}}$  7,67 (2H, d,  $J = 7,2$  Hz); 7,30 (2H, t,  $J = 7,2$  Hz); 7,42 (1H, t,  $J = 7,2$  Hz), 02 proton olefin ở  $\delta_{\text{H}}$  5,03 (1H, t,  $J = 7,2$  Hz); 4,95 (1H, t,  $J = 7,2$  Hz), 02 nhóm oxymethin ở  $\delta_{\text{H}}$  3,54 và 3,57, 09 nhóm  $\text{CH}_3$  xuất hiện dưới dạng đơn bội ở  $\delta_{\text{H}}$  0,53; 1,19; 1,21; 1,22; 1,24; 1,56; 1,63; 1,67; 1,68. Phổ  $^{13}\text{C-NMR}$  của **HH2** xuất hiện tín hiệu của 01 nhóm acylphloroglucinol với khung 1,3-diketo bị enol hóa  $\delta_{\text{C}}$  194,8 (C-7); 111,7 (C-8); 166,3 (C-9) [1], [2], 02 nhóm carbonyl ở  $\delta_{\text{C}}$  210,2 (C-1); 194,0 (C-10), 01 nhóm phenyl  $\delta_{\text{C}}$  137,8 (C-11); 128,3 (C-12 và C-16); 128,2 (C-13 và C-15); 132,2 (C-14), 04 carbon liên kết với oxy ở  $\delta_{\text{C}}$  68,0 (C-30); 82,5 (C-31); 74,9 (C-35); 73,2 (C-36). So sánh đặc điểm phổ của **HH2** với các hợp chất PPAPs đã được phân lập từ chi *Hypericum* thấy rằng, **HH2** giống với hợp chất uralion D [1], [56], (Bảng 3.4), một hợp chất được tìm thấy trong loài *H. uralum*. Công thức phân tử của **HH2** được xác định là  $\text{C}_{38}\text{H}_{52}\text{O}_7$ , trùng với công thức phân tử của uralion D dựa vào pic ion  $m/z$  643  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  trên phổ ESI-MS và các dữ liệu phổ NMR. Do đó, **HH2** được xác định là hợp chất **uralion D**.

### 3.2.3.3. Hợp chất **HH3**:

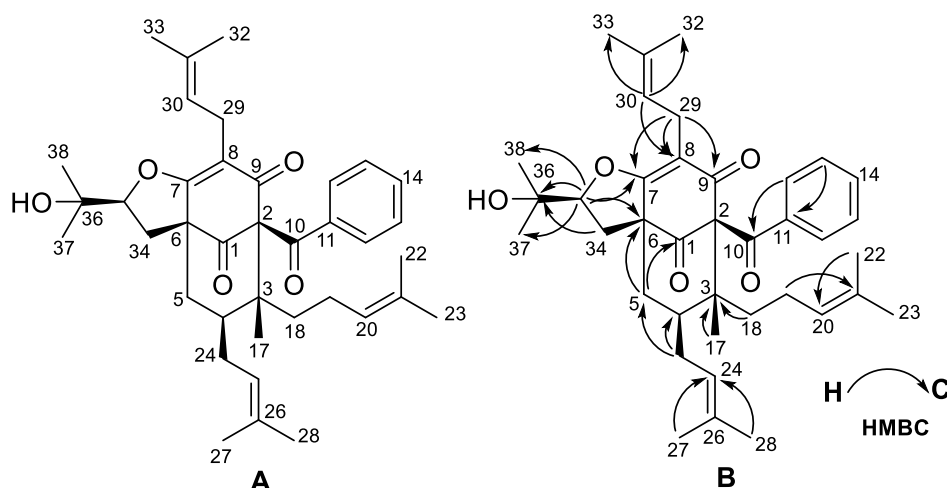
Bột màu trắng ngà, độ tinh khiết 90% (tính theo diện tích pic HPLC, UV 210 nm). Phổ ESI-MS ( $m/z$ ) 585  $[\text{M}-\text{H}]^-$ . Phổ  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 600 MHz) và phổ  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 125 MHz): xem bảng 3.4.



Bảng 3.4. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất HH3

Vị trí C	* $\delta_C$	$\delta_C^{a,b}$	Nhóm carbon	$\delta_H^{a,c}$ (độ bội, $J = \text{Hz}$ )
1	206,2	205,0	C	-
2	80,2	79,8	C	-
3	50,1	50,0	C	-
4	43,8	44,6	CH	1,83 (m)
5	39,4	38,9	CH <sub>2</sub>	1,62 (m) 2,10 (dd, 3,6; 13,2)
6	60,9	60,1	C	-
7	174,3	172,5	C	-
8	116,0	116,2	C	-
9	193,8	193,4	C	-
10	194,9	194,0	C	-
11	138,0	137,1	C	-
12	128,9	128,3	CH	7,45 (d, 7,2)
13	128,6	128,0	CH	7,22 (t, 7,2)
14	132,7	132,1	CH	7,37 (t, 7,2)
15	128,6	128,0	CH	7,22 (t, 7,2)
16	128,9	128,3	CH	7,45 (d, 7,2)
17	14,7	14,0	CH <sub>3</sub>	1,19 (s)
18	37,3	36,7	CH <sub>2</sub>	1,45 (m) 2,20 (m)
19	25,8	25,8	CH <sub>2</sub>	2,00 (m) 2,29 (m)
20	125,7	124,8	CH	5,08 (m)
21	131,4	131,3	C	-
22	25,9	25,7	CH <sub>3</sub>	1,65 (s)
23	17,8	18,2	CH <sub>3</sub>	1,68 (s)
24	27,9	27,4	CH <sub>2</sub>	1,81 (m); 2,20 (m)
25	123,4	122,4	CH	4,99 (t, 7,2)
26	133,8	133,8	C	-
27	26,0	25,9	CH <sub>3</sub>	1,71 (s)
28	18,0	18,0	CH <sub>3</sub>	1,67 (s)
29	22,8	22,3	CH <sub>2</sub>	3,05 (dd, 7,8; 14,4) 3,16 (dd, 7,8; 14,4)
30	122,1	120,8	CH	5,09 (m)
31	132,5	132,6	C	-
32	25,8	25,8	CH <sub>3</sub>	1,65 (s)
33	17,9	17,8	CH <sub>3</sub>	1,63 (s)
34	30,0	30,5	CH <sub>2</sub>	1,85 (m) 2,69 (dd, 10,2; 13,2)
35	91,6	90,3	CH	4,62 (dd, 6,0; 10,2)
36	70,7	71,2	C	-
37	26,2	26,8	CH <sub>3</sub>	1,39 (s)
38	25,7	24,1	CH <sub>3</sub>	1,23 (s)

\* $\delta_C$  của uraloidin A đo trong acetone- $d_6$  [172]; <sup>a</sup>Đo trong  $CDCl_3$ , <sup>b</sup>125 MHz, <sup>c</sup>600 MHz.



Hình 3.15. Cấu trúc hóa học (A) và các tương tác HMBC chính (B) của hợp chất **HH3**

Hợp chất PPAPs **HH3** phân lập được dưới dạng bột màu trắng. So sánh phổ NMR của **HH3** và **HH2** (Bảng 3.5 và 3.4) cho biết 02 hợp chất này có cấu trúc gần giống nhau. **HH3** được xác định là có 01 nhóm prenyl liên kết vào vị trí C-8 và C-9 tồn tại dưới dạng keto thay vì sự xuất hiện của khung 2,2-dimethyl-3,4-dihydro-2H-pyran-3-ol đính vào liên kết C<sub>8</sub>-C<sub>9</sub> như trong **HH2**. Điều này được chứng minh dựa trên các tương tác của H-29 ( $\delta_{\text{H}}$  3,05; 3,16) với C-8 ( $\delta_{\text{C}}$  116,2), C-9 ( $\delta_{\text{C}}$  193,2); tương tác của H-30 ( $\delta_{\text{H}}$  5,09) với C-8, C-32 ( $\delta_{\text{C}}$  25,8), C-33 ( $\delta_{\text{C}}$  17,8). Phổ HMBC xuất hiện tương tác của H-35 ( $\delta_{\text{H}}$  4,62) với C-6 ( $\delta_{\text{C}}$  60,1), C-7 ( $\delta_{\text{C}}$  172,5), C-36 ( $\delta_{\text{C}}$  71,2), C-37 ( $\delta_{\text{C}}$  26,8), C-38 ( $\delta_{\text{C}}$  24,1); tương tác của H-34 ( $\delta_{\text{H}}$  1,85; 2,69) với C-6, C-7 cho biết sự có mặt của nhóm 2-(tetrahydrofuran-2-yl)propan-2-ol liên kết với khung phloroglucinol ở vị trí C<sub>6</sub>-C<sub>7</sub> trong **HH3** thay vì C-7 tồn tại dưới dạng keto và nhóm 2-methylpentan-2,3-diol được đính vào vị trí C-6 như trong **HH2** (Hình 3.14). Phổ ESI-MS xuất hiện pic ion 585 [M-H]<sup>-</sup> cho biết công thức phân tử của **HH3** là C<sub>38</sub>H<sub>50</sub>O<sub>5</sub>. Phân tích các dữ liệu phổ 1D, 2D-NMR của **HH3**, so sánh với các tài liệu đã được công bố của hợp chất uraloidin A [57], [172], cho phép khẳng định hợp chất **HH3** là **uraloidin A**. Như đã trình bày ở phần Tổng quan, sự đa dạng và mới lạ trong cấu trúc của các hợp chất phloroglucinol từ chi *Hypericum* được tạo thành từ phản ứng và liên kết của nhóm prenyl với các nhóm keton [1], [2]. Khung 2,2-dimethyl-3,4-dihydro-2H-pyran-3-ol đính vào vị trí C<sub>8</sub>-C<sub>9</sub> trong **HH2** có thể được hình thành thông qua quá trình epoxy hóa ở vị trí C<sub>30</sub>-C<sub>31</sub> của khung prenyl

gắn vào C-8 của **HH3**. Sau đó, nhóm keton C-9 của **HH3** sẽ tấn công vào vị trí C-31 để tạo nên nhóm 2,2-dimethyl-3,4-dihydro-2H-pyran-3-ol của **HH2** [1]. Tương tự, vòng tetrahydrofuran liên kết ở vị trí C<sub>6</sub>-C<sub>7</sub> của **HH3** được hình thành từ sự đóng vòng nội phân tử của nhóm 2-methylpentan-2,3-diol với nhóm keton ở C-7 của **HH2**.

#### 3.2.3.4. Hợp chất **HH4**:

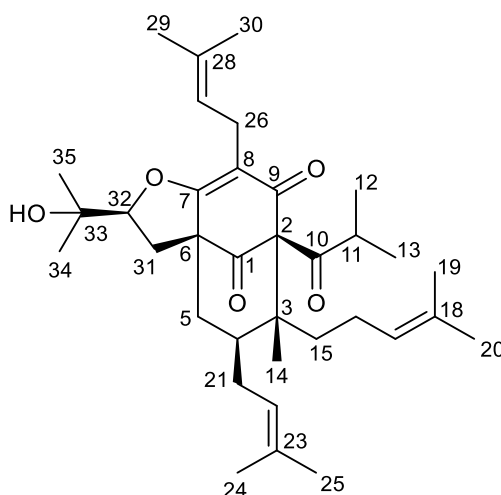
Bột màu trắng ngà, độ tinh khiết 85% (tính theo diện tích pic HPLC, UV 210 nm). Phổ ESI-MS ( $m/z$ ) 553 [M+H]<sup>+</sup>. Phổ <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>; 600 MHz) và phổ <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>; 125 MHz): xem bảng 3.5.

Bảng 3.5. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất **HH4**

Vị trí C	* $\delta_C$	$\delta_{C^{a,b}}$	Nhóm carbon	$\delta_{H^{a,c}}$ (độ bội, J = Hz)
1	204,5	204,7	C	-
2	83,2	83,4	C	-
3	48,2	48,4	C	-
4	43,3	43,4	CH	1,62 (m)
5	38,0	38,2	CH <sub>2</sub>	1,51 (t, 12,6) 2,01 (dd, 3,6; 13,2)
6	59,4	59,5	C	-
7	172,9	173,1	C	-
8	116,6	116,8	C	-
9	192,7	192,9	C	-
10	209,5	209,6	C	-
11	42,0	42,1	CH	1,98 (sept, 6,6)
12	20,4	20,5	CH <sub>3</sub>	1,09 (d, 6,6)
13	21,4	21,5	CH <sub>3</sub>	1,00 (d, 6,6)
14	13,4	13,6	CH <sub>3</sub>	1,04 (s)
15	36,3	36,5	CH <sub>2</sub>	1,32 (m) 2,06 (m)
16	25,2	25,3	CH <sub>2</sub>	1,93 (m) 2,15 (m)
17	124,7	124,9	CH	5,06 (m)
18	131,1	131,2	C	-
19	25,7	25,8	CH <sub>3</sub>	1,64 (s)
20	17,7	17,8	CH <sub>3</sub>	1,59 (s)
21	27,1	27,2	CH <sub>2</sub>	1,77 (m) 2,17 (m)
22	122,3	122,4	CH	4,94 (t, 7,2)
23	133,5	133,7	C	-
24	25,9	26,0	CH <sub>3</sub>	1,70 (s)
25	18,0	18,1	CH <sub>3</sub>	1,57 (s)

Vị trí C	* $\delta_C$	$\delta_C^{a,b}$	Nhóm carbon	$\delta_H^{a,c}$ (độ bội, $J = \text{Hz}$ )
26	22,1	22,3	CH <sub>2</sub>	3,01 (dd, 7,2; 13,8) 3,14 (dd, 7,2; 13,8)
27	121,2	121,3	CH	5,06 (m)
28	132,5	132,7	C	-
29	25,6	25,7	CH <sub>3</sub>	1,65 (s)
30	17,8	18,0	CH <sub>3</sub>	1,69 (s)
31	30,2	30,3	CH <sub>2</sub>	1,76 (m) 2,64 (dd, 10,8; 13,2)
32	90,1	90,2	CH	4,55 (dd, 5,4; 10,8)
33	70,8	71,0	C	-
34	26,9	27,0	CH <sub>3</sub>	1,37 (s)
35	24,0	24,2	CH <sub>3</sub>	1,21 (s)

\* $\delta_C$  của furohyperforin đo trong  $CDCl_3$  [173]; <sup>a</sup>Đo trong  $CDCl_3$ , <sup>b</sup>125 MHz, <sup>c</sup>600 MHz.



Hình 3.16. Cấu trúc hóa học của hợp chất **HH4**

Công thức phân tử của hợp chất PPAPs **HH4** được xác định là  $C_{35}H_{52}O_5$  thông qua pic ion  $m/z$  553  $[M+H]^+$  trên phổ ESI-MS và các dữ liệu phổ NMR. Các tín hiệu phổ NMR của **HH3** và **HH4** (Bảng 3.5 và 3.6) cho biết 02 hợp chất này có cấu trúc gần giống nhau. Điểm khác biệt duy nhất giữa hai hợp chất này là sự thay thế của nhóm benzoyl trong cấu trúc của **HH3** bằng nhóm 2-methylpropanoyl trong **HH4**. Điều này được chứng minh dựa vào sự xuất hiện tín hiệu của một nhóm methin dưới dạng septet ở  $\delta_H$  1,98 với hằng số ghép cặp  $J=6,6$  Hz, 02 nhóm methyl dưới dạng doublet ở  $\delta_H$  1,00 (1H, d,  $J=6,6$  Hz) và 1,09 (1H, d,  $J=6,6$  Hz) trên phổ NMR của **HH4** cùng với dữ liệu phổ khối. Từ những đặc điểm đã phân tích, so sánh phổ của **HH4** với furohyperforin trong tài liệu tham khảo [56], [173], cho phép khẳng định **HH4** là hợp chất **furohyperforin**.

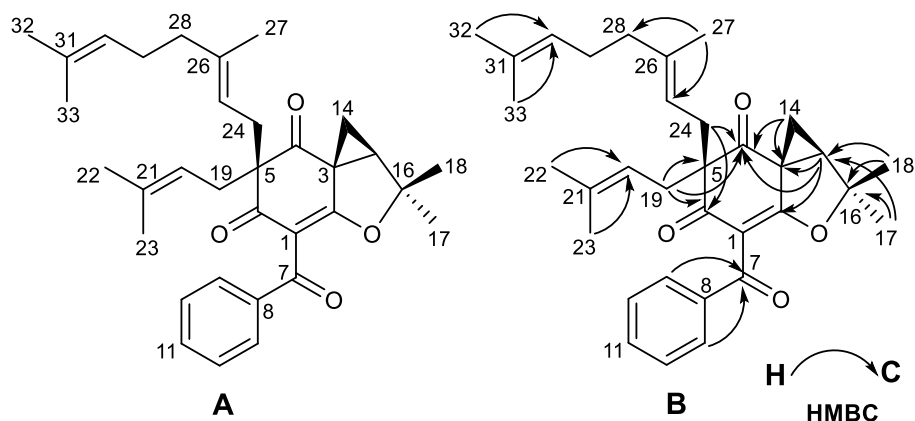
### 3.2.3.5. Hợp chất HH5:

Dạng keo không màu, độ tinh khiết 89% (tính theo diện tích pic HPLC, UV 210 nm). Phổ ESI-MS ( $m/z$ ) 523  $[M+Na]^+$ . Phổ  $^1H$ -NMR ( $CDCl_3$ ; 600 MHz) và phổ  $^{13}C$ -NMR ( $CDCl_3$ ; 125 MHz): xem bảng 3.6.

Bảng 3.6. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất HH5

Vị trí C	$^*\delta_C$	$\delta_C^{a,b}$	Nhóm carbon	$\delta_H^{a,c}$ (độ bội, $J = \text{Hz}$ )
1	117,9	118,0	C	-
2	175,7	172,9	C	-
3	43,0	41,7	C	-
4	207,8	206,9	C	-
5	66,1	65,1	C	-
6	199,3	196,8	C	-
7	193,7	191,9	C	-
8	138,6	137,6	C	-
9	130,3	129,4	CH	7,80 (d, 7,8)
10	129,7	128,4	CH	7,40 (t, 7,8)
11	134,9	133,3	CH	7,52 (t, 7,8)
12	129,7	128,4	CH	7,40 (t, 7,8)
13	130,3	129,4	CH	7,80 (d, 7,8)
14	29,4	27,6	CH <sub>2</sub>	1,72 (m)
15	39,7	38,2	CH	2,91 (dd, 7,8; 6,0)
16	93,9	91,3	C	-
17	28,4	28,2	CH <sub>3</sub>	1,37 (s)
18	23,2	23,4	CH <sub>3</sub>	1,39 (s)
19	38,2	38,0	CH <sub>2</sub>	2,63 (dd, 7,8; 13,2) 2,50 (dd, 7,8; 13,2)
20	119,8	118,9	CH	5,00 (t, 7,2)
21	136,9	135,6	C	-
22	26,4	26,1	CH <sub>3</sub>	1,70 (s)
23	18,1	17,9	CH <sub>3</sub>	1,54 (s)
24	39,5	38,4	CH <sub>2</sub>	2,73 (m) 2,68 (m)
25	119,1	118,1	CH	5,06 (m)
26	140,5	139,2	C	-
27	16,5	16,3	CH <sub>3</sub>	1,56 (s)
28	41,0	40,0	CH <sub>2</sub>	2,01 (br t, 7,2)
29	27,6	26,6	CH <sub>2</sub>	2,09 (m)
30	125,2	124,1	CH	5,07 (m)
31	132,5	131,7	C	-
32	26,0	25,7	CH <sub>3</sub>	1,66 (s)
33	17,9	17,7	CH <sub>3</sub>	1,59 (s)

$^*\delta_C$  của hypercohin K đo trong aceton- $d_6$  [174];  $^a$ Đo trong  $CDCl_3$ ,  $^b$ 125 MHz,  $^c$ 600 MHz.



Hình 3.17. Cấu trúc hóa học (A) và các tương tác HMBC chính (B) của hợp chất **HH5**

Hợp chất **HH5** phân lập được dưới dạng keo, không màu và cũng được xác định là một hợp chất phloroglucinol, nhóm hợp chất chính trong các loài thuộc chi *Hypericum* [4]. Phổ  $^1\text{H-NMR}$  của **HH5** xuất hiện tín hiệu của 01 gốc phenyl [ $\delta_{\text{H}}$  7,80 (2H, d,  $J = 7,8$  Hz); 7,40 (2H, t,  $J = 7,2$  Hz); 7,52 (1H, t,  $J = 7,2$  Hz)], 03 proton olefin ở  $\delta_{\text{H}}$  5,00 (1H, t,  $J = 7,2$  Hz); 5,06 (1H, m); 5,07 (1H, m), 07 nhóm methyl singlet ở  $\delta_{\text{H}}$  1,37; 1,39; 1,54; 1,56; 1,59; 1,66; 1,70. Phổ  $^{13}\text{C-NMR}$  kết hợp với phổ DEPT cho biết sự có mặt của 33 carbon bao gồm 07 carbon bậc 4 (hai tín hiệu carbon ở  $\delta_{\text{C}}$  41,7 và 65,1; một nhóm keton không liên hợp  $\delta_{\text{C}}$  206,9; một nhóm 1,3-diketon  $\delta_{\text{C}}$  196,8, 118,0, 172,9; một oxycarbon  $\delta_{\text{C}}$  91,3), 01 nhóm methin ( $\delta_{\text{C}}$  38,2), 01 nhóm methylen ( $\delta_{\text{C}}$  27,6), 02 nhóm methyl ( $\delta_{\text{C}}$  23,4 và 28,2), cùng với 22 carbon khác được xác định là các tín hiệu của 01 nhóm benzoyl, 01 nhóm prenyl và 01 nhóm geranyl. Cấu trúc hóa học của **HH5** được xác định dựa trên phổ 2D-NMR. Tương tác HMBC của H-19 ( $\delta_{\text{H}}$  2,57; 2,69) với carbon bậc 4 C-5 ( $\delta_{\text{C}}$  65,1), 02 nhóm carbonyl C-4 ( $\delta_{\text{C}}$  206,9), C-6 ( $\delta_{\text{C}}$  196,8), tương tác của H-14 ( $\delta_{\text{H}}$  1,72) với carbon bậc 4 C-3 ( $\delta_{\text{C}}$  41,7), C-2 ( $\delta_{\text{C}}$  172,9), C-4 chỉ ra liên kết C-4/C-5/C-6 và C-2/C-3/C-4 của khung phloroglucinol (Hình 3.17). Sự xuất hiện của nhóm 2,2-dimethyl-3-oxabicyclo[3.1.0]hexan gắn vào khung phloroglucinol ở liên kết C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub> được chứng minh dựa trên các tương tác HMBC của H-15 ( $\delta_{\text{H}}$  2,91) với C-16 ( $\delta_{\text{C}}$  91,3), C-3 ( $\delta_{\text{C}}$  41,7), C-2, C-4, tương tác HMBC của H-14 với C-2, C-3, C-4, tương tác HMBC của H-17 ( $\delta_{\text{H}}$  1,37) và H-18 ( $\delta_{\text{H}}$  1,39) với C-16, C-15 ( $\delta_{\text{C}}$  38,2) cũng như tương tác COSY của H-14 và H-15. Một nhóm prenyl và 01 nhóm geranyl được xác định là

cùng gắn vào vị trí C-5 của khung phloroglucinol dựa trên các tương tác HMBC của H-19 và H-24 ( $\delta_{\text{H}}$  2,68; 2,73) với C-4, C-5 và C-6. Như vậy, nhóm benzoyl còn lại được liên kết với vị trí C-1 của khung phloroglucinol. Phổ ESI-MS xuất hiện pic ion  $m/z$  501  $[\text{M}+\text{H}]^+$  và 523  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  kết hợp với các dữ liệu phổ NMR cho biết công thức phân tử của **HH5** là  $\text{C}_{33}\text{H}_{40}\text{O}_4$  ( $M=500$ ). Từ những đặc điểm phổ đã phân tích, so sánh dữ liệu phổ của **HH5** và phổ của hợp chất hypercohin K trong tài liệu tham khảo [174], xác định **HH5** là **hypercohin K**, một phloroglucinol mang vòng cyclopropan. Đặc điểm cấu trúc này hiếm gặp trong các hợp chất phloroglucinol đã được phân lập.

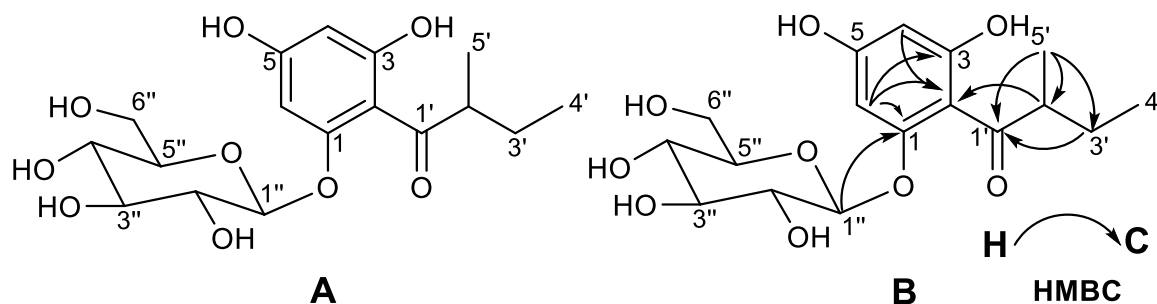
### 3.2.3.6. Hợp chất **HH6**:

Bột màu trắng ngà, độ tinh khiết 87% (tính theo diện tích pic HPLC, UV 210 nm). Phổ ESI-MS ( $m/z$ ) 395  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ . Phổ  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 500 MHz) và phổ  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 125 MHz): xem bảng 3.7.

Bảng 3.7. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất **HH6**

Vị trí C	* $\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{C}^{\text{a,b}}}$	Nhóm carbon	$\delta_{\text{H}^{\text{a,c}}}$ (độ bội, $J = \text{Hz}$ )
1	161,8	161,8	C	-
2	106,8	106,9	C	-
3	167,4	167,4	C	-
4	98,3	98,3	CH	5,98 (d, 2,5)
5	165,6	165,6	C	-
6	95,3	95,4	CH	6,21 (d, 2,0)
1'	211,8	211,8	C	-
2'	47,0	47,0	CH	3,92 (m)
3'	28,3	28,2	CH <sub>2</sub>	1,42 (m) 1,83 (m)
4'	12,0	12,0	CH <sub>3</sub>	0,91 (t, 7,5)
5'	16,8	16,8	CH <sub>3</sub>	1,15 (d, 7,0)
1''	101,7	101,7	CH	5,06 (d, 8,0)
2''	74,8	74,8	CH	3,54 (m)
3''	78,7	78,7	CH	3,49 (m)
4''	71,2	71,2	CH	3,41 (m)
5''	78,4	78,4	CH	3,42 (m)
6''	62,5	62,5	CH <sub>2</sub>	3,74 (dd, 5,5; 12,0) 3,95 (m)

\* $\delta_{\text{C}}$  của 1-(2-methylbutyryl)phloroglucinol-glucopyranosid đo trong  $\text{CD}_3\text{OD}$  [175]; <sup>a</sup>Đo trong  $\text{CD}_3\text{OD}$ , <sup>b</sup>125 MHz, <sup>c</sup>500 MHz.



Hình 3.18. Cấu trúc hóa học (A) và các tương tác HMBC chính (B) của hợp chất **HH6**

**HH6** cũng được xác định là một hợp chất acylphloroglucinol như **HH1–HH5**. Tuy nhiên khác với các hợp chất **HH1–HH5**, **HH6** không phải là một acylphloroglucinol đa vòng mang các nhóm prenyl. Phổ  $^1\text{H-NMR}$  và  $^{13}\text{C-NMR}$  của **HH6** xuất hiện các tín hiệu đặc trưng của 02 proton thơm ghép cặp *meta* ở  $\delta_{\text{H}}$  5,98 (1H, d,  $J = 2,5$  Hz) và 6,21 (1H, d,  $J = 2,0$  Hz), 01 nhóm methylbutyryl [ $\delta_{\text{C}}$  211,8 (C-1');  $\delta_{\text{C}}$  47,0 (C-2'),  $\delta_{\text{H}}$  3,92 (H-2');  $\delta_{\text{C}}$  28,2 (C-3'),  $\delta_{\text{H}}$  1,82 và 1,83 (H-3');  $\delta_{\text{C}}$  12,0 (C-4'),  $\delta_{\text{H}}$  0,91 (H-4');  $\delta_{\text{C}}$  16,8 (C-5'),  $\delta_{\text{H}}$  1,15 (H-5')]. Sự có mặt của góc đường cấu hình  $\beta$  trong cấu trúc của **HH6** được xác định dựa trên tín hiệu doublet của proton anome ở  $\delta_{\text{H}}$  5,06 với hằng số ghép cặp  $J = 8,0$  Hz và một nhóm các tín hiệu carbon ở  $\delta_{\text{C}}$  101,7; 78,7; 78,4; 74,8; 71,2; 62,5 [175], [176]. Các tương tác HMBC chính để xác định vị trí thế của nhóm methylbutyryl và góc đường vào khung phloroglucinol bao gồm tương tác của H-4 ( $\delta_{\text{H}}$  5,98), H-6 ( $\delta_{\text{H}}$  6,21), H-2' ( $\delta_{\text{H}}$  3,92) với C-2 ( $\delta_{\text{C}}$  106,9), tương tác của H-1'' ( $\delta_{\text{H}}$  5,06), H-6 ( $\delta_{\text{H}}$  6,21) với C-1 ( $\delta_{\text{C}}$  161,8) (Bảng 3.8). So sánh phổ NMR của **HH6** với phổ của hợp chất 1-(2-methylbutyryl)phloroglucinol-glucopyranosid trong tài liệu tham khảo thấy hoàn toàn trùng khớp [175], [176], cho phép khẳng định **HH6** là hợp chất 1-(2-methylbutyryl)phloroglucinol-glucopyranosid, với tên thường gọi là **multifidol glucosid**.

### 3.2.3.7. Hợp chất **HH7**:

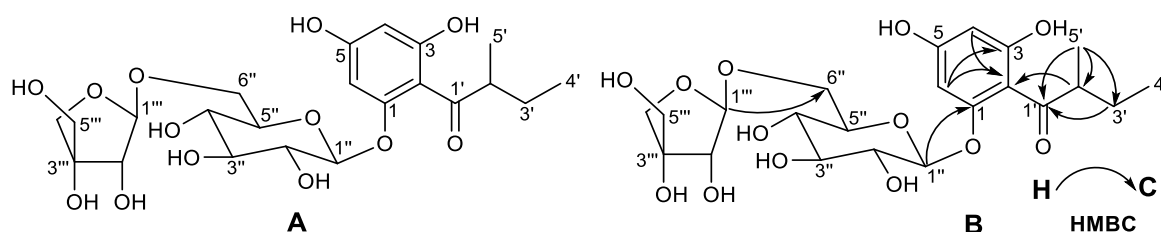
Dạng keo màu trắng ngà, độ tinh khiết 84% (tính theo diện tích pic HPLC, UV 210 nm). Phổ ESI-MS ( $m/z$ ) 527 [ $\text{M}+\text{Na}$ ] $^+$ . Phổ  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 500 MHz) và phổ  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 125 MHz): xem bảng 3.8.



Bảng 3.8. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất **HH7**

Vị trí C	* $\delta_C$	$\delta_C^{a,b}$	Nhóm carbon	$\delta_H^{a,c}$ (độ bội, $J = \text{Hz}$ )
1	161,8	161,8	C	-
2	106,9	106,8	C	-
3	167,3	167,0	C	-
4	95,6	95,7	CH	5,99 (d, 2,5)
5	165,5	165,6	C	-
6	98,4	98,4	CH	6,21 (d, 2,0)
1'	211,8	211,9	C	-
2'	46,9	47,0	CH	3,92 (m)
3'	28,3	28,3	CH <sub>2</sub>	1,42 (m) 1,83 (m)
4'	12,1	12,1	CH <sub>3</sub>	0,92 (t, 7,5)
5'	16,8	16,9	CH <sub>3</sub>	1,16 (d, 7,0)
1''	101,7	101,7	CH	5,03 (d, 7,5)
2''	74,8	74,8	CH	3,53 (m)
3''	78,6	78,6	CH	3,49 (m)
4''	71,3	71,4	CH	3,38 (m)
5''	78,0	78,1	CH	3,42 (m)
6''	68,6	68,7	CH <sub>2</sub>	3,64 (m) 3,95 (m)
1'''	110,9	111,0	CH	4,99 (d, 2,5)
2'''	77,2	77,2	CH	3,63 (m)
3'''	80,5	80,5	C	-
4'''	75,0	75,1	CH <sub>2</sub>	3,77 (d, 9,5) 4,00 (d, 10,0)
5'''	65,7	65,8	CH <sub>2</sub>	3,61 (br s)

\* $\delta_C$  của 2-(2-methylbutyryl)phloroglucinol 1-O-(6''-O- $\beta$ -D-apiofuranosyl)- $\beta$ -D-glucopyranosid đo trong CD<sub>3</sub>OD [177]; <sup>a</sup>Đo trong CD<sub>3</sub>OD, <sup>b</sup>125 MHz, <sup>c</sup>500 MHz.



Hình 3.19. Cấu trúc hóa học (A) và các tương tác HMBC chính (B) của hợp chất **HH7**

Hợp chất **HH7** thu được dưới dạng keo màu trắng ngà và cũng là một hợp chất acylphloroglucinol glycosid giống như **HH6**. Phổ <sup>13</sup>C-NMR kết hợp với phổ HSQC của **HH7** cho biết sự xuất hiện của 22 carbon bao gồm 02 nhóm methyl (CH<sub>3</sub>), 04 nhóm methylen (CH<sub>2</sub>), 10 nhóm methin (CH), 06 carbon không liên kết với hydro. Công thức phân tử của **HH7** được xác định là C<sub>22</sub>H<sub>32</sub>O<sub>13</sub> dựa trên pic ion  $m/z$  527

$[M+Na]^+$  cùng với các dữ liệu phổ NMR. So sánh các phổ của **HH6** và **HH7** (Bảng 3.8 và bảng 3.9) thấy rằng, 02 hợp chất này có cấu trúc gần giống nhau ngoại trừ sự xuất hiện thêm của một gốc đường  $C_5H_8O_4$  trong cấu trúc của **HH7**. Gốc đường này được xác định là gắn vào vị trí C-6'' của đường  $\beta$ -D-glucopyranose dựa trên tương tác HMBC của H-1''' ( $\delta_H$  4,99) với C-6'' ( $\delta_C$  68,7). Từ những suy luận trên, so sánh phổ của **HH7** với phổ của hợp chất 2-(2-methylbutyryl)phloroglucinol 1-O-(6''-O- $\beta$ -D-apiofuranosyl)- $\beta$ -D-glucopyranosid trong tài liệu tham khảo [177], thấy hoàn toàn trùng khớp (Bảng 3.9) cho phép khẳng định **HH7** là **2-(2-methylbutyryl)phloroglucinol 1-O-(6''-O- $\beta$ -D-apiofuranosyl)- $\beta$ -D-glucopyranosid**.

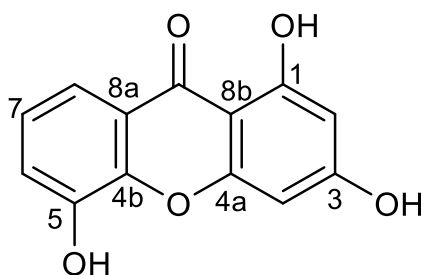
### 3.2.3.8. Hợp chất **HH8**:

Bột màu vàng, độ tinh khiết 88% (tính theo diện tích pic HPLC, UV 210 nm). Phổ ESI-MS ( $m/z$ ) 245  $[M+H]^+$ . Phổ  $^1H$ -NMR (DMSO- $d_6$ ; 500 MHz) và phổ  $^{13}C$ -NMR (DMSO- $d_6$ ; 125 MHz): xem bảng 3.9.

Bảng 3.9. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất **HH8**

Vị trí C	* $\delta_C$	$\delta_C^{a,b}$	Nhóm carbon	$\delta_H^{a,c}$ (độ bội, $J = \text{Hz}$ )
1	163,0	163,0	C	-
2	98,1	98,3	CH	6,20 (d, 2,0)
3	165,8	165,9	C	-
4	94,1	94,3	CH	6,42 (d, 2,0)
4a	157,3	157,4	C	-
4b	144,9	145,0	C	-
5	146,2	146,2	C	-
6	120,6	120,8	CH	7,30 (dd, 1,5; 7,5)
7	124,1	124,3	CH	7,25 (t, 7,5)
8	114,6	114,8	CH	7,54 (dd, 1,5; 7,5)
8a	121,0	121,0	C	-
8b	102,2	102,3	C	-
C=O	180,2	180,3	C	-
1-OH				12,86 (s)

\* $\delta_C$  của 1,3,5-trihydroxyxanthon đo trong DMSO- $d_6$  [178]; <sup>a</sup>Đo trong DMSO- $d_6$ , <sup>b</sup>125 MHz, <sup>c</sup>500 MHz.



Hình 3.20. Cấu trúc hóa học của hợp chất **HH8**

Hợp chất **HH8** phân lập được dưới dạng bột màu vàng. Phổ  $^1\text{H-NMR}$  của **HH8** xuất hiện tín hiệu của 05 proton thơm bao gồm 02 proton ghép cặp *meta* ở  $\delta_{\text{H}}$  6,20 (1H, d,  $J = 2,0$  Hz) và 6,42 (1H, d,  $J = 2,0$  Hz), 03 proton của 01 vòng benzen bị thế 3 vị trí 1,2,3 ở  $\delta_{\text{H}}$  7,30 (1H, dd,  $J = 1,5; 7,5$  Hz); 7,25 (1H, t,  $J = 7,5$  Hz); 7,54 (1H, dd,  $J = 1,5; 7,5$  Hz). Phổ  $^{13}\text{C-NMR}$  của **HH8** cho biết sự có mặt của 13 carbon bao gồm 12 tín hiệu carbon có độ chuyển dịch nằm trong vùng của vòng thơm hoặc liên kết đôi  $\delta_{\text{C}}$  94,3–165,9, một tín hiệu của nhóm carbonyl C=O ( $\delta_{\text{C}}$  180,2). Các dữ liệu phổ NMR cùng với tính chất vật lý bột màu vàng dự đoán rằng **HH8** là một xanthon, nhóm hợp chất chính đã được phân lập từ các loài thuộc chi *Hypericum* nói chung và loài *Ban hooker* nói riêng [2], [4]. Do có 05 proton thơm nên **HH8** là một hợp chất xanthon bị thế ở 03 vị trí, với tất cả các nhóm thế là nhóm thế hydroxy. Một nhóm thế hydroxy được xác định là gắn vào vị trí C-1 do sự xuất hiện của pic đơn ở  $\delta_{\text{H}}$  12,86. Các phân tích này phù hợp với công thức phân tử  $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{O}_5$  ( $M=244$ ) được suy luận từ dữ liệu phổ ESI-MS pic ion  $m/z$  245  $[\text{M}+\text{H}]^+$  của **HH8**. So sánh các dữ liệu phổ thu được từ thực nghiệm với các dữ liệu trong tài liệu [178] khẳng định, **HH8** là hợp chất **1,3,5-trihydroxyxanthon**.

### 3.2.3.9. Hợp chất **HH9**:

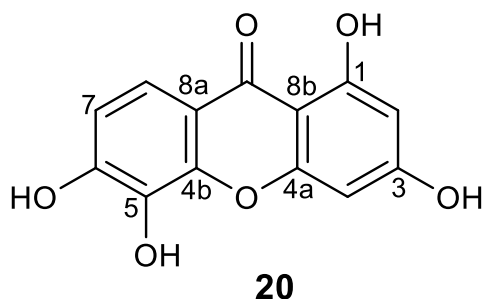
Bột màu vàng, độ tinh khiết 88% (tính theo diện tích pic HPLC, UV 210 nm). Phổ  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{DMSO-}d_6$ ; 500 MHz) và phổ  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{DMSO-}d_6$ ; 125 MHz): xem bảng 3.10.

Bảng 3.10. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất **HH9**

Vị trí C	* $\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}}$	Nhóm carbon	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,c}}$ (độ bội, $J = \text{Hz}$ )
1	162,3	162,9	C	-
2	97,9	97,8	CH	6,39 (d, 2,0)

Vị trí C	* $\delta_C$	$\delta_C^{a,b}$	Nhóm carbon	$\delta_H^{a,c}$ (độ bội, $J = \text{Hz}$ )
3	165,1	165,1	C	-
4	94,0	93,9	CH	6,15 (d, 2,0)
4a	157,4	157,3	C	-
4b	146,1	146,0	C	-
5	132,5	132,4	C	-
6	151,9	151,9	C	-
7	113,1	113,0	CH	7,49 (d, 8,5)
8	115,9	115,9	CH	6,91 (d, 8,5)
8a	113,1	113,0	C	-
8b	101,5	101,4	C	-
C=O	179,7	179,6	C	-
1-OH				13,11 (s)

\* $\delta_C$  của 1,3,5,6-tetrahydroxyxanthon đo trong DMSO- $d_6$  [178]; <sup>a</sup>Đo trong DMSO- $d_6$ , <sup>b</sup>125 MHz, <sup>c</sup>500 MHz.



Hình 3.21. Cấu trúc hóa học của hợp chất **HH9**

**HH9** thu được dưới dạng bột màu vàng và cũng được xác định là một hợp chất xanthon tương tự như **HH8**. Sự khác biệt dễ quan sát nhất của 02 hợp chất là trên phổ <sup>1</sup>H- của **HH9** xuất hiện tín hiệu của 04 proton thơm thay vì 05 proton thơm như trong **HH8**. Như vậy có thể thấy rằng, **HH9** sẽ có thêm 01 nhóm thế khi so với **HH8**. Nhóm thế này được xác định là nhóm hydroxy và gắn vào vị trí C-6 dựa trên tín hiệu của 02 proton ghép cặp *ortho* ở  $\delta_H$  7,49 (1H, d,  $J = 8,5$  Hz; H-7); 6,91 (1H, d,  $J = 8,5$  Hz; H-8). **HH9** được khẳng định là hợp chất **1,3,5,6-tetrahydroxyxanthon** sau khi so sánh các dữ liệu phổ NMR và MS thu được với các dữ liệu của 1,3,5,6-tetrahydroxyxanthon trong tài liệu [178].

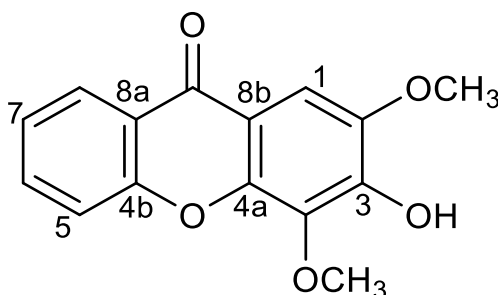
### 3.2.3.10. Hợp chất **HH10**:

Bột màu vàng, độ tinh khiết 85% (tính theo diện tích pic HPLC, UV 210 nm). Phổ ESI-MS ( $m/z$ ) 273 [M+H]<sup>+</sup>. Phổ <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>; 500 MHz) và phổ <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>; 125 MHz): xem bảng 3.11.

Bảng 3.11. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất **HH10**

Vị trí C	* $\delta_C$	$\delta_C^{a,b}$	Nhóm carbon	$\delta_H^{a,c}$ (độ bội, $J = \text{Hz}$ )
1	100,6	100,8	CH	7,53 (s)
2	144,8	145,0	C	-
3	145,1	145,2	C	-
4	134,7	134,9	C	-
4a	155,9	156,1	C	-
4b	146,2	146,4	C	-
5	118,0	118,1	CH	7,57 (br d, 8,5)
6	134,2	134,3	CH	7,71 (ddd, 1,5; 7,0; 8,5)
7	124,0	123,7	CH	7,39 (ddd, 1,5; 7,0; 8,5)
8	126,6	126,7	CH	8,36 (dd, 1,5; 8,0)
8a	121,3	121,3	C	-
8b	114,6	114,7	C	-
C=O	176,2	176,3	C	-
2-OCH <sub>3</sub>	56,5	56,7	CH <sub>3</sub>	4,02 (s)
4-OCH <sub>3</sub>	61,7	61,8	CH <sub>3</sub>	4,12 (s)

\* $\delta_C$  của 3-hydroxy-2,4-dimethoxyxanthon đo trong CDCl<sub>3</sub> [179]; <sup>a</sup>Đo trong CDCl<sub>3</sub>, <sup>b</sup>125 MHz, <sup>c</sup>500 MHz.

Hình 3.22. Cấu trúc hóa học của hợp chất **HH10**

Phổ <sup>1</sup>H-NMR của hợp chất xanthon **HH10** xuất hiện tín hiệu của 05 proton chỉ ra sự có mặt của 03 nhóm thế trong cấu trúc. Ba nhóm thế này được xác định bao gồm 02 nhóm methoxy, 01 nhóm hydroxy và ở trên cùng một vòng do sự xuất hiện của 01 proton thơm dưới dạng singlet ở  $\delta_H$  7,53, 02 proton methyl ở  $\delta_H$  4,02; 4,12,  $\delta_C$  56,7; 61,8 và pic ion  $m/z$  273 [M+H]<sup>+</sup> trên phổ ESI-MS [179], [180]. So sánh phổ NMR của **HH10** với phổ NMR của 3-hydroxy-2,4-dimethoxyxanthon (hợp chất có đặc điểm như đã phân tích) trong các tài liệu thấy hoàn toàn trùng khớp (Bảng 3.12), cho phép khẳng định **HH10** là **3-hydroxy-2,4-dimethoxyxanthon** [179], [180].

### 3.2.3.11. Hợp chất **HH11**:

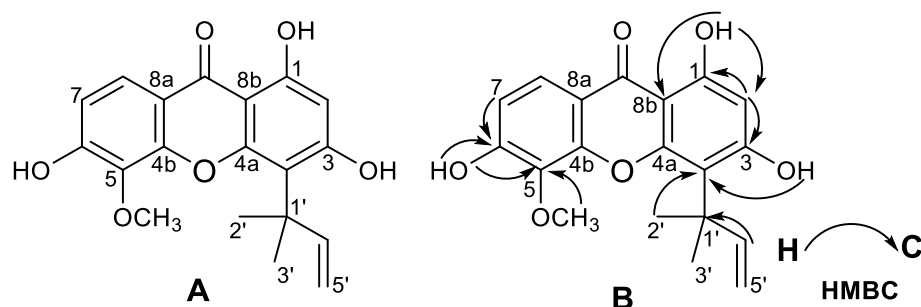
Bột màu vàng, độ tinh khiết 88% (tính theo diện tích pic HPLC, UV 210 nm).

Phổ ESI-MS ( $m/z$ ) 341  $[M-H]^-$ . Phổ  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 500 MHz) và phổ  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 125 MHz): xem bảng 3.12.

Bảng 3.12. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất **HH11**

Vị trí C	* $\delta_C$	$\delta_C^{a,b}$	Nhóm carbon	$\delta_H^{a,c}$ (độ bội, $J = \text{Hz}$ )
1	162,6	162,1	C	-
2	100,1	100,9	CH	6,30 (s)
3	164,8	162,9	C	-
4	112,8	110,4	C	-
4a	157,0	149,9	C	-
4b	151,5	149,5	C	-
5	136,0	134,2	C	-
6	157,6	155,0	C	-
7	114,7	113,1	CH	7,00 (d, 9,0)
8	121,9	122,6	CH	7,96 (d, 9,0)
8a	114,7	114,9	C	-
8b	103,8	104,1	C	-
C=O	181,4	180,7	C	-
1-OH				13,25 (s)
3-OH				7,40 (s)
6-OH				6,23 (s)
5-OCH <sub>3</sub>	61,9	62,4	CH <sub>3</sub>	3,98 (s)
1'	42,0	41,1	C	
2'	30,3	27,9	CH <sub>3</sub>	1,78 (s)
3'	30,3	27,9	CH <sub>3</sub>	1,78 (s)
4'	151,2	149,5	CH	6,51 (dd, 10,5; 17,5)
5'	109,2	113,7	CH <sub>2</sub>	5,50 (d, 17,5) 5,42 (d, 10,5)

\* $\delta_C$  của *neriifolon A* đo trong  $\text{acetone-d}_6$  [181]; <sup>a</sup>Đo trong  $\text{CDCl}_3$ , <sup>b</sup>125 MHz, <sup>c</sup>500 MHz.



Hình 3.23. Cấu trúc hóa học (A) và các tương tác HMBC chính (B) của hợp chất **HH11**

**HH11** phân lập được dưới dạng bột màu vàng và cũng được xác định là một hợp chất xanthon tương tự như **HH8–HH10**. Phổ  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -NMR kết hợp với phổ HSQC cho biết sự có mặt của 03 proton thơm bao gồm 02 proton ghép cặp *ortho* ở  $\delta_{\text{H}}$  7,00 (1H, d,  $J = 9,0$  Hz); 7,96 (1H, d,  $J = 9,0$  Hz), 01 proton thơm dưới dạng singlet ở  $\delta_{\text{H}}$  6,30. Các tín hiệu kể trên chỉ ra sự xuất hiện của 05 nhóm thế trong cấu trúc của **HH11**. Phổ  $^1\text{H}$ -NMR có tín hiệu singlet ở trường thấp  $\delta_{\text{H}}$  13,25 đặc trưng của nhóm hydroxy ở vị trí C-1. Không giống như các xanthon **HH8–HH10** chỉ chứa các nhóm thế hydroxy và methoxy, **HH11** xuất hiện một nhóm thế 1,1-dimethylallyl dựa trên các tín hiệu [ $\delta_{\text{C}}$  41,1 (C-1');  $\delta_{\text{H}}$  1,78 (6H, s; H-2', H-3'),  $\delta_{\text{C}}$  27,9 (C-2'; C-3');  $\delta_{\text{H}}$  6,51 (1H, dd,  $J = 10,5; 17,5$  Hz; H-4'),  $\delta_{\text{C}}$  149,5 (C-4'),  $\delta_{\text{H}}$  5,50 (1H, dd,  $J = 17,5$  Hz; H-5'a), 5,42 (1H, dd,  $J = 10,5$  Hz; H-5'b),  $\delta_{\text{C}}$  113,7 (C-5')] [181]. Bốn nhóm thế còn lại bao gồm 01 nhóm thế methoxy và 03 nhóm thế hydroxy được suy luận từ các tín hiệu  $\delta_{\text{H}}$  3,98 (3H, s); 13,25 (1H, s); 7,40 (1H, s); 6,23 (1H, s) cũng như pic ion  $m/z$  341  $[\text{M-H}]^-$  trên phổ ESI-MS. Vị trí các nhóm thế gắn vào khung xanthon của hợp chất **HH11** được xác định dựa trên các tương tác của phổ HMBC. Tương tác của 1-OH ( $\delta_{\text{H}}$  13,25) với C-8b ( $\delta_{\text{C}}$  104,1), C-1 ( $\delta_{\text{C}}$  162,1), C-2 ( $\delta_{\text{C}}$  100,9); tương tác của H-2 ( $\delta_{\text{H}}$  6,30) với C-1, C-3 ( $\delta_{\text{C}}$  162,9); tương tác của 3-OH ( $\delta_{\text{H}}$  7,40), H-2 với C-4 ( $\delta_{\text{C}}$  110,4) chỉ ra rằng 02 nhóm thế hydroxy được gắn vào lần lượt các vị trí C-1 và C-3, trong khi nhóm 1,1-dimethylallyl được liên kết với vị trí C-4. Sự xuất hiện của 02 proton ghép cặp *ortho* cùng với tương tác HMBC của 5-OCH<sub>3</sub> ( $\delta_{\text{H}}$  3,98) với C-5 ( $\delta_{\text{C}}$  134,2); tương tác của 6-OH ( $\delta_{\text{H}}$  6,23), H-7 ( $\delta_{\text{H}}$  7,00) với C-5, C-6 ( $\delta_{\text{C}}$  155,0) cho biết một nhóm thế methoxy và một nhóm thế hydroxy lần lượt được đính vào vị trí C-5 và C-6 của khung xanthon. Từ những phân tích phổ NMR, MS ở trên, so sánh các phổ của **HH11** với hợp chất neriifolone A (Bảng 3.13), xác định **HH11** là **neriifolon A** [181]. Hợp chất neriifolon A cho đến nay mới chỉ được tìm thấy trong thành phần hóa học của loài *Cratoxylum sumatranum*. Đây là báo cáo đầu tiên về sự có mặt của hợp chất này trong chi *Hypericum*.

### 3.2.3.12. Hợp chất HH12:

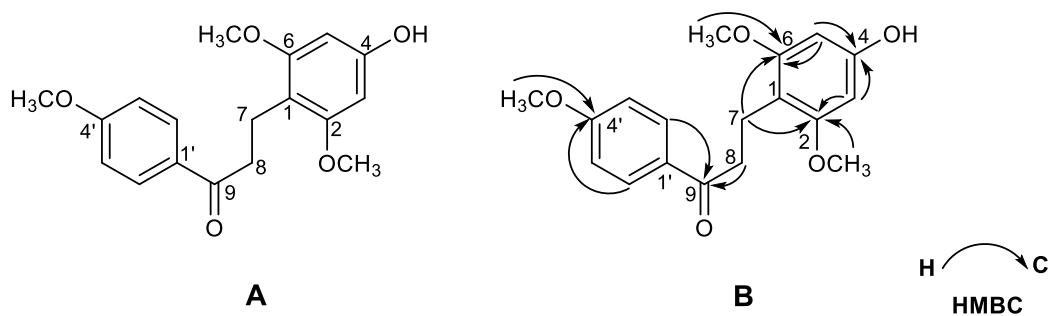
Bột màu vàng nhạt, độ tinh khiết 90% (tính theo diện tích pic HPLC, UV 210

nm). Phổ ESI-MS ( $m/z$ ) 339  $[M+Na]^+$ . Phổ  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 600 MHz) và phổ  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 150 MHz): xem bảng 3.13.

Bảng 3.13. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất **HH12**

Vị trí C	$^*\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}}$	Nhóm carbon	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,c}}$ (độ bội, $J = \text{Hz}$ )
1	109,5	110,1	C	-
2	159,5	158,9	C	-
3	90,4	90,7	CH	6,13 (s)
4	158,6	159,8	C	-
5	90,4	90,7	CH	6,13 (s)
6	159,5	158,9	C	-
7	18,9	18,7	$\text{CH}_2$	2,97 (m)
8	38,5	38,6	$\text{CH}_2$	3,03 (m)
9	201,5	199,6	C	-
2-OCH <sub>3</sub>	55,5	55,8	$\text{CH}_3$	3,77 (s)
4-OCH <sub>3</sub>	55,3	-	-	-
6-OCH <sub>3</sub>	55,5	55,8	$\text{CH}_3$	3,77 (s)
4'-OCH <sub>3</sub>	-	55,5	$\text{CH}_3$	3,81 (s)
1'	129,2	130,5	C	-
2'	130,0	130,9	CH	7,93 (d, 8,4)
3'	115,4	115,3	CH	6,85 (d, 8,4)
4'	161,3	159,7	C	-
5'	115,4	115,3	CH	6,85 (d, 8,4)
6'	130,0	130,9	CH	7,93 (d, 8,4)

\* $\delta_{\text{C}}$  của loureirin B đo trong  $\text{CDCl}_3$  [182]; <sup>a</sup>Đo trong  $\text{CDCl}_3$ , <sup>b</sup>150 MHz, <sup>c</sup>600 MHz.



Hình 3.24. Cấu trúc hóa học (A) và các tương tác HMBC chính (B) của hợp chất **HH12**



**HH12** phân lập dưới dạng bột màu vàng nhạt và được xác định là một hợp chất dihydrochalcon [182], [183]. Phổ  $^1\text{H-NMR}$  kết hợp với phổ HSQC của **HH12** cho biết tín hiệu của 02 cặp proton thơm đối xứng với nhau ở  $\delta_{\text{H}}$  7,93 (2H, d,  $J = 8,4$  Hz); 6,85 (2H, d,  $J = 8,4$  Hz), 01 cặp proton thơm đối xứng với nhau xuất hiện dưới dạng singlet ở  $\delta_{\text{H}}$  6,13, 03 nhóm thế methoxy trong đó có 02 nhóm đối xứng  $\delta_{\text{H}}$  3,77 (6H, s); 02 proton methylen  $\delta_{\text{H}}$  2,97 (2H, m); 3,03 (2H, m). Phổ  $^{13}\text{C-NMR}$  xuất hiện 15 tín hiệu của carbon bao gồm 03 nhóm  $\text{CH}_3$ , 02 nhóm  $\text{CH}_2$ , 06 nhóm CH, và 07 carbon không liên kết với hydro (tín hiệu của nhóm carbonyl ở  $\delta_{\text{C}}$  199,6). Dựa trên các tín hiệu đã phân tích, **HH12** được dự đoán là một hợp chất dihydrochalcon có 02 vòng thơm, trong đó 01 vòng thơm có 02 nhóm thế ở vị trí *para* và 01 vòng thơm bị thế ở 04 vị trí 1,2,4,6. Công thức phân tử của **HH12** được xác định là  $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{O}_5$  dựa vào tín hiệu ion  $m/z$  339  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  trên phổ ESI-MS cùng với các tín hiệu của phổ NMR. So sánh phổ NMR của **HH12** và phổ của loureirin B [182] (Bảng 3.14) thấy rằng 02 hợp chất này có cấu trúc gần giống nhau. Điểm khác biệt duy nhất là nhóm thế methoxy ở vị trí C-4 và nhóm thế hydroxy ở C-4' trong loureirin B đã được thay thế lần lượt bởi các nhóm hydroxy và methoxy trong **HH12**. Điều này được chứng minh dựa vào các tương tác của 4'- $\text{OCH}_3$  ( $\delta_{\text{H}}$  3,81), H-2' ( $\delta_{\text{H}}$  7,93) với C-4' ( $\delta_{\text{C}}$  159,7); tương tác của H-5 ( $\delta_{\text{H}}$  6,13) với C-4 ( $\delta_{\text{C}}$  159,8) và C-6 ( $\delta_{\text{C}}$  158,9); tương tác của 6- $\text{OCH}_3$  ( $\delta_{\text{H}}$  3,77) với C-6 trên phổ HMBC cùng với sự khác nhau về độ chuyển dịch của C-4 và C-4' của 02 hợp chất **HH12** và loureirin B (Bảng 3.14). Từ những phân tích ở trên, **HH12** được xác định là hợp chất **4-hydroxy-2,6,4'-trimethoxydihydrochalcon**. Theo tra cứu, cho đến nay hợp chất 4-hydroxy-2,6,4'-trimethoxydihydrochalcon chỉ được phân lập duy nhất từ loài *Soymida febrifuga*, họ Xoan (Meliaceae) [184], thu hái tại Myanmar. Tuy nhiên, tài liệu này không có phổ của 4-hydroxy-2,6,4'-trimethoxydihydrochalcon. Đây là báo cáo đầu tiên phổ của hợp chất 4-hydroxy-2,6,4'-trimethoxydihydrochalcon.

### 3.2.3.12. Hợp chất HH13:

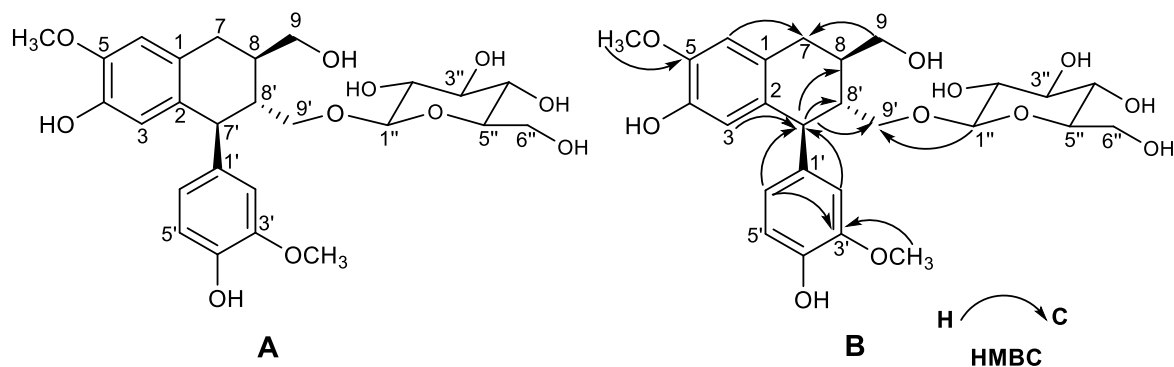
Bột màu trắng ngà, độ tinh khiết 89% (tính theo diện tích pic HPLC, UV 210 nm). Phổ ESI-MS ( $m/z$ ) 545  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ . Phổ  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 500 MHz) và phổ

$^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 125 MHz): xem bảng 3.14.

Bảng 3.14. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất **HH13**

Vị trí C	* $\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}}$	Nhóm carbon	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,c}}$ (độ bội, $J = \text{Hz}$ )
1	129,1	129,2	C	-
2	134,4	134,4	C	-
3	117,4	117,4	CH	6,21 (s)
4	145,8	145,9	C	-
5	147,2	147,2	C	-
6	112,4	112,5	CH	6,67 (s)
7	33,9	33,9	CH <sub>2</sub>	2,83 (m) 2,84 (m)
8	39,5	39,6	CH	2,10 (m)
9	65,2	65,3	CH <sub>2</sub>	3,74 (dd, 6,6; 11,5) 3,78 (dd, 4,0; 11,5)
1'	138,7	138,7	C	-
2'	114,3	114,4	CH	6,81 (d, 2,0)
3'	148,9	148,9	C	-
4'	145,2	145,1	C	-
5'	116,1	116,1	CH	6,76 (d, 8,0)
6'	123,1	123,2	CH	6,66 (dd, 2,0; 8,0)
7'	47,9	47,9	CH	4,09 (d, 10,0)
8'	45,9	46,0	CH	1,85 (tt, 2,5; 3,0; 10,0)
9'	69,5	69,6	CH <sub>2</sub>	3,23 (dd, 3,0; 10,0) 4,05 (dd, 2,5; 10,0)
1''	105,2	105,2	CH	4,14 (d, 8,0)
2''	75,2	75,2	CH	3,20 (m)
3''	78,1	78,1	CH	3,35 (m)
4''	71,7	71,7	CH	3,26 (m)
5''	77,9	77,9	CH	3,22 (m)
6''	62,8	62,8	CH <sub>2</sub>	3,64 (dd, 6,0; 12,0) 3,86 (dd, 2,5; 12,0)
5-OCH <sub>3</sub>	56,4	56,4	CH <sub>3</sub>	3,82 (s)
3'-OCH <sub>3</sub>	56,5	56,5	CH <sub>3</sub>	3,83 (s)

\* $\delta_{\text{C}}$  của isolariciresinol 9'-O- $\beta$ -D-glucopyranosid đo trong  $\text{CD}_3\text{OD}$  [185]; <sup>a</sup>Đo trong  $\text{CD}_3\text{OD}$ , <sup>b</sup>125 MHz, <sup>c</sup>500 MHz.



Hình 3.25. Cấu trúc hóa học (A) và các tương tác HMBC chính (B) của hợp chất **HH13**

**HH13** được xác định là một hợp chất lignan glycosid sau khi phân tích các số liệu phổ NMR. Phổ  $^1\text{H-NMR}$  của **HH13** xuất hiện tín hiệu của 05 proton thơm bao gồm 02 proton dưới dạng singlet ở  $\delta_{\text{H}}$  6,21; 6,67 và 03 proton ghép dạng ABX ở  $\delta_{\text{H}}$  6,81 (1H, d,  $J = 2,0$  Hz); 6,76 (1H, d,  $J = 8,0$  Hz); 6,66 (1H, dd,  $J = 2,0; 8,0$  Hz), 02 tín hiệu của nhóm methoxy ở  $\delta_{\text{H}}$  3,82 và 3,83. Phổ  $^{13}\text{C-NMR}$  kết hợp với phổ HSQC cho biết tín hiệu của 26 carbon bao gồm 02 nhóm methyl, 04 nhóm methylen, 13 nhóm methin, 07 carbon không liên kết trực tiếp với hydro. Sự có mặt của một gốc đường với cấu hình  $\beta$  trong cấu trúc của **HH13** được chứng minh dựa trên tín hiệu proton anome ở  $\delta_{\text{H}}$  4,14 (1H, d,  $J = 8,0$  Hz) và một nhóm các tín hiệu  $\delta_{\text{C}}$  105,2; 78,1; 77,9; 75,2; 71,7; 62,8. Sáu carbon nối 02 vòng thơm của hợp chất lignan **HH13** được xác định bao gồm 03 nhóm methin [ $\delta_{\text{H}}$  2,10 (H-8),  $\delta_{\text{C}}$  39,6 (C-8);  $\delta_{\text{H}}$  4,09 (H-7'),  $\delta_{\text{C}}$  47,9 (C-7');  $\delta_{\text{H}}$  1,85 (H-8'),  $\delta_{\text{C}}$  46,0 (C-8')] và 03 nhóm methylen [ $\delta_{\text{C}}$  33,9 (C-7);  $\delta_{\text{C}}$  65,3 (C-9);  $\delta_{\text{C}}$  69,6 (C-9')]. Như vậy cấu trúc của hợp chất lignan **HH13** có 02 vòng thơm (01 vòng sẽ có 03 nhóm thế, vòng còn lại sẽ có 04 nhóm thế, trong đó có 02 nhóm thế methoxy), 01 gốc đường 06 carbon, chuỗi bên nối 02 vòng thơm bao gồm 03 nhóm methin và 03 nhóm methylen. Liên kết giữa các carbon, vị trí của các nhóm thế và của gốc đường được suy luận từ các tín hiệu trên phổ HMBC (Hình 3.21). Cấu hình *trans* của 02 proton H-7' và H-8' dựa trên hằng số ghép cặp  $J = 10$  Hz. So sánh phổ NMR của **HH13** với phổ của isolariciresinol 9'-O- $\beta$ -D-glucopyranosid (hợp chất có các đặc điểm như đã phân tích) trong các tài

liệu [185], [186] thấy hoàn toàn giống nhau (Bảng 3.15). Phổ khối ESI-MS của **HH13** cho tín hiệu ( $m/z$ ) 545  $[M+Na]^+$ , kết hợp với phổ NMR xác định công thức phân tử của **HH13** là  $C_{26}H_{34}O_{11}$ , trùng với công thức phân tử của isolariciresinol 9'-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosid. Do đó, **HH13** được khẳng định là **isolariciresinol 9'-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosid**, một hợp chất aryltetralin lignan lần đầu tiên được phân lập từ chi *Hypericum*.

#### 3.2.3.14. Hợp chất **HH14**:

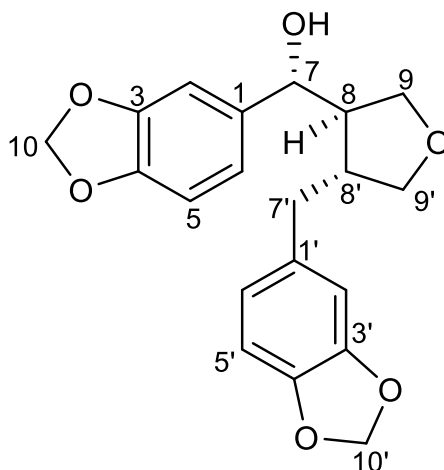
Bột màu trắng ngà, độ tinh khiết 94% (tính theo diện tích pic HPLC, UV 210 nm). Phổ ESI-MS ( $m/z$ ) 357  $[M+H]^+$ . Phổ  $^1H$ -NMR ( $CDCl_3$ ; 500 MHz) và phổ  $^{13}C$ -NMR ( $CDCl_3$ ; 125 MHz): xem bảng 3.15.

Bảng 3.15. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất **HH14**

Vị trí C	* $\delta_C$	$\delta_C^{a,b}$	Nhóm carbon	$\delta_H^{a,c}$ (độ bội, $J = \text{Hz}$ )
1	137,0	137,1	C	-
2	106,2	106,3	CH	6,84 (d, 1,5)
3	147,8	147,9	C	-
4	146,8	146,9	C	-
5	108,2	108,3	CH	6,75 (d, 8,5)
6	119,0	119,1	CH	6,77 (dd, 1,5; 8,5)
7	82,8	82,9	CH	4,80 (d, 6,0)
8	52,6	52,6	CH	2,36 (m)
9	60,8	60,9	CH <sub>2</sub>	3,75 (dd, 6,5; 10,5) 3,89 (dd, 5,5; 10,5)
10	100,9	101,0	CH <sub>2</sub>	5,92 (s)
1'	134,1	134,2	C	-
2'	108,9	109,0	CH	6,68 (d, 1,5)
3'	147,7	147,8	C	-
4'	145,9	146,0	C	-
5'	108,0	108,1	CH	6,73 (d, 8,0)
6'	121,4	121,4	CH	6,63 (dd, 1,5; 8,0)
7'	33,2	33,3	CH <sub>2</sub>	2,53 (dd, 10,5; 13,5) 2,87 (dd, 5,5; 13,5)
8'	42,3	42,4	CH	2,70 (m)

Vị trí C	* $\delta_C$	$\delta_C^{a,b}$	Nhóm carbon	$\delta_H^{a,c}$ (độ bội, $J = \text{Hz}$ )
9'	72,8	72,9	CH <sub>2</sub>	3,72 (dd, 6,5; 8,5) 3,74 (dd, 6,5; 8,5)
10'	100,8	100,9	CH <sub>2</sub>	5,94 (s)

\* $\delta_C$  của isocubein đo trong CDCl<sub>3</sub> [187]; <sup>a</sup>Đo trong CDCl<sub>3</sub>, <sup>b</sup>125 MHz, <sup>c</sup>500 MHz.



Hình 3.26. Cấu trúc hóa học của hợp chất **HH14**

Hợp chất **HH14** phân lập được dưới dạng bột màu trắng ngà và cũng được xác định là một hợp chất lignan. Tuy nhiên khác với **HH13**, **HH14** chỉ có 02 nhóm phenyl propanoid C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> liên kết với nhau để tạo thành một khung lignan mà không có gốc đường ở trong cấu trúc. Phổ <sup>1</sup>H-NMR của **HH14** cho biết sự xuất hiện của 06 proton thơm thuộc 02 nhóm ABX lần lượt ở [ $\delta_H$  6,75 (1H, d,  $J = 8,5$  Hz), 6,77 (1H, dd,  $J = 1,5; 8,5$  Hz), 6,84 (1H, d,  $J = 1,5$  Hz) và  $\delta_H$  6,73 (1H, d,  $J = 8,0$  Hz), 6,63 (1H, dd,  $J = 1,5; 8,0$  Hz), 6,68 (1H, d,  $J = 1,5$  Hz)], tín hiệu 02 nhóm methylenedioxy dưới dạng singlet  $\delta_H$  5,92 và 5,94. Phổ <sup>13</sup>C-NMR của **HH14** xuất hiện tín hiệu của 20 carbon, trong đó có 12 carbon có độ chuyển dịch hóa học  $\delta_C$  106,3–147,9, chỉ ra sự có mặt của 02 vòng thơm trong cấu trúc của **HH14**, tín hiệu của 02 nhóm methylenedioxy ở  $\delta_C$  100,9 và 101,0, 01 nhóm methin và 02 nhóm methylen liên kết với ôxy lần lượt ở  $\delta_C$  82,9; 72,9; 60,9, 02 nhóm methin ở  $\delta_C$  42,4; 52,6, 01 nhóm methylen  $\delta_C$  33,3 [187], [188]. Tín hiệu ion  $m/z$  357 [M+H]<sup>+</sup> của phổ ESI-MS kết hợp với phổ NMR chỉ ra công thức phân tử của **HH14** là C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>O<sub>6</sub>. So sánh phổ của **HH14** với phổ của hợp chất isocubein (hợp chất có các đặc điểm cấu trúc như đã phân tích và có cùng công thức phân tử C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>O<sub>6</sub>) xác định **HH14** là

**isocubein** [187], [188]. Hợp chất này lần đầu tiên được tổng hợp vào năm 1992 trong nghiên cứu của Hanessian S và cộng sự [188]. Đến năm 2008, lần đầu tiên isocubein được phân lập từ thiên nhiên trong loài *Daphne feddei*, họ Trâm (Thymelaeaceae) [187]. Đây là báo cáo đầu tiên về sự có mặt của isocubein trong một loài thuộc chi *Hypericum*.

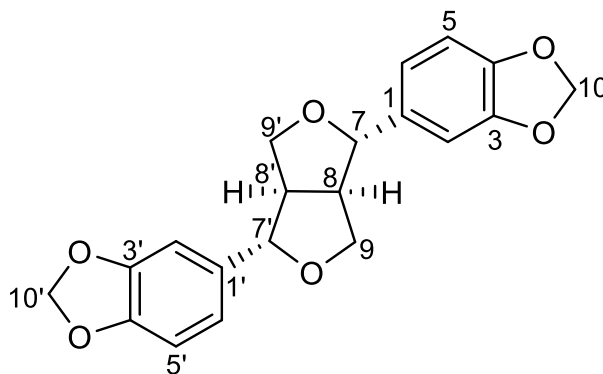
### 3.2.3.15. Hợp chất HH15:

Bột màu trắng ngà, độ tinh khiết 97% (tính theo diện tích pic HPLC, UV 210 nm). Phổ ESI-MS ( $m/z$ ) 353 [M-H]<sup>-</sup>. Phổ <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>; 500 MHz) và phổ <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>; 125 MHz): xem bảng 3.16.

Bảng 3.16. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất HH15

Vị trí C	* $\delta_C$	$\delta_C^{a,b}$	Nhóm carbon	$\delta_H^{a,c}$ (độ bội, J = Hz)
1	135,0	135,2	C	
2	106,5	106,6	CH	6,84 (d, 1,5)
3	147,1	147,2	C	
4	148,0	148,1	C	
5	108,2	108,3	CH	6,77 (d, 8,0)
6	119,4	119,5	CH	6,80 (dd, 1,5; 8,0)
7	85,6	85,9	CH	4,71 (d, 4,0)
8	54,3	54,5	CH	3,05 (m)
9	71,7	71,9	CH <sub>2</sub>	3,87 (m) 4,23 (dd, 7,0; 9,0)
10	101,1	101,2	CH <sub>2</sub>	5,95 (s)
1'	135,0	135,2	C	
2'	106,5	106,6	CH	6,84 (d, 1,5)
3'	147,1	147,2	C	
4'	148,0	148,1	C	
5'	108,2	108,3	CH	6,77 (d, 8,0)
6'	119,4	119,5	CH	6,80 (dd, 1,5; 8,0)
7'	85,6	85,9	CH	4,71 (d, 4,0)
8'	54,3	54,5	CH	3,05 (m)
9'	71,7	71,9	CH <sub>2</sub>	3,87 (m) 4,23 (dd, 7,0; 9,0)
10'	101,1	101,2	CH <sub>2</sub>	5,95 (s)

\* $\delta_C$  của sesamin đo trong CDCl<sub>3</sub> [189]; <sup>a</sup>Đo trong CDCl<sub>3</sub>, <sup>b</sup>125 MHz, <sup>c</sup>500 MHz.



Hình 3.27. Cấu trúc hóa học của hợp chất **HH15**

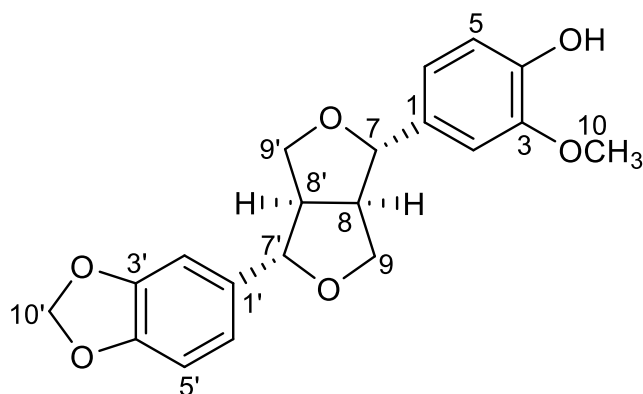
### 3.2.3.16. Hợp chất **HH16**:

Bột màu trắng ngà, độ tinh khiết 98% (tính theo diện tích pic HPLC, UV 210 nm). Phổ ESI-MS ( $m/z$ ) 357  $[M+H]^+$ . Phổ  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 500 MHz) và phổ  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 125 MHz): xem bảng 3.17.

Bảng 3.17. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất **HH16**

Vị trí C	* $\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}}$	Nhóm carbon	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,c}}$ (độ bội, $J = \text{Hz}$ )
1	132,8	132,9	C	-
2	108,5	108,8	CH	6,89 (m)
3	145,2	145,4	C	-
4	147,1	147,2	C	-
5	114,2	114,4	CH	6,76 (m)
6	118,9	119,1	CH	6,88 (m)
7	85,8	85,9	CH	4,72 (dd, 2,0; 9,5)
8	54,3	54,3	CH	3,07 (m)
9	71,6	71,8	CH <sub>2</sub>	3,84 (m) 4,23 (m)
10	55,9	56,1	CH <sub>3</sub>	3,90 (s)
1'	135,0	135,2	C	-
2'	106,4	106,6	CH	6,85 (m)
3'	146,6	146,8	C	-
4'	147,9	148,0	C	-
5'	108,1	108,3	CH	6,76 (m)
6'	119,3	119,5	CH	6,86 (m)
7'	85,8	85,8	CH	4,72 dd (2,0; 9,5)
8'	54,1	54,4	CH	3,07 (m)
9'	71,7	71,8	CH <sub>2</sub>	3,84 (m) 4,23 (m)
10'	101,0	101,2	CH <sub>2</sub>	5,95 (s)

\* $\delta_{\text{C}}$  của piperitol đo trong  $\text{CDCl}_3$  [190]; <sup>a</sup>Đo trong  $\text{CDCl}_3$ , <sup>b</sup>125 MHz, <sup>c</sup>500 MHz.



Hình 3.28. Cấu trúc hóa học của hợp chất **HH16**

Hai hợp chất **HH15** và **HH16** (Hình 3.23 và 3.24) được xác định là 02 hợp chất lignan sau khi phân tích các phổ NMR. Công thức phân tử của **HH15** và **HH16** lần lượt được xác định là  $C_{20}H_{18}O_6$  và  $C_{20}H_{20}O_6$  dựa vào các tín hiệu trên phổ ESI-MS. Phổ  $^1H$ -NMR của **HH15** và **HH16** đều xuất hiện tín hiệu của 06 proton thơm thuộc 02 nhóm ABX chỉ ra sự có mặt của 02 vòng thơm bị thế ở 03 vị trí 1,3,4 [189], [190]. Ngoài ra, phổ NMR của 02 hợp chất **HH15** và **HH16** đều cho biết sự xuất hiện khung tetrahydrofurofuran ( $C_7-C_9$ ,  $C_7-C_9$ , Bảng 3.17 và 3.18) liên kết với 02 vòng thơm. Điểm khác biệt chính giữa 02 hợp chất này là các nhóm thế gắn vào vòng thơm. Theo đó, **HH15** được xác định có 02 nhóm thế methylenedioxy [ $\delta_H$  5,95 (4H, s, H-10, H-10');  $\delta_C$  101,2 (C-10, C-10')], trong khi **HH16** chứa 01 nhóm thế methylenedioxy [ $\delta_H$  5,95 (2H, s, H-10');  $\delta_C$  101,2 (C-10')], 01 nhóm thế hydroxy và 01 nhóm thế methoxy [ $\delta_H$  3,90 (3H, s, H-10);  $\delta_C$  56,1 (C-10)]. Từ những dữ liệu đã phân tích, so sánh phổ của **HH15** và **HH16** với các tài liệu tham khảo [189], [190], xác định 02 hợp chất này lần lượt là **sesamin** và **piperitol**. Đây là lần đầu tiên 02 hợp chất furofuran lignan này được phân lập từ chi *Hypericum*.

### 3.2.3.17. Hợp chất **HH17**:

Bột màu vàng, độ tinh khiết 96% (tính theo diện tích pic HPLC, UV 210 nm). Phổ ESI-MS ( $m/z$ ) 287  $[M+H]^+$ . Phổ  $^1H$ -NMR ( $CD_3OD$ ; 500 MHz):  $\delta_H$  6,20 (1H, br s, H-6); 6,40 (1H, br s, H-8); 8,08 (2H, d,  $J=8,5$  Hz, H-2'; H-6'); 6,92 (2H, d,  $J=8,5$  Hz, H-3'; H-5'). Phổ  $^{13}C$ -NMR ( $CD_3OD$ ; 125 MHz): xem Bảng 3.19.

### 3.2.3.18. Hợp chất **HH18**:

Bột màu vàng, độ tinh khiết 88% (tính theo diện tích pic HPLC, UV 210 nm). Phổ ESI-MS ( $m/z$ ) 301  $[M-H]^-$ . Phổ  $^1H$ -NMR ( $DMSO-d_6$ ; 500 MHz):  $\delta_H$  6,20 (1H, br s, H-6); 6,42 (1H, br s, H-8); 7,69 (1H, br s, H-2'); 6,90 (1H, d,  $J=8,0$  Hz, H-5');



7,55 (1H, d,  $J=8,0$  Hz, H-6'). Phổ  $^{13}\text{C}$ -NMR (DMSO- $d_6$ ; 125 MHz): xem Bảng 3.19.

### 3.2.3.19. Hợp chất HH19:

Bột màu vàng, độ tinh khiết 90% (tính theo diện tích pic HPLC, UV 210 nm),  $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -75,1$  ( $c$  0,13; MeOH). Phổ ESI-MS ( $m/z$ ) 291  $[\text{M}+\text{H}]^+$ . Phổ  $^1\text{H}$ -NMR (acetone- $d_6$ ; 500 MHz):  $\delta_{\text{H}}$  4,87 (1H, br s, H-2); 4,20 (1H, br s, H-3); 2,73 (1H, dd,  $J=2,5$ ; 16,5 Hz, H-4a); 2,85 (1H, dd,  $J=4,5$ ; 16,5 Hz, H-4b); 6,02 (1H, d,  $J=2,0$  Hz, H-6); 5,92 (1H, d,  $J=2,0$  Hz, H-8); 7,05 (1H, br s, H-2'); 6,78 (1H, d,  $J=8,0$  Hz, H-5'); 6,83 (1H, d,  $J=8,0$  Hz, H-6'). Phổ  $^{13}\text{C}$ -NMR (acetone- $d_6$ ; 125 MHz): xem Bảng 3.19.

### 3.2.3.20. Hợp chất HH20:

Bột màu vàng, độ tinh khiết 92% (tính theo diện tích pic HPLC, UV 210 nm). Phổ ESI-MS ( $m/z$ ) 449  $[\text{M}+\text{H}]^+$ . Phổ  $^1\text{H}$ -NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 500 MHz):  $\delta_{\text{H}}$  6,22 (1H, d,  $J=2,0$  Hz, H-6); 6,38 (1H, d,  $J=2,0$  Hz, H-8); 7,36 (1H, br s, H-2'); 6,93 (1H, d,  $J=8,0$  Hz, H-5'); 7,33 (1H, dd,  $J=2,0$ ; 8,5 Hz, H-6'); 5,37 (1H, br s, H-1''); 0,96 (3H, d,  $J=6,0$  Hz, H-6''). Phổ  $^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 125 MHz): xem Bảng 3.19.

### 3.2.3.21. Hợp chất HH21:

Bột màu vàng, độ tinh khiết 91% (tính theo diện tích pic HPLC, UV 210 nm). Phổ ESI-MS ( $m/z$ ) 465  $[\text{M}+\text{H}]^+$ . Phổ  $^1\text{H}$ -NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 500 MHz):  $\delta_{\text{H}}$  6,22 (1H, d,  $J=2,0$  Hz, H-6); 6,42 (1H, d,  $J=2,0$  Hz, H-8); 7,85 (1H, d,  $J=2,0$  Hz, H-2'); 6,89 (1H, d,  $J=8,0$  Hz, H-5'); 7,61 (1H, dd,  $J=2,0$ ; 8,0 Hz, H-6'); 5,19 (1H, d,  $J=8,0$  Hz, H-1''). Phổ  $^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 125 MHz): xem Bảng 3.19.

### 3.2.3.22. Hợp chất HH22:

Bột màu vàng, độ tinh khiết 94% (tính theo diện tích pic HPLC, UV 210 nm). Phổ ESI-MS ( $m/z$ ) 449  $[\text{M}-\text{H}]^-$ . Phổ  $^1\text{H}$ -NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 500 MHz):  $\delta_{\text{H}}$  5,09 (1H, d,  $J=10,5$  Hz, H-2); 4,59 (1H, d,  $J=10,5$  Hz, H-3); 5,92 (1H, d,  $J=2,0$  Hz, H-6); 5,94 (1H, d,  $J=2,0$  Hz, H-8); 6,98 (1H, br s, H-2'); 6,86 (1H, d,  $J=8,0$  Hz, H-5'); 6,88 (1H, d,  $J=8,0$  Hz, H-6'); 4,08 (1H, br s, H-1''); 1,20 (3H, d,  $J=6,5$  Hz, H-6''). Phổ  $^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 125 MHz): xem Bảng 3.19.

### 3.2.3.23. Hợp chất HH23:

Bột màu vàng, độ tinh khiết 96% (tính theo diện tích pic HPLC, UV 210 nm). Phổ ESI-MS ( $m/z$ ) 433  $[\text{M}-\text{H}]^-$ . Phổ  $^1\text{H}$ -NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 500 MHz):  $\delta_{\text{H}}$  5,15 (1H, d,  $J=10,5$  Hz, H-2); 4,62 (1H, d,  $J=10,5$  Hz, H-3); 5,92 (1H, d,  $J=2,0$  Hz, H-6); 5,94

(1H, d,  $J=2,0$  Hz, H-8); 7,37 (2H, d,  $J=7,5$  Hz, H-2'; H-6'); 6,86 (2H, d,  $J=7,5$  Hz, H-3'; H-5'); 4,04 (1H, br s, H-1''); 1,20 (3H, d,  $J=6,0$  Hz, H-6''). Phổ  $^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 125 MHz): xem Bảng 3.19.

#### 3.2.3.24. Hợp chất HH24:

Bột màu vàng, độ tinh khiết 85% (tính theo diện tích pic HPLC, UV 210 nm). Phổ ESI-MS ( $m/z$ ) 477  $[\text{M}-\text{H}]^-$ . Phổ  $^1\text{H}$ -NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 500 MHz):  $\delta_{\text{H}}$  6,22 (1H, d,  $J=2,0$  Hz, H-6); 6,42 (1H, d,  $J=2,0$  Hz, H-8); 7,94 (1H, d,  $J=2,0$  Hz, H-2'); 6,93 (1H, d,  $J=8,0$  Hz, H-5'); 7,61 (1H, dd,  $J=2,0$ ; 8,0 Hz, H-6'); 5,41 (1H, d,  $J=7,5$  Hz, H-1''); 3,96 (3H, s, 3'-OCH<sub>3</sub>). Phổ  $^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 125 MHz): xem Bảng 3.18.

#### 3.2.3.25. Hợp chất HH25:

Bột màu vàng, độ tinh khiết 89% (tính theo diện tích pic HPLC, UV 210 nm). Phổ ESI-MS ( $m/z$ ) 633  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ . Phổ  $^1\text{H}$ -NMR ( $\text{DMSO}-d_6$ ; 500 MHz):  $\delta_{\text{H}}$  6,19 (1H, d,  $J=2,0$  Hz, H-6); 6,38 (1H, d,  $J=2,0$  Hz, H-8); 7,53 (1H, br s, H-2'); 6,84 (1H, d,  $J=8,0$  Hz, H-5'); 7,54 (1H, dd,  $J=8,0$  Hz, H-6'); 5,34 (1H, d,  $J=7,5$  Hz, H-1''); 3,29 (1H, m, H-6''a); 3,71 (1H, d,  $J=10,5$  Hz, H-6''b); 4,39 (1H, d,  $J=1,5$  Hz, H-1'''); 0,99 (3H, d,  $J=6,5$  Hz, H-6'''). Phổ  $^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{DMSO}-d_6$ ; 125 MHz): xem Bảng 3.19.

#### 3.2.3.26. Hợp chất HH26:

Bột màu vàng, độ tinh khiết 91% (tính theo diện tích pic HPLC, UV 210 nm). Phổ ESI-MS ( $m/z$ ) 593  $[\text{M}-\text{H}]^-$ . Phổ  $^1\text{H}$ -NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 500 MHz):  $\delta_{\text{H}}$  6,22 (1H, d,  $J=1,5$  Hz, H-6); 6,41 (1H, br s, H-8); 8,08 (2H, d,  $J=8,5$  Hz, H-2'; H-6'); 6,91 (2H, d,  $J=8,5$  Hz, H-3'; H-5'); 5,14 (1H, d,  $J=7,0$  Hz, H-1''); 3,54 (1H, dd,  $J=5,5$ ; 11,5 Hz, H-6''a); 3,83 (1H, dd,  $J=1,5$ ; 11,5 Hz, H-6''b); 4,54 (1H, br s, H-1'''); 1,14 (3H, d,  $J=6,5$  Hz, H-6'''). Phổ  $^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 125 MHz): xem Bảng 3.18.

Bảng 3.18. Số liệu phổ  $^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz) của các chất HH17–HH26 ( $\delta_{\text{C}}$  ppm)

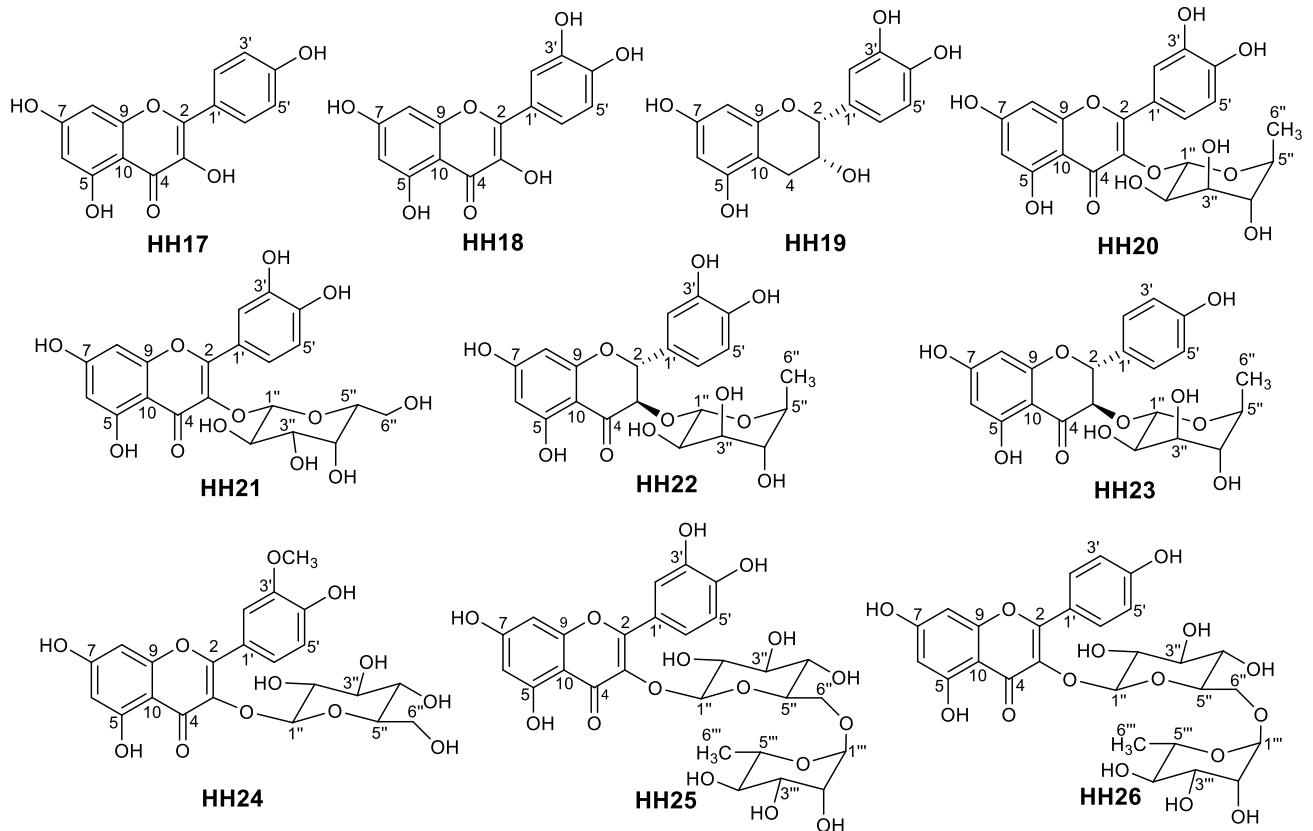
Vị trí	HH17 <sup>a</sup>	HH18 <sup>b</sup>	HH19 <sup>c</sup>	HH20 <sup>a</sup>	HH21 <sup>a</sup>	HH22 <sup>a</sup>	HH23 <sup>a</sup>	HH24 <sup>a</sup>	HH25 <sup>b</sup>	HH26 <sup>a</sup>
2	148,1	146,8	79,4	158,5	158,4	83,9	83,8	158,7	156,5	158,6
3	137,1	135,8	66,9	136,2	135,8	78,6	78,7	135,4	133,3	135,5
4	177,3	175,9	29,3	179,6	179,6	196,0	196,0	179,4	177,3	179,4
5	162,4	160,8	99,8	163,2	163,0	165,5	165,5	163,1	161,2	163,0
6	99,3	98,2	96,2	99,8	99,9	97,3	97,4	99,9	98,6	100,1
7	165,5	163,9	157,6	165,9	166,1	168,6	168,6	166,0	164,0	166,5

Vị trí	HH17 <sup>a</sup>	HH18 <sup>b</sup>	HH19 <sup>c</sup>	HH20 <sup>a</sup>	HH21 <sup>a</sup>	HH22 <sup>a</sup>	HH23 <sup>a</sup>	HH24 <sup>a</sup>	HH25 <sup>b</sup>	HH26 <sup>a</sup>
8	94,5	93,4	95,7	94,7	94,7	96,3	96,3	94,8	93,5	95,0
9	158,2	156,2	157,1	159,3	158,8	164,1	164,1	158,5	156,4	159,4
10	104,5	103,1	99,8	105,9	105,6	102,5	102,2	105,8	103,9	105,6
1'	123,7	122,0	132,2	122,9	122,9	129,2	128,6	123,1	121,5	122,8
2'	130,7	115,1	115,2	116,4	117,8	116,3	130,0	114,4	116,2	132,4
3'	116,3	145,1	145,4	146,4	145,8	146,5	116,4	148,4	144,7	116,1
4'	160,5	147,6	145,3	149,8	150,0	147,4	159,4	150,8	148,4	161,5
5'	116,3	115,6	115,4	117,0	116,1	115,5	116,4	116,0	115,2	116,1
6'	130,7	120,1	119,3	123,0	123,0	120,5	130,0	123,9	121,1	132,4
1''				103,6	105,6	102,1	102,5	103,7	101,2	104,7
2''				72,1	73,2	71,8	71,8	75,9	74,0	75,8
3''				72,2	75,1	72,2	72,2	78,5	76,4	78,2
4''				73,3	70,0	73,8	73,8	71,5	70,5	71,5
5''				71,9	77,2	70,5	70,5	78,1	75,9	77,2
6''				17,6	62,0	17,9	17,8	62,6	66,9	68,6
1'''									100,7	102,4
2'''									70,0	72,1
3'''									70,3	72,3
4'''									71,8	73,9
5'''									68,2	69,7
6'''									17,7	17,9
3'- OCH <sub>3</sub>								56,8		

<sup>a</sup> Đo trong CD<sub>3</sub>OD; <sup>b</sup> Đo trong DMSO-d<sub>6</sub>; <sup>c</sup> Đo trong aceton-d<sub>6</sub>

Hợp chất **HH17** thu được dưới dạng bột màu vàng. Phổ <sup>13</sup>C-NMR của **HH17** xuất hiện tất cả mười ba tín hiệu cacbon, trong đó có một tín hiệu keton carbon tại  $\delta_C$  177,3 và mười hai tín hiệu ở trường thấp đặc trưng cho carbon của vòng thơm hay của liên kết đôi C=C ( $\delta_C$  94,5-165,5). Phổ <sup>1</sup>H-NMR cho các tín hiệu của 06 proton vòng thơm tại  $\delta_H$  6,20-8,08 ppm. Các dữ kiện phổ NMR ở trên kết hợp với những tài liệu đã công bố về thành phần hóa học của các loài thuộc chi *Hypericum* [2] cho biết **HH17** là một flavonoid (chỉ có các nhóm thế hydroxy trong cấu trúc). Hai tín hiệu doublet của 04 proton thơm lần lượt ở  $\delta_H$  8,08 (2H, d,  $J = 8,5$  Hz) và 6,92 (2H, d,  $J = 8,5$  Hz) được xác định là các proton ở vị trí H-2', H-6' và H-3', H-5' vòng B của một flavonoid [191], [192]. Do cacbon ở vị trí C-2'/C-6' và C-3'/C-5'

đối xứng với nhau từng đôi một nên trên phổ  $^{13}\text{C-NMR}$  của **HH17** chỉ xuất hiện tín hiệu của 13 carbon tương ứng với 15 carbon như khung cơ bản  $\text{C}_6\text{-C}_3\text{-C}_6$  của một flavonoid. Hai tín hiệu proton ghép cặp *meta*  $\delta_{\text{H}}$  6,20 (br s) và 6,41 (br s) còn lại được xác định lần lượt là hai proton ở vị trí H-6 và H-8 vòng A. Phổ khối ESI-MS có pic ion  $m/z$  287  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (positive) cho biết khối lượng phân tử của **HH17** là  $\text{M}=286$ . Phân tích các dữ kiện phổ, tham khảo tài liệu đã công bố [191], [192], xác định hợp chất **HH17** là **kaempferol**.



Hình 3.29. Công thức cấu tạo của các hợp chất **HH17–HH26**

Các dữ kiện phổ  $^1\text{H-NMR}$  và  $^{13}\text{C-NMR}$  của **HH18** gần giống với **HH17** cho biết **HH18** cũng là một flavonoid. Phổ  $^1\text{H-NMR}$  của hợp chất **HH18** xuất hiện tín hiệu của 05 proton thơm thay vì 06 proton như trong hợp chất **HH17**. Trong 05 proton thơm của **HH18**, có 03 proton ghép cặp dưới dạng ABX được xác định là các proton ở vị trí H-2' ( $\delta_{\text{H}}$  7,69 br s), H-5' ( $\delta_{\text{H}}$  6,90, d,  $J = 8,0$  Hz), H-6' ( $\delta_{\text{H}}$  7,55, d,  $J = 8,0$  Hz) vòng B của một flavonoid. Hai proton ghép cặp *meta* ở  $\delta_{\text{H}}$  6,20 (br s) và 6,42 (br s) còn lại được xác định lần lượt là hai proton ở vị trí H-6 và H-8 vòng A.

Phân tích các dữ kiện phổ, xác định hợp chất **HH18** là một flavonol với vòng A có 02 nhóm thế và vòng B cũng có 02 nhóm thế. Phổ ESI-MS xuất hiện pic ion  $m/z$  301  $[M-H]^-$  gợi ý công thức phân tử của **HH18** là  $C_{15}H_{10}O_7$  ( $M=302$ ). **HH18** được xác định là hợp chất **quercetin** sau khi đối chiếu, so sánh dữ kiện phổ thực nghiệm với dữ kiện phổ trong các tài liệu tham khảo [184], [185].

Hợp chất **HH19** cũng là một flavonoid với các tín hiệu của vòng A và vòng B tương tự như **HH18**. Điểm khác biệt giữa 02 hợp chất này là các tín hiệu của vòng C. Theo đó, phổ  $^{13}C$ -NMR và phổ DEPT của **HH19** xuất hiện tín hiệu của 02 oxymethin carbon ở  $\delta_C$  66,9; 79,4 và 01 nhóm methylen  $\delta_C$  29,3. Các tín hiệu phổ NMR của hợp chất **HH19** đã phân tích, gợi ý đây là một hợp chất flavonoid với khung flavan-3-ol [193], [194]. Tín hiệu của các proton H-2 và H-3 trong **HH19** xuất hiện dưới dạng pic đơn rộng (broad singlet) thay vì doublet với hằng số ghép cặp  $J > 7,0$  Hz khẳng định proton H-2 và H-3 của **HH19** ở vị trí *cis* [193]. Phổ ESI-MS có pic ion tại  $(m/z)=291$   $[M+H]^+$ , kết hợp quan sát các phổ  $^1H$  và  $^{13}C$ -NMR cho biết công thức phân tử của **HH19** là  $C_{15}H_{14}O_6$  ( $M=290$ ). Phân tích tất cả các dữ kiện phổ NMR, giá trị  $[\alpha]_D^{25}$ , tham khảo tài liệu [193], [194] xác định, **HH19** là hợp chất **(-)-epicatechin**.

Hợp chất **HH20** thu được dưới dạng bột màu vàng và cũng được xác định là một hợp chất flavonoid. Tuy nhiên khác với các hợp chất **HH17–HH19**, phổ NMR của **HH20** ngoài các tín hiệu của phần aglycon còn xuất hiện thêm các tín hiệu của gốc đường. Các số liệu phổ phần aglycon của **HH20** rất giống với phổ của hợp chất **HH18** (quercetin), bao gồm 05 tín hiệu proton vòng thơm (03 proton tương tác với nhau dạng ABX và 02 proton ghép cặp *meta*). Vì vậy, **HH20** được dự đoán là một flavonoid-*O*-glycosid với phần aglycon là quercetin (**HH18**). Phần đường trong hợp chất **HH20** được xác định là  $\alpha$ -L-rhamnopyranose dựa trên các tín hiệu của proton anome ở  $\delta_H$  5,37 (br s) và 01 tín hiệu nhóm methyl ở  $\delta_H$  0,96 (d,  $J=6,0$  Hz) [195], [196]. Gốc đường được xác định gắn vào vị trí C-3 của phần aglycon do xuất hiện tương tác của H-1'' ( $\delta_H$  5,37) và C-3 ( $\delta_C$  136,2) trên phổ HMBC. Như vậy, hợp chất **HH20** có thể là quercetin-3-*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyranosid hay còn có tên gọi khác là quercitrin. So sánh số liệu phổ thu được từ thực nghiệm với các số liệu phổ đã được công bố của quercitrin [195],

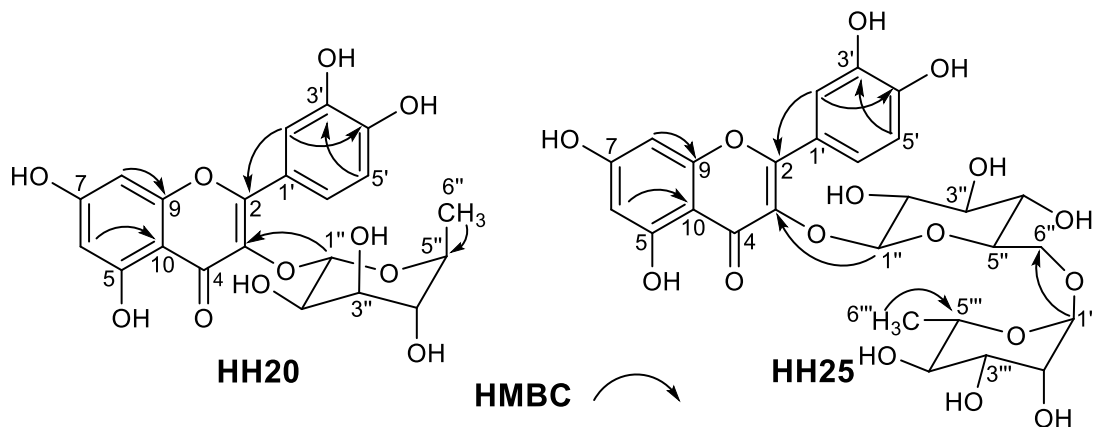
[196] khẳng định hợp chất **HH20** phân lập được là **quercitrin**.

Ba hợp chất (**HH21–HH23**) cũng được xác định là các flavonoid-*O*-glycosid với 01 gốc đường trong cấu trúc. **HH21** có phần aglycon là quercetin và phần đường được gắn vào vị trí C-3 tương tự như **HH20** (Bảng 3.19). Điểm khác biệt giữa **HH20** và **HH21** là sự xuất hiện các tín hiệu của gốc đường  $\beta$ -D-galactopyranose trong **HH21** ( $\delta_C$  105,6; 77,2; 75,1; 73,2; 70,0; 62,0) [197] thay vì  $\alpha$ -L-rhamnopyranose như trong **HH20**. Các tín hiệu phổ NMR của **HH22** và **HH23** (Bảng 3.19) cho biết 02 hợp chất này có cùng gốc đường  $\alpha$ -L-rhamnopyranose [198]. Phần aglycon của **HH22** và **HH23** được xác định là các flavanonol với các tín hiệu của nhóm keton C-4 ở  $\delta_C$  196,0 và 02 oxymethin cacbon C-2 ( $\delta_C$  83,9 đối với **HH22** và  $\delta_C$  83,8 đối với **HH23**) và C-3 ( $\delta_C$  78,6 đối với **HH22** và  $\delta_C$  78,7 đối với **HH23**). Sự khác biệt giữa 02 chất **HH22** và **HH23** nằm ở vòng B của khung aglycon. Theo đó các proton vòng B của hợp chất **HH22** ghép cặp ABX, trong khi các proton vòng B của **HH23** ghép cặp dưới dạng AA'BB'. Tín hiệu của proton H-2 và H-3 trong các hợp chất **HH22** và **HH23** xuất hiện dưới dạng doublet với hằng số ghép cặp  $J = 10,5$  Hz cho biết proton H-2 và H-3 ở vị trí *trans* [197]. Phân tích số liệu phổ thu được của **HH21–HH23**, tham khảo tài liệu đã công bố khẳng định các hợp chất đó lần lượt là **hyperoside** [198], **astilbin** [199] và **engeletin** [199].

Hợp chất **HH24** được xác định là một flavonoid glycosid với phần aglycon có chứa một nhóm thế methoxy [ $\delta_H$  3,96;  $\delta_C$  56,8]. Phổ  $^1\text{H-NMR}$  của **HH24** xuất hiện tín hiệu của 03 proton ghép cặp dưới dạng ABX được xác định là các proton ở vị trí H-2' ( $\delta_H$  7,69, d,  $J = 2,0$  Hz), H-5' ( $\delta_H$  6,93, d,  $J = 8,0$  Hz), H-6' ( $\delta_H$  7,61, dd,  $J = 2,0; 8,0$  Hz) vòng B của một flavonoid. Hai proton ghép cặp *meta* ở  $\delta_H$  6,22 (d,  $J = 2,0$  Hz) và 6,42 (br s) còn lại được xác định lần lượt là hai proton ở vị trí H-6 và H-8 vòng A, tương tự như hợp chất **HH18**. Gốc đường trong **HH24** được nhận định gồm 06 carbon và có cấu hình  $\beta$  từ hằng số ghép cặp  $J = 7,5$  Hz của proton anome và số lượng carbon trên phổ  $^{13}\text{C-NMR}$ . So sánh phổ của **HH24** và phổ của isorhamnetin-3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosid trong tài liệu [200], khẳng định **HH24** là hợp chất **isorhamnetin-3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosid**.

Phần aglycon của hợp chất flavonoid **HH25** được dự đoán là quercetin

(**HH18**) dựa trên các tín hiệu phổ  $^1\text{H}$  và  $^{13}\text{C}$ -NMR (Bảng 3.19). Khác với các hợp chất **HH20–HH24**, **HH25** có 02 gốc đường trong cấu trúc do trên phổ  $^{13}\text{C}$ -NMR xuất hiện thêm 12 tín hiệu carbon cùng với 15 tín hiệu carbon của khung aglycon. Hai gốc đường của **HH25** được xác định bao gồm 01 đường  $\alpha$ -L-rhamnopyranose và 01 đường  $\beta$ -D-glucopyranose dựa trên hằng số ghép cặp của các proton anome, độ chuyển dịch của các carbon, và so sánh với tài liệu tham khảo [184], [201]. Hai gốc đường này liên kết với nhau tạo thành mảnh cấu trúc dạng  $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopyranosyl do trên phổ HMBC xuất hiện tương tác H-1''' ( $\delta_{\text{H}}$  4,39) và C-6'' ( $\delta_{\text{C}}$  66,9). Gốc đường  $\beta$ -D-glucopyranose được quy kết gắn vào vị trí C-3 của khung aglycon do xuất hiện tương tác HMBC của H-1'' ( $\delta_{\text{H}}$  5,34, d,  $J=7,5$  Hz,) và C-3 ( $\delta_{\text{C}}$  133,3) (Hình 3.29). Từ những phân tích ở trên, dự đoán **HH25** là hợp chất quercetin-3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopyranosid (tên gọi rutin) [184]. Phổ ESI-MS có đỉnh ion tại  $m/z$  633  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , cho biết công thức phân tử của **HH25** là  $\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{16}$  ( $M=610$ ), phù hợp với công thức phân tử của hợp chất rutin. Do đó, hợp chất **HH25** được xác định là **rutin**.



Hình 3.30. Các tương tác HMBC chính của **HH20** và **HH25**

Hợp chất **HH26** thu được cũng là một flavonoid diglycosid với 02 gốc đường liên kết với nhau tạo thành mảnh  $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopyranosyl tương tự như hợp chất **HH25**. Điểm khác biệt chính giữa **HH25** và **HH26** là các tín hiệu của vòng B khung aglycon. Theo đó, phổ  $^1\text{H}$ -NMR vòng B của **HH26** xuất hiện 04 proton tương tác với nhau dạng AA'BB' thay vì tương tác dạng ABX như trong **HH25**. Do đó, **HH26** được dự đoán là hợp chất kaempferol-3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopyranosid, tên thường gọi nicotiflorin. So sánh

phổ thực nghiệm với số liệu phổ của hợp chất nicotiflorin [201] thấy hoàn toàn trùng khớp, cho phép khẳng định **HH26** là hợp chất **nicotiflorin**.

### 3.2.3.27. Hợp chất **HH27**:

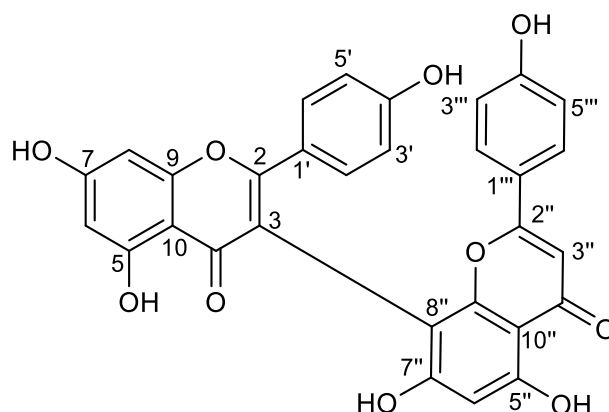
Bột màu vàng, độ tinh khiết 90% (tính theo diện tích pic HPLC, UV 210 nm). Phổ ESI-MS ( $m/z$ ) 537  $[M-H]^-$ . Phổ  $^1H$ -NMR ( $CD_3OD$ ; 500 MHz) và phổ  $^{13}C$ -NMR ( $CD_3OD$ ; 125 MHz): xem bảng 3.19.

Bảng 3.19. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất **HH27**

Vị trí C	* $\delta_C$	$\delta_C^{a,b}$	Nhóm carbon	$\delta_H^{a,c}$ (độ bội, $J = Hz$ )
2	165,9	165,1	C	-
3	112,1	111,3	C	-
4	183,9	183,3	C	-
5	162,7	162,9	C	-
6	100,4	99,8	CH	6,33 (d, 2,0)
7	165,9	165,1	C	-
8	95,1	94,6	CH	6,57 (d, 1,5)
9	159,6	160,8	C	-
10	104,7	105,5	C	-
1'	125,2	124,8	C	-
2'	131,0	130,9	CH	7,49 (d, 9,0)
3'	116,1	116,0	CH	6,77 (d, 8,5)
4'	163,4	163,4	C	-
5'	116,1	116,0	CH	6,77 (d, 8,5)
6'	131,0	130,9	CH	7,49 (d, 9,0)
2''	166,9	165,2	C	-
3''	103,6	103,9	CH	6,60 (s)
4''	182,8	182,1	C	-
5''	161,2	161,9	C	-
6''	100,5	99,8	CH	6,34 (s)
7''	165,3	165,1	C	-
8''	101,2	100,4	C	-
9''	156,9	156,4	C	-
10''	105,3	105,5	C	-
1'''	123,2	123,1	C	-
2'''	129,1	129,0	CH	7,67 (d, 8,5)
3'''	117,0	116,8	CH	6,87 (d, 9,0)
4'''	163,1	163,1	C	-
5'''	117,0	116,8	CH	6,87 (d, 9,0)
6'''	129,1	129,0	CH	7,67 (d, 8,5)
5-OH				13,09 (s)
5''-OH				12,96 (s)

\* $\delta_C$  của 3,8''-biapigenin đo trong acetone- $d_6$  [202]; <sup>a</sup>Đo trong acetone- $d_6$ , <sup>b</sup>125 MHz, <sup>c</sup>500 MHz.





Hình 3.31. Cấu trúc hóa học của hợp chất **HH27**

Hợp chất **HH27** thu được dưới dạng bột màu vàng. Phổ  $^1\text{H-NMR}$  của **HH27** xuất hiện tín hiệu của 02 nhóm proton thơm ghép cặp dưới dạng AA'BB' ở  $\delta_{\text{H}}$  7,67 (2H, d,  $J = 8,5$  Hz); 6,87 (2H, d,  $J = 9,0$  Hz); 7,49 (2H, d,  $J = 9,0$  Hz); 6,77 (2H, d,  $J = 8,5$  Hz), 02 tín hiệu proton thơm ghép cặp dưới dạng *meta* ở  $\delta_{\text{H}}$  6,33 (d,  $J = 2,0$  Hz); 6,57 (d,  $J = 1,5$  Hz) và 02 tín hiệu proton xuất hiện dưới dạng pic đơn ở  $\delta_{\text{H}}$  6,60 và 6,34 ppm. Phổ  $^{13}\text{C-NMR}$  của **HH27** xuất hiện 26 tín hiệu trong đó có 04 tín hiệu cao gấp đôi so với các tín hiệu còn lại. Kết hợp với phổ  $^1\text{H-NMR}$  xác định **HH27** có 30 nguyên tử carbon trong đó có 08 carbon đối xứng với nhau từng đôi một. Với việc có 30 nguyên tử cacbon, bột màu vàng cùng với các tín hiệu trên phổ  $^1\text{H-NMR}$  dự đoán **HH27** là hợp chất biflavonoid [202], [203]. Phổ ESI-MS có pic ion tại  $(m/z)=537$   $[\text{M-H}]^-$  cho biết công thức phân tử của **HH27** là  $\text{C}_{30}\text{H}_{18}\text{O}_{10}$  ( $M=538$ ). So sánh những dữ liệu phổ thu được với hợp chất 3,8''-biapigenin đã công bố [202] cho thấy có sự trùng khớp (Bảng 3.20). Như vậy, **HH27** được xác định là **3,8''-biapigenin**, hợp chất có công thức phân tử  $\text{C}_{30}\text{H}_{18}\text{O}_{10}$ .

### 3.2.3.28. Hợp chất **HH28**:

Bột màu vàng nhạt, độ tinh khiết 96% (tính theo diện tích pic HPLC, UV 210 nm). Phổ ESI-MS  $(m/z)$  179  $[\text{M-H}]^-$ . Phổ  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 500 MHz):  $\delta_{\text{H}}$  6,24 (1H, d,  $J=16,0$  Hz, H-8); 6,79 (1H, d,  $J=8,0$  Hz, H-5); 6,95 (1H, dd,  $J = 2,0$ ; 8,0 Hz, H-6); 7,05 (1H, d,  $J=2,0$  Hz, H-2); 7,55 (1H, d,  $J=16,0$  Hz, H-7). Phổ  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 125 MHz): xem bảng 3.21.

### 3.2.3.29. Hợp chất **HH29**:

Bột màu vàng, độ tinh khiết 97% (tính theo diện tích pic HPLC, UV 210 nm). Phổ  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 500 MHz):  $\delta_{\text{H}}$  3,92 (3H, s, 3-OCH<sub>3</sub>); 6,32 (1H, d,  $J=16,0$  Hz, H-8); 6,83 (1H, d,  $J=8,0$  Hz, H-5); 7,08 (1H, dd,  $J=2,0$ ; 8,0 Hz, H-6); 7,19 (1H, d,  $J=2,0$  Hz, H-2); 7,62 (1H, d,  $J=16,0$  Hz, H-7). Phổ  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 125 MHz): xem bảng 3.21.

### 3.2.3.30. Hợp chất HH30:

Bột màu trắng ngà, độ tinh khiết 95% (tính theo diện tích pic HPLC, UV 210 nm). Phổ ESI-MS ( $m/z$ ) 163  $[\text{M-H}]^-$ . Phổ  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 500 MHz):  $\delta_{\text{H}}$  6,30 (1H, d,  $J=16,0$  Hz, H-8); 6,83 (2H, d,  $J=8,5$  Hz, H-3, H-5); 7,46 (2H, d,  $J=8,5$  Hz, H-3, H-5); 7,62 (1H, d,  $J=16,0$  Hz, H-7). Phổ  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 125 MHz): xem bảng 3.21.

### 3.2.3.31. Hợp chất HH31:

Bột màu trắng ngà, độ tinh khiết 88% (tính theo diện tích pic HPLC, UV 210 nm). Phổ ESI-MS ( $m/z$ ) 205  $[\text{M-H}]^-$ . Phổ  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 600 MHz):  $\delta_{\text{H}}$  6,30 (1H, d,  $J=16,2$  Hz, H-8); 6,90 (2H, d,  $J=9,0$  Hz, H-3, H-5); 7,47 (2H, d,  $J=9,0$  Hz, H-2, H-6); 7,64 (1H, d,  $J=16,2$  Hz, H-7); 3,84 (3H, s, 4-OCH<sub>3</sub>); 4,25 (2H, q,  $J=7,2$  Hz, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 1,33 (3H, t,  $J=7,2$  Hz, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>). Phổ  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 125 MHz): xem bảng 3.21.

### 3.2.3.32. Hợp chất HH32:

Bột màu trắng ngà, độ tinh khiết 87% (tính theo diện tích pic HPLC, UV 210 nm). Phổ  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 600 MHz):  $\delta_{\text{H}}$  6,29 (1H, d,  $J=16,2$  Hz, H-8); 6,83 (2H, d,  $J=8,4$  Hz, H-3, H-5); 7,43 (2H, d,  $J=8,4$  Hz, H-2, H-6); 7,61 (1H, d,  $J=16,2$  Hz, H-7); 4,25 (2H, q,  $J=7,2$  Hz, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 1,33 (3H, t,  $J=7,2$  Hz, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

### 3.2.3.33. Hợp chất HH33:

Bột màu trắng ngà, độ tinh khiết 93% (tính theo diện tích pic HPLC, UV 210 nm). Phổ ESI-MS ( $m/z$ ) 355  $[\text{M+H}]^+$ . Phổ  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 500 MHz):  $\delta_{\text{H}}$  2,00–2,23 (4H, m, H-2', H-6'); 3,74 (1H, dd,  $J=3,0$ ; 8,5 Hz, H-4'); 4,19 (1H, dt,  $J=3,0$ ; 5,5 Hz, H-3'); 5,32 (1H, ddd,  $J=4,5$ ; 8,5; 9,0 Hz, H-5'); 6,27 (1H, d,  $J=16,0$  Hz, H-8);

6,79 (1H, d,  $J=8,5$  Hz, H-5); 6,97 (1H, dd,  $J=2,0; 7,5$  Hz, H-6); 7,06 (1H, d,  $J=2,0$  Hz, H-2); 7,57 (1H, d,  $J=16,0$  Hz, H-7). Phổ  $^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 125 MHz): xem bảng 3.21.

### 3.2.3.34. Hợp chất HH34:

Bột màu trắng ngà, độ tinh khiết 89% (tính theo diện tích pic HPLC, UV 210 nm). Phổ  $^1\text{H}$ -NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 500 MHz):  $\delta_{\text{H}}$  3,91 (6H, s, 3-OCH<sub>3</sub>, 5-OCH<sub>3</sub>); 7,35 (2H, s, H-2, H-4). Phổ  $^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 125 MHz): xem bảng 3.20.

Bảng 3.20. Số liệu phổ  $^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz) của các chất **HH28–HH34** ( $\delta_{\text{C}}$  ppm)

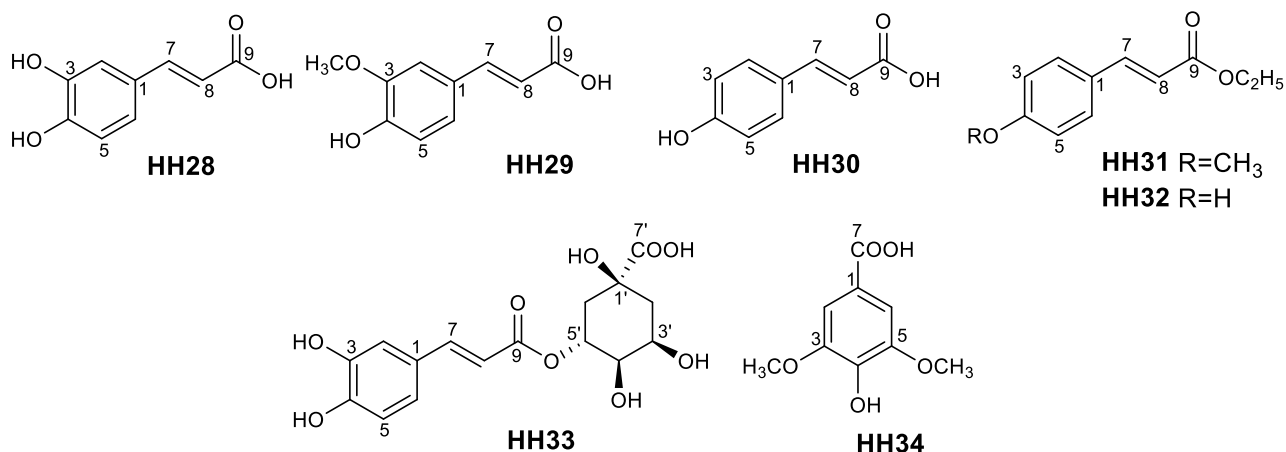
Vị trí	HH28 <sup>a</sup>	HH29 <sup>a</sup>	HH30 <sup>a</sup>	HH31 <sup>b</sup>	HH33 <sup>a</sup>	HH34 <sup>a</sup>
1	127,8	127,8	127,3	127,2	127,8	121,9
2	115,1	111,8	131,1	129,8	115,2	108,4
3	146,8	149,4	116,8	114,5	146,8	148,9
4	149,4	150,5	161,1	161,5	149,6	141,7
5	116,5	116,5	116,8	114,5	116,5	148,9
6	122,8	123,9	131,1	129,8	123,0	108,4
7	146,8	146,9	146,6	144,4	147,0	169,9
8	115,5	115,9	115,6	115,9	115,3	
9	171,0	171,0	171,0	167,5	168,7	
1'					76,1	
2'					38,2	
3'					71,3	
4'					73,5	
5'					72,0	
6'					38,8	
7'					177,0	
3-OCH <sub>3</sub>		56,5				56,8
4-OCH <sub>3</sub>				55,5		
5-OCH <sub>3</sub>						56,8
OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>				60,5		
OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>				14,5		

<sup>a</sup> Đo trong  $\text{CD}_3\text{OD}$ ; <sup>b</sup> Đo trong  $\text{CDCl}_3$

Hợp chất **HH28** thu được dưới dạng bột màu vàng nhạt. Phổ khối ESI-MS có đỉnh ion tại  $m/z$  179  $[\text{M}-\text{H}]^-$ , kết hợp với các dữ kiện phổ NMR cho biết công thức phân tử của **HH28** là  $\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_4$ . Phổ  $^{13}\text{C}$ -NMR và DEPT cho tín hiệu của 09 carbon,

trong đó có 08 nguyên tử carbon có độ chuyển dịch nằm trong vùng của vòng thơm hoặc liên kết C=C ( $\delta_C$  115,1–149,4), 01 nguyên tử carbon của nhóm cacbonyl  $\delta_C$  171,0. Phổ  $^1\text{H-NMR}$  xuất hiện 03 tín hiệu của proton nhân thơm đặc trưng cho hệ spin ABX ở  $\delta_H$  6,79 (d,  $J = 8,0$  Hz), 6,95 (dd,  $J = 2,0, 8,0$  Hz), 7,05 (d,  $J = 2,0$  Hz); 02 proton xuất hiện dưới dạng doublet tại  $\delta_H$  6,24 và 7,55 với hằng số ghép cặp  $J=16,0$  Hz đặc trưng cho 2 proton olefin cấu hình *trans*. Dựa trên dữ liệu phổ khối, **HH28** được nhận định chứa 01 vòng thơm với 3 nhóm thế bao gồm 01 nhóm olefin (-CH=CH-) liên kết với nhóm carboxyl (-COOH), và 2 nhóm hydroxy (-OH). Các đặc điểm cấu trúc của **HH28** cho thấy đây có thể là hợp chất acid caffeic. So sánh dữ liệu phổ thu được từ thực nghiệm với tài liệu tham khảo của acid caffeic thấy hoàn toàn trùng khớp [204], [205]. Do đó, hợp chất **HH28** được xác định là **acid caffeic**.

Các hợp chất **HH29** và **HH30** cũng được xác định là các hợp chất acid phenolic có cấu trúc gần giống với **HH28**. Điểm khác biệt giữa các hợp chất này là các nhóm thế của vòng thơm. Theo đó, phổ  $^1\text{H-NMR}$  của **HH29** xuất hiện thêm tín hiệu của 01 nhóm methoxy ( $\delta_H$  3,92) khi so với **HH28**, trong khi đó phổ  $^1\text{H-NMR}$  của **HH30** xuất hiện 04 proton thơm ghép cặp AABB thay vì 03 proton thơm ghép cặp ABX như trong **HH28**. Carbon ở vị trí C-2 ( $\delta_C$  111,8) của **HH29** xuất hiện ở độ chuyển dịch thấp hơn 3,3 ppm khi so với độ chuyển dịch của carbon ở vị trí C-2 ( $\delta_C$  115,1) của **HH28** gợi ý nhóm  $\text{OCH}_3$  được gắn vào vị trí C-3 trong **HH29** [206]. So sánh dữ liệu phổ NMR của **HH29** với acid isoferulic (hợp chất có nhóm  $\text{OCH}_3$  đính vào vị trí C-4) [207] và acid ferulic (hợp chất có nhóm  $\text{OCH}_3$  đính vào vị trí C-3) [208] cho thấy sự giống nhau giữa phổ NMR của **HH29** và hợp chất acid ferulic. Do đó, các hợp chất **HH29** và **HH30** lần lượt được xác định là **acid ferulic** [208] và **acid p-coumaric** [209].



Hình 3.32. Cấu trúc hóa học của các hợp chất **HH28–HH34**

Hai hợp chất **HH31** và **HH32** được xác định là các dẫn xuất ethyl este của acid *p*-coumaric dựa trên các tín hiệu [ $\delta_{\text{H}}$  4,25 (2H, q,  $J = 7,2$  Hz,  $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ); 1,33 (3H, t,  $J = 7,2$  Hz,  $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ )]. Sự khác nhau giữa 02 hợp chất này là nhóm thế gắn vào vòng thơm. Theo đó, **HH31** có nhóm thế methoxy [ $\delta_{\text{H}}$  3,84 (3H, s, 4- $\text{OCH}_3$ ),  $\delta_{\text{C}}$  55,5 (4- $\text{OCH}_3$ )] trong khi **HH32** có nhóm thế hydroxy. Do đó, hai hợp chất **HH31** và **HH32** lần lượt được xác định là **ethyl-4-methoxy-*trans*-cinnamat** và **ethyl-*trans*-cinnamat** [210].

Hợp chất **HH33** thu được dưới dạng bột trắng ngà. Phổ khối ESI-MS có píc ion tại  $m/z$  355  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , kết hợp với các dữ kiện phổ  $^{13}\text{C}$ -NMR xác định công thức phân tử của **HH33** là  $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_9$ . So sánh phổ NMR của **HH33** và hợp chất **HH28** (Bảng 3.21) cho thấy sự xuất hiện của nhóm caffeoyl trong cấu trúc của **HH33**. Điểm khác biệt giữa 02 hợp chất **HH28** và **HH33** là sự xuất hiện thêm các tín hiệu của phân tử acid quinic trong **HH33** bao gồm 02 nhóm  $\text{CH}_2$  ( $\delta_{\text{C}}$  38,2 và 38,8), 03 nhóm oxymethin ( $\delta_{\text{C}}$  71,3, 72,0 và 73,5), 01 carbon không liên kết với hydro ( $\delta_{\text{C}}$  76,1) và 01 nhóm carboxyl ( $\delta_{\text{C}}$  177,0) [211]. Tín hiệu nhóm  $\text{C}=\text{O}$  của **HH33** xuất hiện ở  $\delta_{\text{C}}$  168,7 nhỏ hơn khoảng 2 ppm khi so với tín hiệu của nhóm carboxyl của acid caffeic (**HH28**) (Bảng 3.21), cùng với dữ liệu phổ khối gợi ý rằng **HH33** có chứa một phân tử acid caffeic và một phân tử acid quinic liên kết với nhau để tạo thành 01 este. So sánh dữ liệu phổ thực nghiệm với phổ của các hợp chất acid neochlorogenic [212], acid cryptochlorogenic [212] và acid chlorogenic [211],

[213] (các hợp chất có cấu trúc như đã phân tích nhưng khác nhau ở vị trí liên kết giữa acid caffeic và acid quinic) cho thấy, phổ của **HH33** và phổ của hợp chất acid chlorogenic hoàn toàn trùng khớp. Do đó, **HH33** được xác định là hợp chất chất **acid chlorogenic**.

Phổ  $^1\text{H-NMR}$  của hợp chất **HH34** chỉ ra sự có mặt của 02 proton thơm đối xứng xuất hiện dưới dạng singlet ở  $\delta_{\text{H}}$  7,35, 02 nhóm  $\text{OCH}_3$  đối xứng ở  $\delta_{\text{H}}$  3,91. Phổ  $^{13}\text{C-NMR}$  cho biết trong phân tử của **HH34** có 09 carbon, trong đó tín hiệu của nhóm carboxyl xuất hiện ở  $\delta_{\text{C}}$  169,9. Như vậy, có thể thấy rằng cấu trúc của **HH34** có chứa một vòng thơm với 04 nhóm thế bao gồm 02 nhóm  $\text{OCH}_3$  đối xứng, 01 nhóm carboxyl. Nhóm thế còn lại được nhận định là nhóm thế hydroxy ( $-\text{OH}$ ) dựa trên dữ liệu phổ khối. Hợp chất **HH34** được xác định là **acid syringic** sau khi so sánh các dữ liệu phổ thực nghiệm với dữ liệu phổ của hợp chất acid syringic [214].

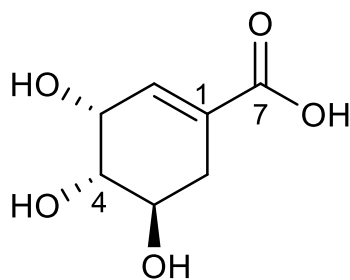
### 3.2.3.35. Hợp chất **HH35**:

Tinh thể màu trắng, độ tinh khiết 84% (tính theo diện tích pic HPLC, UV 210 nm). Phổ  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 500 MHz) và phổ  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 125 MHz): xem bảng 3.21.

Bảng 3.21. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất **HH35**

Vị trí C	* $\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}}$	Nhóm carbon	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,c}}$ (độ bội, $J = \text{Hz}$ )
1	130,8	130,9	C	-
2	138,8	138,7	CH	6,68 (dt, 2,0; 3,5)
3	67,4	67,3	CH	4,39 (ddd, 2,0; 4,0; 5,5)
4	68,4	68,4	CH	3,69 (dd, 4,0; 7,5)
5	72,8	72,8	CH	4,00 (dt, 5,5; 7,5)
6	31,7	31,7	$\text{CH}_2$	2,25 (ddt, 2,0; 5,5; 18,5) 2,73 (ddt, 2,0; 5,5; 18,5)
7	170,1	170,1	C	-

\* $\delta_{\text{C}}$  của acid shikimic đo trong  $\text{CD}_3\text{OD}$  [215]; <sup>a</sup>Đo trong  $\text{CD}_3\text{OD}$ , <sup>b</sup>125 MHz, <sup>c</sup>500 MHz.



Hình 3.33. Cấu trúc hóa học của hợp chất **HH35**

Hợp chất **HH35** phân lập được dưới dạng tinh thể màu trắng. Các phổ  $^{13}\text{C}$ -NMR và DEPT của **HH35** cho biết sự có mặt của 01 nhóm carbonyl ( $\text{C}=\text{O}$ ,  $\delta_{\text{C}}$  170,1), 01 liên kết đôi  $\text{C}=\text{C}$  (01 nhóm CH và 01 carbon bậc 4 lần lượt ở  $\delta_{\text{C}}$  138,7 và 130,9), 03 nhóm oxymethin ( $\delta_{\text{C}}$  67,3, 68,4 và 72,8) và 01 nhóm methylen ( $\delta_{\text{C}}$  31,7). Phân tích các đặc điểm phổ NMR của **HH35** cho thấy đây là 01 hợp chất acid có chứa 03 nhóm hydroxy và một liên kết đôi ở trong cấu trúc [215]. Hằng số ghép cặp  $J=4,0$  Hz chỉ ra cấu hình *cis* của các proton H-3 và H-4 [215]. Các proton H-4 và H-5 được xác định có cấu hình *trans* dựa trên hằng số ghép cặp  $J=7,5$  Hz. Các đặc điểm đã phân tích cho thấy, **HH35** có thể là hợp chất acid shikimic, một acid cyclohexencarboxylic. So sánh phổ NMR của **HH35** và acid shikimic (Bảng 3.22) trong tài liệu tham khảo [215] thấy hoàn toàn trùng khớp, cho phép xác định **HH35** là **acid shikimic**.

### 3.2.3.36. Hợp chất **HH36**:

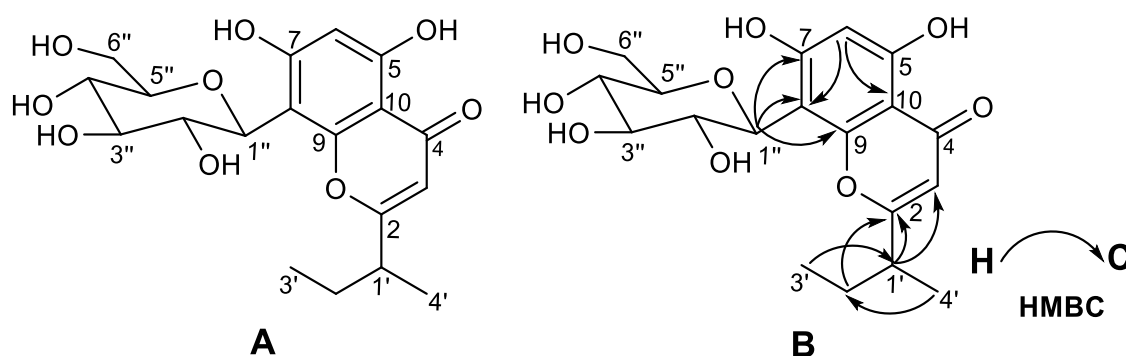
Bột màu trắng ngà, độ tinh khiết 86% (tính theo diện tích pic HPLC, UV 210 nm). Phổ ESI-MS ( $m/z$ ) 397  $[\text{M}+\text{H}]^+$ . Phổ  $^1\text{H}$ -NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 500 MHz) và phổ  $^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 125 MHz): xem bảng 3.22.

Bảng 3.22. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất **HH36**

Vị trí C	* $\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}}$	Nhóm carbon	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,c}}$ (độ bội, $J = \text{Hz}$ )
2	173,0	175,7	C	-
3	106,2	107,5	CH	6,10 (s)
4	181,9	184,3	C	-
5	160,4	162,6	C	-
6	98,7	99,4	CH	6,27 (s)
7	164,2	164,6	C	-
8	104,7	105,6	C	-
9	156,6	158,0	C	-
10	103,3	103,3	C	-

Vị trí C	* $\delta_C$	$\delta_C^{a,b}$	Nhóm carbon	$\delta_H^{a,c}$ (độ bội, $J = \text{Hz}$ )
1'	39,1	41,9	CH	2,71 (m)
2'	27,0	30,6	CH <sub>2</sub>	1,69 (m) 1,85 (m)
3'	17,4	18,2	CH <sub>3</sub>	0,98 (t, 7,5)
4'	11,4	12,0	CH <sub>3</sub>	1,34 (d, 6,5)
1''	73,3	74,8	CH	4,92 (d, 10,0)
2''	71,2	73,0	CH	4,11 (m)
3''	78,7	80,0	CH	3,52 (m)
4''	70,9	72,9	CH	3,47 (m)
5''	81,5	82,6	CH	3,46 (m)
6''	61,7	63,7	CH <sub>2</sub>	3,67 (m) 3,93 (d, 11,0)

\* $\delta_C$  của 5,7-dihydroxy-2-(1-methylpropyl) chromon-8- $\beta$ -D-glucopyranosid đo trong DMSO- $d_6$  [16]; <sup>a</sup>Đo trong CD<sub>3</sub>OD, <sup>b</sup>125 MHz, <sup>c</sup>500 MHz.



Hình 3.34. Cấu trúc hóa học (A) và các tương tác HMBC chính (B) của hợp chất **HH36**

Hợp chất **HH36** được xác định là một hợp chất chromon C-glycosid, nhóm hợp chất đã được tìm thấy trong thành phần hóa học của các loài thuộc chi *Hypericum* [216], [2]. Phổ <sup>1</sup>H-NMR của **HH36** xuất hiện tín hiệu của 01 nhóm s-butyl [ $\delta_H$  0,98 (3H, t,  $J = 7,5$  Hz, H-3'), 1,34 (3H, d,  $J = 6,5$  Hz, H-4'), 1,69 (1H, m, H-2'a), 1,85 (1H, m, H-2'b), 2,71 (1H, dd,  $J = 7,0, 14,0$  Hz, H-1')], 02 tín hiệu proton olefin dưới dạng singlet ở  $\delta_H$  6,10 và 6,27. Nhóm methylpropyl được gắn vào khung chromon ở vị trí C-2 do xuất hiện tương tác của H-4' ( $\delta_H$  1,34) và C-2 ( $\delta_C$  175,7), tương tác của H-3 ( $\delta_H$  6,10) và C-1' ( $\delta_C$  41,9) trên phổ HMBC. Sự có mặt của 01 gốc đường  $\beta$ -D-glucopyranose trong cấu trúc của **HH36** được xác định thông qua tín hiệu của proton anome ở  $\delta_H$  4,92 với hằng số ghép cặp  $J=10$  Hz, và 06 tín hiệu carbon ở  $\delta_C$  74,8 (C-1''), 73,0 (C-2''), 80,0 (C-3''), 72,9 (C-4''), 82,6 (C-5'') và 63,7 (C-6'') [216]. Tương tác HMBC của H-1'' ( $\delta_H$  4,92) với C-8 ( $\delta_C$  105,6) chỉ ra



gốc đường  $\beta$ -D-glucopyranose được đính vào vị trí C-8 của khung chromon thông qua liên kết C-C. Phổ khối ESI-MS xuất hiện pic ion  $m/z$  397  $[M+H]^+$ , cùng với dữ liệu phổ NMR cho biết công thức phân tử của **HH36** là  $C_{19}H_{24}O_9$ . Từ các dữ liệu đã phân tích, so sánh số liệu phổ thu được với số liệu phổ trong tài liệu tham khảo [216], **HH36** được xác định là hợp chất **5,7-dihydroxy-2-(1-methylpropyl) chromon-8- $\beta$ -D-glucopyranosid**.

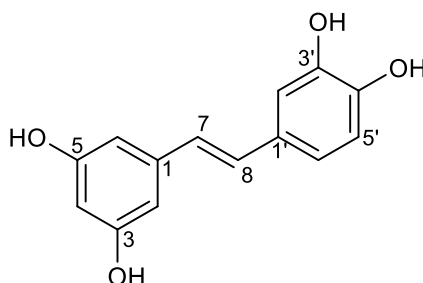
### 3.2.3.37. Hợp chất **HH37**:

Bột màu trắng ngà, độ tinh khiết 85% (tính theo diện tích pic HPLC, UV 210 nm). Phổ ESI-MS ( $m/z$ ) 245  $[M+H]^+$ . Phổ  $^1H$ -NMR (aceton- $d_6$ ; 500 MHz) và phổ  $^{13}C$ -NMR (aceton- $d_6$ ; 125 MHz): xem bảng 3.23.

Bảng 3.23. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất **HH37**

Vị trí C	* $\delta_C$	$\delta_C^{a,b}$	Nhóm carbon	$\delta_H^{a,c}$ (độ bội, $J = \text{Hz}$ )
1	140,7	140,8	C	-
2	105,5	105,6	CH	6,52 (d, 2,0)
3	159,5	159,6	C	-
4	102,5	102,7	CH	6,25 (br s)
5	159,5	159,6	C	-
6	105,5	105,6	CH	6,52 (d, 2,0)
7	126,8	126,9	CH	6,81 (d, 16,5)
8	129,6	129,4	CH	6,93 (d, 16,5)
1'	130,9	130,7	C	-
2'	116,1	116,2	CH	7,07 (d, 1,5)
3'	146,0	146,1	C	-
4'	146,2	146,2	C	-
5'	113,7	113,8	CH	6,82 (d, 8,5)
6'	119,8	119,9	CH	6,89 (dd, 1,5; 8,0)

\* $\delta_C$  của piceatannol đo trong aceton- $d_6$  [217]; <sup>a</sup>Đo trong aceton- $d_6$ , <sup>b</sup>125 MHz, <sup>c</sup>500 MHz.



Hình 3.35. Cấu trúc hóa học của hợp chất **HH37**

Hợp chất **HH37** thu được dưới dạng bột màu trắng ngà. Phổ  $^1H$ -NMR của

**HH37** xuất hiện tín hiệu của 02 proton olefin cấu hình *trans* ở  $\delta_H$  6,93 (d,  $J = 16,5$  Hz); 6,81 (d,  $J = 16,5$  Hz). Ngoài ra, sự có mặt của 02 vòng thơm trong cấu trúc của **HH37** bao gồm một vòng bị thế ở hai vị trí H-3'; H-4' và một vòng bị thế ở 03 vị trí 1,3,5 được khẳng định thông qua tín hiệu của 03 proton ghép cặp dưới dạng ABX ở  $\delta_H$  7,07 (d,  $J = 1,5$  Hz); 6,82 (d,  $J = 8,5$  Hz); 6,89 (dd,  $J = 1,5; 8,0$  Hz) và 03 proton ở  $\delta_H$  6,52 (2H, d,  $J = 2,0$  Hz); 6,25 (br s) [217], [218]. Phổ  $^{13}\text{C}$ -NMR xuất hiện tín hiệu của 14 nguyên tử carbon ở độ chuyển dịch từ  $\delta_C$  102,7-159,6 ppm. Phổ khối ESI-MS có pic ion tại  $(m/z)=245$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ , kết hợp quan sát các phổ  $^1\text{H}$  và  $^{13}\text{C}$ -NMR cho biết công thức phân tử của **HH37** là  $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{O}_4$  ( $M=244$ ). Dựa trên việc phân tích các dữ liệu phổ thu được, so sánh với những tài liệu tham khảo đã công bố, xác định **HH37** là hợp chất **piceatannol**, một stilben khá phổ biến trong tự nhiên [217], [218].

### 3.3. TÁC DỤNG SINH HỌC CỦA CÂY BAN HOOKER

#### 3.3.1. Mẫu nghiên cứu dùng trong các thử nghiệm tác dụng sinh học

Mẫu nghiên cứu trong các thử nghiệm tác dụng sinh học là các cao chiết và một số hợp chất phân lập từ cây Ban hooker đã thực hiện được trong phần nghiên cứu thành phần hóa học (Mục 3.2.2; Chương 3), bao gồm:

- Cao methanol toàn phần (BHM)
- Các cao chiết phân đoạn: *n*-hexan (BHH), ethyl acetat (BHE), *n*-butanol (BHB) và cao nước (BHW).
- 20 hợp chất tinh khiết phân lập được, dùng cho thử nghiệm tác dụng sinh học: chipericumun D (**HH1**), uralione D (**HH2**), uraloidin A (**HH3**), furohyperforin (**HH4**), hypercohin K (**HH5**), multifidol glucosid (**HH6**), 2-(2-methylbutyryl)phloroglucinol 1-*O*-(6''-*O*- $\beta$ -D-apiofuranosyl)- $\beta$ -D-glucopyranosid (**HH7**), 3-hydroxy-2,4-dimethoxyxanthon (**HH10**), neriifolone A (**HH11**), 4-hydroxy-2,6,4'-trimethoxydihydrochalcon (**HH12**), isolariciresinol 9'-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosid (**HH13**), isocubein (**HH14**), sesamin (**HH15**), piperitol (**HH16**), quercetin (**HH18**), (-)-epicatechin (**HH19**), quercitrin (**HH20**), ethyl-4-methoxy-*trans*-cinnamat (**HH31**), 5,7-dihydroxy-2-(1-methylpropyl) chromon-8- $\beta$ -D-

glucopyranosid (**HH36**), piceatannol (**HH37**).

### 3.3.2. Tác dụng chống oxy hóa

Kết quả đánh giá tác dụng dọn gốc tự do DPPH và superoxid ( $O_2^{\cdot-}$ ) của cao toàn phần methanol, các cao phân đoạn *n*-hexan, ethyl acetat, *n*-butanol, nước của phần trên mặt đất cây Ban hooker được trình bày trong bảng 3.24.

*Bảng 3.24. Tác dụng dọn gốc tự do của các mẫu chiết từ cây Ban hooker*

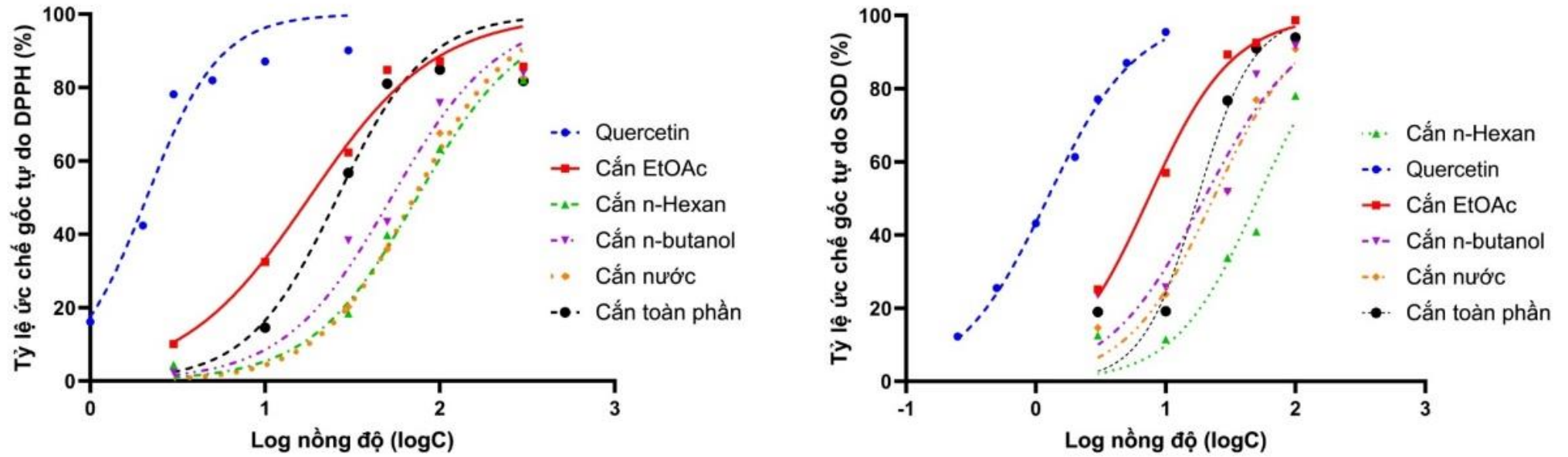
TT	Mẫu thử	Giá trị IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ , 95% CI)	
		DPPH	$O_2^{\cdot-}$
1	BHM	25,91 (15,60 - 41,18)	17,64 (8,324 - 29,66)
2	BHH	74,18 (56,59 - 101,20)	51,40 (29,03 - 116,9)
3	BHE	<b>17,92 (11,48 - 26,63)</b>	<b>7,39 (5,96 - 9,04)</b>
4	BHB	52,91 (35,39 - 82,98)	19,83 (5,585 - 43,42)
5	BHW	71,45 (54,63 - 97,68)	23,39 (14,04 - 35,32)
6	Quercetin <sup>a</sup>	2,10 (1,441 - 2,904)	1,23 (1,116 - 1,357)

<sup>a</sup>: Chất đối chứng dương; 95% CI: Khoảng tin cậy 95%.

Kết quả bảng 3.24 và hình 3.36 cho thấy cao chiết tổng methanol từ phần trên mặt đất cây Ban hooker có tác dụng tốt trên 02 thử nghiệm dọn gốc tự do DPPH và superoxid với giá trị IC<sub>50</sub> lần lượt là 25,91 và 17,64  $\mu\text{g/mL}$ . Trong số các cao phân đoạn, phân đoạn ethyl acetat có tác dụng tốt nhất trên cả 02 thử nghiệm. Cao phân đoạn *n*-butanol và nước chỉ có tác dụng trên thử nghiệm dọn gốc tự do  $O_2^{\cdot-}$  (IC<sub>50</sub> lần lượt là 19,83 và 23,39  $\mu\text{g/mL}$ ). Quercetin được sử dụng như một chất đối chứng dương cũng thể hiện tốt trên 02 nghiên cứu dọn gốc tự do DPPH và  $O_2^{\cdot-}$  với giá trị IC<sub>50</sub> lần lượt là 2,10 và 1,23  $\mu\text{g/mL}$ .

### 3.3.3. Tác dụng bảo vệ gan

Kết quả đánh giá tác dụng bảo vệ gan của cao chiết methanol và cao phân đoạn ethyl acetat trên mô hình gây tổn thương gan cấp bằng paracetamol được trình bày trong bảng 3.25.



Hình 3.36. Mối tương quan giữa nồng độ và tác dụng dọn gốc tự do của các cao chiết từ cây Ban hooker

Bảng 3.25. Ảnh hưởng của các cao chiết cây *Ban hooker* trong mô hình gây tổn thương gan cấp bằng paracetamol

Lô chuột	ALT (U/L)	AST (U/L)	MDA (nmol/g mô)	GSH (nmol/g mô)	SOD (U/mg mô)
Lô 1 (chứng sinh lý)	61,6 ± 14,7	93,5 ± 27,5	16,8 ± 10,5	5,3 ± 0,8	63,4 ± 6,5
Lô 2 (chứng bệnh lý)	681,0 ± 240,0 <sup>#</sup>	585,5 ± 190,8 <sup>#</sup>	33,7 ± 23,9	4,5 ± 0,5	31,6 ± 9,7 <sup>#</sup>
Lô 3 (silymarin 100 mg/kg)	448,0 ± 139,1*	332,9 ± 169,1*	13,4 ± 5,6*	6,0 ± 1,2*	43,4 ± 8,0*
Lô 4 (BHM 250 mg/kg)	<b>356,4 ± 260,6*</b>	<b>333,2 ± 232,1*</b>	27,3 ± 25,8	3,5 ± 2,1	<b>52,1 ± 14,0*</b>
Lô 5 (BHM 500 mg/kg)	<b>299,7 ± 240,8*</b>	<b>262,6 ± 242,1*</b>	22,1 ± 7,0	5,4 ± 1,6	<b>47,2 ± 15,6*</b>
Lô 6 (BHE 250 mg/kg)	470,2 ± 255,2	569,3 ± 276,5	34,6 ± 30,6	3,3 ± 2,2	<b>52,6 ± 17,8*</b>
Lô 7 (BHE 500 mg/kg)	463,6 ± 293,8	456,0 ± 262,2	39,1 ± 30,0	4,2 ± 1,6	<b>59,9 ± 12,6*</b>

\* Khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ) so với chứng bệnh lý (Lô 2)

<sup>#</sup> Khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ) so với chứng sinh lý (Lô 1)

Khi tiến hành gây tổn thương gan cấp trên chuột thí nghiệm, hoạt độ ALT và AST trong huyết thanh chuột sử dụng cao toàn phần BHM ở cả hai mức liều 250 mg/kg và 500 mg/kg đều thấp hơn có ý nghĩa thống kê so với lô chứng bệnh lý ( $p < 0,05$ ), giảm lần lượt 56% và 55% so với lô chứng bệnh lý. Hoạt độ ALT và AST ở nhóm chuột sử dụng cao phân đoạn BHE ở cả hai mức liều nghiên cứu có thấp hơn so với lô chứng bệnh lý nhưng không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ).

Hàm lượng MDA trong gan chuột ở các lô sử dụng cao methanol toàn phần có xu hướng thấp hơn so với lô chứng bệnh lý nhưng không có ý nghĩa thống kê. Trong khi đó, ở các lô sử dụng cao BHE, hàm lượng MDA không đổi, thậm chí có xu hướng tăng với liều 500 mg/kg cân nặng.

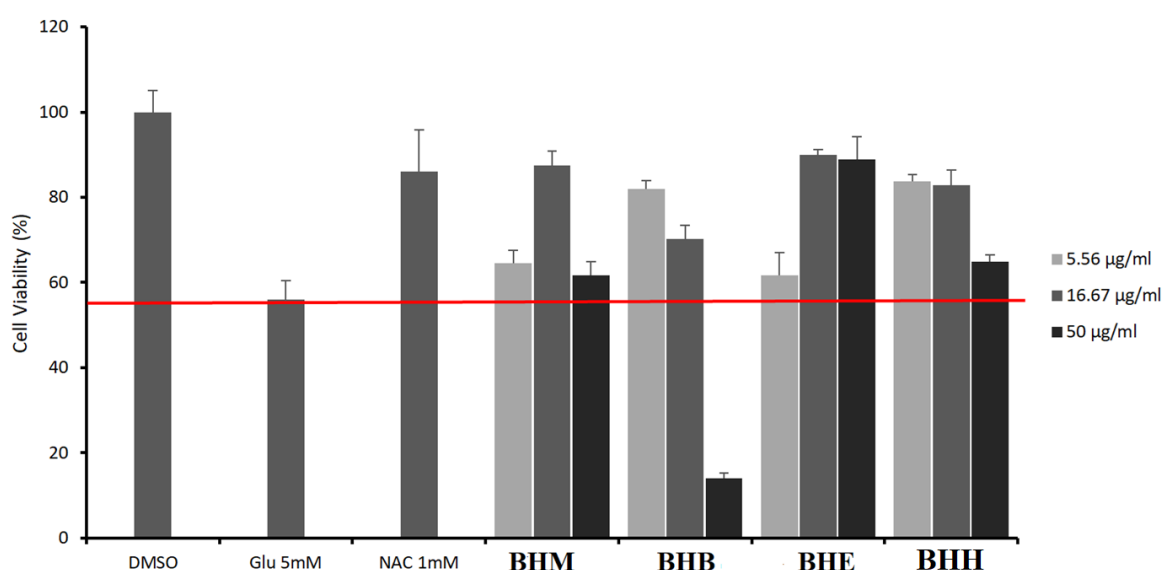
Trong các lô thử, lô sử dụng cao BHM liều 500 mg/kg có hàm lượng GSH trong gan cao nhất (5,4 nmol/g mô, cao hơn 20% so với lô chứng bệnh). Hoạt độ SOD trong gan ở tất cả các lô thử đều cao hơn có ý nghĩa thống kê so với lô chứng

bệnh ( $p < 0,05$ ); đồng thời giá trị hoạt độ SOD ghi nhận được cũng cao hơn so với lô sử dụng chứng dương silymarin.

### 3.3.4. Tác dụng bảo vệ tế bào thần kinh

#### 3.3.4.1. Tác dụng bảo vệ tế bào thần kinh HT<sub>22</sub> của các cao chiết trên mô hình gây độc bởi glutamat

Các cao chiết từ cây Ban hooker được đánh giá tác dụng bảo vệ tế bào thần kinh trên mô hình gây độc tế bào thần kinh hải mã chuột HT<sub>22</sub> ở 03 nồng độ là 5,56; 16,67 và 50,0  $\mu\text{g/mL}$ . Kết quả được trình bày trong hình 3.37.



Hình 3.37. Tác dụng bảo vệ tế bào thần kinh HT<sub>22</sub> của các cao chiết trên mô hình gây độc bởi glutamat 5mM

Kết quả hình 3.37 cho thấy khi ủ tế bào HT<sub>22</sub> với glutamat 5 mM, tỷ lệ tế bào sống sót giảm xuống còn 56% (giá trị được lấy làm điểm tham chiếu trong thử nghiệm này – vạch đỏ trong hình 3.37). Các cao chiết BHM, cao phân đoạn BHH, BHE ở cả 03 nồng độ thử nghiệm đều có tác dụng tốt bảo vệ tế bào gây ra bởi glutamat 5 mM. Theo đó, tỷ lệ sống sót của tế bào HT<sub>22</sub> lần lượt tăng lên là 65, 89, 62% khi thử với cao BHM ở nồng độ tương ứng 5,56; 16,67 và 50,0  $\mu\text{g/mL}$ . Cao phân đoạn BHH có tỷ lệ tế bào sống sót lần lượt là 85, 84, 66% với 03 nồng độ tương ứng 5,56; 16,67 và 50,0  $\mu\text{g/mL}$  và cao phân đoạn BHE có tỷ lệ tế bào sống sót lần lượt là 62, 93, 92% ở 03 nồng độ tương ứng 5,56; 16,67 và 50,0  $\mu\text{g/mL}$ . Riêng cao BHB ở 02 nồng độ 5,56 và 16,67  $\mu\text{g/mL}$ , tỷ lệ tế bào sống sót lần lượt là

82% và 70% còn nồng độ 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  thậm chí gây độc đối với tế bào thần kinh (tỷ lệ tế bào sống sót 17%). Chứng dương NAC 1 mM thể hiện tác dụng với tỷ lệ tế bào sống sót là 87%.

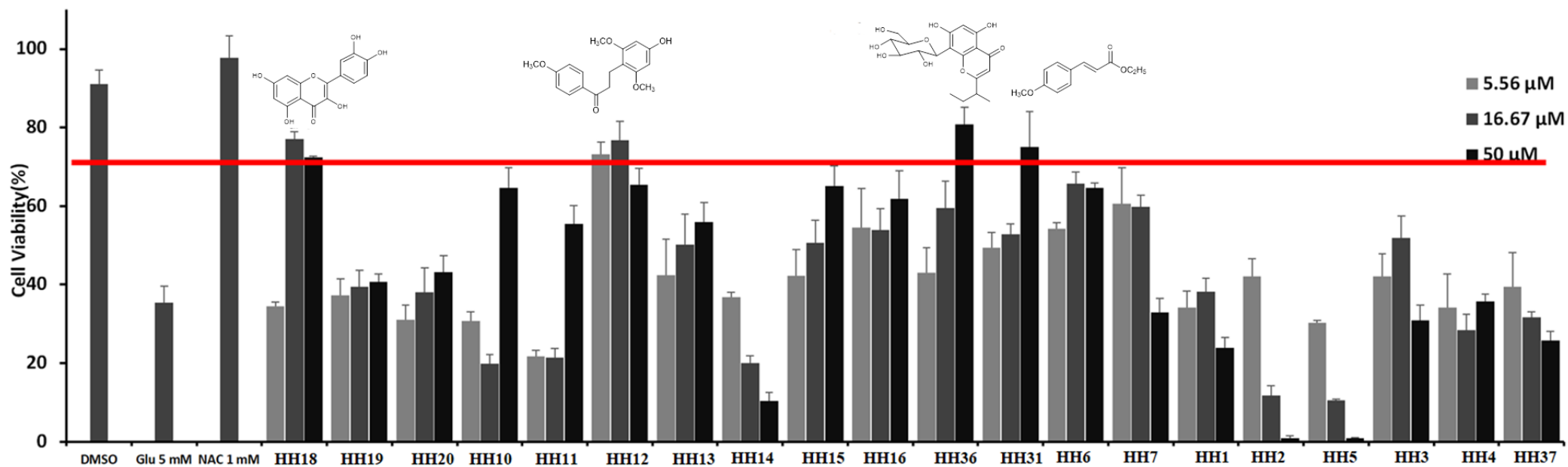
#### ***3.3.4.2. Tác dụng bảo vệ tế bào thần kinh HT<sub>22</sub> của các chất đã phân lập trên mô hình gây độc bởi glutamat***

Sàng lọc, đánh giá tác dụng bảo vệ tế bào thần kinh trên mô hình gây chết tế bào HT<sub>22</sub> bởi glutamat của 20 hợp chất phân lập được (**HH1**, **HH2**, **HH3**, **HH4**, **HH5**, **HH6**, **HH7**, **HH10**, **HH11**, **HH12**, **HH13**, **HH14**, **HH15**, **HH16**, **HH18**, **HH19**, **HH20**, **HH31**, **HH36**, và **HH37**) ở 03 nồng độ 5,56; 16,67 và 50,0  $\mu\text{M}$ . Kết quả được thể hiện trong hình 3.38.

Hình 3.38 cho thấy, glutamat ở nồng độ 5 mM làm tỷ lệ tế bào sống sót giảm xuống còn 38%. Trong khi đó, tỷ lệ tế bào sống ở mẫu trắng (DMSO) là 90%. Trong số các hợp chất được thử nghiệm, có 04 hợp chất làm cho tỷ lệ tế bào HT<sub>22</sub> sống sót đạt trên 70% ở ít nhất một nồng độ nghiên cứu (vạch đỏ trong hình 3.38), được coi là những hợp chất có tác dụng tốt hơn các hợp chất còn lại bao gồm: **HH12**, **HH18**, **HH31** và **HH36**. Vì vậy, được lựa chọn thử nghiệm ở các nồng độ thấp hơn để tính toán giá trị EC<sub>50</sub> (Nồng độ tác dụng 50%).

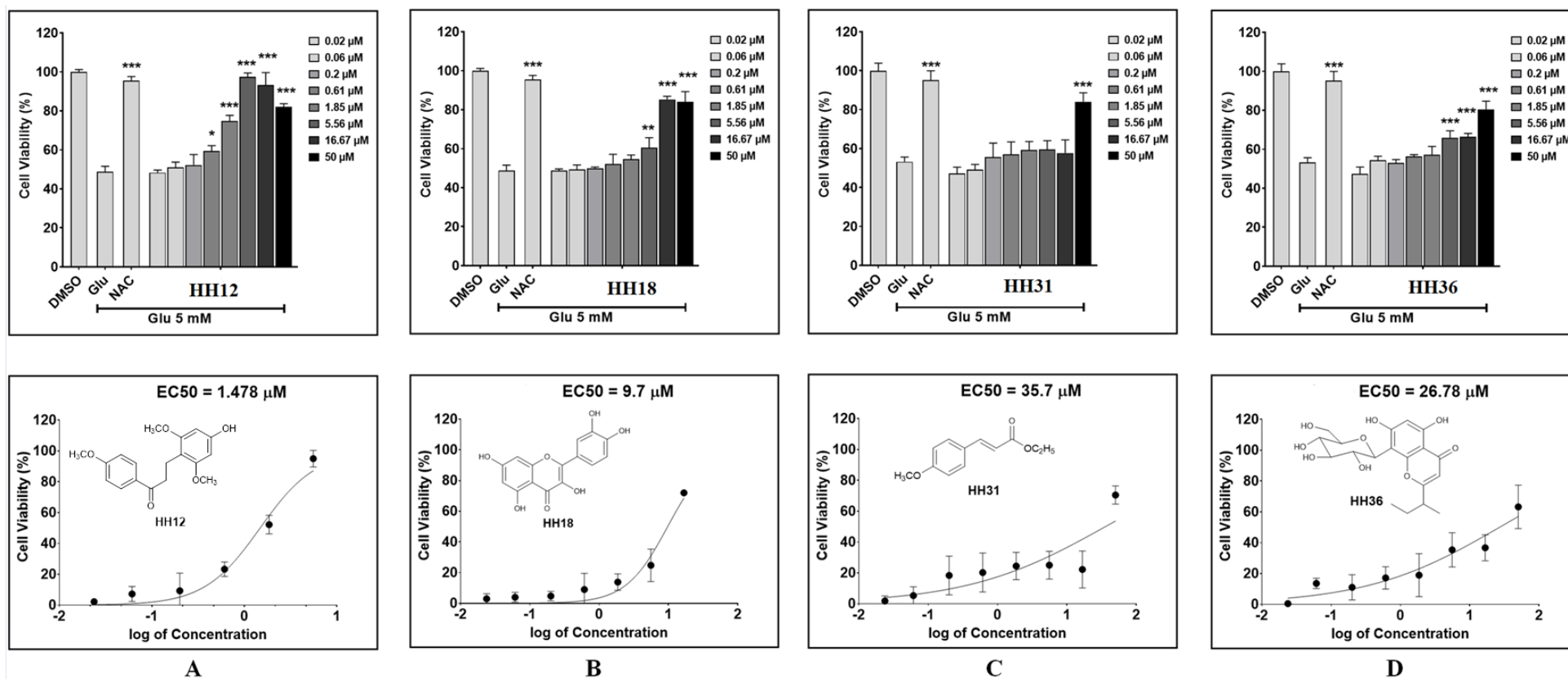
Bốn hợp chất **HH12**, **HH18**, **HH31** và **HH36** được tiến hành thử tác dụng ở 08 nồng độ 0,02; 0,06; 0,20; 0,61; 1,85; 5,56; 16,67; 50  $\mu\text{M}$  trên mô hình gây độc tế bào thần kinh HT<sub>22</sub> bởi glutamat. Kết quả đánh giá hoạt tính bảo vệ tế bào thần kinh và giá trị EC<sub>50</sub> của 04 hợp chất được thể hiện trong hình 3.39.

Trong số 04 hợp chất được nghiên cứu, hợp chất **HH12** có tác dụng tốt nhất với giá trị EC<sub>50</sub> là 1,48  $\mu\text{M}$ , tiếp theo là hợp chất **HH18** (EC<sub>50</sub>=9,70  $\mu\text{M}$ ). Hai hợp chất **H31** và **HH36** có giá trị EC<sub>50</sub> lần lượt là 35,70 và 26,78  $\mu\text{M}$ .



Hình 3.38. Tác dụng bảo vệ tế bào thần kinh HT<sub>22</sub> của các hợp chất trên mô hình gây độc bởi glutamat





\*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*  $p < 0,05$  khi so với nhóm chỉ xử lý bằng glutamat 5 mM.

Hình 3.39. Giá trị  $EC_{50}$  của các hợp chất **HH12**, **HH18**, **HH31** và **HH36** với tác dụng bảo vệ tế bào thần kinh HT<sub>22</sub> trên mô hình gây độc bởi glutamat

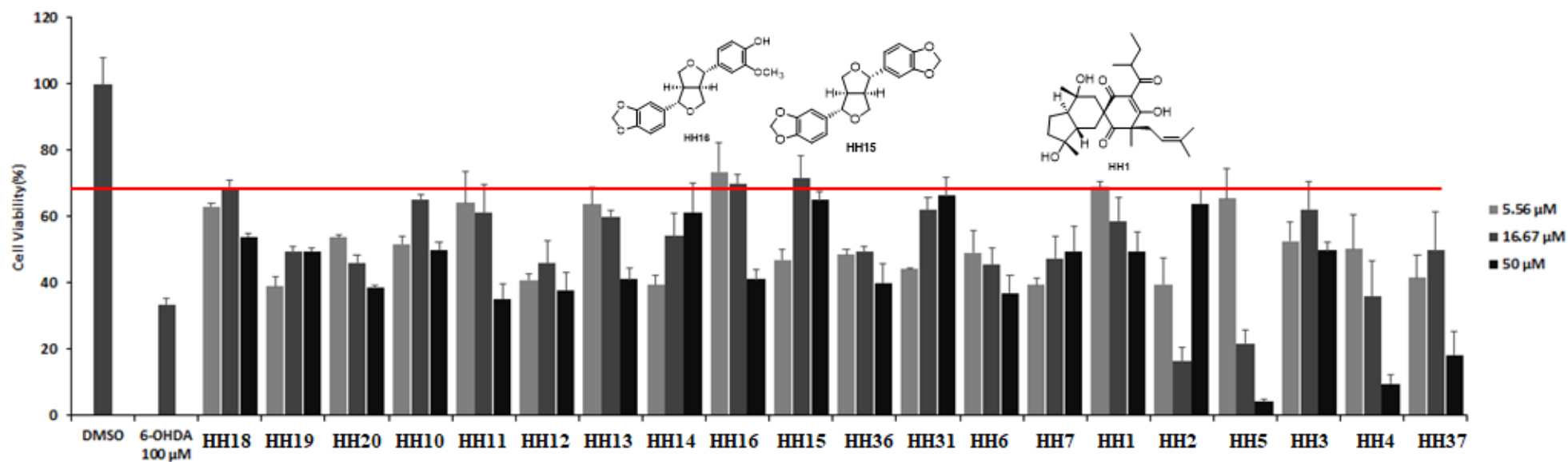
### ***3.3.4.3. Tác dụng bảo vệ tế bào thần kinh SH-SY5Y của các hợp chất đã phân lập được trên mô hình gây độc bởi 6-OHDA***

Tiến hành sàng lọc, đánh giá tác dụng bảo vệ tế bào thần kinh trên mô hình gây độc tế bào u nguyên bào thần kinh SH-SY5Y bởi 6-OHDA của 20 hợp chất phân lập được (**HH1**, **HH2**, **HH3**, **HH4**, **HH5**, **HH6**, **HH7**, **HH10**, **HH11**, **HH12**, **HH13**, **HH14**, **HH15**, **HH16**, **HH18**, **HH19**, **HH20**, **HH31**, **HH36**, và **HH37**) ở 03 nồng độ 5,56; 16,67 và 50,0  $\mu\text{M}$ . Kết quả được trình bày trong hình 3.40.

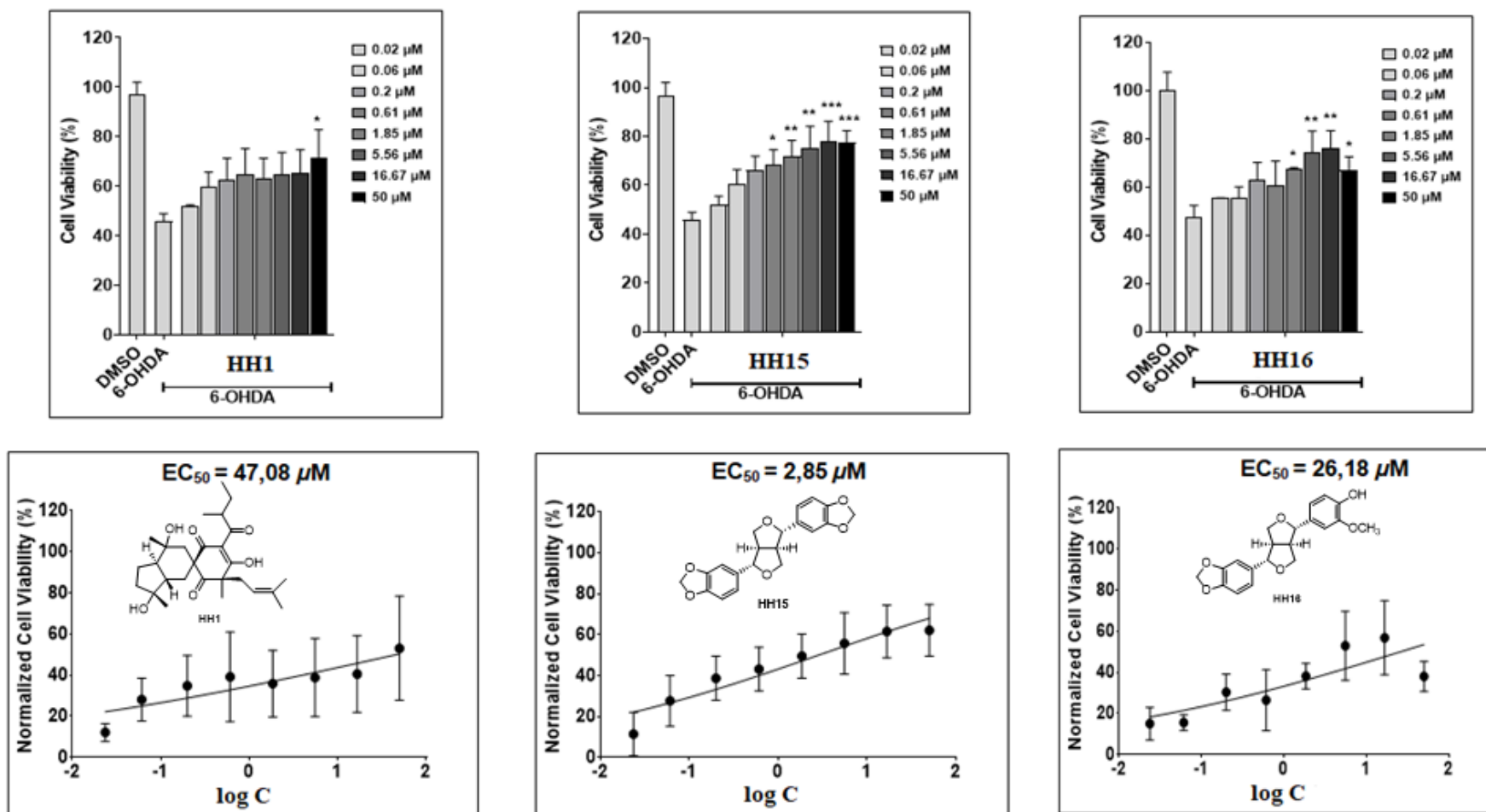
Khi được ủ với 6-OHDA, tỷ lệ tế bào sống sót là 36%, mẫu trắng (DMSO) đạt tỷ lệ sống sót 99%. Ba trong số hai mươi hợp chất được nghiên cứu là **HH1**, **HH15** và **HH16** thể hiện tác dụng tốt trên mô hình thử nghiệm với ít nhất 01 nồng độ có tỷ lệ tế bào sống sót > 70%. Do đó, ba hợp chất **HH1**, **HH15** và **HH16** được lựa chọn thử ở các nồng độ thấp hơn để xác định giá trị  $\text{EC}_{50}$ .

Ba hợp chất **HH1**, **HH15** và **HH16** được tiến hành thử ở 08 nồng độ 0,02; 0,06; 0,20; 0,61; 1,85; 5,56; 16,67; 50  $\mu\text{M}$  trên mô hình gây độc tế bào thần kinh SH-SY5Y bởi 6-OHDA. Kết quả đánh giá hoạt tính và giá trị  $\text{EC}_{50}$  của 03 hợp chất được thể hiện trong hình 3.41.

Trong số 03 hợp chất được nghiên cứu, hợp chất sesamin (**HH15**) có tác dụng tốt nhất với giá trị  $\text{EC}_{50}$  là 2,85  $\mu\text{M}$ . Hai hợp chất chipericum D (**HH1**) và piperitol (**HH16**) có giá trị  $\text{EC}_{50}$  lần lượt là 47,08 và 26,18  $\mu\text{M}$ .



Hình 3.40. Tác dụng bảo vệ tế bào thần kinh SH-SY5Y của các hợp chất trên mô hình gây độc bởi 6-OHDA



\*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*  $p < 0,05$  khi so với nhóm chỉ xử lý bằng 6-OHDA 100 μM.

Hình 3.41. Giá trị EC<sub>50</sub> của các hợp chất **HH1**, **HH15** và **HH16** với tác dụng bảo vệ tế bào thần kinh SH-SY5Y trên mô hình gây độc bởi 6-OHDA

## CHƯƠNG 4. BÀN LUẬN

### 4.1. VỀ ĐẶC ĐIỂM THỰC VẬT VÀ TÊN KHOA HỌC CÂY BAN HOOKER

Tại Việt Nam, nghiên cứu đặc điểm thực vật của cây Ban hooker nói riêng và các loài thuộc chi *Hypericum* nói chung vẫn còn hạn chế, chưa có nghiên cứu mô tả đầy đủ, chi tiết, đặc biệt là cấu tạo của cơ quan sinh sản để phân biệt giữa loài *H. hookerianum* và các loài khác cùng chi để thuận tiện cho việc định danh, phân loại. Do đó, trong luận án này, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu toàn diện về thực vật học của cây Ban hooker thu hái tại Xã Sa Pa, Sa Pa, Tỉnh Lào Cai.

Các nghiên cứu tại thực địa được thực hiện gồm đặc điểm hình thái của cây, thu thập mẫu cây có hoa, quả, làm tiêu bản và phân tích đặc điểm hình thái của lá, hoa, quả, hạt. So sánh với các mẫu tiêu bản đã được xác định tên khoa học hiện đang lưu giữ tại Viện Dược liệu và Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Kết quả cho thấy, mẫu Ban hooker có đặc điểm hình thái bên ngoài giống với các mẫu tiêu bản (cùng tên) đang lưu giữ.

Để xác định tên khoa học của mẫu Ban hooker, chúng tôi dựa vào các tài liệu khóa phân loại thực vật như Từ điển cây thuốc Việt Nam [5], Cây cỏ Việt Nam [6], Thực vật chí Trung Quốc [9]. Từ các đặc điểm chung của chi *Hypericum* cũng như các đặc điểm đặc trưng của cây Ban hooker, chúng tôi khẳng định mẫu nghiên cứu có tên khoa học là *Hypericum hookerianum* Wight. and Arn., họ Ban (Hypericaceae).

Tên khoa học của cây Ban hooker đã được giám định dưới sự trợ giúp của các chuyên gia thực vật học của Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, Khoa Tài nguyên Dược liệu, Viện Dược liệu. Việc giám định chính xác tên khoa học giúp cho các công bố về thành phần hóa học cũng như tác dụng sinh học được khẳng định rõ ràng, chính xác.

Luận án này cũng là công trình đầu tiên mô tả đầy đủ cấu tạo vi phẫu của lá, thân, rễ; đặc điểm bột của lá, thân, rễ cây Ban hooker thu hái ở Việt Nam. Cùng với các đặc điểm hình thái của thân cây, lá, cụm hoa, hoa, quả, hạt, các đặc điểm vi phẫu, đặc điểm bột cũng là những dẫn liệu quan trọng giúp cho việc

nghiên cứu, kiểm nghiệm, giám định tính đúng của dược liệu Ban hooker khi cần thiết.

So với đặc điểm thực vật của loài *Hypericum hookerianum* phân bố tại các khu vực địa lý khác nhau, cũng như so với các loài khác trong chi *Hypericum*, có thể thấy trong Bảng 4.1.

*Bảng 4.1. Sự thay đổi đặc điểm thực vật theo phân bố địa lý của loài H. hookerianum và loài H. hookerianum so với các loài khác trong chi Hypericum*

<b>TT</b>	<b>Loài <i>H. hookerianum</i> tại Việt Nam</b>	<b>Loài <i>H. hookerianum</i> tại Trung Quốc [9]</b>	<b>Các loài khác thuộc chi <i>Hypericum</i> [5], [6], [12]</b>
1	Thân non có 4 cạnh, có 2 gờ dạng cánh ở 2 cạnh đối diện.	Thân có 4 cạnh, mọc thẳng đứng khi còn non	Thân non không có gờ, mặc dù một số loài có thân 4 cạnh.
2	Cụm hoa mọc ở đỉnh cành.	Cụm hoa 1–5 hoa, mọc từ đốt ở gần đỉnh cành	Cụm hoa thường mọc ở nách lá gần đầu cành.
3	Hoa dạng chén sâu, nụ hình trứng rộng đến gần cầu.	Hoa có đường kính 3–6 cm, có hoặc không có dạng chén sâu; nụ hình trứng rộng đến hình cầu.	Hoa hình sao hoặc xòe ra, ngoại trừ <i>H. patulum</i> có hoa hình chén nhưng nụ có hình trứng chóp tù.
4	Đài hoa trải ra, uốn cong vào trong, hình trứng hoặc trứng ngược – thìa tới gần tròn hoặc elip hoặc thuôn – elip, gần bằng nhau	Đài hoa trải rộng-cong, hình trứng hoặc hình trứng ngược- thìa tới gần tròn hoặc elip hoặc elip thuôn dài, gần bằng nhau, 5–10 × 4–8 mm	Đài hoa thẳng đứng hoặc cong ra ngoài, không bằng nhau.
5	Cánh hoa vàng dài bằng khoảng 3 lần đài, mép nguyên, không có tuyến.	Cánh hoa màu vàng đậm đến vàng nhạt, hình trứng rộng đến hình bán nguyệt, 1,5–3 × 1,5–2,5 cm, dài bằng 3 lần lá đài; mép nguyên, có tuyến; đỉnh tù đến tròn .	Cánh hoa có chiều dài bằng đài hoa, viền thường có răng cưa.
6	Nhị hoa dài nhất (5 – 9 mm), ngắn hơn cánh hoa.	Mỗi cụm nhị có 60–80 nhị, dài nhất 5–9 mm, dài bằng cánh hoa	Nhị hoa có chiều dài bằng cánh hoa.

#### **4.2. VỀ THÀNH PHẦN HÓA HỌC CỦA CÂY BAN HOOKER**

Trên thế giới, đã có một số các nghiên cứu về thành phần hóa học của cây Ban hooker, tuy nhiên ở Việt Nam chưa có nghiên cứu nào về thành phần hóa học

của loài này được công bố. Do đó, việc nghiên cứu thành phần hóa học (xác định các nhóm chất, cấu trúc hóa học của các hợp chất) trong phần trên mặt đất (thân và lá) cây Ban hooker là việc làm cần thiết để có thêm dữ liệu khoa học về loài cây này ở nước ta.

#### **4.2.1. Kết quả định tính**

Kết quả phân tích định tính bằng các phản ứng đặc trưng trong ống nghiệm cho thấy trong phần trên mặt đất (thân và lá) cây Ban hooker có các nhóm chất flavonoid, polysaccharid, acid hữu cơ, acid amin, các hợp chất phenolic và tanin. Phản ứng dương tính rất rõ với dung dịch  $\text{FeCl}_3$  5% và các phản ứng nhận biết nhóm flavonoid cho thấy các hợp chất flavonoid và phenolic là những thành phần hóa học chính trong phần trên mặt đất cây Ban hooker.

#### **4.2.2. Kết quả phân lập và xác định cấu trúc của các hợp chất**

Trong luận án này, chúng tôi đã tiến hành chiết xuất, phân lập và xác định cấu trúc của các hợp chất từ cao phân đoạn *n*-hexan (BHH) và ethyl acetat (BHE) phân trên mặt đất cây Ban hooker.

Việc tập trung nghiên cứu thành phần hóa học trên 02 phân đoạn BHE và BHH được định hướng dựa trên các kết quả nghiên cứu định tính bằng phản ứng ống nghiệm, khảo sát bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng, đồng thời cũng được định hướng dựa trên các kết quả nghiên cứu tác dụng sinh học của cao chiết trong luận án này. Theo đó, trong các thử nghiệm với mẫu thử là cao chiết, ngoài cao toàn phần BHM, cao phân đoạn cao BHE và BHH thể hiện tác dụng tốt hơn các cao phân đoạn còn lại trong thử nghiệm tác dụng chống oxy hóa. Trong thử nghiệm bảo vệ tế bào thần kinh HT<sub>22</sub>, cao phân đoạn BHE và BHH có tác dụng tốt ở tất cả các nồng độ thử nghiệm, cao BHB chỉ có tác dụng ở hai nồng độ thấp và thậm chí còn gây độc ở liều cao.

Bằng phương pháp sắc ký cột với chất hấp phụ silica gel pha thường, pha đảo, Sephadex LH-20, đã phân lập được 37 hợp chất tinh sạch từ phần trên mặt đất cây Ban hooker. Sau đó, dựa trên sự phân tích các phổ IR, NMR, MS và so sánh dữ liệu phổ thu được với các tài liệu tham khảo, chúng tôi đã xác định được cấu trúc của 37

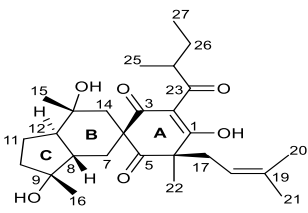
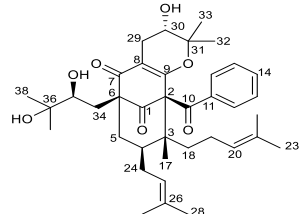
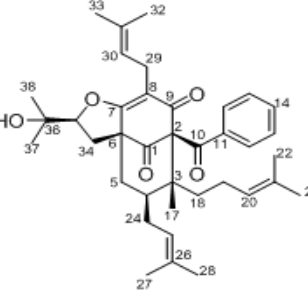
hợp chất, bao gồm bảy hợp chất phloroglucinol (**HH1–HH7**), bốn xanthon (**HH8–HH11**), một chalcon (**HH12**), bốn lignan (**HH13–HH16**), 11 hợp chất flavonoid (**HH17–HH27**), bảy dẫn xuất acid phenolic (**HH28–HH34**), một hợp chất acid cyclohexencarboxylic (**HH35**), một hợp chất chromon glycosid (**HH36**), một hợp chất stilben (**HH37**). Trong số 37 hợp chất, có 15 hợp chất (**HH1–HH5**, **HH8–HH12**, **HH14–HH16**, **HH31**, **HH32**) được phân lập từ phân đoạn *n*-hexan và 22 hợp chất (**HH6**, **HH7**, **HH13**, **HH17–HH30**, **HH33–HH37**) được phân lập từ phân đoạn ethyl acetat.

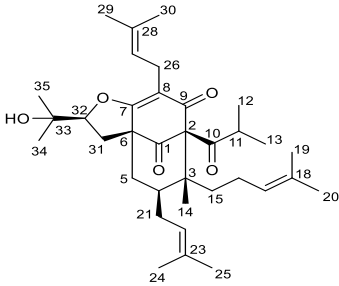
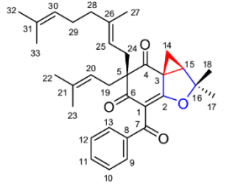
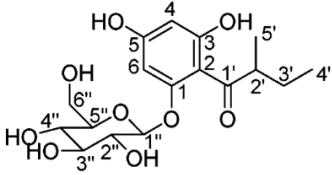
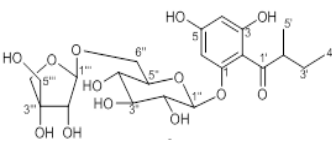
Trong 37 hợp chất đã được phân lập, có 11 hợp chất là **HH6**, **HH7**, **HH11–HH16**, **HH24**, **HH31** và **HH37** có thể là những hợp chất lần đầu tiên được tìm thấy trong một loài thuộc chi *Hypericum*. Đồng thời, đối với loài *H. hookerianum*, ngoại trừ **HH4**, tất cả các hợp chất còn lại đều có thể là lần đầu tiên được phân lập từ loài này. Chúng tôi sẽ tiếp tục nghiên cứu và so sánh các nghiên cứu quốc tế để củng cố thêm cho nhận định này trong thời gian tới.

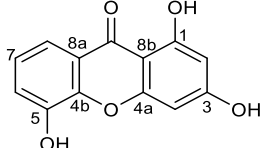
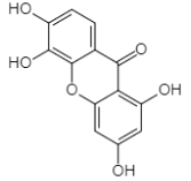
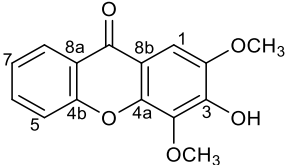
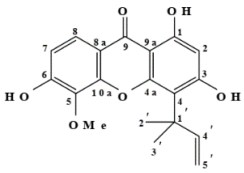
Để kết quả phân lập các hợp chất hóa học trong cây *Ban hooker* thêm phần phong phú và được đánh giá trong bức tranh toàn cảnh các hợp chất thiên nhiên, chúng tôi đã tra cứu thông tin phân lập từ thực vật và các nghiên cứu tác dụng sinh học đã được công bố trên thế giới của 37 hợp chất này (Bảng 4.2). Kết quả cho thấy có chín hợp chất chưa được nghiên cứu tác dụng sinh học là **HH5**, **HH7**, **HH10**, **HH12**, **HH13**, **HH16**, **HH31**, **HH32** và **HH36**. Các hợp chất còn lại đã được nghiên cứu tác dụng trên nhiều lĩnh vực như chống viêm, kháng khuẩn, kháng virus, gây độc tế bào, chống oxy hóa, chống dị ứng, chống trầm cảm, chống đái tháo đường... Như vậy, kết quả nghiên cứu của luận án này về thành phần hóa học và tác dụng sinh học đã góp phần làm phong phú thêm tri thức về hóa thực vật học của chi *Hypericum* nói chung và của loài *H. hookerianum* nói riêng. Đây cũng là những đóng góp mới của luận án.

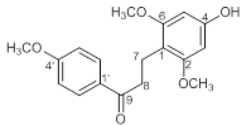
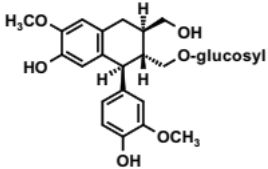
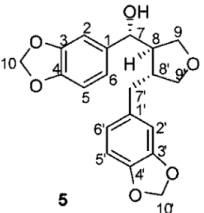
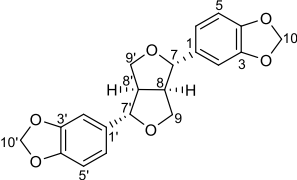
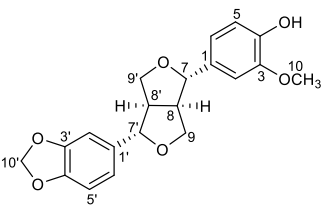


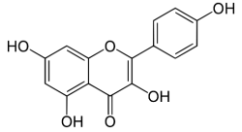
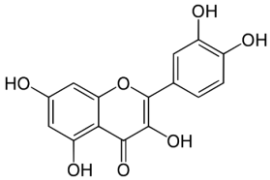
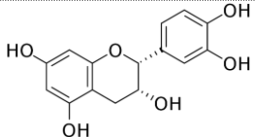
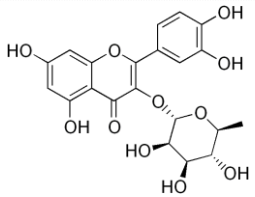
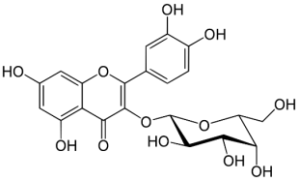
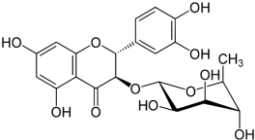
Bảng 4.2. Danh mục 37 hợp chất phân lập được từ cây *Ban hooker*

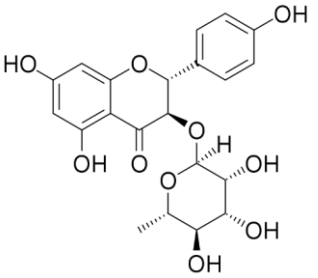
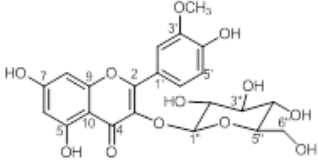
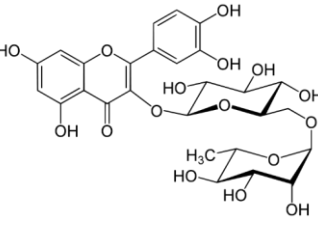
S TT	Kí hiệu	Tên gọi	Công thức cấu tạo	Thông tin phân lập từ thực vật	Tác dụng sinh học đã công bố
1	HH1	Chipericumín D		Đã phân lập từ rễ <i>H. chinense</i> [26]	Không có tác dụng gây độc tế bào u lympho L1210 chuột và tế bào u epidermoid người ( $EC_{50} > 10 \mu\text{M}$ ); không có tác dụng kháng vi khuẩn – vi nấm khi thử với <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Micrococcus luteus</i> ( $MIC > 32 \mu\text{g/mL}$ ) và <i>Aspergillus niger</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Cryptococcus neoformans</i> , <i>Trichophyton mentagrophytes</i> ( $IC_{50} > 32 \mu\text{g/mL}$ ) [26]
2	HH2	Uralioné D		Đã phân lập từ <i>H. uralum</i> [56]	Khả năng bảo vệ tế bào u sắc tố của tủy thượng thận chuột PC12 trước độc tính thần kinh của corticosteroid (mô hình gây trầm cảm <i>in vitro</i> ) ở khoảng nồng độ 0,1 - 10 $\mu\text{M}$ : tỷ lệ sống của tế bào PC12 cao hơn chất đối chứng fluoxetine. Tỷ lệ sống ở 10 $\mu\text{M}$ là 80,9% [56].
3	HH3	Uraloidin A		Đã phân lập từ phần trên mặt đất <i>H. henryi</i> [2]	Chống viêm theo cơ chế tạo NO của đại thực bào chuột bị kích thích bởi LPS: nồng độ 10 $\mu\text{M}$ ức chế tạo NO đạt 90,61% (chứng dương dexamethason là 94,88%). Bảo vệ tế bào u sắc tố của tủy thượng thận chuột PC12 trước độc tính thần kinh của corticosteroid (mô hình gây trầm cảm <i>in vitro</i> ) ở khoảng nồng độ 0,1 - 10 $\mu\text{M}$ : tỷ lệ sống của tế bào PC12 cao hơn chất đối chứng fluoxetine. Tỷ lệ sống ở 10 $\mu\text{M}$ là 85,3%. Tác dụng chống trầm cảm <i>in vivo</i> trên mô hình treo đuôi chuột (TST) và bơi cưỡng bức (FST):

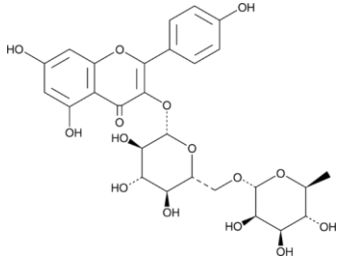
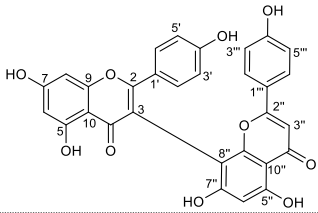
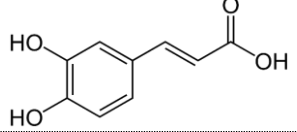
S TT	Kí hiệu	Tên gọi	Công thức cấu tạo	Thông tin phân lập từ thực vật	Tác dụng sinh học đã công bố
					liều 13mg/kg; 26mg/kg và chứng dương fluoxetine 25mg/kg làm giảm thời gian bắt động lần lượt 6,6%; 12,6% và 23,1% [56].
4	HH4	Furohyperforin		Đã phân lập từ hoa, quả <i>H. perforatum</i> , phần trên mặt đất <i>H. sampsonii</i> <i>H. henryi</i> <i>H. perforatum</i> [1], [35]	Bảo vệ tế bào u sắc tố của tủy thượng thận chuột PC12 trước độc tính thần kinh của corticosteroid (mô hình gây trầm cảm <i>in vitro</i> ) ở khoảng nồng độ 0,1 - 10 $\mu$ M: tỷ lệ sống của tế bào PC12 cao hơn chất đối chứng fluoxetine, tỷ lệ sống ở 10 $\mu$ M là 85,2% [56]. Không có tác dụng gây độc khi thử với tế bào SMMC-7721, HL-60, A-549, MCF-7, SW-480 ( $IC_{50} > 40 \mu$ M) [219].
5	HH5	Hypercohin K		Đã phân lập từ phần trên mặt đất <i>H. cohaerens</i> [54]	Chưa tìm thấy nghiên cứu về tác dụng sinh học
6	HH6	Multifidol glucosid (tên thường gọi 1-(2-methylbutyryl)phloroglucinol-glucopyranosid)		Chưa phân lập từ chi <i>Hypericum</i> Đã phân lập từ <i>Phyllanthus emblica</i> [177], <i>Acacia mearnsii</i> [220]	Thử tác dụng chống viêm: khả năng ức chế hoạt tính COX-1 yếu, $IC_{50} = 131,3 \mu$ M [175]
7	HH7	2-(2-methylbutyryl)phloroglucinol 1-O-(6''-O- $\beta$ -D-		Chưa phân lập từ chi <i>Hypericum</i> Đã phân lập từ <i>Phyllanthus emblica</i>	Chưa tìm thấy nghiên cứu về tác dụng sinh học

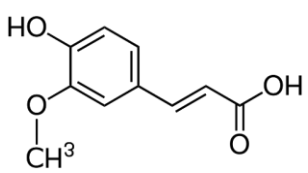
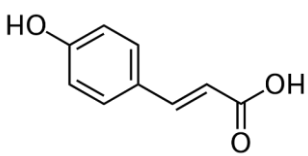
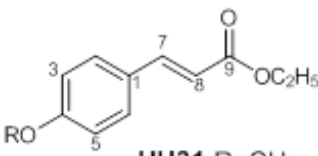
S TT	Kí hiệu	Tên gọi	Công thức cấu tạo	Thông tin phân lập từ thực vật	Tác dụng sinh học đã công bố
		apiofuranosyl)- $\beta$ -D-glucopyranosid			
8	HH8	1,3,5-trihydroxyxanthon		Đã phân lập từ <i>H. henryi</i> , <i>H. sikokumontanum</i> [221], [19]	Không ức chế virus cúm A/H1N1, A/H3N2, cúm B; không kháng HIV-1, HIV-2 ( $IC_{50} > 100 \mu M$ ) [222]. Không có tác dụng chống kết tập tiểu cầu [223]. Chống oxy hóa LDL xúc tác bởi $CuSO_4$ : $IC_{50} = 3,48 \mu M$ (chứng dương probucol: $IC_{50} = 0,57 \mu M$ ).
9	HH9	1,3,5,6-tetrahydroxyxanthon		Đã phân lập từ <i>H. scabrum</i> , <i>H. patulum</i> [224], [225], [226], [227]	Ức chế men chuyển angiotensin-1 phụ thuộc liều [228]. Gây độc <i>in vitro</i> với dòng tế bào A549 và MCF-7 mức trung bình: $IC_{50}$ lần lượt là $10 \mu g/ml$ và $9,3 \mu g/ml$ [229]. Không có tác dụng kháng HIV [229]
10	HH10	3-hydroxy-2,4-dimethoxyxanthon		Đã phân lập từ <i>H. chinense</i> , <i>H. erectum</i> , <i>H. monogynum</i> [227], [230]	Chưa tìm thấy nghiên cứu về tác dụng sinh học
11	HH11	Neriifolone A		Chưa phân lập từ chi <i>Hypericum</i> Đã phân lập từ <i>Cratoxylum sumatranum</i> [231]	Có tác dụng bảo vệ tế bào thần kinh SH-SY5Y được gây độc bởi 6-OHDA ( $EC_{50} = 0,7 \mu M$ ) [232]

S TT	Kí hiệu	Tên gọi	Công thức cấu tạo	Thông tin phân lập từ thực vật	Tác dụng sinh học đã công bố
12	HH12	4-hydroxy-2,6,4'-trimethoxydihydrochalcon		Chưa phân lập từ chi <i>Hypericum</i> Chưa tìm thấy thông tin phân lập từ loài khác	Chưa tìm thấy nghiên cứu về tác dụng sinh học ngoài luận án này.
13	HH13	Isolariciresinol 9'-O-β-D-glucopyranosid		Chưa phân lập từ chi <i>Hypericum</i> Đã được phân lập từ <i>Pelargonium reniforme</i> [185]	Chưa tìm thấy nghiên cứu về tác dụng sinh học
14	HH14	Isocubein		Chưa phân lập từ chi <i>Hypericum</i> Đã được phân lập từ <i>Daphne feddei</i> [187], [233]	Chống viêm (khả năng ức chế sản xuất NO) do kích thích của LPS: tác dụng kém với IC <sub>50</sub> > 0.3 μM/mL so với chứng dương aminoguanidin (IC <sub>50</sub> = 0.021 μM/mL) [187]
15	HH15	Sesamin		Chưa phân lập từ chi <i>Hypericum</i>	Chống viêm bởi ức chế phiên mã NF-kB dưới sự kích thích của TNF-alpha ở tế bào HepG2 phụ thuộc liều (IC <sub>50</sub> = 9,4 μM). Ức chế phụ thuộc liều biểu hiện của iNOS và COX-2 trên tế bào HepG2 bị kích thích bởi TNF-alpha [234]
16	HH16	Piperitol		Chưa phân lập từ chi <i>Hypericum</i> Đã được phân lập từ <i>Artemisia herba-alba</i> [235], <i>Anethum graveolens</i> [236]	Chưa tìm thấy nghiên cứu về tác dụng sinh học

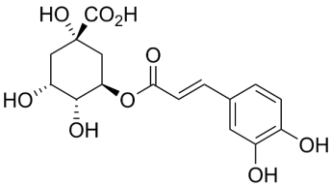
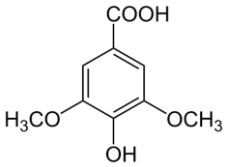
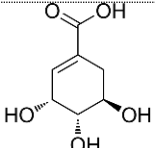
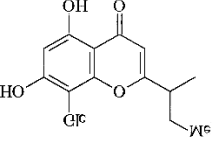
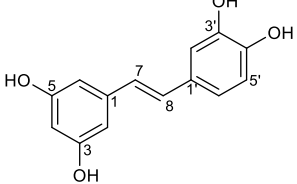
S TT	Kí hiệu	Tên gọi	Công thức cấu tạo	Thông tin phân lập từ thực vật	Tác dụng sinh học đã công bố
17	HH17	Kaempferol		Đã phân lập từ <i>H. japonicum</i> , <i>H. perforatum</i> [2], [101]	Đã được thương mại hóa dạng thực phẩm chức năng. Tác dụng chống oxy hóa, chống viêm, kháng khuẩn, chống ung thư, bảo vệ tế bào thần kinh, bảo vệ tim mạch [237].
18	HH18	Quercetin		Đã phân lập từ <i>H. thasium</i> , <i>H. hircinum</i> , <i>H. perforatum</i> , <i>H. ericoides</i> [98], [99]	Đã được thương mại hóa dạng thực phẩm chức năng. Tác dụng chống oxy hóa, chống viêm, chống lão hóa [238], [239].
19	HH19	(-)-epicatechin		Đã phân lập từ <i>H. perforatum</i> [102]	Chống oxy hóa, chống tia tử ngoại, kháng khuẩn, chống dị ứng và chống viêm [240], [241].
20	HH20	Quercitrin		Đã phân lập từ <i>H. perforatum</i> , <i>H. sikokumontanum</i> , ... [2], [99]	Chống oxy hóa, chống viêm, kháng khuẩn, điều biến miễn dịch [242]
21	HH21	Hyperosid		Đã phân lập từ <i>H. laricifolium</i> , <i>H. perforatum</i> [2], [99]	Chống ung thư, chống oxy hóa, kháng vi khuẩn – virus, chống trầm cảm và bảo vệ các cơ quan [243], [244]
22	HH22	Astilbin		Đã phân lập từ <i>H. perforatum</i> [99]	Điều biến miễn dịch, chống viêm, bảo vệ gan [245]

S TT	Kí hiệu	Tên gọi	Công thức cấu tạo	Thông tin phân lập từ thực vật	Tác dụng sinh học đã công bố
23	HH23	Engeletin		Đã phân lập từ <i>H. perforatum</i> [99]	Chống viêm mạnh trên mô hình gây viêm màng trong dạ con bởi LPS ở chuột bởi ức chế hoạt hóa yếu tố KB nhân tế bào phụ thuộc TLR [246]. Bảo vệ tế bào gan chuột khi gây độc bằng LPS và D-galactosamin [247]. Bảo vệ phổi trong thí nghiệm gây độc với LPS, làm giảm hoạt tính myeloperoxidase, giảm nồng độ cytokin gây viêm [248]. Ức chế ung thư phổi do làm giảm tăng sinh và kích thích chết theo chương trình thông qua điều biến con đường tín hiệu XIAP [249].
24	HH24	Isorhamnetin-3-O- $\beta$ -D-glucopyranosid		Chưa phân lập từ chi <i>Hypericum</i> Đã phân lập từ <i>Aristolochia kaempferi</i> [250]	Ức chế biệt hóa tế bào mỡ trên tế bào 3T3-L1 thông qua điều hòa các protein PPAR $\gamma$ , C/EBP $\alpha$ , SREBP1 và các protein tế bào tạo mỡ khác [251]
25	HH25	Rutin		Đã phân lập từ <i>H. perforatum</i> <i>H. sikokumontanum</i> <i>H. perfoliatum</i> <i>H. ericoides</i> [2], [100]	Đã được thương mại hóa với nhiều tác dụng khác nhau như chống oxi hóa, chống viêm, bảo vệ gan, bảo vệ đường tiêu hóa, chống rối loạn chuyển hóa [252]

S TT	Kí hiệu	Tên gọi	Công thức cấu tạo	Thông tin phân lập từ thực vật	Tác dụng sinh học đã công bố
26	HH26	Nicotiflorin		Đã phân lập từ <i>H. perforatum</i> [99]	<p>Chống viêm, bảo vệ nội mô, làm giảm tiết NO (chất trung gian phản ứng viêm được giải phóng khi nội mô tổn thương) trong điều trị đột quỵ [253]</p> <p>Hạn chế suy giảm nhận thức, suy giảm chuyển hóa năng lượng và stress oxi-hóa trên mô hình sa sút trí tuệ đa nhồi máu ở chuột [254].</p> <p>Trên mô hình gây độc tế bào gan chuột bởi Concanavalin A và D-Galactosamin: mức liều 25, 50, 100 mg/kg thể trọng trong 10 ngày đều làm giảm hoạt độ AST, ALT huyết thanh; cải thiện các thông số MDA, SOD, GSH và NO; làm giảm các cytokine tiền viêm (interleukin 1beta, interleukin-6, TNF-alpha, interferon-gamma) [255].</p> <p>Bảo vệ thần kinh <i>in vitro</i> và mô hình gây nhồi máu não kéo dài ở chuột: liều 2,5; 5 và 10 mg/kg thể trọng, đều làm giảm tổn thương não, giảm giải phóng LDH của tế bào thần kinh trên <i>in vitro</i> [256].</p>
27	HH27	3,8''-biapigenin		Đã phân lập từ <i>H. perforatum</i> , <i>H. thasium</i> [101], [97], [100]	Bảo vệ tế bào thần kinh qua thí nghiệm gây độc tế bào với kainate và mCMN-methyl-D-aspartase do ảnh hưởng đến các chu trình năng lượng của ty thể và kênh calci [257]
28	HH28	Acid caffeic		Đã phân lập từ <i>H. perforatum</i> , <i>H. linarioides</i> ,	Kháng khuẩn, kháng virus, chống viêm, chống oxi hóa, chống xơ động mạch, kích thích miễn dịch, chống đái tháo đường, chống ung thư [258]

S TT	Kí hiệu	Tên gọi	Công thức cấu tạo	Thông tin phân lập từ thực vật	Tác dụng sinh học đã công bố
				<i>H. confertum</i> , <i>H. pruinatum</i> [108], [105]	
29	<b>HH29</b>	Acid ferulic		Đã phân lập từ <i>H. perforatum</i> , <i>H. pruinatum</i> , <i>H. ericoides</i> [100], [109]	Có tác dụng chống oxi hóa, chống viêm, chống virus, chống dị ứng, chống huyết khối, chống ung thư [259]
30	<b>HH30</b>	Acid <i>p</i> -coumaric		Đã phân lập từ <i>H. perforatum</i> , <i>H. ericoides</i> , <i>H. montbretii</i> , <i>H. organifolium</i> [109], [100], [111]	Tác dụng chống vữa xơ, chống tổn thương hệ tim mạch do oxi hóa, chống ung thư, chống viêm, chống kết tập tiểu cầu [260]
31	<b>HH31</b>	Ethyl-4-methoxy- <i>trans</i> -cinnamat	 HH31 R=CH <sub>3</sub> HH32 R=H	Chưa phân lập từ chi <i>Hypericum</i> Đã phân lập từ <i>Hedychium spicatum</i> , <i>Kaempferia galanga</i>	Chưa tìm thấy nghiên cứu về tác dụng sinh học
32	<b>HH32</b>	Ethyl- <i>trans</i> -cinnamat		Chưa phân lập từ chi <i>Hypericum</i> Đã phân lập từ <i>Hedychium spicatum</i> [261], <i>Kaempferia galanga</i> [262]	Chưa tìm thấy nghiên cứu về tác dụng sinh học.



S TT	Kí hiệu	Tên gọi	Công thức cấu tạo	Thông tin phân lập từ thực vật	Tác dụng sinh học đã công bố
33	HH33	Acid chlorogenic		Đã phân lập từ <i>H. perforatum</i> , <i>H. linarioides</i> , <i>H. confertum</i> , <i>H. pruinatum</i> , <i>H. olivieri</i> , <i>H. scabrum</i> , <i>H. lydium</i> [108], [109]	Chống oxi hóa, bảo vệ gan – thận, kháng khuẩn, chống ung thư, điều chỉnh chuyển hóa đường và lipid, chống viêm, bảo vệ tế bào thần kinh. Đã có ứng dụng trong hóa thực phẩm [263], [264]
34	HH34	Acid syringic		Đã phân lập từ <i>H. perforatum</i> , <i>H. sinaicum</i> , <i>H. ericoides</i> [109], [100], [110]	Chống oxi hóa, chống viêm, chống ung thư, chống đái tháo đường, bảo vệ thần kinh, bảo vệ tim mạch, bảo vệ gan [265]
35	HH35	Acid shikimic		Đã phân lập từ <i>H. oblongifolium</i> [112]	Không thể hiện tác dụng chống oxy hóa trong thử nghiệm khả năng dọn gốc tự do DPPH [112]
36	HH36	5,7-dihydroxy-2-(1-methylpropyl) chromon-8-β-D-glucopyranosid		Đã phân lập từ <i>H. japonicum</i> [92]	Chưa tìm thấy nghiên cứu về tác dụng sinh học
37	HH37	Piceatannol		Chưa phân lập từ chi <i>Hypericum</i> Đã phân lập từ <i>Medicago sativa</i> [266]	Chống viêm, chống ung thư [267], [268]

### 4.3. VỀ TÁC DỤNG SINH HỌC CỦA CÂY BAN HOOKER

#### 4.3.1. Tác dụng chống oxy hóa

Quá trình oxy hóa trong cơ thể gây ra bởi các chất được gọi là các dạng oxy hóa hoạt động (ROS) [151]. ROS gồm các gốc tự do của ôxy là superoxid ( $O_2^{\bullet-}$ ), hydroxyl ( $OH^{\bullet}$ ), peroxy ( $RO_2^{\bullet}$ ), alkoxy ( $RO^{\bullet}$ ) và các tiền gốc tự do như HOCl, oxy đơn bội ( $^1O_2$ ), hydrogen peroxid ( $H_2O_2$ ), peroxyinitrit ( $ONOO^-$ ). Trong cơ thể con người luôn tồn tại sự cân bằng giữa các chất chống oxy hóa và ROS. Tuy nhiên, vì một lý do nào đó bên ngoài hoặc bên trong cơ thể làm mất cân bằng theo hướng gia tăng ROS gọi là stress oxy hóa [151]. Stress oxy hóa gây ra rất nhiều các bệnh nguy hại cho cơ thể như tổn hại ADN gây ung thư, viêm, các bệnh về tim mạch, thần kinh, tâm thần, lão hóa...[269].

Có thể loại bỏ ROS trong cơ thể bởi các chất chống oxy hóa, đóng vai trò là chất thu gom gốc tự do, chất nhường hydro, chất cho điện tử, chất phân hủy peroxid, chất khử oxy nhóm đơn, chất ức chế enzym, chất hiệp đồng và tác nhân tạo phức kim loại... Chất chống oxy hóa được chia thành hai loại theo bản chất enzym và không enzym, đều tồn tại trong môi trường nội bào và ngoại bào để giải độc ROS [270], cụ thể:

#### ***Các chất chống oxy hóa có bản chất enzym***

*Superoxid dismutase:* Các Superoxid dismutase (SODs) là một nhóm các enzym có khả năng xúc tác phản ứng phân rã các anion superoxid thành oxy và hydro peroxid. Ở người và các loài động vật có vú khác có 3 loại superoxid dismutase là SOD1 có trong tế bào chất, SOD2 trong ty thể và SOD3 trong khoang ngoại bào, trong đó SOD1 ở dạng dimer, SOD2 và SOD3 ở dạng tetramer.

*Catalase:* là nhóm enzym thường gặp, được tìm thấy trong tất cả các sinh vật sống, có vai trò xúc tác phản ứng phân hủy hydro peroxid thành oxy và nước, ngăn chặn tổn thương cho tế bào.

*Hệ thống glutathion:* bao gồm glutathion, glutathion reductase, glutathion peroxidase, và glutathion S-transferase. Glutathion peroxidase là enzym chứa bốn cofactor selen, có khả năng xúc tác phản ứng phân hủy hydro peroxid và các peroxid hữu cơ. Có ít nhất bốn isozyme glutathion peroxidase ở động vật, trong đó glutathion peroxidase 1 thường gặp nhất và có khả năng dọn gốc tự do hydro

peroxid mạnh, trong khi glutathion peroxidase 4 có tác dụng mạnh nhất với lipid peroxid. Glutathion S-transferase có hoạt tính cao trên các lipid peroxid. Các enzym này có nồng độ cao ở gan và có mặt trong hệ thống chuyển hóa chất độc.

***Các chất chống oxy hóa không có bản chất enzym***

*Acid ascorbic (Vitamin C)*: là một monosaccharid có mặt ở cả động vật và thực vật, tuy nhiên không được tổng hợp trong cơ thể người mà được lấy từ thức ăn. Trong tế bào, acid ascorbic giữ ở dạng khử bằng cách liên kết với glutathion, có khả năng trung hòa các gốc tự do như hydro peroxid.

*Glutathion*: là một peptid chứa cystein có mặt ở hầu hết các loài sống hiếu khí, được tổng hợp từ các amino acid, không nhất thiết phải bổ sung qua chế độ ăn. Glutathion có khả năng chống oxy hóa do nhóm thiol trong cystein là một tác nhân khử có khả năng chuyển qua lại dạng oxy hóa và dạng khử. Trong tế bào, glutathion được giữ ở dạng khử bởi enzym glutathion reductase. Do có nồng độ cao trong tế bào và có vai trò quan trọng trong giải độc tế bào, glutathion là một trong những chất chống oxy hóa tế bào quan trọng nhất.

*Melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine)*: là một hormon có ở động vật và một số sinh vật khác, là một chất chống oxy hóa mạnh có thể đi qua màng tế bào và hàng rào máu não dễ dàng. Không như các chất chống oxy hóa khác, melatonin không có chu kỳ tái sử dụng (khả năng chuyển qua lại dạng oxy hóa và dạng khử), vì vậy sau khi bị oxy hóa sẽ tạo ra một số sản phẩm bền vững, do vậy còn gọi là chất chống oxy hóa tự sát.

*Tocopherol và tocotrienol (Vitamin E)*: Vitamin E là tên gọi chung của tám hợp chất tocopherol và tocotrienol, là các vitamin thân dầu có hoạt tính chống oxy hóa. Trong đó, alpha-tocopherol được nghiên cứu nhiều nhất do có sinh khả dụng cao. Quá trình dọn các gốc tự do của alpha-tocopherol làm oxy hóa alpha-tocopherol thành alpha-tocopheoxyl có khả năng tái sử dụng bằng cách phản ứng với các chất oxy hóa khác như ascorbat, retinol hoặc ubiquinol.

*Acid uric*: là chất mang lại đến một nửa hoạt tính chống oxy hóa của huyết thanh. Trên thực tế, acid uric đã thay thế cho ascorbat ở người thông qua tiến hóa và cũng giống như acid ascorbic, acid uric có thể ngăn chặn sự hình thành các gốc tự do gây phản ứng oxy hóa [270].

Để đánh giá tác dụng chống oxy hóa của mẫu nghiên cứu, có nhiều phương pháp *in vitro* được sử dụng như khả năng dọn gốc tự do DPPH,  $O_2^{\bullet-}$ ,  $H_2O_2$ ,  $OH^{\bullet}$ , khả năng hấp thụ gốc tự do oxy, khả năng chống oxy hóa tương đương với Trolox, khả năng tạo chelat với kim loại...[151], [271]. Trong số các phương pháp đánh giá tác dụng chống oxy hóa, phương pháp DPPH được sử dụng nhiều nhất vì nhanh, đơn giản, rẻ tiền [271].

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tiến hành đánh giá tác dụng chống oxy hóa *in vitro* của cao BHM, các cao phân đoạn BHH, BHE, BHB và BHW phân trên mặt đất cây Ban hooker thu hái tại Việt Nam trên hai thử nghiệm dọn gốc tự do DPPH và  $O_2^{\bullet-}$ .

Từ kết quả nghiên cứu (bảng 3.24 và hình 3.36) cho thấy, cao phân đoạn BHE có tác dụng tốt nhất trên cả 02 mô hình nghiên cứu với giá trị  $IC_{50}$  là 25,91 và 17,64  $\mu\text{g/mL}$ .

Trên thế giới, một số nghiên cứu tác dụng chống oxy hóa của loài *H. hookerianum* cũng đã được thực hiện:

Nghiên cứu của Manosroi và cộng sự về tác dụng chống oxy hóa 06 loài thuộc chi *Guttiferae* thu hái tại Thái Lan được thực hiện với cao chiết MeOH và chloroform từ thân loài *Hypericum hookerianum* được thử tác dụng dọn gốc tự do DPPH, so sánh với chuẩn acid ascorbic và alpha-tocopherol. Theo đó, cao chiết MeOH và  $CHCl_3$  có  $IC_{50}$  lần lượt tương tự với  $IC_{50}$  của chuẩn acid ascorbic và alpha-tocopherol [272].

Nghiên cứu của H. Raghu Chandrashekhar và cộng sự được thực hiện với cao chiết MeOH từ các phần lá, rễ, hoa và phần trên mặt đất của loài *Hypericum hookerianum* thu hái tại Ấn Độ để đánh giá tác dụng chống oxy hóa bằng 08 phương pháp (ABTS, DPPH, Hydro peroxid, Nitric oxid, Deoxyribose, LPO, DMSO kiềm, p-NDA) so sánh với chuẩn acid ascorbic, rutin, BHA và alpha-tocopherol. Kết quả cho thấy cao chiết từ lá có tác dụng chống oxy hóa tốt nhất với kết quả  $IC_{50}$  với các phương pháp ABTS, DPPH,  $H_2O_2$ , deoxyribose và LPO lần lượt là  $5,6 \pm 0,3$ ;  $3,3 \pm 0,05$ ;  $58,06 \pm 1,95$ ;  $66 \pm 1,04$  và  $58 \pm 1,42$  mcg/mL (tương đương với các chất chuẩn). Cao chiết từ hoa cũng thể hiện tác dụng oxy hóa tốt với

IC<sub>50</sub> của các phương pháp ABTS, DPPH, hydro peroxid và hydroxyl lần lượt là  $7,65 \pm 0,26$ ;  $5,1 \pm 0,12$ ;  $117,64 \pm 5,14$  và  $74,16 \pm 5,05$   $\mu\text{g/mL}$  [142].

Nghiên cứu của Pradeep và cộng sự đánh giá tác dụng chống oxy hóa và chống viêm của dịch chiết nước chồi non loài *Hypericum hookerianum* dạng liposom hóa. Theo đó, dung dịch *Hypericum hookerianum* dạng liposom được sử dụng trên mô hình gây độc phôi cá ngựa (Zebra Fish Embryo), trên kết quả của RT-PCR, làm tăng xuất hiện các gen chịu trách nhiệm chống oxy hóa như Cat và Cu-Zn SoD [273].

Như vậy, cây Ban hooker thu hái tại Việt Nam trong nghiên cứu này cũng có tác dụng chống oxy hóa tốt so với cây cùng loài đó tại các vùng khí hậu và thổ nhưỡng khác trên thế giới.

Trong Luận án này, tại bảng 4.2 đã cho thấy có 11 hợp chất đã được chứng minh có hoạt tính chống oxy hóa bằng các nghiên cứu là **HH8, HH17, HH18, HH20, HH21, HH25, HH26, HH29, HH30, HH33, HH34**. Trong số 11 hợp chất này, chỉ có 01 hợp chất được phân lập từ phân đoạn cao *n*-hexan (BHH) là **HH8**, 10 hợp chất còn lại đều được phân lập từ phân đoạn cao ethylacetat (BHE) và 10 hợp chất này đều là những flavonoid (**HH17, HH18, HH20, HH21, HH25, HH26**) và phenolic (**HH29, HH30, HH33, HH34**). Như vậy, có thể thấy tác dụng tốt của cao phân đoạn BHE trong thử nghiệm tác dụng chống oxy hóa là phù hợp với kết quả phân lập các hợp chất, phù hợp với các nghiên cứu quốc tế đã được công bố.

Các kết quả sàng lọc hoạt tính bước đầu cho thấy, dược liệu Ban hooker là một nguyên liệu tiềm năng cho tác dụng chống oxy hóa. Đây là cơ sở khoa học cho những nghiên cứu chuyên sâu tiếp theo về tác dụng chống oxy hóa, giúp mở ra các hướng nghiên cứu mới về tác dụng bảo vệ gan, bảo vệ tế bào thần kinh, tác dụng chống ung thư...của cây thuốc Ban hooker.

#### 4.3.2. Tác dụng bảo vệ gan

Từ kết quả sàng lọc tác dụng chống oxy hóa *in vitro* cho thấy cao phân đoạn BHE và cao BHM có tác dụng dọn gốc tự do mạnh hơn các cao phân đoạn khác. Do đó, đề tài lựa chọn mẫu nghiên cứu là cao BHE và cao BHM với 2 mức liều 250 mg/kg và 500 mg/kg cân nặng chuột để đánh giá tác dụng bảo vệ gan trên mô

hình gây tổn thương gan cấp bằng paracetamol (PAR). Hai thông số được lựa chọn để đánh giá tác dụng bảo vệ gan là hoạt độ AST và ALT huyết thanh [274]. Để nghiên cứu sâu hơn về mối liên quan giữa tác dụng bảo vệ gan và cơ chế chống oxy hóa, đề tài đã tiến hành xác định hàm lượng MDA, GSH và hoạt độ SOD trong gan.

Mô hình sử dụng PAR liều cao để gây tổn thương gan dựa trên độc tính của PAR khi dùng quá liều. Trên người, khi dùng quá liều PAR gây ra tổn thương gan nghiêm trọng, tác dụng này có liên quan đến sự hình thành phức hợp với protein của gan, gây tổn thương ty thể và ADN [275], [276]. Khi vào cơ thể, khoảng 90% PAR liên hợp với sulfat hoặc glucuronid trở thành chất chuyển hóa không có độc tính và được thải trừ qua nước tiểu. Khoảng 5-10% PAR được chuyển hóa qua CYP<sub>450</sub> (đặc biệt là CYP<sub>2E1</sub> và CYP<sub>1A2</sub>) thành một gốc tự do có tính ái nhân cao là *N*-acetyl-*p*-benzoquinonimin (NAPQI) [277]. Với liều điều trị thông thường, PAR ít gây độc cho gan do lượng NAPQI sinh ra nhanh chóng được đào thải bằng cách liên kết với nhóm sulfhydryl của glutathion trong gan tạo thành một chất chuyển hóa mới không còn độc tính. Tuy nhiên, nếu dùng quá liều PAR sẽ tạo ra một lượng lớn NAPQI và từ đó làm cạn kiệt glutathion của gan. NAPQI gây peroxy hóa thành phần lipid trong lớp kép phospholipid của màng tế bào gan dẫn đến tổn thương các tế bào gan, sản phẩm được tạo thành là MDA cùng các gốc tự do superoxid [278].

AST và ALT là các enzym chuyển hóa acid amin và có mặt ở tất cả các tế bào của cơ thể. AST phân bố nhiều ở tim, gan, thận trong khi ALT phân bố chủ yếu ở gan, thận, cơ. Khi tế bào gan bị tổn thương, AST và ALT sẽ được giải phóng từ gan vào máu, vì vậy các kết quả xét nghiệm đo hoạt độ của chúng trong huyết thanh sẽ tăng lên. Mức độ tăng hoạt độ của 2 enzym ALT và AST tùy thuộc vào mức độ tổn thương gan. Do đó, định lượng hoạt độ AST và ALT huyết thanh sẽ đánh giá được mức độ tổn thương gan.

MDA là sản phẩm cuối cùng của quá trình peroxy hóa lipid. PAR gián tiếp làm tăng quá trình peroxy hóa lipid trong tế bào gan dẫn đến hàm lượng MDA trong gan tăng. Do vậy, xác định hàm lượng MDA trong gan sẽ đánh giá được mức độ peroxy hóa lipid tế bào gan gây ra bởi PAR [279].

Ngoài hàm lượng MDA, hàm lượng GSH và hoạt độ của một số enzym khác ở gan như SOD cũng phản ánh chức năng gan [151], [280]. GSH là một chất chống oxy hóa có mặt trong thực vật, động vật, nấm, vi khuẩn. GSH có khả năng ngăn ngừa các chất oxy hóa hoạt động như các gốc tự do, sự peroxy hóa lipid và kim loại nặng ảnh hưởng xấu đến tế bào [281]. SOD là một enzym đặc biệt, có thể chuyển hóa các gốc superoxid thành chất ít độc hơn là hydrogen peroxid, sau đó chất này được chuyển hóa thành nước và oxy bởi enzym catalase.

Silymarin là hỗn hợp 07 flavonolignan (flavonoid liên kết với lignin) bao gồm silybin A, silybin B, isosilybin A, isosilybin B, silychristin A, silychristin B, silydianin và 01 flavonoid là taxifolin được chiết xuất từ quả và hạt của cây kế sữa (*Silybum marianum*), trong đó silybin A và B là những thành phần chính và có tác dụng bảo vệ gan [282]. Các nghiên cứu cho thấy silymarin an toàn, ít thể hiện độc tính khi sử dụng với liều cao [282]. Silymarin đã được chứng minh có tác dụng cải thiện tổn thương gan gây ra bởi rượu, carbon tetrachlorid, thioacetamid, paracetamol. Silymarin được sử dụng trong điều trị các bệnh gan như viêm gan, xơ gan [283]. Do đó, nhóm nghiên cứu đã sử dụng silymarin là thuốc đối chiếu.

Kết quả nghiên cứu cho thấy, cho chuột uống silymarin với mức liều 100 mg/kg làm giảm hoạt độ AST và ALT lần lượt là 43,14 % và 34,21 % so với lô chứng bệnh lý, mức giảm này có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ). Về tác dụng chống oxy hóa, silymarin làm giảm 60,33 % hàm lượng MDA, làm tăng 33,33 % hàm lượng GSH và 37,47 % hoạt độ SOD so với lô chứng bệnh lý, tất cả mức thay đổi này đều có ý nghĩa thống kê so với lô chứng bệnh lý ( $p < 0,05$ ). Qua đó cho thấy mối liên quan giữa tác dụng bảo vệ gan và tác dụng chống oxy hóa của silymarin.

Khi cho chuột uống PAR liều 400 mg/kg cân nặng chuột, hoạt độ AST, ALT ở các lô chứng bệnh lý tăng cao rõ rệt so với lô chứng sinh lý, từ đó khẳng định tác dụng gây tổn thương gan của paracetamol. Kết quả đánh giá sơ bộ tác dụng bảo vệ gan của các mẫu thử cho thấy, ở 2 mức liều là 250 mg/kg và 500 mg/kg, cao toàn phần (BHM) cây Ban hooker làm giảm hoạt độ AST và ALT có ý nghĩa thống kê so với lô chứng bệnh lý.

Ở 2 mức liều 250 mg/kg và 500 mg/kg, cao phân đoạn ethyl acetat (BHE) làm giảm hoạt độ AST và ALT so với lô chứng bệnh (mức giảm có xu hướng tăng

lên khi tăng mức liều). Tuy nhiên mức giảm này không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ).

Để tìm hiểu cơ chế tác dụng bảo vệ gan có liên quan đến tác dụng dọn gốc tự do hay không, trong nghiên cứu này chúng tôi đã tiến hành xác định nồng độ MDA, GSH và hoạt độ enzym SOD ở các lô thử uống cao BHM và cao BHE ở 2 mức liều 250 mg/kg và 500 mg/kg. Kết quả cho thấy cao BHM làm giảm hoạt độ MDA, tăng hoạt độ GSH và SOD so với lô chứng bệnh. Mặc dù, tác dụng giảm hoạt độ MDA và tăng hoạt độ GSH có xu hướng phụ thuộc vào nồng độ nhưng chỉ có tác dụng làm tăng hoạt độ SOD là cho sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô chứng bệnh. Trong khi đó, cao phân đoạn ethyl acetat (BHE) cũng làm tăng hoạt độ SOD có ý nghĩa thống kê so với lô chứng bệnh, mức tăng có xu hướng phụ thuộc vào nồng độ (bảng 3.25).

Từ các kết quả trên cho thấy cao methanol toàn phần (BHM) có tác dụng bảo vệ gan liên quan đến cơ chế chống oxy hóa theo hướng tăng hoạt độ SOD. Đối với cơ chế tăng tác dụng của GSH, giảm hàm lượng MDA của cao BHM cần tiến hành thêm các nghiên cứu trong tương lai theo hướng tăng liều thử để khẳng định giả thiết này. Cao phân đoạn BHE cũng làm tăng hoạt độ SOD có ý nghĩa thống kê so với lô chứng bệnh và có xu hướng phụ thuộc vào liều. Đây cũng là phân đoạn có hoạt độ SOD cao nhất. Các kết quả này phù hợp với kết quả sàng lọc tác dụng chống oxy hóa của cao BHM và các cao phân đoạn từ cây Ban hooker. Tuy nhiên, kết quả cũng chỉ ra rằng cao phân đoạn BHE có xu hướng bảo vệ gan phụ thuộc liều mẫu thử, chưa chứng minh tác dụng bảo vệ gan trên mô hình gây tổn thương gan cấp bằng paracetamol.

Trên thế giới, một số nghiên cứu tác dụng bảo vệ gan của loài *H. hookerianum* cũng đã được thực hiện:

Nghiên cứu của H. Raghu Chandrashekhara và cộng sự được thực hiện bằng cao chiết MeOH từ các phần lá, rễ, hoa và phần trên mặt đất của loài *Hypericum hookerianum* thu hái tại Ấn Độ. Kết quả cho thấy, cao chiết lá liều 100 mg/kg và 200 mg/kg đường uống được sử dụng trong mô hình gây độc bởi  $\text{CCl}_4$  trên chuột thể hiện tác dụng bảo vệ gan phụ thuộc liều qua các thông số: hoạt độ Catalase (CAT), SOD và mức độ peroxid hóa lipid (LPO, tính theo mol MDA/mg protein).



Với mức liều 200 mg/kg, cao chiết MeOH lá có tác dụng tương đương chứng dương silymarin liều 100mg/kg [142].

Như vậy, cây Ban hooker thu hái tại Việt Nam trong nghiên cứu này cũng có tác dụng bảo vệ gan tốt so với cây cùng loài đó tại các vùng khí hậu và thổ nhưỡng khác trên thế giới.

### **4.3.3. Tác dụng bảo vệ tế bào thần kinh**

#### **4.3.3.1. Tác dụng bảo vệ tế bào thần kinh của các cao chiết**

Stress oxy hóa đã được biết đến là nguyên nhân chính gây chết tế bào thần kinh, có liên quan đến các bệnh thoái hóa thần kinh [284], [285] như đột quỵ do thiếu máu cục bộ, xơ cứng teo cơ một bên, bệnh Parkinson và bệnh Alzheimer [286-288]. Glutamat là một chất dẫn truyền thần kinh kích thích nội sinh trong hệ thần kinh trung ương. Khi nồng độ glutamat quá cao trong hệ thống thần kinh trung ương sẽ gây ra độc tố kích thích và stress oxy hóa, từ đó dẫn đến thoái hóa tế bào thần kinh [162]. Trong các mô hình gây độc tế bào thần kinh, glutamat đã được chứng minh gây ra sự tích tụ các dạng oxy hóa hoạt động nội bào (ROS) và giảm hàm lượng GSH thông qua ức chế sự hấp thu cysteine vào tế bào [163]. Stress oxy hóa do glutamat có khả năng kích hoạt các đường dẫn tín hiệu bao gồm c-Jun N-terminal kinase (JNK) và MAPK, từ đó ảnh hưởng đến quá trình viêm, tăng sinh và chết của tế bào [164], [159]. Tế bào HT<sub>22</sub> là dòng tế bào thần kinh hải mã chuột đã được sử dụng rộng rãi trong các thí nghiệm gây stress oxy hóa bởi glutamat *in vitro* do sự thiếu hụt các thụ thể glutamat ion chức năng của chúng [289], [290].

Tuy nhiên, hiện chưa chắc chắn cơ chế gây chết tế bào HT<sub>22</sub> bởi glutamat là do kích thích tế bào chết theo chương trình (apoptosis) hay gây hoại tử tế bào (necrosis) hoặc một kiểu gây chết tế bào khác. Nghiên cứu của tác giả Masayuki Fukui và cộng sự tiến hành năm 2009 tập trung vào vấn đề này, theo đó, nghiên cứu đã chỉ ra cơ chế gây độc phụ thuộc thời gian của glutamat. Sau khi được ủ với glutamat, trong giai đoạn đầu (8 – 12 giờ), glutamat chủ yếu gây chết tế bào do hoại tử, trong khi đó ở giai đoạn muộn (16 – 24 giờ), glutamat gây chết tế bào theo chương trình [291].

N-acetylcystein (NAC), là hợp chất cystein được acetyl hóa, đã được Tổ chức

Y tế Thế giới (WHO) công nhận là một loại thuốc thiết yếu trong hệ thống y tế cơ bản [292]. NAC là tiền chất của glutathion và đã được báo cáo có tác dụng chống oxy hóa thông qua loại bỏ các gốc tự do, tăng nồng độ cystein và GSH trong tế bào [292]. NAC đã được chứng minh có thể thâm nhập hiệu quả vào hàng rào máu não, làm tăng nồng độ GSH trong não. Đây là một yếu tố quan trọng trong các liệu pháp để điều trị các bệnh rối loạn thần kinh. Ngoài ra, NAC cũng đã được nghiên cứu có khả năng bảo vệ các tế bào thần kinh khỏi các tác nhân gây thoái hóa có liên quan đến quá trình kích hoạt và điều hòa các thụ thể glutamat N-methyl-D-aspartat [292], [293]. Vì vậy, NAC có thể sử dụng phối hợp hiệu quả trong điều trị các bệnh như Parkinson, Alzheimer, đau thần kinh và đột quỵ [292], [293].

Các cao chiết của cây Ban hooker trong nghiên cứu này đã được chứng minh có tác dụng chống oxy hóa, do đó chúng tôi tiến hành đánh giá tác dụng bảo vệ tế bào thần kinh hải mã chuột HT<sub>22</sub> bị gây độc bởi glutamat với NAC là mẫu đối chứng dương. Mô hình này đã được sử dụng để đánh giá, tìm kiếm các hợp chất có tác dụng bảo vệ tế bào thần kinh trong nhiều các nghiên cứu trước đây [289], [290]. Kết quả nghiên cứu của luận án cho thấy, các cao chiết BHM, cao phân đoạn BHH, BHE của cây Ban hooker đều có tác dụng bảo vệ tế bào bị gây độc bởi glutamat 5 mM ở 03 nồng độ 5,56; 16,67 và 50,0  $\mu\text{g/mL}$  (Hình 3.37). Trong đó, cao phân đoạn BHE có tỷ lệ tế bào sống sót lớn nhất trong các mẫu nghiên cứu với tỷ lệ lần lượt là 93%, 92% ở 02 nồng độ 16,67 và 50,0  $\mu\text{g/mL}$  (mẫu đối chứng dương NAC 1 mM có tỷ lệ tế bào sống sót là 87%). Kết quả này phù hợp với tác dụng chống oxy hóa tốt nhất (*in vitro* và *in vivo*) của cao chiết BHE khi so với các cao chiết khác.

Ngoài BHE, các cao chiết BHH, BHD và BHB cũng cho thấy tác dụng bảo vệ tế bào thần kinh. Tỷ lệ tế bào HT<sub>22</sub> sống sót lần lượt là 65, 89, 62% khi thử nghiệm với cao BHM và 85, 84, 66% khi thử nghiệm với cao BHH. Cao BHB thể hiện tác dụng ức chế sự chết tế bào ở 02 nồng độ 5,56 và 16,67  $\mu\text{g/mL}$  với tỷ lệ tế bào sống sót lần lượt là 82% và 70% (Hình 3.37), tuy nhiên ở nồng độ 50  $\mu\text{g/mL}$ , lại gây độc đối với tế bào thần kinh. Đây là báo cáo đầu tiên về tác dụng bảo vệ tế bào bị gây độc bởi glutamat của các mẫu cao chiết từ loài Ban hooker.

Tác dụng tốt của các cao chiết gợi mở những hướng nghiên cứu cho việc sử

dụng phần trên mặt đất cây Ban hooker trong điều trị các bệnh liên quan đến thoái hóa thần kinh như đột quy do thiếu máu cục bộ, xơ cứng teo cơ một bên, bệnh Parkinson và bệnh Alzheimer. Ngoài ra, các kết quả nghiên cứu cũng sẽ định hướng cho việc phân lập, tìm kiếm các chất có tác dụng bảo vệ tế bào thần kinh từ các cao chiết phân đoạn. Đồng thời gợi ý nghiên cứu liên quan đến cơ chế tác dụng của các mẫu thử từ cây Ban hooker như: cơ chế kích thích tế bào chết theo chương trình (apoptosis) hay gây hoại tử tế bào (necrosis); cơ chế kích thích gây độc liên quan đến miễn dịch [294].

#### **4.3.3.2. Tác dụng bảo vệ tế bào thần kinh của các hợp chất phân lập được**

##### *a. Tác dụng bảo vệ tế bào HT<sub>22</sub> trên mô hình gây độc bởi glutamat*

Để đánh giá tác dụng của các hợp chất phân lập được từ các cao chiết, nhóm nghiên cứu đã lấy 20 hợp chất đã được phân lập được từ cây Ban hooker để sàng lọc, đánh giá tác dụng bảo vệ tế bào thần kinh HT<sub>22</sub> ở 03 nồng độ 5,56; 16,67 và 50,0  $\mu$ M. Các hợp chất được thử nghiệm bao gồm **HH1, HH2, HH3, HH4, HH5, HH6, HH7, HH10, HH11, HH12, HH13, HH14, HH15, HH16, HH18, HH19, HH20, HH31, HH36, HH37**. Kết quả cho thấy, có 04 hợp chất thể hiện tác dụng bảo vệ tế bào bị gây độc bởi glutamat là **HH12, HH18, HH31, HH36** với tỷ lệ tế bào sống sót > 70% (hình 3.38).

Điều đáng chú ý là một số các hợp chất phloroglucinol đã phân lập như **HH2, HH3, HH4** đã được chứng minh là có tác dụng bảo vệ tế bào thần kinh tốt trên mô hình gây chết tế bào thần kinh chuột PC-12 gây ra bởi corticosteron lại không có tác dụng trên mô hình nghiên cứu này [56].

Bốn hợp chất có tác dụng tốt hơn các hợp chất còn lại là **HH12, HH18, HH31** và **HH36** được tiến hành thử tác dụng bảo vệ tế bào thần kinh ở tám nồng độ 0,02; 0,06; 0,20; 0,61; 1,85; 5,56; 16,67; 50  $\mu$ M, để tính toán giá trị EC<sub>50</sub>. Kết quả cho thấy, hợp chất **HH12** có tác dụng tốt nhất với giá trị EC<sub>50</sub> là 1,48  $\mu$ M. Ba hợp chất còn lại **HH18, HH31, HH36** có giá trị EC<sub>50</sub> lần lượt là 9,70; 35,70 và 26,78  $\mu$ M (Hình 3.35). Hợp chất **HH12** được phân lập từ cao phân đoạn BHH, trong khi **HH18, HH31, HH36** được phân tách từ cao phân đoạn BHE, do đó tác dụng tốt của 02 cao phân đoạn BHH và BHE (hình 3.39) có thể do đóng góp của các thành phần này.

Hợp chất quercetin (**HH18**) đã được báo cáo có tác bảo vệ tế bào HT<sub>22</sub> bị gây độc bởi glutamat trong các nghiên cứu trước đây [295], [296]. Đây là công bố đầu tiên về tác dụng bảo vệ tế bào thần kinh của 03 hợp chất **HH12**, **HH31** và **HH36**. Đặc biệt, tác dụng rất tốt của hợp chất 4-hydroxy-2,6,4'-trimethoxydihydrochalcon (**HH12**), EC<sub>50</sub> = 1,48  $\mu$ M) cho thấy, đây là một nguyên liệu tiềm năng cho các nghiên cứu chuyên sâu tiếp theo về tìm kiếm các thuốc điều trị các bệnh liên quan đến thoái hóa thần kinh.

*b. Tác dụng bảo vệ tế bào SH-SY5Y trên mô hình gây độc bởi 6-OHDA*

Bệnh Parkinson là một rối loạn thoái hoá của hệ thần kinh trung ương, gây ảnh hưởng đến tình trạng cử động, thăng bằng và kiểm soát cơ. Trong cơ thể bệnh nhân parkinson, hàm lượng dopamin (một chất dẫn truyền thần kinh) bị thiếu hụt đáng kể. Các kết quả nghiên cứu đã chỉ ra rằng, stress oxy hóa, viêm thần kinh, rối loạn chức năng ty thể là những nguyên nhân gây Parkinson [154], [155]. Dòng tế bào u nguyên bào thần kinh người SH-SY5Y đã được sử dụng trong nhiều trong các nghiên cứu *in vitro* để đánh giá tác dụng của các thuốc trên bệnh Parkinson do độ tương đồng cao với tế bào thần kinh dopamin [158]. Chất độc thần kinh 6-OHDA có cấu trúc gần giống như dopamin, được sử dụng trong các mô hình thí nghiệm *in vivo* và *in vitro* của bệnh Parkinson do nó có thể gây tổn thương một cách chọn lọc các nơ ron dopamin. Khi ở bên trong tế bào thần kinh, 6-OHDA tích tụ, trải qua quá trình tự oxy hóa từ đó thúc đẩy sự hình thành các các dạng oxy hóa hoạt động (ROS) và ức chế các phức hợp ty thể I và IV, gây thiếu hụt adenosine triphosphat [154], [155]. Rối loạn chức năng của ty thể có thể dẫn đến vỡ màng ngoài ty thể và giải phóng các protein pro-apoptotic từ nhân, dẫn đến chết tế bào thông qua sự kích hoạt con đường apoptosis nội sinh [154], [158].

Ngoài ra, 6-OHDA còn ảnh hưởng đến các kênh điện áp calci (Voltage gated calcium channels – VGCC). VGCC là một kênh vận chuyển rất nhạy cảm với stress oxi hóa, việc hoạt hóa hay bất hoạt kênh này đều có thể ảnh hưởng đến tế bào. Theo một nghiên cứu được tiến hành năm 2014 cho thấy 6-OHDA có khả năng kích thích gây biến đổi dẫn truyền thần kinh điện và chức năng của các kênh calci tại neuron dopaminergic tại vùng đật chất đen (Substantia nigra pars compacta - SNpc). 6-OHDA làm khử dòng điện trong tế bào, đồng thời làm tăng

nồng độ ion calci tự do nội bào. Hơn nữa, 6-OHDA có thể điều chỉnh dòng ion calci thông qua con đường dẫn truyền Protein kinase phụ thuộc vào AMP vòng (cAMP-Dependent protein kinase – PKA) [297].

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tiến hành sàng lọc, đánh giá tác dụng bảo vệ tế bào u nguyên bào thần kinh SH-SY5Y của 20 hợp chất đã phân lập (**HH1–HH7**, **HH10–HH16**, **HH18–HH20**, **HH31**, **HH36** và **HH37**) ở 03 nồng độ 5,56; 16,67 và 50,0  $\mu\text{M}$ . Kết quả có 03 hợp chất có tác dụng bảo vệ tế bào SH-SY5Y bị gây độc bởi 6-OHDA bao gồm chipericum D (**HH1**), sesamin (**HH15**), piperitol (**HH16**) với tỷ lệ tế bào sống sót > 70% với ít nhất một trong các nồng độ nghiên cứu (hình 3.40).

Ba hợp chất có tác dụng tốt hơn các hợp chất còn lại là **HH1**, **HH15** và **HH16** được tiến hành thử tác dụng bảo vệ tế bào thần kinh SH-SY5Y ở 08 nồng độ 0,02; 0,06; 0,20; 0,61; 1,85; 5,56; 16,67; 50  $\mu\text{M}$  để tính toán giá trị  $\text{EC}_{50}$ . Kết quả cho thấy, sesamin (**HH15**) có tác dụng tốt nhất với giá trị  $\text{EC}_{50}$  là 2,85  $\mu\text{M}$ . Hai hợp chất còn lại chipericum D (**HH1**) và piperitol (**HH16**) có giá trị  $\text{EC}_{50}$  lần lượt là 47,08 và 26,78  $\mu\text{M}$  (hình 3.41).

Trong số 03 hợp chất có tác dụng tốt nêu trên, hai furofuran lignan (**HH15** và **HH16**) có thể là lần đầu tiên được phân lập từ chi *Hypericum*, trong khi một phloroglucinol (**HH1**) có thể cũng là lần đầu tiên được tìm thấy trong thành phần hóa học của loài *H. hookerianum*. Với dữ liệu có được (Bảng 4.2 của Luận án này), cả ba hợp chất chưa được chứng minh có tác dụng chống oxy hóa, đồng thời chúng đều được phân lập từ phân đoạn cao BHH, là phân đoạn cao chiết có tác dụng yếu nhất trong thử nghiệm tác dụng chống oxy hóa của Luận án này. Những điều đó có thể cho thấy tác dụng bảo vệ tế bào thần kinh của chúng liên quan đến giữ cân bằng nội môi calci và ổn định dẫn truyền thần kinh điện trong não.

Theo tra cứu, chưa có tài liệu nào báo cáo về tác dụng bảo vệ tế bào SH-SY5Y bị gây độc bởi 6-OHDA của 03 hợp chất **HH1**, **HH15** và **HH16**. Các kết quả nghiên cứu của Luận án này tạo cơ sở khoa học, gợi mở cho những nghiên cứu tiếp theo để làm sáng tỏ hơn tác dụng đối với bệnh Parkinson của các mẫu chiết từ cây *Ban hooker*.

## KẾT LUẬN

### 1. Về đặc điểm thực vật

Luận án đã xác định được tên khoa học của cây Ban hooker thu hái tại Xã Sa Pả, huyện Sa Pa, tỉnh Lào Cai là *Hypericum hookerianum* Wight & Arn., (họ Ban - Hypericaceae). Đã mô tả được đầy đủ đặc điểm hình thái thực vật bên ngoài, xác định đặc điểm vi phẫu, đặc điểm bột của một số bộ phận cây Ban hooker.

### 2. Về thành phần hóa học

Luận án đã phân lập được 37 hợp chất từ phần trên mặt đất cây Ban hooker. Các hợp chất lần lượt được xác định là chipericum D (**HH1**), uralione D (**HH2**), uraloidin A (**HH3**), furohyperforin (**HH4**), hypercohin K (**HH5**), multifidol glucosid (**HH6**), 2-(2-methylbutyryl)phloroglucinol 1-O-(6''-O- $\beta$ -D-apiofuranosyl)- $\beta$ -D-glucopyranosid (**HH7**), 1,3,5-trihydroxyxanthon (**HH8**), 1,3,5,6-tetrahydroxyxanthon (**HH9**), 3-hydroxy-2,4-dimethoxyxanthon (**HH10**), neriifolone A (**HH11**), 4-hydroxy-2,6,4'-trimethoxydihydrochalcon (**HH12**), isolariciresinol 9'-O- $\beta$ -D-glucopyranosid (**HH13**), isocubein (**HH14**), sesamin (**HH15**), piperitol (**HH16**), kaempferol (**HH17**), quercetin (**HH18**), (-)-epicatechin (**HH19**), quercitrin (**HH20**), hyperoside (**HH21**), astilbin (**HH22**), engeletin (**HH23**), isorhamnetin-3-O- $\beta$ -D-glucopyranosid (**HH24**), rutin (**HH25**), nicotiflorin (**HH26**), 3,8''-biapigenin (**HH27**), acid caffeic (**HH28**), acid ferulic (**HH29**), acid *p*-coumaric (**HH30**), ethyl-4-methoxy-*trans*-cinnamat (**HH31**), ethyl-*trans*-cinnamat (**HH32**), acid chlorogenic (**HH33**), acid syringic (**HH34**), acid shikimic (**HH35**), 5,7-dihydroxy-2-(1-methylpropyl) chromon-8- $\beta$ -D-glucopyranosid (**HH36**), piceatannol (**HH37**).

Trong số 37 hợp chất phân lập được, có 11 hợp chất là **HH6**, **HH7**, **HH11**–**HH16**, **HH24**, **HH31** và **HH37** có thể lần đầu tiên được tìm thấy trong một loài thuộc chi *Hypericum*. Ngoại trừ **HH4**, tất cả các hợp chất còn lại đều có thể là lần đầu tiên phân lập được từ loài *H. hookerianum*.

### 3. Về tác dụng sinh học

Cao phân đoạn ethyl acetat phần trên mặt đất cây Ban hooker có tác dụng dọn gốc tự do DPPH và superoxid với giá trị IC<sub>50</sub> lần lượt là 17,92 và 7,39  $\mu$ g/mL.

Trong nghiên cứu đánh giá tác dụng bảo vệ gan, cao methanol cây *Ban hooker* (ở 2 mức liều là 250 mg/kg và 500 mg/kg) làm giảm hoạt độ AST và ALT có ý nghĩa thống kê so với lô chứng bệnh lý.

Hoạt độ SOD trong gan ở nhóm thử cao methanol và cao phân đoạn ethyl acetat (ở 02 mức liều 250 mg/kg và 500 mg/kg) cao hơn có ý nghĩa thống kê so với lô chứng bệnh lý ( $p < 0,05$ ).

Cao chiết methanol, các cao phân đoạn *n*-hexan, ethyl acetat và *n*-butanol từ loài *H. hookerianum* có tác dụng bảo vệ tế bào thần kinh trên mô hình gây độc tế bào thần kinh hải mã chuột HT<sub>22</sub> bởi glutamat ở các nồng độ 5,56; 16,67 và 50,0  $\mu\text{g/mL}$ .

Hợp chất 4-hydroxy-2,6,4'-trimethoxydihydrochalcon (**HH12**) có tác dụng tốt nhất bảo vệ tế bào HT<sub>22</sub> bị gây độc bởi glutamat với giá trị EC<sub>50</sub> là 1,48  $\mu\text{M}$ . Các hợp chất **HH18**, **HH31**, **HH36** có giá trị EC<sub>50</sub> lần lượt là 9,70; 35,70 và 26,78  $\mu\text{M}$ .

Các hợp chất **HH1**, **HH15** và **HH16** thể hiện tác dụng bảo vệ tế bào u nguyên bào thần kinh SH-SY5Y bị gây độc bởi 6-OHDA với giá trị EC<sub>50</sub> lần lượt là 47,08; 2,85 và 26,78  $\mu\text{M}$ .

## KIẾN NGHỊ

1. Đề nghị gọi tên tiếng Việt của loài nghiên cứu là *Ban hooker*. Tiếp tục nghiên cứu bằng giải trình tự gen của cây *Ban hooker* để củng cố thêm cho việc định danh loài này.
2. Tiếp tục nghiên cứu thành phần hóa học của cao chiết phân đoạn *n*-Butanol mà luận án chưa có điều kiện nghiên cứu.
3. Tiếp tục nghiên cứu cơ chế và tác dụng bảo vệ tế bào thần kinh của hợp chất 4-hydroxy-2,6,4'-trimethoxydihydrochalcon (**HH12**) và sesamin (**HH15**) vì có tác dụng tốt bảo vệ tế bào thần kinh HT<sub>22</sub> trên mô hình gây độc bởi glutamat và tế bào thần kinh SH-SY5Y trên mô hình gây độc bởi 6-OHDA.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bridi H., Meirelles, G. C., Von Poser, G. L. (2018), "Structural diversity and biological activities of phloroglucinol derivatives from *Hypericum* species", *Phytochemistry*. 155, tr. 203-232.
2. Zhao J., Liu W., Wang, J. C. (2015), "Recent advances regarding constituents and bioactivities of plants from the genus *Hypericum*", *Chem Biodivers*. 12(3), tr. 309-49.
3. Tanaka N., Kashiwada, Y. (2021), "Characteristic metabolites of *Hypericum* plants: their chemical structures and biological activities", *J Nat Med*. 75(3), tr. 423-433.
4. Zhang R., et al. (2020), "Ethnopharmacology of *Hypericum* species in China: A comprehensive review on ethnobotany, phytochemistry and pharmacology", *J Ethnopharmacol*. 254, p. 112686.
5. Võ Văn Chí (2012), *Từ điển cây thuốc Việt Nam*, Vol. 1, NXB Y học, Hà Nội.
6. Phạm Hoàng Hộ (1999), *Cây cỏ Việt Nam*, Vol. 1, Nhà xuất bản Trẻ, Hà Nội.
7. Nguyễn Tiên Bân (1997), *Cẩm nang tra cứu và nhận biết các họ thực vật hạt kín ở Việt Nam*, NXB Nông Nghiệp, Hà Nội.
8. Armen Leonovich Takhtadzhian, Takhtajan Armen (1997), *Diversity and Classification of Flowering Plants*, Columbia University Press, USA.
9. Wu Z. Y. Raven P. H. (2007), *Flora of China*, Vol. 13, Science Press and Missouri Botanical Garden, Ann Bot. .
10. Li Xi-wen, K.B Robson (2007), "Clusiaceae", in Wu ZY, Piter .H. Raven, De Yuan Hong, Editor, *Flora of China*, Sci. Press, Beijing & Missouri Bot. Gard. Press, St. Louis, USA, tr. 2 - 18.
11. Gagnepain F. (1909), *Hypericum/Hypericaceae*, ed. Lecomte, M.H. , Vol. 1, Flore générale de l'Indo-Chine, Paris.
12. Nguyễn Tiên Bân (2003), *Danh lục các loài thực vật ở Việt Nam*, NXB Nông nghiệp, Hà Nội.
13. Ngô Đức Phương (2006), "Bổ sung một loài cây thuốc cho hệ thực vật Việt Nam - Ban Wight (*Hypericum wightianum* Wall. ex Wight et Arn.)- Clusiaceae", *Tạp chí Dược liệu*. 11, tr. 47-49.
14. Trần Danh Việt, et al. (2017), "Đánh giá đặc điểm nông sinh học cây Ban âu di thực tại Bắc Hà – Lào Cai.", *Tạp chí Dược liệu*. Tập 22(2/2017), tr. 123 - 128.
15. Đỗ Huy Bích, Đặng Quang Chung, Bùi Xuân Chương (2003), *Cây thuốc và Động vật làm thuốc ở Việt Nam*, Vol. 1, NXB Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
16. Tada Masahiro, et al. (1991), "Phloroglucinol derivatives as competitive inhibitors against thromboxane A2 and leukotriene D4 from *Hypericum erectum*", *J Phytochemistry*. 30, tr. 2559-2562.



17. Lu S., et al. (2016), "Erecricins A-E, prenylated acylphloroglucinols from the roots of *Hypericum erectum*", *Fitoterapia*. 114, tr. 188-193.
18. Tanaka Naonobu, et al. (2008), "Takaneones A-C, prenylated butylphloroglucinol derivatives from *Hypericum sikokumontanum*", *Tetrahedron Letters*. 49(17), tr. 2799-2803.
19. Tanaka N., et al. (2009), "Chromone and chromanone glucosides from *Hypericum sikokumontanum* and their anti-*Helicobacter pylori* activities", *Phytochemistry*. 70(1), tr. 141-6.
20. Tanaka N., et al. (2011), "Yojironins E-I, prenylated acylphloroglucinols from *Hypericum yojiroanum*", *Bioorg Med Chem Lett*. 21(18), tr. 5393-7.
21. Henry G. E., et al. (2006), "Acylphloroglucinol derivatives from *Hypericum prolificum*", *J Nat Prod*. 69(11), tr. 1645-8.
22. Henry G. E., et al. (2009), "Bioactive acylphloroglucinols from *Hypericum densiflorum*", *Phytother Res*. 23(12), tr. 1759-62.
23. Crockett S., et al. (2016), "A new chromanone derivative isolated from *Hypericum lissophloeus* (Hypericaceae) potentiates GABA<sub>A</sub> receptor currents in a subunit specific fashion", *Bioorg Med Chem*. 24(4), tr. 681-5.
24. Masashi Nagai, Masahiro Tada (1987), "Antimicrobial Compounds, Chinesin I and II from Flowers of *Hypericum chinense* L". 16(7), tr. 1337-1340.
25. Tanaka Naonobu, et al. (2009), "Acylphloroglucinol, biyouyanagiol, biyouyanagin B, and related spiro-lactones from *Hypericum chinense*", *Journal of Natural Products*. 72(8), tr. 1447-1452.
26. Abe S., Tanaka N., Kobayashi J. (2012), "Prenylated acylphloroglucinols, chipericumins A-D, from *Hypericum chinense*", *J Nat Prod*. 75(3), tr. 484-8.
27. Wang X. W., et al. (2008), "A new phloroglucinol diglycoside derivative from *Hypericum japonicum* Thunb", *Molecules*. 13(11), tr. 2796-803.
28. Ferraz A. B., et al. (2001), "Benzopyrans from *Hypericum polyanthemum*", *Phytochemistry*. 57(8), tr. 1227-30.
29. Gibbons S., et al. (2005), "An anti-staphylococcal acylphloroglucinol from *Hypericum foliosum*", *Phytochemistry*. 66(12), tr. 1472-5.
30. Tala M. F., et al. (2015), "Antimicrobial and cytotoxic constituents from native Cameroonian medicinal plant *Hypericum riparium*", *Fitoterapia*. 102, tr. 149-55.
31. Fobofou S. A., et al. (2015), "Isolation and anticancer, anthelmintic, and antiviral (HIV) activity of acylphloroglucinols, and regioselective synthesis of empetrifranzinans from *Hypericum roeperianum*", *Bioorg Med Chem*. 23(19), tr. 6327-34.
32. Fobofou S. A., et al. (2016), "Tricyclic Acylphloroglucinols from *Hypericum lanceolatum* and Regioselective Synthesis of Selancins A and B", *J Nat Prod*. 79(4), tr. 743-53.

33. Athanasas K., et al. (2004), "Hyperjovinols A and B: Two new phloroglucinol derivatives from *Hypericum jovis* with antioxidant activity in cell cultures", *J Nat Prod.* 67(6), tr. 973-7.
34. Winkelmann K., et al. (2003), "Antibacterial and cytotoxic activity of prenylated bicyclic acylphloroglucinol derivatives from *Hypericum amblycalyx*", *Z Naturforsch C J Biosci.* 58(7-8), tr. 527-32.
35. Wang Q. Q., et al. (2020), "Polyprenylated acylphloroglucinols as deubiquitinating protease USP7 inhibitors from *Hypericum hookerianum*", *Fitoterapia.* 146, p. 104678.
36. Shiu W. K., et al. (2012), "Antibacterial acylphloroglucinols from *Hypericum olympicum*", *J Nat Prod.* 75(3), tr. 336-43.
37. Ishiguro K., et al. (1986), "Sarthrolen A and B, new antibiotic compounds from *Hypericum japonicum*", *Planta Med*(4), tr. 288-90.
38. Ishiguro K., et al. (1987), "Saroaspidin A, B, and C: additional antibiotic compounds from *Hypericum japonicum*", *Planta Med.* 53(5), tr. 415-7.
39. Guoming Gu, Shuzhen Feng, Xiaoyan Wang (1988), "The isolation and structure of japonicine A,B,C,D", *Acta Chimica Sinica.* 46(3), tr. 246-257.
40. Rocha Leandro, et al. (1996), "More phloroglucinols from *Hypericum brasiliense*", *Phytochemistry.* 42(1), tr. 185-188.
41. VidalCcana-Ccapatinta Gari, Poser Gilsane Linovon (2015), "Acylphloroglucinol derivatives from *Hypericum laricifolium* Juss", *Phytochemistry Letters.* 12, tr. 63-68.
42. Bridi H., et al. (2016), "Dimeric acylphloroglucinols from *Hypericum austrobrasiliense* exhibiting antinociceptive activity in mice", *Phytochemistry.* 122, tr. 178-183.
43. Bystrov N. S., et al. (1975), "The structure of hyperforin", *Tetrahedron Letters.* 16(32), tr. 2791-2794.
44. Maisenbacher P., Kovar K. A. (1992), "Adhyperforin: A Homologue of Hyperforin from *Hypericum perforatum*", *Planta Med.* 58(3), tr. 291-3.
45. Shan M. D., Hu L. H., Chen Z. L. (2001), "Three new hyperforin analogues from *Hypericum perforatum*", *J Nat Prod.* 64(1), tr. 127-30.
46. Ishida Y., et al. (2010), "Polyprenylated benzoylphloroglucinol-type derivatives including novel cage compounds from *Hypericum erectum*", *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 58(3), tr. 336-43.
47. Ye Ye Xing-Wei Yang, Gang Xu (2016), "Unusual adamantane type polyprenylated acylphloroglucinols with an oxirane unit and their structural transformation from *Hypericum hookerianum*", *Tetrahedron.* 72(22), tr. 3057-3062.
48. Zhou Zhongbo, et al. (2016), "Cytotoxic polycyclic polyprenylated acylphloroglucinol derivatives and xanthenes from *Hypericum attenuatum*", *Phytochemistry Letters.* 15, tr. 215-219.

49. Li Dongyan, et al. (2015), "Hyperattenuins A–I, bioactive polyprenylated acylphloroglucinols from *Hypericum attenuatum* Choisy", *RSC Advances*. 5(7), tr. 5277-5287.
50. Ye Y., et al. (2019), "Homo-Adamantane type polycyclic polyprenylated acylphloroglucinols from *Hypericum hookerianum*", *Fitoterapia*. 133, tr. 43-50.
51. Decosterd Laurent A., et al. (1989), "New Cell Growth-Inhibitory Cyclohexadienone Derivatives from *Hypericum calycinum* L", *Medicinal and Biological Chemistry*. 72(8), tr. 1833-1845.
52. Chen Xuan-Qin, et al. (2011), "Spirocyclic Acylphloroglucinol Derivatives from *Hypericum beanii*", *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 59(10), tr. 1250-1253.
53. Zhang Jing-Jing, et al. (2015), "1,9-seco-Bicyclic Polyprenylated Acylphloroglucinols from *Hypericum uralum*", *Journal of Natural Products*. 78(12), tr. 3075-3079.
54. Liu X., et al. (2013), "Bioactive polyprenylated acylphloroglucinol derivatives from *Hypericum cohaerens*", *J Nat Prod*. 76(9), tr. 1612-8.
55. Yang X. W., et al. (2014), "New acylphloroglucinol derivatives with diverse architectures from *Hypericum henryi*", *Organic Letters*. 16(9), tr. 2434-2437.
56. Zhou Z. B., et al. (2016), "Polycyclic Polyprenylated Derivatives from *Hypericum uralum*: Neuroprotective Effects and Antidepressant-like Activity of Uralodin A", *J Nat Prod*. 79(5), tr. 1231-40.
57. Gao Wan, et al. (2016), "Polycyclic Polyprenylated Acylphloroglucinol Congeners from *Hypericum scabrum*", *Journal of Natural Products*. 79(6), tr. 1538-1547.
58. Hu Lihong, Sim Keng-Yeow (2000), "Sampsoniones A–M, a Unique Family of Caged Polyprenylated Benzoylphloroglucinol Derivatives, from *Hypericum sampsonii*", *Tetrahedron*. 56, tr. 1379-1386.
59. Lin Yun-Lian, Wu Yu-San (2003), "Polyprenylated Phloroglucinol Derivatives from *Hypericum sampsonii*", *Helvetica Chimica Acta*. 86(6), tr. 2156-2163.
60. Tian Wen-Jing, et al. (2016), "Hypersampsones S–W, new polycyclic polyprenylated acylphloroglucinols from *Hypericum sampsonii*", *RSC Advances*. 6(56), tr. 50887-50894.
61. Tian W. J., et al. (2014), "Dioxasampsones A and B, two polycyclic polyprenylated acylphloroglucinols with unusual epoxy-ring-fused skeleton from *Hypericum sampsonii*", *Org Lett*. 16(24), tr. 6346-9.
62. Zhu H., et al. (2015), "Hyperascyrones A-H, polyprenylated spirocyclic acylphloroglucinol derivatives from *Hypericum ascyron* Linn", *Phytochemistry*. 115, tr. 222-30.
63. Li Wei-Xian, et al. (2021), "Type B polycyclic polyprenylated acylphloroglucinols from the roots of *Hypericum beanii*", *Chinese Journal of Natural Medicines*. 19(5), tr. 385-390.

64. Qiu D. R., et al. (2021), "Cytotoxic polyprenylated phloroglucinol derivatives from *Hypericum elodeoides* Choisy modulating the transactivation of RXR $\alpha$ ", *Bioorg Chem.* 107, p. 104578.
65. Zong J. F., et al. (2021), "Polyprenylated acylphloroglucinol meroterpenoids with PTP1B inhibition from *Hypericum forrestii*", *Fitoterapia.* 153, p. 104959.
66. Lu W. J., et al. (2021), "Diverse Polycyclic Polyprenylated Acylphloroglucinol Congeners with Anti-Nonalcoholic Steatohepatitis Activity from *Hypericum forrestii*", *J Nat Prod.* 84(4), tr. 1135-1148.
67. Zhang N., et al. (2020), "Longisglucinols A-C, Structurally Intriguing Polycyclic Polyprenylated Acylphloroglucinols with Anti-inflammatory Activity from *Hypericum longistylum*", *Org Lett.* 22(20), tr. 7926-7929.
68. Zeng Y. R., et al. (2021), "Hypermoins A-D: Rearranged Nor-Polyprenylated Acylphloroglucinols from the Flowers of *Hypericum monogynum*", *J Org Chem.* 86(10), tr. 7021-7027.
69. Zeng Yan-Rong, et al. (2021), "Hymoins A–D: Two Pairs of Polyprenylated Acylphloroglucinols from *Hypericum monogynum* and Their Light-Induced Transformation", *Organic Letters.* 23(8), tr. 3125-3129.
70. Duan Y., et al. (2021), "Hypaluton A, an Immunosuppressive 3,4-nor-Polycyclic Polyprenylated Acylphloroglucinol from *Hypericum patulum*", *J Org Chem.* 86(9), tr. 6478-6485.
71. Sun Hao-Ran, et al. (2021), "Hypseudohenrins I–K: three new polycyclic polyprenylated acylphloroglucinol derivatives from *Hypericum pseudohenryi*", *Journal of Asian Natural Products Research.* 23(6), tr. 536-544.
72. Sun H., et al. (2021), "Polycyclic polyprenylated acylphloroglucinol derivatives from *Hypericum pseudohenryi*", *Phytochemistry.* 187, p. 112761.
73. Duan Yulin, et al. (2021), "Discovery of bioactive polycyclic polyprenylated acylphloroglucinols from *Hypericum wilsonii*", *Bioorganic Chemistry.* 115, p. 105246.
74. Bernardi Ana Paula M, et al. (2005), "Benzophenones from *Hypericum carinatum*", *Journal of Natural Products.* 68(5), tr. 784-786.
75. Cheng Y. B., et al. (2013), "Hyperinakin, a new anti-inflammatory phloroglucinol derivative from *Hypericum nakamurai*", *Nat Prod Res.* 27(8), tr. 727-34.
76. Kitanov G. M., Nedialkov P. T. (2001), "Benzophenone O-glucoside, a biogenic precursor of 1,3,7-trioxygenated xanthenes in *Hypericum annulatum*", *Phytochemistry.* 57(8), tr. 1237-43.
77. Demirkiran Ozlem (2012), "Three new benzophenone glycosides with MAO-A inhibitory activity from *Hypericum thasium* Griseb", *Phytochemistry Letters.* 5(4), tr. 700-704.
78. Rouis Zyed, et al. (2013), "Benzophenone Glycosides from *Hypericum humifusum* ssp. austral", *Journal of Natural Products.* 76(5), tr. 979-982.

79. Xie Jin-Yan, et al. (2022), "Two new benzophenone glycosides from the aerial parts of *Hypericum przewalskii*", *Natural Product Research*. 36(14), tr. 3520-3528.
80. Hu L., et al. (2016), "Filicinic Acid Based Meroterpenoids with Anti-Epstein-Barr Virus Activities from *Hypericum japonicum*", *Org Lett*. 18(9), tr. 2272-5.
81. Yang Xing-Wei, et al. (2016), "Hyperjapones A–E, Terpenoid Polymethylated Acylphloroglucinols from *Hypericum japonicum*", *Organic Letters*. 18(8), tr. 1876-1879.
82. Zhang Jie, et al. (2022), "Hypericin: Source, Determination, Separation, and Properties", *Separation & Purification Reviews*. 51(1), tr. 1-10.
83. Wirz A., et al. (2000), "Bisanthraquinone glycosides of *Hypericum perforatum* with binding inhibition to CRH-1 receptors", *Phytochemistry*. 55(8), tr. 941-7.
84. Don Ming-Jaw, et al. (2004), "New Phenolic Principles from *Hypericum sampsonii*", *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. 52, tr. 866-9.
85. Tanaka N., et al. (2009), "Xanthonones from *Hypericum chinense* and their cytotoxicity evaluation", *Phytochemistry*. 70(11-12), tr. 1456-61.
86. Tanaka Naonobu, Takaishi Yoshihisa (2007), "Xanthonones from stems of *Hypericum chinense*", *Chemical Pharmaceutical Bulletin*. 55(1), tr. 19-21.
87. Tanaka N., Takaishi Y. (2006), "Xanthonones from *Hypericum chinense*", *Phytochemistry*. 67(19), tr. 2146-51.
88. Ferrari Franco, et al. (2005), "Xanthonones from calli of *Hypericum Perforatum* subsp. *Perforatum*", *Natural Product Research*. 19, tr. 171 - 176.
89. Fu P., et al. (2006), "Two new xanthonones from *Hypericum japonicum*", *Natural Product Research*. 20(13), tr. 1237-1240.
90. Wilairat R., et al. (2005), "Cytotoxicities of xanthonones and cinnamate esters from *Hypericum hookerianum*", *Planta Med*. 71(7), tr. 680-2.
91. Chung M. I., et al. (1999), "A new chalcone, xanthonones, and a xanthonolignoid from *Hypericum geminiflorum*", *J Nat Prod*. 62(7), tr. 1033-5.
92. Wu Q. L., et al. (1998), "Xanthonones from *Hypericum japonicum* and *H. henryi*", *Phytochemistry*. 49(5), tr. 1395-402.
93. Hong D., et al. (2004), "Sulfonated xanthonones from *Hypericum sampsonii*", *Phytochemistry*. 65(18), tr. 2595-8.
94. Ishiguro K., Yamamoto R., Oku H. (1999), "Patulosides A and B, novel xanthone glycosides from cell suspension cultures of *Hypericum patulum*", *J Nat Prod*. 62(6), tr. 906-8.
95. Wang A. Z., et al. (2021), "Acroxanthonones A-E, New Lavandulated Xanthonones from *Hypericum acmosepalum* N. Robson", *Fitoterapia*. 154, p. 104923.
96. Ishiguro K., et al. (2002), "Bisxanthonones from *Hypericum japonicum*: inhibitors of PAF-induced hypotension", *Planta Med*. 68(3), tr. 258-61.
97. Demirkiran O., et al. (2009), "Cellular reactive oxygen species inhibitory constituents of *Hypericum thasium* Griseb", *Phytochemistry*. 70(2), tr. 244-9.

98. Chimenti F., et al. (2006), "Quercetin as the active principle of *Hypericum hircinum* exerts a selective inhibitory activity against MAO-A: extraction, biological analysis, and computational study", *J Nat Prod.* 69(6), tr. 945-9.
99. Butterweck V., et al. (2000), "Flavonoids from *Hypericum perforatum* show antidepressant activity in the forced swimming test", *Planta Med.* 66(1), tr. 3-6.
100. Hosni Karim, et al. (2010), "Bioactive components of three *Hypericum* species from Tunisia: A comparative study", *Industrial Crops and Products.* 31, tr. 158-163.
101. Silva B., et al. (2008), "Quercetin, kaempferol and biapigenin from *Hypericum perforatum* are neuroprotective against excitotoxic insults", *Neurotox Res.* 13(3-4), tr. 265-79.
102. Ploss O., Petereit F., Nahrstedt A. (2001), "Procyanidins from the herb of *Hypericum perforatum*", *Pharmazie.* 56(6), tr. 509-11.
103. Tanaka Naonobu, et al. (2011), "Biyoulactones A–C, New Pentacyclic Meroterpenoids from *Hypericum chinense*", *Organic Letters.* 13(20), tr. 5488-5491.
104. Aramaki Yoshinori, Chiba Kazuhiro, Tada Masahiro (1995), "Spiro-lactones, hyperolactone A-D from *Hypericum chinense*", *Phytochemistry.* 38(6), tr. 1419-1421.
105. Tanaka N., et al. (2005), "Biyouyanagin A, an anti-HIV agent from *Hypericum chinense* L. var. *salicifolium*", *Org Lett.* 7(14), tr. 2997-9.
106. Niwa Kanji, et al. (2021), "Hyperdioxanes, dibenzo-1,4-dioxane derivatives from the roots of *Hypericum ascyron*", *Journal of Natural Medicines.* 75(4), tr. 907-914.
107. Damen F., et al. (2021), "A new polyketide from the bark of *Hypericum roeperianum* Schimp. (Hypericaceae)", *Nat Prod Res.* 35(14), tr. 2381-2387.
108. Camas Necdet, et al. (2014), "Chemical composition of *Hypericum* species from the Taeniocarpium and Drosanthe sections", *Plant Systematics and Evolution.* 300, tr. 953-960.
109. Zeljković Sanja Čavar, et al. (2017), "Environmental factors do not affect the phenolic profile of *Hypericum perforatum* Growing Wild in Bosnia and Herzegovina", *Natural Product Communications.* 12(9), tr. 1465-1468.
110. El-Hawary S., et al. (2022), "Antiinflammatory and antioxidant activity of *Hypericum sinaicum* Boiss. growing widely in Egypt", *Nat Prod Res.* 36(11), tr. 2913-2916.
111. Oztürk Nilgün, Tunçel Muzaffer, Potoğlu-Erkara İsmühan (2009), "Phenolic compounds and antioxidant activities of some *Hypericum* species: A comparative study with *H. perforatum*", *Pharmaceutical Biology.* 47(2), tr. 120-127.
112. Raziq N., et al. (2015), "In vitro anti-oxidant potential of new metabolites from *Hypericum oblongifolium* (Guttiferae)", *Nat Prod Res.* 29(24), tr. 2265-70.

113. Nguyễn Quốc Thúc (2006), *Nghiên cứu về thực vật, thành phần hóa học và tác dụng sinh học của một số loài thuộc chi Hypericum L. ở Việt Nam*, Luận án tiến sĩ dược học, Viện Dược liệu, Hà Nội.
114. Viện Dược liệu (2011), *Nghiên cứu di thực và quy trình trồng trọt cây ban Hypericum perforatum L. để chiết xuất sản phẩm chứa hypericin*, Bộ Y tế, Đề tài nghiên cứu cấp Bộ, Hà Nội.
115. Vitiello Benedetto (2010), "Hypericum perforatum Extracts as Potential Antidepressants", *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 51(5), tr. 513-517.
116. Xu L., et al. (2005), "Experimental study of the total flavonoid in *Hypericum perforatum* on depression", *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 30(15), tr. 1184-8.
117. Linde K., et al. (1996), "St John's wort for depression-an overview and meta-analysis of randomised clinical trials", *Bmj*. 313(7052), tr. 253-8.
118. Müldner H., Zöller M. (1984), "Antidepressive effect of a *Hypericum* extract standardized to an active hypericine complex. Biochemical and clinical studies", *Arzneimittelforschung*. 34(8), tr. 918-20.
119. Suzuki O., et al. (1984), "Inhibition of monoamine oxidase by hypericin", *Planta Med*. 50(3), tr. 272-4.
120. Suzuki O., et al. (1980), "Inhibition of type A and type B monoamine oxidase by isogentisin and its 3-o-glucoside", *Planta Medica*. 39(05), tr. 19-23.
121. Okpanyi S. N., Weischer M. L. (1987), "[Animal experiments on the psychotropic action of a *Hypericum* extract]", *Arzneimittelforschung*. 37(1), tr. 10-3.
122. Baureithel K. H., et al. (1997), "Inhibition of benzodiazepine binding in vitro by amentoflavone, a constituent of various species of *Hypericum*", *Pharm Acta Helv*. 72(3), tr. 153-7.
123. Bladt S., Wagner H. (1994), "Inhibition of MAO by fractions and constituents of *hypericum* extract", *J Geriatr Psychiatry Neurol*. 7 Suppl 1, tr. S57-9.
124. Gaster B., Holroyd J. (2000), "St John's wort for depression: a systematic review", *Arch Intern Med*. 160(2), tr. 152-6.
125. Müller D., Pfeil T., Von den Driesch, V. (2003), "Treating depression comorbid with anxiety results of an open, practice-oriented study with St John's wort WS 5572 and valerian extract in high doses", *Phytomedicine*. 10 Suppl 4, tr. 25-30.
126. Sánchez-Mateo C. C., Prado B., Rabanal R. M. (2002), "Antidepressant effects of the methanol extract of several *Hypericum* species from the Canary Islands", *J Ethnopharmacol*. 79(1), tr. 119-27.
127. Wan D., et al. (2003), "Antidepressant effect of ethanol extracts from three species of sect. *Hypericum* medicinal plants in mice", *Zhong Yao Cai*. 26(3), tr. 187-9.
128. Mukherjee P. K., Saritha G. S., Suresh B. (2002), "Antimicrobial potential of two different *Hypericum* species available in India", *Phytother Res*. 16(7), tr. 692-5.

129. Lyles J. T., et al. (2017), "The Chemical and Antibacterial Evaluation of St. John's Wort Oil Macerates Used in Kosovar Traditional Medicine", *Front Microbiol.* 8, p. 1639.
130. Vijayan P., et al. (2003), "In vitro cytotoxicity and antitumour properties of *Hypericum mysorense* and *Hypericum patulum*", *Phytother Res.* 17(8), tr. 952-6.
131. Madunić J., et al. (2016), "Evaluation of the cytotoxic activity of *Hypericum* spp. on human glioblastoma A1235 and breast cancer MDA MB-231 cells", *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng.* 51(13), tr. 1157-63.
132. França Hildegado Seibert, et al. (2013), "Antiproliferative activity of the hexanic extract and phloroglucinols from *Hypericum brasiliense*", *Revista Brasileira de Farmacognosia.* 23(5), tr. 844-847.
133. Brito L. C., Berenger A. L. R., Figueiredo M. R. (2017), "An overview of anticancer activity of *Garcinia* and *Hypericum*", *Food Chem Toxicol.* 109(Pt 2), tr. 847-862.
134. Zhang H. B., et al. (2013), "The effect-enhancing and toxicity-reducing activity of *Hypericum japonicum* Thunb. extract in murine liver cancer chemotherapy", *Mol Clin Oncol.* 1(2), tr. 395-399.
135. Pabuçcuoğlu A., et al. (2003), "The in vitro effects of *Hypericum* species on human leukocyte myeloperoxidase activity", *J Ethnopharmacol.* 87(1), tr. 89-92.
136. Galeotti N. (2017), "*Hypericum perforatum* (St John's wort) beyond depression: A therapeutic perspective for pain conditions", *J Ethnopharmacol.* 200, tr. 136-146.
137. Vũ Thị Cẩm Tú (2017), *Phân lập một số hợp chất từ cao phân đoạn ethyl acetate từ cây ban lá dính (*Hypericum sampsonii* Hance), đánh giá hàm lượng và tác dụng chống oxy hóa của chất phân lập được*, Luận án tiến sĩ, Đại học Dược Hà Nội, Hà Nội
138. Huang SB, Chen CM (1987), "Study the botanical origin resource of lian qiao and han lian cao", *Journal Chinese Medicine Material*(4), tr. 50-51.
139. Ji YY (2018), *Ethnobotanical and phytochemical studies on *Hypericum stellatum* (Clusiaceae)*, Minzu University of China, Beijing.
140. Li Xi-wen, Yan-hui Li (1990), "Flora Reipublicae Popularis Sinicae (FRPS)", in Xi-wen, Li, Editor, Science Press, Beijing China, p. 50 (2).
141. Henry Geneive E., et al. (1996), "Plukenetione A. An unusual adamantyl ketone from *Clusia plukenetii* (guttiferae)", *Tetrahedron Letters.* 37(48), tr. 8663-8666.
142. Raghu Chandrashekar H., et al. (2009), "Antioxidant activity of *Hypericum hookerianum* Wight and Arn", *Natural Product Research.* 23(13), tr. 1240-1251.



143. Wahile Atul, et al. (2007), "Antioxidant potentials of *Hypericum hookerianum* (Family: Hypericaceae) on CCl<sub>4</sub> induced hepatotoxicity in rats", *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*. 7, tr. 85-93.
144. Vijayan Prabha, et al. (2003), "Selective in vitro cytotoxicity of *Hypericum hookerianum* towards cancer cell lines", *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*. 3, tr. 141-146.
145. Mukherjee P. K., Saritha G. S., Suresh B. (2001), "Antibacterial spectrum of *Hypericum hookerianum*", *Fitoterapia*. 72(5), tr. 558-60.
146. Vijayan P., et al. (2004), "Antiviral activity of medicinal plants of Nilgiris", *Indian J Med Res*. 120(1), tr. 24-9.
147. Alam M. N., Bristi N. J., Rafiquzzaman M. (2013), "Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity", *Saudi Pharm J*. 21(2), tr. 143-52.
148. Thuong Phuong Thien, et al. (2009), "Antioxidant activity and principles of Vietnam bitter tea *Ilex kudingcha*", *Food Chemistry*. 113(1), tr. 139-145.
149. Beauchamp Charles, Fridovich Irwin (1971), "Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels", *Analytical Biochemistry*. 44(1), tr. 276-287.
150. Delgado-Montemayor C., et al. (2015), "Models of hepatoprotective activity assessment", *Medicina Universitaria*. 17(69), tr. 222-228.
151. Viện Dược liệu (2006), *Phương pháp nghiên cứu tác dụng dược lý của thuốc từ thảo dược*, NXB Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
152. Girish C., et al. (2009), "Hepatoprotective activity of six polyherbal formulations in paracetamol induced liver toxicity in mice", *Indian J Med Res*. 129(5), tr. 569-78.
153. Cetin Sandra, et al. (2022), "Cell models for Alzheimer's and Parkinson's disease: At the interface of biology and drug discovery", *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 149, p. 112924.
154. Silva J., et al. (2018), "Neuroprotective effects of seaweeds against 6-hydroxydopamine-induced cell death on an in vitro human neuroblastoma model", *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 18(1), p. 58.
155. Tungalag T., Yang D. K. (2021), "Sinapic Acid Protects SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cells against 6-Hydroxydopamine-Induced Neurotoxicity", *Biomedicines*. 9(3).
156. Elyasi L., et al. (2020), "6-OHDA mediated neurotoxicity in SH-SY5Y cellular model of Parkinson disease suppressed by pretreatment with hesperidin through activating L-type calcium channels", *J Basic Clin Physiol Pharmacol*. 32(2), tr. 11-17.
157. Storch A., et al. (2000), "6-Hydroxydopamine toxicity towards human SH-SY5Y dopaminergic neuroblastoma cells: independent of mitochondrial energy metabolism", *J Neural Transm (Vienna)*. 107(3), tr. 281-93.

158. Esmaeili-Mahani S., et al. (2013), "Protective effect of orexin-A on 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity in SH-SY5Y human dopaminergic neuroblastoma cells", *Neurochem Int.* 63(8), tr. 719-25.
159. Choi J. H., et al. (2010), "Baicalein protects HT22 murine hippocampal neuronal cells against endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis through inhibition of reactive oxygen species production and CHOP induction", *Exp Mol Med.* 42(12), tr. 811-22.
160. Kwon Jaeyoung, et al. (2021), "Phenolic constituents isolated from Senna tora sprouts and their neuroprotective effects against glutamate-induced oxidative stress in HT<sub>22</sub> and R28 cells", *Bioorganic Chemistry.* 114, p. 105112.
161. Selvaraj B., et al. (2021), "Neuroprotective effects of 2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolone in HT22 mouse hippocampal neuronal cells", *Bioorg Med Chem Lett.* 49, p. 128312.
162. Rizor A., et al. (2019), "Astrocytic Oxidative/Nitrosative Stress Contributes to Parkinson's Disease Pathogenesis: The Dual Role of Reactive Astrocytes", *Antioxidants (Basel).* 8(8), p. 265.
163. Murphy T. H., et al. (1989), "Glutamate toxicity in a neuronal cell line involves inhibition of cystine transport leading to oxidative stress", *Neuron.* 2(6), tr. 1547-58.
164. Ray P. D., Huang B. W., Tsuji Y. (2012), "Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling", *Cell Signal.* 24(5), tr. 981-90.
165. Trần Công Khánh, Nguyễn Thị Sinh (1997), *Thực vật Dược-Phân loại thực vật*, Trường Đại học Dược Hà Nội.
166. Bộ môn Dược liệu (2005), *Thực tập Dược liệu*, Trường Đại học Dược Hà Nội, Hà Nội.
167. Nguyễn Văn Đàn, Nguyễn Viết Tựu (1985), *Phương pháp nghiên cứu hoá học cây thuốc*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
168. Trần Văn Sung (2002), *Phổ cộng hưởng từ hạt nhân trong hóa hữu cơ*, Vol. 1, NXB Đại học Quốc gia Hà Nội, Hà Nội.
169. Wasowicz W., Nève J., Peretz A. (1993), "Optimized steps in fluorometric determination of thiobarbituric acid-reactive substances in serum: importance of extraction pH and influence of sample preservation and storage", *Clin Chem.* 39(12), tr. 2522-6.
170. Koh P. H., Mokhtar R. A., Iqbal M. (2012), "Antioxidant potential of *Cymbopogon citratus* extract: alleviation of carbon tetrachloride-induced hepatic oxidative stress and toxicity", *Hum Exp Toxicol.* 31(1), tr. 81-91.
171. Takada Yoshikazu, et al. (1982), "Superoxide dismutase in various tissues from rats bearing the Vx-2 carcinoma in the maxillary sinus", *Cancer Research.* 42(10), tr. 4233-4235.

172. Na Guo, Xuan-Qin Chen, Qin-Shi Zhao (2008), "A new polyisoprenylated benzoylphloroglucinol derivative from *Hypericum henryi* subsp. *uraloides* (Guttiferae)", *Plant Diversity*. 30(04), p. 515.
173. Lee J. Y., et al. (2006), "Hyperforin and its analogues inhibit CYP3A4 enzyme activity", *Phytochemistry*. 67(23), tr. 2550-60.
174. Yang Xing-Wei, et al. (2015), "Hypercohin K, a polycyclic polyprenylated acylphloroglucinol with an unusual spiro-fused cyclopropane ring from *Hypericum cohaerens*", *Tetrahedron Letters*. 56(41), tr. 5537-5540.
175. Bohr Gregor, et al. (2005), "Anti-inflammatory Acylphloroglucinol Derivatives from Hops (*Humulus lupulus*)", *Journal of Natural Products*. 68(10), tr. 1545-1548.
176. Kosasi Samlipto, Van Der Sluis Willem G., Labadie Rudi (1989), "Multifidol and multifidol glucoside from the latex of *Jatropha multifida*", *Phytochemistry*. 28(9), tr. 2439-2441.
177. Zhang Y. J., et al. (2002), "Two new acylated flavanone glycosides from the leaves and branches of *Phyllanthus emblica*", *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 50(6), tr. 841-3.
178. Frahm A. W., Chaudhuri R. K. (1979), "<sup>13</sup>C NMR spectroscopy of substituted xanthenes—II: <sup>13</sup>C NMR spectral study of polyhydroxy xanthenes", *Tetrahedron*. 35(17), tr. 2035-2038.
179. Kijjoa A., et al. (2000), "Xanthenes from *Calophyllum teysmannii* var. *inophylloide*", *Phytochemistry*. 55(7), tr. 833-6.
180. Cardona M. Luz, et al. (1986), "Additional New Xanthenes and Xanthonolignoids from *Hypericum canariensis*", *Journal of Natural Products*. 49(1), tr. 95-100.
181. Nuangnaowarat Warraphong, Phupong Worrarong, Isaka Masahiko (2010), "New xanthenes from the barks of *Cratoxylum sumatranum* ssp. *neriifolium*", *Heterocycles*. 81, tr. 2335-2341.
182. Meksuriyen D., Cordell G. A. (1988), "Retrodihydrochalcones from *Dracaena loureiri*", *J Nat Prod*. 51(6), tr. 1129-35.
183. Chatterjea JN (1973), "Condensation of mannich base salts with phenols: Orientation of adducts".
184. Lima Caroline Sprengel, et al. (2021), "Flavonoids from *Pterogyne nitens* as Zika virus NS2B-NS3 protease inhibitors", *Bioorganic Chemistry*. 109, p. 104719.
185. Latté K. P., et al. (2008), "An ellagitannin, n-butyl gallate, two aryltetralin lignans, and an unprecedented diterpene ester from *Pelargonium reniforme*", *Phytochemistry*. 69(3), tr. 820-6.
186. Achenbach H., et al. (1992), "New Lignan Glucosides from *Stemmadenia minima*", *Planta Med*. 58(3), tr. 270-2.

187. Liang Shuang, et al. (2008), "Phenylpropanoids from *Daphne feddei* and Their Inhibitory Activities against NO Production", *Journal of Natural Products*. 71(11), tr. 1902-1905.
188. Hanessian Stephen, Leger Roger (1992), "Total synthesis of the lignan antibiotic Burseran and a novel approach to the podophyllotoxin skeleton", *Synlett*(5), tr. 402-404.
189. Jayasinghe L., et al. (2003), "Antifungal constituents of the stem bark of *Bridelia retusa*", *Phytochemistry*. 62(4), tr. 637-41.
190. Terreaux Christian, et al. (1994), "Analysis of the fungicidal constituents from the bark of *Ocotea usambarensis* Engl. (Lauraceae)", *Phytochemical Analysis*. 5(5), tr. 233-238.
191. Juan-Badaturuge Malindra, Habtemariam Solomon, Thomas Michael (2011), "Antioxidant compounds from a South Asian beverage and medicinal plant, *Cassia auriculata*", *Food Chemistry*. 125, tr. 221-225.
192. Harborne JB, Mabry TJ, Williams CA (1970), "The systematic identification of flavonoids Springer Verlag", *New York*, tr. 120-135.
193. Davis Adrienne L., et al. (1996), "1H and 13C NMR Assignments of Some Green Tea Polyphenols", *Magnetic Resonance in Chemistry*. 34.
194. Sun Jian, et al. (2006), "Identification of (-)-epicatechin as the direct substrate for polyphenol oxidase isolated from litchi pericarp", *Food Research International*. 39, tr. 864-870.
195. Riihinen Kaisu R., et al. (2013), "1H-NMR Fingerprinting of Vaccinium vitis-idaea Flavonol Glycosides", *Phytochemical Analysis*. 24(5), tr. 476-483.
196. Bose Sankhadip, Maji Sushomasri, Chakraborty Pranabesh (2013), "Quercitrin from *Ixora coccinea* Leaves and its Anti-oxidant Activity", *Journal of PharmaSciTech*. 2, tr. 72-74.
197. Lucas-Filho M. D., et al. (2010), "ACE inhibition by astilbin isolated from *Erythroxylum gonocladum* (Mart.) O.E. Schulz", *Phytomedicine*. 17(5), tr. 383-387.
198. Vieira Mariana N., Winterhalter Peter, Jerz Gerold (2016), "Flavonoids from the flowers of *Impatiens glandulifera* Royle isolated by high performance countercurrent chromatography", *Phytochemical analysis : PCA*. 27(2), tr. 116-125.
199. Huang H., et al. (2011), "Isolation and characterization of two flavonoids, engeletin and astilbin, from the leaves of *Engelhardia roxburghiana* and their potential anti-inflammatory properties", *J Agric Food Chem*. 59(9), tr. 4562-9.
200. He Zining, et al. (2017), "Isolation, structural characterization and neuraminidase inhibitory activities of polyphenolic constituents from *Flos caryophylli*", *Phytochemistry Letters*. 19, tr. 160-167.
201. Baraka Sara M., et al. (2020), "Flavonoids from *Barnebydendron riedelii* leaf extract mitigate thioacetamide-induced hepatic encephalopathy in rats: The

- interplay of NF- $\kappa$ B/IL-6 and Nrf2/HO-1 signaling pathways", *Bioorganic Chemistry*. 105, p. 104444.
202. Berghöfer R., Hölzl J. (1987), "Biflavonoids in *Hypericum perforatum*1; Part 1. Isolation of I3, II8-Biapigenin", *Planta Med.* 53(2), tr. 216-7.
  203. Tatsis E. C., et al. (2007), "Identification of the major constituents of *Hypericum perforatum* by LC/SPE/NMR and/or LC/MS", *Phytochemistry*. 68(3), tr. 383-93.
  204. Chen Yung-Husan, et al. (2007), "Identification of phenolic antioxidants from Sword Brake fern (*Pteris ensiformis* Burm.)", *Food Chemistry*. 105, tr. 48-56.
  205. Kumaran Alaganandam, Karunakaran Raj (2007), "Activity-guided isolation and identification of free radical-scavenging components from an aqueous extract of *Coleus aromaticus*", *Food Chemistry*. 100, tr. 356-361.
  206. Lee Eunjung, et al. (2008), "Effects of Hydroxy and Methoxy Substituents on NMR Data in Flavonols", *Bulletin of The Korean Chemical Society*. 29, tr. 507-510.
  207. Sun Kai-Hui, et al. (2019), "A new indole-type alkaloid from the roots of *Clematis florida* var. plena", *Natural Product Research*. 33(20), tr. 2925-2931.
  208. Dan Yang (2014), "Two tetrahydroisoquinoline alkaloids from the fruit of *Averrhoa carambola*", *Phytochemistry letters*. 7, tr. 217-220.
  209. Costa A. G., Jr., et al. (2020), "Metabolomics approach expands the classification of propolis samples from Midwest Brazil", *J Nat Prod*. 83(2), tr. 333-343.
  210. Zheng Guo Qiang, Kenney Patrick M, Lam Luke KT (1993), "Potential anticarcinogenic natural products isolated from lemongrass oil and galanga root oil", *Journal of Agricultural*. 41(2), tr. 153-156.
  211. Lee Eun Ju, et al. (2010), "Phenolic constituents from the flower buds of *Lonicera japonica* and their 5-lipoxygenase inhibitory activities", *Food Chemistry*. 120(1), tr. 134-139.
  212. Nakatani N., et al. (2000), "Identification, quantitative determination, and antioxidative activities of chlorogenic acid isomers in prune (*Prunus domestica* L. )", *J Agric Food Chem*. 48(11), tr. 5512-6.
  213. Ghoneim A. I., Eldahshan O. A. (2012), "Anti-apoptotic effects of tamarind leaves against ethanol-induced rat liver injury", *J Pharm Pharmacol*. 64(3), tr. 430-8.
  214. Phadungkit M., Luanratana O. (2006), "Anti-Salmonella activity of constituents of *Ardisia elliptica* Thunb", *Nat Prod Res*. 20(7), tr. 693-6.
  215. Zhang Yanjun, et al. (2004), "Novel Lipid-Peroxidation- and Cyclooxygenase-Inhibitory Tannins from *Picrorhiza kurroa* Seeds", *Chemistry & Biodiversity*. 1(3), tr. 426-441.
  216. Wu Qing-Li, et al. (1998), "Chromone glycosides and flavonoids from *Hypericum japonicum*", *Phytochemistry*. 49(5), tr. 1417-1420.

217. Uz Cardona M., et al. (1986), "Synthesis of natural polyhydroxystilbenes", *Tetrahedron*. 42(10), tr. 2725-2730.
218. Young Han Su, et al. (2009), "Efficient Total Synthesis of Piceatannol via (E)-Selective Wittig–Horner Reaction", *Synthetic Communications*. 39(8), tr. 1425-1432.
219. Yang X. W., et al. (2015), "Polycyclic Polyprenylated Acylphloroglucinol Congeners Possessing Diverse Structures from *Hypericum henryi*", *J Nat Prod*. 78(4), tr. 885-95.
220. Kusano Rie, et al. (2011), " $\alpha$ -Amylase and Lipase Inhibitory Activity and Structural Characterization of Acacia Bark Proanthocyanidins", *Journal of Natural Products*. 74(2), tr. 119-128.
221. Chen Xuan-Qin, et al. (2010), "Polycyclic Polyprenylated Acylphloroglucinols and Chromone O-Glucosides from *Hypericum henryi* subsp. *uraloides*", *Chemistry & Biodiversity*. 7(1), tr. 196-204.
222. Lannang A. M., et al. (2010), "Cytotoxicity of natural compounds isolated from the seeds of *Garcinia afzelii*", *Planta Med*. 76(7), tr. 708-12.
223. Jantan I., Saputri F. C. (2012), "Benzophenones and xanthenes from *Garcinia cantleyana* var. *cantleyana* and their inhibitory activities on human low-density lipoprotein oxidation and platelet aggregation", *Phytochemistry*. 80, tr. 58-63.
224. Don Ming-Jaw, et al. (2004), "New Phenolic Principles from *Hypericum sampsonii*", *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 52(7), tr. 866-869.
225. Tanaka Naonobu, et al. (2004), "Prenylated Benzophenones and Xanthenes from *Hypericum scabrum*", *Journal of Natural Products*. 67(11), tr. 1870-1875.
226. Ishiguro Kyoko, et al. (1997), "A prenylated xanthone from cell suspension cultures of *Hypericum patulum*", *Phytochemistry*. 44(6), tr. 1065-1066.
227. Tanaka Naonobu, Takaishi Yoshihisa (2006), "Xanthenes from *Hypericum chinense*", *Phytochemistry*. 67(19), tr. 2146-2151.
228. Chen C. H., et al. (1992), "Inhibition of angiotensin-I-converting enzyme by tetrahydroxyxanthenes isolated from *Tripterospermum lanceolatum*", *J Nat Prod*. 55(5), tr. 691-5.
229. Tanaka N., et al. (2004), "Prenylated benzophenones and xanthenes from *Hypericum scabrum*", *J Nat Prod*. 67(11), tr. 1870-5.
230. Matsuoka Erika, Machida Koichi, Kikuchi Masao (2008), "Chemical constituents of *Hypericum erectum* Thunb", *Journal of Natural Medicines*. 62(4), tr. 467-469.
231. Phupong Worrapong, Nuangnaowarat Warraphong, Isaka Masahiko (2010), "New Xanthenes from the Barks of *Cratoxylum sumatranum* ssp. *neriifolium*", *Heterocycles*. 81.
232. Kwon J., et al. (2014), "Neuroprotective Xanthenes from the Root Bark of *Cudrania tricuspidata*", *J Nat Prod*. 77(8), tr. 1893-901.

233. Hu Qiu-Fen, et al. (2011), "Secolignans, Neolignans and Phenylpropanoids from *Daphne feddei* and Their Biological Activities", *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 59(11), tr. 1421-1424.
234. Quang T. H., et al. (2012), "Anti-inflammatory and PPAR transactivational effects of secondary metabolites from the roots of *Asarum sieboldii*", *Bioorg Med Chem Lett*. 22(7), tr. 2527-33.
235. Feuerstein Ilan, Danin Avinoam, Segal Ruth (1988), "Constitution of the essential oil from an *Artemisia herba-alba* population of Spain", *Phytochemistry*. 27(2), tr. 433-434.
236. Brunke E. J., et al. (1991), "Constituents of Dill (*Anethum graveolens* L.) with Sensory Importance", *Journal of Essential Oil Research*. 3(4), tr. 257-267.
237. Calderón-Montaño J. M., et al. (2011), "A review on the dietary flavonoid kaempferol", *Mini Rev Med Chem*. 11(4), tr. 298-344.
238. Yang Dengyu, et al. (2020), "Quercetin: Its Main Pharmacological Activity and Potential Application in Clinical Medicine", *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2020, tr. 8825387.
239. Zou H., et al. (2021), "A review on pharmacological activities and synergistic effect of quercetin with small molecule agents", *Phytomedicine*. 92, p. 153736.
240. Bae Joonseo, et al. (2020), "Activity of catechins and their applications", *Biomedical Dermatology*. 4(1), p. 8.
241. Jug Urška, Naumoska Katerina, Vovk Irena (2021), "(-)-Epicatechin—An Important Contributor to the Antioxidant Activity of Japanese Knotweed Rhizome Bark Extract as Determined by Antioxidant Activity-Guided Fractionation", *Antioxidants (Basel)*. 10(1), p. 133.
242. Chen Junren, et al. (2022), "Chemistry, pharmacokinetics, pharmacological activities, and toxicity of Quercitrin", *Phytotherapy Research*. 36(4), tr. 1545-1575.
243. Wang Q., et al. (2022), "Hyperoside: A review on its sources, biological activities, and molecular mechanisms", *Phytotherapy Research*. 36(7), tr. 2779-2802.
244. Xu S., et al. (2022), "Hyperoside: A Review of Its Structure, Synthesis, Pharmacology, Pharmacokinetics and Toxicity", *Molecules*. 27(9).
245. Sharma A., et al. (2020), "Astilbin: A promising unexplored compound with multidimensional medicinal and health benefits", *Pharmacological Research*. 158, p. 104894.
246. Wu H., et al. (2016), "Engeletin Alleviates Lipopolysaccharide-Induced Endometritis in Mice by Inhibiting TLR4-mediated NF- $\kappa$ B Activation", *J Agric Food Chem*. 64(31), tr. 6171-8.
247. Tian Q., et al. (2019), "Engeletin inhibits Lipopolysaccharide/d-galactosamine-induced liver injury in mice through activating PPAR- $\gamma$ ", *J Pharmacol Sci*. 140(3), tr. 218-222.

248. Jiang X., et al. (2018), "Protective and Therapeutic Effects of Engeletin on LPS-Induced Acute Lung Injury", *Inflammation*. 41(4), tr. 1259-1265.
249. Liu Ting, et al. (2020), "Engeletin suppresses lung cancer progression by inducing apoptotic cell death through modulating the XIAP signaling pathway: A molecular mechanism involving ER stress", *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 128, p. 110221.
250. Wu Tian-Shung, Leu Yann-Lii, Chan Yu-Yi (2000), "Constituents from the Stem and Root of *Aristolochia kaempferi*", *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 23(10), tr. 1216-1219.
251. Kong C. S., Seo Y. (2012), "Antiadipogenic activity of isohamnetin 3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside from *Salicornia herbacea*", *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 34(6), tr. 907-11.
252. Hosseinzadeh Hossein, Nassiri-Asl Marjan (2014), "Review of the protective effects of rutin on the metabolic function as an important dietary flavonoid", *Journal of Endocrinological Investigation*. 37(9), tr. 783-788.
253. Li R., et al. (2006), "Nicotiflorin reduces cerebral ischemic damage and upregulates endothelial nitric oxide synthase in primarily cultured rat cerebral blood vessel endothelial cells", *J Ethnopharmacol*. 107(1), tr. 143-50.
254. Huang J. L., et al. (2007), "Protective effects of Nicotiflorin on reducing memory dysfunction, energy metabolism failure and oxidative stress in multi-infarct dementia model rats", *Pharmacol Biochem Behav*. 86(4), tr. 741-8.
255. Zhao J., et al. (2017), "Hepatoprotective Effects of Nicotiflorin from *Nymphaea candida* against Concanavalin A-Induced and D-Galactosamine-Induced Liver Injury in Mice", *Int J Mol Sci*. 18(3), tr. 587.
256. Li R., et al. (2006), "Neuroprotection of nicotiflorin in permanent focal cerebral ischemia and in neuronal cultures", *Biol Pharm Bull*. 29(9), tr. 1868-72.
257. Silva Bruno, et al. (2008), "Quercetin, kaempferol and biapigenin from *Hypericum perforatum* are neuroprotective against excitotoxic insults", *Neurotoxicity Research*. 13(3), tr. 265-279.
258. Espíndola Kaio Murilo Monteiro, et al. (2019), "Chemical and Pharmacological Aspects of Caffeic Acid and Its Activity in Hepatocarcinoma", *Frontiers in Oncology*. 9, tr. 541.
259. Kim J. K., Park S. U. (2019), "A recent overview on the biological and pharmacological activities of ferulic acid", *EXCLI Journal*. 18, tr. 132-138.
260. Pragasam S. J., Venkatesan V., Rasool M. (2013), "Immunomodulatory and anti-inflammatory effect of p-coumaric acid, a common dietary polyphenol on experimental inflammation in rats", *Inflammation*. 36(1), tr. 169-76.
261. Prabhakar Reddy P., et al. (2009), "Phytochemical investigation of labdane diterpenes from the rhizomes of *Hedychium spicatum* and their cytotoxic activity", *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 19(21), tr. 6078-6081.



262. Kiuchi Fumiyuki, et al. (1988), "Studies on Crude Drugs Effective on Visceral Larva Migrans. II. : Larvicidal Principles in Kaempferiae Rhizoma", *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. 36(1), tr. 412-415.
263. Wang Liang, et al. (2022), "The Biological Activity Mechanism of Chlorogenic Acid and Its Applications in Food Industry: A Review", *Frontiers in Nutrition*. 9, tr. 943911.
264. Naveed Muhammad, et al. (2018), "Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research", *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 97, tr. 67-74.
265. Srinivasulu C., et al. (2018), "Syringic acid (SA) – A Review of Its Occurrence, Biosynthesis, Pharmacological and Industrial Importance", *Biomed Pharmacother*. 108, tr. 547-557.
266. Song Tingting, et al. (2017), "Metabolomic Analysis of Alfalfa (*Medicago sativa* L.) Root-Symbiotic Rhizobia Responses under Alkali Stress", *Frontiers in Plant Science*. 8, tr. 1278.
267. Kershaw J., Kim K. H. (2017), "The Therapeutic Potential of Piceatannol, a Natural Stilbene, in Metabolic Diseases: A Review", *Journal of Medicinal Food*. 20(5), tr. 427-438.
268. Piotrowska Hanna, Kucinska Malgorzata, Murias Marek (2012), "Biological activity of piceatannol: Leaving the shadow of resveratrol", *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*. 750(1), tr. 60-82.
269. Singh P. P., et al. (2009), "Reactive oxygen species, reactive nitrogen species and antioxidants in etiopathogenesis of diabetes mellitus type-2", *Indian J Clin Biochem*. 24(4), tr. 324-42.
270. Lobo V., et al. (2010), "Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health", *Pharmacogn Rev*. 4(8), tr. 118-26.
271. Alfadda A. A., Sallam R. M. (2012), "Reactive oxygen species in health and disease", *J Biomed Biotechnol*. 2012, p. 936486.
272. Manosroi J., et al. (2005), "Free Radical Scavenging Activity of Extracts from Thai Plants in Guttiferae and Schisandraceae Families", *Pharm Biol*. 43(4), tr. 324-329.
273. Pradeep P. S., et al. (2019), "Potential antioxidant and anti-inflammatory action of *Hypericum hookerianum* extracts in a liposome system evaluated with zebrafish embryos", *J Microencapsul*. 36(6), tr. 513-522.
274. Phạm Hải Nam (2004), *Một số xét nghiệm hóa sinh trong lâm sàng*, Học viện Quân Y, Hà Tây.
275. Davern T. J., 2nd, et al. (2006), "Measurement of serum acetaminophen-protein adducts in patients with acute liver failure", *Gastroenterology*. 130(3), tr. 687-94.
276. McGill M. R., et al. (2012), "The mechanism underlying acetaminophen-induced hepatotoxicity in humans and mice involves mitochondrial damage and nuclear DNA fragmentation", *J Clin Invest*. 122(4), tr. 1574-83.

277. Mühl H. (2016), "STAT3, a Key Parameter of Cytokine-Driven Tissue Protection during Sterile Inflammation - the Case of Experimental Acetaminophen (Paracetamol)-Induced Liver Damage", *Front Immunol.* 7, p. 163.
278. Clauson K. A. (2006), Drug-Induced Diseases: Prevention, Detection, and Management, *American Journal of Pharmaceutical Education*.
279. Han Bing, et al. (2016), "Protective effect of a polysaccharide from *Rhizoma Atractylodis macrocephalae* on acute liver injury in mice", *International Journal of Biological Macromolecules.* 87, tr. 85-91.
280. Ismail Amel F. M., Salem Asmaa A. M., Eassawy Mamdouh M. T. (2016), "Hepatoprotective effect of grape seed oil against carbon tetrachloride induced oxidative stress in liver of  $\gamma$ -irradiated rat", *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology.* 160, tr. 1-10.
281. Pompella A., et al. (2003), "The changing faces of glutathione, a cellular protagonist", *Biochem Pharmacol.* 66(8), tr. 1499-503.
282. AbouZid Sameh, Ahmed Osama M. (2013), "Chapter 14 - Silymarin Flavonolignans: Structure–Activity Relationship and Biosynthesis", in Atta ur, Rahman, Editor, *Studies in Natural Products Chemistry*, Elsevier, tr. 469-484.
283. Papackova Z., et al. (2018), "Silymarin prevents acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice", *PLoS One.* 13(1), p. e0191353.
284. Andersen J. K. (2004), "Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence?", *Nat Med.* 10 Suppl, tr. S18-25.
285. Coyle J. T., Puttfarcken P. (1993), "Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders", *Science.* 262(5134), tr. 689-95.
286. Yang Q., et al. (2019), "Potential Neuroprotective Treatment of Stroke: Targeting Excitotoxicity, Oxidative Stress, and Inflammation", *Front Neurosci.* 13, p. 1036.
287. Trist B. G., Hare D. J., Double K. L. (2019), "Oxidative stress in the aging substantia nigra and the etiology of Parkinson's disease", *Aging Cell.* 18(6), p. e13031.
288. Butterfield D. A., Halliwell B. (2019), "Oxidative stress, dysfunctional glucose metabolism and Alzheimer disease", *Nat Rev Neurosci.* 20(3), tr. 148-160.
289. Selvaraj B., et al. (2020), "Synthesis and biological evaluation of isoliquiritigenin derivatives as a neuroprotective agent against glutamate mediated neurotoxicity in HT<sub>22</sub> cells", *Bioorg Med Chem Lett.* 30(8), p. 127058.
290. Kim D. H., et al. (2019), "Ginsenoside Rb2 suppresses the glutamate-mediated oxidative stress and neuronal cell death in HT<sub>22</sub> cells", *J Ginseng Res.* 43(2), tr. 326-334.
291. Fukui M., et al. (2009), "Mechanism of glutamate-induced neurotoxicity in HT<sub>22</sub> mouse hippocampal cells", *Eur J Pharmacol.* 617(1-3), tr. 1-11.

292. Tardiolo G., Bramanti P., Mazzon E. (2018), "Overview on the Effects of N-Acetylcysteine in Neurodegenerative Diseases", *Molecules*. 23(12).
293. Schwalfenberg G. K. (2021), "N-Acetylcysteine: A Review of Clinical Usefulness (an Old Drug with New Tricks)", *J Nutr Metab*. 2021, p. 9949453.
294. Wang Ji, et al. (2020), "Molecular Mechanisms of Glutamate Toxicity in Parkinson's Disease", *Frontiers in neuroscience*. 14, tr. 585584.
295. Park D. J., et al. (2019), "Quercetin alleviates the injury-induced decrease of protein phosphatase 2A subunit B in cerebral ischemic animal model and glutamate-exposed HT<sub>22</sub> cells", *J Vet Med Sci*. 81(7), tr. 1047-1054.
296. Kang J. B., et al. (2022), "Quercetin ameliorates glutamate toxicity-induced neuronal cell death by controlling calcium-binding protein parvalbumin", *J Vet Sci*. 23(2), p. e26.
297. Qu L., et al. (2014), "6-OHDA induced calcium influx through N-type calcium channel alters membrane properties via PKA pathway in substantia nigra pars compacta dopaminergic neurons", *Neurosci Lett*. 575, tr. 1-6.

**CÁC CÔNG TRÌNH NGHIÊN CỨU KHOA HỌC  
LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN ĐÃ ĐƯỢC CÔNG BỐ**

1. **Vũ Duy Hồng**, Nguyễn Mạnh Tuyển, Nguyễn Minh Khởi, Phương Thiện Thương (2019), Nghiên cứu đặc điểm thực vật cây Ban hooker *Hypericum hookerianum* Wight & Arnott. (Hypericaceae), *Tạp chí Dược học*, 518, 78-82.
2. **Vũ Duy Hồng**, Nguyễn Mạnh Tuyển, Nguyễn Minh Khởi, Phương Thiện Thương (2020), Tác dụng chống oxy hóa và bảo vệ gan của cây Ban hooker thu hái tại Việt Nam, *Tạp chí Dược liệu*, 25(4), 251-256.
3. **Vũ Duy Hồng**, Nguyễn Mạnh Tuyển, Nguyễn Minh Khởi, Phương Thiện Thương, Vũ Văn Tuấn (2021), Thành phần hóa học của loài *Hypericum hookerianum*, *Tạp chí Nghiên cứu Dược và Thông tin thuốc*, 12(6), 40-46.
4. **Vũ Duy Hồng**, Nguyễn Mạnh Tuyển, Nguyễn Minh Khởi, Phương Thiện Thương, Vũ Văn Tuấn (2022), Cấu trúc một số flavonoid phân lập từ loài Ban hooker (*Hypericum hookerianum* Wight & Arn.), *Tạp chí Nghiên cứu Dược và Thông tin thuốc*, 13(6), 1-8.
5. **Vũ Duy Hồng**, Nguyễn Mạnh Tuyển, Nguyễn Minh Khởi, Phương Thiện Thương, Vũ Văn Tuấn, Nguyễn Duy Thuận, Jae Wook Lee (2023), Chemical constituents and neuroprotective activity of *Hypericum hookerianum*, *Natural Product Communications* (Accepted 06 Mar 2023, ID: NPX-22-0793.R2).

