

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

VIỆN DƯỢC LIỆU



HOÀNG THÁI HÒA

**NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM THỰC VẬT,  
THÀNH PHẦN HÓA HỌC VÀ MỘT SỐ TÁC  
DỤNG SINH HỌC CỦA CÂY TẦM BÓP  
(*Physalis angulata* L.), họ Cà (Solanaceae)**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ DƯỢC HỌC

HÀ NỘI, 2023

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

VIỆN DƯỢC LIỆU

HOÀNG THÁI HÒA

**NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM THỰC VẬT,  
THÀNH PHẦN HÓA HỌC VÀ MỘT SỐ TÁC  
DỤNG SINH HỌC CỦA CÂY TẦM BÓP  
(*Physalis angulata* L.), họ Cà (Solanaceae)**

**LUẬN ÁN TIẾN SĨ DƯỢC HỌC**

CHUYÊN NGÀNH: Dược liệu - Dược học cổ truyền

MÃ SỐ: 9720206

Người hướng dẫn khoa học: **1. PGS.TS. Trần Thị Oanh**

**2. PGS.TS. Nguyễn Thượng Dong**

**HÀ NỘI, 2023**

## LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan luận án này là công trình nghiên cứu khoa học của riêng tôi dưới sự hướng dẫn của **PGS.TS. Trần Thị Oanh** và **PGS.TS. Nguyễn Thượng Đông**.

Các số liệu, kết quả trình bày trong luận án là trung thực, khách quan và chưa từng được ai công bố trong bất kỳ một công trình nào khác.

Tác giả luận án

**NCS. Hoàng Thái Hòa**

## LỜI CẢM ƠN

Để hoàn thành được luận án này, tôi đã nhận được rất nhiều sự giúp đỡ quý báu của các Thầy Cô giáo, các nhà khoa học cùng bạn bè, đồng nghiệp và gia đình.

Trước hết, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc nhất tới **PGS.TS. Trần Thị Oanh** và **PGS.TS. Nguyễn Thượng Dong**, những người Thầy Cô đã tận tình hướng dẫn, chỉ bảo, giúp đỡ, tạo điều kiện thuận lợi nhất cho tôi trong quá trình học tập, nghiên cứu và hoàn thành luận án.

Tôi xin trân trọng cảm ơn PGS. TSKH Nguyễn Minh Khởi, Ban lãnh đạo, các Khoa, Phòng và các nhà khoa học tại Viện Dược liệu, Viện Hóa học, Viện Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam và Trường Đại học Dược Hà Nội đã nhiệt tình giúp đỡ, tạo điều kiện và cộng tác giúp tôi hoàn thành công trình này.

Tôi xin chân thành cảm ơn Ban lãnh đạo bệnh viện cùng các đồng nghiệp tại Khoa Dược - Bệnh viện Đa khoa Đức Giang đã động viên tinh thần và tạo điều kiện thuận lợi để tôi hoàn thành luận án này.

Tôi cũng xin bày tỏ lòng biết ơn tới:

- + PGS.TS. Đỗ Thị Hà - Viện Dược liệu
- + PGS.TS. Phạm Thị Vân Anh - Trường Đại học Y Hà Nội
- + TS. Đỗ Thị Nguyệt Quế - Trường Đại học Dược Hà Nội
- + TS. Trần Thị Hiền - Trường Đại học Lund, Thụy Điển

Đã đóng góp những ý kiến quý báu cho tôi khi thực hiện luận án này.

Cuối cùng, tôi xin gửi lời cảm ơn sâu sắc tới gia đình, người thân và bạn bè đã động viên, giúp đỡ và tạo mọi điều kiện tốt nhất cho tôi trong suốt quá trình nghiên cứu, học tập và hoàn thành luận án.

Một lần nữa, tôi xin chân thành cảm ơn những sự giúp đỡ quý báu đó!

**NCS. Hoàng Thái Hòa**

# MỤC LỤC

## DANH MỤC KÝ HIỆU, CHỮ VIẾT TẮT

## DANH MỤC BẢNG

## DANH MỤC SƠ ĐỒ

<b>ĐẶT VẤN ĐỀ</b> .....	<b>1</b>
<b>CHƯƠNG 1 TỔNG QUAN</b> .....	<b>2</b>
1.1. THỰC VẬT HỌC .....	2
1.1.1. Vị trí phân loại .....	2
1.1.2. Đặc điểm thực vật .....	3
1.1.3. Phân bố và sinh thái .....	3
1.2. CÁC THÀNH PHẦN HÓA HỌC CHÍNH.....	3
1.2.1. Tinh dầu .....	3
1.2.2. Carotenoid.....	4
1.2.3. Nhóm hợp chất phi phenolic.....	4
1.2.4. Nhóm hợp chất phenolic.....	20
1.3. TÁC DỤNG SINH HỌC .....	22
1.3.1. Hoạt tính kháng viêm.....	22
1.3.2. Hoạt tính giảm đau.....	24
1.3.3. Hoạt tính gây độc tế bào ung thư.....	24
1.3.4. Hoạt tính điều hòa miễn dịch.....	28
1.3.5. Hoạt tính chống đái tháo đường .....	30
1.3.6. Hoạt tính kháng khuẩn và kháng nấm .....	31
1.3.7. Hoạt tính kháng ký sinh trùng .....	32
1.3.8. Hoạt tính diệt nhuyễn thể.....	33
1.3.9. Hoạt tính chống hen suyễn .....	33
1.3.10. Hoạt tính lợi tiểu .....	33
1.4. CÔNG DỤNG TRONG Y HỌC CỔ TRUYỀN .....	34
1.4.1. Công dụng trong y học cổ truyền thế giới .....	34
1.4.2. Công dụng trong y học cổ truyền Việt Nam.....	34
<b>CHƯƠNG 2 NGUYÊN VẬT LIỆU, TRANG THIẾT BỊ VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU</b> .....	<b>36</b>
2.1. NGUYÊN VẬT LIỆU NGHIÊN CỨU .....	36
2.1.1. Nguyên liệu nghiên cứu.....	36

2.2.2. Động vật thí nghiệm .....	37
2.2.3. Thuốc thử, hóa chất, dung môi và dòng tế bào.....	37
2.2. TRANG THIẾT BỊ NGHIÊN CỨU .....	38
2.3. ĐỊA ĐIỂM NGHIÊN CỨU .....	39
2.3.1. Địa điểm nghiên cứu thực vật.....	39
2.3.2. Địa điểm nghiên cứu thành phần hóa học .....	39
2.3.3. Địa điểm nghiên cứu một số tác dụng sinh học.....	39
2.4. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	39
2.4.1. Phương pháp nghiên cứu thực vật .....	39
2.4.2. Phương pháp nghiên cứu thành phần hóa học.....	40
2.4.3. Phương pháp nghiên cứu một số tác dụng sinh học .....	40
2.5. XỬ LÝ SỐ LIỆU .....	53
<b>CHƯƠNG 3 KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU .....</b>	<b>54</b>
3.1. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VỀ THỰC VẬT CỦA TẦM BÓP .....	54
3.1.1. Mô tả đặc điểm hình thái và giám định tên khoa học của Tầm bóp.....	54
3.1.2. Đặc điểm vi học.....	56
3.1.3. Đặc điểm bột dược liệu.....	58
3.2. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VỀ THÀNH PHẦN HÓA HỌC CỦA TẦM BÓP.....	60
3.2.1. Định tính .....	60
3.2.2. Chiết xuất, phân lập và xác định cấu trúc của các hợp chất .....	61
3.3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VỀ TÁC DỤNG SINH HỌC CỦA TẦM BÓP .....	92
3.3.1. Hoạt tính kháng viêm.....	92
3.3.2. Tác dụng giảm đau.....	96
3.3.3. Tác dụng trên chuyển hóa acid béo và glucose trong tế bào gan HepG2.....	97
3.3.4. Tác dụng gây độc trên một số dòng tế bào ung thư.....	103
<b>CHƯƠNG 4 BÀN LUẬN .....</b>	<b>106</b>
4.1. VỀ THỰC VẬT .....	106
4.2. VỀ HÓA HỌC .....	107
4.3. VỀ TÁC DỤNG SINH HỌC .....	118
4.3.1. Hoạt tính kháng viêm.....	118
4.3.2. Tác dụng giảm đau.....	122
4.3.3. Tác dụng trên chuyển hóa acid béo và glucose trong tế bào gan HepG2...	123
4.3.4. Tác dụng gây độc trên một số dòng tế bào ung thư <i>in vitro</i> .....	126
<b>KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....</b>	<b>130</b>

KẾT LUẬN.....	130
KIẾN NGHỊ.....	131
<b>DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ .....</b>	<b>132</b>
<b>TÀI LIỆU THAM KHẢO</b>	

## DANH MỤC KÝ HIỆU, CHỮ VIẾT TẮT

Phân viết tắt	Phân viết đầy đủ
$^1\text{H-NMR}$	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân proton (Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy)
$^{13}\text{C-NMR}$	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân carbon 13 (Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy)
ACC	Acetyl-CoA Carboxylase
AICAR	Một chất tương tự của AMP, có khả năng kích thích hoạt động của AMPK (5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide)
AMPK	Protein kinase kích hoạt AMP (Adenosine Monophosphate (AMP)-activated protein Kinase)
BuOH	<i>n</i> -Butanol
$\text{CD}_3\text{OD}$	Methanol deuterium, là một dạng methanol trong đó nguyên tử hydro (H) được thay thế bằng đồng vị đơteri (D)
COX-2	Cyclooxygenase-2
DCM	Dichloromethane
DEPT	Phổ DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer)
DMSO	Dimethyl sulfoxide
$\text{EC}_{50}$	Nồng độ có hiệu quả tối đa 50% (half maximal Effective Concentration)
ESI-MS	Phổ khối ion hóa phun mù điện tử (Electrospray Ionisation - Mass Spectrometry)
EtOAc	Ethyl acetate
EtOH	Ethanol
FAS	Enzyme tổng hợp acid béo (Fatty acid synthase)
$\text{GI}_{50}$	Nồng độ ức chế 50% sự tăng sinh tế bào (Growth Inhibitory, 50%)
HMBC	Phổ tương quan dị nhân đa liên kết (Heteronuclear Multiple Bond Correlation)
HPLC-PDA-MS/MS	Sắc ký lỏng hiệu năng cao với đầu dò dãy đi ốt quang kết hợp với sắc ký khối phổ 2 lần (High Performance Liquid Chromatography-



## Photo Diode Array Mass Spectrometry)

HSQC	Phổ tương tác dị nhân lượng tử đơn (Heteronuclear Single Quantum Coherence)
IC <sub>50</sub>	Nồng độ ức chế tối đa 50% (Half maximal inhibitory concentration)
ID <sub>50</sub>	Liều ức chế 50% (Inhibitory Dose, 50%)
IFN- $\gamma$	Interferon-gamma
<i>J</i>	Hằng số tương tác (đơn vị là Hz)
iNOS	Enzym tổng hợp NO cảm ứng (inducible Nitric Oxide Synthase)
IL	Interleukin
LD <sub>50</sub>	Liều gây chết 50% động vật thử nghiệm (Lethal Dose, 50%)
LPS	Lipopolysaccharide
<i>m/z</i>	Tỉ số giữa khối lượng và điện tích (mass to charge ratio)
MeOH	Methanol
MIC	Nồng độ ức chế tối thiểu (Minimal Inhibitory Concentration)
MPO	Myeloperoxidase
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid
Na-CMC	Natri Carboxymethyl Cellulose
NAFLD	Bệnh gan nhiễm mỡ không do rượu (Non-alcoholic fatty liver disease)
NF- $\kappa$ B	Yếu tố nhân kappa B (Nuclear factor kappa B)
NO	Nitric oxide
OD	Mật độ quang (Optical Density)
<i>P. angulata</i>	Tầm bóp ( <i>Physalis angulata</i> )
PGE2	Prostaglandin E2
ROS	Oxy phản ứng (reactive oxygen species)
SREBP-1c	Protein liên kết yếu tố điều hòa sterol 1c (Sterol Regulatory Element-Binding Protein 1c)

STT	Số thứ tự
TBE	Cao phân đoạn EtOAc của cây Tầm bóp
TBH	Cao phân đoạn <i>n</i> -hexan của cây Tầm bóp
TBN	Cao phân đoạn nước của cây Tầm bóp
TBT	Cao toàn phần EtOH 96% của cây Tầm bóp
TGF	Yếu tố tăng trưởng chuyển đổi (Transforming Growth Factor)
TLTK	Tài liệu tham khảo
TNF- $\alpha$	Yếu tố hoại tử khối u alpha (Tumor necrosis factor- $\alpha$ )
TPA	Chất gây phù (12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate)
v/v	Thể tích / thể tích
$\delta$	Độ dịch chuyển hóa học (đơn vị là ppm)

---

## DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1. Các hợp chất withanolid dạng $5\beta,6\beta$ -epoxid phân lập từ Tầm bóp .....	5
Bảng 1.2. Các hợp chất withanolid trung gian phân lập từ Tầm bóp.....	10
Bảng 1.3. Các hợp chất withanolid nhóm II phân lập từ Tầm bóp .....	14
Bảng 1.4. Các hợp chất withanolid khác phân lập từ Tầm bóp.....	17
Bảng 1.5. Các hợp chất terpenoid phân lập từ Tầm bóp .....	18
Bảng 1.6. Các hợp chất flavonoid phân lập từ Tầm bóp .....	20
Bảng 1.7. Các hợp chất phenolic phân lập từ Tầm bóp.....	21
Bảng 3.1. Kết quả định tính các nhóm chất trong Tầm bóp bằng các phản ứng hóa học .....	60
Bảng 3.2. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất <b>PA1</b> .....	66
Bảng 3.3. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất <b>PA2</b> .....	67
Bảng 3.4. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất <b>PA3</b> .....	68
Bảng 3.5. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất <b>PA4</b> .....	70
Bảng 3.6. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất <b>PA5</b> .....	71
Bảng 3.7. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất <b>PA6</b> .....	73
Bảng 3.8. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất <b>PA7</b> .....	74
Bảng 3.9. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất <b>PA8</b> .....	77
Bảng 3.10. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất <b>PA9</b> .....	78
Bảng 3.11. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất <b>PA10</b> .....	80
Bảng 3.12. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất <b>PA11</b> .....	83
Bảng 3.13. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất <b>PA12</b> .....	84
Bảng 3.14. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất <b>PA13</b> .....	86
Bảng 3.15. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất <b>PA14</b> .....	88
Bảng 3.16. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất <b>PA15</b> .....	90
Bảng 3.17. Ảnh hưởng của cao toàn phần EtOH 96% Tầm bóp lên mức độ phù chân chuột .....	95
Bảng 3.18. Ảnh hưởng của cao toàn phần EtOH 96% Tầm bóp trên khối lượng u hạt trên chuột cống trắng .....	96
Bảng 3.19. Ảnh hưởng của cao toàn phần EtOH 96% Tầm bóp đến số cơn đau quận của chuột nhắt trắng .....	97
Bảng 3.20. Khả năng gây độc tế bào của cao chiết Tầm bóp .....	103
Bảng 3.21. Khả năng gây độc tế bào của các hợp chất phân lập từ Tầm bóp .....	104

## DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1. Cấu trúc của các withanolid với bộ khung không bị biến đổi (I).....	4
Hình 1.2. Các hợp chất 17 $\beta$ -withanolid-5-en phân lập từ cây Tầm bóp .....	9
Hình 1.3. Cấu trúc của các withanolid với bộ khung bị biến đổi (II).....	14
Hình 2.1. Cây Tầm bóp ( <i>Physalis angulata</i> L.) .....	36
Hình 2.2. Phản ứng nhuộm màu tế bào sống bằng phương pháp MTT .....	42
Hình 2.3. Quy trình đánh giá hoạt tính kháng viêm cấp thực nghiệm trên mô hình gây phù bàn chân chuột bằng carrageenan.....	46
Hình 2.4. Quy trình đánh giá tác dụng giảm đau ngoại vi theo phương pháp gây đau quặn bằng acid acetic.....	48
Hình 3.1. Đặc điểm hình thái cây Tầm bóp ( <i>Physalis angulata</i> L.).....	55
Hình 3.2. Vi phẫu thân cây Tầm bóp.....	56
Hình 3.3. Vi phẫu lá cây Tầm bóp.....	57
Hình 3.4. Đặc điểm bột thân cây Tầm bóp.....	58
Hình 3.5. Đặc điểm bột lá cây Tầm bóp.....	59
Hình 3.6. Cấu trúc của hợp chất <b>PA1</b> .....	67
Hình 3.7. Cấu trúc và các tương tác HMBC chính ( $\rightarrow$ ) của hợp chất <b>PA2</b> .....	68
Hình 3.8. Cấu trúc và các tương tác HMBC chính ( $\rightarrow$ ) của hợp chất <b>PA3</b> .....	69
Hình 3.9. Cấu trúc của hợp chất <b>PA4</b> .....	71
Hình 3.10. Cấu trúc và tương tác HMBC chính ( $\rightarrow$ ) của hợp chất <b>PA5</b> .....	72
Hình 3.11. Cấu trúc và tương tác HMBC chính ( $\rightarrow$ ) của hợp chất <b>PA6</b> .....	74
Hình 3.12. Cấu trúc và tương tác HMBC chính ( $\rightarrow$ ) của hợp chất <b>PA7</b> .....	75
Hình 3.13. Cấu trúc và các tương tác HMBC chính ( $\rightarrow$ ) của hợp chất <b>PA8</b> .....	78
Hình 3.14. Cấu trúc của hợp chất <b>PA9</b> .....	80
Hình 3.15. Cấu trúc của hợp chất <b>PA10</b> .....	82
Hình 3.16. Cấu trúc và các tương tác HMBC chính ( $\rightarrow$ ) của hợp chất <b>PA11</b> .....	84
Hình 3.17. Cấu trúc và các tương tác HMBC chính ( $\rightarrow$ ) của hợp chất <b>PA12</b> .....	86
Hình 3.18. Cấu trúc (A) và các tương tác HMBC chính (B) của hợp chất <b>PA13</b> .....	88
Hình 3.19. Cấu trúc và các tương tác HMBC chính ( $\rightarrow$ ) của hợp chất <b>PA14</b> .....	90
Hình 3.20. Cấu trúc của hợp chất <b>PA15</b> .....	92
Hình 3.21. Ảnh hưởng của mẫu thử đến khả năng sống sót của tế bào RAW 264.7....	92
Hình 3.22. Hoạt tính kháng viêm <i>in vitro</i> của các cao chiết (20 $\mu$ g/mL) và chất tinh khiết (10 $\mu$ M) từ Tầm bóp .....	94
Hình 3.23. Ảnh hưởng của mẫu thử đến khả năng sống sót của tế bào HepG2.....	98

Hình 3.24. Khả năng hoạt hóa p-AMPK và p-ACC trong tế bào HepG2 của các cao chiết .....	99
Hình 3.25. Khả năng hoạt hóa p-AMPK và p-ACC trong tế bào HepG2 của các hợp chất.....	100
Hình 3.26. Tác dụng ức chế FAS và SREBP-1c theo nồng độ của <b>PA12</b> và <b>PA14</b> trong tế bào HepG2.....	101
Hình 3.27. Hình ảnh nhuộm Nile Red của các tế bào sau khi ủ mẫu thử.....	102
Hình 3.28. Khả năng ức chế tích tụ lipid trên tế bào HepG2 bằng thử nghiệm Nile Red ...	102
Hình 4.1. Cây Tầm bóp, Lu lu đực và cây Xoan leo .....	107
Hình 4.2. Cấu trúc của các hợp chất phân lập từ Tầm bóp .....	108
Hình 4.3. Chức năng điều hòa ACC, FAS của SREBP-1c .....	125
Hình 4.4. Cấu trúc của những withanolid liên quan gây độc tế bào .....	127

## DANH MỤC SƠ ĐỒ

Sơ đồ 3.1. Tóm tắt quá trình chiết xuất cao từ Tầm bóp .....	62
Sơ đồ 3.2. Tóm tắt quá trình phân lập các hợp chất từ cao <i>n</i> -hexan của Tầm bóp .....	64
Sơ đồ 3.3. Tóm tắt quá trình phân lập các hợp chất từ cao EtOAc của Tầm bóp .....	65
Sơ đồ 3.4. Tóm tắt quá trình phân lập các hợp chất từ cặn nước của Tầm bóp .....	66

## ĐẶT VẤN ĐỀ

Việt Nam nằm trong vùng khí hậu nhiệt đới gió mùa quanh năm nóng ẩm, có hệ thực vật vô cùng phong phú và đa dạng. Từ xa xưa, cha ông ta đã sử dụng các dược liệu làm thuốc chữa bệnh rất có hiệu quả. Ngày nay, những hợp chất tự nhiên có hoạt tính sinh học được phân lập từ cây cỏ đã được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực, trong đó có ngành Dược dùng để sản xuất thuốc phòng và chữa bệnh. Vì vậy, nguồn cây thuốc dân gian cũng như vốn sử dụng phong phú của đồng bào các dân tộc vẫn là kho tàng quý giá để khám phá, tìm kiếm nhiều loại thuốc mới có hiệu lực cao cho công tác phòng và chữa bệnh.

Ở Việt Nam, Tầm bóp (*Physalis angulata* L., họ Cà Solanaceae) được sử dụng để tắm cho trẻ em rôm sảy, những người bị mẩn ngứa, toàn cây còn dùng sắc uống điều trị viêm khớp, cứng khớp [1], [2]. Qua tổng quan trên thế giới cho thấy, các cao chiết và hợp chất tinh khiết phân lập từ *P. angulata* L. có hoạt tính kháng viêm, giảm đau, gây độc tế bào ung thư, chống hen suyễn, điều hòa miễn dịch, kháng khuẩn, kháng nấm, lợi tiểu... với các nhóm chất như tinh dầu, withanolid, flavonoid, terpenoid, acid phenolic và carotenoid. Tuy nhiên, ở Việt Nam, Tầm bóp chưa được quan tâm nhiều. Trong ngành nông nghiệp và lâm nghiệp còn coi loài này như một loại cỏ dại, chưa có nhiều báo cáo về thành phần hóa học cũng như tác dụng sinh học.

Với mục đích góp phần nghiên cứu về thực vật, thành phần hóa học cũng như hoạt tính sinh học của Tầm bóp, chứng minh việc sử dụng vị thuốc trong dân gian, nhất là tác dụng chống viêm, giảm đau, chống ung thư..., đồng thời nhằm bổ sung cây thuốc mới vào kho tàng cây thuốc Việt Nam và nâng cao giá trị của cây tầm bóp về mặt dược học, luận án: **“Nghiên cứu đặc điểm thực vật, thành phần hóa học và một số tác dụng sinh học của cây Tầm bóp (*Physalis angulata* L.), họ Cà (Solanaceae)”** được thực hiện với ba mục tiêu sau:

1. Mô tả được hình thái thực vật, giám định tên khoa học và xác định được đặc điểm vi học của cây Tầm bóp.
2. Chiết xuất, phân lập và xác định được cấu trúc hóa học một số hợp chất từ cây Tầm bóp.
3. Đánh giá được một số tác dụng sinh học của cao chiết và một số hợp chất phân lập được từ cây Tầm bóp.

# CHƯƠNG 1

## TỔNG QUAN

### 1.1. THỰC VẬT HỌC

#### 1.1.1. Vị trí phân loại

Tầm bóp hay còn gọi là Lu lu cái, Thù lu, Toan tương, thuộc họ Cà (Solanaceae), bộ Solanales, giới Plantae, chi *Physalis* L. và loài *Physalis angulata* L. [3].

“*Physalis*” theo tiếng Hy Lạp có nghĩa là 'bong bóng' dùng để chỉ đài hoa được thổi phồng lên như cái bong bóng. Chi *Physalis* và loài *P. angulata* đều được nhà thực vật học nổi tiếng Thụy Điển Carl von Linné xác lập năm 1753 (L. Species Plantarum 1:183.1753). Chi *Physalis* trên thế giới hiện đã biết có khoảng 75 loài [4], [5] hoặc có tài liệu cho biết có tới 90 - 100 loài [2], [6]. Người ta cho rằng, Mexico là nơi phát sinh của chi *Physalis*, về sau được du nhập và phát tán rộng rãi ra các vùng nhiệt đới, cận nhiệt đới ở châu Mỹ cũng như các châu lục khác trên thế giới [7], [8]. Ở Mexico hiện vẫn là nơi tập trung sự đa dạng cao và có nhiều loài đặc hữu của chi *Physalis* [9]. Chi *Physalis* chứa nhiều loài được trồng để lấy quả, làm cảnh hoặc để ăn sống hoặc nấu chín. Loài được trồng phổ biến nhất ở Bắc Mỹ là Tomatillo (*P. philadelphica*), thường được trồng để làm thực phẩm và được sử dụng trong sốt xanh (salsa verde). Nhiều loài khác như cây chùm ruột Cape (*P. peruviana*) và cà chua vỏ hoặc cà chua muiyaca ở Nam Mỹ (*P. pubescens*) đã được trồng và lấy quả chua của chúng [10]. Cây lồng đèn Trung Quốc (*Physalis alkekengi*) là một loài cây cảnh được trồng để lấy vỏ có màu đỏ cam rực rỡ [1], [7].

Ở Việt Nam, người đầu tiên đề cập về chi *Physalis* L. và loài Tầm bóp (*P. angulata* L.) là Joannis de Loureiro trong “Flora cochinchinensis”, I: 129., Beroloni, năm 1790 [11]. Sau J. de Loureiro, năm 1915 trong “Flore générale de l'Indo-Chine”, T.4:335, Gustave Henri Bonati cũng mô tả chi và loài Tầm bóp kể trên [12]. Tác giả người Việt Nam nghiên cứu phân loại thực vật họ Cà (Solanaceae) nói chung hay chi *Physalis* và loài Tầm bóp (*P. angulata* L.) nói riêng đáng chú ý có 2 người: (1) Phạm Hoàng Hộ (“Cây cỏ Miền Nam Việt Nam”, Quyển II, 1972) [13] và “Cây cỏ Việt Nam”, Quyển II, 2000 [14]) và (2) Vũ Văn Hợp (Thực vật chí Việt Nam, 2017, T.17 - Solanaceae, tr.35-45) [5]. Bên cạnh các tài liệu về phân loại này, từ năm 1954 đến nay, loài Tầm bóp (*P. angulata* L.) cũng được đề cập trong nhiều tài liệu về thực vật học khác cũng như về cây thuốc Việt Nam.

### 1.1.2. Đặc điểm thực vật

Cây thảo, sống hằng năm, cao tới 1 m. Thân nhẵn có góc cạnh, phân cành nhiều. Lá mọc so le, hình trái xoan, dài 3 - 5,5 cm, rộng 2 - 4 cm, gốc hình nêm, đầu thuôn nhọn, mép nguyên hoặc đôi khi xẻ thùy nhỏ và lượn sóng; cuống lá dài 1 - 3 cm. Hoa mọc đơn độc ở kẽ lá, rủ xuống, màu vàng tươi hoặc trắng nhạt, có khi điểm chấm tím ở giữa; đài hình chuông, 5 răng nhọn có lông; tràng 5 cánh hàn liền, có lông tơ ở mặt ngoài; nhị 5 dính ở gốc tràng; bầu 2 ô. Quả mọng, hình cầu, nhẵn, màu đỏ, bao bọc bởi đài to đồng trường có phiến mỏng; hạt nhiều, dẹt, hình thận. Mùa hoa quả: tháng 5 - 7 [15].

### 1.1.3. Phân bố và sinh thái

Tầm bóp - *P. angulata* là một loài ngoại lai có nguồn gốc từ châu Mỹ nhiệt đới và hiện nay, có sự phân bố ở vùng nhiệt đới [16], [17]. Đây là một loài di thực tiềm năng trong các hệ sinh thái Địa Trung Hải, loài này được ghi nhận ở Ai Cập bởi Tackholm (1974) [18], Thổ Nhĩ Kỳ bởi Gonen và cộng sự (2000) [19] và từ Iraq của Al-Ellagi (2012) [20]. Sau đó, được ghi nhận từ Syria bởi Mahklouf [2]. Những phát hiện này là một điểm mới về sự di thực của loài này ở khu vực Địa Trung Hải.

Ở Việt Nam, Tầm bóp được coi là loài cỏ dại mọc ở khắp nơi, từ vùng đồng bằng đến vùng núi ở độ cao 1500 m (Sơn La, Lạng Sơn, Bắc Giang, Hà Nội, Ninh Bình, Đà Nẵng, Kon Tum, Gia Lai, Bà Rịa - Vũng Tàu, thành phố Hồ Chí Minh) [21]. Cây ưa sáng và có thể hơi chịu bóng, thường mọc trên đất ẩm, ở ruộng ngô, bãi sông, nơi đất trũng, trên nương rẫy hoặc ở những bãi hoang xung quanh làng bản. Hằng năm, cây con mọc từ hạt vào khoảng tháng 4 - 5. Cây sinh trưởng nhanh trong mùa hè, sau khi ra hoa quả, toàn cây sẽ lụi. Thời gian hạt nằm trên mặt đất thường dài hơn (1 - 2 tháng) vòng đời của cây [15].

## 1.2. CÁC THÀNH PHẦN HÓA HỌC CHÍNH

Tầm bóp rất đa dạng thành phần hóa học, ở các bộ phận khác nhau của cây.

### 1.2.1. Tinh dầu

Các nhóm chất được xác định trong tinh dầu của loài *P. angulata* là diterpen (31,7%), acid béo (22,8%), sesquiterpen dạng oxy hóa (22,3%) và các hợp chất thơm (13,6%). Các hợp chất monoterpen chiếm hàm lượng rất thấp [22].

Thành phần chính của tinh dầu là phytol (31,7%) và hexahydrofarnesyl aceton hoặc 6,10,14-trimethy-2-pentadecanon (18,8%). Thành phần có hàm lượng đáng kể là *n*-nonadecan (8,6%) và acid *n*-hexadecanoic (5,0%). Các hợp chất có hàm lượng thấp



của tinh dầu bao gồm heptadecan (3,8%), acid oleic (3,6%), 2-methylpentadecan (3,3%), farnesol acetat (2,8%) và 2-phenylundecan (2,3%) [22].

### 1.2.2. Carotenoid

Đã có 22 hợp chất carotenoid từ quả của loài *P. angulata* được xác định bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao với đầu dò dẫn đi ốt quang kết hợp với sắc ký khối phổ 2 lần (HPLC-PDA-MS/MS), trong đó *trans*-caroten là thành phần chính, chiếm 62,2%, sau đó là 9-*cis*-caroten (2,9%) và *trans*-cryptoxanthin (2,7%) [23].

### 1.2.3. Nhóm hợp chất phi phenolic

Trong nhóm này, đầu tiên phải kể đến các withanolid. Hiện nay, đã có hơn 100 withanolid được phân lập từ tâm bóp.

#### 1.2.3.1. Withanolid

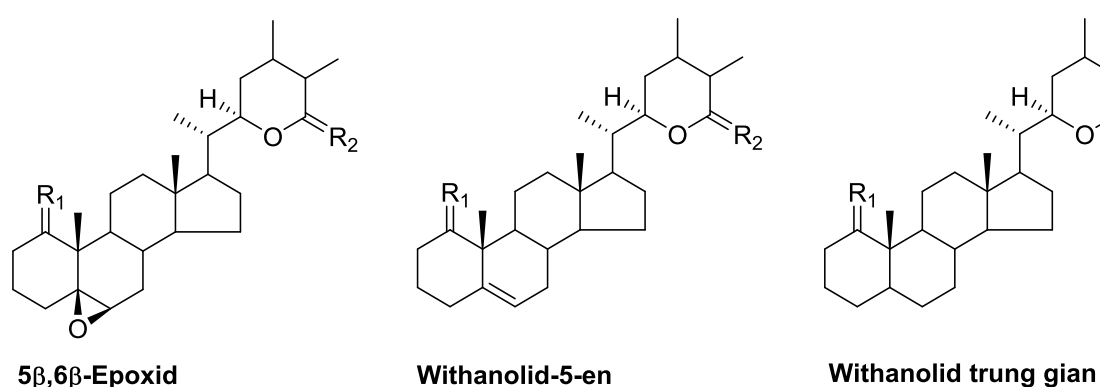
Withanolid trong tự nhiên được chia làm 2 loại cơ bản:  $\delta$ -lacton/lactol (loại A) và  $\gamma$ -lacton/lactol (loại B) [24]. Các hợp chất withanolid phân lập từ loài *P. angulata* thuộc loại A; ngoài ra còn một số hợp chất withanolid khác không thuộc 2 loại A và B.

#### ➤ Withanolid với khung $\delta$ -lacton/lactol (loại A)

Các withanolid loại A chia thành 2 nhóm dựa trên bộ khung không bị biến đổi (I) hay bị biến đổi (II):

#### ✚ Các withanolid nhóm I

Trong nhóm I, các withanolid từ loài *P. angulata* được phân thành 3 nhóm nhỏ: 5 $\beta$ ,6 $\beta$ -epoxid, withanolid-5-en và withanolid trung gian (**Hình 1.1**).

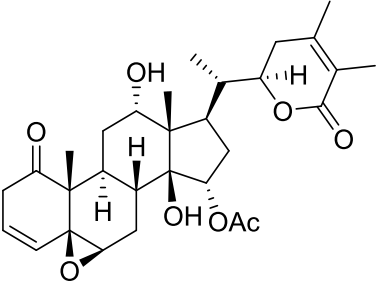
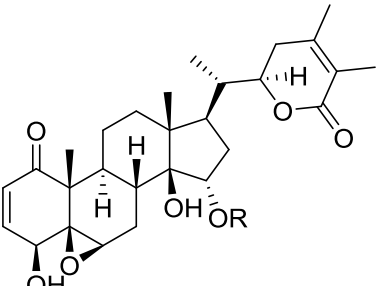
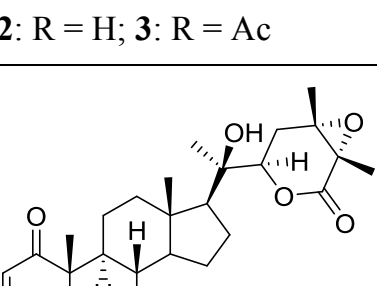
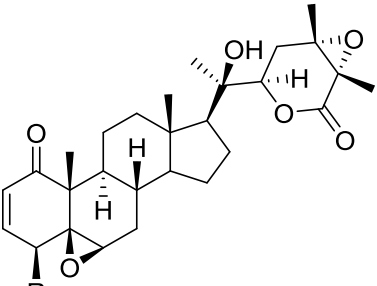
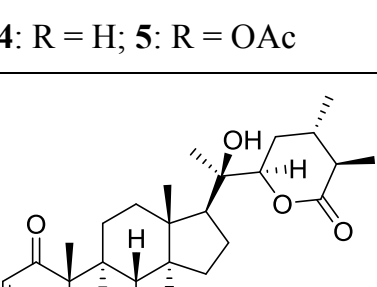
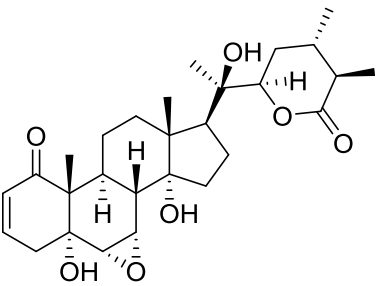


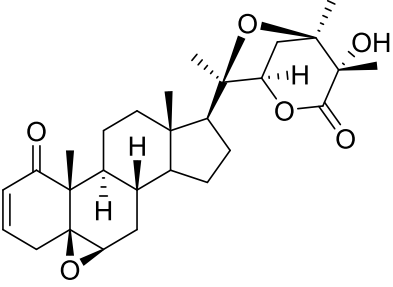
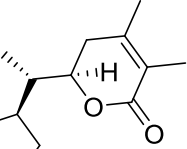
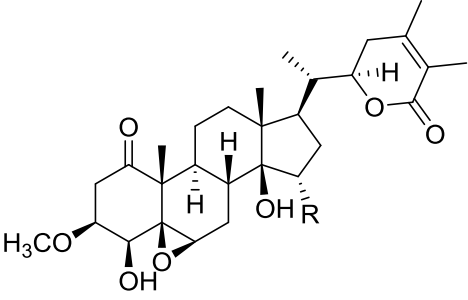
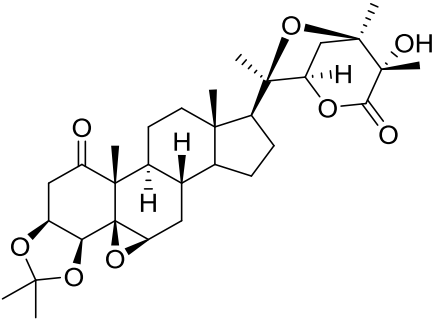
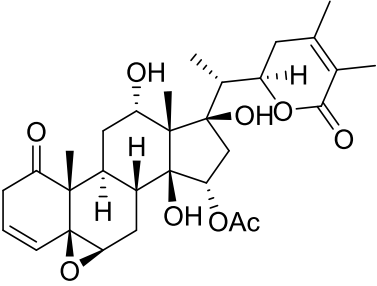
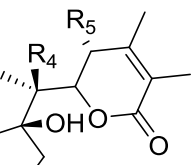
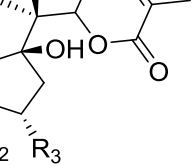
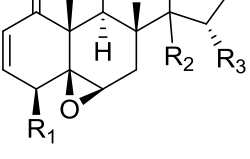
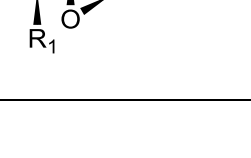
**Hình 1.1. Cấu trúc của các withanolid với bộ khung không bị biến đổi (I)**

#### ❖ Các withanolid dạng 5 $\beta$ ,6 $\beta$ -epoxid

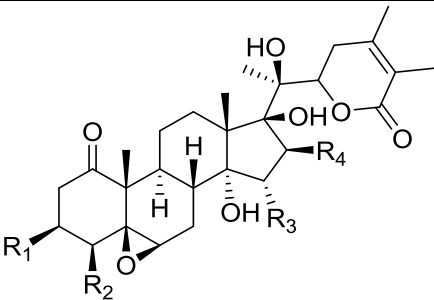
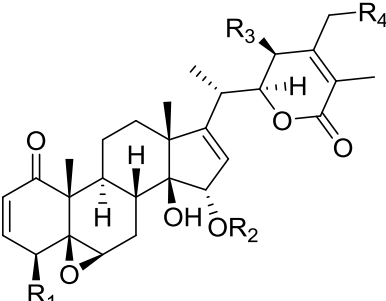
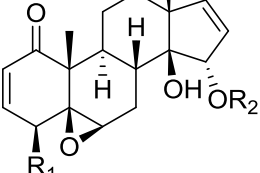
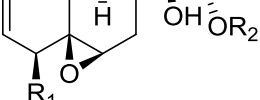
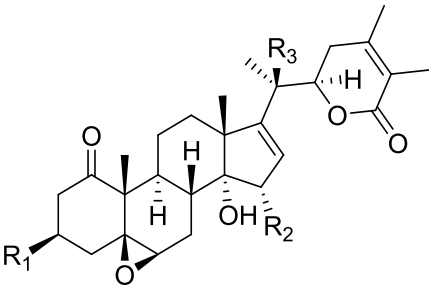
Các withanolid dạng 5 $\beta$ ,6 $\beta$ -epoxid thường có cấu hình 17 $\alpha$  hoặc 17 $\beta$  và nối đôi ở vị trí 16. Cấu trúc của các hợp chất này được liệt kê trong bảng dưới đây:

**Bảng 1.1. Các hợp chất withanolid dạng 5 $\beta$ ,6 $\beta$ -epoxid phân lập từ Tầm bóp**

STT	Tên chất	Cấu trúc hóa học	TLTK
<b>Withanolid 5<math>\beta</math>,6<math>\beta</math>-epoxid với cấu hình 17<math>\beta</math></b>			
1	Physagulid J		[25], [26]
2	(20 <i>S</i> ,22 <i>R</i> )-5 $\beta$ (6)-epoxy-4 $\beta$ ,14 $\beta$ ,15 $\alpha$ -trihydroxy-1-oxowith-2,24-dienolid		[27]
3	Physapubenolid		[27]
		2: R = H; 3: R = Ac	
4	24,25-Epoxywithanolid D		[28]
5	4- <i>O</i> -Acetyl-24,25-epoxywithanolid D		[28]
		4: R = H; 5: R = OAc	
6	14 $\alpha$ -Hydroxyixocarpanolid		[29]

7	Physangulid B		[28]
8	Physangulid N		[30]
9	Physangulid M		[30]
		8: R = H; 9: R = OAc	
10	Physangulid acetonid		[28]
<b>Withanolid 5<math>\beta</math>,6<math>\beta</math>-epoxid với cấu hình 17<math>\alpha</math></b>			
11	Physangulid I		[25], [26]
12	Withanolid E		[31]
13	Physangulid P		[32]
14	Physangulid S		[27]
15	4 $\beta$ -Hydroxywithanolid		[31]

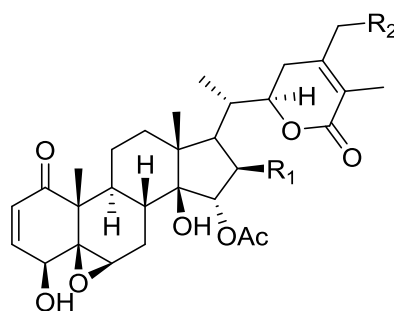
		<p><b>12:</b> <math>R_1 = R_3 = R_5 = H, R_2 = \alpha\text{-OH}, R_4 = OH</math></p> <p><b>13:</b> <math>R_1 = OH, R_2 = \beta\text{-OH}, R_3 = OAc, R_4 = R_5 = H</math></p> <p><b>14:</b> <math>R_1 = R_5 = OH, R_2 = \beta\text{-OH}, R_3 = OAc, R_4 = H</math></p>	
<b>16</b>	Withangulatin B		[31]
		<p><b>15:</b> <math>R_1 = R_4 = OH, R_2 = \alpha\text{-OH}, R_3 = H, R_5 = H</math></p> <p><b>16:</b> <math>R_1 = R_3 = R_4 = OH, R_2 = \alpha\text{-OH}, R_5 = H</math></p>	
<b>17</b>	Physagulin H		[26], [33], [34]
<b>18</b>	Physagulin C		[27], [33], [34], [35], [36]
<b>19</b>	Physagulid R	<p><b>17:</b> <math>R_1 = R_2 = H</math></p> <p><b>18:</b> <math>R_1 = OH, R_2 = H</math></p> <p><b>19:</b> <math>R_1 = OH, R_2 = OH</math></p>	[27]
<b>20</b>	Physangulatin I		[26]
<b>21</b>	Physagulid O		[30]
		<b>20:</b> $R = \alpha\text{-OCH}_3$ ; <b>21:</b> $R = \beta\text{-OCH}_3$	
<b>22</b>	Withangulatin C		[31]
<b>23</b>	Withangulatin E		[31]

24	Withangulatin H		[31]
		22: $R_1 = H, R_2 = OH, R_3 = OCH_3, R_4 = H$	
		23: $R_1 = H, R_2 = OCH_3, R_3 = R_4 = H$	
		24: $R_1 = OCH_3, R_2 = H, R_3 = H, R_4 = OH$	
<b>Withanolid 5<math>\beta</math>,6<math>\beta</math>-epoxid với nhóm 16-en</b>			
25	Physagulin A		[26], [27], [32], [33], [34], [36]
26	Withangulatin I		[37]
27	Physagulid U		[27]
28	Withangulatin A	25: $R_1 = H, R_2 = Ac, R_3 = R_4 = H$ 26: $R_1 = =O, R_2 = Ac, R_3 = R_4 = H$ 27: $R_1 = OH, R_2 = R_3 = R_4 = H$	[25], [27], [32], [33], [34], [36], [37], [38]
29	Physagulid C	28: $R_1 = OH, R_2 = Ac, R_3 = R_4 = H$ 29: $R_1 = OH, R_2 = Ac, R_3 = H, R_4 = OH$	[25]
30	Physagulid D	30: $R_1 = OH, R_2 = Ac, R_3 = OH, R_4 = H$	[25]
31	Withangulatin F		[31]
32	Physagulin N	31: $R_1 = R_2 = H, R_3 = OH$ 32: $R_1 = OCH_3, R_2 = OAc, R_3 = H$	[26], [33], [39]

**Các hợp chất withanolid 5 $\beta$ ,6 $\beta$ -epoxid khác**

**33** Physagulid V

[27]



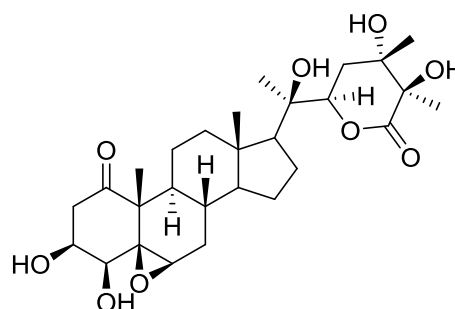
**34** Physagulid T

[27]

**33:** R<sub>1</sub> = OH, R<sub>2</sub> = H  
**34:** R<sub>1</sub> = H, R<sub>2</sub> = OH

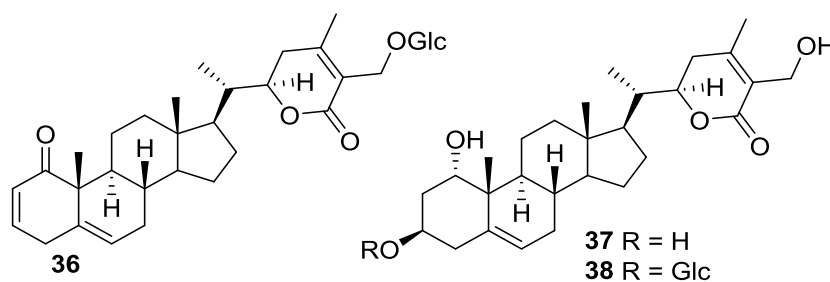
**35** Physangulid

[40]



❖ Các withanolid-5-en

Các hợp chất withanolid-5-en phân lập từ Tầm bóp có cấu hình 17 $\beta$ : Daturametelin A (**36**) [36], pubesenolid (**37**) [38] và physagulin D (**38**) [33], [36], [38] (Hình 1.2).



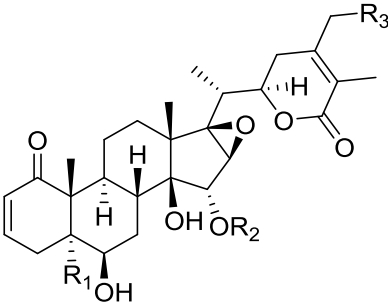
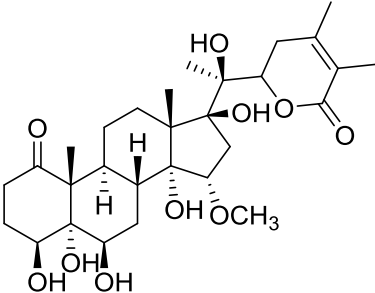
**Hình 1.2. Các hợp chất 17 $\beta$ -withanolid-5-en phân lập từ cây Tầm bóp**

❖ Các withanolid trung gian

Các hợp chất withanolid trung gian phân lập từ Tầm bóp có cấu hình 17 $\beta$  hoặc 17 $\alpha$  hoặc nối đôi ở C-16 (nhóm 16-en). Cấu trúc của các hợp chất này được liệt kê trong bảng sau:

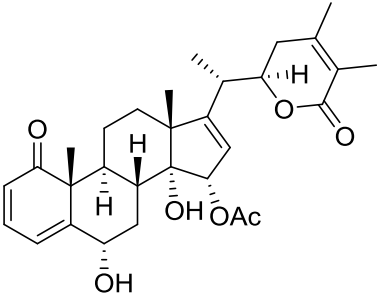
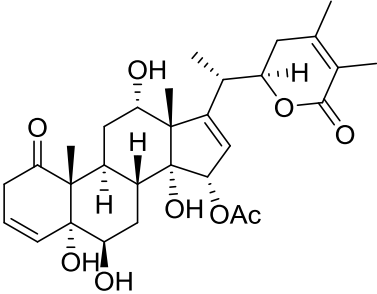
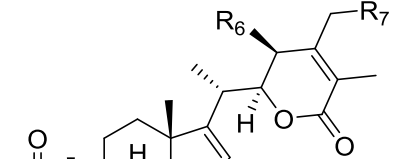
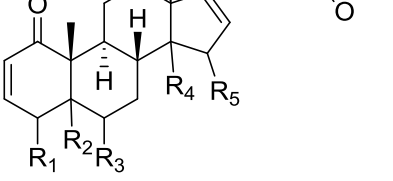
**Bảng 1.2. Các hợp chất withanolid trung gian phân lập từ Tầm bóp**

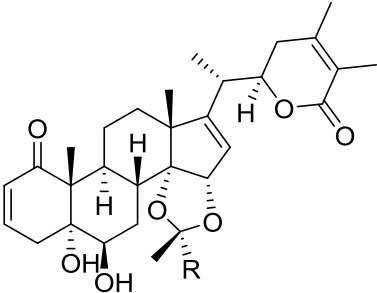
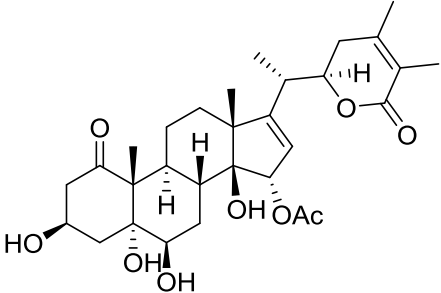
STT	Tên chất	Cấu trúc hóa học	TLTK	
<b>Withanolid trung gian với khung 17<math>\beta</math></b>				
39	Physagulin J		[25], [26], [33], [34], [38], [39]	
40	Physangulatin M		[26]	
41	Physangulatin N		[26]	
42	Physagulid A		39: R <sub>1</sub> = OH, R <sub>2</sub> = $\beta$ -OH, R <sub>3</sub> = Ac, R <sub>4</sub> = R <sub>5</sub> = R <sub>6</sub> = R <sub>7</sub> = H	[25]
43	Physagulid B		40: R <sub>1</sub> = OH, R <sub>2</sub> = $\alpha$ -H, R <sub>3</sub> = Ac, R <sub>4</sub> = R <sub>5</sub> = R <sub>6</sub> = R <sub>7</sub> = H	[25]
44	Physagulid E	41: R <sub>1</sub> = OH, R <sub>2</sub> = $\alpha$ -H, R <sub>3</sub> = R <sub>4</sub> = H, R <sub>5</sub> = OH, R <sub>6</sub> = R <sub>7</sub> = H	[25]	
45	(20 <i>S</i> ,22 <i>R</i> )-15 $\alpha$ - Acetoxy-5 $\alpha$ -chloro- 6 $\beta$ ,14 $\beta$ -dihydroxy-1- oxowitha-2,24-dienolid	42: R <sub>1</sub> = OH, R <sub>2</sub> = $\beta$ -OH, R <sub>3</sub> = Ac, R <sub>4</sub> = R <sub>5</sub> = R <sub>6</sub> = H, R <sub>7</sub> = OH 43: R <sub>1</sub> = OH, R <sub>2</sub> = $\beta$ -OH, R <sub>3</sub> = Ac, R <sub>4</sub> = R <sub>5</sub> = H, R <sub>6</sub> = OH, R <sub>7</sub> = H 44: R <sub>1</sub> = OH, R <sub>2</sub> = $\beta$ -OH, R <sub>3</sub> = Ac, R <sub>4</sub> = $\alpha$ -OH, R <sub>5</sub> = R <sub>6</sub> = R <sub>7</sub> = H 45: R <sub>1</sub> = Cl, R <sub>2</sub> = $\beta$ -OH, R <sub>3</sub> = Ac, R <sub>4</sub> = R <sub>5</sub> = R <sub>6</sub> = R <sub>7</sub> = H	[25]	
<b>Withanolid trung gian với khung 17<math>\alpha</math></b>				
46	Physagulin K		[25], [26], [33], [34], [38], [39]	
47	Physagulin P		[27], [39]	
48	14-Epi-physagulin P		[39]	

49	Physangulatin K	46: $R_1 = R_2 = H, R_3 = \beta\text{-OH}, R_4 = \text{OAc},$ $R_5 = R_6 = H$	[26]
50	Withangulatin G	47: $R_1 = R_2 = H, R_3 = \beta\text{-OH}, R_4 = \text{OAc},$ $R_5 = \alpha\text{-OH}, R_6 = H$ 48: $R_1 = R_2 = H, R_3 = \alpha\text{-OH}, R_4 = \text{OAc},$ $R_5 = \alpha\text{-OH}, R_6 = H$ 49: $R_1 = H, R_2 = \text{CH}_3, R_3 = \beta\text{-OH}, R_4 =$ $\text{OAc}, R_5 = R_6 = H$	[31]
51	Withaperuvin	50: $R_1 = \text{OH}, R_2 = H, R_3 = \alpha\text{-OH}, R_4 =$ $H, R_5 = \beta\text{-OH}, R_6 = \text{OH}$ 51: $R_1 = \text{OH}, R_2 = H, R_3 = \alpha\text{-OH}, R_4 =$ $R_5 = H, R_6 = \text{OH}$	[31]
52	Physagulin F		[26], [32], [33], [34], [36]
53	Physagulin G		[36]
54	Physagulin I	52: $R_1 = \text{OH}, R_2 = \text{Ac}, R_3 = H$	[26], [32], [33], [34]
55	Physangulatin J	53: $R_1 = \text{OH}, R_2 = \text{Ac}, R_3 = \text{OGlc}$ 54: $R_1 = \text{Cl}, R_2 = \text{Ac}, R_3 = H$	[26]
56	Physangulatin L	55: $R_1 = \text{OCH}_3, R_2 = \text{Ac}, R_3 = H$ 56: $R_1 = \text{OH}, R_2 = R_3 = H$	[26]
57	Withangulatin D		[31]



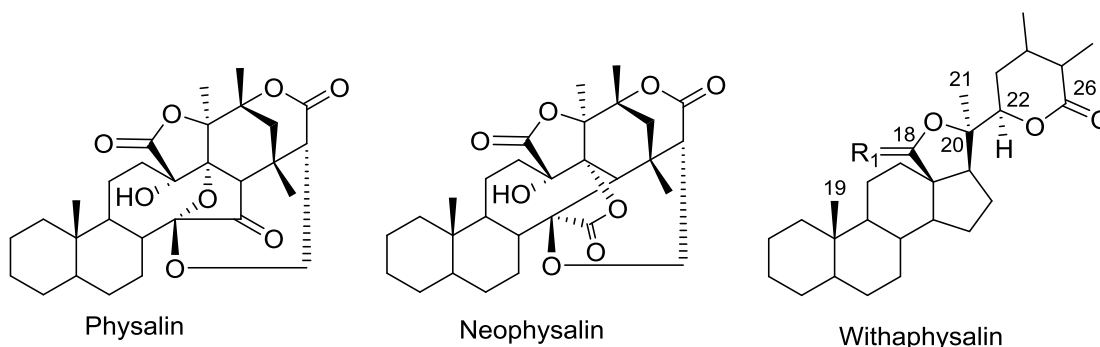
**Withanolid trung gian với nhóm 16-en**

<b>58</b>	Physagulin L		[33], [38]
<b>59</b>	Physagulin O		[38]
<b>60</b>	Physagulin B		[25], [26], [33], [34], [36], [38]
<b>61</b>	Physagulid F		[25]
<b>62</b>	Withaminimin	<b>60:</b> $R_1 = H, R_2 = \alpha\text{-Cl}, R_3 = \beta\text{-OH}, R_4 = \alpha\text{-OH}, R_5 = \alpha\text{-OAc}, R_6 = R_7 = H$	[25], [26], [32], [33], [34], [36], [38], [39]
<b>63</b>	Physagulin M	<b>61:</b> $R_1 = H, R_2 = \alpha\text{-OH}, R_3 = \beta\text{-OH}, R_4 = R_5 = \alpha\text{-OH}, R_6 = R_7 = H$	[25], [33]
<b>64</b>	Physagulin E	<b>62:</b> $R_1 = H, R_2 = \alpha\text{-OH}, R_3 = \beta\text{-OH}, R_4 = \alpha\text{-OH}, R_5 = \alpha\text{-OAc}, R_6 = R_7 = H$	[36]
<b>65</b>	Physangulatin A	<b>63:</b> $R_1 = H, R_2 = \alpha\text{-OH}, R_3 = \beta\text{-OH}, R_4 = \alpha\text{-OH}, R_5 = \alpha\text{-OAc}, R_6 = OH, R_7 = H$	[26]
<b>66</b>	Physangulatin E	<b>64:</b> $R_1 = H, R_2 = \alpha\text{-OH}, R_3 = \beta\text{-OH}, R_4 = \alpha\text{-OH}, R_5 = \alpha\text{-OAc}, R_6 = H, R_7 = \text{OGlc}$	[26]
<b>67</b>	Physangulatin H		[26]
<b>68</b>	Physangulatin D		[26]
<b>69</b>	Physangulatin B		[26]

70	Physangulatin F	65: $R_1 = H, R_2 = \alpha\text{-OH}, R_3 = \beta\text{-OH}, R_4 = \beta\text{-OH}, R_5 = \alpha\text{-OH}, R_6 = R_7 = H$	[26]
71	Physagulid G	66: $R_1 = H, R_2 = \alpha\text{-OH}, R_3 = \beta\text{-OH}, R_4 = \beta\text{-OH}, R_5 = \alpha\text{-OCH}_3, R_6 = R_7 = H$	[25]
72	Physagulin Q	67: $R_1 = H, R_2 = \alpha\text{-OCH}_3, R_3 = \beta\text{-OH}, R_4 = \beta\text{-OH}, R_5 = \alpha\text{-OAc}, R_6 = R_7 = H$	[25], [39]
		68: $R_1 = H, R_2 = \beta\text{-OH}, R_3 = \alpha\text{-OH}, R_4 = \beta\text{-OH}, R_5 = \alpha\text{-OAc}, R_6 = R_7 = H$	
		69: $R_1 = H, R_2 = \alpha\text{-OH}, R_3 = \beta\text{-OH}, R_4 = \beta\text{-OH}, R_5 = \beta\text{-OH}, R_6 = R_7 = H$	
73	Physagulid H	70: $R_1 = H, R_2 = \alpha\text{-OH}, R_3 = \beta\text{-OH}, R_4 = \beta\text{-OH}, R_5 = \beta\text{-OCH}_3, R_6 = R_7 = H$	[25]
		71: $R_1 = H, R_2 = R_3 = R_4 = \alpha\text{-OH}, R_5 = \alpha\text{-OAc}, R_6 = R_7 = H$	
		72: $R_1 = H, R_2 = \beta\text{-OH}, R_3 = \alpha\text{-Cl}, R_4 = \alpha\text{-OH}, R_5 = \alpha\text{-OAc}, R_6 = R_7 = H$	
		73: $R_1 = R_2 = \beta\text{-OH}, R_3 = \alpha\text{-Cl}, R_4 = \alpha\text{-OH}, R_5 = \alpha\text{-OAc}, R_6 = R_7 = H$	
74	Physangulatin C		[26]
75	Withaminimin acetonid		[26]
		74: $R = H, 75: R = CH_3$	
76	Physangulatin G		[26]

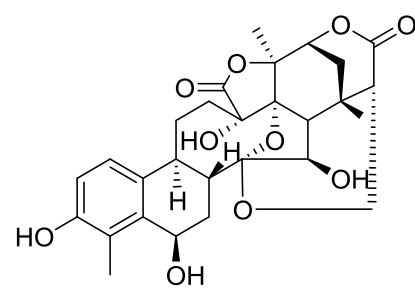
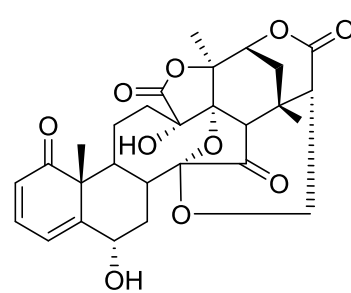
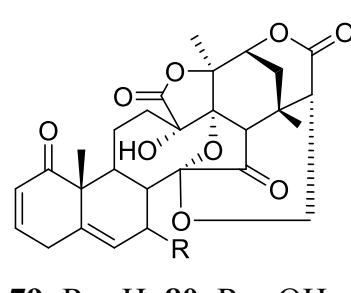
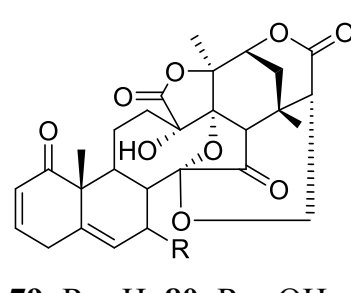
✚ Các withanolid nhóm II

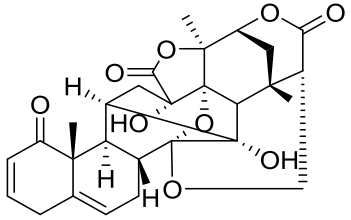
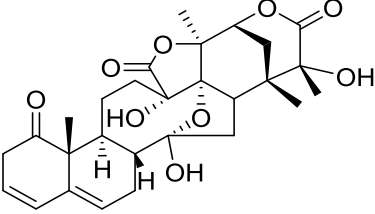
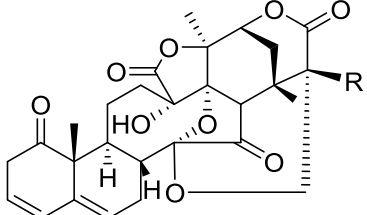
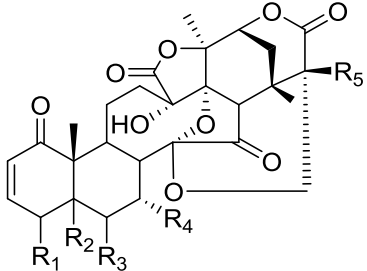
Trong nhóm II, các withanolid từ cây Tầm bóp được chia thành 3 phân nhóm nhỏ: Physalin, neophysalin và withaphysalin (**Hình 1.3, Bảng 1.3**).



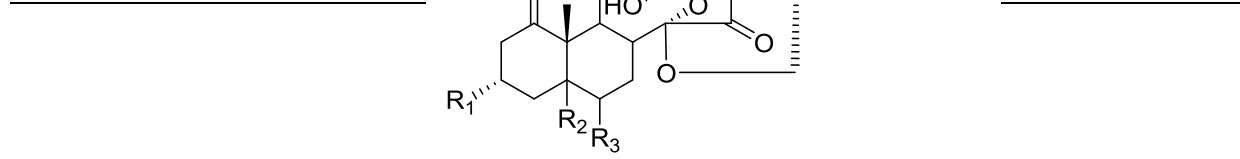
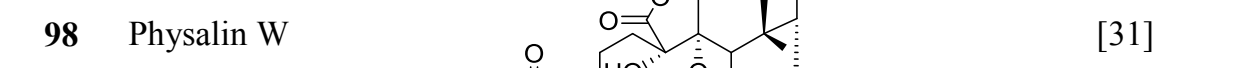
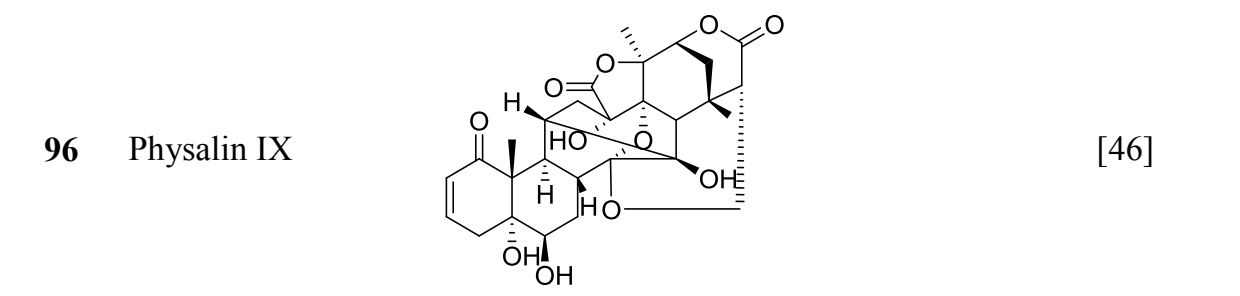
**Hình 1.3. Cấu trúc của các withanolid với bộ khung bị biến đổi (II)**

**Bảng 1.3. Các hợp chất withanolid nhóm II phân lập từ Tầm bóp**

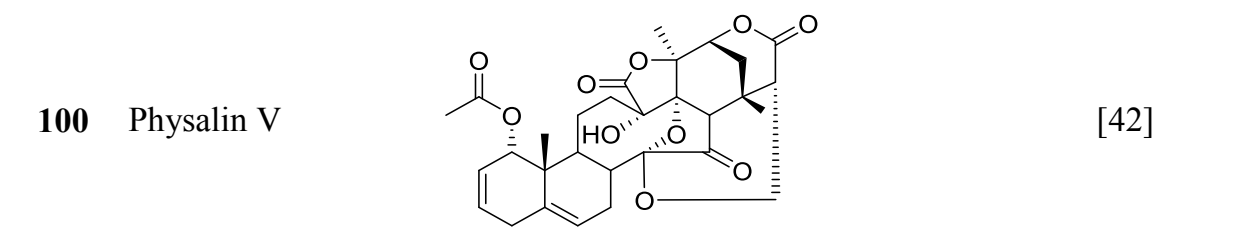
STT	Tên chất	Cấu trúc hóa học	TLTK
<b>Physalin</b>			
77	Aromaphysalin A		[41]
78	Physalin G		[31], [42], [43], [44], [45], [45], [46], [47]
79	Physalin B		[31], [42], [44], [45], [45], [46], [48]
80	Physalin H		[43], [44], [45], [45], [46]
		<b>79: R = H, 80: R = OH</b>	

81	Physalin R		[46]
82	Physalin VI		[46]
83	Physalin VII		[46]
84	Isophysalin B		[46]
		<b>83:</b> R = OH, <b>84:</b> R = H	
85	Physalin D		[31], [42], [43], [44], [46], [48], [49]
86	25 $\beta$ -Hydroxyphysalin D		[46]
87	Physalin I	<b>85:</b> R <sub>1</sub> = H, R <sub>2</sub> = $\alpha$ -OH, R <sub>3</sub> = $\beta$ -OH, R <sub>4</sub> = R <sub>5</sub> = H	[31], [42], [45], [46]
88	Physalin VIII	<b>86:</b> R <sub>1</sub> = H, R <sub>2</sub> = $\alpha$ -OH, R <sub>3</sub> = $\beta$ -OH, R <sub>4</sub> = H, R <sub>5</sub> = OH	[46]
89	5 $\beta$ -Hydroxy-6 $\alpha$ -chloro-5,6-dihydrophysalin B	<b>87:</b> R <sub>1</sub> = H, R <sub>2</sub> = $\alpha$ -OCH <sub>3</sub> , R <sub>3</sub> = $\beta$ -OH, R <sub>4</sub> = R <sub>5</sub> = H	[43]
90	5 $\alpha$ -Ethoxy-6 $\beta$ -hydroxy-5,6-dihydrophysalin B	<b>88:</b> R <sub>1</sub> = H, R <sub>2</sub> = $\alpha$ -OC(O)CHOHCH <sub>2</sub> COOCH <sub>3</sub> , R <sub>3</sub> = $\beta$ -OH, R <sub>4</sub> = R <sub>5</sub> = H	[43]
91	Physalin D <sub>1</sub>	<b>89:</b> R <sub>1</sub> = H, R <sub>2</sub> = $\beta$ -OH, R <sub>3</sub> = $\alpha$ -Cl, R <sub>4</sub> = R <sub>5</sub> = H	[46]
92	Physalin E	<b>90:</b> R <sub>1</sub> = H, R <sub>2</sub> = $\beta$ -OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> , R <sub>3</sub> = $\alpha$ -OH, R <sub>4</sub> = R <sub>5</sub> = H	[44], [45]
93	Physalin F	<b>91:</b> R <sub>1</sub> = H, R <sub>2</sub> = $\beta$ -OH, R <sub>3</sub> = $\alpha$ -OH, R <sub>4</sub> = R <sub>5</sub> = H	[31], [42], [44], [45], [46], [47], [48], [49],

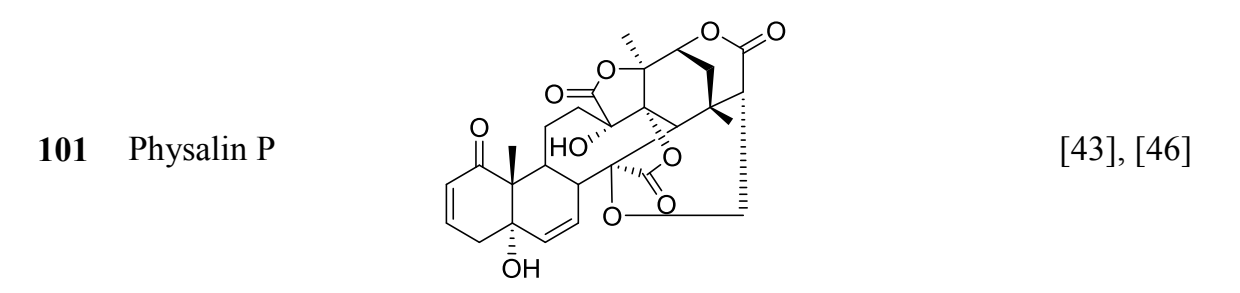
<b>94</b>	Physalin J	<b>92:</b> $R_1 = H, R_2 = \alpha\text{-OH}, R_3 = H, R_4 = OH, R_5 = H$	[31], [42], [45]
		<b>93:</b> $R_1 = H, R_2 + R_3 = 5\beta,6\beta\text{-peroxid}, R_3 = R_4 = R_5 = H$	
<b>95</b>	Physalin K	<b>94:</b> $R_1 = H, R_2 + R_3 = 5\alpha,6\alpha\text{-peroxid}, R_3 = R_4 = R_5 = H$	[44]
		<b>95:</b> $R_1 + R_2 = 4\alpha,5\alpha\text{-peroxid}, R_3 = R_4 = R_5 = H$	



<b>99</b>	Physalin U	<b>97:</b> $R_1 = H, R_2 = \alpha\text{-OH}, R_3 = \beta\text{-OH}$	[42]
		<b>98:</b> $R_1 = OCH_3, R_2 = R_3 = H$	
		<b>99:</b> $R_1 = OCH_3, R_2 + R_3 = 5\beta,6\beta\text{-peroxid}$	

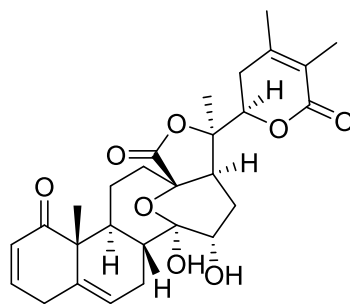


**Neophysalin**



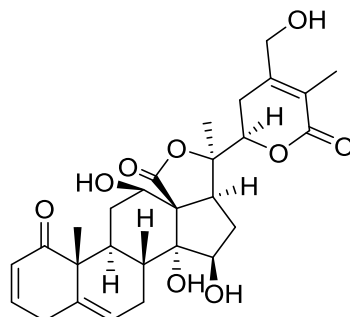
**Withaphysalin**

102 Withaphysalin Y



[26]

103 Withaphysalin Z



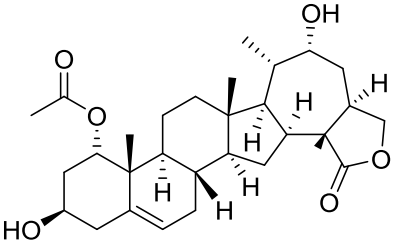
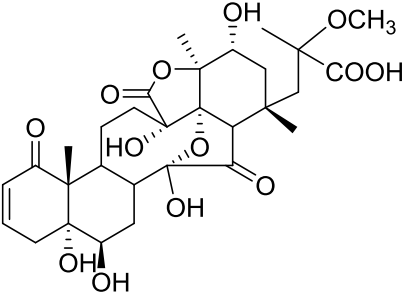
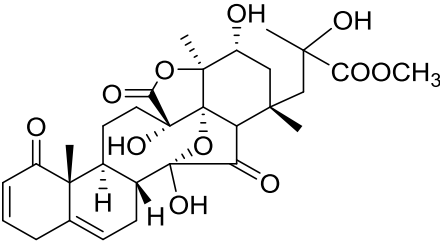
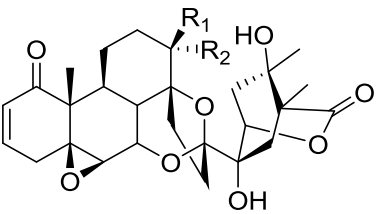
[26]

➤ Một số hợp chất withanolid khác

Một số withanolid khác phân lập từ Tầm bóp được liệt kê trong bảng dưới đây:

**Bảng 1.4. Các hợp chất withanolid khác phân lập từ Tầm bóp**

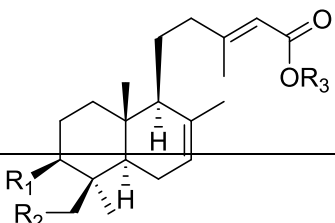
STT	Tên chất	Cấu trúc hóa học	TLTK
104	Aromaphysalin B		[50]
105	Aminophysalin A		[43]

106	Physanolid A		[31], [42]
107	Physalin X		[50]
108	Physalin XI		[51]
109	Physangulidin A		[52]
110	Physangulidin B		[52]
111	Physangulidin C		[52]
		<p>109: <math>R_1 = \text{CH}_3, R_2 = \text{H}</math></p> <p>110: <math>R_1 = \text{OH}, R_2 = \text{CH}_3</math></p> <p>111: <math>R_1 = \text{CH}_3, R_2 = \text{OH}</math></p>	

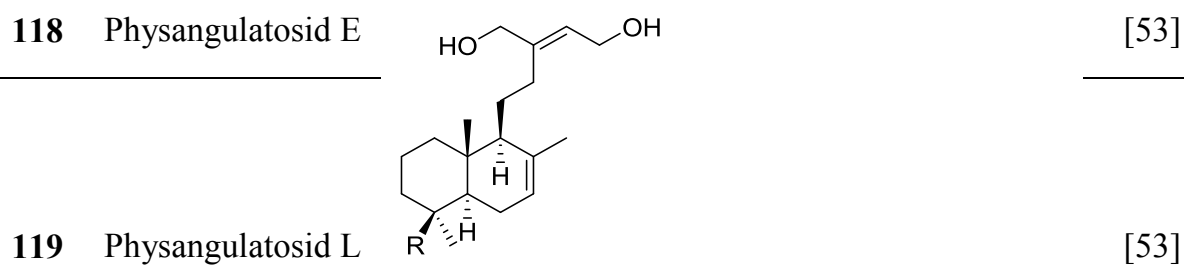
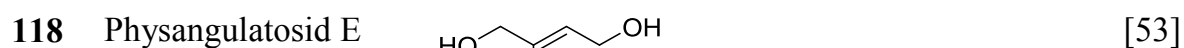
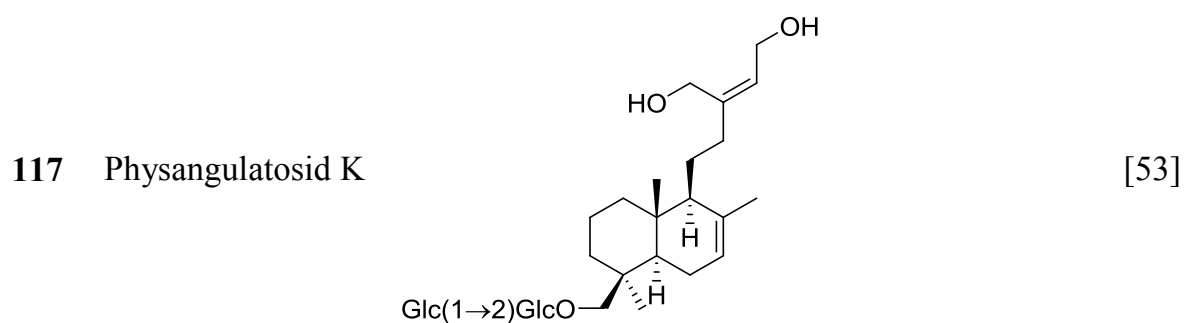
### 1.2.3.2. Terpenoid

Một số terpenoid phân lập từ Tầm bóp được trình bày trong bảng dưới đây:

**Bảng 1.5. Các hợp chất terpenoid phân lập từ Tầm bóp**

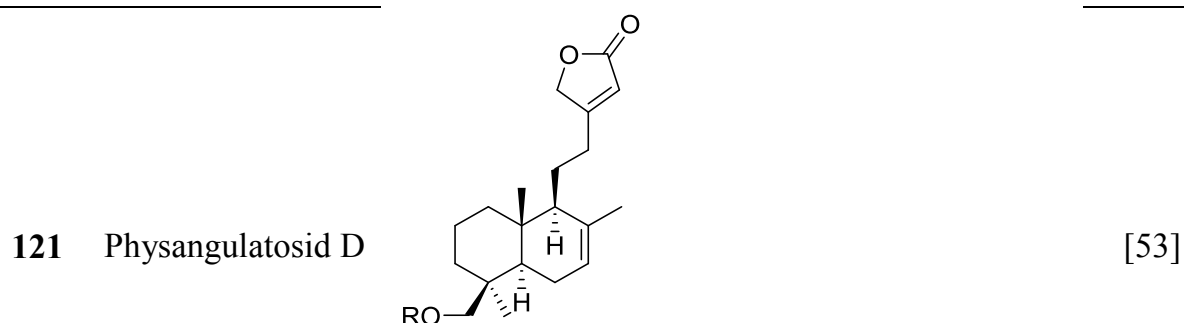
STT	Tên chất	Cấu trúc hóa học	TLTK
112	Physangulatosid G		[53]
113	Physangulatosid A		[53]

<b>114</b>	Physangulatosid F	<b>112:</b> R <sub>1</sub> = OGlc, R <sub>2</sub> = H, R <sub>3</sub> = Glc,	[53]
<b>115</b>	Physangulatosid H	<b>113:</b> R <sub>1</sub> = H, R <sub>2</sub> = OGlc, R <sub>3</sub> = Glc	[53]
		<b>114:</b> R <sub>1</sub> = H, R <sub>2</sub> = OGlc(2<-1)Glc, R <sub>3</sub> = Glc	
<b>116</b>	Physangulatosid J	<b>115:</b> R <sub>1</sub> = H, R <sub>2</sub> = OH, R <sub>3</sub> = Glc-[(2<-1)Glc]- (6<-1)Glc	[53]
		<b>116:</b> R <sub>1</sub> = H, R <sub>2</sub> = OGlc(2<-1)Glc, R <sub>3</sub> = Glc(2<- 1)Glc	



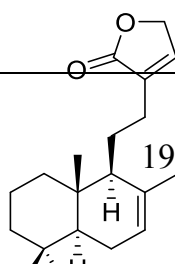
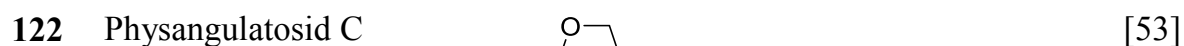
**118:** R = CH<sub>2</sub>OGlc(2<-1)Glc

**119:** R = COOGlc(2<-1)Glc

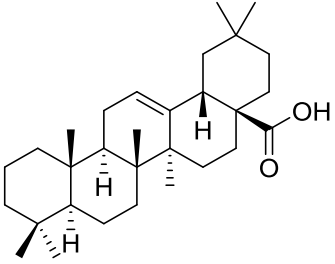
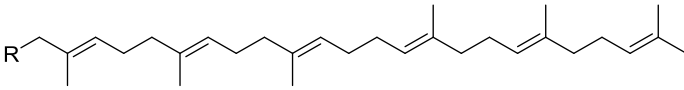
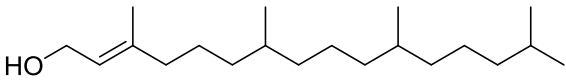


**120:** R = Glc(2<-1)Glc,

**121:** R = Glc-[(2<-1)Glc]-(6<-1)Glc





123	Physangulatosid I	122: R = Glc(2<-1)Glc, 123: R = Glc-[(2<-1)Glc]-(6<-1)Glc	[53]
124	Acid oleanoic		[54]
125	Squalen		[55]
126	Squalen-1-ol	125 R = H; 126 R = OH	[55]
127	Phytol		[55]

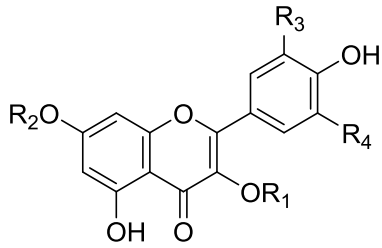
#### 1.2.4. Nhóm hợp chất phenolic

Một số hợp chất thuộc nhóm phenolic cũng được báo cáo trong Tầm bóp như flavonoid, các acid phenolic, lignan,... Hàm lượng của chúng trong các bộ phận khác nhau của cây là khác nhau [56].

##### 1.2.4.1. Flavonoid

Một số flavonoid cũng được báo cáo phân lập từ Tầm bóp (**Bảng 1.6**).

**Bảng 1.6. Các hợp chất flavonoid phân lập từ Tầm bóp**

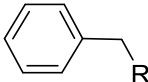
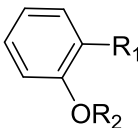
STT	Tên chất	Cấu trúc hóa học	TLTK
128	Kaempferol 7-O-rhamnosid		[57]
129	Kaempferol 3-O-rutinosid		[58]
130	Kaempferol 3-O-rutinosid-7-O-glucopyranosid	128: R <sub>1</sub> = H, R <sub>2</sub> = Rha, R <sub>3</sub> = R <sub>4</sub> = H 129: R <sub>1</sub> = Glc(6<-1)Rha, R <sub>2</sub> = R <sub>3</sub> = R <sub>4</sub> = H	[58]
131	Quercetin	130: R <sub>1</sub> = Glc(6<-1)Rha, R <sub>2</sub> = Glc, R <sub>3</sub> = R <sub>4</sub> =	[59]

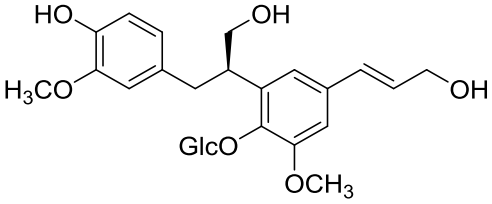
132	Quercetin 3- <i>O</i> -methyl ether	H 131: R <sub>1</sub> = R <sub>2</sub> = R <sub>3</sub> = H, R <sub>4</sub> = OH	[59]
133	Isoquercetrin	132: R <sub>1</sub> = CH <sub>3</sub> , R <sub>2</sub> = R <sub>3</sub> = H, R <sub>4</sub> = OH 133: R <sub>1</sub> = Glc, R <sub>2</sub> = R <sub>3</sub> = H, R <sub>4</sub> = OH	[47], [59]
134	Quercetin 3- <i>O</i> -rutinosid	134: R <sub>1</sub> = Glc(6<-1)Rha, R <sub>2</sub> = R <sub>3</sub> = H, R <sub>4</sub> = OH	[47], [59]
135	Quercetin 3- <i>O</i> -rhamnosyl-(1→6)-galactosid	135: R <sub>1</sub> = Gal(6<-1)Rha, R <sub>2</sub> = R <sub>3</sub> = H, R <sub>4</sub> = OH 136: R <sub>1</sub> = Glc(6<-1)Rha, R <sub>2</sub> = R <sub>3</sub> = H, R <sub>4</sub> =	[33]
136	Isorhamnetin 3- <i>O</i> -rutinosid	OCH <sub>3</sub> 137: R <sub>1</sub> = Glc(2<-1)Rha, R <sub>2</sub> = H, R <sub>3</sub> = R <sub>4</sub> =	[59]
137	Myricetin 3- <i>O</i> -neohesperidosid	OH	[60]

#### 1.2.4.2. Một số hợp chất phenolic khác

Một số hợp chất phenolic khác đã được phân lập từ Tầm bóp được trình bày trong bảng dưới đây:

**Bảng 1.7. Các hợp chất phenolic phân lập từ Tầm bóp**

STT	Tên chất	Cấu trúc hóa học	TLTK
138	Phenethanol-β-vicianosid		[61]
139	Benzylalcohol <i>O</i> -α-L-arabinopyranosyl(1→6)-β-D-glucopyranosid	138: R = CH <sub>2</sub> OGlc(6<1)Ara 139: R = OGlc(6<1)Ara	[59]
140	Physangulosid A		[62]
141	Gaultherin		[61]
142	Physangulosid B	140: R <sub>1</sub> = COOCH <sub>3</sub> , R <sub>2</sub> = Glc(2<-1)Glc	[62]
143	Guaiacyl-β-D-primeverosid		[61]

		<b>141:</b> R <sub>1</sub> = COOCH <sub>3</sub> , R <sub>2</sub> = Glc(6<-1)Ara	
<b>144</b>	Methyl salicylat 2- <i>O</i> -triglycosid	<b>142:</b> R <sub>1</sub> = OCH <sub>3</sub> , R <sub>2</sub> = Glc(2<-1)Glc <b>143:</b> R <sub>1</sub> = OCH <sub>3</sub> , R <sub>2</sub> = Glc(6<-1)Ara <b>144:</b> R <sub>1</sub> = OCH <sub>3</sub> , R <sub>2</sub> = Glc-[(2<-1)Glc]-(6<-1)Xyl	[59]
<b>145</b>	Icarisid E <sub>5</sub>		[59]

### 1.3. TÁC DỤNG SINH HỌC

#### 1.3.1. Hoạt tính kháng viêm

Cao nước từ rễ Tâm bóp liều 1 mg/kg cho thấy hoạt tính kháng viêm đáng kể, làm giảm thể tích dịch tiết, tổng số tế bào viêm, hoạt tính adenosin deaminase (ADA), nitric oxid (NO) và prostaglandin E2 (PGE2) tương ứng là 50%, 41%, 20%, 60% và 41%. Với liều 5 mg/kg, hoạt tính kháng viêm mạnh hơn, cụ thể, các chỉ số viêm trên giảm lần lượt là 84%, 80%, 43%, 70% và 75%. Ngoài ra, nồng độ yếu tố tăng trưởng biến đổi beta (TGF-β) đã tăng lên 9700 pg/mL khi dùng liều 5 mg/kg, so với 160 pg/mL trong nhóm được điều trị bằng giả dược và 137 pg/mL trong nhóm được điều trị bằng indomethacin. Kết quả chỉ ra rằng, cao nước rễ Tâm bóp thể hiện hoạt tính chống viêm và điều hòa miễn dịch mạnh thông qua con đường cyclooxygenase, NO, tăng sinh tế bào lympho và sản xuất TGF-β [63].

Hoạt tính kháng viêm của các cao chiết từ lá cây Tâm bóp (MeOH, EtOH, nước) đã được đánh giá ở các nồng độ khác nhau (62,5; 125; 250; 500; 1000 và 2000 µg/mL) trên tế bào hồng cầu máu người theo phương pháp ổn định màng tế bào máu. Kết quả cho thấy, các cao chiết này thể hiện tác dụng ức chế viêm phụ thuộc vào nồng độ; phần trăm ức chế viêm cao nhất tại 2000 µg/mL. Tại nồng độ 2000 µg/mL của các cao MeOH, EtOH và nước có tỷ lệ ức chế viêm lần lượt là 69,9%; 85,9%; 74,2% và chúng tương đương diclofenac là 89,9%. Tác dụng này có thể là do sự có mặt của các steroid, alkaloid và flavonoid trong các phân đoạn khác nhau. Trong các cao chiết này, cao EtOH thể hiện tác dụng mạnh nhất, sau đó đến cao nước và cuối cùng là cao MeOH. Các cao chiết này cũng được đánh giá hoạt tính kháng viêm khớp theo phương pháp biến tính protein. Các kết quả cũng tương tự như phương pháp ổn định màng tế bào,

trong đó phần trăm ức chế tại 2000  $\mu\text{g/mL}$  của các cao MeOH, EtOH, nước và diclofenac lần lượt là 68,9%, 82,9%, 73,7% và 89,2% [64].

Cao MeOH của lá Tầm bóp cũng thể hiện hoạt tính kháng viêm trên mô hình gây phù bàn chân chuột bằng carrageenan với phần trăm ức chế là 62,71% ở liều 400 mg/kg và tác dụng này phụ thuộc vào liều [65].

Nghiên cứu khả năng chống viêm của 10 loại dược liệu thường được sử dụng trong y học dân gian Colombia qua việc đánh giá ảnh hưởng đối với việc sản xuất NO trong đại thực bào RAW 264.7 được kích thích bằng lipopolysaccharid (LPS). Dược liệu có tác dụng mạnh nhất sẽ được đánh giá tiếp *in vivo* trên mô hình phù tai chuột bằng 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate (TPA). Cao toàn phần EtOH 96% của Tầm bóp cho tác dụng mạnh nhất. Tiếp tục chiết cao phân đoạn Tầm bóp, sau đó tiến hành đánh giá tác dụng của các cao này. Kết quả cho thấy, cao phân đoạn dichloromethan thể hiện hoạt tính mạnh nhất trên mô hình *in vitro*, ức chế sản xuất NO, PGE<sub>2</sub>, interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-6, yếu tố hoại tử khối u alpha (TNF- $\alpha$ ) và protein hóa trị đơn bào (MCP-1). *In vivo*, phân đoạn dichloromethan ức chế đáng kể phù tai chuột và hoạt động của enzym myeloperoxidase (MPO) giảm rõ rệt sự xâm nhập của bạch cầu vào mô [66].

Hoạt tính kháng viêm của physalin E, một seco-steroid được phân lập từ cây Tầm bóp đã được đánh giá trên các mô hình viêm da cấp và mạn tính gây ra bởi TPA và oxazolone trong tai chuột. Những thay đổi về phù/độ dày của tai, sản xuất các cytokin tiền viêm (TNF- $\alpha$  và interferon (IFN)- $\gamma$ ), hoạt tính của enzym MPO và các kết quả mô học và hóa học miễn dịch đã được phân tích như là các chỉ số của viêm da. Physalin E (0,125; 0,25 và 0,5 mg/tai) có khả năng ức chế viêm da do TPA và oxazolone gây ra, dẫn đến giảm đáng kể tình trạng phù/độ dày của tai, các cytokin gây viêm và hoạt động MPO [67].

Tác dụng ức chế sản sinh NO do LPS gây ra trong các đại thực bào của các hợp chất phân lập từ cây Tầm bóp cũng được thử nghiệm. Kết quả chỉ ra rằng, các hợp chất physangulatin C, D, E, I, J và K, physagulid I và J, physagulin A, B, H, I và N phân lập từ thân và lá của cây Tầm bóp ức chế sản xuất NO với giá trị IC<sub>50</sub> là 1,36 - 11,59  $\mu\text{M}$  [26]; physangulatosid F-J có IC<sub>50</sub> nằm trong khoảng  $15,9 \pm 1,0$  -  $60,7 \pm 3,8$   $\mu\text{M}$  [53], physalin X và aromaphysalin B là 68,50 và 29,69  $\mu\text{M}$  [50], aromaphysalin A là 51,64  $\mu\text{M}$  [41] và withaminimin là  $69,6 \pm 4,5$   $\mu\text{M}$  [68]. Hợp chất physalin B, F, H và isophysalin B cũng thể hiện hoạt tính ức chế đáng kể với giá trị IC<sub>50</sub> 0,32 - 4,03  $\mu\text{M}$ , trong khi các hợp chất physalin V, VII, physalin I và physalin D<sub>1</sub> cho thấy tác dụng ức chế vừa phải với giá trị IC<sub>50</sub> là 12,83 - 34,19  $\mu\text{M}$ . So sánh tác dụng ức chế của các physalin cho thấy, liên kết đôi  $\Delta^{5,6}$  và proton ở C-25 có vai trò quan trọng. Hợp chất

isophysalin B cho thấy tác dụng ức chế đáng kể, trong khi physalin VII ức chế vừa phải. Điều này có thể giải thích là do proton H-25 làm tăng hoạt động ức chế ở hợp chất isophysalin B. Tương tự như hợp chất physalin B và D, cho thấy tác dụng ức chế yếu vì 5-en đã bị hydroxyl hóa. Tuy nhiên, hợp chất physalin D<sub>1</sub> thể hiện tác dụng ức chế vừa phải, nguyên nhân có thể do ảnh hưởng của cấu hình OH-5 và OH-6 đến hoạt tính ức chế [46].

### 1.3.2. Hoạt tính giảm đau

Cao nước từ rễ của Tầm bóp với liều 10 - 30 mg/kg, ức chế đáng kể ( $83 \pm 8$  và  $66 \pm 5\%$ ) các cơn co thắt bụng do acid acetic gây ra với liều ức chế 50% (ID<sub>50</sub>) là 18,5 (17,4 - 19,8) và 21,5 (18,9 - 24,4) mg/kg. Với liều 10 - 60 mg/kg, cao nước rễ Tầm bóp cũng ức chế đáng kể (100%) giai đoạn cuối của cơn đau do formalin gây ra với ID<sub>50</sub> là 20,8 (18,4 - 23,4) mg/kg. Khi cho chuột dùng cao nước từ rễ Tầm bóp với liều 60 mg/kg hoặc morphin 10 mg/kg làm tăng đáng kể thời gian phản ứng trên mô hình mâm nóng [69].

Cao MeOH từ lá của cây Tầm bóp (200, 300 và 400 mg/kg trọng lượng cơ thể) đã được đánh giá hoạt động giảm đau trên mô hình gây đau quận bằng acid acetic ở chuột nhắt trắng chủng Swiss. Tác dụng giảm đau của cao chiết được so sánh với đối chứng dương ibuprofen (100 mg/kg). Kết quả cho thấy, cao chiết thể hiện tác dụng giảm đau đáng kể và phụ thuộc vào liều, với sự ức chế 72,7% ở liều 400 mg/kg so với ibuprofen (100 mg/kg) là 21,2% ( $p < 0,05$ ) [65].

### 1.3.3. Hoạt tính gây độc tế bào ung thư

Tầm bóp đã được chứng minh như một tác nhân hóa học ngăn ngừa ung thư *in vitro* thông qua việc nghiên cứu vai trò của Tầm bóp trong việc điều chỉnh sự tăng sinh, chu kỳ tế bào và quá trình chết theo chương trình (apoptosis) trên các dòng tế bào ung thư vú ở người (MAD-MB 231 và MCF-7). Xử lý với Tầm bóp ở các nồng độ khác nhau trong dòng tế bào MDA-MB 231 và tiến hành kiểm tra nồng độ mRNA đối với cyclin A và cyclin B1 cũng như nồng độ protein của cyclin A và cyclin B1, Cdc2 (kinase phụ thuộc cyclin), p21 (waf1/cip1) và P27(Kip1) (chất ức chế kinase phụ thuộc cyclin), Cdc25C, Chk2 và Wee1 kinase (yếu tố tương đối kinase phụ thuộc cyclin) trong pha G2/M của chu kỳ tế bào. Kết quả cho thấy rằng, Tầm bóp bắt giữ các tế bào MDA-MB 231 ở pha G2/M bằng cách (i) ức chế sự tổng hợp hoặc tính ổn định của mRNA và mức protein của cyclin A và cyclin B1, (ii) tăng p21(waf1/cip1) và P27(kip1), (iii) làm tăng Chk2, do đó gây ra sự gia tăng quá trình phosphoryl hóa/bất hoạt Cdc25C và làm giảm mức độ Cdc2 và tăng mức độ Wee1. Điều đó cho thấy ảnh hưởng của Tầm bóp đối với mức độ Cdc25C bị phosphoryl hóa/bất hoạt được trung gian bởi sự hoạt hóa Chk2 thông qua con đường ức chế kinase phụ thuộc cyclin

p21(waf1/cip1) và P27(kip1) để bắt giữ các tế bào tại pha G2 /M trong các tế bào ung thư biểu mô ung thư vú [70].

Cao chiết Tầm bóp (5 - 15  $\mu\text{g/mL}$ ) ức chế rõ rệt sự di căn và xâm lấn của các tế bào HSC-3 di căn; ức chế hoạt động của matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), MMP-9 và chất hoạt hóa plasminogen urokinase (u-PA); làm giảm đáng kể biểu hiện protein MMP-2 và u-PA trong các tế bào ung thư biểu mô vảy ở miệng người (HSC-3); làm tăng đáng kể biểu hiện của các chất ức chế nội sinh, bao gồm các chất ức chế mô của MMP (TIMP-1 và -2) và các chất ức chế hoạt hóa plasminogen (PAI-1 và -2). Các nghiên cứu sâu hơn cho thấy, ở nồng độ không gây độc tế bào, cao chiết Tầm bóp (5 - 15  $\mu\text{g/mL}$ ) ức chế sự tăng sinh tế bào nội mô mạch máu (VEGF), ức chế sự xâm lấn của tế bào nội mô tĩnh mạch rốn người *in vitro*. Cao chiết cây Tầm bóp cũng ngăn chặn hoạt động của MMP-9 trong tế bào nội mô tĩnh mạch rốn người [71].

Cao chiết phân đoạn *n*-hexan và chloroform quả cây Tầm bóp được thử nghiệm ảnh hưởng trên sự tăng sinh tế bào trên một số dòng tế bào như MK2 (tế bào biểu mô khi), SP20 (u tủy chuột), Neuro 2A (u nguyên bào thần kinh chuột), P3652 (plasmocytoma chuột), Erlich (sarcoma gây ra bởi methyl clolanthren), J774 (dòng tế bào đơn bào ở chuột) và BW (lymphoma ở chuột). Kết quả cho thấy, phân đoạn *n*-hexan có tác dụng ức chế đáng kể trên dòng tế bào BW (97%), Erlich (93%) và SP20 (92%). Giá trị ức chế trên dòng tế bào P3652 của phân đoạn chloroform cũng đạt 92% [72].

Nghiên cứu tác dụng chống ung thư của cao EtOH Tầm bóp cho thấy có độc tính tế bào *in vitro* trên năm dòng tế bào ung thư ở người: HA22T (ung thư gan), HeLa (cổ tử cung), KB (vòm họng), Colo-205 (đại tràng) và Calu-1 (phổi) và ba dòng tế bào ung thư động vật: H1477 (khối u ác tính), Hep-2 (thanh quản) và 8401 (u thần kinh đệm). Từ cao chiết trên đã phân lập được physalin F và physalin D. Đánh giá tác dụng gây độc trên 8 dòng tế bào ung thư này cho thấy, physalin F có tác dụng trên tế bào HA22T mạnh nhất sau đó đến dòng HeLa. Ngoài ra, physalin F cũng gây độc trên dòng tế bào P388 gây bệnh bạch hầu ở chuột trong khi đó physalin D không thể hiện tác dụng *in vitro* và *in vivo* [49].

Myricetin 3-*O*-neohesperidosid được phân lập từ cao chiết MeOH từ lá cây Tầm bóp có tác dụng gây độc tế bào. Hợp chất này cho thấy khả năng gây độc tế bào *in vitro* mạnh chống lại dòng tế bào P388 gây bệnh bạch cầu ở chuột, tế bào ung thư biểu bì vòm họng KB-16 và ung thư biểu mô phổi A-549 với giá trị  $\text{ED}_{50}$  tương ứng là 0,048, 0,50 và 0,55  $\text{mg/mL}$  [60].

Physalin B, D và F cho thấy độc tính tế bào mạnh đối với nhiều dòng tế bào ung thư, bao gồm KB, A431, HCT-8, PC-3 và ZR751 với giá trị  $\text{EC}_{50}$  nhỏ hơn 4  $\mu\text{g/mL}$

[42]. Physalin B và D cũng cho thấy tác dụng gây độc tế bào ung thư trên một số dòng tế bào ung thư (CEM, HL-60, K562, HCT-8, MCF-7, MDA-MB-435, MDA-MB-231, PC3 và B-16) với giá trị  $IC_{50}$  trong khoảng 0,58 đến 15,18  $\mu\text{g/mL}$  đối với physalin B và 0,28 đến 2,43  $\mu\text{g/mL}$  đối với physalin D. Hoạt tính chống ung thư của cả hai hợp chất này trên thí nghiệm *in vivo* đã được đánh giá trên chuột mang tế bào ung thư sarcoma 180. Kiểm tra bệnh học của thận và gan cho thấy, cả hai cơ quan đều được cải thiện tình trạng bệnh học khi được điều trị bằng các hợp chất physalin B và D [73].

Các hợp chất withagulatin B-D, G, H, physalin B, D, F, G, I, J, U, W và physanolid A đã được đánh giá khả năng gây độc các dòng tế bào ung thư người như DU-45, 1A9, HCT116, LNCAP, KB, KB-VIN, A431, A549, HCT-8, PC-3 và ZR751. Kết quả cho thấy, hợp chất withagulatin B chỉ ra khả năng gây độc mạnh nhất trên các dòng tế bào ung thư DU-45, 1A9, HCT116 và LNCAP với giá trị  $EC_{50}$  nằm trong khoảng 0,2 - 1,3  $\mu\text{g/mL}$ . Các hợp chất physalin B, D và F cũng chỉ ra khả năng gây độc mạnh các dòng tế bào ung thư KB, A431, HCT-8, PC-3 và ZR751 với giá trị  $EC_{50}$  ít hơn 3,0  $\mu\text{g/mL}$ . Tuy nhiên, khả năng gây độc các dòng tế bào ung thư LNCAP và A549 của physalin B ( $EC_{50}$  5,3 và 5,9  $\mu\text{g/mL}$ ) và dòng tế bào KB-VIN của physalin D ( $EC_{50}$  7,0  $\mu\text{g/mL}$ ) giảm. Nghiên cứu liên quan cấu trúc - tác dụng chỉ ra rằng, các withanolid và physalin với cấu trúc 4 $\beta$ -hydroxy-2-en-1-on và 5 $\beta$ ,6 $\beta$ -epoxy có khả năng gây độc tế bào [31].

Độc tính tế bào của các hợp chất physagulin B, D, J, K, L-O, withagulatin A, withaminimin và pubesenolid đã được đánh giá tác dụng gây độc tế bào ung thư đại trực tràng người (HCT-116) và các dòng tế bào ung thư phổi không phải tế bào nhỏ của người (NCI-H460), sử dụng topotecan làm chứng dương. Kết quả cho thấy, hợp chất withangulatin A và physagulin B cho thấy độc tế bào mạnh với  $IC_{50}$  lần lượt là  $1,64 \pm 0,06 \mu\text{g/mL}$  (HCT-116),  $1,40 \pm 0,04 \mu\text{g/mL}$  (NCI-H460) đối với withagulatin A và  $2,11 \pm 0,1 \mu\text{g/mL}$  (HCT-116),  $0,43 \pm 0,02 \mu\text{g/mL}$  (NCI-H460) đối với physalin B. Hợp chất physagulin L và M có hoạt tính trung bình. Nghiên cứu liên quan cấu trúc - tác dụng cho thấy, vòng  $\beta$ -epoxid ở C-5/C-6 trong cấu trúc withanolid đóng vai trò quan trọng đối với hoạt động gây độc tế bào. Ngoài ra, việc thay thế nhóm OH ở vị trí C-5 bằng nguyên tử Cl làm tăng cường độc tính tế bào [38].

Withangulatin A và I phân lập từ toàn cây Tầm bóp đã được thử nghiệm về hoạt tính gây độc tế bào trên 2 dòng tế bào ung thư biểu mô đại trực tràng Colo 205 và ung thư biểu mô dạ dày AGS *in vitro*. Kết quả cho thấy, cả 2 hợp chất này đều thể hiện hoạt tính ức chế với giá trị  $IC_{50}$  lần lượt là 16,6; 1,8 và 53,6; 65,4  $\mu\text{M}$  [37].

Physalin B thể hiện độc tính tế bào A375 và A2058 (giá trị  $IC_{50}$  thấp hơn 4,6  $\mu\text{g/mL}$ ). Ngoài ra, physalin B gây ra biểu hiện của protein proapoptotic NOXA trong

vòng 2 h và sau đó kích hoạt biểu hiện của Bax và caspase-3 trong các tế bào A375 muộn hơn. Những kết quả này cho thấy physalin B có thể gây ra apoptosis của các tế bào ung thư khối u ác tính thông qua các con đường trung gian NOXA, caspase-3 và ty thể, nhưng không phải các nguyên bào sợi da người hay các nguyên bào cơ [74].

Physangulidin A đã được tìm thấy có hoạt tính ức chế tăng sinh tế bào ung thư tuyến tiền liệt DU145 ( $GI_{50}$  khoảng 3,0  $\mu\text{M}$ ), tế bào biểu mô tuyến tiền liệt RWPE-1 ( $GI_{50} = 2,4 \mu\text{M}$ ). Giá trị  $GI_{50}$  của physangulidin B và physangulidin C tương đối giống nhau và thấp hơn so với physangulidin A.  $GI_{50}$  của physangulidin B lần lượt là 6,0 và 6,8  $\mu\text{M}$  đối với RWPE-1 và DU145, trong khi ở physangulidin C lần lượt là 6,6 và 6,0  $\mu\text{M}$  đối với RWPE-1 và DU145. Ngoài ra, physangulidin A đã được thử nghiệm trên một số dòng tế bào ung thư khác (3T3, H460, HuTu 80, DU145, MCF-7, M-14, HT-29 và K562), sử dụng 5-fluorouracil làm đối chứng dương. Kết quả cho thấy, so với 5-fluorouracil, physangulidin A có hoạt tính ức chế tăng sinh tế bào yếu hơn đối với các tế bào 3T3 và hoạt tính mạnh hơn đối với các tế bào HT-29 và K562 [52].

Physangulidin C làm giảm đáng kể tỷ lệ sống sót của hai dòng tế bào ung thư tuyến tiền liệt không phụ thuộc hormon. Nghiên cứu độc tế bào ung thư tuyến tiền liệt DU145 ở người chỉ ra rằng, physangulidin C gây ra sự bắt giữ chu kỳ tế bào trong pha  $G_2/M$  và gây chết tế bào theo chương trình [75].

Các hợp chất physangulid M-O đã được đánh giá tác dụng gây độc tế bào ung thư người (HepG2 và MDA-MB-231), doxorubicin được sử dụng làm đối chứng dương, với  $IC_{50}$  lần lượt là 3,72 và 3,70  $\mu\text{M}$  [30].

Các hợp chất physangulid B và physangulid acetonid đã được đánh giá về hoạt tính gây độc tế bào trên sáu dòng tế bào ung thư ở người. Ở nồng độ 20  $\mu\text{M}$ , physangulid B gây ức chế 100% sự tăng trưởng tế bào, trong khi hợp chất physangulid acetonid chỉ đạt 30%. Giá trị  $IC_{50}$  của physangulid B được xác định theo các dòng tế bào khối u PC-3 và SKLU-1 lần lượt là  $0,43 \pm 0,03 \mu\text{M}$ ,  $0,35 \pm 0,01 \mu\text{M}$ ; sử dụng camptothecin làm đối chứng dương ( $IC_{50}$ :  $0,12 \pm 0,01 \mu\text{M}$  đối với PC-3 và  $0,15 \pm 0,009 \mu\text{M}$  đối với SKLU-1) [28].

Physangulid A-J, physangulin B, J, K, M, Q, withangulatin A, withaminimin, (20*S*,22*R*)-15 $\alpha$ -acetoxy-5 $\alpha$ -chloro-6 $\beta$ ,14 $\beta$ -dihydroxy-1-oxowitha-2,24-dienolid đã được đánh giá độc tính tế bào đối với ba dòng tế bào ung thư ở người, bao gồm: ung thư gan (HepG2), ung thư biểu mô tuyến vú (MCF-7) và tế bào tạo xương ở người (MG-63). Hợp chất physangulid I, J, withangulatin A, (20*S*,22*R*)-15 $\alpha$ -acetoxy-5 $\alpha$ -chloro-6 $\beta$ ,14 $\beta$ -dihydroxy-1-oxowitha-2,24-dienolid và physangulin B thể hiện độc tính tế bào trên tất cả các dòng tế bào với  $IC_{50}$  là 0,06 - 6,73  $\mu\text{M}$ . Một trong những hợp chất mạnh là physangulid I đã bắt giữ các tế bào trong pha  $G_2/M$  và hoạt hóa con đường



apoptosis phụ thuộc caspase. Hơn nữa, apoptosis gây ra bởi physagulid I trong các tế bào MG-63 có liên quan đến việc tạo ra các gốc oxy hóa hoạt động (ROS) và kích hoạt ERK và JNK [25].

Các hợp chất phân lập từ thân và lá của cây Tầm bóp đã được thử nghiệm về tác dụng ức chế tăng sinh đối với các tế bào ung thư tuyến tiền liệt của người (C4-2B và 22Rv1), tế bào ung thư biểu mô thận ở người (786-O, A-498 và ACHN) và tế bào u ác tính ở người (A375-S2). Kết quả chỉ ra rằng, hợp chất physangulatin I, physagulid I và J, physagulin A, B, và I cho thấy tác dụng ức chế tăng sinh đối với tất cả các tế bào ung thư đã được thử nghiệm với giá trị  $IC_{50}$  là 0,18 - 7,43  $\mu\text{M}$  [26].

Các hợp chất phân lập từ cây Tầm bóp được thử nghiệm về hoạt tính ức chế sự tăng sinh trên các tế bào ung thư tuyến tiền liệt người (C4-2B và 22Rv1), tế bào ung thư thận người (786-O, A-498 và ACHN) và tế bào ung thư khối u ác tính ở người (A375-S2). Các hợp chất physalin B và F cho thấy tác dụng ức chế đáng kể đối với tất cả các tế bào ung thư được thử nghiệm với giá trị  $IC_{50}$  tương ứng là 0,24 và 3,17  $\mu\text{M}$  [46].

Physagulid R-V, withangulatin A, physagulin A, C, P, physapubenolid và (20*S*,22*R*)-5 $\beta$ (6)-epoxy-4 $\beta$ ,14 $\beta$ ,15 $\alpha$ -trihydroxy-1-oxowith-2,24-dienolid được đánh giá về hoạt tính gây độc trên các dòng tế bào ung thư biểu mô đại tràng ở người (HCT-116) và tế bào ung thư vú ở người (MDA-MB-231). Kết quả cho thấy, tất cả các hợp chất này đều có hoạt tính gây độc tế bào trên cả 2 dòng tế bào ung thư được thử nghiệm, trong số đó hợp chất withangulatin A, physapubenolid và physagulin C thể hiện tác dụng mạnh hơn với  $IC_{50}$  nằm trong khoảng 1,57 - 6,29  $\mu\text{M}$  [27].

Sáu withanolid từ phần trên mặt đất của cây Tầm bóp, bao gồm: Physagulid P, withangulatin A, withaminimin, physagulin A, F và I đã được đánh giá về độc tính tế bào chống lại dòng tế bào ung thư người (HepG-2 và MDA-MB-231). Kết quả cho thấy, physagulid P thể hiện khả năng gây độc tế bào mạnh nhất với giá trị  $IC_{50}$  tương ứng là 4,22; 15,74  $\mu\text{M}$ . Trong khi đó, doxorubicin được sử dụng làm đối chứng dương với các giá trị  $IC_{50}$  lần lượt là 3,72 và 3,70  $\mu\text{M}$ . Hợp chất withangulatin A, physagulin A, physagulin I cũng chỉ ra hoạt tính gây độc đáng kể [32]. Hợp chất physaguline J phân lập từ Tầm bóp cũng cho thấy hoạt tính gây độc tế bào đáng kể đối với các tế bào A549 với  $IC_{50}$  là 8,27  $\mu\text{M}$ , trong khi đó, hợp chất physagulin M thể hiện hoạt tính mạnh nhất chống lại các dòng tế bào PANC-1 với  $IC_{50}$  là 3,18  $\mu\text{M}$  [76].

#### **1.3.4. Hoạt tính điều hòa miễn dịch**

Tác dụng điều hòa miễn dịch của các phân đoạn từ dịch chiết ban đầu EtOH cây Tầm bóp (PA-VII, PA-VII-A, PA-VII-B và PA-VII-C) đã được nghiên cứu. Kết quả

cho thấy PA-VII và PA-VII-C tăng cường mạnh mẽ phản ứng tạo phôi, PA-VII-B có hoạt động vừa phải và PA-VII-A chỉ có tác dụng nhẹ đối với sự tăng sinh tế bào. Tác dụng hiệp đồng đã được quan sát khi liều phytohemagglutinin (PHA) hoặc LPS dưới mức tối ưu được thêm vào môi trường nuôi cấy. Hơn nữa, PA-VII và PA-VII-C thể hiện hoạt động kích thích trên các tế bào B và ít ảnh hưởng đến các tế bào T. Các phản ứng kháng thể cũng được tăng cường bởi PA-VII, PA-VII-B và PA-VII-C. Sự tăng cường của phản ứng kháng thể được quan sát cả ở chuột BALB/c và C3H/HeJ [77].

Cao chiết CO<sub>2</sub> siêu tới hạn từ cây Tầm bóp (PACO<sub>2</sub>) làm giảm đáng kể các hoạt động của enzym myeloperoxidase (MPO) và alkaline phosphatase (ALP), giảm stress oxy hóa và thâm nhập bạch cầu trung tính. Những tác dụng này đi kèm với việc giảm đáng kể nồng độ của IFN- $\gamma$  và IL-6 ở đại tràng và giảm biểu hiện của các gen heparanase, Hsp70, Mapk3, Mapk9, Muc1 và Muc2. Ngoài ra, tác dụng bảo vệ cũng được chứng minh bằng cách giảm thâm nhiễm bạch cầu trung tính, phục hồi cấu trúc và thay thế tế bào chất nhầy bởi các phân tích mô bệnh học [78].

Năm 2003, Soares M. B. P. và cộng sự đã đánh giá hoạt tính điều hòa miễn dịch của các physalin (seco-steroid) phân lập từ Tầm bóp. Kết quả cho thấy, physalin B, F và G làm giảm sự sản sinh NO trong đại thực bào gây kích thích bởi LPS và IFN- $\gamma$ . Khi có mặt physalin B, đại thực bào gây kích thích bởi LPS độc lập hoặc kết hợp với IFN- $\gamma$ , làm giảm nồng độ của TNF- $\alpha$ , IL-6 và IL-12. Tác dụng của physalin B không giống như dexamethason, không bị đảo ngược bởi RU486 (mifepriston), một chất kháng glucocorticoid. Chuột dùng physalin B có nồng độ TNF- $\alpha$  trong huyết thanh thấp hơn so với nhóm chứng sau khi kích thích bằng LPS. Những kết quả này chứng minh rằng, seco-steroid từ cây Tầm bóp là những chất điều hòa miễn dịch mạnh và hoạt động thông qua cơ chế khác với cơ chế của dexamethason [79].

Năm 2006, nhóm nghiên cứu của Soares M. B. P. tiếp tục nghiên cứu các hoạt động điều hòa miễn dịch của các physalin B, F, G trên sự tăng sinh tế bào lympho, sản xuất cytokin và trong cấy ghép. Việc bổ sung các physalin B, F hoặc G vào môi trường nuôi cấy tế bào lách được kích hoạt bởi concanavalin A (ConA) gây ra sự ức chế tăng sinh phụ thuộc nồng độ. Physalin B cũng ức chế sản xuất IL-2 trong các tế bào lách khi được kích hoạt bởi ConA. Việc thêm 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  physalin B vào phản ứng hỗn hợp của bạch cầu lympho (MLR) gây ra sự ức chế tăng sinh 100%. Ngoài ra, khi cho chuột dùng physalin B, F và G đã ngăn chặn sự đào thải của ghép tim dị hợp [80].

Withangulatin A ngăn chặn đáng kể sự tăng sinh quá mức của các tế bào lympho T do ConA gây ra một cách phụ thuộc vào nồng độ và thời gian. Hơn nữa, withangulatin A gây ra biểu hiện của heme oxyase 1 (HO-1) tế bào lympho ở chuột thông qua con đường ERK/MAPK và ức chế ConA - gây chuyển vị hạt nhân (NF- $\kappa\text{B}$ )

p65) trực tiếp hoặc gián tiếp qua trung gian HO-1. Ngoài ra, withangulatin A ảnh hưởng đến sự biểu hiện của COX-2 và PPAR- $\gamma$  trong các tế bào lympho T do ConA gây ra [81].

Physalin F phân lập từ cây Tầm bóp gây apoptosis các tế bào đơn nhân máu ngoại vi, làm giảm sự tăng sinh tự phát và sản xuất cytokin do nhiễm virus T-lymphotropic ở người loại 1 (HTLV-1) [82].

Physalin E ức chế đáng kể sự biểu hiện và bài tiết của TNF- $\alpha$  và IL-6 do LPS gây ra một cách phụ thuộc vào liều. Không giống như dexamethason, những tác động này không bị ức chế bởi RU486. Trong khi đó, physalin E làm giảm sự phân hủy protein I-kappa B trong tế bào chất và điều hòa ức chế yếu tố NF- $\kappa$ B protein p65 trong nhân, dẫn đến ức chế chuyển vị hạt nhân NF- $\kappa$ B [83].

### 1.3.5. Hoạt tính chống đái tháo đường

Hoạt tính chống đái tháo đường của cao MeOH và các phân đoạn từ cây Tầm bóp đã được đánh giá trên khả năng dung nạp glucose đường uống và ở chuột bị đái tháo đường do alloxan gây ra; đồng thời so sánh với tác dụng của glibenclamid. Theo dõi đường huyết trong 7 ngày. Kết quả cho thấy, cao chiết có tác dụng hạ đường huyết đáng kể trong liệu pháp dung nạp glucose và ở chuột bị đái tháo đường do alloxan. Phân đoạn EtOAc có hoạt tính mạnh hơn cao toàn phần MeOH, làm giảm đáng kể mức đường huyết vào ngày thứ 7 (giảm 58,6%;  $p < 0,05$ ). Tác dụng hạ đường huyết rõ rệt hơn ở chuột bị tăng đường huyết so với chuột có đường huyết bình thường [84]. Ngoài ra, cao MeOH từ quả cây Tầm bóp ở nồng độ 100  $\mu$ g/mL ức chế cả 2 enzym  $\alpha$ -amylase và  $\alpha$ -glucosidase *in vitro* với phần trăm ức chế lần lượt là 97,23% và 96,53% [85]. Một nghiên cứu khác cũng chỉ ra rằng, cao chiết Tầm bóp ở nồng độ 200  $\mu$ g/mL có khả năng ức chế hoạt tính enzym  $\alpha$ -amylase lên đến  $56,6 \pm 4,7\%$ . Hơn nữa, Tầm bóp còn có khả năng hấp phụ và hấp thu glucose lần lượt lên đến  $2,2 \pm 0,18$  mM glucose/g dịch chiết và  $156 \pm 10,1\%$  [86], [87].

Ngoài các cao MeOH, một số withanolid từ Tầm bóp cũng được đánh giá tác dụng trên đái tháo đường với các mô hình thử nghiệm khác nhau, cụ thể:

Withangulatin A làm giảm đáng kể ( $p < 0,05$ ) nồng độ đường trong máu ở chuột mắc bệnh đái tháo đường do alloxan gây ra theo đường uống ở liều 25 mg/kg và 50 mg/kg trọng lượng cơ thể [88].

Physalin G ức chế  $\alpha$ -glucosidase với IC<sub>50</sub> là 218,1  $\mu$ g/mL trong khi IC<sub>50</sub> của chứng dương acarbose là 183,4  $\mu$ g/mL. Như vậy, physalin G thể hiện hoạt tính ức chế  $\alpha$ -glucosidase với hiệu quả bằng 84,1% so với thuốc điều trị đái tháo đường acarbose [47].

Physagulin F (100, 300 và 500 mg/kg) được đánh giá khả năng chống đái tháo đường trên mô hình chuột bị đái tháo đường do streptozotocin (STZ) gây ra. Kết quả chỉ ra rằng, hợp chất này làm giảm đáng kể nồng độ glucose trong máu ( $p < 0,5$ ) [89].

### 1.3.6. Hoạt tính kháng khuẩn và kháng nấm

Tinh dầu từ phần trên mặt đất của cây Tầm bóp có hoạt tính kháng vi khuẩn *Bacillus subtilis* và *Klebsiella pneumoniae* với nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) lần lượt là  $4,0 \pm 0,1$  mg/mL và  $4,0 \pm 0,2$  mg/mL. Tuy nhiên, tinh dầu từ rễ của cây Tầm bóp chỉ có tác dụng trên *Klebsiella pneumoniae* với MIC là  $4,0 \pm 0,2$  mg/mL. Đối với các chủng nấm *Candida albicans*, *Candida stellatoidea* và *Candida torulopsis*, cả 2 loại tinh dầu này đều thể hiện hoạt tính [90].

Cao toàn phần và các cao phân đoạn cây Tầm bóp đã được thử hoạt tính kháng vi khuẩn. Phân đoạn chứa physalin B, F và D có hoạt tính chống lại *Mycobacterium tuberculosis* chủng H<sub>37</sub>Rv với giá trị MIC là 32 µg/mL. Physalin B và D cũng có tác dụng kháng lại *Mycobacterium tuberculosis* chủng H<sub>37</sub>Rv với giá trị MIC lần lượt là 128 µg/mL và 32 µg/mL [48].

Cao chiết từ quả cây Tầm bóp ức chế tụ cầu vàng (*Streptococcus aureus*) với bán kính vòng vô khuẩn trung bình từ 34,5 - 50,5 mm [91].

Cao chiết MeOH từ cây Tầm bóp thể hiện hoạt động kháng khuẩn *in vitro* chống lại *Streptococcus mutans* và *Porphyromonas gingivalis*. Cao phân đoạn EtOAc cũng cho thấy hoạt tính kháng khuẩn. Từ phân đoạn EtOAc này, đã phân lập được một hợp chất kháng khuẩn (acid oleanolic) với MIC lần lượt là 50 và 25 µg/mL đối với *Streptococcus mutans* và *Porphyromonas gingivalis* [54].

Cao chiết EtOH từ đài hoa cây Tầm bóp thể hiện hoạt tính kháng khuẩn chống lại các vi khuẩn *Streptococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* và *Pseudomonas aeruginosa* ở nồng độ 1000 µg/mL. Hoạt tính của phân đoạn dichloromethan (MIC  $\leq$  128 µg/mL) đối với tất cả các chủng mà không gây độc trên tế bào chống lại các nguyên bào sợi da ở người bình thường [92].

Cao chloroform và các phân đoạn chứa physalin từ cây Tầm bóp thể hiện hoạt tính kháng vi khuẩn *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium malmoense* và *Mycobacterium intracellulare* [93].

Một hỗn hợp chứa physalin B, D, F, G được phân lập từ quả của cây Tầm bóp cho thấy tác dụng ức chế *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ATCC 29213, *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 6538P và *Neisseria gonorrhoeae* ATCC 49226 ở nồng độ 200 mg/µL. Physalin B (200 µg/mL) ức chế  $\pm 85\%$  *S. aureus* ATCC 6538P [94].

Các hợp chất physalin B, physalin D và physalin F phân lập từ Tầm bóp đã được đánh giá hoạt tính kháng khuẩn chống lại *E. coli* (ATCC 25922), *P. aeruginosa* (ATCC 27853), *E. faecalis* (ATCC 29212), *S. aureus* (ATCC 25923), *B. subtilis* (ATCC 6633), *B. cereus* (ATCC 11778) và *C. albicans* (ATCC 10231). Kết quả cho thấy, physalin B thể hiện khả năng kháng khuẩn trên các chủng *S. aureus*, *B. subtilis* và *E. coli* với các giá trị MIC lần lượt là 128, 64 và 32  $\mu\text{g/mL}$ . Hợp chất physalin D cũng thể hiện hoạt tính kháng khuẩn, kháng lại các chủng *S. aureus*, *E. faecalis*, *B. subtilis*, *B. cereus* và *E. coli* với giá trị MIC từ 64 đến 128  $\mu\text{g/mL}$ , trong khi physalin F thể hiện khả năng kháng khuẩn, chống lại các chủng *S. aureus*, *B. subtilis*, *B. cereus* và *E. coli* với giá trị MIC là 128  $\mu\text{g/mL}$  [95].

### 1.3.7. Hoạt tính kháng ký sinh trùng

#### + Kháng *Leishmania*

Cao EtOH từ cây Tầm bóp (EPA) thể hiện hoạt tính kháng *Leishmania* với  $\text{IC}_{50}$  lần lượt là  $5,35 \pm 2,50$   $\mu\text{g/mL}$  và  $4,50 \pm 1,17$   $\mu\text{g/mL}$  đối với *L. amazonensis* và *L. braziliensis* thể promastigotes [96].

Cao nước từ rễ của cây Tầm bóp (AEPa) làm giảm sự nhân lên của *L. amazonensis* thể promastigote ( $\text{IC}_{50} = 39,5$   $\mu\text{g/mL} \pm 5,1$ ) và thể amastigote ( $\text{IC}_{50} = 43,4$   $\mu\text{g/mL} \pm 10,1$ ) phụ thuộc nồng độ. Sự ức chế tăng trưởng này có liên quan đến một số thay đổi hình thái quan sát được ở thể promastigote [97]. Tác dụng này là do sự gia tăng của ROS trừ NO. Sự tăng sản xuất của ROS gây chết tế bào theo chương trình ở *Leishmania*, nhưng không phải là sự tự thực bào (autophagy) hoặc hoại tử. Ngoài ra, phân tích giải phẫu các đại thực bào cho thấy, AEPa gây ra sự giải phóng một số lượng lớn tế bào chất, làm tăng thể tích tế bào chất và số lượng không bào, gây ra sự thay đổi tế bào và dẫn đến khả năng lan truyền cao. AEPa cũng thúc đẩy sản xuất anion superoxid ( $\text{O}^{2-}$ ) ở cả đại thực bào chưa bị nhiễm và đã bị nhiễm *Leishmania* [98].

Physalin B, G và F (2, 5, 15  $\mu\text{g/mL}$ ) ức chế sự phát triển của *L. amazonensis* phụ thuộc nồng độ với  $\text{IC}_{50}$  lần lượt là 6,7, 1,4 và 9,2  $\mu\text{M}$  [99].

#### + Kháng ký sinh trùng sốt rét (*Plasmodium*)

Tác dụng chống sốt rét của physalin B, D, F và G - phân lập từ cây Tầm bóp đã được đánh giá. Hợp chất physalin F làm tăng nồng độ ký sinh trùng và tỷ lệ tử vong ở chuột bị nhiễm *P. berghei*, trong khi physalin D có tác dụng bảo vệ (làm giảm ký sinh trùng và làm chậm quá trình tử vong ở chuột nhiễm *P. berghei*). Sự gia tăng nhiễm trùng *in vivo* khi sử dụng physalin F có thể là do hoạt động ức chế miễn dịch mạnh của hợp chất này [100].

#### + Kháng *Trypanosoma cruzi*

Ký sinh trùng *Trypanosoma cruzi* lưu hành trong máu gây bệnh Chagas/ Nam Mỹ hay bệnh ngủ châu Phi.

Cao EtOH từ cây Tầm bóp có hiệu quả ức chế sự tăng trưởng của thể epimastigote ( $IC_{50}$   $2,9 \pm 0,1 \mu\text{M}$ ) và làm giảm khả năng sống sót trong máu của thể trypomastigote ( $EC_{50}$   $1,7 \pm 0,5 \mu\text{M}$ ); gây chết tế bào ký sinh trùng do hoại tử; làm giảm sự lây nhiễm ký sinh trùng cũng như sự phát triển thể amastigote ở nồng độ không gây độc cho tế bào động vật có vú. Ở chuột bị nhiễm *T. cruzi*, cao EtOH làm giảm tỷ lệ nhiễm ký sinh trùng máu 72,7%. Khi kết hợp với benznidazol, cao EtOH cho thấy tác dụng hiệp đồng chống lại *T. cruzi*, với các giá trị  $EC_{50}$  là  $0,8 \pm 0,07$  và  $EC_{90}$  là  $0,83 \pm 0,1$  [101].

Physalin B và F là các hợp chất mạnh nhất chống lại các thể trypomastigote và thể epimastigote của *T. cruzi* trong số các physalin được thử nghiệm (physalin B, D, F và G). Các physalin này làm giảm quá trình xâm lấn, cũng như sự phát triển của ký sinh trùng nội bào trong nuôi cấy tế bào đại thực bào với tiềm năng tương tự như benznidazol. Khi kết hợp của các physalin với benznidazol, hoạt tính chống *T. cruzi* mạnh hơn so với khi các hợp chất này sử dụng một mình [102].

### 1.3.8. Hoạt tính diệt nhuyễn thể

13 mẫu cao chiết và các phân đoạn chứa physalin đã được nghiên cứu. 5 trong số 13 mẫu (EtOAc và aceton từ toàn bộ cây, EtOH từ rễ, physalin từ thân và lá) cho thấy tác dụng diệt nhuyễn thể (*Biomphalaria tenagophila*); trong đó cao EtOAc và aceton từ toàn bộ cây và physalin từ lá xác định được  $LD_{50}$  và  $LD_{90}$  [103].

### 1.3.9. Hoạt tính chống hen suyễn

Cao chiết từ lá cây Tầm bóp thể hiện hoạt tính kháng histamin và 5-HT (serotonin) trên một số mô hình cơ trơn động vật. Đối với mô hình GPIIP (guinea pig ileum preparation), Tầm bóp ức chế histamin 100% (1  $\mu\text{g}$ ), 133% (2  $\mu\text{g}$ ), 126% (4  $\mu\text{g}$ ); với mô hình GPTCP (guinea pig tracheal chain preparation), Tầm bóp ức chế histamin 86% (1  $\mu\text{g}$ ), 100% (2  $\mu\text{g}$ ) và 106% (4  $\mu\text{g}$ ). Trên mô hình FSP (fundus strip preparation), Tầm bóp ức chế 5-HT là 50% (1  $\mu\text{g}$ ), 75% (2  $\mu\text{g}$ ), 100% (4  $\mu\text{g}$ ) [104].

### 1.3.10. Hoạt tính lợi tiểu

Cao methanol từ lá Tầm bóp đã được đánh giá tác dụng lợi tiểu trên chuột theo đường uống liều 250, 500 và 1000 mg/kg, với chứng dương furosemid (20 mg/kg) bằng cách đo thể tích nước tiểu và bài tiết ion natri, kali và clorid. Kết quả chỉ ra rằng, lượng nước tiểu tăng đáng kể khi chuột dùng cao methanol so với nhóm đối chứng; sự bài tiết các ion natri, kali và clorid tăng khi cho chuột uống cao methanol liều 1000 mg/kg [105].

## **1.4. CÔNG DỤNG TRONG Y HỌC CỔ TRUYỀN**

### **1.4.1. Công dụng trong y học cổ truyền thế giới**

Các nghiên cứu cho thấy Tầm bóp được sử dụng ở nhiều nơi trên thế giới để điều trị một số bệnh, như chống ung thư, kháng khuẩn, chữa bệnh tiểu đường, điều trị sốt rét, thiếu máu và hạ sốt. Cụ thể tại một số nước [8]:

Ở Peru, người ta đã ghi nhận rằng các nhóm bản địa ở vùng Amazon thuộc Peru, sử dụng nước sắc của lá và quả cho nhiễm trùng sau sinh và bộ phận trên mặt đất để điều trị bệnh sốt rét. Ngoài ra, để điều trị bệnh đái tháo đường, bằng cách dùng một ly rễ cây kết hợp với mật ong, hai lần mỗi ngày trong 60 ngày. Rễ cây còn được thực hiện cho bệnh viêm gan; lá cây được dùng làm thuốc lợi tiểu, chữa bệnh hen suyễn, sốt rét, viêm nhiễm và như một chất khử trùng, quả chưa chín được dùng để trị ghẻ.

Ở Brazil, nhựa cây được dùng chữa đau tai, nước sắc rễ trị bệnh vàng da. Ở bang Paraíba, người ta sử dụng sắc của lá làm thuốc an thần và chống viêm bàng quang, lá lách và thận. Trong cộng đồng Marudá, bang Pará, rễ được dùng làm trà chữa các triệu chứng viêm gan, thiếu máu, nhiễm trùng đường tiết niệu, đau dạ dày, tuyến tiền liệt và sỏi thận.

Ở Bolivia, cộng đồng bản địa của Tacana, nước sắc rễ được sử dụng để điều trị sốt.

Ở Nigeria, việc sử dụng truyền thống được báo cáo rất phổ biến, trong đó tất cả các bộ phận của cây đều được sử dụng cho mục đích y học; Toàn cây dùng để sinh con, lợi tiểu, hạ sốt, lậu, vàng da, các bệnh về gan, sốt rét, viêm thận, xuất huyết sau đẻ, mẫn ngứa, lở da, ngũ li bì, ngứa sảy thai, u bướu.

Ở Kenya, toàn bộ cây được sử dụng để trị giun và đau dạ dày.

Ở Samoa, lá được sử dụng để kháng khuẩn.

Ở Vương quốc Tonga, lá bôi ngoài da trị viêm da.

Ở Indonesia dùng nước sắc rễ làm thuốc chữa sau đẻ, đau nhức cơ và viêm gan.

Ở Ấn Độ, lá đắp bên ngoài các vết thương.

Bên cạnh công dụng làm thuốc, ở Mexico, quả được dùng để làm nước sốt thường dùng kèm với các loài thực vật khác như hành tây.

### **1.4.2. Công dụng trong y học cổ truyền Việt Nam**

Toàn cây Tầm bóp có vị đắng, tính mát, không độc, có tác dụng thanh nhiệt, lợi thấp, khu đàm, chỉ khái, tán kết, dùng chữa cảm sốt, viêm họng, ho nhiều đờm. Ngày

15 - 30 g sắc uống. Để trị mụn nhọt, đinh độc, sưng vú, sưng bìu đái, lấy 40 - 80 g cây tươi, giã nát, vắt lấy nước cốt uống, bã đắp, hoặc nấu nước rửa [15].

Quả có vị chua, tính bình, có tác dụng thanh nhiệt, lợi tiểu, tiêu đờm, được dùng chữa đờm nhiệt, sinh ho, thủy thũng. Trẻ em nóng âm, người gầy khô, ăn quả Tầm bóp để cho mát da mát thịt, rất bổ ích [15].

Rễ Tầm bóp được dùng chữa viêm họng, viêm tuyến nước bọt, viêm tinh hoàn, bí tiểu tiện, hoàng đản, cổ trướng. Ngày 20 - 40 g, sắc chia làm 2 lần uống trong ngày [15].

**Như vậy, qua tổng quan thấy rằng, cây Tầm bóp chứa hầu hết các nhóm chất chính trong thực vật như terpenoid, flavonoid, carotenoid, withanolid... Đặc biệt đã phân lập, xác định cấu trúc được hơn 100 withanolid từ cây Tầm bóp với nhiều hoạt tính như chống viêm, giảm đau, chống đái tháo đường, kháng khuẩn, kháng ký sinh trùng, chống hen suyễn, lợi niệu, đặc biệt là tác dụng điều hòa miễn dịch, kháng tế bào ung thư. Đã có hàng trăm công trình nghiên cứu về Tầm bóp trên thế giới được công bố. Ở Việt Nam đã có một số công trình nghiên cứu về tầm bóp của Phan Văn Kiệt, Hoàng Lê Anh Tuấn... về thành phần hóa học, hoạt tính chống viêm, bảo vệ gan, độc tế bào... nhưng mới dừng ở mức độ nghiên cứu ban đầu. Do vậy, đề tài đã tiến hành nghiên cứu về đặc điểm thực vật, thành phần hóa học và một số tác dụng sinh học của Tầm bóp (chống viêm, giảm đau, trên chuyển hóa acid béo, chuyển hóa glucose và tác dụng độc trên một số dòng tế bào ung thư).**



## CHƯƠNG 2

### NGUYÊN VẬT LIỆU, TRANG THIẾT BỊ VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### 2.1. NGUYÊN VẬT LIỆU NGHIÊN CỨU

##### 2.1.1. Nguyên liệu nghiên cứu

Mẫu Tầm bóp (có đủ hoa và quả) được thu hái tháng 11 năm 2014 tại huyện Gia Lâm - Hà Nội. Mẫu nghiên cứu đã được PGS.TS. Trần Văn Ôn - Đại học Dược Hà Nội và PGS.TS. Nguyễn Khắc Khôi - Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật giám định tên khoa học là *Physalis angulata* L., họ Cà Solanaceae. Mẫu tiêu bản được lưu tại Phòng Tiêu bản - Bộ môn Thực vật - Đại học Dược Hà Nội với mã số HNIP/18111/15 và Phòng Tiêu bản - Viện Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật với mã số PA101 (Phụ lục 1).



a. Cây Tầm bóp



b. Quả Tầm bóp



c. Hoa Tầm bóp

**Hình 2.1. Cây Tầm bóp (*Physalis angulata* L.)**

*Mẫu nghiên cứu thực vật:* Toàn cây Tầm bóp có đầy đủ các bộ phận để làm tiêu bản và vi phẫu.

*Các mẫu nghiên cứu định tính và chiết xuất, phân lập:* Toàn cây Tầm bóp được thái nhỏ, phơi sấy khô và bảo quản trong túi nilon kín.

*Các mẫu nghiên cứu tác dụng sinh học:*

+ Cao toàn phần EtOH 96% (**TBT**) và các cao phân đoạn (*n*-hexan, **TBH**; EtOAc, **TBE** và nước, **TBN**) của cây Tầm bóp được điều chế theo phương pháp mô tả ở phần chiết xuất.

+ Các hợp chất withanolid phân lập từ cây Tầm bóp.

### 2.2.2. Động vật thí nghiệm

Chuột nhắt trắng chủng *Swiss* khỏe mạnh, cân nặng 18 - 20 g do Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương cung cấp.

Chuột cống trắng chủng *Wistar* khỏe mạnh, cân nặng 150 - 180 g do Học viện Quân Y cung cấp.

Động vật được nuôi trong điều kiện phòng thí nghiệm Bộ môn Dược lực, Trường Đại học Dược Hà Nội 5 ngày trước khi thực hiện nghiên cứu, được nuôi dưỡng bằng thức ăn tiêu chuẩn do Viện vệ sinh Dịch tễ Trung ương cung cấp, uống nước tự do.

### 2.2.3. Thuốc thử, hóa chất, dung môi và dòng tế bào

+ Các dung môi dùng trong chiết xuất và phân lập như: Ethanol (EtOH), *n*-hexan, ethyl acetat (EtOAc), methanol (MeOH), dichloromethan (DCM), *n*-butanol (BuOH), aceton, dimethyl sulfoxid (DMSO)

+ Dung dịch H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10% trong EtOH 96%

+ Các dung môi đo phổ: CDCl<sub>3</sub>, CD<sub>3</sub>OD, DMSO-*d*<sub>6</sub>, aceton-*d*<sub>6</sub>

+ Silica gel pha thường (0,040 - 0,063 mm, Merck), pha đảo RP-C<sub>18</sub> (30-50 μm, Fuji Silysia Chemical Ltd, Nhật)

+ Bản mỏng tráng sẵn DC-Alufolien 60G F<sub>254</sub> (silica gel, 0,25 mm, Merck) và bản mỏng pha đảo RP-18 F<sub>254</sub> (0,25 mm, Merck)

+ Chất gây viêm LPS lô L4391, Dexamethason (D4902, Sigma, St. Louis, MO, Mỹ)

+ Môi trường nuôi cấy tế bào: DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) hoặc EMEM (Eagle's Minimal Essential Medium) có bổ sung thêm L-glutamin, natri pyruvat, NaHCO<sub>3</sub>, penicillin/streptomycin (A2212, Biochrom, Anh), FBS (Fetal Bovine Serum - huyết thanh phôi bò) 10% (Biochrom, Anh), trypsin (Gibco BRL, Grand Island, New York, Mỹ)

+ Kháng thể p-AMPK, p-ACC, FAS và SREBP-1c, β-actin (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, Mỹ)

+ Các dòng tế bào RAW 264.7 và HepG2 (Trung tâm lưu trữ tế bào ở Mỹ ATCC, Rockville, MD)

+ Các dòng tế bào ung thư: SNU-1 (ung thư dạ dày ở người, human gastric carcinoma), 4T1 (ung thư vú ở chuột, mouse breast carcinoma), LLC (ung thư phổi ở chuột, Lewis lung carcinoma), Hep3B (ung thư gan ở người, human hepatocellular carcinoma), NTERA-2 (tế bào gốc ung thư ở người, pluripotent human embryonal

carcinoma) và HEK-293A (tế bào biểu mô phôi thận người, human embryonic kidney cells) do GS.TS. J. M. Pezzuto, Trường Đại học Long-Island, Mỹ, GS. Jeanette Maier, Trường Đại học Milan, Italia và ATCC (Mỹ, Rockville, MD) cung cấp

+ ELISA kit (PGE2: 500141, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI và R&D Systems, Mỹ). Mouse IL-1 $\beta$  ELISA Kit (ab100705), NF- $\kappa$ B p65 Transcription Factor Assay Kit (ab133112) và Nitric Oxide Assay Kit (Colorimetric, ab65328) được cung cấp bởi Abcam (Mỹ)

+ Chất đối chứng dương Aicar (Công ty Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, Mỹ)

+ Isopropanol, Oil Red O, acid oleic, BSA (Bovine Serum Albumin), formalin, fenofibrat (Sigma Aldrich, Đức)

+ Một số hóa chất khác: Na-CMC (Nhật Bản), aspirin (Traphaco, Việt Nam), acid acetic (Merck, Đức), indomethacin (Dopharma, Việt Nam), carrageenan, ellipticine (Sigma Aldrich, Đức), prednisolon (Mediplantex, Việt Nam), TCA (acid trichloroacetic), Tris base, PBS (phosphate buffered saline, muối đệm phosphat), SRB (sulforhodamin B)...

## **2.2. TRANG THIẾT BỊ NGHIÊN CỨU**

+ Máy ảnh Canon EOS 60D (Nhật)

+ Kính hiển kết nối màn hình Nikon 550S (Nhật), kính hiển vi ngược (Axiovert 40 CFL)

+ Máy siêu âm Power sonic 405 (Hàn Quốc)

+ Tủ sấy Memmert, Binder-FD115 (Đức)

+ Máy cất quay Rotavapor R-220, Rotavapor R-200 (Buchi, Thụy Sĩ)

+ Cân kỹ thuật Precisa BJ 610C, cân phân tích Precisa 262SMA-FR

+ Đèn tử ngoại hai bước sóng 254 nm và 366 nm

+ Phổ khối lượng ion hóa điện tử (ESI-MS) được ghi trên thiết bị AutoSpec Premier, Waters, USA - Khoa Hóa học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên - Đại học Quốc gia Hà Nội

+ Máy đo phổ cộng hưởng từ hạt nhân: Bruker Avance Digital 500 MHz NMR (Karlsruhe, Đức). Chất nội chuẩn là tetramethylsilan

+ Máy đo độ nóng chảy SMP3 (Stuart) - Viện Dược liệu

+ Máy đo quang microplate reader (Varioskan, Thermo Electron Co., Mỹ)

- + Máy xét nghiệm sinh hóa bán tự động XC - 55 Chemistry analyzers (Trung Quốc)
- + Máy đo độ phù chân chuột Plethysmometer LE 7500 (Letica Scientific Instruments).
- + Thiết bị nghiền đồng thể WiseStir HS-30E (Daihan, Hàn Quốc)
- + Máy đo quang phổ UV-VIS (Shimadzu, Nhật), máy quang phổ (BioTek)
- + Hệ thống ELISA gồm máy đọc khay tinh thể (Bioteck, Mỹ) và máy ủ lắc khay (Awareness, Mỹ)
- + Đĩa 96 giếng nhựa (Corning, Mỹ), pippett, eppendorf
- + Buồng đếm tế bào (Fisher, Hoa kỳ)
- + Một số thiết bị khác: Tủ ẩm CO<sub>2</sub>, tủ lạnh sâu -80°C, bình nitơ lỏng, máy đo pH

## **2.3. ĐỊA ĐIỂM NGHIÊN CỨU**

### **2.3.1. Địa điểm nghiên cứu thực vật**

- + Khoa Tài nguyên Dược liệu - Viện Dược liệu
- + Bộ môn Thực vật - Trường Đại học Dược Hà Nội
- + Phòng Thực vật - Viện Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật

### **2.3.2. Địa điểm nghiên cứu thành phần hóa học**

- + Khoa Hóa Thực vật - Viện Dược liệu
- + Trung tâm các phương pháp phổ ứng dụng - Viện Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

### **2.3.3. Địa điểm nghiên cứu một số tác dụng sinh học**

- + Bộ môn Dược lực - Trường Đại học Dược Hà Nội
- + Phòng Thử nghiệm Sinh học, Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam
- + Khoa Khoa học Y khoa Thực nghiệm, Khoa Y, Đại học Lund, Thụy Điển.

## **2.4. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

### **2.4.1. Phương pháp nghiên cứu thực vật**

Nghiên cứu đặc điểm hình thái của mẫu tại thực địa và trong phòng thí nghiệm. Xác định tên khoa học bằng phương pháp so sánh hình thái, đối chiếu đặc điểm hình

thái với khóa phân loại thực vật, các bộ thực vật chí và đối chiếu với các mẫu tiêu bản được lưu trữ ở Phòng Tiêu bản - Khoa Tài nguyên dược liệu, Viện Dược liệu; Phòng Tiêu bản - Bộ môn Thực vật, Đại học Dược Hà Nội; Phòng Tiêu bản - Viện Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật và tra cứu tài liệu với các khóa phân loại.

Nghiên cứu đặc điểm hiển vi: Làm vi phẫu các bộ phận của cây theo phương pháp cắt ngang, nhuộm kép. Soi bột dược liệu, quan sát và chụp ảnh dưới kính hiển vi.

## **2.4.2. Phương pháp nghiên cứu thành phần hóa học**

### **2.4.2.1. Phương pháp định tính**

Khảo sát sơ bộ các nhóm chất chính trong dược liệu bằng phương pháp hóa học theo Nguyễn Văn Đán, Nguyễn Việt Tụ [106].

### **2.4.2.2. Phương pháp chiết xuất, phân lập và xác định cấu trúc các hợp chất**

Chiết xuất: Dược liệu được chiết bằng phương pháp ngâm với dung môi EtOH 96% sau đó phân đoạn bằng các dung môi có độ phân cực tăng dần: *n*-hexan và EtOAc.

Phân lập: Phân lập các hợp chất bằng sắc ký cột (silica gel) hoặc phương pháp kết tinh trong dung môi thích hợp, theo dõi phân đoạn bằng sắc ký lớp mỏng (TLC) kết hợp UV 254 và 365 nm hoặc dùng thuốc thử, kiểm tra độ tinh khiết bằng TLC hoặc NMR.

Xác định cấu trúc: Xác định cấu trúc của các hợp chất dựa trên các đặc tính lý hóa (màu sắc, nhiệt độ nóng chảy, độ tan...), dữ liệu phổ (NMR, MS) và kết hợp so sánh với dữ liệu phổ trong tài liệu tham khảo.

## **2.4.3. Phương pháp nghiên cứu một số tác dụng sinh học**

### **2.4.3.1. Phương pháp nghiên cứu hoạt tính kháng viêm**

➤ *Phương pháp nghiên cứu hoạt tính kháng viêm in vitro bằng xét nghiệm ELISA*

❖ Nguyên tắc

Định lượng các chất trung gian gây viêm như PGE<sub>2</sub>, NO, IL-1 $\beta$ , NF- $\kappa$ B bằng kit thử ELISA theo hướng dẫn của nhà sản xuất [107], [108], [109], [110]. Nguyên tắc ELISA cạnh tranh là phản ứng cạnh tranh xảy ra giữa kháng nguyên (trong mẫu thử) cạnh tranh với kháng nguyên (được đánh dấu) để liên kết với một lượng kháng thể giới hạn mà trước đó kháng thể này đã được đưa lên một pha rắn. Sau khi phản ứng cân bằng, người ta rửa sạch các kháng nguyên không liên kết và đo tín hiệu từ phần đánh dấu. Các bước thử được thực hiện theo hướng dẫn của kit thử. Tín hiệu đo được tỷ lệ nghịch với nồng độ chất phân tích trong mẫu [111].

❖ Cách chuẩn bị mẫu thí nghiệm

+ Mẫu thử: Cao toàn phần EtOH 96% (**TBT**), các cao phân đoạn (**TBH**, **TBE** và **TBN**) được điều chế theo quy trình chiết xuất ở mục 2.4.2.2. và các hợp chất withanolid (**PA11 - PA14**) phân lập từ Tâm bóp, được pha bằng DMSO và lắc vortex ở tốc độ 300 - 500 (vòng/phút) trong 1 - 2 phút cho đến khi dịch đồng đều. Các mẫu thử tiếp tục được pha loãng đến nồng độ thử thích hợp bằng DMSO. Tế bào RAW 264.7 được kích thích viêm bằng LPS và bổ sung mẫu thử. Sử dụng 2  $\mu$ L dung dịch mẫu thử cho mỗi giếng (200  $\mu$ L). Nồng độ cuối cùng của chất thử trong giếng là 20  $\mu$ g/mL (đối với cao chiết) hoặc 10  $\mu$ M (đối với chất tinh khiết).

+ Mẫu chứng trắng: Tế bào RAW 264.7 không được kích thích viêm bằng LPS và không có mẫu thử.

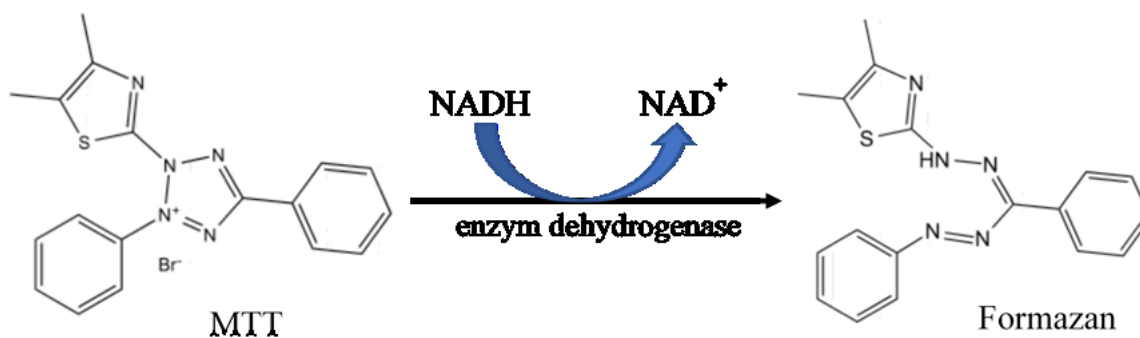
+ Mẫu chứng viêm (chứng bệnh lý): Tế bào RAW 264.7 được kích thích viêm bằng LPS (nồng độ 1  $\mu$ g/mL) và không có mẫu thử.

+ Mẫu đối chứng dương: Tế bào RAW 264.7 được kích thích viêm bằng LPS (nồng độ 1  $\mu$ g/mL) và được thêm dexamethason nồng độ 100 nM.

❖ Đánh giá ảnh hưởng của mẫu thử đến khả năng sống sót của tế bào RAW 264.7 bằng phương pháp MTT để xác định nồng độ thử

✚ Nguyên tắc

Đánh giá độ ảnh hưởng của các mẫu nghiên cứu đến khả năng sống sót của tế bào dựa trên mức độ hoạt động của enzym dehydrogenase trong ty thể của tế bào sống sót còn lại sau khi được xử lý với các mẫu thử. Enzym này biến đổi tetrazolium có màu vàng nhạt thành formazan có màu tím và chất này có hấp thụ cực đại tại bước sóng  $\lambda = 570$  nm (**Hình 2.2**) [112], [113], [114].



## Hình 2.2. Phản ứng nhuộm màu tế bào sống bằng phương pháp MTT

### ✚ Nuôi cấy tế bào

Tế bào RAW 264.7 được nuôi cấy ở 37°C, 5% CO<sub>2</sub> trong môi trường có chứa 10% huyết thanh phôi bò (FBS), 1% kháng sinh penicillin (100 UI/mL) và streptomycin (100 µg/mL). Đối với tất cả các thí nghiệm, các tế bào được nuôi đến mật độ 80% - 90% và chịu không quá 20 phân chia tế bào.

### ✚ Tiến hành

Thiết kế đĩa: Mỗi đĩa (96 giếng) bao gồm 1 chứng dương, 1 chứng âm (môi trường) và 4 giếng lặp lại cho mỗi nồng độ của cao chiết và chất thử.

Ủ đĩa: Tế bào RAW 264.7 được nuôi cấy trong đĩa ổn định với mật độ tế bào đạt 90% ở điều kiện 37°C và 5% CO<sub>2</sub> trong môi trường DMEM có chứa 10% FBS, 100 đơn vị penicillin và 100 µg/mL streptomycin. Các dòng tế bào được chuyển sang đĩa. Sau 24 giờ ổn định, các mẫu thuốc thử sẽ được đưa vào ủ trong 48 giờ. Tế bào sống sẽ được ủ và nhuộm màu với môi trường nuôi cấy tế bào có chứa MTT (2 mg/mL, trong 4 giờ). Loại bỏ môi trường và hòa tan các tinh thể formazan bằng cách thêm vào 200 µL DMSO. Xác định tỷ lệ tế bào còn sống giữa mẫu chuẩn và mẫu thử bằng máy đo quang ở bước sóng 570 nm.

### ✚ Tính kết quả

Phần trăm sống sót của tế bào (RAW 264.7) được tính theo công thức:

$$\% \text{ Sống sót tế bào} = \left[ \frac{\text{OD (mẫu thử)} - \text{OD (ngày 0)}}{\text{OD (DMSO)} - \text{OD (ngày 0)}} \times 100 \right]$$

Trong đó:

OD là mật độ quang ở bước sóng 570 nm;

OD (ngày 0): OD của giếng không chứa chất thử nhưng có tế bào ung thư.

### ❖ Đo nồng độ PGE<sub>2</sub>, NO, IL-1β và NF-κB

Tế bào RAW 264.7 được nuôi cấy trong đĩa 48 giếng với mật độ  $5 \times 10^4$  tế bào/mL. Sau khi được ủ 24 giờ, các giếng được ủ với chất trung gian gây viêm (PGE<sub>2</sub>, NO, IL-1β, NF-κB) có hoặc không có các mẫu thử là cao chiết tổng, cao chiết phân đoạn hoặc chất tinh khiết phân lập từ Tâm bóp với các nồng độ khác nhau. Sau 24 giờ ủ, môi trường nuôi cấy được thu và nồng độ PGE<sub>2</sub>, NO, IL-1β, và NF-κB được đo bằng cách sử dụng xét nghiệm miễn dịch ELISA ở bước sóng phù hợp theo hướng dẫn của nhà sản xuất các kit ELISA và xét nghiệm tương ứng.

#### ✚ ELISA kit (PGE2: 500141)

- + Chuẩn bị thuốc thử đặc hiệu: PGE2 chuẩn, chất đánh dấu, kháng thể đơn dòng.
- + Thiết lập đĩa (Plate set up): Đĩa 96 giếng.
- + Tiến hành:
  - Thêm thuốc thử: Theo bảng sau

Giếng	Đệm ELISA	Chuẩn/Mẫu	Chất đánh dấu	Kháng thể
Blk (Chứng)	-	-	-	-
TA (Total activity)	-	-	5 µL	-
NSB (Liên kết không đặc hiệu)	100 µL	-	50 µL	-
B <sub>0</sub> (Liên kết tối đa)	50 µL	-	50 µL	50 µL
Chuẩn/Mẫu	-	50 µL	50 µL	50 µL

- Ủ đĩa: 60 phút tại nhiệt độ phòng (Room temperature - RT)
- Phát triển đĩa (Development of the Plate): Làm sạch các giếng và rửa năm lần với đệm; thêm 200 µL loại thuốc thử Ellman vào mỗi giếng; thêm 5 µL chất đánh dấu vào các giếng TA; che tấm bằng màng nhựa.
  - Đọc đĩa: Lau sạch đáy đĩa bằng khăn giấy sạch để loại bỏ dấu vân tay, bụi bẩn, v.v.; tháo nắp đĩa cẩn thận để thuốc thử Ellman không bị văng lên nắp; đọc đĩa ở bước sóng trong khoảng 405 đến 420 nm microplate reader (Infinite F200, Tecan).

#### ✚ Nitric Oxide Assay Kit (Colorimetric) (ab65328)

- + Chuẩn bị đường cong chuẩn.
- + Chuẩn bị mẫu chuẩn.
- + Thêm enzym, cofactor và ủ tại nhiệt độ phòng trong 60 phút.
- + Thêm chất tăng cường, thuốc thử Griess và phát triển tại nhiệt độ phòng trong 10 phút.
- + Đo mật độ quang (đo ở bước sóng 540 nm) microplate reader (Infinite F200, Tecan).

#### ✚ Mouse IL-1β ELISA Kit (ab100705)



- + Chuẩn bị tất cả các thuốc thử, mẫu và mẫu chuẩn (standard) theo hướng dẫn.
- + Thêm mẫu chuẩn hoặc mẫu thử cho mỗi giếng được sử dụng. Ủ ở nhiệt độ phòng.
- + Thêm kháng thể biotin đã chuẩn bị vào từng giếng. Ủ ở nhiệt độ phòng.
- + Thêm dung dịch streptavidin đã chuẩn bị. Ủ ở nhiệt độ phòng.
- + Thêm dung dịch bộc lộ bậc 1 TMB (TMB One-Step Development Solution) cho mỗi giếng. Ủ ở nhiệt độ phòng. Thêm dung dịch dừng phản ứng cho mỗi giếng. Đọc ở 450 nm ngay lập tức microplate reader (Infinite F200, Tecan).

**✚ NF- $\kappa$ B p65 Transcription Factor Assay Kit (ab133112)**

- + Chuẩn bị CTFB (Complete Transcription Factor Binding Assay Buffer).
- + Thêm CTFB vào mẫu và giếng NSB.
- + Thêm dsDNA cạnh tranh (Competitor dsDNA) (tùy chọn) vào các giếng thích hợp.
- + Thêm yếu tố kiểm soát tích cực vào giếng thích hợp.
- + Thêm mẫu chứa NF- $\kappa$ B vào giếng thích hợp.
- + Ủ qua đêm ở 4°C không khuấy trộn.
- + Rửa mỗi giếng 5 lần với đệm rửa 1X (1X Wash Buffer)
- + Thêm kháng thể chính NF- $\kappa$ B pha loãng vào từng giếng
- + Ủ 1 giờ tại nhiệt độ phòng không khuấy trộn.
- + Rửa mỗi giếng 5 lần với đệm rửa 1X.
- + Thêm hỗn hợp Goat Anti-Rabbit HRP đã được pha loãng
- + Ủ không khuấy trộn 1 giờ tại nhiệt độ phòng
- + Rửa mỗi giếng 5 lần với đệm rửa 1X.
- + Thêm dung dịch khuếch trương (Developing Solution) vào các giếng
- + Ủ và khuấy nhẹ từ 15 đến 45 phút
- + Thêm dung dịch dừng vào các giếng (STOP SOLUTION)
- + Đo độ hấp thụ ở 450 nm.

**✚ *Tính kết quả:***

Đánh giá hoạt tính ức chế sự sản sinh PGE<sub>2</sub>, NO, IL-1 $\beta$  và NF- $\kappa$ B dựa vào kết quả đo mật độ quang của chất thử với mẫu trắng được xử lý bằng dung dịch DMSO 1% thay cho chất thử.

$$\% \text{ Ức chế của mẫu thử} = \frac{\text{Mật độ quang của mẫu thử}}{\text{Mật độ quang của đối chứng DMSO}} \times 100 (\%)$$

➤ *Phương pháp nghiên cứu hoạt tính kháng viêm in vivo*

❖ Chuẩn bị mẫu thử

Bột dược liệu Tầm bóp (hàm ẩm 10,27%) được ngâm với EtOH 96% tỷ lệ 1:10 (dược liệu/ dung môi, kg/L) ở nhiệt độ phòng, 3 lần x 4 ngày/ lần. Sau khi lọc tách nguyên liệu rắn, các dịch lọc EtOH 96% được gộp lại và cất loại dung môi dưới áp suất giảm thu được cao toàn phần EtOH 96%. Hiệu suất chiết là 6%, độ ẩm cao là 15%.

❖ Về liều nghiên cứu

Liều sử dụng để tiến hành thực nghiệm được ngoại suy từ liều có hiệu quả trên người [115]. Liều dùng hằng ngày cây Tầm bóp trong dân gian để điều trị viêm họng, ho nhiều đờm, mụn nhọt là 40 - 120 g dược liệu/ ngày [15], tiến hành ngoại suy liều dùng ở chuột cống trắng là 5,6 - 16,8 g dược liệu/kg (hệ số 7) và chuột nhắt trắng là 9,6 - 28,8 g dược liệu/kg (hệ số 12) khi tính trung bình cân nặng của người là 50 kg.

Đối với liều thử hoạt tính kháng viêm và giảm đau *in vivo*: Cao toàn phần EtOH 96% với hiệu suất chiết là 6%, độ ẩm cao là 15%, hàm ẩm dược liệu 10,27% quy đổi ra cao Tầm bóp được sử dụng trên chuột cống trắng là 0,3 - 0,9 g cao/kg và chuột nhắt trắng là 0,6 - 1,8 g cao/kg.

❖ Đánh giá hoạt tính kháng viêm cấp trên mô hình gây phù chân chuột bằng carrageenan

• Mẫu thử: Cao toàn phần EtOH 96% liều dùng 0,3 và 0,9 g/kg.

• Thiết kế thí nghiệm:

Sử dụng mô hình gây phù chân chuột bằng carrageenan của Winter - Levy [116]. Chuột cống trắng được chia thành các lô:

+ Lô chứng (n = 10): Uống dung môi pha mẫu thử (Na-CMC 0,5%).

+ Lô đối chiếu (n = 11): Uống indomethacin pha trong Na-CMC 0,5% với liều 10 mg/kg.

+ Lô thử 1 (n = 11): Uống cao chiết EtOH 96% Tầm bóp pha trong Na-CMC 0,5% với liều 0,3 g/kg.

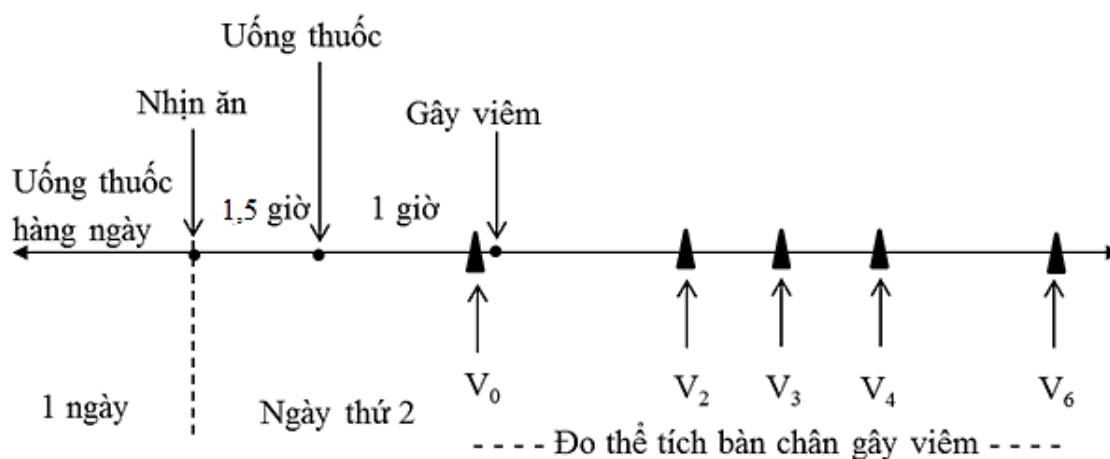
+ Lô thử 2 (n = 11): Uống cao chiết EtOH 96% Tầm bóp pha trong Na-CMC 0,5% với liều 0,9 g/kg.

Chuột được uống dung môi pha mẫu thử hoặc mẫu thử với cùng thể tích 1 mL/100 g chuột vào một giờ nhất định hàng ngày trong vòng 2 ngày trước khi làm thí nghiệm. Trước khi dùng dung môi, thuốc hoặc mẫu thử 1,5 giờ, chuột không được ăn nhưng được uống nước bình thường. Ngày thứ 2, sau khi uống dung môi, thuốc đối chiếu hoặc mẫu thử 1 giờ chuột được tiêm carrageenan 1% vào gan bàn chân sau phải. Sử dụng máy đo độ phù LE 7500 để đo thể tích bàn chân sau phải của từng chuột ở các thời điểm 2 h, 3 h, 4 h và 6 h sau khi gây viêm.

- Kỹ thuật đo độ phù bàn chân chuột:

Dùng bút đánh dấu cố định mặt bên khớp gối chân sau phải của chuột. Nhúng bàn chân sau phải vào dung dịch đo đến đúng vị trí đã đánh dấu, đọc kết quả hiển thị trên thiết bị đo. Kỹ thuật đo được thực hiện bởi cùng một kỹ thuật viên và là phép đo mù.

Quy trình tiến hành thí nghiệm được mô tả trong **hình 2.3**.



**Hình 2.3. Quy trình đánh giá hoạt tính kháng viêm cấp thực nghiệm trên mô hình gây phù bàn chân chuột bằng carrageenan**

- Thông số đánh giá:

+ Thể tích bàn chân sau phải của từng chuột

+ Tỷ lệ phù chân chuột được tính theo công thức:

$$X \% = \frac{V_t - V_0}{V_0} \times 100\%$$

Trong đó: X là tỷ lệ phù chân chuột tại thời điểm t giờ sau khi gây viêm, Vt là thể tích chân chuột ở thời điểm t sau khi gây viêm, Vo là thể tích chân chuột trước khi gây viêm.

- ❖ Đánh giá hoạt tính kháng viêm mạn trên mô hình gây u hạt thực nghiệm bằng bông
- Mẫu thử: Cao toàn phần EtOH 96% cây Tầm bóp (liều dùng: 0,3 và 0,9 g/kg).
- Bố trí thí nghiệm:

Sử dụng mô hình gây u hạt ở chuột cống trắng [117]. Chuột cống trắng, cả hai giống được chia thành các lô:

+ Lô chứng (n = 10): Uống dung môi pha mẫu thử Na-CMC 0,5%.

+ Lô đối chiếu (n = 10): Uống prednisolon pha trong Na-CMC 0,5% với liều 5 mg/kg.

+ Lô thử 1 (n = 10): Uống cao EtOH 96% Tầm bóp pha trong Na-CMC 0,5% với liều 0,3 g/kg cân nặng.

+ Lô thử 2 (n = 10): Uống cao EtOH 96% Tầm bóp pha trong Na-CMC 0,5% với liều 0,9 g/kg cân nặng.

Gây viêm mạn bằng cách cấy viên bông tẩm carrageenan 1% ( $20 \pm 1$  mg/con chuột) đã được tiệt trùng vào vùng da dưới lưng. Sau khi cấy u hạt, cho chuột uống thuốc và mẫu thử liên tục 7 ngày, ngày thứ 8 tiến hành giết chuột bằng ether, bóc tách u hạt, cân khối lượng ướt của hạt rồi đem sấy ở  $60^\circ\text{C}$  đến khối lượng không đổi (khoảng 18 giờ). Cân u hạt khô.

- Thông số đánh giá:

Hoạt tính kháng viêm được tính theo công thức:

$$I \% = \frac{T_c - T_t}{T_c} \times 100\%$$

Trong đó: I là tỷ lệ ức chế u hạt. Tc, Tt là trọng lượng trung bình khối u hạt ở lô chứng và lô thử.

#### **2.4.3.2. Phương pháp nghiên cứu tác dụng giảm đau**

- Mẫu thử: Cao toàn phần EtOH 96% cây Tầm bóp được điều chế theo phương pháp trong mục chuẩn bị mẫu thử đánh giá hoạt tính kháng viêm *in vivo*, với liều dùng 0,6 và 1,8 g/kg.
- Bố trí thí nghiệm: Sử dụng mô hình gây đau quặn bằng acid acetic của Koster và cộng sự [118]. Chuột nhắt trắng được chia thành các lô:

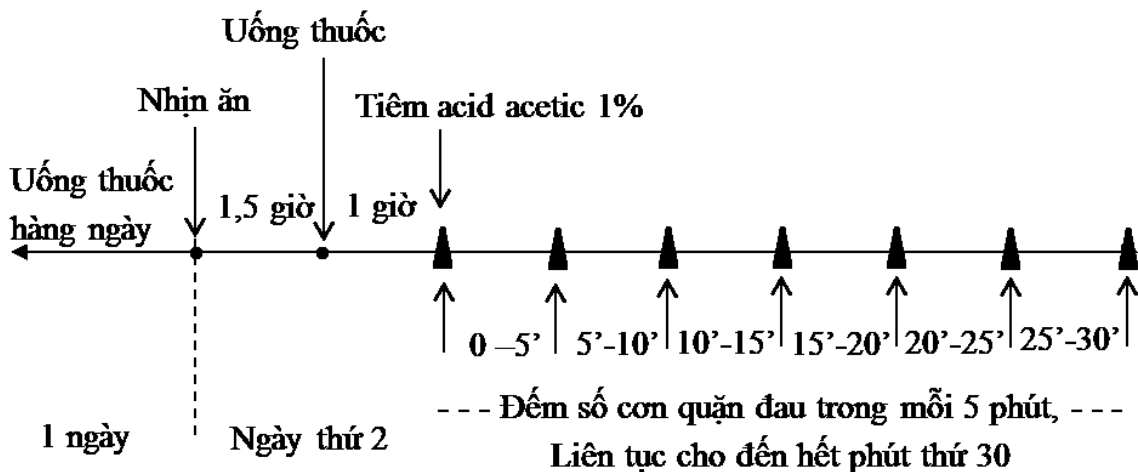
- + Lô chứng (n = 10): Uống dung môi pha mẫu thử (Na-CMC 0,5%).
- + Lô đối chiếu (n = 11): Uống aspirin pha trong Na-CMC 0,5% với liều 240 mg/kg.
- + Lô thử 1 (n = 10): Uống cao EtOH 96% Tầm bóp pha trong Na-CMC 0,5% với liều 0,6 g/kg.
- + Lô thử 2 (n = 11): Uống cao EtOH 96% Tầm bóp pha trong Na-CMC 0,5% với liều 1,8 g/kg.

Chuột được uống dung môi pha mẫu thử hoặc mẫu thử với cùng thể tích 0,1mL/10g chuột vào một giờ nhất định hàng ngày trong vòng 2 ngày trước khi làm thí nghiệm. Trước khi dùng dung môi, thuốc hoặc mẫu thử 1,5 giờ, chuột không được ăn nhưng được uống nước bình thường. Ngày thứ 2, sau uống dung môi, thuốc đối chiếu hoặc mẫu thử 1 giờ chuột được tiêm màng bụng dung dịch acid acetic 1% liều 0,1 mL/10g.

Biểu hiện của cơn đau quặn là toàn thân chuột vờn dài, hai chân sau doãi ra, uốn cong người, xoắn mình sang một bên, co thót bụng hoặc bụng chạm sát vào sàn.

So sánh kết quả giữa các lô.

Quy trình tiến hành thí nghiệm được mô tả trong hình 2.5.



**Hình 2.4. Quy trình đánh giá tác dụng giảm đau ngoại vi theo phương pháp gây đau quặn bằng acid acetic**

Đếm số cơn đau quặn trong thời gian 5 phút và trong tổng thời gian 30 phút kể từ khi tiêm acid acetic.

### 2.4.3.3. Phương pháp đánh giá tác dụng trên chuyển hóa acid béo và glucose trong tế bào gan HepG2

- Đánh giá ảnh hưởng của mẫu thử đến khả năng sống sót của tế bào HepG2 bằng phương pháp MTT để xác định nồng độ thử

Mẫu thử: Cao toàn phần EtOH 96% (TBT, 50 µg/mL), các cao phân đoạn (TBH, TBE và TBN, 50 µg/mL) được điều chế theo phương pháp mục 2.3.2.2 và các hợp chất withanolid (PA11 - PA14; 10 µM) phân lập từ Tầm bóp.

Chuẩn bị mẫu thử, nguyên tắc, cách tiến hành và cách tính kết quả: Tương tự như trong phần phương pháp đánh giá ảnh hưởng của mẫu thử đối với khả năng sống sót của tế bào RAW 264.7.

- Đánh giá tác dụng hoạt hóa AMPK, ACC, FAS và SREBP-1c trong tế bào HepG2 bằng phương pháp Western Blot

#### ❖ Nuôi cấy tế bào và ủ mẫu

- Hoạt hoá tế bào HepG2 và nuôi cấy trong môi trường DMEM đã bổ sung 10% FBS, penicillin 100 UI/mL; streptomycin 0,1 mg/mL ở 37°C trong môi trường không khí có 5% CO<sub>2</sub>. Cấy chuyên tế bào vào đĩa 6 giếng (10<sup>6</sup> tế bào/2 mL môi trường/giếng) và tiếp tục nuôi cấy trong 24 giờ. Thúc đẩy sự biệt hoá tế bào bằng 5% huyết thanh ngựa (HS).

- Thay môi trường DMEM có chứa 5% HS bằng môi trường DMEM có chứa 1% HS, tiếp tục nuôi cấy tế bào trong 24 giờ. Bổ sung mẫu thử (đã được hòa tan trong dung dịch DMSO) để đảm bảo lượng dung dịch mẫu thử được bổ sung vào các giếng như nhau (đều là 2 µL), và nồng độ cuối cùng của các mẫu thử trong các giếng tế bào như yêu cầu đối với từng bước thí nghiệm đã nêu ở trên. Ủ tế bào với mẫu thử gồm cao chiết tổng, cao phân đoạn và chất tinh khiết ở các nồng độ khác nhau (50 µg/mL đối với cao chiết tổng và cao phân đoạn và 10 µM với chất tinh khiết) trong 2h cho thử nghiệm p-AMPK và p-ACC và 6 h đối với thử nghiệm FAS và SREBP-1c.

#### ❖ Thu tế bào và chuẩn bị protein để điện di

Tế bào sau khi ủ với mẫu thử, hút loại bỏ hết môi trường nuôi cấy sau đó rửa sạch với PBS. Các tế bào được ly giải trên băng trong 30 phút trong 100 µL dung dịch ly giải [60 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% natri lauryl sulfat (SDS), 10% glycerol]. Dịch chiết tế bào sau đó được đun sôi trong 5 phút (100°C) để phá vỡ màng tế bào. Sau đó ly tâm với tốc độ 12000 vòng/phút trong 30 phút loại bỏ cặn thu lấy protein tổng số. Nồng độ dịch chiết tế bào được xác định bằng phương pháp BCA (acid bicinchoninic, Pierce, Rockford, IL). Bién tính protein bằng dung dịch SDS 5x (gồm glycerol 50%,

bromophenol 0,05%; sodium dodecyl sulfate 10%; mecarptoethanol 25%) ở 100°C trong 5 phút.

#### ❖ Điện di protein

Tiến hành điện di protein trên gel SDS - polyacrylamid 10% với dung dịch chạy điện di (running buffer: gồm glycerin 14,4g; tris base 3,03g; SDS 1g; nước cất vđ 1 lít), hiệu điện thế 120V trong 100 đến 120 phút (quan sát trên bản điện di thấy màu xanh của dung dịch tải mẫu di chuyển đến sát mép dưới bản gel thì dừng).

#### ❖ Phát hiện protein bằng phương pháp Western blot

Sau khi điện di kết thúc, protein trong gel được chuyển sang màng nitrocellulose, sau đó được ủ với kháng thể nguyên cấp (p-AMPK, p-ACC và  $\beta$ -actin). Màng sau đó được ủ thêm với kháng thể thứ cấp peroxidase liên hợp (chuột hoặc thỏ 1:4000).

- Phong bế các vị trí chưa liên kết với protein trên màng bằng sữa gầy (skim milk) 5% pha trong TBS-T (ủ màng với dung dịch sữa gầy là 1 giờ ở nhiệt độ phòng, lắc đều liên tục trong quá trình ủ).

- Nhận biết AMPK đã hoạt hóa (p-AMPK), ACC đã hoạt hóa (p-ACC), hay FAS và SREBP-1c bị ức chế,  $\beta$ -actin nằm trên màng.

Đánh giá mức độ biểu hiện của các protein cần xác định (p-AMPK và p-ACC) hoặc  $\beta$ -actin hay FAS và SREBP-1c dựa vào mật độ ánh sáng thu được tương ứng với các "dải protein" này trên phim X-quang. So sánh mật độ ánh sáng của các dải protein thu được từ lô tế bào có ủ mẫu thử với các dải protein thu được từ lô tế bào chỉ ủ với dung môi dùng để pha mẫu thử để đánh giá ảnh hưởng của các mẫu thử trên mức độ biểu hiện của các protein này. Mật độ các vết được phát hiện bằng dung dịch west femto (Thermo Scientific) và hình ảnh được phát hiện và phân tích bằng máy LICOR.

#### ➤ *Phương pháp đánh giá khả năng ức chế tích tụ lipid của chất tinh khiết phân lập từ Tầm bốp trên tế bào HepG2 bằng thử nghiệm Nile Red*

Mẫu thử: Hai hợp chất **PA12** và **PA14** ở mức liều 10  $\mu$ M.

Dung dịch nhuộm Nile Red (9-(diethylamino)-5H-benzo[a]phenoxazin-5-on, 1 mM) được điều chế bằng cách hòa tan 318  $\mu$ g/mL Nile Red trong DMSO và được lọc qua bộ lọc ống tiêm 0,22  $\mu$ m (Göttinger, Đức) để giảm nền huỳnh quang. Dung dịch Nile Red sau đó được pha trong dung dịch đẳng trương (dung dịch đệm FACS của BD) đến nồng độ cuối cùng là 10  $\mu$ M và được bảo vệ khỏi ánh sáng.

Các tế bào HepG2 nồng độ  $0,5 \times 10^6$  / mL được nuôi cấy trên các phiến kính hiển vi thủy tinh phủ FN sau khi vẽ một vòng tròn xấp xỉ 1,5 cm bằng bút chì kỵ nước DAKO (Dako, Heverlee, Bỉ) được ủ trong 1 giờ ở 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, sau đó các tế bào

bám dính được cố định với nồng độ 4% formaldehyd và thấm trong 5 phút với 0,1% Triton-X100 và được ủ với thuốc nhuộm lipid Nile Red (1 µg/mL; N3013-100MG, Sigma Aldrich, Zwijndrecht, Hà Lan) trong 15 phút. Các tế bào được rửa trong PBS (pH 7,4) và được gắn huỳnh quang (Dako, Heverlee, Bỉ). Hình ảnh tế bào được chụp bằng kính hiển vi soi nổi của Zeiss (Đức).

#### **2.4.3.4. Phương pháp đánh giá hoạt tính gây độc trên một số dòng tế bào ung thư *in vitro***

Phương pháp thử độ độc tế bào *in vitro* được Viện Ung thư Quốc gia Hoa Kỳ (National Cancer Institute - NCI) xác nhận là phép thử độ độc tế bào chuẩn nhằm sàng lọc, phát hiện các chất có khả năng kìm hãm sự phát triển hoặc diệt tế bào ung thư ở điều kiện *in vitro*. Theo tiêu chuẩn của NCI, cao chiết được coi có hoạt tính tốt với  $IC_{50} \leq 20$  µg/mL, trong khi chất tinh khiết được coi có hoạt tính tốt khi  $IC_{50} \leq 5$  µM [119].

Các dòng tế bào sử dụng trong nghiên cứu: Tế bào ung thư SNU-1, 4T1, LLC, Hep3B, NTERA-2 và tế bào biểu mô phôi thận người HEK-293A.

#### **➤ Phương pháp đánh giá tác dụng gây độc trên một số dòng tế bào ung thư *in vitro* của cao chiết**

Phép thử này được thực hiện theo phương pháp của Skehan và cộng sự (1990) [120]. Phép thử tiến hành xác định hàm lượng protein tế bào tổng số, dựa vào mật độ quang (OD) đo được khi thành phần protein của tế bào được nhuộm bằng sulforhodamin B (SRB). Giá trị OD máy đo được tỉ lệ thuận với lượng SRB gắn với phân tử protein, do đó lượng tế bào càng nhiều (lượng protein càng nhiều) thì giá trị OD càng lớn.

Mẫu thử: Cao toàn phần EtOH 96% (TBT), các cao phân đoạn (TBH, TBE và TBN) được điều chế theo phương pháp mục 2.4.2.2 và được thử nghiệm ở các nồng độ 100 - 20 - 4 - 0,8 µg/mL.

Phép thử được thực hiện trong điều kiện cụ thể như sau:

+ Trypsin hóa tế bào thí nghiệm để làm rời tế bào và đếm trong buồng đếm để điều chỉnh mật độ cho phù hợp với thí nghiệm. Tiến hành đưa 190 µL tế bào vào đĩa 96 giếng để thử nghiệm.

+ Mẫu thử được hòa tan trong DMSO 100% để có nồng độ ban đầu (stock) là 20 mM. Tiến hành pha loãng mẫu trên đĩa 96 giếng bằng môi trường nuôi cấy tế bào (không có FBS) thành 4 dãy nồng độ từ cao xuống thấp. Chất thử đã pha loãng ở các nồng độ (10 µL) được đưa vào các giếng của đĩa 96 giếng đã chuẩn bị tế bào ở trên.



Giếng không có chất thử nhưng có tế bào ung thư (190  $\mu$ L) + DMSO 1% (10  $\mu$ L) sẽ được sử dụng làm đối chứng ngày 0. Sau 1 giờ, giếng đối chứng ngày 0 tế bào sẽ được cố định bằng Trichloroacetic acid - TCA 20%.

+ Ủ trong tủ ấm 72 giờ. Sau 72 giờ, tế bào được cố định bằng TCA trong 1 giờ, được nhuộm bằng SRB trong 30 phút ở 37°C, rửa 3 lần bằng acetic acid rồi để khô ở nhiệt độ phòng.

+ 10 mM unbuffered Tris base để hòa tan lượng SRB, lắc nhẹ trong 10 phút rồi đọc kết quả OD ở bước sóng 540 nm trên máy ELISA Plate Reader (Biotek).

+ Phần trăm ức chế sự phát triển của tế bào khi có mặt chất thử sẽ được xác định thông qua công thức sau:

$$\% \text{ Ức chế} = 100\% - \frac{OD_{(\text{chất thử})} - OD_{(\text{ngày 0})}}{OD_{(\text{đối chứng âm})} - OD_{(\text{ngày 0})}} \times 100$$

+ Phép thử được lặp lại 3 lần để đảm bảo tính chính xác. Ellipticin ở các nồng độ 10 - 2 - 0,4 - 0,08  $\mu$ g/mL được sử dụng là chất đối chứng dương.

+ DMSO 1% luôn được sử dụng như đối chứng âm (nồng độ cuối cùng trong giếng thử là 0,05%).

+ Giá trị IC<sub>50</sub> (nồng độ ức chế 50% sự phát triển) sẽ được xác định nhờ vào phần mềm máy tính TableCurve 2Dv4.

➤ *Phương pháp đánh giá tác dụng gây độc trên một số dòng tế bào ung thư in vitro của các hợp chất withanolid phân lập được*

Phương pháp thử tương tự như mục “Đánh giá ảnh hưởng của mẫu thử đến khả năng sống sót của tế bào RAW 264.7 bằng phương pháp MTT để xác định nồng độ thử”

❖ **Mẫu thử:** Mẫu nghiên cứu là các hợp chất withanolid (**PA11 - PA14**) phân lập từ Tầm bóp.

❖ **Chuẩn bị mẫu**

Các mẫu được pha bằng dung dịch **DMSO** và lắc vortex ở tốc độ 300 - 500 vòng/phút trong 1 - 2 phút cho đến khi dịch chiết đồng đều trong DMSO. Nồng độ các chất tinh khiết là 1, 3, 10, 20, 30  $\mu$ g/mL với thể tích là 500  $\mu$ L cho mỗi mẫu thử. Nồng độ của doxorubicin được pha là 0,1, 0,3, 1, 3 và 10  $\mu$ M. Các mẫu được lưu giữ ở nhiệt độ -20 độ trong tủ lạnh.

❖ **Tính kết quả**

Khả năng sống sót của tế bào được tính toán theo công thức tương tự như đối với tế bào RAW 264.7.

Sử dụng chương trình GraphPad Prism 5.0 để tính giá trị  $IC_{50}$  (nồng độ ức chế 50% tế bào ung thư) theo công thức:

$$Y = 100 / (1 + 10^{(X - \text{Log}IC_{50})})$$

Trong đó: X là nồng độ mẫu thử; Y là % tế bào sống sót; doxorubicin được sử dụng như là chất đối chứng dương.

## 2.5. XỬ LÝ SỐ LIỆU

Số liệu định lượng được trình bày dưới dạng  $M \pm SE$  (M: giá trị trung bình từng lô; SE: sai số chuẩn). Dữ liệu được phân tích bằng phần mềm GraphPad Prism 5.

Phân tích thống kê được thực hiện bằng t-test (đối với những nghiên cứu so sánh 2 lô) hoặc bằng Phân tích phương sai một chiều (one way ANOVA, đối với những nghiên cứu so sánh nhiều hơn 2 lô). Sự khác biệt giữa các lô đánh giá được coi là có ý nghĩa khi  $p < 0,05$ .

## CHƯƠNG 3

### KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

#### 3.1. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VỀ THỰC VẬT CỦA TẦM BÓP

##### 3.1.1. Mô tả đặc điểm hình thái và giám định tên khoa học của Tầm bóp

###### *Đặc điểm hình thái*

Cây cỏ sống hằng năm, cao tới 1 m; thân rỗng, thiết diện hình tứ giác, phân cành nhiều, cành mọc cùng chỗ với lá. Thân màu xanh, có lông rất ngắn, lông nhiều ở cạnh.

Lá đơn, mọc cách, cuống dài 3 - 10 cm, rộng khoảng 0,3 cm, có lông cứng, nhiều hơn ở mặt trên cuống, mặt trên nổi ở giữa, có 2 cánh ngắn ở hai bên cuống; phiến lá hình trứng, 7 - 10 x 4 - 6 cm, hai mặt nhẵn hoặc có lông rất thưa; gốc lá hình nêm hoặc hơi tròn, đôi khi lệch; mép lá nguyên hoặc có răng cưa thưa, không đều; gốc lá nhọn; gân hình lông chim, 6 - 7 đôi, nổi ở mặt dưới, lõm ở mặt trên, trên gân phủ lông.

Hoa đơn độc, mọc ở nách lá, lưỡng tính, mẫu 5; cuống hoa dài 1,3 - 1,4 cm, xanh ở phần dưới, nâu đỏ phần trên, phủ lông hướng lên. Đài hoa 5, màu xanh, hàn liền thành ống ở phần nửa dưới, cao khoảng 5 mm, chia thành 5 thùy hình tam giác ở phần nửa trên, mỗi thùy có một gân chính màu nâu đỏ phần dưới, xanh ở phần trên; mặt ngoài đài phủ lông trắng, mặt trong nhẵn, trừ ở phần thùy, mép thùy có lông; tràng hoa 5, hàn liền, màu vàng nhạt, dài 0,9 cm, thùy tràng hình tam giác rộng, mặt ngoài trắng phủ lông dày, mặt trong phủ lông thưa, có các đốm nâu ở họng tràng, lông mọc dày trên các đốm nâu. Nhị 5, rời nhau, hàn liền với phần ống tràng ở dưới, phần hàn liền khoảng 1 mm; chỉ nhị dài 5 - 6 mm, nhẵn, màu xanh vàng ở dưới, hơi nâu ở phần trên; bao phấn 2 ô, khoảng 2 mm, màu xanh nhạt, đính gốc, nứt dọc. Bầu trên, 2 mm x 2 mm, 2 ô, 2 lá noãn hàn liền, đính noãn trung trụ, noãn nhiều ở mỗi ô; vòi nhụy dài 5,5 mm, nhẵn, núm nhụy 1, hơi xanh.

Quả mọng, hình gần cầu, đường kính khoảng 1 cm; cuống quả dài khoảng 2 cm, quả phát triển ở trong đài đồng trường; đài đồng trường khoảng 3 cm x 2 cm, mặt ngoài có lông, mặt trong nhẵn, hình ngũ giác, với 5 gờ chính và 5 gờ phụ màu tím. Hạt nhiều, dẹt, khoảng 1,5 mm (**Hình 3.1**).



**Hình 3.1. Đặc điểm hình thái cây Tâm bóp (*Physalis angulata* L.)**

*a:* Cành mang hoa, quả; *b:* Thân có cạnh; *c:* Mặt cắt thân; *d:* Cuống lá; *e:* Mặt cắt cuống lá; *f:* Lá; *g:* Mặt dưới lá; *h:* Mặt trên lá; *i:* Hoa ở các mức độ trưởng thành khác nhau; *j-k:* Hoa; *l:* Mặt ngoài đài; *m:* Mặt trong đài; *n:* Mặt trong tràng hoa; *o:* Mặt ngoài tràng hoa; *p:* Tràng hoa; *q:* Bộ nhụy; *r:* Bầu cắt ngang; *s:* Nhị; *t:* Quả ở các mức trưởng thành khác nhau; *u:* Đài (góc và ngọn); *v:* Đài đồng trưởng bao quanh quả; *w:* Quả; *x:* Quả cắt ngang; *y:* Hạt. (Độ phóng đại 10x và 40x)

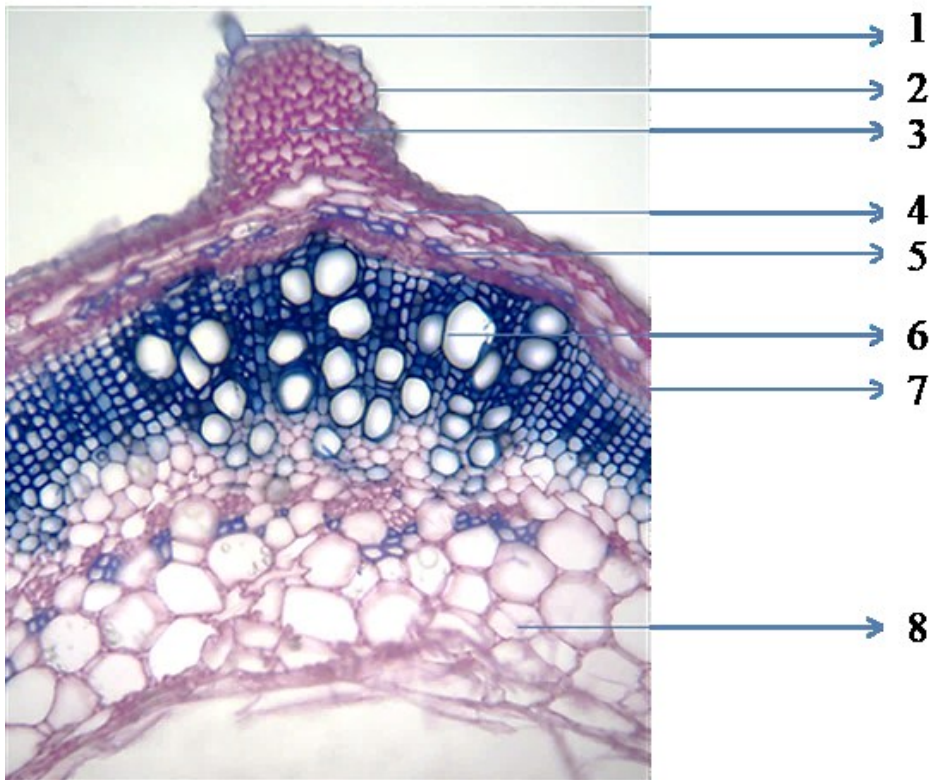
### **Xác định tên khoa học**

Căn cứ vào các đặc điểm của tiêu bản đã thu thập (về thân, lá, hoa, quả) đối chiếu với khóa phân loại và bản mô tả trong các tài liệu [4], [5], [11] [12], [13], [14], mẫu Tầm bóp được xác định tên khoa học là *Physalis angulata* L. (họ Cà - Solanaceae).

### **3.1.2. Đặc điểm vi học**

#### **3.1.2.1. Đặc điểm giải phẫu thân**

Mặt cắt tiêu bản hình tròn có 4 góc lồi, từ ngoài vào trong có: (2) Biểu bì gồm 1 lớp tế bào hình đa giác phía ngoài hóa cutin, rải rác có lông che chở đơn bào (1). Mô dày nằm ngay sát lớp biểu bì (3), ở các góc lồi có nhiều lớp tế bào mô dày, các tế bào có thành dày lên ở các góc tiếp xúc với nhau, ở những chỗ còn lại chỉ có 2 lớp tế bào mô dày. Mô mềm vỏ (4) gần như không nhìn rõ, các tế bào bị ép bẹp. Xen kẽ trong mô mềm vỏ có các mô cứng nằm rải rác (5). Libe gỗ xếp liên tiếp tạo thành vòng tròn khép kín gồm libe ở phía ngoài (7) và gỗ ở phía trong (6). Trong cùng là mô mềm ruột cấu tạo bởi các tế bào hình đa giác có kích thước lớn, xếp lộn xộn với nhau để hở các khoảng gian bào (8) (**Hình 3.2**).



**Hình 3.2. Vi phẫu thân cây Tầm bóp**

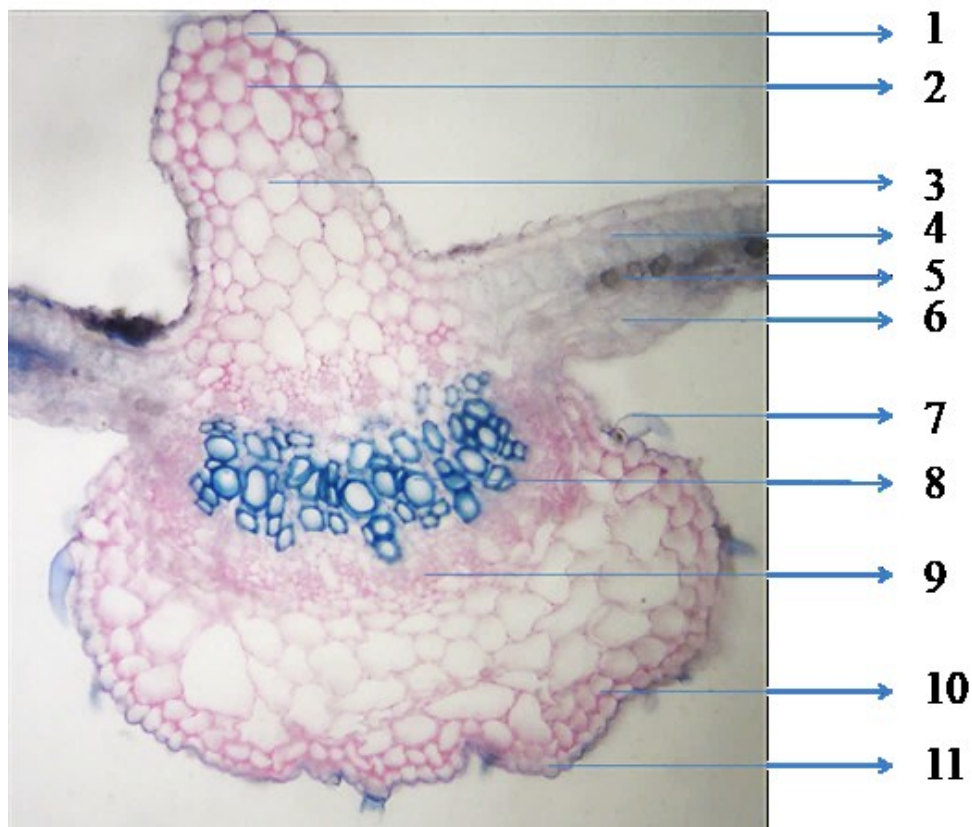
1-Lông che chở; 2-Biểu bì; 3-Mô dày; 4-Mô mềm vỏ; 5-Mô cứng; 6-Gỗ; 7-Libe; 8-Mô mềm ruột.



### 3.1.2.2. Đặc điểm giải phẫu lá

**Gân lá:** Lồi lên cả hai phía. Ngoài cùng là biểu bì trên (1) và biểu bì dưới (11) được cấu tạo bởi một hàng tế bào hình tròn xếp đều đặn, màng ngoài hóa cutin, có lông che chở đa bào (8). Ngay dưới hàng biểu bì trên và biểu bì dưới là lớp mô dày được cấu tạo bởi 2 hàng tế bào thành dày (2, 10). Tiếp đến là mô mềm cấu tạo bởi các tế bào kích thước lớn nhất, thành mỏng, hình đa giác, sắp xếp lộn xộn, tạo thành các khoảng gian bào (3). Bó libe-gỗ sắp xếp liên tục khép kín gồm libe ở ngoài (9) và gỗ ở trong (7) (**Hình 3.3**).

**Phiến lá:** Biểu bì trên và biểu bì dưới cấu tạo bởi một hàng tế bào hình chữ nhật xếp đều đặn. Nằm ngay dưới lớp biểu bì trên là mô giậu gồm một hàng tế bào hình chữ nhật xếp đều đặn nhau (4). Rải rác có các tinh thể calci oxalat hình cầu gai trong mô khuyết (5). Cuối cùng là hạ bì dưới nằm sát biểu bì dưới (6) (**Hình 3.3**).



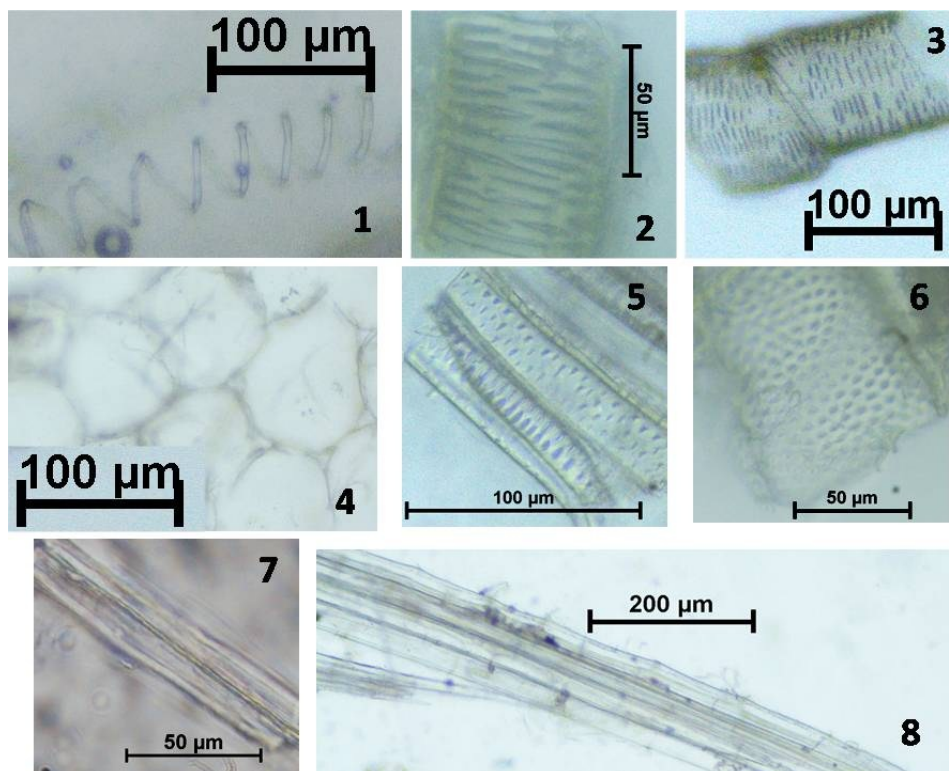
**Hình 3.3. Vi phẫu lá cây Tầm bóp**

1-Biểu bì trên; 2-Mô dày trên; 3-Mô mềm; 4-Mô giậu; 5-Tinh thể calci oxalat hình cầu gai; 6-Hạ bì dưới; 7-Gỗ; 8-Lông che chở đa bào; 9-Libe; 10-Mô dày dưới; 11-Biểu bì dưới.

### 3.1.3. Đặc điểm bột dược liệu

#### 3.1.3.1. Đặc điểm bột thân

Bột màu xám, không mùi, vị hơi đắng. Soi trên kính hiển vi thấy các đặc điểm sau: Mảnh mạch xoắn (1), mảnh mạch vạch (2, 3), mảnh mạch điểm (5, 6), mảnh mô mềm gồm các tế bào kích thước lớn, thành mỏng, xếp lộn xộn nhau (4), sợi và bó sợi (7, 8) (**Hình 3.4**).

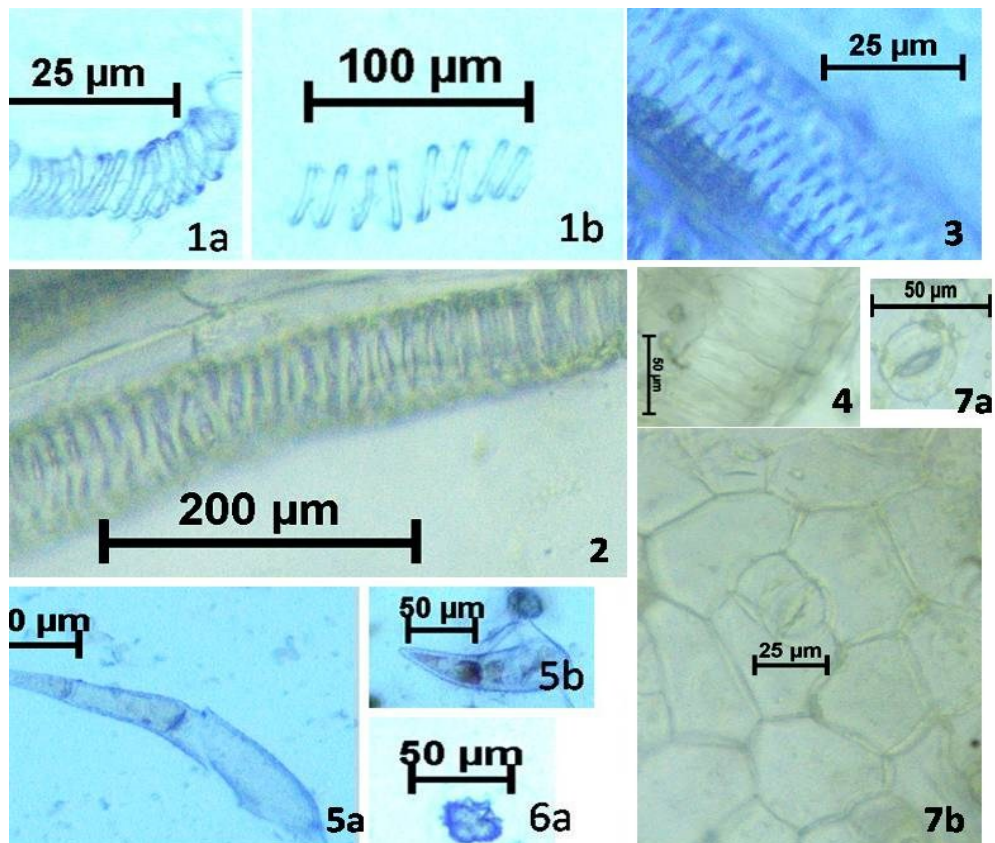


**Hình 3.4. Đặc điểm bột thân cây Tầm bóp**

*1-Mạch xoắn; 2,3-Mạch vạch; 4-Mô mềm; 5,6-Mạch điểm; 7,8-Sợi và bó sợi*

#### 3.1.3.2. Đặc điểm bột lá

Bột màu xám, không mùi, vị đắng. Soi trên kính hiển vi thấy các đặc điểm sau: Lỗ khí và mảnh biểu bì mang lỗ khí (7a, 7b), mô giậu gồm các tế bào hình chữ nhật xếp thẳng hàng nhau (4), mảnh mạch xoắn (1a, 1b), mảnh mạch vạch (2), mảnh mạch điểm (3), mảnh mô mềm gồm các tế bào kích thước lớn, thành mỏng, xếp lộn xộn, lông che chở đa bào (5a, 5b) và tinh thể calci oxalat hình cầu gai (6a) (**Hình 3.5**).



**Hình 3.5. Đặc điểm bột lá cây Tâm bốp**

*1a, 1b-Mạch xoắn; 2-Mạch vạch; 3-Mạch điểm; 4-Mô giậu; 5a, 5b-Lông che chở; 6a-Tinh thể calci oxalat hình cầu gai; 7a, 7b-Lỗ khí và mảnh biểu bì chứa lỗ khí.*



## 3.2. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VỀ THÀNH PHẦN HÓA HỌC CỦA TẦM BÓP

### 3.2.1. Định tính

Kết quả định tính các nhóm chất hữu cơ trong cây Tầm bóp bằng phản ứng hóa học được chỉ ra ở **bảng 3.1**.

**Bảng 3.1. Kết quả định tính các nhóm chất trong Tầm bóp bằng các phản ứng hóa học**

STT	Nhóm chất	Phản ứng định tính	Kết quả	Kết luận
1	Alcaloid	Phản ứng với thuốc thử Mayer	+	Có
		Phản ứng với thuốc thử Dragendorff	+	
		Phản ứng với thuốc thử Bouchardat	+	
2	Flavonoid	Phản ứng cyanidin	++++	Có
		Phản ứng diazo hóa	+++	
		Phản ứng với kiềm loãng	+++	
		Phản ứng với dung dịch FeCl <sub>3</sub> 5%	+++	
3	Saponin	Phản ứng tạo bọt	+	Có
		Salkowski	+	
		Liebermann-Burchard	+	
4	Glycosid tim	Phản ứng Liebermann-Burchard	-	Có
5	Coumarin	Phản ứng mở vòng lacton	++	Có
		Phản ứng diazo hóa	+	
6	Tannin	Phản ứng với dung dịch FeCl <sub>3</sub> 5%	++	Có
		Phản ứng với chì acetat 10%	+	
		Phản ứng với dung dịch gelatin 1%	+	
7	Acid hữu cơ	Phản ứng với Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	++	Có

8	Đường khử	Phản ứng với thuốc thử Fehling	++	Có
9	Acid amin	Phản ứng với thuốc thử Ninhydrin	+	Có
10	Polysaccharid	Phản ứng với thuốc thử Lugol	++	Có
11	Caroten	Phản ứng với H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> đặc	+++	Có
12	Chất béo	Vết mờ trên giấy lọc	+	Có

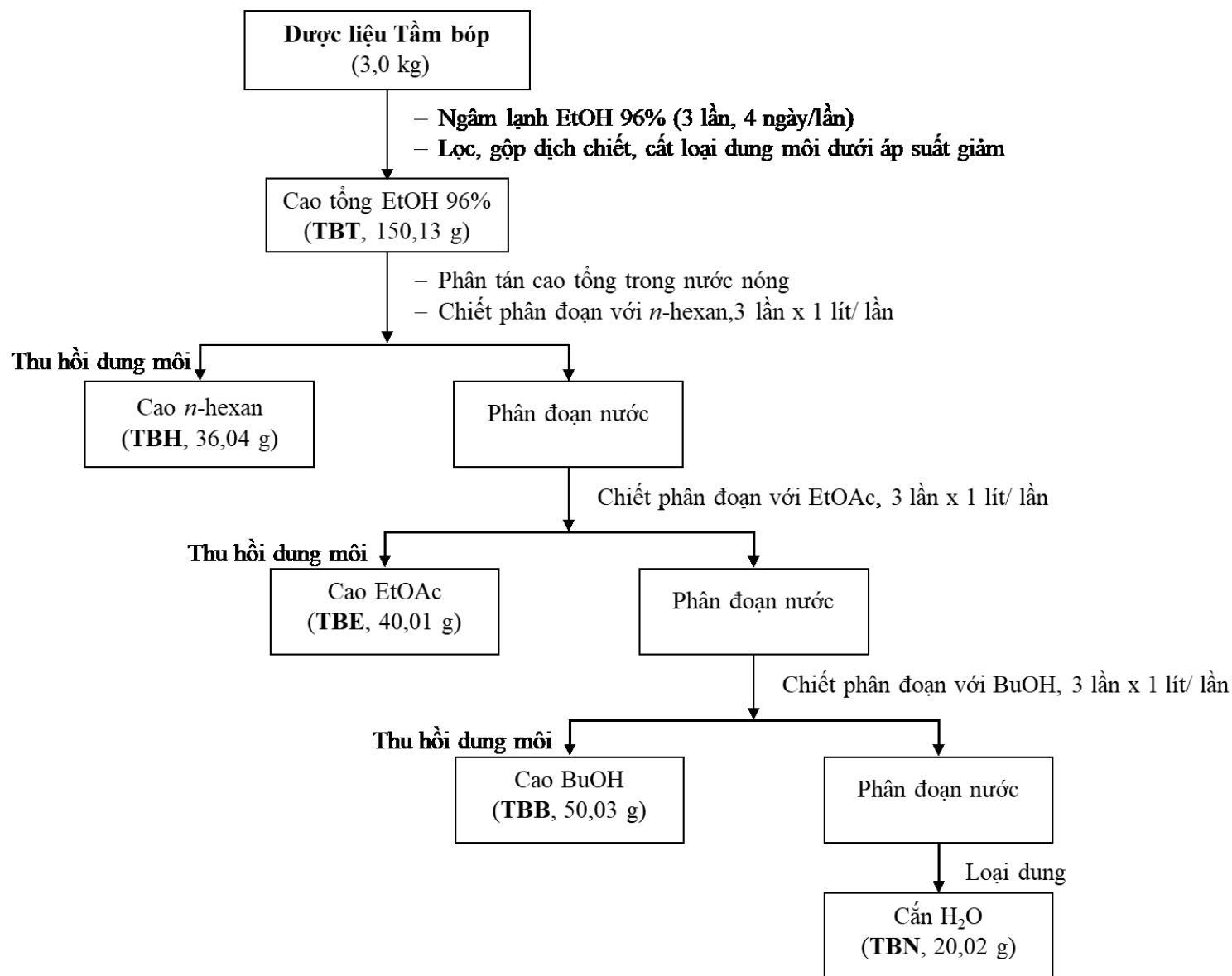
**Ghi chú:** (-) âm tính, (+) dương tính, (++) dương tính rõ, (+++) dương tính rất rõ, (++++) dương tính đặc biệt rõ.

**Nhận xét:** Hầu hết các nhóm hợp chất hữu cơ đều có mặt trong cây Tâm bóp trừ nhóm glycosid tim.

### 3.2.2. Chiết xuất, phân lập và xác định cấu trúc của các hợp chất

#### 3.2.2.1. Chiết xuất, phân lập các hợp chất

Bột dược liệu Tâm bóp (3 kg) được ngâm với EtOH 96% ở nhiệt độ phòng 3 lần, mỗi lần 4 ngày. Lọc loại bã, gộp dịch lọc và cất thu hồi dung môi dưới áp suất giảm thu được 150,13 g cao toàn phần EtOH 96% (**TBT**). Phân tán cao toàn phần trong nước nóng và chiết lỏng - lỏng với các dung môi có độ phân cực tăng dần: *n*-hexan, EtOAc và BuOH (mỗi dịch chiết 3 lần, tỉ lệ 1:1). Cất thu hồi dung môi dưới áp suất giảm thu được 36,04 g cao *n*-hexan (**TBH**), 40,01 g cao EtOAc (**TBE**), 50,03 g cao BuOH (**TBB**) và 20,02 g cặn nước (**TBN**). Quy trình chiết xuất cao được thể hiện qua sơ đồ 3.1.



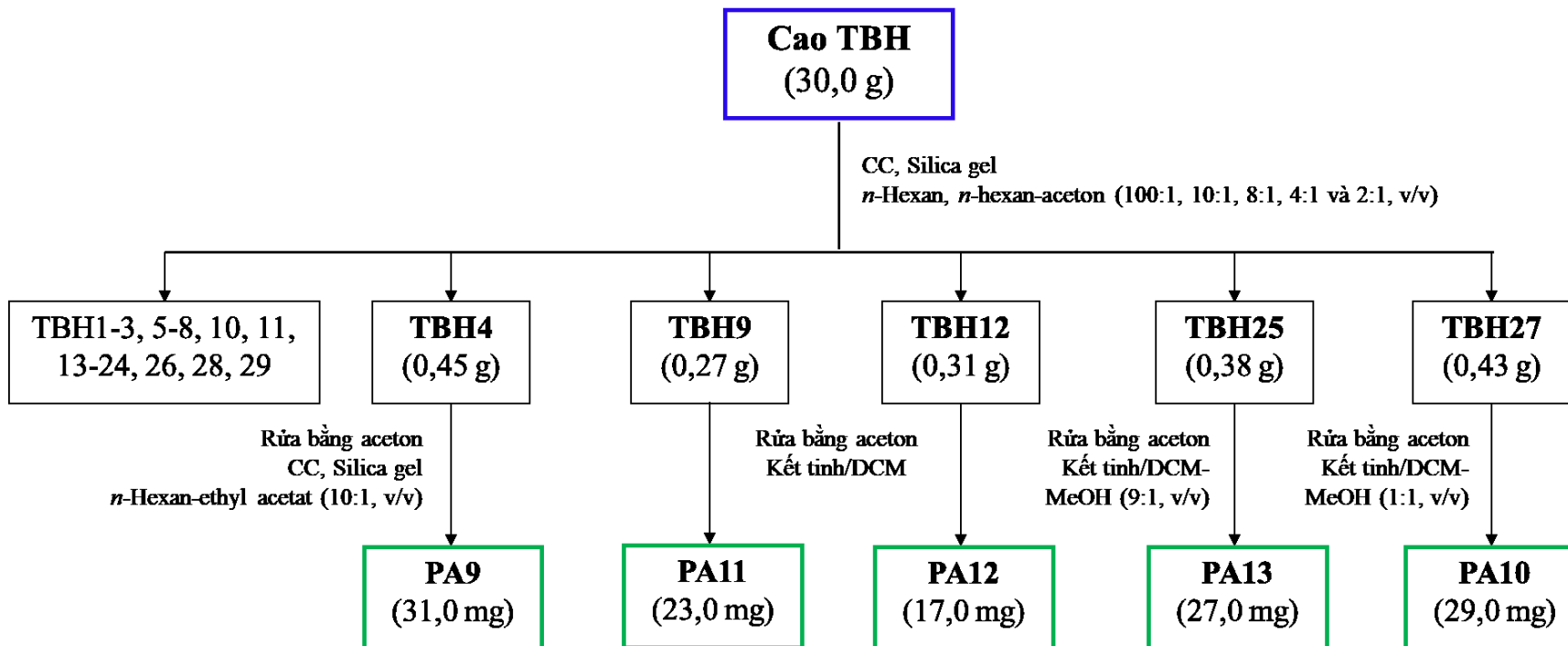
**Sơ đồ 3.1. Tóm tắt quá trình chiết xuất cao từ Tầm bóp**

Cao **TBH** (30,0 g) được phân tách bằng sắc ký cột silica gel, rửa giải với *n*-hexan và hệ dung môi gradient *n*-hexan-aceton (100:1, 10:1, 8:1, 4:1 và 2:1, v/v) thu được 29 phân đoạn (TBH1 - TBH29). Phân đoạn TBH4 (0,45 g) được rửa bằng aceton sau đó tiếp tục tinh chế trên silica gel, rửa giải với hệ dung môi *n*-hexan-EtOAc (10:1, v/v) thu được hợp chất **PA9** (31 mg). Các phân đoạn TBH9 (0,27 g) và TBH12 (0,31 g) lần lượt được rửa bằng aceton, sau đó kết tinh lại trong DCM thu được 2 hợp chất tương ứng là **PA11** (23 mg) và **PA12** (17 mg). Phân đoạn TBH25 (0,38 g) và TBH27 (0,43 g) cũng được rửa với aceton sau đó kết tinh lại lần lượt trong hệ DCM-MeOH (9:1/1:1, v/v) thu được 2 hợp chất tương ứng là **PA15** (27 mg) và **PA10** (29 mg).

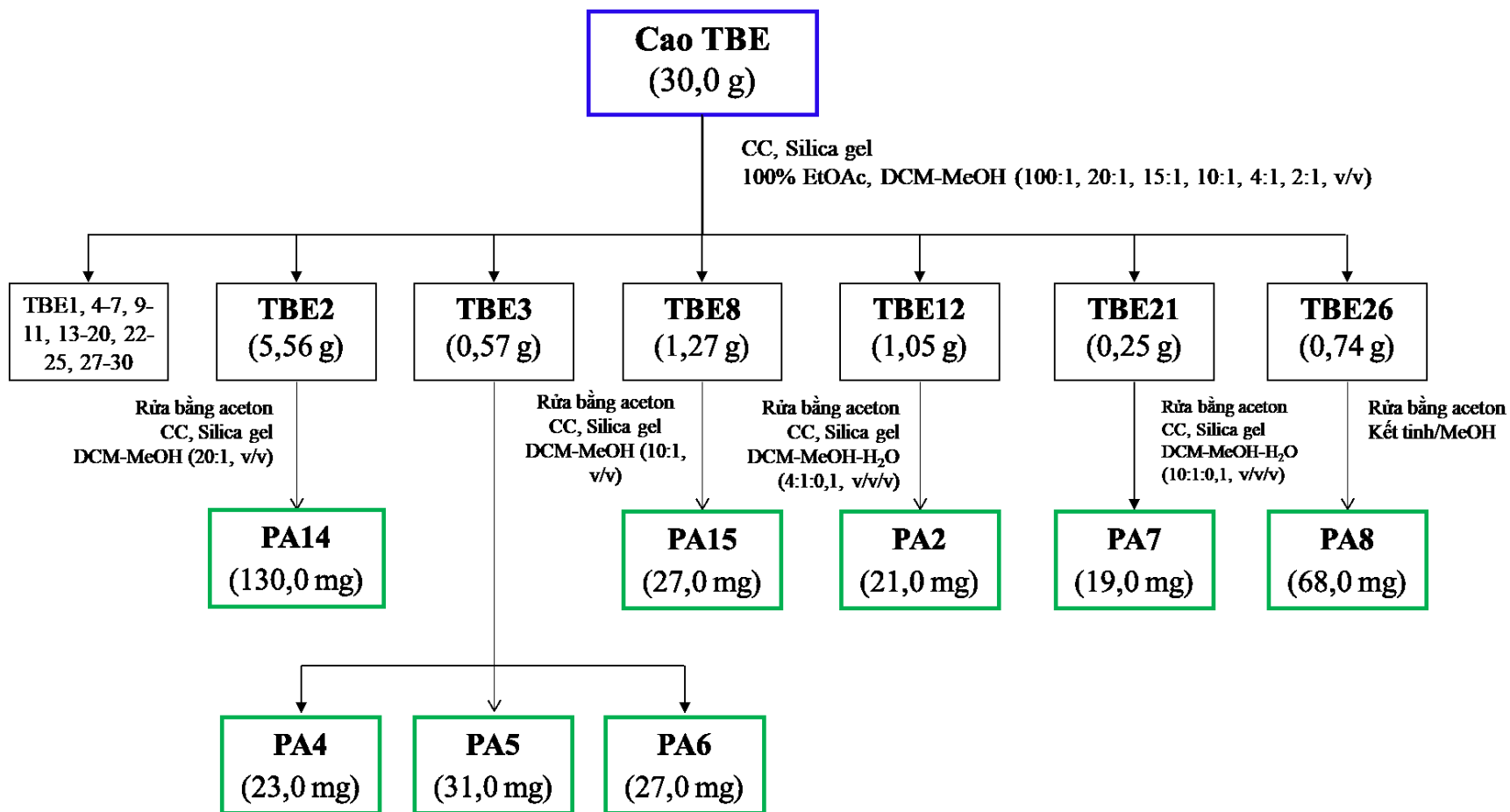
Cao **TBE** (30,0 g) được phân tách bằng sắc ký cột silica gel, rửa giải bằng EtOAc và hệ dung môi gradient DCM-MeOH (100:1, 20:1, 15:1, 10:1, 4:1, 2:1, v/v) thu được 30 phân đoạn (TBE1 - TBE30). Phân đoạn TBE2 (5,56 g) được rửa bằng aceton sau đó tiếp tục tinh chế bằng sắc ký cột silica gel, rửa giải với hệ DCM-MeOH (20:1, v/v) thu được hợp chất **PA13** (130 mg). Tương tự, phân đoạn TBE3 (0,57 g) cũng được rửa bằng aceton sau đó tinh chế bằng sắc ký cột silica gel, rửa giải với hệ DCM-MeOH (10:1, v/v) thu được 3 hợp chất **PA4** (23,0 mg), **PA5** (31,0 mg) và **PA6** (27,0 mg). Tiến hành các phương pháp tương tự đối với phân đoạn TBE8 (1,27 g) cũng thu được hợp chất **PA14** (27,0 mg). Hợp chất **PA2** (21,0 mg) thu được từ phân đoạn TBE12 (1,05 g) bằng cách rửa với aceton sau đó tiếp tục tinh chế trên sắc ký cột silica gel, rửa giải với hệ dung môi DCM-MeOH-H<sub>2</sub>O (4:1:0,1, v/v/v). Phân đoạn TBE21 (0,25 g) được rửa bằng aceton sau đó được tinh chế bằng sắc ký cột silica gel, rửa giải với hệ DCM-MeOH-H<sub>2</sub>O (10:1:0,1, v/v/v) thu được hợp chất **PA7** (19,0 mg). Phân đoạn TBE26 (0,74 g) được rửa bằng aceton sau đó được kết tinh lại trong MeOH thu được hợp chất **PA8** (68,0 mg).

Cẩn **TBN** (19,0 g) được phân bố lại trong MeOH cho hai phần TBN1 (không tan trong MeOH) và TBN2 (tan trong MeOH). TBN2 (15,36 g) được phân tách bằng sắc ký cột silica gel, rửa giải sắc ký với EtOAc và hệ dung môi gradient EtOAc-MeOH (10:1, 4:1, 2:1 và 1:1, v/v) thu được 5 phân đoạn (TBN2.1 - TBN2.5). Phân đoạn TBN2.1 được rửa bằng aceton thu được hợp chất **PA1** (12,0 mg). Phân đoạn TBN2.2 cũng được rửa bằng aceton và thu được hợp chất **PA3** (18,0 mg).

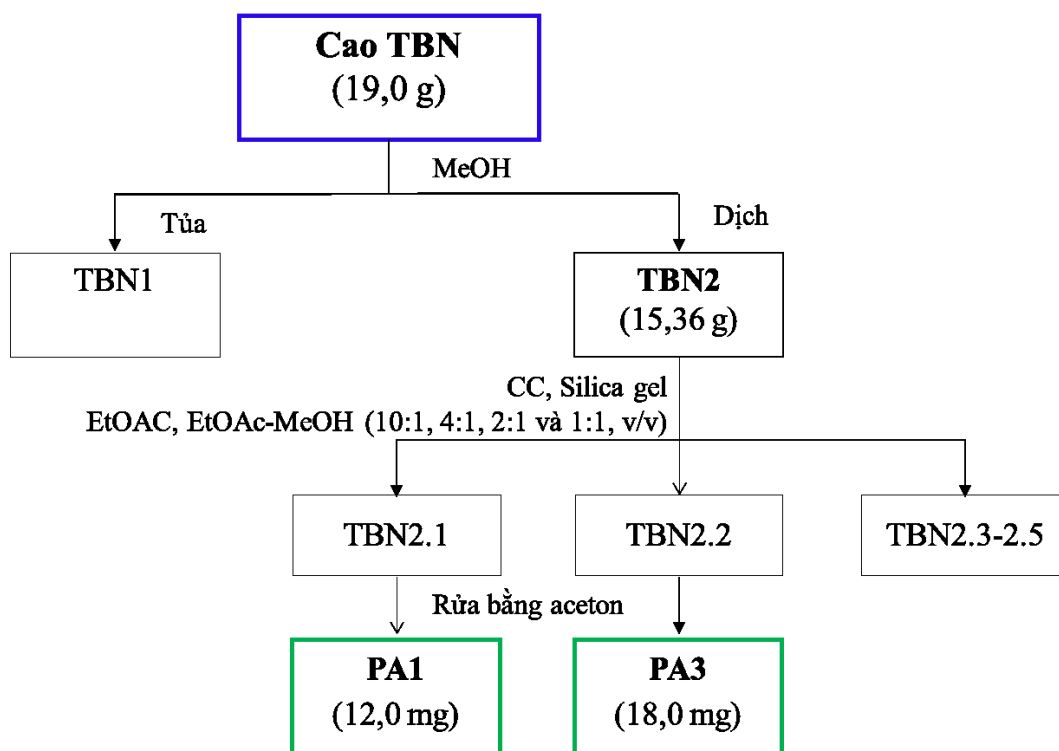
Quy trình phân lập các hợp chất từ Tầm bóp được tóm tắt trong sơ đồ 3.2-3.4.



Sơ đồ 3.2. Tóm tắt quá trình phân lập các hợp chất từ cao *n*-hexan của Tầm bóp



Sơ đồ 3.3. Tóm tắt quá trình phân lập các hợp chất từ cao EtOAc của Tầm bóp



### Sơ đồ 3.4. Tóm tắt quá trình phân lập các hợp chất từ cặn nước của Tầm bóp

Phân đoạn cao *n*-BuOH cũng được nghiên cứu phân lập các hợp chất, nhưng do nhiều tạp chất, nên việc phân lập không thu được kết quả. Do vậy, việc nghiên cứu sàng lọc các hoạt tính sinh học cũn không được thực hiện trong phạm vi nghiên cứu của luận án.

#### 3.2.2.2. Xác định cấu trúc của các hợp chất

##### ✚ Hợp chất PA1

Hợp chất **PA1** thu được dưới dạng chất rắn màu trắng. Phổ ESI-MS xuất hiện pic ion giả phân tử tại  $m/z$  179,0  $[M-H]^-$  phù hợp với công thức phân tử là  $C_9H_8O_4$ . Phổ  $^1H$ -NMR (500 MHz,  $CD_3OD$ ) và  $^{13}C$ -NMR (125 MHz,  $CD_3OD$ ): **Bảng 3.2**.

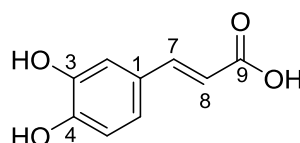
**Bảng 3.2. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất PA1**

Vị trí	$\# \delta_C$	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ (mult., Hz)
1	127,8	127,8	-
2	114,8	115,1	7,05 (1H, d, $J = 2,0$ Hz)
3	147,0	146,8	-
4	149,8	149,5	-
5	116,7	116,5	6,80 (1H, d, $J = 8,0$ Hz)
6	123,0	122,8	6,95 (1H, dd, $J = 2,0; 8,0$ Hz)

7	147,3	147,0	7,55 (1H, d, $J = 16,0$ Hz)
8	115,7	115,6	6,23 (1H, d, $J = 16,0$ Hz)
9	171,4	171,0	-

<sup>a</sup> CD<sub>3</sub>OD, <sup>b</sup> 125 MHz, <sup>c</sup> 500 MHz, <sup>#</sup> phổ <sup>13</sup>C-NMR của acid caffeic đo trong CD<sub>3</sub>OD [121]

Phổ <sup>1</sup>H-NMR (**Bảng 3.2**) xuất hiện 3 tín hiệu tương tác ABX ở  $\delta_H$  7,05 (1H, d,  $J = 2,0$  Hz, H-2), 6,80 (1H, d,  $J = 8,0$  Hz, H-5) và 6,95 (1H, dd,  $J = 2,0; 8,0$  Hz, H-6). Ngoài ra, trên phổ proton còn xuất hiện tín hiệu của một nối đôi có cấu hình *trans* được xác định bởi hai proton chuyển dịch về trường thấp ở  $\delta_H$  6,23 (1H, d, H-8), 7,55 (1H, d, H-7) với hằng số tương tác lớn  $J = 16,0$  Hz. Phổ <sup>13</sup>C-NMR (**Bảng 3.2**) và DEPT cho thấy tín hiệu của 9 carbon, trong đó tín hiệu carbon ở  $\delta_C$  171,0 (C-9) đặc trưng cho gốc acid carboxylic. Các tín hiệu tại  $\delta_C$  146,8 (C-3) và 149,5 (C-4) cho thấy vòng thơm đã bị thế bởi nhóm hydroxy. Từ các dữ kiện phổ trên kết hợp với tài liệu tham khảo [121] có thể kết luận hợp chất **PA1** là dẫn xuất 3,4-dihydroxy của acid cinnamic hay tên gọi khác là **acid caffeic (Hình 3.6)**.



**Hình 3.6. Cấu trúc của hợp chất PA1**

#### Hợp chất PA2

Hợp chất **PA2** thu được dưới dạng tinh thể hình kim màu trắng. Phổ ESI-MS xuất hiện pic ion giả phân tử tại  $m/z$  195,0  $[M+H]^+$ , 193,0  $[M-H]^-$  phù hợp với công thức phân tử là C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub>. Phổ <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) và <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD): **Bảng 3.3**.

**Bảng 3.3. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất PA2**

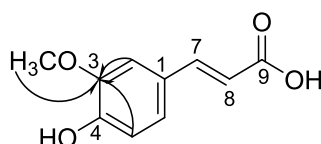
Vị trí	<sup>#</sup> $\delta_C$	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ (mult., Hz)
1	127,9	127,8	-
2	111,9	111,8	7,19 (1H, d, $J = 1,0$ Hz)
3	149,5	150,5	-
4	149,3	149,4	-
5	116,5	116,5	6,83 (1H, d, $J = 8,0$ Hz)



6	124,0	124,0	7,08 (1H, dd, $J = 1,0; 8,0$ Hz)
7	146,9	146,9	7,62 (1H, d, $J = 16,0$ Hz)
8	116,0	115,9	6,33 (1H, d, $J = 16,0$ Hz)
9	171,0	170,9	-
3-OCH <sub>3</sub>	56,5	56,5	3,91 (3H, s)

<sup>a</sup> CD<sub>3</sub>OD, <sup>b</sup> 125 MHz, <sup>c</sup> 500 MHz, <sup>#</sup> phổ <sup>13</sup>C-NMR của acid ferulic đo trong CD<sub>3</sub>OD [122]

Phổ 1D-NMR (**Bảng 3.3**) của **PA2** tương tự như **PA1**, tuy nhiên **PA2** xuất hiện thêm một nhóm methoxy tại  $\delta_H$  3,91 và  $\delta_C$  56,5. Vị trí của nhóm này được xác định tại C-3 thông qua tương tác giữa proton  $\delta_H$  3,91 (OCH<sub>3</sub>), H-2 ( $\delta_H$  7,19) và H-5 ( $\delta_H$  6,83) với carbon  $\delta_C$  150,5 (C-3) trên phổ HMBC. Từ các phân tích trên kết hợp với tài liệu tham khảo [122] có thể kết luận hợp chất **PA2** là là acid 3-methoxy-4-hydroxycinnamic hay **acid ferulic** (**Hình 3.7**).



**Hình 3.7.** Cấu trúc và các tương tác HMBC chính (→) của hợp chất **PA2**

#### 🌈 Hợp chất **PA3**

Hợp chất **PA3** được phân lập dưới dạng bột màu trắng. Phổ ESI-MS cho pic ion giả phân tử tại  $m/z$  353,0 [M-H]<sup>-</sup> phù hợp với công thức phân tử là C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>O<sub>9</sub>. Phổ <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, aceton-*d*<sub>6</sub>) và <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, aceton-*d*<sub>6</sub>): **Bảng 3.4**.

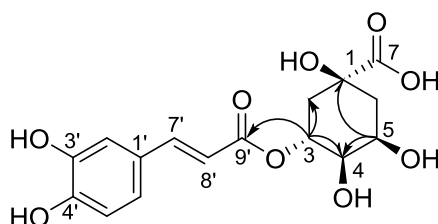
**Bảng 3.4.** Dữ liệu phổ NMR của hợp chất **PA3**

Vị trí	# $\delta_C$	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ (mult., Hz)
1	76,2	76,2	-
2	39,0	39,1	2,02 (1H, m) 2,25 (1H, ddd, $J = 2,5; 4,5; 13,0$ Hz)
3	71,2	71,3	5,38 (1H, m)
4	73,4	73,5	3,78 (1H, dd, $J = 3,0; 9,0$ Hz)
5	71,4	71,6	4,23 (1H, q, $J = 3,5$ Hz)
6	37,9	37,9	2,12 (1H, dd, $J = 3,0; 4,0$ Hz)

			2,16 (1H, dd, $J = 3,0; 14,0$ Hz)
7	175,9	175,1	-
1'	127,3	127,6	-
2'	115,4	115,2	7,15 (1H, d, $J = 2,0$ Hz)
3'	146,3	145,8	-
4'	149,0	148,7	-
5'	116,3	116,4	6,87 (1H, d, $J = 8,5$ Hz)
6'	122,6	122,5	7,03 (1H, dd, $J = 2,0; 8,0$ Hz)
7'	146,3	146,3	7,55 (1H, d, $J = 16,0$ Hz)
8'	115,0	115,9	6,26 (1H, d, $J = 16,0$ Hz)
9'	167,8	167,1	-

<sup>a</sup> Aceton-*d*<sub>6</sub>, <sup>b</sup> 125 MHz, <sup>c</sup> 500 MHz, <sup>#</sup> phổ <sup>13</sup>C-NMR của acid chlorogenic đo trong aceton-*d*<sub>6</sub> [123]

Phổ 1D-NMR (**Bảng 3.4**) của **PA3** cho thấy sự có mặt của gốc caffeoyl tương tự như **PA1**. Tuy nhiên, **PA3** xuất hiện thêm các tín hiệu của acid quinic được đặc trưng bởi các proton liên kết với carbon cạnh dị tố (CH-O) ở  $\delta_H$  5,38 (1H, m, H-3), 3,78 (1H, dd,  $J = 3,0; 9,0$  Hz, H-4), 4,23 (1H, q,  $J = 3,5$  Hz, H-5) và tín hiệu của 2 cặp proton methylen ở  $\delta_H$  2,02 (1H, m, H-2a), 2,25 (1H, ddd,  $J = 2,5; 4,5; 13,0$  Hz, H-2b) và 2,12 (1H, dd,  $J = 3,0; 4,0$  Hz, H-6a), 2,16 (1H, dd,  $J = 3,0; 14,0$  Hz, H-6b). Phổ <sup>13</sup>C-NMR của **PA3** xuất hiện tín hiệu của 16 nguyên tử carbon bao gồm 9 carbon thuộc gốc caffeoyl và 7 carbon thuộc acid quinic [với bốn carbon CH-O- ở  $\delta_C$  76,2 (C-1), 71,3 (C-3), 73,5 (C-4), 71,6 (C-5), hai carbon methylen tại  $\delta_C$  39,1 (C-2), 37,9 (C-6) và 1 carbon carbonyl tại  $\delta_C$  175,1 (C-7)]. Vị trí liên kết của 2 đơn vị này tại C-3 được chứng minh qua tương tác HMBC giữa H-3 ( $\delta_H$  5,38) với C-9' ( $\delta_C$  167,1), C-2 ( $\delta_C$  39,1) và C-4 ( $\delta_C$  73,5). Từ các dữ kiện phổ trên gợi ý **PA3** là một dẫn xuất của acid caffeic, kết hợp với tài liệu [123] có thể khẳng định **PA3** là acid 3-*O*-caffeoylquinic hay **acid chlorogenic (Hình 3.8)**.



**Hình 3.8. Cấu trúc và các tương tác HMBC chính (→) của hợp chất PA3**

### Hợp chất PA4

Hợp chất PA4 thu được dưới dạng tinh thể hình kim màu vàng. Phổ ESI-MS xuất hiện pic ion giả phân tử tại  $m/z$  303,0  $[M+H]^+$ , 301,0  $[M-H]^-$ , phù hợp với công thức phân tử là  $C_{15}H_{10}O_7$ . Phổ  $^1H$ -NMR (500 MHz, aceton- $d_6$ ) và  $^{13}C$ -NMR (125 MHz, aceton- $d_6$ ): **Bảng 3.5**.

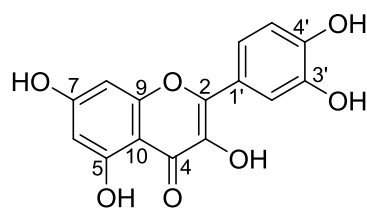
**Bảng 3.5. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất PA4**

Vị trí	$\# \delta_C$	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ (mult., Hz)
2	146,9	146,9	-
3	136,7	136,7	-
4	176,5	176,5	-
5	162,1	162,3	-
6	99,1	99,1	6,26 (1H, d, $J = 2,0$ Hz)
7	164,9	165,0	-
8	94,5	94,4	6,51 (1H, d, $J = 2,0$ Hz)
9	157,8	157,7	-
10	104,1	104,1	-
1'	123,8	123,8	-
2'	115,8	115,7	7,82 (1H, d, $J = 2,0$ Hz)
3'	145,8	145,8	-
4'	148,3	148,3	-
5'	116,2	116,2	6,99 (1H, d, $J = 8,5$ Hz)
6'	121,5	121,4	7,69 (1H, dd, $J = 2,0; 8,5$ Hz)

<sup>a</sup> Aceton- $d_6$ , <sup>b</sup> 125 MHz, <sup>c</sup> 500 MHz, <sup>#</sup> phổ  $^{13}C$ -NMR của quercetin đo trong aceton- $d_6$  [124]

Phổ  $^1H$ -NMR (**Bảng 3.5**) xuất hiện tín hiệu của 5 proton vòng thơm trong đó 3 tín hiệu tương tác ABX ở  $\delta_H$  7,82 (1H, d,  $J = 2,0$  Hz, H-2'), 6,99 (1H, d,  $J = 8,5$  Hz, H-5') và 7,69 (1H, dd,  $J = 2,0; 8,5$  Hz, H-6') thuộc về vòng thơm B, hai tín hiệu proton tương tác *meta* ở  $\delta_H$  6,51 (1H, d,  $J = 2,0$  Hz, H-8) và 6,26 (1H, d,  $J = 2,0$  Hz, H-6) thuộc về vòng thơm A. Phổ  $^{13}C$ -NMR (**Bảng 3.5**) và DEPT chỉ ra tín hiệu của 15 carbon với 5 nhóm methin nhân thơm ở  $\delta_C$  99,1 (C-6), 94,4 (C-8), 115,7 (C-2'), 116,2 (C-5') và 121,4 (C-6'), 10 carbon không liên kết với hydro trong đó tín hiệu tại  $\delta_C$  176,5 đặc trưng cho nhóm carbonyl, 5 carbon có độ chuyển dịch tại  $\delta_C$  136,7, 145,8, 148,3, 162,3 và 164,9 đặc trưng cho dạng liên kết của nhân thơm với nhóm OH của C-3, C-3', C-4', C-5 và C-7. Dựa vào dữ kiện phổ trên đồng thời so sánh với các dữ liệu

phổ đã công bố [124], cấu trúc của **PA4** được xác định là 3,3',4',5,7-pentahydroxyflavon hay **quercetin (Hình 3.9)**.



**Hình 3.9. Cấu trúc của hợp chất PA4**

#### **✚ Hợp chất PA5**

Hợp chất **PA5** thu được dưới dạng chất rắn màu vàng. Phổ ESI-MS cho pic ion giả phân tử tại  $m/z$  471,0  $[M+Na]^+$  phù hợp với công thức phân tử là  $C_{21}H_{20}O_{11}$ . Phổ  $^1H$ -NMR (500 MHz,  $CD_3OD$ ) và  $^{13}C$ -NMR (125 MHz,  $CD_3OD$ ): **Bảng 3.6**.

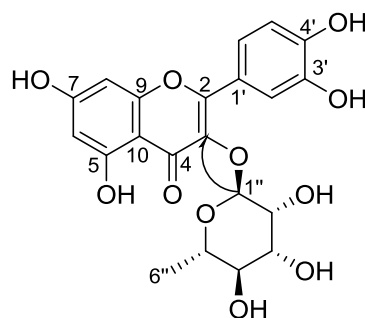
**Bảng 3.6. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất PA5**

Vị trí	$\delta_C$	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ (mult., Hz)
2	158,5	158,5	-
3	136,3	136,3	-
4	179,7	179,7	-
5	163,2	163,2	-
6	99,9	99,8	6,22 (1H, d, $J = 1,5$ Hz)
7	165,9	165,9	-
8	94,7	94,7	6,39 (1H, d, $J = 1,5$ Hz)
9	159,3	159,3	-
10	105,9	105,9	-
1'	123,0	123,0	-
2'	116,4	116,4	7,36 (1H, d, $J = 2,0$ Hz)
3'	146,4	146,4	-
4'	149,8	149,8	-
5'	117,0	117,0	6,93 (1H, d, $J = 8,0$ Hz)
6'	122,9	122,9	7,33 (1H, dd, $J = 2,0; 8,0$ Hz)
1''	103,6	103,6	5,37 (1H, br s)

2''	71,9	71,9	4,24 (1H, br d, $J = 1,0$ Hz)
3''	72,1	72,2	3,78 (1H, dd, $J = 3,0; 9,0$ Hz)
4''	73,3	73,3	3,36 (1H, m)
5''	72,0	72,0	3,45 (1H, m)
6''	17,6	17,7	0,95 (1H, t, $J = 6,0$ Hz)

<sup>a</sup> CD<sub>3</sub>OD, <sup>b</sup> 125 MHz, <sup>c</sup> 500 MHz, <sup>#</sup> phổ <sup>13</sup>C-NMR của quercitrin đo trong CD<sub>3</sub>OD [125]

Phổ 1D-NMR (Bảng 3.6) của **PA5** tương tự như **PA4** với phần aglycon là quercetin. Ngoài ra, trên phổ 1D-NMR của **PA5** còn có thêm một gốc rhamnopyranosyl với tín hiệu proton anomeric ở  $\delta_H$  5,37 (1H, br s, H-1'') và các proton khác ở  $\delta_H$  4,24 (1H, br d,  $J = 1,0$  Hz, H-2''), 3,78 (1H, dd,  $J = 3,0; 9,0$  Hz, H-3''), 3,36 (1H, m, H-4''), 3,45 (1H, m, H-5'') và 0,95 (1H, t,  $J = 6,0$  Hz, H-6'') cùng với 6 carbon ở  $\delta_C$  103,6 (C-1''), 71,9 (C-2''), 72,2 (C-3''), 73,3 (C-4''), 72,0 (C-5'') và 17,7 (C-6''). Proton anomeric có pic gần giống dạng đơn (broad singlet) của cho phép xác định cấu hình  $\alpha$  của gốc đường này. Vị trí liên kết của gốc đường với C-3 của aglycon được khẳng định dựa trên tương tác HMBC giữa proton anomeric  $\delta_H$  5,37 (H-1'') và carbon  $\delta_C$  136,3 (C-3). Dựa vào các phân tích trên và tham khảo tài liệu [125], có thể kết luận hợp chất **PA5** là **quercitrin (Hình 3.10)**.



**Hình 3.10. Cấu trúc và tương tác HMBC chính (→) của hợp chất PA5**

#### **✚ Hợp chất PA6**

Hợp chất **PA6** thu được dưới dạng tinh thể hình kim màu vàng. Phổ ESI-MS cho pic ion giả phân tử tại  $m/z$  487,0  $[M+Na]^+$  phù hợp với công thức phân tử là C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>12</sub>. Phổ <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD&DMSO-*d*<sub>6</sub>) và <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD&DMSO-*d*<sub>6</sub>): **Bảng 3.7**.

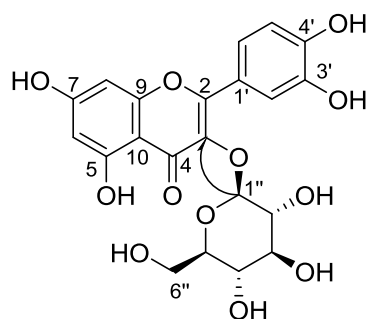
**Bảng 3.7. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất PA6**

Vị trí	$\delta_C$	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ (mult., Hz)
2	157,9	158,6	-
3	134,6	135,6	-
4	178,4	179,4	-
5	162,0	162,9	-
6	99,3	99,9	6,24 (1H, d, $J = 2,0$ Hz)
7	166,1	165,9	-
8	94,0	94,8	6,44 (1H, d, $J = 2,0$ Hz)
9	157,6	158,3	-
10	104,4	105,6	-
1'	122,1	122,9	-
2'	115,0	116,3	7,85 (1H, d, $J = 3,0$ Hz)
3'	144,9	145,8	-
4'	148,9	149,9	-
5'	116,6	117,8	6,91 (1H, d, $J = 8,5$ Hz)
6'	122,2	123,0	7,63 (1H, dd, $J = 3,0; 8,5$ Hz)
1''	103,5	105,0	5,29 (1H, d, $J = 7,5$ Hz)
2''	74,7	75,0	3,68 (1H, m)
3''	77,1	77,1	
4''	70,2	69,9	3,51 - 3,61 (3H, m)
5''	77,4	77,2	
6''	61,6	61,9	3,88 (1H, m), 3,81 (1H, m)

<sup>a</sup> CD<sub>3</sub>OD&DMSO-*d*<sub>6</sub>, <sup>b</sup> 125 MHz, <sup>c</sup> 500 MHz, <sup>#</sup> phổ <sup>13</sup>C-NMR của quercetin 3-*O*-β-D-glucopyranosid đo trong CD<sub>3</sub>OD [126]

Phổ 1D-NMR (**Bảng 3.7**) của **PA6** tương tự như **PA4** và **PA5** với aglycon là quercetin. Sự khác biệt được nhận biết qua các tín hiệu cộng hưởng của phần glycosid với sự xuất hiện của gốc đường glucopyranosyl được đặc trưng bởi tín hiệu proton anomeric ở  $\delta_H$  5,29 (1H, d,  $J = 7,5$  Hz, H-1'') và các tín hiệu khác tại  $\delta_H$  3,68 (1H, m, H-2''), 3,51 - 3,61 (3H, m, H-3'', H-4'', H-5''), 3,81 (1H, m, H-6''), 3,88 (1H, m, H-6''),

cùng với 6 carbon tại  $\delta_C$  104,9 (C-1''), 75,0 (C-2''), 77,1 (C-3''), 69,9 (C-4''), 77,2 (C-5'') và 61,9 (C-6''). Hằng số tương tác của proton anomeric lớn ( $J = 7,5$  Hz) cho phép xác định cấu hình  $\beta$  của gốc đường này. Vị trí của gốc đường cũng được xác định tại C-3 của aglycon thông qua tương tác HMBC giữa proton anomeric  $\delta_H$  5,29 (H-1'') và carbon  $\delta_C$  135,6 (C-3) (**Hình 3.11**). So sánh các dữ liệu phổ NMR với tài liệu tham khảo [126], cho phép kết luận **PA6** là **quercetin 3-O- $\beta$ -D-glucopyranosid** (**Hình 3.11**).



**Hình 3.11. Cấu trúc và tương tác HMBC chính ( $\rightarrow$ ) của hợp chất PA6**

#### **🚩 Hợp chất PA7**

Hợp chất **PA7** thu được dưới dạng bột màu vàng. Phổ ESI-MS cho pic ion giả phân tử tại  $m/z$  487,0  $[M+Na]^+$  phù hợp với công thức phân tử là  $C_{21}H_{20}O_{12}$ . Phổ  $^1H$ -NMR (500 MHz,  $CD_3OD$ ) và  $^{13}C$ -NMR (125 MHz,  $CD_3OD$ ): **Bảng 3.8**.

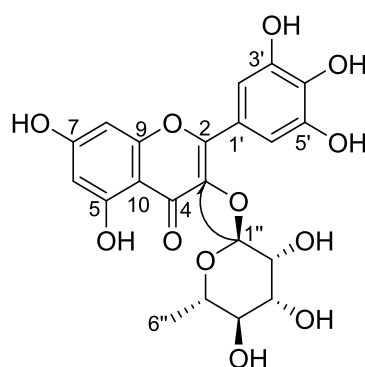
**Bảng 3.8. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất PA7**

Vị trí	# $\delta_C$	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ (mult., Hz)
2	159,5	159,5	-
3	136,4	136,3	-
4	179,7	179,7	-
5	163,3	163,2	-
6	99,9	99,8	6,22 (1H, d, $J = 2,0$ Hz)
7	165,9	165,9	-
8	94,8	94,7	6,38 (1H, d, $J = 2,0$ Hz)
9	158,6	158,5	-
10	106,0	105,9	-
1'	122,1	122,0	-
2', 6'	109,7	109,6	6,97 (2H, s)

3', 5'	146,9	146,9	-
4'	138,8	137,9	-
1''	103,7	103,6	5,34 (1H, d, $J = 1,5$ Hz)
2''	72,0	71,9	4,24 (1H, dd, $J = 1,5; 3,0$ Hz)
3''	72,2	72,1	3,81 (1H, dd, $J = 3,0; 9,0$ Hz)
4''	73,5	73,4	3,36 (1H, m)
5''	72,1	72,0	3,54 (1H, m)
6''	17,8	17,7	0,99 (3H, d, $J = 6,0$ Hz)

<sup>a</sup> CD<sub>3</sub>OD, <sup>b</sup> 125 MHz, <sup>c</sup> 500 MHz, <sup>#</sup> phổ <sup>13</sup>C-NMR của myricitrin đo trong CD<sub>3</sub>OD [127]

Phổ 1D-NMR (**Bảng 3.8**) của **PA7** tương tự như **PA5**. Tuy nhiên, vòng B của **PA7** không xuất hiện các proton tương tác ABX như trong cấu trúc của **PA5** mà thay vào đó là các tín hiệu ở dạng đối xứng với tín hiệu singlet tại  $\delta_H$  6,97 (2H, s, H-2', H-6'). Phổ <sup>13</sup>C-NMR (**Bảng 3.8**) cũng cho thấy tính đối xứng của vòng B với các tín hiệu tại  $\delta_C$  121,9 (C-1'), 109,6 (C-2', C-6'), 146,8 (C-3', C-5') và 137,9 (C-4'), gợi ý aglycon của **PA7** là myricetin. Gốc đường của **PA7** tương tự như **PA5** và cũng gắn vào vị trí C-3 thông qua tương tác HMBC giữa proton anomeric ( $\delta_H$  5,34) và carbon C-3 ( $\delta_C$  136,3). Căn cứ vào việc phân tích các dữ kiện phổ ở trên kết hợp với tham khảo tài liệu [127] cho phép kết luận **PA7** là myricetin 3-*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyranosid hay **myricitrin** (**Hình 3.12**).



**Hình 3.12.** Cấu trúc và tương tác HMBC chính ( $\rightarrow$ ) của hợp chất **PA7**

#### **+** Hợp chất **PA8**

Hợp chất **PA8** thu được dưới dạng chất rắn màu vàng. Phổ ESI-MS cho pic ion giả phân tử tại  $m/z$  633,1 [ $M+Na$ ]<sup>+</sup>, 609,0 [ $M-H$ ]<sup>-</sup>, phù hợp với công thức phân tử là



$C_{27}H_{30}O_{16}$ . Phổ  $^1H$ -NMR (500 MHz,  $CD_3OD$ ) và  $^{13}C$ -NMR (125 MHz,  $CD_3OD$ ): **Bảng 3.8.**

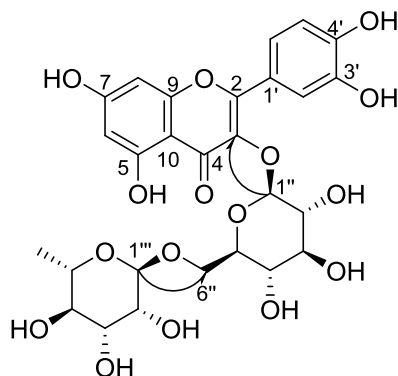
**Bảng 3.9. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất PA8**

Vị trí	$\delta_C$	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ (mult., Hz)
2	158,5	158,5	-
3	135,7	135,7	-
4	179,4	179,4	-
5	163,0	163,0	-
6	100,0	100,0	6,23 (1H, d, $J = 2,0$ Hz)
7	166,0	166,0	-
8	95,0	94,9	6,42 (1H, d, $J = 2,0$ Hz)
9	159,4	159,3	-
10	105,7	105,7	-
1'	123,7	123,6	-
2'	117,8	117,7	7,69 (1H, d, $J = 2,5$ Hz)
3'	145,9	145,8	-
4'	149,9	149,8	-
5'	116,1	116,1	6,90 (1H, d, $J = 8,5$ Hz)
6'	123,2	123,2	7,65 (1H, dd, $J = 2,5; 8,5$ Hz)
1''	104,8	104,7	5,12 (1H, d, $J = 8,0$ Hz)
2''	75,8	75,7	3,48 (1H, m)
3''	77,2	77,2	3,36 (1H, m)
4''	71,5	71,4	3,28 (1H, m)
5''	78,2	78,2	3,42 (1H, m)
6''	68,6	68,6	3,43 (1H, m) 3,82 (1H, dd, $J = 1,5; 11,0$ Hz)
1'''	102,5	102,4	4,54 (1H, d, $J = 1,5$ Hz)
2'''	72,3	72,1	3,65 (1H, dd, $J = 2,0; 3,0$ Hz)
3'''	72,2	72,3	3,55 (1H, dd, $J = 3,0; 9,0$ Hz)
4'''	74,0	74,0	3,30 (1H, m)

5 <sup>'''</sup>	69,8	69,7	3,46 (1H, m)
6 <sup>'''</sup>	18,0	17,9	1,14 (3H, d, $J = 6,0$ Hz)

<sup>a</sup> CD<sub>3</sub>OD, <sup>b</sup> 125 MHz, <sup>c</sup> 500 MHz, <sup>#</sup> phổ <sup>13</sup>C-NMR của rutin đo trong CD<sub>3</sub>OD [128]

Phổ 1D-NMR (**Bảng 3.9**) của **PA8** tương tự như **PA6**. Tuy nhiên, **PA8** xuất hiện thêm các tín hiệu của gốc đường  $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl tại  $\delta_{\text{H}}$  4,54 (1H, d,  $J = 1,5$  Hz, H-1<sup>'''</sup>), 3,65 (1H, dd,  $J = 2,0; 3,0$  Hz, H-2<sup>'''</sup>), 3,55 (1H, dd,  $J = 3,0; 9,0$  Hz, H-3<sup>'''</sup>), 3,30 (1H, m, H-4<sup>'''</sup>), 3,46 (1H, m, H-5<sup>'''</sup>), 1,14 (3H, d,  $J = 6,0$  Hz, H-6<sup>'''</sup>) cùng với tín hiệu của 6 carbon tại  $\delta_{\text{C}}$  102,4 (C-1<sup>'''</sup>), 72,1 (C-2<sup>'''</sup>), 72,3 (C-3<sup>'''</sup>), 74,0 (C-4<sup>'''</sup>), 69,7 (C-5<sup>'''</sup>) và 17,9 (C-6<sup>'''</sup>). Sự chuyển dịch về phía trường thấp của carbon C-6 ( $\delta_{\text{C}}$  68,5) của gốc đường  $\beta$ -D-glucopyranosyl so với **PA6** ( $\delta_{\text{C}}$  61,9) gợi ý vị trí liên kết của gốc đường  $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl. Ngoài ra, tương tác HMBC giữa H-1<sup>'''</sup> ( $\delta_{\text{H}}$  4,54) với C-6<sup>''</sup> ( $\delta_{\text{C}}$  68,5) cũng khẳng định vị trí của gốc đường này (**Hình 3.13**). So sánh các dữ liệu phổ của **PA8** với tài liệu tham khảo [128] cho phép kết luận **PA8** là quercetin 3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopyranosid hay **rutin** (**Hình 3.13**).



**Hình 3.13.** Cấu trúc và các tương tác HMBC chính ( $\rightarrow$ ) của hợp chất **PA8**

#### **+** Hợp chất **PA9**

Hợp chất **PA9** thu được dưới dạng tinh thể hình kim màu trắng. Phổ ESI-MS cho pic ion giả phân tử tại  $m/z$  413,1  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 411,2  $[\text{M}-\text{H}]^-$  phù hợp với công thức phân tử là C<sub>29</sub>H<sub>48</sub>O. Phổ <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) và <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD): **Bảng 3.10**.

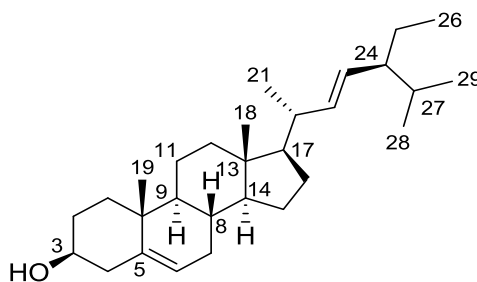
**Bảng 3.10.** Dữ liệu phổ NMR của hợp chất **PA9**

Vị trí	<sup>#</sup> $\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{C}}$ <sup>a,b</sup>	$\delta_{\text{H}}$ <sup>a,c</sup> (mult., Hz)
1	37,2	37,3	
2	31,6	31,7	
3	71,8	71,8	3,53 (1H, m)

4	42,3	42,3	
5	140,7	140,8	
6	121,7	121,7	5,35 (1H, br d, $J = 3,5$ Hz)
7	31,9	31,9	
8	31,9	31,9	
9	50,1	50,1	
10	36,5	36,5	
11	21,1	21,1	
12	39,6	39,7	
13	42,3	42,3	
14	56,8	56,8	
15	24,3	24,3	
16	28,9	28,9	
17	55,9	56,0	
18	12,0	12,1	0,84 (3H, s)
19	19,4	19,4	1,03 (3H, s)
20	40,5	40,5	
21	21,1	21,1	0,91 (3H, d, $J = 6,5$ Hz)
22	138,3	138,3	5,15 (1H, dd, $J = 8,5; 15,0$ Hz)
23	129,2	129,3	5,02 (1H, dd, $J = 8,5; 15,0$ Hz)
24	51,2	51,2	
25	31,9	31,9	
26	21,2	21,2	0,84 (3H, t, $J = 8,5$ Hz)
27	25,4	25,4	
28	19,0	19,0	0,81 (3H, d, $J = 7,0$ Hz)
29	12,3	12,3	0,68 (3H, d, $J = 9,0$ Hz)

<sup>a</sup> CDCl<sub>3</sub>, <sup>b</sup> 125 MHz, <sup>c</sup> 500 MHz, <sup>#</sup> phổ <sup>13</sup>C-NMR của stigmasterol đo trong CDCl<sub>3</sub> [129]

Phổ  $^1\text{H}$ - và  $^{13}\text{C}$ -NMR (**Bảng 3.10**) của **PA9** cho các tín hiệu đặc trưng của một sterol với các tín hiệu methyl ở vùng trường cao  $\delta_{\text{H}}$  0,84 (3H, s, H-18), 1,03 (3H, s, H-19), 0,91 (3H, d,  $J = 6,5$  Hz, H-21), 0,84 (3H, t,  $J = 8,5$  Hz, H-26), 0,81 (3H, d,  $J = 6,8$  Hz, H-28) và 0,68 (3H, d,  $J = 9,0$  Hz, H-29). Sự có mặt của nhóm  $\beta$ -OH tại vị trí C-3 được khẳng định bởi tín hiệu của nhóm methin tại  $\delta_{\text{H}}$  3,53 (1H, m, H-3). Tín hiệu của 3 nhóm methin chuyển dịch về trường thấp chứng tỏ sự có mặt của hai nối đôi trong đó có một nối đôi thế 3 lần tại  $\delta_{\text{H}}$  5,35 (1H, br d,  $J = 3,5$  Hz, H-6) và một nối ở dạng *trans*  $\delta_{\text{H}}$  5,15 (1H, dd,  $J = 8,5; 15,0$  Hz, H-22) và 5,02 (1H, dd,  $J = 8,5; 15,0$  Hz, H-23). Phổ  $^{13}\text{C}$ -NMR (**Bảng 3.10**) xuất hiện tín hiệu của 29 carbon khẳng định thêm về cấu trúc sterol của **PA9**. Phổ DEPT xuất hiện tín hiệu của 6 nhóm methyl tại  $\delta_{\text{C}}$  11,9 (C-18), 19,4 (C-19), 21,2 (C-21), 21,2 (C-26), 19,0 (C-28) và 12,2 (C-29), 9 nhóm methylen tại  $\delta_{\text{C}}$  37,3 (C-1), 31,7 (C-2), 42,3 (C-4), 31,9 (C-7), 21,1 (C-11), 39,8 (C-12), 24,4 (C-15), 28,9 (C-16) và 31,9 (C-25), 11 nhóm methin tại  $\delta_{\text{C}}$  71,8 (C-3), 121,7 (C-6), 31,9 (C-8), 50,2 (C-9), 56,9 (C-14), 56,1 (C-17), 40,5 (C-20), 138,3 (C-22), 129,3 (C-23), 51,2 (C-24) và 25,4 (C-27) và 3 carbon bậc 4 tại  $\delta_{\text{C}}$  140,8 (C-5), 36,5 (C-10) và 42,3 (C-13). Dựa vào các dữ liệu phổ và so sánh với tài liệu tham khảo [129], **PA9** được xác định là stigmasta-5,22-dien-3 $\beta$ -ol hay **stigmasterol** (**Hình 3.14**).



**Hình 3.14. Cấu trúc của hợp chất PA9**

#### **+** Hợp chất **PA10**

Hợp chất **PA10** thu được dưới dạng chất rắn màu trắng. Phổ ESI-MS cho pic ion giả phân tử tại  $m/z$  599,3  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , 575,4  $[\text{M}-\text{H}]^-$ , phù hợp với công thức phân tử là  $\text{C}_{35}\text{H}_{60}\text{O}_6$ . Phổ  $^1\text{H}$ -NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$  &  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) và  $^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$  &  $\text{CD}_3\text{OD}$ ): **Bảng 3.11**.

**Bảng 3.11. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất PA10**

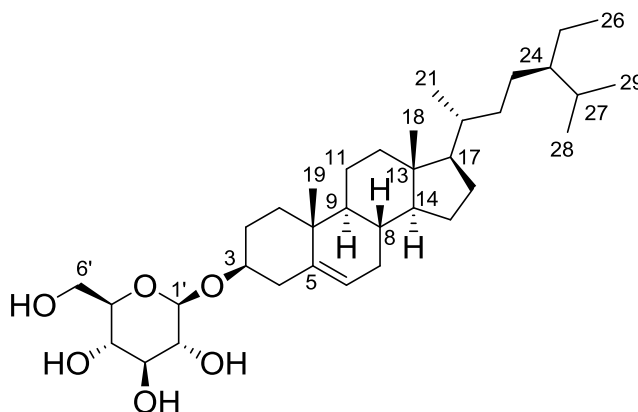
Vị trí	$\# \delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,c}}$ (mult., Hz)
1	36,8	37,4	
2	29,0	29,7	
3	78,4	79,3	3,59 (1H, m)

4	38,1	38,8	
5	139,9	140,4	
6	121,4	122,3	5,37 (1H, t, $J = 3,5$ Hz)
7	31,4	32,0	
8	31,4	31,9	
9	49,7	50,3	
10	36,2	36,8	
11	20,5	21,2	
12	39,3	39,9	
13	41,8	42,4	
14	56,3	56,9	
15	23,7	24,4	
16	27,7	28,3	
17	55,5	56,2	
18	11,1	11,9	0,68 (3H, s)
19	18,5	19,4	1,00 (3H, s)
20	35,6	36,3	
21	18,0	18,8	0,92 (3H, d, $J = 6,5$ Hz)
22	33,4	34,1	
23	25,4	26,2	
24	45,4	45,9	
25	28,6	29,3	
26	18,1	19,9	0,86 (3H, t, $J = 7,5$ Hz)
27	18,9	19,1	
28	22,5	23,1	0,81 (3H, d, $J = 7,0$ Hz)
29	11,1	12,0	0,81 (3H, d, $J = 7,0$ Hz)
1'	100,6	101,2	4,41 (1H, d, $J = 8,0$ Hz)
2'	73,1	73,6	3,24 (1H, m)

3'	76,1	76,5	3,44 (2H, m)
4'	69,7	70,1	
5'	75,6	75,8	3,29 (1H, m)
6'	61,1	61,9	3,84 (1H, dd, $J = 2,0; 12,0$ Hz), 3,75 (1H, dd, $J = 4,5; 12,0$ Hz)

<sup>a</sup> CDCl<sub>3</sub> & CD<sub>3</sub>OD, <sup>b</sup> 125 MHz, <sup>c</sup> 500 MHz, <sup>#</sup> phổ <sup>13</sup>C-NMR của daucosterol đo trong CDCl<sub>3</sub> & CD<sub>3</sub>OD [130]

So sánh phổ 1D-NMR (**Bảng 3.11**) của **PA10** và **PA9** cho thấy có sự tương đồng. Tuy nhiên, **PA10** không xuất hiện tín hiệu của nối đôi *trans*. Ngoài ra, **PA10** xuất hiện tín hiệu của gốc đường  $\beta$ -D-glucopyranosyl tương tự như các hợp chất **PA6** với các tín hiệu tại  $\delta_H$  4,41 (1H, d,  $J = 8,0$  Hz, H-1'), 3,24 (1H, m, H-2'), 3,44 (2H, m, H-3', H-4'), 3,29 (1H, m, H-5'), 3,84 (1H, dd,  $J = 2,0; 12,0$  Hz, H-6b'), 3,75 (1H, dd,  $J = 4,5; 12,0$  Hz, H-6a'), cùng với 6 tín hiệu carbon tại 101,2 (C-1'), 73,6 (C-2'), 76,5 (C-3'), 70,1 (C-4'), 75,8 (C-5') và 61,9 (C-6'). Sự dịch chuyển về phía trường thấp của C-3 ( $\delta_C$  79,3) so với **PA9** ( $\delta_C$  71,8) cho thấy vị trí của gắn của gốc đường. Trên cơ sở các phân tích về phổ NMR kết hợp với tham khảo tài liệu [130], cấu trúc của **PA10** được xác định là  $\beta$ -sitosterol 3-O- $\beta$ -D-glucopyranosid hay **daucosterol** (**Hình 3.15**).



**Hình 3.15. Cấu trúc của hợp chất PA10**

#### **+** Hợp chất **PA11**

Hợp chất **PA11** được tinh chế dưới dạng chất rắn màu trắng. Phổ ESI-MS cho pic ion giả phân tử tại  $m/z$  413,1  $[M-H]^-$ , phù hợp với công thức phân tử là C<sub>28</sub>H<sub>46</sub>O<sub>2</sub>. Phổ <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) và <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): **Bảng 3.12**.

**Bảng 3.12. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất PA11**

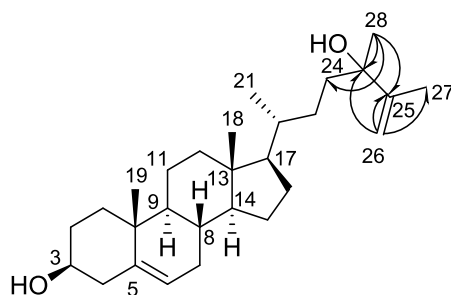
Vị trí	# $\delta_C$	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ (mult., Hz)
1	36,8	37,3	
2	31,3	31,9	
3	70,5	71,8	3,52 (1H, m)
4	41,7	42,4	
5	140,7	140,8	
6	120,6	121,7	5,35 (1H, t, $J = 3,0$ Hz)
7	31,1	31,7	
8	31,3	31,9	
9	49,5	50,2	
10	36,1	36,6	
11	20,5	21,1	
12	40,1	39,8	
13	41,8	42,4	
14	56,2	56,8	
15	23,7	24,3	
16	27,6	28,2	
17	55,2	55,9	
18	11,3	11,9	0,68 (3H, s)
19	18,9	19,4	1,10 (3H, s)
20	35,3	35,8	
21	18,3	18,8	0,92 (3H, d, $J = 6,5$ Hz)
22	29,2	29,7	
23	36,0	36,5	
24	74,4	75,5	
25	150,0	150,5	
26	108,9	109,5	4,81 (1H, t, $J = 1,0$ Hz)



			4,95 (1H, t, $J = 1,0$ Hz)
27	18,9	19,4	1,74 (3H, br s)
28	27,2	27,8	1,30 (3H, s)

<sup>a</sup> CDCl<sub>3</sub>, <sup>b</sup> 125 MHz, <sup>c</sup> 500 MHz, <sup>#</sup> phổ <sup>13</sup>C-NMR của physalindicanol A đo trong CDCl<sub>3</sub> và DMSO-*d*<sub>6</sub> [131].

Phổ 1D-NMR (**Bảng 3.12**) của **PA11** có sự tương đồng với **PA9**. Sự khác biệt thuộc về chuỗi mạch nhánh từ C-22 - C-29. Phổ <sup>1</sup>H- và <sup>13</sup>C-NMR (**Bảng 3.12**) của **PA11** không xuất hiện nổi đôi dạng *trans* cũng như các nhóm methyl doublet và triplet mà thay vào đó là sự có mặt của nhóm exomethylen ( $\delta_H$  4,81, 4,95;  $\delta_C$  109,5) và 2 nhóm methyl siglet ( $\delta_H$  1,74,  $\delta_C$  19,4;  $\delta_H$  1,30,  $\delta_C$  27,8). Ngoài ra, **PA11** còn xuất hiện tín hiệu của carbon không liên kết với hydro ở vùng trường yếu ( $\delta_C$  75,5). Phân tích phổ HMBC cho thấy sự tương tác của các proton exomethylen với C-24 ( $\delta_C$  75,5), C-25 ( $\delta_C$  150,5), C-27 ( $\delta_C$  19,4); giữa H-28 ( $\delta_H$  1,30) với C-23 ( $\delta_C$  36,5), C-24, C-25 và giữa H-21 ( $\delta_H$  0,92) với C-17 ( $\delta_C$  55,9), C-20 ( $\delta_C$  35,8), C-22 ( $\delta_C$  29,7), xác định cấu trúc mạch nhánh của **PA11** như **hình 3.16**. Từ các dữ liệu phổ trên, kết hợp tham khảo tài liệu [131] cho phép khẳng định **PA11** là **physalindicanol A (Hình 3.16)**.



**Hình 3.16.** Cấu trúc và các tương tác HMBC chính (→) của hợp chất **PA11**

#### 🚩 Hợp chất **PA12**

Hợp chất **PA12** được tinh chế dưới dạng chất rắn màu trắng. Phổ ESI-MS cho pic ion giả phân tử tại  $m/z$  413,1 [M-H]<sup>-</sup>, phù hợp với công thức phân tử là C<sub>28</sub>H<sub>46</sub>O<sub>2</sub>. Phổ <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) và <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): **Bảng 3.13**.

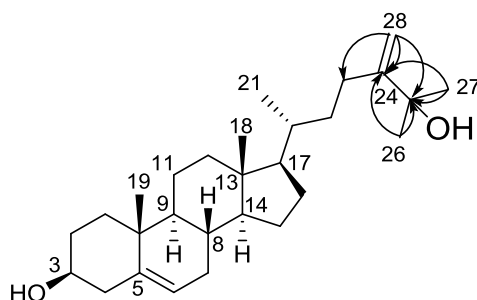
**Bảng 3.13.** Dữ liệu phổ NMR của hợp chất **PA12**

Vị trí	<sup>#</sup> $\delta_C$	<sup>&amp;</sup> $\delta_C$	<sup>@</sup> $\delta_C$	$\delta_C$ <sup>a,b</sup>	$\delta_H$ <sup>a,c</sup> (mult., Hz)
1	37,3	37,3	36,2	37,3	
2	31,7	31,9	31,0	31,9	
3	71,8	71,8	70,4	71,8	3,51 (1H, m)

4	42,4	42,4	41,6	42,3	
5	140,9	140,8	164,9	140,8	
6	121,7	121,7	126,0	121,7	5,35 (1H, t, $J = 2,5$ Hz)
7	31,7	31,7	202,0	31,7	
8	31,9	31,9	45,1	32,0	
9	50,2	50,2	49,7	50,2	
10	37,1	36,6	38,1	36,5	
11	21,1	21,1	21,1	21,1	
12	39,8	39,8	38,5	39,8	
13	42,4	42,4	43,0	42,4	
14	56,7	56,8	49,8	56,8	
15	24,3	24,3	26,1	24,3	
16	28,2	28,2	28,4	28,2	
17	55,9	55,9	54,4	56,0	
18	11,9	11,9	11,8	11,9	0,69 (3H, s)
19	19,3	19,4	17,4	19,4	1,01 (3H, s)
20	35,9	35,8	35,7	35,9	
21	18,8	18,8	18,8	18,8	0,97 (3H, d, $J = 6,5$ Hz)
22	31,9	29,7	35,3	31,9	
23	35,6	36,5	27,4	35,6	
24	164,1	75,5	<b>156,5</b>	<b>156,9</b>	
25	71,8	150,5	<b>73,4</b>	<b>73,6</b>	
26	27,6	109,5	<b>29,1</b>	<b>29,4</b>	
27	27,6	19,4	<b>29,2</b>	<b>29,3</b>	1,35 (6H, s)
28	106,7	27,8	<b>106,6</b>	<b>106,7</b>	5,09 (1H, s) 4,76 (1H, d, $J = 1,0$ Hz)

<sup>a</sup> CDCl<sub>3</sub>, <sup>b</sup> 125 MHz, <sup>c</sup> 500 MHz, & phổ <sup>13</sup>C-NMR của **PA11** đo trong CDCl<sub>3</sub>, @ phổ <sup>13</sup>C-NMR của 3 $\beta$ ,25-dihydroxyergosta-5,24(28)-dien-7-on đo trong CDCl<sub>3</sub> [132], # phổ <sup>13</sup>C-NMR của physalindicanol B đo trong CDCl<sub>3</sub> [133].

Phổ <sup>1</sup>H- và <sup>13</sup>C-NMR (**Bảng 3.13**) của **PA12** xuất hiện các tín hiệu đặc trưng của một sterol khung ergostan tương tự như hợp chất **PA11**. Tuy nhiên, tín hiệu carbon của nhóm exomethylen có sự thay đổi [**PA11**:  $\delta_C$  150,5 (C-25) và 109,5 (C-26)] so với **PA12** [ $\delta_C$  156,9 (C-24) và 106,7 (C-28)], chứng tỏ vị trí của nhóm này có sự chuyển dịch trong mạch nhánh. Phổ HMBC (Hình 3.17) của **PA12** cho thấy tương tác giữa proton của nhóm exomethylen với C-22 ( $\delta_C$  27,6), C-24 ( $\delta_C$  156,9), C-25 ( $\delta_C$  73,6) và giữa các proton H-26, H-27 ( $\delta_H$  1,35, 6H) với C-24, C-25, chứng tỏ nối đôi ở vị trí C-24, C-28 tương tự như cấu trúc mạch nhánh của hợp chất 3 $\beta$ ,25-dihydroxyergosta-5,24(28)-dien-7-on [132]. Từ các dữ liệu trên kết hợp với tài liệu [133] có thể kết luận cấu trúc của **PA12** là **physalindicanol B** (Hình 3.17).



**Hình 3.17.** Cấu trúc và các tương tác HMBC chính (→) của hợp chất **PA12**

#### 🚩 Hợp chất **PA13**

Hợp chất **PA13** thu được dưới dạng tinh thể hình kim màu vàng nhạt. Phổ ESI-MS xuất hiện pic ion phân tử  $m/z$  511,1 [M+H]<sup>+</sup>, phù hợp với công thức phân tử là C<sub>28</sub>H<sub>30</sub>O<sub>9</sub>. Phổ <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) và <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): **Bảng 3.14**.

**Bảng 3.14.** Dữ liệu phổ NMR của hợp chất **PA13**

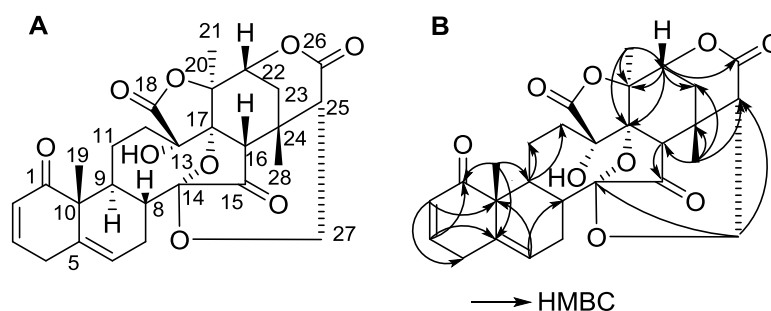
Vị trí	# $\delta_C$	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ (mult., Hz)
1	205,7	205,7	
2	127,4	127,4	5,90 (1H, dd, $J = 3,0; 10,0$ Hz)
3	146,1	146,1	6,79 (1H, ddd, $J = 3,0; 5,0; 10,0$ Hz)
4	33,1	33,1	
5	133,9	133,9	
6	124,5	124,5	5,57 (1H, d, $J = 7,0$ Hz)

7	24,8	24,8	
8	40,0	39,9	
9	33,2	33,2	
10	52,7	52,7	
11	24,2	24,2	
12	25,9	25,9	
13	80,2	79,7	
14	107,5	107,5	
15	208,1	208,1	
16	56,4	56,4	2,16 (1H, s)
17	81,0	81,0	
18	172,3	172,3	
19	17,9	17,9	1,22 (3H, s)
20	79,7	80,3	
21	21,4	21,5	1,97 (3H, s)
22	76,9	77,0	4,55 (1H, d, $J = 2,0$ Hz)
23	32,7	32,7	
24	31,1	31,6	
25	50,9	50,9	2,45 (1H, d, $J = 4,0$ Hz)
26	166,7	166,7	
27	60,7	60,7	3,79 (1H, d, $J = 13,5$ Hz), 4,51 (1H, dd, $J = 4,5; 13,5$ Hz)
28	26,5	26,5	1,27 (3H, s)

<sup>a</sup> CDCl<sub>3</sub>, <sup>b</sup> 125 MHz, <sup>c</sup> 500 MHz, <sup>#</sup> phổ <sup>13</sup>C-NMR của physalin B đo trong CDCl<sub>3</sub> [47]

Phổ proton <sup>1</sup>H-NMR của hợp chất **PA13** xuất hiện tín hiệu của 3 proton olefinic tại  $\delta_H$  5,90 (1H, dd,  $J = 3,0; 10,0$  Hz, H-2), 6,79 (1H, ddd,  $J = 3,0; 5,0; 10,0$  Hz, H-3), 5,57 (1H, d,  $J = 7,0$  Hz, H-6); 3 nhóm methyl ở dạng singlet tại  $\delta_H$  1,22 (3H, s, H-19), 1,97 (3H, s, H-21), 1,27 (3H, s, H-28); 1 proton hydroxymethin tại  $\delta_H$  4,55 (1H, d,  $J = 2,0$  Hz, H-22) và 2 proton oxymethylen tại  $\delta_H$  3,79 (1H, d,  $J = 13,5$  Hz, H-27a), 4,51

(1H, dd,  $J = 4,5; 13,5$  Hz, H-27b). Phổ  $^{13}\text{C}$ -NMR và HSQC cho thấy tín hiệu của 28 carbon với 11 carbon không liên kết với hydro [trong đó có 2 keto carbonyl tại  $\delta_{\text{C}}$  205,7 (C-1), 208,1 (C-15); 2 ester carbonyl tại  $\delta_{\text{C}}$  172,3 (C-18), 166,7 (C-26); 1 carbon olefin  $\delta_{\text{C}}$  133,9 (C-5); 4 carbon liên kết với oxy tại  $\delta_{\text{C}}$  79,7 (C-13), 107,5 (C-14), 81,0 (C-17), 80,3 (C-20)]; 8 carbon methin [trong đó có 3 carbon olefin tại  $\delta_{\text{C}}$  127,4 (C-2), 146,1 (C-3), 124,5 (C-6)]; 1 carbon oxymethin tại  $\delta_{\text{C}}$  77,0 (C-22)]; 6 carbon methylen  $\text{CH}_2$  [1 carbon oxymethylen tại  $\delta_{\text{C}}$  60,7 (C-27)] và 3 carbon methyl [ $\delta_{\text{C}}$  17,9 (C-19), 21,5 (C-21) và 26,5 (C-28)]. Các số liệu cho thấy đây là một hợp chất dạng seco-steroid (còn gọi là các chất dạng physalin). Phổ HMBC cho thấy các tương tác từ H-2 ( $\delta_{\text{H}}$  5,90) đến C-4 ( $\delta_{\text{C}}$  33,1)/C-10 ( $\delta_{\text{C}}$  52,7), từ H-3 ( $\delta_{\text{H}}$  6,79) đến C-1 ( $\delta_{\text{C}}$  205,7)/C-5 ( $\delta_{\text{C}}$  133,9), từ H-6 ( $\delta_{\text{H}}$  5,57) đến C-8 ( $\delta_{\text{C}}$  39,9)/C-10 ( $\delta_{\text{C}}$  52,7) và từ H-19 ( $\delta_{\text{H}}$  1,22) đến C-1 ( $\delta_{\text{C}}$  205,7) /C-5 ( $\delta_{\text{C}}$  133,9)/C-9 ( $\delta_{\text{C}}$  33,2)/C-10 ( $\delta_{\text{C}}$  52,7) xác nhận rằng hai liên kết đôi nằm ở C-2/C-3 và C-5/C-6. Các mối tương quan HMBC từ H-27 ( $\delta_{\text{H}}$  3,79, 4,51) đến C-14 ( $\delta_{\text{C}}$  107,5)/C-25 ( $\delta_{\text{C}}$  50,9) đã xác nhận sự hiện diện của cầu ether tại C-14 và C-27 (**Hình 3.18**). Từ các dữ liệu phổ trên, kết hợp với tài liệu tham khảo cho thấy, các số liệu phổ của **PA13** có sự phù hợp với số liệu phổ của hợp chất **physalin B** (**Hình 3.18**) đã được công bố trước đó [47].



**Hình 3.18. Cấu trúc (A) và các tương tác HMBC chính (B) của hợp chất PA13**

#### **+** Hợp chất **PA14**

Hợp chất **PA14** cũng thu được dưới dạng tinh thể hình kim màu vàng nhạt. Phổ ESI-MS xuất hiện pic ion phân tử tại  $m/z$  567,0  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , phù hợp với công thức phân tử là  $\text{C}_{28}\text{H}_{46}\text{O}_2$ . Phổ  $^1\text{H}$ -NMR (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$  &  $\text{CDCl}_3$ ) và  $^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$  &  $\text{CDCl}_3$ ): **Bảng 3.15**.

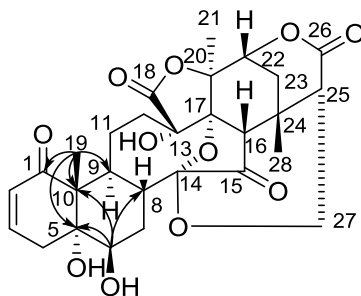
**Bảng 3.15. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất PA14**

Vị trí	$\# \delta_{\text{C}}$	$\$ \delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,c}}$ (mult., Hz)
1	207,3	205,7	206,9	
2	127,9	127,4	127,7	5,93 (1H, dd, $J = 2,5; 10,5$ Hz)
3	144,0	146,1	143,6	6,66 (1H, m)

4	35,6	33,1	35,4	
5	77,8	<b>133,9</b>	<b>76,9</b>	
6	73,6	<b>124,5</b>	<b>73,5</b>	3,71 (1H, m)
7	26,7	24,8	26,6	
8	38,8	39,9	38,5	
9	30,8	33,2	30,5	
10	54,9	52,7	54,7	
11	25,5	24,2	25,3	
12	26,0	25,9	25,7	
13	80,0	79,7	79,7	
14	108,0	107,5	107,7	
15	208,9	208,1	208,5	
16	55,9	56,4	55,7	2,16 (1H, s)
17	81,2	81,0	81,1	
18	173,1	172,3	172,6	
19	14,2	<b>17,9</b>	<b>14,1</b>	1,31 (3H, s)
20	81,4	80,3	80,8	
21	21,8	21,5	21,7	2,00 (3H, s)
22	77,8	77,0	76,9	
23	33,0	32,7	32,9	
24	31,3	31,6	31,1	
25	51,0	50,9	50,9	2,45 (1H, d, $J = 4,5$ Hz)
26	168,6	166,7	167,6	
27	61,0	60,7	60,8	3,75 (1H, m) 4,53 (1H, m)
28	26,3	26,5	26,4	1,28 (3H, s)

<sup>a</sup> CD<sub>3</sub>OD & CDCl<sub>3</sub>, <sup>b</sup> 125 MHz, <sup>c</sup> 500 MHz, <sup>\$</sup> phổ <sup>13</sup>C-NMR của **PA13** đo trong CDCl<sub>3</sub>, <sup>#</sup> phổ <sup>13</sup>C-NMR của physalin D đo trong CD<sub>3</sub>OD & CDCl<sub>3</sub> [95].

Phổ  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$  (**Bảng 3.15**) và HSQC cho thấy **PA14** cũng là một seco-steroid. So sánh số liệu phổ của **PA14** và **PA13** thấy sự khác nhau chủ yếu xảy ra ở vị trí C-5 và C-6. Sự chuyển dịch về phía trường cao của 2 tín hiệu carbon  $\delta_{\text{C}}$  76,9 (C) và 73,5 (CH) cho thấy nối đôi ở vị trí C-5 và C-6 của chất **PA13** đã bị hydroxyl hóa trong **PA14**. Điều này được khẳng định thông qua tương tác HMBC giữa H-19 ( $\delta_{\text{H}}$  1,31) với C-1 ( $\delta_{\text{C}}$  206,9), C-5 ( $\delta_{\text{C}}$  76,9), C-9 ( $\delta_{\text{C}}$  30,5) và C-10 ( $\delta_{\text{C}}$  54,7); giữa H-6 ( $\delta_{\text{H}}$  3,71) với C-5, C-8 ( $\delta_{\text{C}}$  38,5) và C-10. Từ các dữ liệu phổ trên, có thể khẳng định **PA14** là **physalin D** (**Hình 3.19**) [95].



**Hình 3.19.** Cấu trúc và các tương tác HMBC chính ( $\rightarrow$ ) của hợp chất **PA14**

#### **+** Hợp chất **PA15**

Hợp chất **PA15** thu được dưới dạng chất rắn màu trắng. Phổ ESI-MS của **PA15** xuất hiện pic ion phân tử  $m/z$  479,0  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  phù hợp với công thức phân tử là  $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3$ . Phổ  $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) và  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): **Bảng 3.16**.

**Bảng 3.16.** Dữ liệu phổ NMR của hợp chất **PA15**

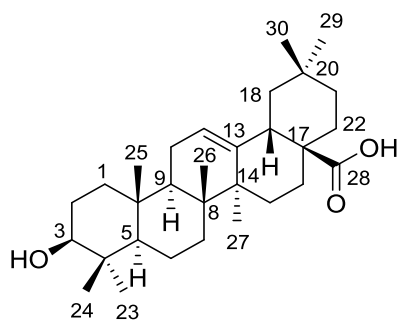
Vị trí	$\# \delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,c}}$ (mult., Hz)
1	38,4	38,5	
2	27,7	27,2	
3	79,1	79,1	3,22 (1H, dd, $J = 4,5; 11,5$ Hz)
4	38,8	38,8	
5	55,3	55,3	
6	18,3	18,3	
7	32,7	32,5	
8	39,3	39,3	
9	47,7	47,7	
10	37,1	37,1	

11	23,0	23,0	
12	122,7	122,7	5,28 (1H, t, $J = 3,5$ Hz)
13	143,6	143,6	
14	41,7	41,7	
15	27,2	27,7	
16	23,4	23,6	
17	46,5	46,6	
18	41,1	41,1	2,81 (1H, dd, $J = 4,0; 13,5$ Hz)
19	45,9	45,9	
20	30,7	30,7	
21	33,8	33,8	
22	32,5	32,7	
23	28,1	28,1	0,99 (3H, s)
24	15,6	15,6	0,78 (3H, s)
25	15,3	15,3	0,92 (3H, s)
26	17,1	17,2	0,76 (3H, s)
27	25,9	25,9	1,13 (3H, s)
28	182,6	182,9	
29	33,1	33,1	0,90 (3H, s)
30	23,6	23,6	0,93 (3H, s)

<sup>a</sup> CDCl<sub>3</sub>, <sup>b</sup> 125 MHz, <sup>c</sup> 500 MHz, <sup>#</sup> phổ <sup>13</sup>C-NMR của acid oleanolic đo trong CDCl<sub>3</sub> [134]

Phổ <sup>1</sup>H- và <sup>13</sup>C-NMR (**Bảng 3.16**) cho thấy **PA15** là một triterpen năm vòng với tín hiệu của 1 proton hydroxymethin  $\delta_{\text{H}} 3,22$  (1H, dd,  $J = 4,5; 11,5$  Hz, H-3 $\alpha$ ), 1 proton methin olefinic  $\delta_{\text{H}} 5,28$  (1H, t,  $J = 3,5$  Hz, H-12) và 7 proton methyl singlet tại  $\delta_{\text{H}} 0,99$  (3H, s, H-23); 0,78 (3H, s, H-24); 0,92 (3H, s, H-25); 0,76 (3H, s, H-26); 1,13 (3H, s, H-27); 0,90 (3H, s, H-29) và 0,93 (3H, s, H-30). Sự có mặt của 30 carbon với 5 CH, 10 CH<sub>2</sub>, 7CH<sub>3</sub> và 8C được khẳng định qua phổ <sup>13</sup>C-NMR (**Bảng 3.16**) và DEPT. Tín hiệu carbon tại  $\delta_{\text{C}} 182,5$  đặc trưng cho carbon carbonyl trong cấu trúc của **PA15**. Trên cơ sở những phân tích trên cũng như so sánh với các số liệu phổ đã công bố [134] cho phép kết luận **PA15** là **acid oleanolic** (**Hình 3.20**).





**Hình 3.20. Cấu trúc của hợp chất PA15**

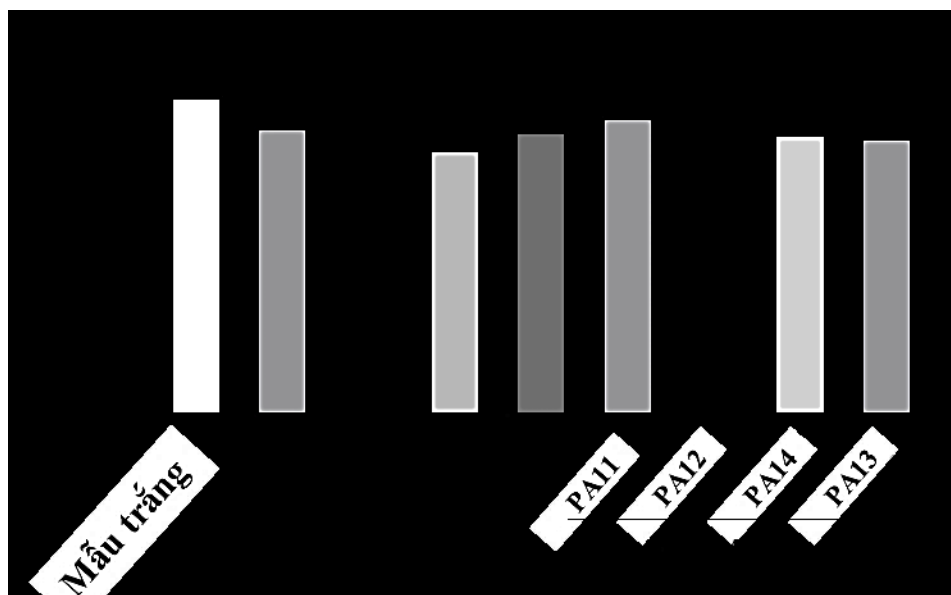
### 3.3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VỀ TÁC DỤNG SINH HỌC CỦA TÂM BÓP

#### 3.3.1. Hoạt tính kháng viêm

##### 3.3.1.1. Hoạt tính kháng viêm *in vitro*

❖ Ảnh hưởng của mẫu thử đến khả năng sống sót của tế bào RAW 264.7

Cao toàn phần EtOH 96% cây Tâm bóp (TBT, 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), các cao phân đoạn (TBH, TBE và TBN, 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) và 4 hợp chất tinh khiết (10  $\mu\text{M}$ ) phân lập từ Tâm bóp được đánh giá mức độ gây độc tế bào *in vitro* trên dòng tế bào RAW 264.7 theo phương pháp MTT. Kết quả được thể hiện ở hình 3.21.



**Hình 3.21. Ảnh hưởng của mẫu thử đến khả năng sống sót của tế bào RAW 264.7.**

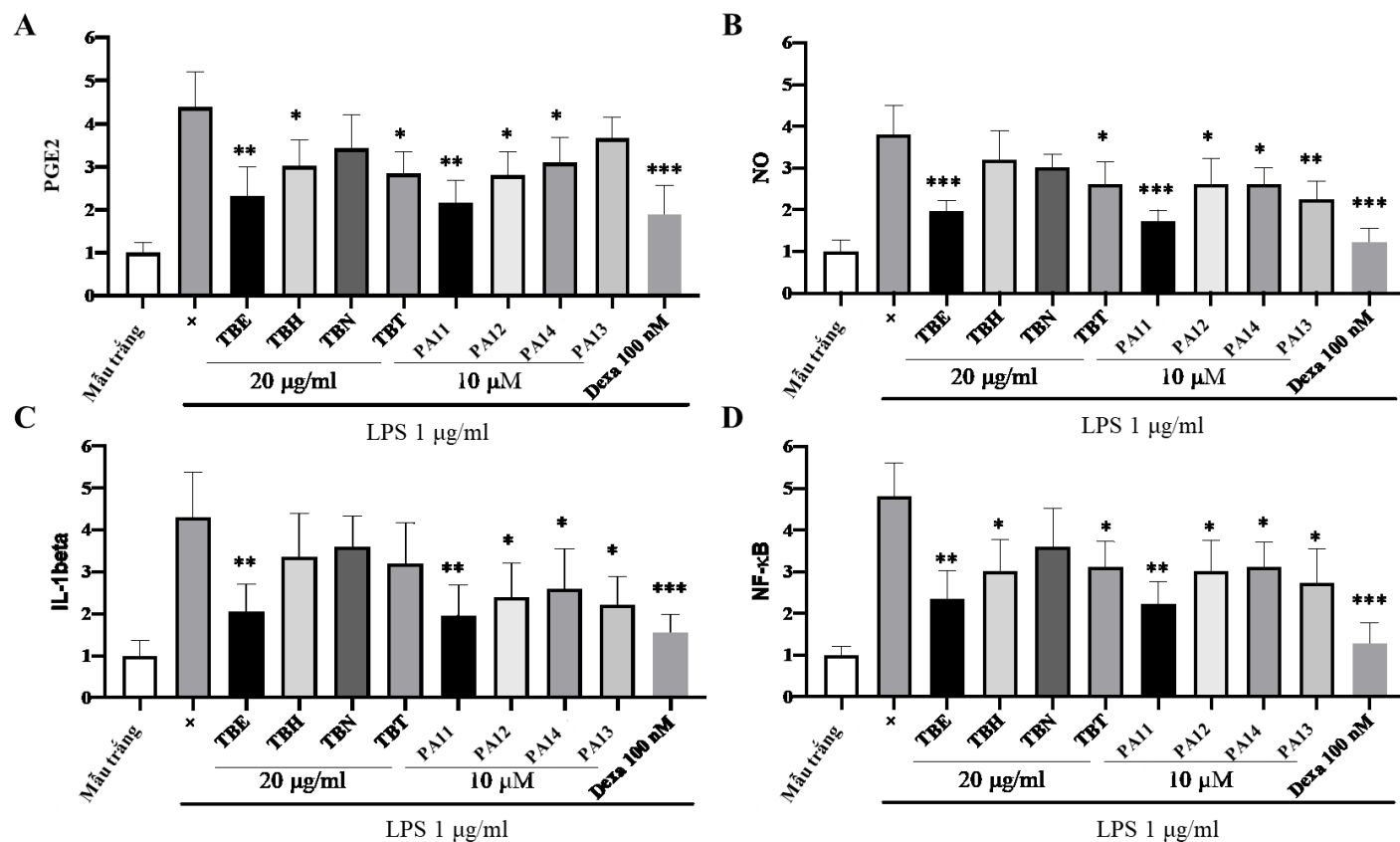
Cao chiết (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) và các chất tinh khiết (nồng độ 10  $\mu\text{M}$ ) cây Tâm bóp được ủ với tế bào RAW 264.7 trên đĩa 96 giếng (30 000 tế bào/giếng) trong 24 giờ. Mẫu trắng được ủ với DMSO. Sau đó MTT 2 mg/mL trong PBS (100  $\mu\text{L}$ ) được ủ với tế bào khoảng 45 phút cho đến khi xuất hiện màu tím. Sản phẩm được đo quang ở bước sóng 570 nm.

Sau 24 giờ ủ với cao chiết (20 µg/mL) và hợp chất tinh khiết (10 µM), trên 80% các tế bào sống sót, dao động từ 85 - 96%. Do vậy nồng độ 20 µg/mL đối với dịch chiết và 10 µM đối với chất tinh khiết là an toàn để thực hiện thí nghiệm chống viêm *in vitro* tiếp theo trên tế bào RAW 264.7.

❖ *Hoạt tính kháng viêm in vitro của các mẫu thử Tầm bóp*

Cao toàn phần EtOH 96% (**TBT**, 20 µg/mL), các cao phân đoạn (**TBH**, **TBE** và **TBN**, 20 µg/mL) và 4 hợp chất tinh khiết (10 µM) phân lập từ Tầm bóp được đánh giá mức độ ức chế sản sinh PGE2 và NO, IL-1β và hoạt tính NF-κB trong đại thực bào RAW 264.7 gây kích thích viêm bằng LPS sử dụng phương pháp xét nghiệm ELISA (**Hình 3.22**).

Kết quả cho thấy: Trong số 4 cao thử nghiệm, cao EtOAc (**TBE**, 20 µg/mL) của Tầm bóp ức chế mạnh nhất sự sản sinh PGE2, NO, IL-1β và giảm hoạt tính của NF-κB trong đại thực bào RAW 264.7 gây kích thích viêm bằng LPS. Các hợp chất withanolid phân lập từ cây Tầm bóp cũng thể hiện hoạt tính kháng viêm *in vitro* tốt. Trong số đó, hợp chất **PA11** thể hiện khả năng ức chế mạnh nhất trên sự sản sinh PGE2, NO, và IL-1β và giảm hoạt tính NF-κB trong đại thực bào RAW 264.7 gây kích thích viêm bằng LPS ở liều thử nghiệm 10 µM (**Hình 3.22A-D**).



**Hình 3.22. Hoạt tính kháng viêm *in vitro* của các cao chiết (20 μg/mL) và chất tinh khiết (10 μM) từ Tầm bóp**

Ảnh hưởng của các cao chiết và chất tinh khiết phân lập từ Tầm bóp lên mức độ sản sinh PGE2 (A), NO (B), IL-1β (C) và hoạt tính NF-κB (D). Cao chiết (20 μg/mL) và các chất tinh khiết (nồng độ 10 μM) cây Tầm bóp được ủ cùng với chất gây cảm ứng viêm LPS (1 μg/mL) với tế bào RAW 264.7 trên đĩa 96 giếng (30 000 tế bào/giếng) trong 24 giờ. Mẫu trắng được ủ với DMSO. Dịch môi trường tế bào được thu và thử phản ứng Elisa với các cytokin khác nhau. Độ tin cậy, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  so sánh giữa các mẫu dịch chiết, chất tinh khiết với mẫu chứng LPS. Dexamethason 100 nM được sử dụng là chất đối dương.

### 3.3.1.2. Hoạt tính kháng viêm in vivo

#### ❖ Hoạt tính kháng viêm cấp

Kết quả thể hiện hoạt tính kháng viêm cấp của cao toàn phần EtOH 96% Tầm bóp trên mô hình gây phù bàn chân chuột bằng carrageenan ở **bảng 3.17**.

**Bảng 3.17. Ảnh hưởng của cao toàn phần EtOH 96% Tầm bóp lên mức độ phù chân chuột**

Lô nghiên cứu	n	Tỷ lệ phù chân chuột (%)			
		Sau 2 h	Sau 3 h	Sau 4 h	Sau 6 h
<b>Chứng</b>	10	24,60 ± 2,80	38,46 ± 4,58	43,11 ± 4,89	41,16 ± 4,82
<b>Indomethacin (10 mg/kg)</b>	10	8,92 ± 2,20**	14,26 ± 1,77**	11,00 ± 2,55**	5,03 ± 1,48**
<b>Lô 1</b> (Cao EtOH 96% liều 0,3 g/kg)	11	23,52 ± 2,98	41,51 ± 3,64	39,33 ± 2,60	35,34 ± 2,35
<b>Lô 2</b> (Cao EtOH 96% liều 0,9 g/kg)	11	22,00 ± 1,56	30,39 ± 1,61	27,04 ± 2,52*	25,11 ± 2,17*

\*:  $p < 0,05$  và \*\*:  $p < 0,01$  khi so sánh với lô chứng

#### Nhận xét:

Cao toàn phần EtOH 96% của Tầm bóp liều 0,3 g/kg không có tác dụng ức chế phù bàn chân chuột ở các thời điểm 2 h, 3 h, 4 h và 6 h sau khi gây viêm ( $p > 0,05$ ) nhưng liều cao hơn (0,9 g/kg) có tác dụng ức chế phù bàn chân chuột ở 2 thời điểm là 4 h và 6 h sau khi gây viêm ( $p < 0,05$ ).

#### ❖ Hoạt tính kháng viêm mạn

Kết quả thể hiện hoạt tính kháng viêm mạn của cao toàn phần EtOH 96% Tầm bóp trên mô hình gây u hạt thực nghiệm bằng bông ở **bảng 3.18**.

**Bảng 3.18. Ảnh hưởng của cao toàn phần EtOH 96% Tầm bóp trên khối lượng u hạt trên chuột cống trắng**

Lô nghiên cứu	n	Khối lượng u hạt tươi (mg)	% ức chế khi cân ướt	Khối lượng u hạt khô (mg)	% ức chế khi cân khô
<b>Chứng</b>	10	634,22 ± 74,89	-	103,61 ± 20,04	-
<b>Prednisolon (5 mg/kg)</b>	10	296,34 ± 43,92**	53,28	40,14 ± 6,31*	61,26
<b>Lô 1</b> (Cao EtOH 96% liều 0,3 g/kg)	10	626,64 ± 79,90	-	107,84 ± 24,54	-
<b>Lô 2</b> (Cao EtOH 96% liều 0,9 g/kg)	10	453,87 ± 33,39*	28,44	84,37 ± 15,77	-

\*:  $p < 0,05$  và \*\*:  $p < 0,01$  khi so sánh với lô chứng

#### Nhận xét:

Prednisolon liều 5 mg/kg thể hiện hoạt tính kháng viêm mạn rõ rệt, làm giảm đáng kể khối lượng u hạt tươi ( $p < 0,01$ ) và u hạt khô ( $p < 0,05$ ) so với lô chứng, tỷ lệ giảm lần lượt là 53,28% và 61,26%.

Cao toàn phần EtOH 96% Tầm bóp với liều 0,3 g/kg không thể hiện tác dụng làm giảm khối lượng u hạt cả lúc ướt và lúc khô ( $p > 0,05$ ).

Cao toàn phần EtOH 96% Tầm bóp với liều 0,9 g/kg có tác dụng làm giảm khối lượng u hạt lúc ướt ( $p < 0,05$ ) với tỷ lệ giảm là 28,44%, nhưng không làm giảm khối lượng u hạt sau khi sấy khô ( $p > 0,05$ ).

#### 3.3.2. Tác dụng giảm đau

Kết quả đánh giá tác dụng giảm đau ngoại vi của cao toàn phần EtOH 96% Tầm bóp trên mô hình gây đau quận bằng acid acetic thể hiện ở **bảng 3.19**.

**Bảng 3.19. Ảnh hưởng của cao toàn phần EtOH 96% Tầm bóp đến số cơn đau quặn của chuột nhắt trắng**

Lô/Liều	n	Số cơn đau quặn (số cơn/5 phút)					
		0-5 phút	5-10 phút	10-15 phút	15-20 phút	20-25 phút	25-30 phút
<b>Chứng</b>	10	11 (9-15)	26 (21-30)	19 (16-25)	19 (16-20)	13 (12-16)	11 (8-12)
<b>Aspirin</b> (240 mg/kg)	11	0**	4 (0-12)**	8 (1-18)**	6 (0-13)**	7 (0-12)**	7 (0-10)*
<b>Lô 1</b> (Cao EtOH 96% liều 0,6 g/kg)	10	2 (0-6)**	15 (11-16)**	15 (12-16)**	11 (8-12)**	9 (4-11)**	7 (6-11)
<b>Lô 2</b> (Cao EtOH 96% liều 1,8 g/kg)	11	2 (1-4)**	13 (10-14)**	10 (8-10)**	7 (6-10)**	6 (2-7)**	2 (0-6)**

Số liệu được trình bày dưới dạng trung vị và khoảng tứ phân vị, \*:  $p < 0,05$  và \*\*:  $p < 0,01$  khi so sánh với lô chứng, dùng Mann - Whitney U test

**Nhận xét:** Aspirin liều 240 mg/kg thể hiện tác dụng giảm đau tốt, làm giảm số cơn đau quặn ở thời điểm 5 phút và kéo dài đến 30 phút sau khi tiêm acid acetic 1% ( $p < 0,01$ ).

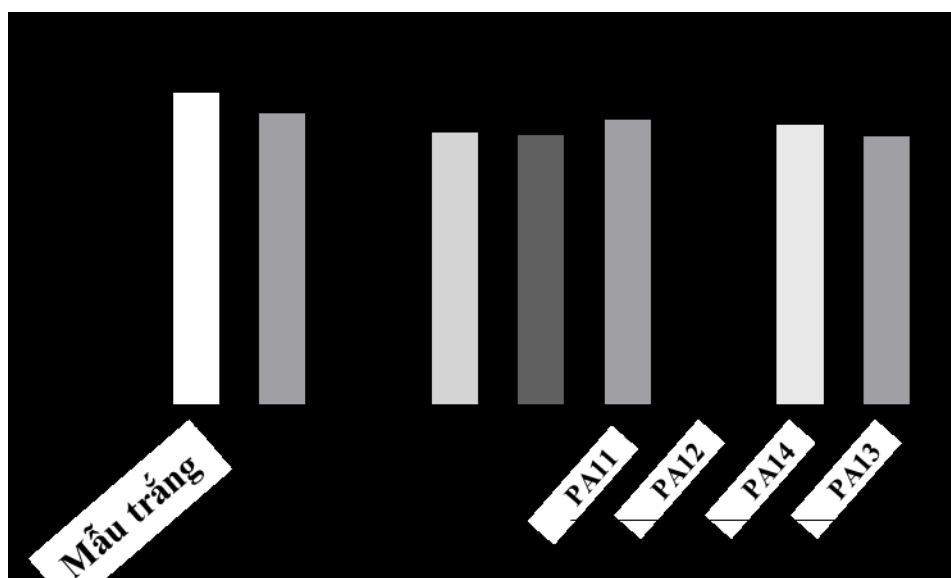
Cao toàn phần EtOH 96% Tầm bóp cả hai mức liều 0,6 g/kg và 1,8 g/kg đều thể hiện tác dụng giảm đau tốt, làm giảm số cơn đau quặn ở thời điểm 5 phút sau khi tiêm acid acetic 1% ( $p < 0,01$ ), tác dụng này kéo dài đến 30 phút sau khi tiêm đối với mức liều cao 1,8 g/kg ( $p < 0,01$ ) và tác dụng kéo dài đến phút 25 ở mức liều thấp hơn (0,6 g/kg) ( $p < 0,01$ ).

### 3.3.3. Tác dụng trên chuyển hóa acid béo và glucose trong tế bào gan HepG2

Đánh giá tác dụng của cao chiết và một số hợp chất tinh khiết phân lập được đến chuyển hóa acid béo và glucose thông qua con đường AMPK trong tế bào gan HepG2

### 3.3.3.1. Ảnh hưởng của mẫu thử lên khả năng sống sót của tế bào HepG2

Cao toàn phần EtOH 96% (TBT, 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), các cao phân đoạn (TBH, TBE và TBN, 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) và 4 hợp chất tinh khiết (10  $\mu\text{M}$ ) phân lập từ Tầm bóp được đánh giá mức độ gây độc tế bào *in vitro* trên dòng HepG2 theo phương pháp MTT. Kết quả được thể hiện ở hình 3.23.



Hình 3.23. Ảnh hưởng của mẫu thử đến khả năng sống sót của tế bào HepG2

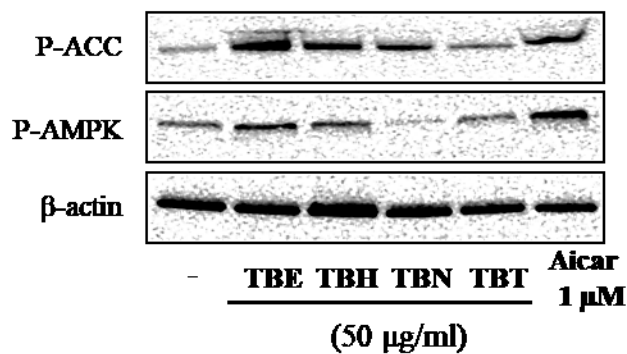
Cao chiết (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) và các chất tinh khiết (nồng độ 10  $\mu\text{M}$ ) cây Tầm bóp được ủ với tế bào HepG2 trên đĩa 96 giếng (30 000 tế bào/giếng) trong 24 giờ. Mẫu trắng được ủ với DMSO. Sau đó MTT 2 mg/mL trong PBS (100  $\mu\text{L}$ ) được ủ với tế bào khoảng 45 phút cho đến khi xuất hiện màu vàng đậm. Sản phẩm được đo quang ở bước sóng 570 nm.

Sau 24 giờ ủ với cao chiết (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) và hợp chất tinh khiết (10  $\mu\text{M}$ ), trên 80% các tế bào sống sót (dao động từ 85 - 96%). Các nồng độ 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  đối với dịch chiết và 10  $\mu\text{M}$  đối với chất tinh khiết là an toàn với tế bào trong 24 giờ thí nghiệm.

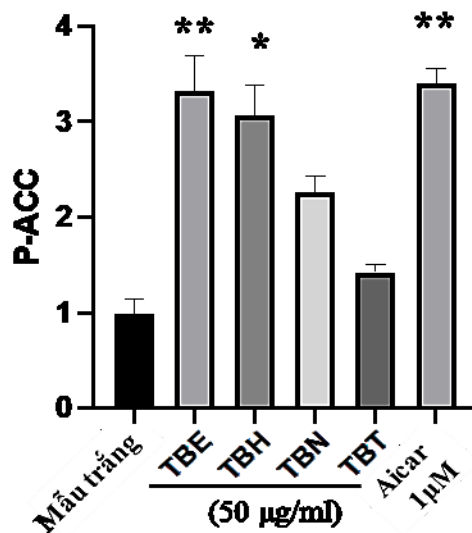
### 3.3.3.2. Tác dụng hoạt hóa AMPK và ACC trong tế bào gan HepG2

Kết quả đánh giá tác dụng hoạt hóa AMPK và ACC trong tế bào gan HepG2 của cao chiết và 4 hợp chất withanolid được trình bày ở hình 3.24 - 3.25.

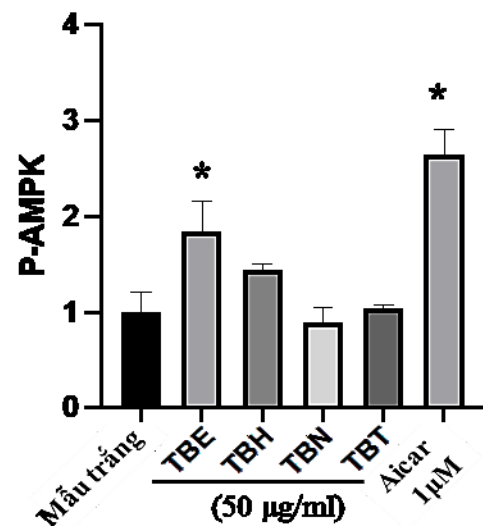
**A**



**B**



**C**



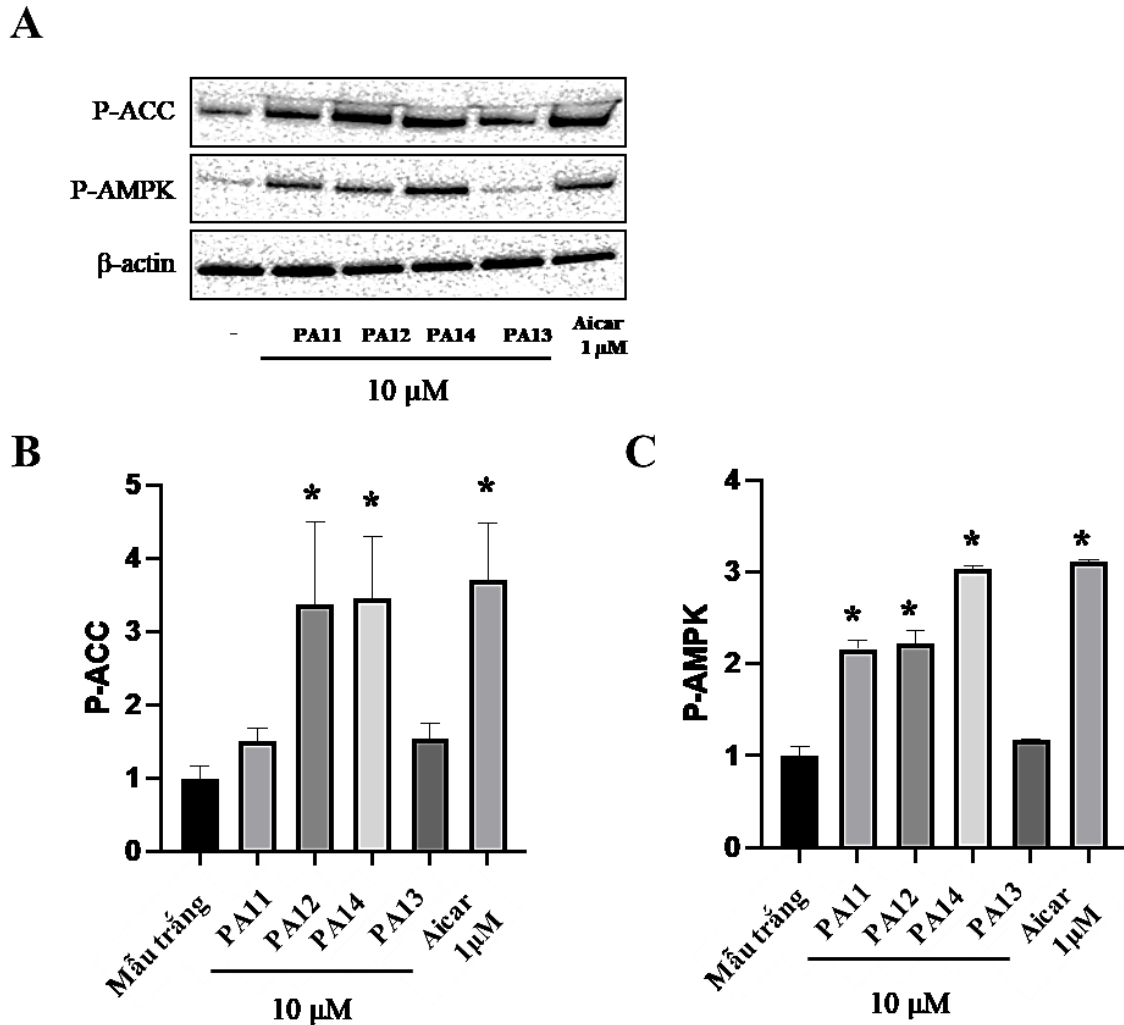
**Hình 3.24.** Khả năng hoạt hóa p-AMPK và p-ACC trong tế bào HepG2 của các cao chiết

(A) Sự biểu hiện nồng độ protein AMPK và ACC trong tế bào HepG2 bởi các cao chiết (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Dịch chiết (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) từ Tầm bóp được ủ với tế bào HepG2 trong 2 giờ. Dịch chiết tế bào sau đó được ly giải và phân tích điện di protein với các kháng thể: phospho-AMPK, phospho-ACC và  $\beta$ -actin. (B, C) Cường độ dải của phospho-AMPK và phospho-ACC trong A được định lượng bằng phần mềm Image J. Aicar được sử dụng là chất đối chứng dương cho thí nghiệm. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  so với mẫu trắng.

Kết quả cho thấy: Cao toàn phần (TBT) và các cao phân đoạn tương ứng gồm cao *n*-hexan (TBH), cao EtOAc (TBE) và cao nước (TBN) ở liều thử nghiệm 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  đều làm tăng biểu hiện của p-ACC và p-AMPK ở mức độ khác nhau (Hình 3.24A-C) so với giếng chứng (chỉ bổ sung dung môi đã dùng để pha mẫu thử). Tuy nhiên, như quan sát trên hình 3.24B và 3.24C, cao TBE ở liều thử nghiệm 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$



tăng biểu hiện p-ACC và p-AMPK mạnh nhất so với các mẫu thử khác và mạnh hơn so với chứng dương Aicar liều 1  $\mu\text{M}$  trên biểu hiện p-ACC và yếu hơn trên biểu hiện p-AMPK. Mức độ tác dụng hoạt hóa p-ACC của các cao chiết như sau **TBE > TBH > TBN > TBT** và hoạt hóa p-AMPK như sau: **TBE > TBH > TBT > TBN**.



**Hình 3.25. Khả năng hoạt hóa p-AMPK và p-ACC trong tế bào HepG2 của các hợp chất**

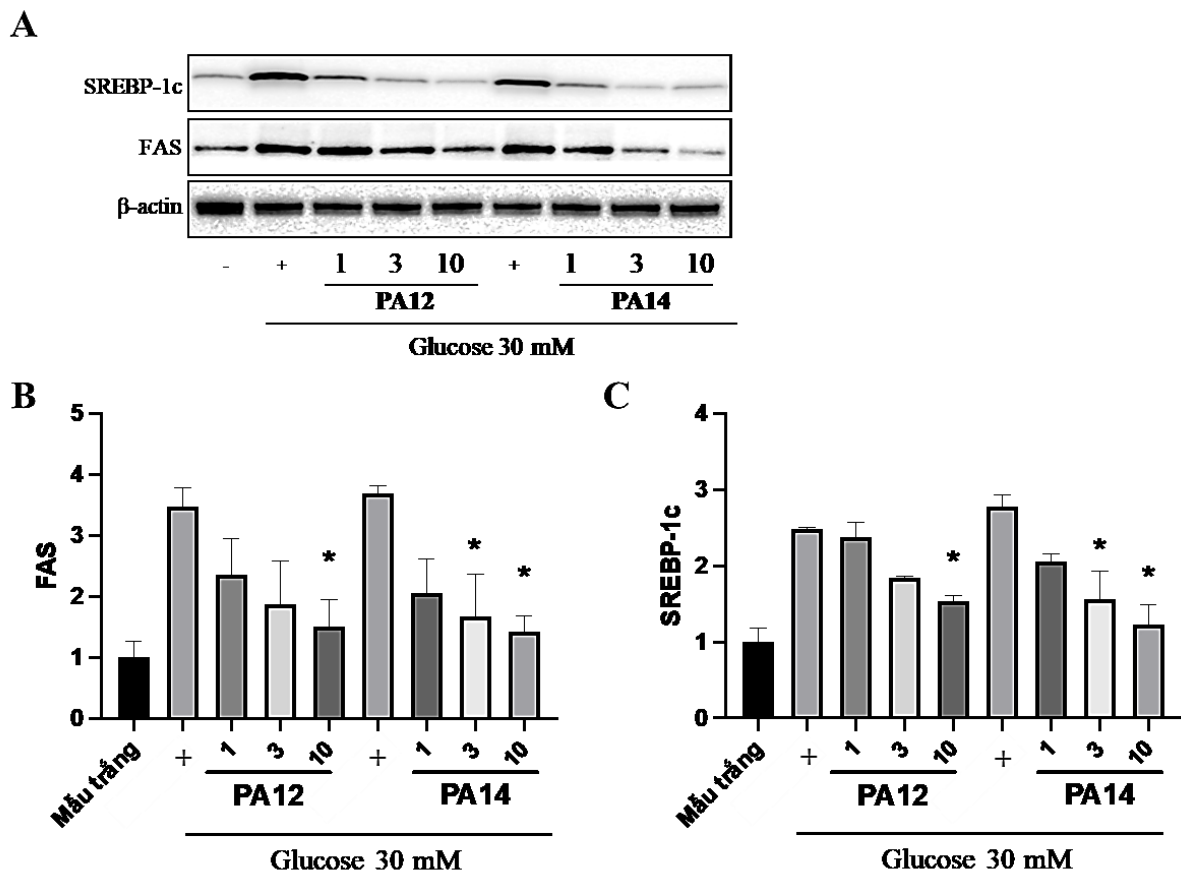
(A) Sự biểu hiện nồng độ AMPK và ACC trong tế bào HepG2 bởi các hợp chất tinh khiết (10  $\mu\text{M}$ ). Chất tinh khiết phân lập từ Tầm bóp được ủ với tế bào HepG2 trong 2 giờ. Dịch chiết tế bào sau đó được ly giải và phân tích điện di protein với các kháng thể: p-AMPK, p-ACC và  $\beta$ -actin. (B, C) Cường độ dải của p-AMPK và p-ACC trong A được định lượng bằng phần mềm Image J. Aicar được sử dụng là chất đối chứng dương cho thí nghiệm. \*  $p < 0,05$  so với mẫu trắng.

Nhận xét: Ở mức liều thử nghiệm 10  $\mu\text{M}$ , 4 hợp chất tinh khiết **PA11 - PA14** đều tăng biểu hiện p-ACC ở mức độ khác nhau. Trong đó, hai hợp chất **PA12** và **PA14** thể hiện tác dụng mạnh tương đương đối chứng dương Aicar ở nồng độ thử nghiệm 1

$\mu\text{M}$ . Đối với thử nghiệm trên mức độ biểu hiện p-AMPK, hợp chất **PA14** ( $10 \mu\text{M}$ ) thể hiện tác dụng mạnh nhất so với 3 chất còn lại (**PA11-PA13**) và tương đương chất đối chứng dương Aicar ở nồng độ thử nghiệm  $1 \mu\text{M}$  (**Hình 3.25A, B và C**), tiếp theo là đến hợp chất **PA11** và **PA12**. Mức độ biểu hiện của  $\beta\text{-actin}$  không thay đổi.

### 3.3.3.3. Tác dụng ức chế FAS và SREBP-1c của PA12 và PA14 trong tế bào HepG2

Nghiên cứu trên cho thấy, hai hợp chất **PA12** và **PA14** ( $10 \mu\text{M}$ ) hoạt hóa mạnh p-AMPK và p-ACC, do đó chúng được lựa chọn để đánh giá mức độ ảnh hưởng trên biểu hiện gen FAS và yếu tố phiên mã nhạy cảm với AMPK (SREBP-1c) trong tế bào HepG2 ở các nồng độ khác nhau 1, 3 và  $10 \mu\text{M}$  trong điều kiện nồng độ glucose cao ( $30 \text{ mM}$ ) (**Hình 3.26**).



**Hình 3.26. Tác dụng ức chế FAS và SREBP-1c theo nồng độ của PA12 và PA14 trong tế bào HepG2**

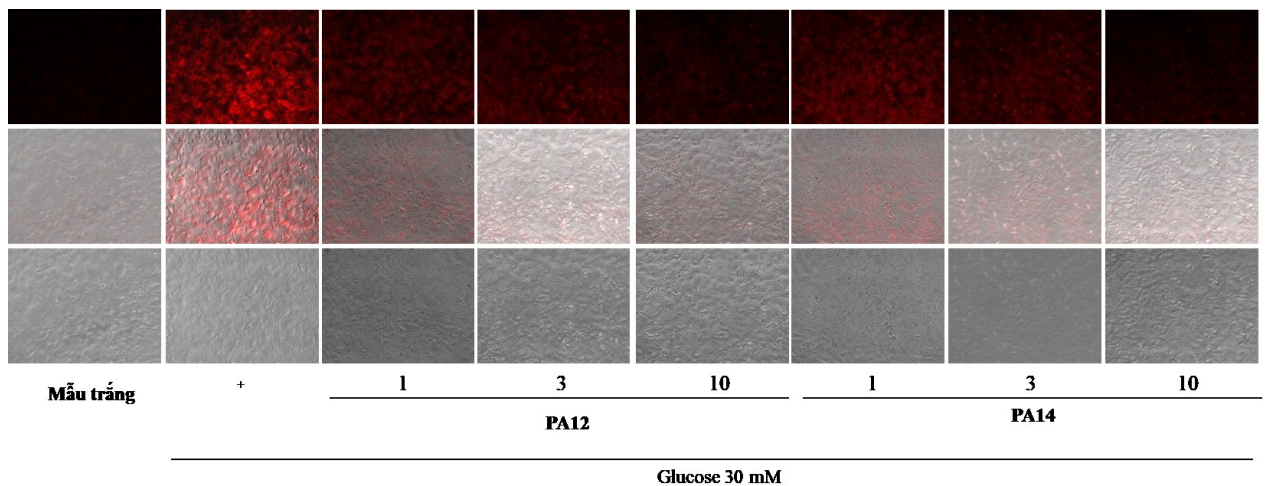
Chất tinh khiết ( $10 \mu\text{M}$ ) phân lập từ Tầm bóp được ủ với tế bào HepG2 có chứa glucose  $30 \text{ mM}$  trong 6 giờ. Dịch chiết tế bào sau đó được ly giải và phân tích điện di protein với các kháng thể: SREBP-1c, FAS và  $\beta\text{-actin}$ . \*  $p < 0,05$  so với glucose.

Kết quả cho thấy: Mức độ biểu hiện của  $\beta\text{-actin}$  không thay đổi. Tế bào sau khi được bổ sung glucose nồng độ cao  $30 \text{ mM}$  gây tăng sự biểu hiện FAS và SREBP-1c với mức độ tăng lần lượt là 3,65 và 2,58 so với mẫu chứng không ủ glucose. Kết quả

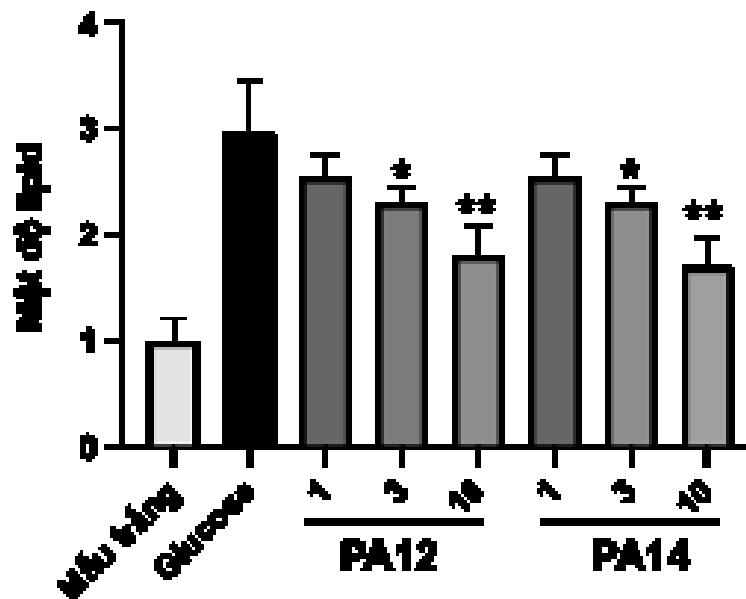
thể hiện cụ thể trên hình ảnh chụp Western Blot (**Hình 3.26A**). Trong khi đó, hai hợp chất **PA12** và **PA14** (10  $\mu$ M) đều thể hiện khả năng ức chế mạnh biểu hiện của gen FAS và SREBP-1c phụ thuộc theo nồng độ ở cùng điều kiện nồng độ glucose cao 30 mM (**Hình 3.26A-C**).

**3.3.3.4. Đánh giá khả năng ức chế tích tụ lipid trên tế bào HepG2 bằng thử nghiệm Nile Red**

Hai hợp chất **PA12** và **PA14** ở mức liều 10  $\mu$ M không gây ảnh hưởng đến khả năng sống sót của tế bào HepG2. Do vậy, mức liều cao nhất 10  $\mu$ M được sử dụng cho thí nghiệm đánh giá khả năng ức chế sự tích tụ lipid. Kết quả chỉ ra ở **hình 3.27** và **2.28**.



**Hình 3.27.** Hình ảnh nhuộm Nile Red của các tế bào sau khi ủ mẫu thử



**Hình 3.28.** Khả năng ức chế tích tụ lipid trên tế bào HepG2 bằng thử nghiệm Nile Red

Chất tinh khiết (1, 3 và 10  $\mu\text{M}$ ) phân lập từ Tầm bóp được ủ với tế bào HepG2 có chứa glucose 30 mM trong 24 giờ. Thử nghiệm đánh giá Nile Red được thực hiện như miêu tả phương pháp tiến hành thí nghiệm.

Nhận xét: Khi tiến hành đánh giá khả năng tích tụ acid oleic vào trong tế bào, kết quả cho thấy mẫu được ủ nồng độ glucose cao và không được điều trị với các hợp chất tinh khiết PA12 và PA14 cho thấy mức độ tích tụ lipid vào trong tế bào cao trong khi mẫu chứng trắng không ủ glucose mức độ tích tụ lipid không được quan sát thấy. Các hợp chất tinh khiết PA12 và PA14 ở 3 mức liều 1, 3 và 10  $\mu\text{M}$  có tác dụng ức chế sự tích tụ lipid phụ thuộc nồng độ so với lô chỉ ủ với glucose nồng độ cao (Hình 3.27).

### 3.3.4. Tác dụng gây độc trên một số dòng tế bào ung thư

#### 3.3.4.1. Tác dụng gây độc trên một số dòng tế bào ung thư *in vitro* của cao chiết

Cao toàn phần EtOH 96% (TBT) và 3 cao phân đoạn (TBH, TBE và TBN) được tiến hành thử nghiệm hoạt tính kháng các dòng tế bào là 4T1 (ung thư vú ở chuột), SNU-1 (ung thư dạ dày ở người), Hep3B (ung thư gan ở người), NTERA-2 (tế bào gốc ung thư ở người), LLC (ung thư phổi ở chuột) và HEK-293A (tế bào biểu mô phổi thận người) *in vitro*. Kết quả chỉ ra ở bảng 3.20.

**Bảng 3.20. Khả năng gây độc tế bào của cao chiết Tầm bóp**

STT	Mẫu	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )					
		4T1	SNU1	Hep3B	NTERA2	LLC	HEK-293A
1	TBT	4,13 ± 0,36	6,71 ± 0,47	4,69 ± 0,34	10,74 ± 1,41	6,84 ± 0,45	4,31 ± 0,15
2	TBH	13,44 ± 1,19	12,98 ± 1,17	11,14 ± 0,59	8,04 ± 0,53	8,95 ± 0,56	9,13 ± 0,94
3	TBE	6,63 ± 0,46	6,88 ± 0,71	6,31 ± 0,28	8,41 ± 0,57	5,41 ± 0,32	3,81 ± 0,27
4	TBN	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
5	Ellipticin	0,40 ± 0,02	0,43 ± 0,03	0,45 ± 0,04	0,46 ± 0,05	0,55 ± 0,06	0,39 ± 0,03

Kết quả trên cho thấy:

+ Các cao **TBT**, **TBH** và **TBE** thể hiện hoạt tính gây độc tế bào trên các dòng tế bào ung thư nghiên cứu với giá trị  $IC_{50}$  từ 4,13 - 13,44  $\mu\text{g/mL}$ . So với cao toàn phần và cao EtOAc, cao *n*-hexan thể hiện tác dụng yếu hơn trên tất cả các dòng tế bào.

+ Mẫu **TBN** không thể hiện hoạt tính gây độc ở các nồng độ nghiên cứu.

+ Chất đối chứng dương ellipticin hoạt động ổn định trong quá trình thí nghiệm.

### 3.3.4.2. Tác dụng gây độc trên một số dòng tế bào ung thư *in vitro* của hợp chất phân lập

Bốn hợp chất withanolid (**PA11** - **PA14**) phân lập từ Tầm bóp cũng được thử nghiệm hoạt tính kháng các dòng tế bào ung thư 4T1, SNU-1, Hep3B, NTERA-2, LLC và HEK-293A *in vitro*. Kết quả chỉ ra ở **bảng 3.21**.

**Bảng 3.21. Khả năng gây độc tế bào của các hợp chất phân lập từ Tầm bóp**

STT	Mẫu	$IC_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )					
		4T1	SNU1	Hep3B	NTERA2	LLC	HEK-293A
1	<b>PA11</b>	3,41 ±	2,67 ±	7,62 ±	6,98 ±	5,57 ±	8,79 ± 1,13
		<b>0,44</b>	<b>0,63</b>	1,17	8,30	0,85	
2	<b>PA12</b>	4,32 ±	3,12 ±	8,07 ±	8,32 ±	7,18 ±	9,49 ± 1,65
		<b>0,57</b>	<b>1,21</b>	1,54	7,80	1,62	
3	<b>PA13</b>	2,64 ±	1,10 ±	6,79 ±	4,44 ±	4,59 ±	5,81 ± 0,68
		<b>0,39</b>	<b>0,74</b>	0,96	<b>0,40</b>	<b>0,77</b>	
4	<b>PA14</b>	3,61 ±	2,70 ±	7,62 ±	9,00 ±	8,53 ±	13,28 ± 1,49
		<b>0,95</b>	<b>0,86</b>	1,53	0,60	0,96	
5	<b>Doxorubicin</b>	0,16 ±	0,39 ±	0,17 ±	0,75 ±	0,22 ±	0,81 ± 0,09
		0,03	0,04	0,02	0,06	0,02	

Kết quả trên cho thấy:

+ **PA13** thể hiện tác dụng mạnh nhất trong số 4 hợp chất nghiên cứu trên các dòng tế bào 4T1, SNU1, NTERA-2 và LLC, với  $IC_{50}$  trong khoảng 1,10 - 4,59  $\mu\text{M}$ .

+ Các hợp chất còn lại (**PA11**, **PA12** và **PA14**) chỉ thể hiện tác dụng trên dòng tế bào 4T1 và SNU1, trong đó tác dụng của **PA11** ~ **PA14** > **PA12**, với  $IC_{50}$  lần lượt trên dòng tế bào 4T1 là 3,41 ± 0,44  $\mu\text{M}$  (**PA11**), 4,32 ± 0,57  $\mu\text{M}$  (**PA12**), 3,61 ± 0,95

$\mu\text{M}$  (**PA14**) và trên dòng tế bào SNU1 là  $2,67 \pm 0,63 \mu\text{M}$  (**PA11**),  $3,12 \pm 1,21$  (**PA12**)  $\mu\text{M}$ ,  $2,70 \pm 0,86 \mu\text{M}$  (**PA14**).

+ Chứng dương doxorubicin hoạt động ổn định trong quá trình thí nghiệm.

## CHƯƠNG 4

### BÀN LUẬN

Cây Tầm bóp hay còn gọi là Tầm phốc, Lu lu cái... có tên khoa học là *Physalis angulata* L., thuộc họ Cà Solanaceae là loại cây thảo, sống hằng năm, được nhân dân sử dụng để tắm trị rôm sảy cho trẻ em, người bị mẩn ngứa; toàn cây còn dùng sắc uống điều trị viêm khớp, cứng khớp, họng sưng đau... Ở Việt Nam, cây mọc khắp nơi từ đồng bằng đến vùng núi có độ cao 1500 m như Sơn La, Lạng Sơn, Bắc Giang, Hà Nội, Ninh Bình, Thanh Hóa, Đà Nẵng, Kon Tum, Gia Lai, thành phố Hồ Chí Minh [15], [21]. Tầm bóp đã được nghiên cứu về thành phần hóa học và tác dụng sinh học. Tuy nhiên, ở Việt Nam loài này chưa được quan tâm. Do đó, luận án đã tiến hành nghiên cứu tổng thể về thực vật, thành phần hóa học và tác dụng sinh học cây Tầm bóp thu hái ở Việt Nam, góp phần tạo cơ sở khoa học cho việc sử dụng loài này theo tri thức dân gian và định hướng phát triển sản phẩm trong tương lai.

#### 4.1. VỀ THỰC VẬT

Luận án đã xây dựng được bộ dữ liệu hoàn chỉnh về đặc điểm hình thái, cấu tạo giải phẫu (thân, lá) và đặc điểm vi học bột dược liệu (thân, lá). Kết quả này phù hợp với các tài liệu ở trong và ngoài nước đã công bố về cây Tầm bóp [4], [14], [135], [136], [137]. Tuy nhiên, những công bố trước đây mới chỉ tập trung mô tả hình thái, chưa có công bố về đặc điểm giải phẫu, bột dược liệu. Đây là công bố đầu tiên về đặc điểm giải phẫu và bột dược liệu của phần thân và lá cây Tầm bóp góp phần xây dựng tiêu chuẩn dược liệu, phục vụ công tác kiểm nghiệm, đồng thời xác định tính đúng của loài nghiên cứu.

Hiện nay, trong gian gian Tầm bóp (*Physalis angulata*, họ Cà - Solanaceae) đang bị nhầm lẫn với cây Lu lu đực (Lù lù đực, Cà lù, Thù lu đực - *Solanum nigrum*, họ Cà - Solanaceae) và cây Xoan leo (Tam phồng, Tầm phồng - *Cardiospermum halicacabum*, họ Bồ hòn - Sapindaceae). Hai cây này đều được người dân gọi chung là “Tầm bóp” (Hình 4.1). Chúng thường được tìm thấy ở cùng một nơi, nhiều nhất là trong các cánh đồng ngô sau khi bẻ bắp hay ven bờ sông.

Theo tài liệu tham khảo về lu lu đực [138] và xoan leo [139] Hình 4.1 với kết quả nghiên cứu về Tầm bóp của luận án, cho thấy, 3 loài này có đặc điểm thực vật rất khác nhau: Tầm bóp (lu lu cái) được bao bọc bởi đài đồng trường hình ngũ giác, cây thảo, còn “tầm bóp” (lu lu đực) quả trần không được bao bọc. Cũng có thể phân biệt với dây “tầm bóp” (xoan leo) ở đài đồng trường hình tam giác và thân leo.



a. Cây Tầm bóp

b. Cây Lu lu đực [138]

c. Cây Xoan leo [139]

#### Hình 4.1. Cây Tầm bóp, Lu lu đực và cây Xoan leo

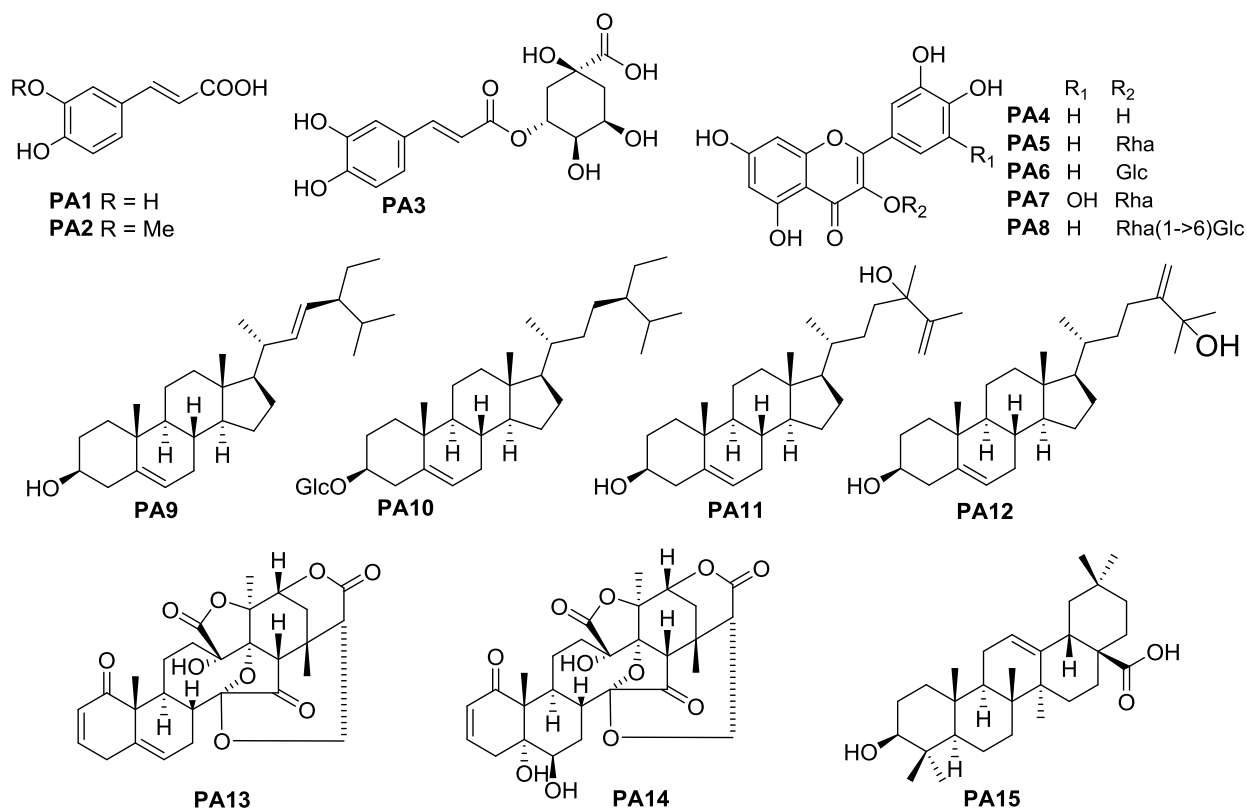
Như vậy, luận án đã góp phần làm sáng tỏ các đặc điểm thực vật giúp người dân có thể phân biệt Tầm bóp (Lu lu cái) với “tầm bóp” (Lu lu đực) hay cây Xoan leo.

#### 4.2. VỀ HÓA HỌC

**Định tính:** Kết quả định tính bằng các phản ứng hóa học cho thấy, Tầm bóp chứa hầu hết các nhóm chất ngoại trừ nhóm glycosid tim, trong đó flavonoid là nhóm chất chính của loài này. Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu trong và ngoài nước về Tầm bóp.

**Chiết xuất và phân lập:** Từ cao EtOH 96% Tầm bóp đã phân lập và xác định cấu trúc của 15 hợp chất (**Hình 4.2**), bao gồm 3 acid phenolic (acid caffeic **PA1**, acid ferrulic **PA2** và acid chlorogenic **PA3**), 5 flavonoid (quercetin **PA4**, quercitrin **PA5**, quercetin 3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosid **PA6**, myricetin 3-*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyranosid **PA7** và rutin **PA8**), 2 sterol (stigmasterol **PA9** và daucosterol **PA10**), 4 withanolid (physalindicanol A **PA11**, physalindicanol B **PA12**, physalin B **PA13** và physalin D **PA14**) và 1 triterpen (acid oleanolic **PA15**). Trong số đó, hợp chất **PA7** và **PA12** lần đầu tiên phân lập từ loài *P. angulata*. Kết quả phân lập phù hợp với kết quả định tính và cũng phù hợp với các nghiên cứu trên thế giới về loài *P. angulata* L.





**Hình 4.2. Cấu trúc của các hợp chất phân lập từ Tầm bóp**

Các hợp chất phân lập từ cây Tầm bóp cũng được nghiên cứu về tác dụng sinh học:

➤ Hợp chất **PA1: Acid caffeic**

Acid caffeic phân bố rộng rãi trong thực vật và thường được tìm thấy dưới dạng các dẫn xuất khác nhau như glycosid, amid, ester và đường ester. Trong số các dẫn xuất của acid caffeic, sự biến đổi thành ester hoặc amid tạo ra các chất mới với các hoạt tính sinh học khác nhau. Một số tác dụng sinh học của acid caffeic và dẫn xuất của nó đã được nghiên cứu như **chống viêm, chống ung thư**, chống oxy hóa, kháng HIV... Acid caffeic và dẫn xuất của nó CAPE được biết là ức chế NF-κB, do đó làm chậm quá trình phiên mã của một số gen tiền viêm. Trong trường hợp cụ thể của ester methyl vanillat acid caffeic (CAMVE, một chất tương tự acid caffeic tổng hợp), cơ chế ức chế NF-κB đã được chứng minh và không đặc hiệu cho tế bào. Trong nhiều năm, nhiều dẫn xuất của acid caffeic và CAPE đã được tổng hợp để cải thiện khả năng chống viêm của các phân tử tự nhiên này [140].

➤ Hợp chất **PA2: Acid ferrulic**

Acid ferulic (acid 4-hydroxy-3-methoxycinnamic) là một acid phenolic được phân lập lần đầu tiên từ *Ferula foetida* (Apiaceae) vào khoảng giữa thế kỷ 19. Acid ferulic và các hợp chất liên quan được tìm thấy rộng rãi trong rau, trái cây, một số đồ

uống (ví dụ, cà phê, bia, v.v.) và một số dược liệu như *Angelica sinensis*, *Cimicifuga racemosa* và *Ligusticum chuangxiong*. Những thành phần phổ biến này cũng có trong thành tế bào sơ cấp của một số loài thực vật, xuất hiện trong hạt và lá của chúng ở cả dạng tự do và được ester hóa thành monosaccharid, disaccharid, và polysaccharid của thành tế bào thực vật, glycoprotein, polyamin, lignin và các acid béo hydroxyl hóa. Các đồng phân *trans* của acid ferulic chiếm tới 90% tổng số acid phenolic của một số loại trái cây và rau quả, trong khi các monomer acid ferulic là hợp chất phenolic chính trong một số loại thức phẩm như cà chua, cà rốt, cam và ngô. Hiện nay đã có rất nhiều các nghiên cứu về tác dụng sinh học của hợp chất này như **chống viêm, chống ung thư**, chống oxy hóa, **đái tháo đường**, tác dụng bảo vệ đối với các cơ quan, mô và tế bào [141].

**Hoạt tính kháng viêm:** Nhiều nghiên cứu đã chứng minh rằng, acid ferulic và các dẫn xuất của nó cùng với các chất chống oxy hóa khác làm giảm nồng độ của một số chất trung gian gây viêm bằng cách ức chế COX, iNOS và biểu hiện/chức năng của caspase-1, cũng như kích hoạt NF- $\kappa$ B, một phức hợp protein kiểm soát phiên mã ADN và tham gia vào các phản ứng của tế bào đối với các kích thích như căng thẳng, cytokin, gốc tự do, chiếu xạ tia cực tím, lipoprotein tỉ trọng thấp bị oxy hóa (LDL) và các kháng nguyên vi khuẩn hoặc virus. Các cơ chế chống viêm khác của acid ferulic đề cập đến sự giảm nồng độ của IL-6 và IL-8, là những chemokin được sản xuất bởi đại thực bào và các loại tế bào khác như tế bào biểu mô, tế bào cơ trơn đường hô hấp và tế bào nội mô để tạo ra sự điều hòa hóa học trong các tế bào đích (chủ yếu là bạch cầu trung tính, bạch cầu hạt), khiến chúng di chuyển đến vị trí viêm nhiễm [141].

**Hoạt tính chống đái tháo đường:** Bệnh đái tháo đường là một bệnh rối loạn chuyển hóa liên quan đến việc gia tăng hình thành các gốc tự do. Balasubashini và cộng sự (2004) bổ sung acid ferulic cho chuột mắc bệnh đái tháo đường đều làm giảm nồng độ glucose trong máu, các chất phản ứng với acid thiobarbituric, hydroperoxyd và acid béo tự do trong gan của chuột bị đái tháo đường. Ngoài ra, acid ferulic làm tăng hoạt động của superoxid dismutase, catalase, glutathion peroxidase và mở rộng các đảo nhỏ của tuyến tụy, chứng tỏ việc sử dụng acid ferulic đã tăng cường đáng kể khả năng chống oxy hóa của chuột bị đái tháo đường bằng cách trung hòa các gốc tự do được hình thành, do đó làm giảm mức độ của bệnh đái tháo đường. Hơn nữa, các nghiên cứu bổ sung từ một số tác giả khác đã chứng minh rằng, acid ferulic cũng ức chế quá trình peroxy hóa lipid trong mô mỡ nâu của chuột mắc bệnh đái tháo đường, tái tạo tế bào beta tuyến tụy, điều chỉnh mức đường huyết bằng cách tăng cường hoạt động glucokinase và sản xuất glycogen và bằng cách điều chỉnh các phân tử truyền tín hiệu insulin trong gan. Ngoài ra, acid ferulic đã được chứng minh là có tác dụng bảo vệ và điều trị đối với bệnh thận do đái tháo đường bằng cách giảm stress oxy hóa và

viêm, chống đái tháo đường ở chuột mắc bệnh đái tháo đường do alloxan gây ra, có thể thông qua việc ức chế yếu tố tiền viêm NF- $\kappa$ B. Acid ferulic cũng làm giảm nguy cơ tăng đường huyết do chế độ ăn nhiều chất béo gây ra thông qua việc điều chỉnh bài tiết insulin và các hoạt động của enzym điều hòa glucose ở gan và cải thiện khả năng chống stress, chống oxy hóa của tế bào gan và tế bào cơ tim với nồng độ glucose cao hơn mà cơ chế liên quan đến con đường truyền tín hiệu Keap1-Nrf2-ARE. Các nghiên cứu gần đây báo cáo rằng, acid ferulic cũng tương tác hiệp đồng với các loại thuốc trị đái tháo đường metformin và thiazolidinedion [141].

**Độc tính trên tế bào ung thư:** Acid ferulic có cả đặc tính chống oxy hóa và quá trình chết tế bào. Một chế độ ăn thường xuyên trái cây và rau quả, chủ yếu là những loại có hàm lượng acid ferulic cao, làm giảm đáng kể nguy cơ mắc nhiều bệnh ung thư. Có rất nhiều báo cáo mô tả các hoạt động chống ung thư của acid ferulic. Đặc biệt quan tâm là một số nghiên cứu gần đây báo cáo độc tính tế bào của hợp chất này đối với các dòng tế bào ung thư vú người, ung thư ruột kết Caco-2, u lympho bào U937, u xương, dòng tế bào ung thư cổ tử cung ME-180 ở người và dòng tế bào ung thư hắc tố da. Một trong những con đường khác nhau đối với hoạt động chống ung thư của acid ferulic và các dẫn xuất là kích thích uridin diphosphat (UDP) glucuronosyltransferase (UGTs) trong gan, góp phần giải độc tốt hơn các hợp chất có khả năng gây ung thư và sau đó ngăn ngừa ung thư đường tiêu hóa. Các cơ chế khác được báo cáo bao gồm ức chế COX-2, cảm ứng apoptosis thông qua việc giải phóng cytochrom c từ ty thể và kích hoạt caspase-3. Acid ferulic cũng ức chế sự tăng sinh và gây ra quá trình apoptosis thông qua việc ức chế con đường PI3K/Akt trong tế bào u xương hoặc bằng cách tác động vào thụ thể tăng trưởng nguyên bào sợi 1 qua trung gian con đường tín hiệu PI3K-Akt, dẫn đến ngăn chặn sự phát triển của khối u ác tính và tạo mạch [141].

➤ **Hợp chất PA3: Acid chlorogenic**

Acid chlorogenic là một acid phenolic phổ biến trong thực phẩm như trà và cà phê. Các nghiên cứu về hoạt tính của acid này cũng đã được đánh giá [142]:

**Hoạt tính chống đái tháo đường và béo phì:** Các đặc tính chống béo phì và chống đái tháo đường của acid chlorogenic có liên quan đến quá trình chuyển hóa glucose. Cũng có ý kiến cho rằng, việc giảm trọng lượng cơ thể và sự hấp thụ glucose ở người và động vật do ức chế giải phóng glucose bằng cách ngăn chặn hoạt động glucose-6-phosphatase ở gan và ức chế hấp thụ glucose ở ruột non bằng cách ngăn cản glucose-6-phosphate translocase 1. Dẫn đến làm giảm lượng glucose trong máu, do đó hoạt động của insulin sẽ yếu hơn. Nguồn năng lượng thứ hai sau khi giảm lượng glucose sẵn có là chất béo dự trữ. Hoạt động của insulin càng yếu sẽ gây ra sự gia tăng tích tụ chất béo trong mô mỡ và do đó nó dẫn đến việc đốt cháy mô mỡ quá mức và

giảm cân. Hơn nữa, người ta đã chứng minh rằng acid chlorogenic có thể tăng cường quá trình phosphoryl hóa, thụ thể adiponectin và adiponectin của protein kinase kích hoạt AMP (AMPK) và làm giảm sự biểu hiện của glucose-6-phosphatase ở gan. Sự gia tăng trong quá trình phosphoryl hóa AMPK, adiponectin và các thụ thể adiponectin và cũng làm giảm hoạt động của glucose-6-phosphatase có liên quan đến việc hạ thấp mức triglycerid, glycosyl hóa hemoglobin, glucose và cholesterol, đồng thời ức chế gan nhiễm mỡ và cũng là sự gia tăng dung nạp glucose và sự nhạy cảm với insulin.

**Hoạt tính chống oxy hóa và chống viêm:** Tác dụng chống oxy hóa của acid chlorogenic như các acid phenolic đã được báo cáo từ các cao chiết của các loại thực vật khác nhau. Cao chiết *Hypericum hircinum* L. có chứa acid chlorogenic đã được chứng minh là có hoạt tính dọn gốc tự do. Mặt khác, phân tích các thành phần của tinh dầu *Stachys palustris* cho thấy sự có mặt của acid caffeoylquinic với khả năng dọn gốc tự do. Người ta đã chứng minh được rằng các hydroxyl (OH) trong cấu trúc của acid phenolic đóng vai trò là nhóm chức chịu trách nhiệm chính trong hoạt tính chống oxy hóa của chúng, với các thứ tự giảm dần hoạt tính như sau: acid phenolic trihydroxy > dihydroxy (catechol) > monohydroxy. CA (một chất chuyển hóa của acid chlorogenic) cũng đã được báo cáo là có các hoạt động chống viêm và chống oxy hóa. Trong một nghiên cứu được công bố gần đây, báo cáo rằng sự tiết IL-8 và biểu hiện mRNA do stress oxy hóa gây ra đã bị ức chế đáng kể bởi acid chlorogenic. Ngoài ra, việc sản xuất IL-8 bị ngăn chặn bởi CA, nhưng nó không bị ảnh hưởng bởi acid quinic (một chất chuyển hóa khác của acid chlorogenic) trong tế bào Caco-2. Nghiên cứu trước đây chỉ ra rằng, CA và acid chlorogenic làm giảm biểu hiện mRNA của protein gây viêm đại thực bào 2 (MIP-2, một chất tương đồng của IL-8 trên chuột) trên mô hình viêm đại tràng do dextran sulfat natri gây ra. Cơ chế chống viêm của acid chlorogenic và CA là ức chế sự hoạt hóa của con đường tín hiệu IL-8, PKD-IKK, NF-κB bằng cách dọn các gốc oxy hóa tự do ở nội bào. Trong nghiên cứu của Shin H. S. và cộng sự, báo cáo rằng các đặc tính chống viêm của CA và acid chlorogenic có liên quan đến nhóm catechol của nó. Do đó, người ta tin rằng acid chlorogenic, CA và các hợp chất khác có nhóm catechol có thể hữu ích trong việc góp phần ngăn ngừa các bệnh viêm nhiễm. Hầu hết các sản phẩm tự nhiên có chứa acid chlorogenic đều có tác dụng hoạt tính kháng viêm và acid chlorogenic có thể là một chất chống viêm đáng chú ý. Người ta cũng phát hiện ra rằng, acid chlorogenic có thể ngăn chặn hiệu quả chuột khỏi bệnh viêm gan do Con A gây ra, có thể là kết quả của việc kích hoạt tín hiệu TLR4, điều chỉnh giảm sự biểu hiện của các phân tử kết dính và cũng làm giảm sự xâm nhập và hoạt hóa của bạch cầu gan và sản xuất cytokin gây viêm. Ngoài ra, việc sử dụng acid chlorogenic cho chuột bị thương có thể đẩy nhanh quá trình chữa lành vết thương mà không để lại bất kỳ tác dụng phụ nào đối với tim và thận.

Ngoài các tác dụng trên, acid chlorogenic còn có tác dụng chống tăng huyết áp và kháng khuẩn.

➤ **Hợp chất PA4: Quercetin**

Quercetin là một flavonoid có trong thành phần của nhiều cây (chokeberry đen, hành tây, cà chua, rau diếp...). Trong thực vật, quercetin thường ở dạng liên kết với đường, eter hoặc acid phenolic. Quercetin thu hút nhiều sự chú ý do tác dụng chống oxy hóa, chống béo phì, kháng khuẩn, virus, chống viêm và kháng ung thư. Theo ghi nhận của Rubio, Motilva và Romero (2013) và Ruma, Kumar và Prakash (2013), quercetin thể hiện khả năng **chống viêm mạnh**. Một số nhà nghiên cứu cho rằng quercetin có thể ngăn chặn sự sản xuất cytokin do LPS tạo ra trong các tế bào khác nhau. Ví dụ, quercetin có thể ức chế sản xuất yếu tố hoại tử khối u do LPS gây ra trong đại thực bào và sản xuất IL-8 do LPS gây ra trong tế bào phổi. Bureau, Longpre và Martinoli (2008) báo cáo rằng quercetin có thể ức chế mức mRNA do LPS gây ra của các cytokin trong tế bào tạo keo, như TNF- $\alpha$  và IL-1 $\alpha$ . Họ cũng phát hiện ra rằng quá trình apoptosis của tế bào thần kinh đã giảm xuống trong hệ thống nuôi cấy vi tế bào thần kinh bằng cách bổ sung quercetin. Hoạt tính kháng viêm của quercetin có liên quan đến đặc tính chống oxy hóa và loại bỏ gốc tự do. Các gốc oxy hóa tự do không chỉ tồn tại trong quá trình oxy hóa, mà còn tham gia vào phản ứng viêm bằng cách kích hoạt các yếu tố chuyển giao như yếu tố nhân kappa B (NF- $\kappa$ B). Hơn nữa, NF- $\kappa$ B có thể tạo ra TNF- $\alpha$ . Do đó, loại bỏ các gốc oxy hóa tự do ngăn chặn quá trình oxy hóa và ức chế viêm đồng thời. Hơn nữa, Nair và cộng sự (2006) đã giải thích rằng quercetin có thể ức chế sự biểu hiện gen của TNF- $\alpha$  bằng cách điều chỉnh NF- $\kappa$ B trong các tế bào đơn nhân máu ngoại vi. Ngoài ra, quercetin đã được chứng minh là một chất có độc tính cao với tế bào ung thư. Từ các nghiên cứu *in vitro* trên các dòng tế bào ung thư khác nhau, ví dụ: U138MG, tế bào Hep-2 và tế bào ung thư phổi A549 và cả từ các thử nghiệm *in vivo*. Quercetin có thể ngăn ngừa ung thư do stress oxy hóa do hoạt động chống oxy hóa của nó và ức chế nhiều kinase liên quan đến sự phát triển của tế bào ung thư, sự tăng sinh và di căn. Về các tế bào ung thư biểu mô vú ở người, chẳng hạn như tế bào SK-Br3 và MDA-MB, một liều quercetin thấp đã ức chế sự tăng sinh của chúng. Quercetin cũng được tìm thấy là gây apoptois trong tế bào cổ trướng của chuột mang ung thư hạch Dalton. Hơn nữa, quercetin hạn chế hoạt động của protein kinase C, góp phần ức chế sự tiến triển của ung thư [143].

➤ **Hợp chất PA5: Quercitrin**

Quercitrin hay 3-rhamnosylquercetin có đặc tính chống oxy hóa, có hoạt tính kháng viêm đại tràng thực nghiệm. Trong nghiên cứu Camuesco D. và cộng sự (2004), các thử nghiệm *in vivo* khác nhau đã được thực hiện để đánh giá các cơ chế hoạt động

liên quan đến hiệu ứng này, đặc biệt chú ý đến ảnh hưởng của nó đối với các chất trung gian tiền viêm, bao gồm cả NO. Viêm đại tràng thực nghiệm được gây ra ở chuột Wistar cái bằng cách bổ sung dextran natri sulfat (DSS) trong nước uống. Điều trị bằng đường uống quercitrin (1 hoặc 5 mg/ kg/ ngày) cho chuột bị viêm ruột kết làm cải thiện sự tiến triển của quá trình viêm gây ra. Khi dùng quercitrin (1 mg/ kg/ ngày) đối với bệnh viêm đại tràng, nó tạo điều kiện phục hồi niêm mạc bị viêm. Các tác dụng có lợi do quercitrin gây ra đã được chứng minh cả về mặt mô học và sinh hóa và có liên quan đến việc cải thiện tình trạng oxy hóa ruột kết. Bên cạnh đó, việc giảm hoạt động NO đại tràng đã được quan sát, có thể liên quan đến giảm biểu hiện dưới dạng cảm ứng của enzym qua ức chế tuyến yên trong hoạt động đại tràng của NF- $\kappa$ B. Các nghiên cứu mô miễn dịch hóa cho thấy điều trị bằng quercitrin làm giảm sự xâm nhập của đại thực bào và bạch cầu hạt trong mô bị viêm [144]. Tang J. và cộng sự (2019) cũng nghiên cứu hoạt tính kháng viêm của quercetin. Kết quả xét nghiệm CCK-8 cho thấy nồng độ an toàn của quercitrin thấp hơn 22,4  $\mu$ g/mL. Ngoài ra, nồng độ NO có thể bị ức chế đáng kể bởi quercitrin. Bên cạnh đó, kết quả ELISA cho thấy TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  và IL-6 đã bị giảm trong các tế bào RAW 264.7 được kích thích bằng LPS sau khi can thiệp bằng quercitrin. Xu hướng thay đổi ROS tương tự như xu hướng của các yếu tố gây viêm. Tính toán lý thuyết đã giả thuyết rằng nguyên tử oxy trên các vòng B có thể là yếu tố chính của sự thay đổi mật độ đám mây điện tử, điều này có thể gợi ý một cơ chế khả thi cho hoạt tính kháng viêm và dọn ROS của quercitrin. Như vậy, có thể thấy quercitrin ức chế viêm đại thực bào do LPS và stress oxy hóa bằng cả thực nghiệm và tính toán lý thuyết [145].

➤ Hợp chất **PA6: Quercetin 3-O- $\beta$ -D-glucopyranosid (Isoquercetin)**

Quercetin 3-O- $\beta$ -D-glucopyranosid cũng là dẫn xuất glycosid của quercetin hay còn gọi là isoquercetin. Hợp chất này đã được chứng minh là có tác dụng gây độc tế bào ung thư [146], ức chế  $\alpha$ -glucosidase, chống viêm, chống oxy hóa... Jayachandran M. cùng các cộng sự (2019), đã đánh giá hoạt động chống đái tháo đường của isoquercetin qua các con đường khác (stress oxy hóa và viêm nhiễm) để phân tích đầy đủ xem liệu isoquercetin có điều chỉnh hiệu quả các gen của những con đường này hay không. Vào cuối thời gian thử nghiệm, chuột được mổ và phân tích về stress oxy hóa, peroxy hóa lipid, các dấu hiệu viêm và lipid. Con đường liên quan đến yếu tố hạt nhân erythroid 2 (Nrf2) được cho là cơ quan điều chỉnh chính của sự biểu hiện của các gen enzym chống oxy hóa khác nhau và nó có liên quan trực tiếp hoặc gián tiếp đến NF- $\kappa$ B và con đường AMPK hoạt hóa AMP. Do đó, nhóm nghiên cứu tiếp tục tìm hiểu tác động của STZ trên con đường Nrf2, NF- $\kappa$ B và AMPK và cách thức hoạt động của isoquercetin ở cấp độ phân tử. Kết quả nghiên cứu này đã cung cấp bằng chứng thuyết phục về các đặc tính dược lý của isoquercetin dựa trên khả năng ức chế stress oxy hóa

do STZ gây ra thông qua việc tạo ra các gốc tự do và điều chỉnh sự biểu hiện của các protein và gen liên quan đến con đường Nrf2. Bằng cách xem xét các kết quả trên, isoquercetin có thể được nghiên cứu sâu hơn để làm sáng tỏ hoạt tính chống đái tháo đường của nó ở các mức độ khác nhau [147].

➤ **Hợp chất PA7: Myricetin 3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosid (myricitrin)**

Myricitrin là một flavonoid với nhiều tác dụng đã được nghiên cứu và chứng minh, trong đó có hoạt tính kháng viêm, chống oxy hóa, bảo vệ gan, chống ung thư... Nghiên cứu của Domitrovic R. và cộng sự (2015) cho thấy, myricitrin ở liều 10, 30 và 100 mg/kg và silymarin ở liều 100 mg/kg được dùng cho chuột BALB/cN bằng đường uống, một lần mỗi ngày trong hai ngày liên tiếp sau khi gây độc bằng CCl<sub>4</sub>. Myricitrin cải thiện đáng kể tác động do CCl<sub>4</sub> gây ra như tăng nồng độ aspartat transaminase (AST) và alanin transaminase (ALT) trong huyết thanh và những thay đổi về mô bệnh học ở gan. Stress oxy hóa ở gan được giảm bởi myricitrin, bằng chứng là quá trình peroxy hóa lipid giảm, đồng thời tăng nồng độ glutathion (GSH) và biểu hiện cytochrom P450 2E1 (CYP2E1). Ngoài ra, sự biểu hiện quá mức của COX-2 và TNF- $\alpha$  trong gan đã giảm, cho thấy sự ức chế viêm. Sự biểu hiện của yếu tố tăng trưởng biến đổi-beta (TGF- $\beta$ ) và alpha-actin cơ trơn ( $\alpha$ -SMA) được cải thiện rõ rệt, điều đó cho thấy sự ức chế phản ứng tiền xơ. Myricitrin cũng cải thiện sự tái tạo của mô gan sau khi nhiễm độc CCl<sub>4</sub>, bằng chứng là tăng biểu hiện kháng nguyên nhân tế bào tăng sinh [148]. Mặc dù, myricitrin có nhiều tác dụng sinh học nhưng ứng dụng lâm sàng của nó bị hạn chế bởi khả năng hòa tan kém và sinh khả dụng đường uống thấp. Việc tạo ra proliposom chứa myricitrin (MP) thông qua sự kết hợp của kỹ thuật phân tán màng mỏng và phương pháp đông khô đã làm tăng sinh khả dụng của myricitrin. Sự giải phóng của MP so với myricitrin tự do được đo trong các môi trường hòa tan khác nhau khi nghiên cứu dược động học trên chuột. Hoạt động hạ acid uric của MP cũng được nghiên cứu trên mô hình chuột tăng acid uric máu. Đáng chú ý, so với myricitrin tự do, sự giải phóng *in vitro* và *in vivo* sinh khả dụng đường uống của MP đã tăng lên rõ rệt. MP có thể làm giảm đáng kể nồng độ acid uric huyết thanh cũng như cải thiện tổn thương gan và thận ở chuột tăng acid uric máu so với nhóm mô hình [149].

➤ **Hợp chất PA8: Rutin**

Rutin (3,3',4',5,7-pentahydroxyflavon-3-rhamnoglucosid) là một flavonol, được tìm thấy nhiều ở các loại thực vật như hoa hòe, lạc tiên, kiêu mạch, trà và táo. Nó là một thành phần dinh dưỡng quan trọng của thực phẩm. Rutin, còn được gọi là rutosid, quercetin-3-rutinosid và sophorin. Tên 'rutin' xuất phát từ cây *Ruta graveolens*, cũng chứa rutin. Hợp chất này đã được nghiên cứu là có nhiều hoạt tính sinh học như [150]:

+ Trên hệ thống thần kinh trung ương: Chống viêm thần kinh, tăng cường sự sống sót của tế bào mào thần kinh, tác dụng an thần, chống co giật, chống bệnh Alzheimer & điều trị rối loạn vận động, chống trầm cảm, đột quy.

+ Trên hệ nội tiết: **Chống đái tháo đường, chống tăng cholesterol** trong máu;

+ Trên hệ tim mạch: Tăng huyết áp, đông máu, chống kết tập tiểu cầu, chống xơ vữa động mạch;

+ Trên hệ tiêu hóa: Chống loét;

+ Trên hệ hô hấp: Chống bệnh hen suyễn và các tác dụng liên quan khác;

+ Trên xương: Chống loãng xương;

+ Trên mắt: Chống đục thủy tinh thể;

+ Trên hệ bài tiết: Lợi tiểu (hoạt động trên nội mô mạch máu gây giải phóng oxid nitric, dẫn đến tăng tuần hoàn mạch máu ở thận do tăng lọc thận);

+ Bảo vệ nội tạng (thần kinh, phổi, tim, võng mạc, gan, lách), bảo vệ vết thương...

#### ➤ Hợp chất **PA9: Stigmasterol**

Stigmasterol được phân lập lần đầu tiên từ Calabarbohne vào năm 1906 bởi Adolf Wind Form and A. Hauth. Ngoài ra, hợp chất này cũng được tìm thấy trong nhiều loại dược liệu khác nhau (*Croton sublyratus*, *Ficus hirta*, *Eclipta alba* (L.) Hassk, *Eclipta prostrate*, *Parkia speciosa*, *Gypsophila oldhamiana*, *Eucalyptus globules*, *Aralia cordata*, *Emilia sonchifolia*, *Akebia quinata*, *Desmodium styracifolium*, *Heracleum rapula*. Stigmasterol đã được nghiên cứu nhiều về tác dụng sinh học như chống viêm khớp xương mạn tính, chống tăng huyết áp, gây độc tế bào, chống u, hạ đường huyết, hạ sốt, chống oxy hóa, chống viêm và tác dụng trên thần kinh trung ương. **Đối với hoạt tính kháng viêm:** Cao chiết aceton của *Sideriti foetens* được phát hiện là có chứa các phân đoạn sterol bao gồm stigmasterol,  $\beta$ -sitosterol và campesterol. Các phân đoạn này được đánh giá về hoạt tính chống viêm. Kết quả cho thấy, chúng làm giảm phù nề do carrageenan và cũng ức chế phù nề tai do TPA khi bôi tại chỗ. Ngoài ra, stigmasterol được phân lập từ *Eryngium foetidum* (Apiaceae) đã được Garcia M. D. đánh giá, tập trung vào chúng phù não do TPA gây ra, bằng cách sử dụng đơn hoặc kết hợp với tác nhân phlogistic và stigmasterol được chứng minh là làm giảm phù nề. **Đối với hoạt tính kháng khối u:** stigmasterol ức chế rõ rệt sự thúc đẩy khối u trong các thử nghiệm tăng sinh ung thư hai giai đoạn. Zhijie G. đã nghiên cứu các chất chiết xuất từ *Couepia polyandry* và *Edgeworthia gardner* cho thấy sự có mặt của stigmasterol cùng với các thành phần khác và stigmasterol



được tìm thấy là có tác dụng ức chế hoạt tính lyase của DNA polymerase  $\beta$  và cũng làm tăng tác dụng ức chế của thuốc chống ung thư bleomycin trong các tế bào A549 được nuôi cấy. Những tác động này là kết quả của sự ức chế tổng hợp ADN [151].

➤ **Hợp chất PA10: Daucosterol**

Daucosterol là dạng glycosid của  $\beta$ -sitosterol. Tương tự như aglycon của nó, hợp chất này cũng có trong thành phần của nhiều loại thảo dược với các tác dụng tương đối đa dạng như: Chống ung thư [152], điều hòa miễn dịch [153], chống viêm [154]... **ĐỐI VỚI HOẠT TÍNH KHÁNG VIÊM:** Nghiên cứu của Jang J. và cộng sự (2019) đã đánh giá tác dụng điều trị và miễn dịch của daucosterol trên mô hình chuột bị viêm đại tràng do dextran sulfat natri (DSS) gây ra. Chuột được điều trị trước hoặc sau bằng daucosterol cho thấy sự ức chế giảm trọng lượng cơ thể và giảm chỉ số hoạt động bệnh (DAI). Ngoài ra, điều trị bằng daucosterol đã giải quyết được tình trạng giảm chiều dài ruột kết do DSS gây ra và sự gián đoạn của lớp biểu mô. Hơn nữa, nó làm giảm sản xuất các gốc oxy hóa tự do do DSS gây ra, sự thâm nhập của đại thực bào và biểu hiện của các cytokin tiền viêm như TNF- $\alpha$ , IL-6 và IL-1 $\beta$ . Chuột bị viêm đại tràng cho thấy số lượng tế bào Foxp<sup>3+</sup> giảm, tế bào này được điều hòa khi điều trị bằng daucosterol. Hơn nữa, daucosterol làm tăng hoạt động của tế bào NK và ức chế mức IgA quá mức ở chuột bị viêm đại tràng do DSS. Như vậy có thể thấy rằng, daucosterol làm giảm đáng kể viêm đại tràng do DSS, cho thấy khả năng sử dụng daucosterol như một lựa chọn điều trị cho bệnh viêm đại tràng [154].

➤ **Hợp chất PA11: Physalindicanol A và hợp chất PA12: Physalindicanol B**

Mặc dù đã được phân lập từ cây Tầm bóp nhưng các nghiên cứu về 2 hợp chất này còn tương đối hạn chế.

➤ **Hợp chất PA13: Physalin B**

Hợp chất physalin B đã được phân lập từ cây Tầm bóp và đánh giá một số tác dụng sinh học như chống ung thư [31], [38], [42], [73], điều hòa miễn dịch [80], chống viêm [46], [79], kháng khuẩn [48]...

➤ **Hợp chất PA14: Physalin D**

Tương tự như physalin B, physalin D cũng được nghiên cứu nhiều về tác dụng chống thư và gây độc tế bào ung thư [49], [73]; ngoài ra hợp chất này được báo cáo là có tác dụng khác như chống viêm [46], chống sốt rét [100], kháng khuẩn [48], [94]

➤ **Hợp chất PA15: Acid oleanolic**

Acid oleanolic là một triterpenoid pentacyclic có hoạt tính sinh học. Hợp chất đã được phân lập từ hơn 1620 loài thực vật, bao gồm nhiều thực phẩm và cây thuốc [155].

Acid oleanolic được biết đến với các tác dụng kháng khuẩn, bảo vệ gan, chống viêm, chống dị ứng, kháng vi-rút và độc tế bào. Nó có thể là một thành phần có hoạt

tính trong điều trị urease, beta-lactamase, acetyl cholinesterase, alpha-glucosidase, tác dụng kháng khuẩn, bảo vệ gan, chống viêm, chống ngứa, chống co thắt, chống tạo mạch, chống dị ứng, kháng vi-rút và độc tế bào. Trong những năm gần đây, người ta thấy rằng acid oleanolic có tác dụng chống khối u rõ rệt. Ngoài ra, hợp chất này đã được chứng minh là có tác dụng bảo vệ chuột chống lại độc tính gan do carbon tetrachlorid, acetaminophen, bromobenzen, thioacetamid, furosemid, phalloidin, colchicin, cadmium, D-galactosamine và endotoxin. Bên cạnh đó, acid oleanolic làm giảm transaminase huyết thanh do CCl<sub>4</sub> gây ra ở chuột. Nó tăng cường sinh khả dụng của thành phần hoạt tính trong dược phẩm [156].

**Như vậy có thể thấy, các hợp chất phân lập từ Tâm bóp đều thể hiện các hoạt tính đại diện cho loài này. Các nghiên cứu chống oxy hóa, chống viêm, chống đái tháo đường, béo phì, chống ung thư chủ yếu đến từ nhóm acid phenolic và flavonoid và steroid. Đây là các nhóm phổ biến trong thực vật. Trong khi đó, các nghiên cứu về các tác dụng này trên nhóm withanolid, nhóm chất đặc trưng trong cây Tâm bóp chưa có nhiều, hầu hết tập trung trên tác dụng chống ung thư. Do đó, một số nghiên cứu trong luận án đã tiến hành chọn nhóm withanolid để đánh giá một số tác dụng.**

Các kết quả về hóa học đã góp phần tạo cơ sở khoa học cho việc chứng minh các tác dụng của dược liệu Tâm bóp sử dụng trong dân gian.

### **4.3. VỀ TÁC DỤNG SINH HỌC**

Hiện nay, các nghiên cứu về tác dụng sinh học trên thế giới về cây Tâm bóp tương đối nhiều và đa dạng (như phần tổng quan đã trình bày). Tuy nhiên, chưa có nhiều nghiên cứu về tác dụng trên các bệnh chuyển hóa glucose và lipid máu. Ngoài ra, các hoạt tính kháng viêm [46], [63], [67], giảm đau [65], [69], lợi tiểu hay đái tháo đường [84], [85], [88] liên quan đến chuyển hóa glucose và lipid cũng chưa toàn diện. Trong nghiên cứu này, luận án tiến hành đánh giá hoạt tính kháng viêm *in vitro* và *in vivo*, tác dụng giảm đau cũng như tác dụng trên chuyển hóa glucose và lipid *in vitro* và tác dụng gây độc trên một số dòng tế bào ung thư của cao chiết và các hợp chất withanolid.

#### **4.3.1. Hoạt tính kháng viêm**

##### **4.3.1.1. Hoạt tính kháng viêm *in vitro***

Trong phản ứng viêm, các hợp chất trung gian gây viêm như bradykinin, serotonin, histamin, prostaglandin và nitric oxid được giải phóng và gây ra các triệu chứng lâm sàng điển hình như sưng, nóng, đỏ, đau [157]. Các mô hình *in vitro* thường được sử dụng để sàng lọc, hoặc tìm hiểu sâu về cơ chế tác dụng. Các đích nghiên cứu

bao gồm: COX-2, NO, mức độ biểu hiện gen của COX-2, iNOS, hay các chất trung gian gây viêm như PGE2, cytokin. Trong đó, các kỹ thuật chính như Western blot, ELISA và định lượng RT-PCR được ứng dụng để đo lường. Nhiều dòng tế bào đại thực bào đã được sử dụng, phổ biến nhất là dòng RAW 264.7 [158], [159], [160]. Trong các nghiên cứu này, LPS thường được sử dụng làm tác nhân kích thích tế bào. LPS là thành phần chủ yếu của màng ngoài vi khuẩn gram âm, có khả năng kích thích mạnh các tín hiệu tế bào liên quan đến phản ứng miễn dịch tự nhiên [161]. Sau khi bị kích thích, các tế bào đại thực bào sản xuất ra một loạt các cytokin viêm, bao gồm TNF- $\alpha$ , IL và các chất trung gian gây viêm như NO và các prostaglandin (PGs) [162]. Các chất này đóng vai trò quan trọng trong đáp ứng viêm, có liên quan đến nhiều bệnh lý nguy hiểm. Do vậy, người ta đánh giá hoạt tính kháng viêm của mẫu thử thông qua khả năng ức chế tế bào sản xuất ra các sản phẩm trung gian này.

PGE2 là protanoid thuộc nhóm lipid và là một phân lớp của eicosanoid được tạo ra từ quá trình oxy hóa của acid béo thiết yếu có chứa 20 carbon thường được kết hợp trong phospholipid màng. PGE2 cùng với 4 prostanoid khác (PGF2 $\alpha$ , PGD2, PGI2 và thromboxan A2) được tạo ra từ PGH2 từ con đường chuyển hóa acid arachidonic bằng cyclooxygenase (COX) [163], [164]. Trong giai đoạn đầu của phản ứng viêm, PGE2 và các chất có liên quan đến protanoid như PGI2, hoạt động như chất giãn mạch để tạo điều kiện cho dòng mô bạch cầu trung tính, đại thực bào và tế bào mast từ máu dẫn đến sưng và phù ở vị trí nhiễm trùng hoặc tổn thương mô. Hơn nữa, PGE2 kích thích các dây thần kinh cảm giác để tăng phản ứng đau và tác động lên các tế bào thần kinh ở khu vực trước giao thoa thị giác để thúc đẩy tác dụng gây sốt [165]. Như vậy, PGE2 có vai trò quan trọng trong việc điều chỉnh các khía cạnh khác nhau liên quan đến phản ứng viêm. Ức chế sản xuất PGE2 có thể làm giảm khả năng gây viêm. Do PGE2 có bản chất là protein nên có thể được định tính và định lượng dựa trên nguyên tắc phản ứng kháng nguyên - kháng thể.

NO là một chất trung gian đa chức năng liên quan đến quá trình giãn mạch trong phản ứng viêm và được tổng hợp từ L-arginin bởi iNOS (loại đồng phân được tạo ra trong nhiều tế bào và mô). Sự sản sinh quá mức gốc tự do này sẽ dẫn đến gây bệnh cho mô chủ, bởi NO có thể liên kết với các gốc tự do superoxid khác gây tổn thương đến chức năng tế bào. NOS (Nitric Oxide Synthase) được phát hiện từ 1970, là chất điều hòa nội sinh, liên quan đến yếu tố nội mô EDRF (endothelium-derived relaxing factor) gây giãn mạch. Có 3 dạng NOS: nNOS (n: neuronal- tế bào thần kinh), eNOS (e: endothelial- nội mô), and iNOS (i: cytokine-inducible: cảm ứng cytokine) [166], [167]. Sự biểu hiện của iNOS có thể được điều chỉnh bởi các tác nhân như IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , LPS và stress oxy hoá [168].

IL-1 $\beta$  là cytokin tiền viêm nguyên mẫu có nhiều tác động trên các loại tế bào khác nhau và đóng vai trò chính trong các bệnh viêm cấp và mạn tính, các rối loạn tự miễn. Bên cạnh đó, IL-1 $\beta$  có chức năng cân bằng nội môi quan trọng trong cơ thể sinh vật bình thường, chẳng hạn như điều hòa trong việc ăn, ngủ và nhiệt độ. Tuy nhiên, việc sản xuất quá mức IL-1 $\beta$  có liên quan đến những thay đổi sinh lý bệnh xảy ra trong các tình trạng bệnh khác nhau, như viêm khớp dạng thấp, đau thần kinh, bệnh viêm ruột, viêm xương khớp, bệnh mạch máu, bệnh đa xơ cứng và bệnh Alzheimer. IL-1 $\beta$  có thể được giải phóng từ tế bào sừng, nguyên bào sợi, tế bào hoạt dịch, nội mô, tế bào thần kinh, tế bào miễn dịch như đại thực bào và tế bào mast và các tế bào thần kinh đệm như tế bào Schwann, microglia và tế bào hình sao [169].

NF- $\kappa$ B bao gồm một loạt các kết hợp homo hoặc heterodime của protein NF- $\kappa$ B / Rel trong động vật có vú. Dạng gây cảm ứng chính là heterodime, bao gồm tiểu phân p50/p65. NF- $\kappa$ B có mặt trong tế bào chất ở dạng phức hợp không hoạt động kết hợp với một protein ức chế là I $\kappa$ B. Sự tiếp xúc của tế bào với yếu tố kích thích viêm sẽ làm cho phức hợp NF- $\kappa$ B / I $\kappa$ B phân ly bởi phản ứng phosphoryl hóa IKK (I $\kappa$ B kinase), sau đó phosphorylates I $\kappa$ B ở Ser-32 và Ser-36, theo sau là sự thoái hóa proteosomal của I $\kappa$ B. Tiếp theo, NF- $\kappa$ B chuyển vị từ tế bào chất sang nhân. Trong nhân tế bào, NF- $\kappa$ B thúc đẩy quá trình phiên mã số lượng lớn các gen mục tiêu mã hoá các enzym gây viêm, bằng cách liên kết với yếu tố cis-acting  $\kappa$ B. Trong số các chất điều hòa phiên mã trong vùng promoter của iNOS và COX-2, NF- $\kappa$ B có thể coi là yếu tố phiên mã thiết yếu nhất cho sự biểu hiện của các enzym viêm trong các tế bào bị kích thích bởi LPS [170], [171], [172], [173], [174].

Như vậy, có thể thấy PGE2, NO, IL-1 $\beta$  và NF- $\kappa$ B có những vai trò nhất định trong quá trình viêm. Việc ức chế sản xuất, hay làm giảm biểu hiện và hoạt tính của các yếu tố này sẽ góp phần làm giảm viêm. Trong nghiên cứu này, hoạt tính kháng viêm *in vitro* của Tầm bóp đã được đánh giá dựa trên khả năng ức chế sản xuất các yếu tố trung gian gây viêm như PGE2, NO, cytokin viêm (IL-1 $\beta$ ) và hoạt tính của yếu tố nhân kappa B. Kết quả cho thấy, cao EtOAc (**TBE**) thể hiện hoạt tính chống viêm *in vitro* mạnh nhất trong mô hình thử nghiệm. Bên cạnh đó, các hợp chất withanolid phân lập từ cao EtOAc (physalin B và D) cũng thể hiện hoạt tính kháng viêm. Tuy nhiên, tác dụng này yếu hơn so với hợp chất **PA11** (physalindicanol A) phân lập từ phân đoạn *n*-hexan. Hoạt tính kháng viêm của hợp chất **PA11** là mạnh và gần tương đương dexamethason 100 nM.

Hiện nay, hoạt tính kháng viêm của cao chiết và các hợp chất phân lập từ Tầm bóp đã được nhiều nhóm nghiên cứu công bố. Tuy nhiên, chưa có công bố nào về hoạt tính kháng viêm của cao EtOH 96% và các cao phân đoạn của cao chiết này. Trong số

các hợp chất phân lập từ Tầm bóp, physalin B cũng đã được chứng minh là có tác dụng ức chế đáng kể sản sinh NO do LPS gây ra trong các đại thực bào với giá trị  $IC_{50}$  0,32 - 4,03  $\mu$ M [46]. Trong nghiên cứu này, ở nồng độ 10  $\mu$ M, physalin cũng cho thấy khả năng ức chế mạnh sự sản sinh NO khi bị kích thích bởi LPS trong đại thực bào RAW 264.7 (Hình 3.22).

Như vậy, kết quả của nghiên cứu này góp phần cung cấp thêm cơ sở dữ liệu để chứng minh hoạt tính kháng viêm của Tầm bóp.

#### **4.3.1.2. Hoạt tính kháng viêm *in vivo***

Hiện nay các mô hình *in vivo* sử dụng trong nghiên cứu hoạt tính kháng viêm của dược liệu cũng tương đối đa dạng trong đó có mô hình gây phù chân chuột với các tác nhân cũng tương đối đa dạng, nhưng phổ biến là carrageenan [175], [176], [177]. Carrageenan (có bản chất là polysaccharid giống với cấu trúc vỏ vi khuẩn), vì vậy đáp ứng miễn dịch của cơ thể chủ yếu là đáp ứng miễn dịch không đặc hiệu với sự tham gia chủ yếu của các đại thực bào, bạch cầu đa nhân trung tính, phản ứng viêm xảy ra gồm hai giai đoạn: giai đoạn 1 (0 - 2,5 giờ sau khi tiêm carrageenan) có sự giải phóng một loạt các chất trung gian hóa học gây viêm như histamin, serotonin, kinin gây phá hủy xung quanh các mô, giai đoạn 2 (3 - 6 giờ sau khi tiêm carrageenan) đại thực bào giải phóng gia bradykinin, leucotrien và prostaglandin. Giai đoạn này kéo dài do sự giải phóng ra prostaglandin - một chất trung gian hóa học có vai trò quan trọng trong phản ứng viêm [116], [178]. Vì vậy, cần tiến hành đo độ phù trước và sau thời điểm 3 giờ sau khi tiêm. Luận án lựa chọn các mốc đo độ phù là 2 h, 3 h, 4 h và 6 h sau khi tiêm. Các thuốc có tác dụng làm giảm độ phù trên mô hình có thể có tác dụng ức chế riêng lẻ hoặc đồng thời các chất trung gian hóa học trên. Cũng trong mô hình này, indomethacin (một thuốc chống viêm kinh điển thuộc nhóm phi steroid) được sử dụng làm thuốc đối chiếu. Indomethacin có cơ chế chống viêm là ức chế sinh tổng hợp PG bằng cách ức chế enzym COX. Thuốc còn đối kháng với hệ enzym phân hủy protein, ngăn cản quá trình biến đổi protein, làm bền vững màng lysosom (màng lysosom là màng sinh chất được cấu tạo từ protein và lipid) do đó hạn chế giải phóng các enzym của lysosom trong quá trình thực bào nên có hoạt tính kháng viêm. Ngoài ra thuốc còn ức chế cơ chất của enzym; ức chế sự di chuyển của bạch cầu tới ổ viêm; ức chế phản ứng kháng nguyên - kháng thể; ức chế các chất trung gian hóa học của quá trình viêm như bradykinin, histamin, serotonin [179].

Đánh giá hoạt tính kháng viêm cấp trên mô hình gây phù chân chuột bằng carrageenan, cao chiết EtOH 96% cây Tầm bóp liều 0,9 g/kg có hoạt tính kháng viêm cấp ở các thời điểm 4 giờ và 6 giờ sau gây viêm. Tuy nhiên, cũng ở liều này cao chiết

Tầm bóp không thể hiện hoạt tính kháng viêm mạn trên mô hình gây u hạt thực nghiệm.

Hoạt tính kháng viêm của Tầm bóp có thể là do tác dụng của nhiều hợp chất khác nhau có trong cây như flavonoid, các steroid, saponin, withanolid... và tác động bằng nhiều cơ chế khác nhau. Trong đó, nhiều flavonoid đã được chứng minh có hoạt tính kháng viêm cấp và mạn trên thực nghiệm như quercetin, rutin... [180]. Bên cạnh đó, flavonoid trong Tầm bóp cũng được chứng minh là có tác dụng chống oxy hóa, có thể khả năng chống oxy hóa đã góp phần dọn các gốc tự do giải phóng trong quá trình viêm, cản trở quá trình peroxyd hóa lipid màng tế bào, gây bất lợi cho quá trình tổng hợp các chất trung gian hóa học của quá trình viêm của Tầm bóp. Ngoài ra, theo tổng quan tài liệu (mục 1.3.1.), cơ chế chống viêm của Tầm bóp theo nhiều con đường như ức chế COX, tăng sinh lymphocyt, NO và sản xuất TGF- $\beta$ ...

Nghiên cứu của Misico R. I và cộng sự cho thấy, physalin B và physalin F có hoạt tính kháng viêm theo con đường ức chế leucotrien và enzym COX-2 (cyclooxygenase 2) và hầu như không ức chế COX-1. Physalin B, F và G ức chế NO, làm giảm TNF $\alpha$ , IL-6, IL-12. Hiệu quả này không bị ức chế bởi chất kháng viêm bằng con đường ức chế glucocorticoid như mifepriston. Điều đó cho thấy cơ chế kháng viêm của các physalin khác với glucocorticoid và có khả năng tác động trực tiếp lên các tế bào lympho [181]. Kết quả này góp phần củng cố cơ sở để giải thích cho việc y học dân gian sử dụng Tầm bóp trong điều trị viêm mà không bị ảnh hưởng tới dạ dày tá tràng như các thuốc hóa dược. Vì đa phần các thuốc hóa dược chống viêm qua con đường về ức chế enzym COX-1 là chính, thay vì chỉ ức chế enzym COX-2 như Tầm bóp.

Như vậy, hoạt tính kháng viêm của Tầm bóp là do tác dụng của nhiều hợp chất khác nhau có trong cây như withanolid, flavonoid... và tác động bằng nhiều cơ chế khác nhau.

#### **4.3.2. Tác dụng giảm đau**

Ngoài “sung”, “nóng”, “đỏ”, thì một triệu chứng điển hình khác của viêm là “đau”. Vì vậy, khi nghiên cứu hoạt tính kháng viêm của dược liệu, các tác giả thường đồng thời đánh giá tác dụng giảm đau [182], [183], [184]. Có nhiều cách để tạo ra cơn đau thực nghiệm, ví dụ như tiêm acid acetic, formalin hay sử dụng mâm nóng. Ở đây, luận án sử dụng mô hình gây đau quặn bằng acid acetic. Mặc dù mô hình này không có tính chọn lọc vì có nhiều chất khác nhau cũng đáp ứng với mô hình này (ví dụ: các thuốc kháng cholinergic, các thuốc chống trầm cảm, các thuốc kháng histamin...), tuy nhiên đây vẫn là mô hình được sử dụng rộng rãi để sàng lọc, đánh giá tác dụng giảm

đau của các thuốc [117]. Thử nghiệm gây đau quận bằng acid acetic có độ nhạy và độ chính xác cao [65].

Mô hình gây đau quận liên quan đến các receptor phức tạp tại chỗ (receptor cholinergic, receptor histamin) các chất trung gian, acetylcholin và histamin. Ngoài ra, nó còn liên quan đến sự tăng mức PGE2 và PGF2 $\alpha$  ở dịch màng bụng. Con đường quan trọng nhất dẫn truyền sự đau do viêm là sự nhạy cảm của các receptor nhận cảm giác đau ngoại vi với các proton (như là các kênh ion nhạy cảm với acid) và với các chất gây đau (như bradykinin và cytokin). Các receptor này sẽ truyền tín hiệu về thần kinh trung ương thông qua sợi C. Thêm vào đó sự đáp ứng đau gây ra bởi acid acetic còn phụ thuộc vào một số cytokin như TNF- $\alpha$ , IL-1 và IL-8 thông qua sự điều biến của đại thực bào và tế bào mast khu trú ở khoang màng bụng [185]. Trong mô hình này, aspirin được sử dụng làm thuốc đối chiếu. Aspirin là một phi steroid có tác dụng giảm đau bằng cách làm giảm tổng hợp PGF2 thông qua ức chế enzym COX; làm giảm tính cảm thụ của ngọn dây thần kinh cảm giác với các chất gây đau của phản ứng viêm như bradykinin, serotonin,... [186].

Kết quả nghiên cứu cho thấy, cao chiết EtOH 96% cây Tầm bóp ở cả hai mức liều 0,3 g/kg và 0,9 g/kg đều thể hiện tác dụng giảm đau, làm giảm số cơn đau quận của chuột nhất trắng có ý nghĩa thống kê so với lô chứng từ 5 phút đầu sau khi tiêm acid acetic 1% ( $p < 0,01$ ) và tác dụng còn kéo dài đến phút 30 ở lô sử dụng liều cao 0,9 g/kg ( $p < 0,01$ ), phút 25 ở lô sử dụng liều thấp 0,3 g/kg ( $p < 0,01$ ).

Tác dụng giảm đau của cao chiết này có thể là do giảm tổng hợp PGF<sub>2</sub> bằng cách ức chế COX, ngoài ra còn có thể do làm giảm tính cảm thụ của ngọn dây thần kinh cảm giác với các chất gây đau của quá trình viêm. Tuy nhiên đây mới chỉ là nhận định ban đầu. Để có thể xác định chính xác cơ chế tác dụng giảm đau của dược liệu này cần phải tiến hành thêm các nghiên cứu sâu hơn.

#### **4.3.3. Tác dụng trên chuyển hóa acid béo và glucose trong tế bào gan HepG2**

Tiếp tục đánh giá ảnh hưởng của cao chiết và các hợp chất withanolid trên chuyển hóa acid béo và glucose. Vì ngoài flavonoid, withanolid là thành phần chính của chi *Physalis* L. nói chung và cây Tầm bóp nói riêng. Nghiên cứu của Maurya và cộng sự đã tìm thấy coagulanolid, coagulin C và L, 17 $\beta$ -hydroxywithanolid K và withanolid F từ loài *Withania coagulans* ức chế đáng kể đối với sự tăng đường huyết ngay sau khi chuột có đường huyết bình thường được uống succrose, cũng như chuột bị đái tháo đường do streptozotocin gây ra. Hợp chất coagulin L cũng làm giảm đáng kể đường huyết và cải thiện khả năng dung nạp glucose của chuột db/db (chuột db/db (diabetic) là chuột bị đột biến gen trong đó các thụ thể leptin không hoạt động bình thường. Loại chuột này bị béo phì và có nhiều khuyết tật về trao đổi chất (tăng não,



tăng đường huyết, tăng insulin máu và vô sinh). Chuột db/db được sử dụng rộng rãi trên mô hình tiền lâm sàng trong nghiên cứu bệnh tiểu đường). Ngoài ra, coagulin L còn có hoạt tính chống mỡ máu ở chuột db/db. Liều hiệu quả trung bình của coagulin L được xác định là khoảng 25 mg/kg ở chuột bị đái tháo đường do streptozotocin gây ra, thấp hơn so với metformin - thuốc điều trị đái tháo đường [187]. Đây là cơ sở cho việc lựa chọn nhóm chất này để nghiên cứu trên sự chuyển hóa acid béo và glucose trong tế bào gan HepG2.

Bệnh gan nhiễm mỡ không do rượu (NAFLD) là một trong những bệnh thường gặp của rối loạn chức năng gan [188], [189], [190] và tỷ lệ phổ biến của bệnh này đã tăng lên rõ rệt [191], [192], [193]. Hơn nữa, viêm gan nhiễm mỡ không do rượu (NASH), một dạng nặng của NAFLD kèm theo viêm gan và xơ hóa, có thể tiến triển thành xơ gan và suy gan [194], [195]. NAFLD thường được tìm thấy trong bệnh nhân béo phì và/hoặc kháng insulin. Nghiên cứu của Kohjima M. và cộng sự đã đánh giá mức độ biểu hiện của các gen liên quan đến chuyển hóa acid béo trong gan với NAFLD và thấy rằng biểu hiện của những gen bao gồm acetyl-CoA carboxylase (ACC) và fatty acid synthase (FAS) đã tăng, điều đó chỉ ra rằng tổng hợp acid béo được tăng cường trong tế bào gan, dẫn đến sự tích tụ acid béo [196], [197].

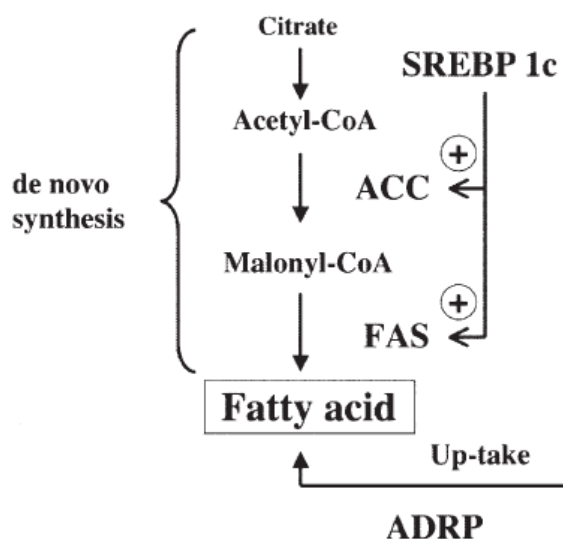
Protein kinase hoạt hóa AMP (AMPK) là một chất điều hòa trao đổi chất quan trọng giúp giảm mức năng lượng tế bào và dạng hoạt động của nó sẽ kích thích các con đường tạo ra ATP, như oxy hóa và thủy phân glucose của acid béo và ngăn chặn các quá trình đồng hóa (sinh tổng hợp acid béo) [198]. AMPK là một enzym dị hợp nội bào và được kích hoạt bởi sự phosphoryl hóa khi tiếp xúc với tỷ lệ AMP: ATP cao khi năng lượng tế bào thấp [199], [200].

ACC là một enzym đa miền xúc tác cho quá trình chuyển đổi acetyl-CoA thành malonyl-CoA, đây là một bước quan trọng trong sinh tổng hợp lipid. ACC bị bất hoạt thông qua quá trình phosphoryl hóa thuận nghịch bởi AMPK. Ức chế ACC làm giảm malonyl-CoA; vì nồng độ malonyl-CoA cao là cần thiết để ức chế Carnitine palmitoyl transferase-1 (CPT1) và giảm quá trình oxy hóa ty thể của acid béo, ức chế ACC bằng AMPK cho phép tăng quá trình oxy hóa acid béo. FAS là một enzym đa chức năng xúc tác tổng hợp các acid béo chuỗi dài, chủ yếu palmitat, sử dụng acetyl-CoA và malonyl-CoA làm chất nền và NADPH như chất cho electron [201].

SREBP-1c (Sterol liên kết với yếu tố điều hòa protein-1c) là một thành viên của vòng xoắn helix-leucin cơ bản của các yếu tố phiên mã. Được tổng hợp như một tiền chất gắn màng, nó nằm trong mạng lưới nội chất (ER) và khi phân cắt sẽ giải phóng một đoạn đầu N hòa tan chuyển vào nhân để kích hoạt phiên mã [202]. Cần có hai loại protein quan trọng để điều chỉnh sự phân cắt SREBP-1c, protein kích hoạt phân cắt

SREBP (SCAP) và protein gen 1 do insulin gây ra (INSIG1). SCAP là một protein liên kết màng tương tác với tiền chất SREBP mới được tổng hợp. Khi sterol có rất nhiều trong mạng lưới nội chất, SCAP liên kết với sterol được giữ trong một cấu hình cho phép kết hợp với INSIG1. Trong trường hợp không liên kết sterol, SCAP không liên kết INSIG1 và vận chuyển SREBP-1c đến golgi, nơi các protease thường trú giải phóng SREBP-1c hoạt động từ màng. Ngoài ra, SREBP-1c có thể bị ức chế bởi quá trình phosphoryl hóa [203]. Một nghiên cứu gần đây đã chỉ ra rằng trong tế bào gan AMPK có thể tương tác và phosphoryl hóa SREBP-1c. Phosphoryl hóa bởi AMPK đã ức chế sự phân giải protein và sự chuyển vị hạt nhân của SREBP-1c, kìm hãm biểu hiện của gen gây tăng sản sinh lipid. Hơn nữa, hoạt hóa gan của AMPK, một phần thông qua quá trình phosphoryl hóa SREBP-1c, bảo vệ chống lại gan nhiễm mỡ, tăng lipid máu và tăng tốc xơ vữa động mạch ở động vật gặm nhấm cho ăn chế độ ăn nhiều chất béo, sucrose cao [204].

SREBP-1c chủ yếu điều chỉnh sự biểu hiện của các gen liên quan đến tổng hợp LDL và triglycerid, bao gồm, ACL, ACC, FAS, SCD1 và GPAT. SREBP1 là yếu tố phiên mã quan trọng, cân bằng nội môi năng lượng, có chức năng điều hòa ACC và FAS, kiểm soát trực tiếp FAS, leptin, insulin [197], [205], [206], [207]. SREBP-1c cũng làm tăng sự biểu hiện của các enzym tạo ra NADPH, enzym malic (ME), glucose 6-phosphat dehydrogenase (G6PD) và phosphoglucaonate dehydrogenase (6PDG) [207]. Các yếu tố phiên mã tăng sinh peroxisome được kích hoạt bởi thụ thể gamma (PPAR $\gamma$ ) là mục tiêu trực tiếp của SREBP-1c [208] và như vậy, SREBP-1c đã được chứng minh là có vai trò quan trọng trong sự biệt hóa tế bào mỡ [209].



**Hình 4.3. Chức năng điều hòa ACC, FAS của SREBP-1c [197]**

Như vậy, có thể thấy, AMPK, ACC, FAS và SREBP-1c có mối tương quan với nhau và có vai trò nhất định trong quá trình chuyển hóa lipid. Sự kích hoạt AMPK sẽ

làm giảm biểu hiện của ACC và FAS thông qua quá trình điều hòa ngược SREBP-1c [210], [211].

Stigmasterol đã được Kaur và cộng sự nghiên cứu đánh giá vai trò, cơ chế tổng hợp cholesterol bằng cách ức chế enzym sterol  $\Delta$ 24-reductase ở dòng tế bào người Caco-2 và HL-60, do đó ức chế tổng hợp cholesterol ở gan [151]. Điều đó cho thấy có sự liên quan của withanolid mà cả sterol nói chung và stigmasterol nói riêng (**PA9**) đến việc ức chế những mắt xích của quá trình chuyển hóa acid béo, cholesterol qua các tín hiệu nghiên cứu trên.

Trong nghiên cứu này, khả năng hoạt hóa p-AMPK, p-ACC, ức chế FAS và SREBP-1c của các cao chiết và bốn hợp chất withanolid đã được đánh giá. Kết quả cho thấy, cao EtOAc và *n*-hexan (50  $\mu$ g/mL) hoạt hóa p-AMPK và p-ACC mạnh hơn các cao còn lại; các hợp chất **PA12** và **PA14** hoạt hóa p-AMPK, p-ACC mạnh hơn hai hợp chất còn lại. Ngoài ra, **PA12** và **PA14** còn thể hiện tác dụng ức chế FAS và SREBP-1c phụ thuộc nồng độ. Đây là nghiên cứu đầu tiên về tác dụng ức chế tích tụ lipid của Tầm bóp trên tế bào HepG2.

#### 4.3.4. Tác dụng gây độc trên một số dòng tế bào ung thư *in vitro*

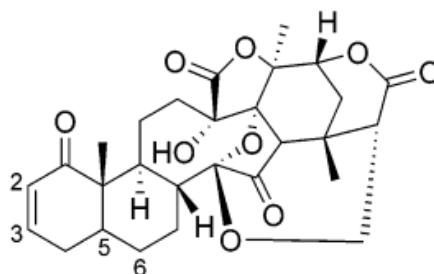
Theo tổng quan tài liệu cho thấy, cao chiết và các hợp chất đặc biệt là các withanolid phân lập từ Tầm bóp được nghiên cứu khá nhiều về tác dụng trên ung thư. Trong đó, có rất nhiều các dòng tế bào ung thư đã được thử nghiệm; và hợp chất physalin B và D là 2 trong số các withanolid phổ biến được đánh giá. Điều đó cho thấy ngoài hoạt tính kháng viêm, tác dụng chống ung thư cũng là tác dụng nổi trội của Tầm bóp. Mặc dù đã được nghiên cứu nhiều, nhưng vẫn còn một số các dòng tế bào ung thư chưa được nghiên cứu như:

- + SNU-1: Ung thư dạ dày ở người (human gastric carcinoma)
- + 4T1: Ung thư vú ở chuột (mouse breast carcinoma)
- + LLC: Ung thư phổi ở chuột (Lewis lung carcinoma)
- + Hep3B: Ung thư gan ở người (human hepatocellular carcinoma)
- + NTERA-2: Tế bào gốc ung thư ở người (pluripotent human embryonal carcinoma)
- + HEK-293A: Tế bào biểu mô phôi thận người (human embryonic kidney cells)

Do đó, luận án đánh giá tác dụng gây độc trên 6 dòng tế bào trên của cao chiết toàn phần, cao phân đoạn và 4 hợp chất withanolid phân lập từ Tầm bóp. Kết quả cho thấy, trừ cao nước (**TBN**), cao chiết toàn phần (**TBT**), cao phân đoạn *n*-hexan (**TBH**) và EtOAc (**TBE**) đều có tác dụng trên 5 dòng tế bào ung thư nghiên cứu với  $IC_{50}$  từ

4,13 - 13,44  $\mu\text{g/mL}$ . Trong đó, cao *n*-hexan thể hiện tác dụng yếu hơn 2 cao chiết còn lại. Điều này có thể được giải thích dựa trên thành phần hóa học của các cao phân đoạn *n*-hexan và EtOAc với sự có mặt của các hợp chất flavonoid và withanolid. Đây là các nhóm chất đã được nghiên cứu nhiều về tác dụng chống ung thư. Bên cạnh việc đánh giá tác dụng của các cao chiết, luận án cũng tiến hành nghiên cứu tác dụng của 4 withanolid (**PA11** - **PA14**) phân lập từ cao *n*-hexan và EtOAc. Đây là nhóm chất đặc trưng cho loài Tầm bóp nói riêng và chi *Physalis* nói chung, đồng thời cũng được phân lập từ các phân đoạn có hoạt tính. Kết quả cho thấy, tất cả các chất đều thể hiện tác dụng trên 2 dòng tế bào 4T1 và SNU-1 với  $\text{IC}_{50}$  1,10 - 3,61  $\mu\text{M}$ . Ngoài ra, physalin B (**PA13**) cũng thể hiện tác dụng gây độc trên 2 dòng tế bào NTERA-2 và LLC với  $\text{IC}_{50}$  lần lượt là  $4,44 \pm 0,40$  và  $4,59 \pm 0,77$   $\mu\text{M}$ .

Kết quả trên cho thấy, có thể là có sự liên quan cấu trúc - tác dụng. Những withanolid có cấu trúc phân tử chứa gốc  $4\beta$ -hydroxy-2-en-1-on như hợp chất **PA13** và **PA14** là những tác nhân tiềm ẩn gây độc tế bào ung thư; phù hợp với nghiên cứu của Amooru G. Damu và cộng sự đã chỉ ra [31].



**Hình 4.4. Cấu trúc của những withanolid liên quan gây độc tế bào**

Về cơ chế, theo Ding H. và cộng sự đã cho thấy một số withanolid và physalin trong Tầm bóp có hoạt tính gây cảm ứng enzym quinone reductase (QR), một loại enzym khử quinon. Quinon là chất độc gây tăng ROS. Vì ROS làm tổn thương tế bào bằng cách oxy hóa các đại phân tử tế bào quan trọng như acid nucleic, protein và lipid màng, dẫn đến tăng gốc tự do, từ đó gây ung thư, lão hóa... Vậy nên, enzym QR đóng một vai trò quan trọng trong quá trình chống ung thư, giải độc và chống oxy hóa [39]. Đó có thể là một trong những cơ chế đem lại hoạt tính gây độc trên một số dòng tế bào ung thư của cây Tầm bóp.

Một cơ chế tác động khác trong phòng ngừa ung thư là ngăn tạo mạch, phòng di căn của tế bào ung thư, đã được Hseu Y. C. và cộng sự đánh giá [71]. Tạo mạch, sự hình thành các mạch máu mới từ hệ mạch đã tồn tại trước đó, là một quá trình thiết yếu trong nhiều tình trạng sinh lý và bệnh lý, bao gồm chữa lành vết thương, phát triển phôi thai, viêm mạn tính, ung thư và di căn. Tác nhân có tác dụng chống tạo mạch có thể đóng vai trò chính trong việc điều hòa hoạt động phòng chống ung thư. Sự hình

thành mạch được điều chỉnh chặt chẽ bởi sự cân bằng phức tạp giữa chất kích thích và chất ức chế. Trong số đó, VEGF (vascular endothelial growth factor)-yếu tố tăng trưởng nội mô mạch máu, một yếu tố tạo mạch hòa tan được tạo ra bởi nhiều khối u cũng như các dòng tế bào bình thường, đóng một vai trò quan trọng trong việc điều chỉnh sự hình thành mạch bình thường và bệnh lý. Hơn nữa, VEGF là một mitogen mạnh cho các tế bào nội mô gây ra sự tăng sinh, di chuyển / xâm lấn của tế bào nội mô, cũng như các tổ chức tiếp theo của tế bào để tạo thành ống mao mạch. Đặc biệt, một số nghiên cứu đã chỉ ra rằng VEGF là yếu tố tạo mạch quan trọng nhất có liên quan chặt chẽ với quá trình tân mạch ở các khối u ở người. Tầm bóp đã ức chế VEGF [71].

Hơn nữa, theo quan điểm hiện đại, hoạt tính chống viêm cũng có liên quan chặt chẽ đến hoạt tính kháng tế bào ung thư. Người ta đã chứng minh NF- $\kappa$ B hoạt động thúc đẩy sự biểu hiện của hơn 150 gen mục tiêu. Tức là NF- $\kappa$ B tham gia vào quá trình phiên mã của hơn 150 gen. Bao gồm, các cytokin, chemokin khác nhau, cũng như các thụ thể cần thiết để nhận biết miễn dịch, chẳng hạn như các protein liên quan đến sự trình bày kháng nguyên và các thụ thể cần thiết để kết dính và di chuyển bạch cầu trung tính qua thành mạch máu. Vì thế NF- $\kappa$ B có tên gọi khác của “chất trung gian trung tâm của phản ứng miễn dịch”, kiểm soát viêm, ung thư [171].

Các nghiên cứu ở Việt Nam hiện nay mới đánh giá trên các dòng tế bào A-549, Hela, Panc-1, KB, MDA-MB-231, KB-VIN, MCF-7 [58], [76], [212] mà chưa thử trên 5 dòng tế bào ung thư của luận án (SNU-1, 4T1, LLC, Hep3B và NTERA-2). Trong đó dòng tế bào NTERA-2 là tế bào gốc ung thư người, muốn đánh giá khả năng phòng ngừa di căn. Vì ngày nay, người ta cho rằng khả năng di căn một phần là do các tế bào gốc. Bên cạnh đó, luận án cũng đánh giá song song trên dòng tế bào thường là HEK-293A và thấy rằng dù có hiệu quả với các tế bào ung thư nhưng cũng đồng thời gây độc trên cả tế bào thường.

Trước đây, Hsu C. và cộng sự đã có đánh giá độc tính trên tế bào thường là nguyên bào cơ tim chuột, nguyên bào sợi da người, tế bào cơ trơn động mạch chủ người, song song với các tế bào u hắc tố để đánh giá xem Physalin B phân lập từ phân đoạn EtOAc của Tầm bóp có độc tính với tế bào thường không thì kết quả cho thấy không có độc tính với tế bào thường, mà chọn lọc trên u hắc tố [74]. Vậy cho thấy, có thể không phải là chọn lọc tất cả với các dòng tế bào thường, cần cân nhắc trong loại ung thư khi lựa chọn cho phù hợp.

Như vậy, luận án đã xác định được tên khoa học của đối tượng nghiên cứu, đã mô tả đặc điểm hình thái, đặc điểm giải phẫu thực vật, đồng thời đã phân lập và xác định cấu trúc các hợp chất từ các phân đoạn *n*-hexan (5 chất), ethyl acetat (8 chất) và

cần nước (2 chất). Trong đó, hợp chất myricetin 3-*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyranosid (myricitrin, **PA7**) và physalindicanol B (**PA12**) lần đầu tiên được phân lập từ loài Tâm bóp. Bên cạnh đó, luận án đã chứng minh phân đoạn ethyl acetat và hợp chất **PA11** có tác dụng chống viêm mạnh trên mô hình tế bào RAW 264.7 gây kích thích viêm bằng LPS. Trong khi đó, cao toàn phần ethanol 96% có tác dụng giảm đau mạnh nhất. Cao phân đoạn ethyl acetat và hai hợp chất **PA12**, **PA14** có tác dụng chế sự tích tụ lipid và glucose trong tế bào gan. Ngoài ra, luận án cũng chứng minh được cao toàn phần, các cao phân đoạn ethyl acetat, phân đoạn nước và 4 hợp chất **PA11** - **PA14** có hoạt tính gây độc trên một số dòng tế bào ung thư, trong đó, **PA13** có hoạt tính mạnh nhất với  $IC_{50}$  trong khoảng 1,1 đến 4,59  $\mu$ M. Các kết quả trên đều là đóng góp mới của luận án.

# KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

## KẾT LUẬN

Luận án đã thực hiện đầy đủ 3 mục tiêu nghiên cứu:

### 1. Về thực vật học

Giám định được tên khoa học của cây Tầm bóp thu hái tại huyện Gia Lâm, thành phố Hà Nội là *Physalis angulata* L. (họ Cà - Solanaceae).

Đã mô tả, phân tích đặc điểm hình thái thực vật, đặc điểm giải phẫu thân, lá và xác định được đặc điểm bột dược liệu lá, thân Tầm bóp.

### 2. Về thành phần hóa học

Đã xác định trong cây Tầm bóp có chứa hầu hết các nhóm chất (flavonoid, caroten, alcaloid, saponin, coumarin, tannin, acid hữu cơ, đường khử, acid amin, chất béo và polysaccharid).

Đã phân lập và xác định được cấu trúc của 15 hợp chất từ cây Tầm bóp, trong đó:

- + 3 hợp chất phenolic (acid caffeic **PA1**, acid ferrulic **PA2** và acid chlorogenic **PA3**),
- + 5 flavonoid (quercetin **PA4**, quercitrin **PA5**, quercetin 3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosid **PA6**, myricetin 3-*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyranosid **PA7** và rutin **PA8**),
- + 2 sterol (stigmasterol **PA9** và daucosterol **PA10**),
- + 4 withanolid (physalindicanol A **PA11**, physalindicanol B **PA12**, physalin B **PA13** và physalin D **PA14**),
- + 1 triterpen (acid oleanolic **PA15**).

Trong số đó, hợp chất **PA7** và **PA12** lần đầu tiên công bố từ cây Tầm bóp.

### 3. Về tác dụng sinh học

#### ❖ *Hoạt tính kháng viêm và giảm đau*

Cao EtOAc (**TBE**, 20  $\mu$ g/mL) và hợp chất physalindicanol A (10  $\mu$ M) của Tầm bóp ức chế mạnh nhất sự sản sinh PGE<sub>2</sub>, NO, IL-1 $\beta$  và giảm hoạt tính của NF- $\kappa$ B trong đại thực bào RAW 264.7 gây kích thích viêm bằng LPS trong số các mẫu cao và chất tinh khiết thử nghiệm.

Cao toàn phần EtOH 96% Tầm bóp ở liều 0,9 g/kg thể hiện tác dụng ức chế phù bàn chân chuột cống trắng tại thời điểm 4 giờ và 6 giờ sau khi gây viêm bằng

carrageenan, với tỷ lệ phù lần lượt chỉ còn là  $27,04 \pm 2,52\%$  và  $25,11 \pm 2,17\%$ , khác biệt có ý nghĩa so với lô chứng,  $p < 0,05$ .

Cao toàn phần EtOH 96% Tầm bóp ở liều 0,6 và 1,8 g/kg thể hiện tác dụng làm giảm số cơn đau quận so với lô chứng từ 5 phút đầu đến phút 30.

#### ❖ *Trên chuyển hóa acid béo và glucose*

Cao phân đoạn EtOAc (50  $\mu\text{g/mL}$ ) tăng biểu hiện p-ACC và p-AMPK mạnh nhất so với các mẫu thử khác.

Đối với thử nghiệm trên mức độ biểu hiện p-AMPK, hợp chất physalin D (10  $\mu\text{M}$ ) thể hiện tác dụng mạnh nhất tiếp theo là hợp chất physalindicanol A và physalindicanol B.

Physalindicanol B và physalin D (10  $\mu\text{M}$ ) đều thể hiện khả năng ức chế mạnh biểu hiện của gen FAS và SREBP-1c phụ thuộc theo nồng độ ở cùng điều kiện nồng độ glucose cao 30 mM.

Ở 3 mức liều 1, 3 và 10  $\mu\text{M}$ , physalindicanol B và physalin D có tác dụng ức chế sự tích tụ lipid phụ thuộc nồng độ so với lô chỉ ủ với glucose nồng độ cao.

#### ❖ *Tác dụng gây độc trên một số dòng tế bào ung thư*

Cao toàn phần EtOH 96% và 2 cao phân đoạn (*n*-hexan và EtOAc) thể hiện hoạt tính gây độc tế bào trên các dòng tế bào ung thư nghiên cứu (4T1, SNU-1, Hep3B, NTERA-2, LLC) và HEK-293A với giá trị  $\text{IC}_{50}$  từ 3,81 - 13,44  $\mu\text{g/mL}$ .

Các hợp chất physalindicanol A, physalindicanol B, physalin B và physalin D thể hiện tác dụng gây độc trên 2 dòng tế bào 4T1 và SNU-1 với  $\text{IC}_{50}$  là 1,10 - 3,61  $\mu\text{M}$ . Ngoài ra, physalin B cũng thể hiện tác dụng gây độc trên 2 dòng tế bào NTERA-2 và LLC với  $\text{IC}_{50}$  lần lượt là  $4,44 \pm 0,40$  và  $4,59 \pm 0,77$   $\mu\text{M}$ .

## **KIẾN NGHỊ**

- Nghiên cứu xây dựng tiêu chuẩn cơ sở dược liệu Tầm bóp.
- Tiếp tục nghiên cứu sâu hơn về tác dụng giảm đau, chống viêm, chống đái tháo đường và chống ung thư của cây Tầm bóp.
- Có thể lựa chọn Tầm bóp làm vị thuốc được sử dụng phối hợp với các vị khác trong bài thuốc chống viêm giảm đau, phòng ngừa ung thư của Y học cổ truyền.



## DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ

1. **Hoàng Thái Hòa**, Nguyễn Thượng Dong, Đào Thanh Hiền, Nghiêm Đức Trọng, Nguyễn Hoàng Tuấn (2017), “Nghiên cứu đặc điểm hình thái và vi học của cây Tầm bóp (*Physalis angulata* L.), thuộc họ Cà (Solanaceae)”, *Tạp chí Dược học*, số 491, năm 57, tr.21-24.
2. **Hoàng Thái Hòa**, Nguyễn Thượng Dong, Trần Thị Oanh, Lê Việt Dũng, Huỳnh Đăng Khoa, Đào Thị Thanh Hiền (2017), “Flavonoid phân lập từ cây Tầm bóp”, *Tạp chí Dược liệu*, 22(2), tr.72-77.
3. **Hoàng Thái Hòa**, Nguyễn Thượng Dong, Trần Thị Oanh, Lê Việt Dũng, Đào Thị Thanh Hiền (2017), “Thành phần hóa học của phân đoạn *n*-hexan cây Tầm bóp thu hái tại Việt Nam”, *Tạp chí Dược liệu*, 22(6), tr.327-332.
4. **Hoàng Thái Hòa**, Trần Thị Oanh, Nguyễn Thượng Dong, Nguyễn Thế Hùng (2018), “Các hợp chất physalin và acid phenolic phân lập từ cây Tầm bóp thu hái tại Việt Nam”, *Tạp chí Dược liệu*, 23(2), tr.77-82.
5. **Hoàng Thái Hòa**, Nguyễn Thị Thu, Nguyễn Thượng Dong, Trần Thị Oanh, Trần Thị Hiền, Đỗ Thị Hà (2020), “Effects of compounds from *Physalis angulata* on fatty acid synthesis and glucose metabolism in HepG2 cells via the AMP-activated protein kinase pathway”, *Natural Product Sciences*, 26(3), pp.200-206.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Mahalakshmi A. M., Nidavani R. B. (2014), "*Physalis angulata* L.: An ethanopharmacological review", *Indo American Journal of Pharmaceutical Research*, 4(3), pp.1479-1486.
2. Mahklouf M. H. (2016), "A new record *Physalis angulata* L. (Solanaceae) for the flora of Syria", *American Journal of Life Science Researches*, 4(1), DOI: 10.21859/ajlsr-0401021.
3. Sharma N., Bano A., Dhaliwal H. S., Sharma V. (2015), "A pharmacological comprehensive review on "Rassbhary" *Physalis angulata* (L.)", *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 7(8), pp.30-34.
4. Wu Z. Y., Raven P. H. (1994), *Flora of China, Vol. 17 (Verbenaceae through Solanaceae)*, Science Press, Beijing, and Missouri Botanical Garden Press, St. Louis, pp.311-312.
5. Vũ Văn Hợp (2017), *Thực vật chí Việt Nam, T.17 - Solanaceae*, Nhà xuất bản Khoa học Tự nhiên và Công nghệ Hà Nội, tr.35-45.
6. Sultana N., Hassan M. A., Begum M., Sultana M. (2008), "*Physalis angulata* L.(Solanaceae)-A new angiospermic record for Bangladesh", *Bangladesh Journal of Botany*, 37(2), pp.195-198.
7. Kindscher K., Long Q., Corbett S., Bosnak K., Loring H., Cohen M., Timmermann B. N. (2012), "The ethnobotany and ethnopharmacology of wild tomatillos, *Physalis longifolia* Nutt., and related *Physalis* species: a review", *Economic Botany*, 66(3), pp.298-310.
8. Rengifo-Salgad E., Vargas-Arana G. (2013), "*Physalis angulata* L.(Bolsa Mullaca): a review of its traditional uses, chemistry and pharmacology", *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 12(5), pp.431-445.
9. Martínez M. (1998), "Revisión de *Physalis* sección Epiteiorhiza (Solanaceae)", *Anales del Instituto de Biología. Serie Botánica*, 69(2), pp.71-117.
10. Von Mueller F. (1888), *Select extra-tropical plants: Readily eligible for industrial culture or naturalisation, with indications of their native countries and some of their uses.*
11. Joannis de Loureiro (1790), *Flora cochinchinensis, I: 129.*, Beroliori.

12. Gustave Henri Bonati (1915), *Flore générale de l'Indo-Chine*, T.4, Paris, pp.332-335.
13. Phạm Hoàng Hộ (1972), *Cây cỏ Miền Nam Việt Nam, Quyển II*, Trung tâm Học liệu, Sài Gòn, tr.220.
14. Phạm Hoàng Hộ (2000), *Cây cỏ Việt Nam, Quyển 2*, Nhà xuất bản Trẻ, tr.764-765.
15. Viện Dược liệu (2006), *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam, Tập II*, NXB. Khoa học và Kỹ thuật, tr.792-793.
16. Bean A. R. (2007), "A new system for determining which plant species are indigenous in Australia", *Australian Systematic Botany*, 20(1), pp.1-43.
17. Martínez M. (1999), *Infrageneric taxonomy of Physalis*. In: M. Nee, D. E. Symon, R. N. Lester & J. P. Jessop (Eds.). *Solanaceae IV*, Kew, Royal Botanic Gardens, pp.275-283.
18. Tackholm V. (1974), *Students flora of Egypt. 2nd ed. Beirut: Cooperative Printing Co.*
19. Kaya M., Yildirim A., Uygur F. N. (2000), "A new record for the flora of Turkey *Physalis angulata* L.(Solanaceae)", *Turkish Journal of Botany*, 24(5), pp.299-302.
20. Al-Ellagi S. (2012), "New record *Physalis angulata* (Solanaceae) to the Flora of Iraq", *Al-Nahrain Journal of Science*, 15(4), pp.31-42.
21. Võ Văn Chi (2012), *Từ điển cây thuốc Việt Nam, Tập 2*, Nhà xuất bản Y học, tr.786.
22. Akintayo L. O., Atikueke S. A., Nimota A. T., Isiaka A. O. (2015), "Chemical constituents of the leaf essential oil of *Physalis angulata* L.", *Asian Journal of Applied Sciences* 3(4), pp.652-655.
23. de Rosso V. V., Mercadante A. Z. (2007), "Identification and quantification of carotenoids, by HPLC-PDA-MS/MS, from Amazonian fruits", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(13), pp.5062-5072.
24. Chen L. X., He H., Qiu F. (2011), "Natural withanolides: an overview", *Natural Product Reports*, 28(4), pp.705-740.
25. Ma T., Zhang W. N., Yang L., Zhang C., Lin R., Shan S. M., Zhu M. D., Luo J. G., Kong L. Y. (2016), "Cytotoxic withanolides from *Physalis angulata* var.

- villosa and the apoptosis-inducing effect via ROS generation and the activation of MAPK in human osteosarcoma cells", *RSC Advances*, 6(58), pp.53089-53100.
26. Sun C. P., Qiu C. Y., Yuan T., Nie X. F., Sun H. X., Zhang Q., Li H. X., Ding L. Q., Zhao F., Chen L. X. (2016), "Antiproliferative and anti-inflammatory withanolides from *Physalis angulata*", *Journal of Natural Products*, 79(6), pp.1586-1597.
  27. Zhang Y., Chen C., Zhang Y. L., Kong L. Y., Luo J. G. (2018), "Target discovery of cytotoxic withanolides from *Physalis angulata* var. *villosa* via reactivity-based screening", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 151, pp.194-199.
  28. Maldonado E., Hurtado N. E., Pérez-Castorena A. L., Martínez M. (2015), "Cytotoxic 20,24-epoxywithanolides from *Physalis angulata*", *Steroids*, 104, pp.72-78.
  29. Okmanov R. Y., Makhmudova M. M., Bobaev I. D., Tashkhodjaev B. (2021), "Withanolides from *Physalis angulata* L.", *Acta Crystallographica Section E: Crystallographic Communications*, 77(8), pp.804-808.
  30. Gao C. Y., Ma T., Luo J., Kong L. K. (2015), "Three new cytotoxic withanolides from the Chinese folk medicine *Physalis angulata*", *Natural Product Communications*, 10(12), pp.1934578X1501001211.
  31. Damu A. G., Kuo P. C., Su C. R., Kuo T. H., Chen T. H., Bastow K. F., Lee K. H., Wu T. S. (2007), "Isolation, structures, and structure – cytotoxic activity relationships of withanolides and physalins from *Physalis angulata*", *Journal of Natural Products*, 70(7), pp.1146-1152.
  32. Gao C., Li R., Zhou M., Yang Y., Kong L., Luo J. (2018), "Cytotoxic withanolides from *Physalis angulata*", *Natural Product Research*, 32(6), pp.676-681.
  33. Abe F., Nagafuji S., Okawa M., Kinjo J. (2006), "Trypanocidal constituents in plants 6. Minor withanolides from the aerial parts of *Physalis angulata*", *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 54(8), pp.1226-1228.

34. Nagafuji S., Okabe H., Akahane H., Abe F. (2004), "Trypanocidal constituents in plants 4. Withanolides from the aerial parts of *Physalis angulata*", *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 27(2), pp.193-197.
35. Shingu K., Marubayashi N., Ueda I., Yahara S., Nohara T. (1991), "Physagulin C, a new withanolide from *Physalis angulata* L.", *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 39(6), pp.1591-1593.
36. Shingu K., Yahara S., Nohara T., Okabe H. (1992), "Three new withanolides, physagulins A, B and D from *Physalis angulata* L.", *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 40(8), pp.2088-2091.
37. Lee S. W., Pan M. H., Chen C. M., Chen Z. T. (2008), "Withangulatin I, a new cytotoxic withanolide from *Physalis angulata*", *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 56(2), pp.234-236.
38. He Q. P., Ma L., Luo J. Y., He F. Y., Lou L. G., Hu L. H. (2007), "Cytotoxic withanolides from *Physalis angulata* L.", *Chemistry & Biodiversity*, 4(3), pp.443-449.
39. Ding H., Hu Z., Yu L., Ma Z., Ma X., Chen Z., Wang D., Zhao X. (2014), "Induction of quinone reductase (QR) by withanolides isolated from *Physalis angulata* L. var. *villosa* Bonati (Solanaceae)", *Steroids*, 86, pp.32-38.
40. Vasina O. E., Abdullaev N. D., Abubakirov N. K. (1990), "Withasteroids of *Physalis*. IX. Physangulide—The first natural 22*S*-withasteroid", *Chemistry of Natural Compounds*, 26(3), pp.304-307.
41. Sun C. P., Kutateladze A. G., Zhao F., Chen L. X., Qiu F. (2017), "A novel withanolide with an unprecedented carbon skeleton from *Physalis angulata*", *Organic & Biomolecular Chemistry*, 15(5), pp.1110-1114.
42. Kuo P. C., Kuo T. H., Damu A. G., Su C. R., Lee E. J., Wu T. S., Shu R., Chen C. M., Bastow K. F., Chen T. H., Lee K. H. (2006), "Physanolide A, a novel skeleton steroid, and other cytotoxic principles from *Physalis angulata*", *Organic Letters*, 8(14), pp.2953-2956.
43. Men R. Z., Li N., Ding W. J., Hu Z. J., Ma Z. J., Cheng L. (2014), "Unprecedented aminophysalin from *Physalis angulata*", *Steroids*, 88, pp.60-65.

44. Row L. R., Reddy K. S., Sarma N. S., Matsuura T., Nakashima R. (1980), "New physalins from *Physalis angulata* and *Physalis lancifolia*. Structure and reactions of physalins D, I, G and K", *Phytochemistry*, 19(6), pp.1175-1181.
45. Row L. R., Sarma N. S., Reddy K. S., Matsuura T., Nakashima R. (1978), "The structure of physalins F and J from *Physalis angulata* and *P. lancifolia*", *Phytochemistry*, 17(9), pp.1647-1650.
46. Sun C. P., Qiu C. Y., Zhao F., Kang N., Chen L. X., Qiu F. (2017), "Physalins V-IX, 16, 24-cyclo-13, 14-seco withanolides from *Physalis angulata* and their antiproliferative and anti-inflammatory activities", *Scientific Reports*, 7(1), pp.4057.
47. Huong Ton Nu Lien, Ly Anh Van, Nguyen Duy Thanh, Nguyen Thi Thu Suong, Nguyen Hoang Phuong, Nguyen Dinh Cung Tien (2016), "Chemical constituents of *Physalis angulata* L. (family Solanaceae) ", *Can Tho University Journal of Science* 2, pp.46-49
48. Januário A. H., Filho E. R., Pietro R. C. L. R., Kashima S., Sato D. N., França S. C. (2002), "Antimycobacterial physalins from *Physalis angulata* L.(Solanaceae)", *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 16(5), pp.445-448.
49. Chiang H. C., Jaw S. M., Chen C. F., Kan W. S. (1992), "Antitumor agent, physalin F from *Physalis angulata* L.", *Anticancer Research*, 12(3), pp.837-843.
50. Sun C. P., Oppong M. B., Zhao F., Chen L. X., Qiu F. (2017), "Unprecedented 22, 26-seco physalins from *Physalis angulata* and their anti-inflammatory potential", *Organic & Biomolecular Chemistry*, 15(41), pp.8700-8704.
51. Boonsombat J., Chawengrum P., Mahidol C., Kittakoop P., Ruchirawat S., Thongnest S. (2020), "A new 22,26-seco physalin steroid from *Physalis angulata*", *Natural Product Research*, 34(8), pp.1097-1104.
52. Jin Z., Mashuta M. S., Stolowich N. J., Vaisberg A. J., Stivers N. S., Bates P. J., Lewis W. H., Hammond G. B. (2012), "Physangulidines A, B, and C: three new antiproliferative withanolides from *Physalis angulata* L.", *Organic Letters*, 14(5), pp.1230-1233.

53. Sun C. P., Yuan T., Wang L., Kang N., Zhao F., Chen L. X., Qiu F. (2016), "Anti-inflammatory labdane-type diterpenoids from *Physalis angulata*", *Rsc Advances*, 6(80), pp.76838-76847.
54. Shim J. S., Park K. M., Chung J. Y., Hwang J. K. (2002), "Antibacterial activity of oleanolic acid from *Physalis angulata* against oral pathogens", *Journal of Food Science and Nutrition*, 7(2), pp.215-218.
55. Odusina B. O., Onocha P. A. (2022), "A new squalene derivative from *Physalis angulata* L.(Solanaceae)", *Natural Product Research*, 36(8), pp.2154-2157.
56. Nguyen K. N. H., Kim K. H. (2021), "Determination of phenolic acids and flavonoids in leaves, calyces, and fruits of *Physalis angulata* L. in Viet Nam", *Pharmacia*, 68(2), pp.501-509.
57. Augustine A. A., Ufuoma O. (2013), "Flavonoids from the leaves of *Physalis angulata* Linn", *Planta Medica*, 79(13), pp.PJ5.
58. Tuan Anh H. L., Le Ba V., Do T. T., Phan V. K., Pham Thi H. Y., Bach L. G., Tran M. H., Tran Thi P. A., Kim Y. H. (2021), "Bioactive compounds from *Physalis angulata* and their anti-inflammatory and cytotoxic activities", *Journal of Asian Natural Products Research*, 23(8), pp.809-817.
59. Anh H. L. T., Dung D. T., Tuan D. T., Hung T. Q., Yen P. T. H., Quang T. H., Nhiem N. X., Van Minh C., Yen D. T. H., Van Kiem P. (2017), "Hepatoprotective effects of phenolic glycosides from the methanol extract of *Physalis angulata*", *Vietnam Journal of Science and Technology*, 55(2), pp.161.
60. Ismail N., Alam M. (2001), "A novel cytotoxic flavonoid glycoside from *Physalis angulata*", *Fitoterapia*, 72(6), pp.676-679.
61. Sun C. P., Nie X. F., Kang N., Zhao F., Chen L. X., Qiu F. (2017), "A new phenol glycoside from *Physalis angulata*", *Natural Product Research*, 31(9), pp.1059-1065.
62. Anh H. L. T., Dung D. T., Tuan D. T., Tai B. H., Nhiem N. X., Yen P. H., Duc T. M., Binh P. Q., Nam N. H., Minh C. V. (2016), "New phenolic glycosides from *Physalis angulata*", *Natural Product Communications*, 11(12), pp.1934578X1601101221.
63. Bastos G. N. T., Silveira A. J. A., Salgado C. G., Picanço-Diniz D. L. W., Do Nascimento J. L. M. (2008), "*Physalis angulata* extract exerts anti-

- inflammatory effects in rats by inhibiting different pathways", *Journal of Ethnopharmacology*, 118(2), pp.246-251.
64. Shravan K. N., Kishore G., Siva K. G., Sindhu P. E. S. (2011), "In vitro anti-inflammatory and anti-arthritis activity of leaves of *Physalis angulata* L.", *International Journal of Pharmaceutical Research*, 1(3), pp.211-213.
  65. Ukwubile C. A., Oise I. E. (2016), "Analgesic and anti-inflammatory activity of *Physalis angulata* Linn.(Solanaceae) leaf methanolic extract in Swiss albino mice", *International Biological and Biomedical Journal*, 2(4), pp.167-170.
  66. Rivera D. E., Ocampo Y. C., Castro J. P., Barrios L., Diaz F., Franco L. A. (2019), "A screening of plants used in Colombian traditional medicine revealed the anti-inflammatory potential of *Physalis angulata* calyces", *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(7), pp.1758-1766.
  67. Pinto N. B., Morais T. C., Carvalho K. M. B., Silva C. R., Andrade G. Md., Brito G. Ad C., Veras M. L., Pessoa O. D. L., Rao V. S., Santos F. A. (2010), "Topical anti-inflammatory potential of Physalin E from *Physalis angulata* on experimental dermatitis in mice", *Phytomedicine*, 17(10), pp.740-743.
  68. Yen P. H., Cuong L. C. V., Dat T. T. H., Thuy D. T. Q., Hoa D. T. N., Cuc N. T., Yen D. T. H., Thao D. T., Anh H. L. T. (2019), "Withanolides from the whole plant of *Physalis angulata* and their anti-inflammatory activities", *Vietnam Journal of Chemistry*, 57(3), pp.334-338.
  69. Bastos G. N. T., Santos A. R. S., Ferreira V. M. M., Costa A. M. R., Bispo CI., Silveira A. J. A., Do Nascimento J. L. M. (2006), "Antinociceptive effect of the aqueous extract obtained from roots of *Physalis angulata* L. on mice", *Journal of Ethnopharmacology*, 103(2), pp.241-245.
  70. Hsieh W. T., Huang K. Y., Lin H. Y., Chung J. G. (2006), "*Physalis angulata* induced G2/M phase arrest in human breast cancer cells", *Food and Chemical Toxicology*, 44(7), pp.974-983.
  71. Hseu Y. C., Wu C. R., Chang H. W., Kumar K. J. S., Lin M. K., Chen C. S., Cho H. J., Huang C. Y., Huang C. Y., Lee H. Z. (2011), "Inhibitory effects of *Physalis angulata* on tumor metastasis and angiogenesis", *Journal of Ethnopharmacology*, 135(3), pp.762-771.



72. Ribeiro I. M., Silva M. T. G., Soares R. D. A., Stutz C. M., Bozza M., Tomassini T. C. B. (2002), "*Physalis angulata* L. antineoplastic activity, *in vitro*, evaluation from its stems and fruit capsules", *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 12, pp.21-23.
73. Magalhães H. I. F., Torres M. R., Costa - Lotufo L. V., De Moraes M. O., Pessoa C., Veras M. L., Pessoa O. D. L., Silveira E. R., Alves A. P. N. N. (2006), "*In vitro* and *in vivo* antitumour activity of physalins B and D from *Physalis angulata*", *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 58(2), pp.235-241.
74. Hsu C. C., Wu Y. C., Farh L., Du Y. C., Tseng W. K., Wu C. C., Chang F. R. (2012), "Physalin B from *Physalis angulata* triggers the NOXA-related apoptosis pathway of human melanoma A375 cells", *Food and Chemical Toxicology*, 50(3-4), pp.619-624.
75. Reyes-Reyes E. M., Jin Z., Vaisberg A. J., Hammond G. B., Bates P. J. (2012), "Physangulidine A, a withanolide from *Physalis angulata*, perturbs the cell cycle and induces cell death by apoptosis in prostate cancer cells", *Journal of Natural Products*, 76(1), pp.2-7.
76. Anh H. L. T., Dung D. T., Van Kiem P., Quang T. H., Yen P. T. H., Cuong P. V., Hung T. M. (2018), "Phytochemical constituents and cytotoxic activity of *Physalis angulata* L. growing in Vietnam", *Phytochemistry Letters*, 27, pp.193-196.
77. Lin Y. S., Chiang H. C., Kan W. S., Hone E., Shih S. J., Won M. H. (1992), "Immunomodulatory activity of various fractions derived from *Physalis angulata* L. extract", *The American Journal of Chinese Medicine*, 20(03n04), pp.233-243.
78. Junior L. D. A., Quaglio A. E. V., de Almeida Costa C. A. R., Di Stasi L. C. (2017), "Intestinal anti-inflammatory activity of Ground Cherry (*Physalis angulata* L.) standardized CO<sub>2</sub> phytopharmaceutical preparation", *World Journal of Gastroenterology*, 23(24), pp.4369.
79. Soares M. B. P., Bellintani M. C., Ribeiro I. M., Tomassini T. C. B., dos Santos R. R. (2003), "Inhibition of macrophage activation and lipopolysaccharide-

- induced death by seco-steroids purified from *Physalis angulata* L.", *European Journal of Pharmacology*, 459(1), pp.107-112.
80. Soares M. B. P., Brustolim D., Santos L. A., Bellintani M. C., Paiva F. P., Ribeiro Y. M., Tomassini T. C. B., Dos Santos R. R. (2006), "Physalins B, F and G, seco-steroids purified from *Physalis angulata* L., inhibit lymphocyte function and allogeneic transplant rejection", *International Immunopharmacology*, 6(3), pp.408-414.
  81. Sun L., Liu J., Liu P., Yu Y., Ma L., Hu L. (2011), "Immunosuppression effect of Withangulatin A from *Physalis angulata* via heme oxygenase 1-dependent pathways", *Process Biochemistry*, 46(2), pp.482-488.
  82. Pinto L. A., Meira C. S., Villarreal C. F., Vannier-Santos M. A., de Souza C. V., Ribeiro I. M., Tomassini T. C., Galvão-Castro B., Soares M. B., Grassi M. F. (2016), "Physalin F, a seco-steroid from *Physalis angulata* L., has immunosuppressive activity in peripheral blood mononuclear cells from patients with HTLV1-associated myelopathy", *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 79, pp.129-134.
  83. Yang Y. J., Yi L., Wang Q., Xie B. B., Dong Y., Sha C. W. (2017), "Anti-inflammatory effects of physalin E from *Physalis angulata* on lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells through inhibition of NF- $\kappa$ B pathway", *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 39(2), pp.74-79.
  84. Abo K. A., Lawal I. O. (2013), "Antidiabetic activity of *Physalis angulata* extracts and fractions in alloxan-induced diabetic rats", *Journal of Advanced Scientific Research*, 4(3), pp.32-36.
  85. Poojari S., Porika R., Mamidala E. (2014), "Phytochemical analysis and *in vitro* antidiabetic activities of *Physalis angulata* fruit extracts", *National Journal of Integrated Research in Medicine (NJIRM)*, 5(2), pp.34-38.
  86. Vo T., Le P., Ngo D. (2021), "The role of *Physalis angulata* as potential anti-type 2 diabetic agent", *Pharmacognosy Research*, 13(2), pp.69-74.
  87. Nguyen T. Q., Vo T. S. (2020), "Investigation of the anti-diabetic and antioxidant activities of *Physalis angulata* extract", *Tropical Journal of Natural Product Research (TJNPR)*, 4(6), pp.243-248.

88. Raju P., Mamidala E. (2015), "Anti-diabetic activity of compound isolated from *Physalis angulata* fruit extracts in alloxan induced diabetic rats", *The American Journal of Science & Medical Research*, 1(1), pp.40-43.
89. Pujari S., Mamidala E. (2015), "Anti-diabetic activity of Physagulin-F isolated from *Physalis angulata* fruits", *The American Journal of Science & Medical Research*, 1(1), pp.53-60.
90. Osho A., Adetunji T., Fayemi S. O., Moronkola D. P. (2010), "Antimicrobial activity of essential oils of *Physalis angulata* L.", *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 7(4), pp.303-306.
91. Donkor A. M., Glover R. L. K., Boateng J. K., Gakpo V. Y. (2012), "Antibacterial activity of the fruit extract of *Physalis angulata* and its formulation", *Journal of Medical and Biomedical Sciences*, 1(4), pp.21-26.
92. Rivera D. E., Ocampo Y. C., Castro J. P., Caro D., Franco L. A. (2015), "Antibacterial activity of *Physalis angulata* L., *Merremia umbellata* L., and *Cryptostegia grandiflora* Roxb. Ex R. Br.-medicinal plants of the Colombian Northern Coast", *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*, 15(1), pp.95-102.
93. Pietro R. C. L. R., Kashima S., Sato D. N., Januario A. H., Franca S. C. (2000), "In vitro antimycobacterial activities of *Physalis angulata* L.", *Phytomedicine*, 7(4), pp.335-338.
94. Silva M. T. G., Simas S. M., Batista T. G. F. M., Cardarelli P., Tomassini T. C. B. (2005), "Studies on antimicrobial activity, *in vitro*, of *Physalis angulata* L. (Solanaceae) fraction and physalin B bringing out the importance of assay determination", *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 100(7), pp.779-782.
95. Cuong L. C. V., Dat T. T. H., Nhiem N. X., Cuc N. T., Yen D. T. H., Anh H. L. T. (2020), "The anti - microbial activities of secosteroids isolated from *Physalis angulata*", *Vietnam Journal of Chemistry*, 58(3), pp.321-326.
96. Nogueira R. C., Rocha V. P. C., Nonato F. R., Tomassini T. C. B., Ribeiro I. M., dos Santos R. R., Soares M. B. P. (2013), "Genotoxicity and antileishmanial activity evaluation of *Physalis angulata* concentrated ethanolic extract", *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 36(3), pp.1304-1311.

97. da Silva R. R. P., da Silva B. J. M., Rodrigues A. P. D., Farias L. H. S., da Silva M. N., Alves D. T. V., Bastos G. N. T., do Nascimento J. L. M., Silva E. O. (2015), "*In vitro* biological action of aqueous extract from roots of *Physalis angulata* against *Leishmania (Leishmania) amazonensis*", *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 15(1), pp.249.
98. Da Silva B. J. M., Da Silva R. R. P., Rodrigues A. P. D., Farias L. H. S., Do Nascimento J. L. M., Silva E. O. (2016), "*Physalis angulata* induces death of promastigotes and amastigotes of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* via the generation of reactive oxygen species", *Micron*, 82, pp.25-32.
99. Guimarães E. T., Lima M. S., Santos L. A., Ribeiro I. M., Tomassini T. B. C., Santos R. R. dos, dos Santos W. L. C., Soares M. B. P. (2010), "Effects of seco-steroids purified from *Physalis angulata* L., Solanaceae, on the viability of *Leishmania sp*", *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 20(6), pp.945-949.
100. Sá M. S., de Menezes M. N., Krettli A. U., Ribeiro I. M., Tomassini T. C., Ribeiro dos Santos R., de Azevedo Jr W. F., Soares M. B. (2011), "Antimalarial activity of physalins B, D, F, and G", *Journal of Natural Products*, 74(10), pp.2269-2272.
101. Meira C. S., Guimarães E. T., dos Santos J. A. F., Moreira D. R. M., Nogueira R. C., Tomassini T. C. B., Ribeiro I. M., de Souza C. V. C., dos Santos R. R., Soares M. B. P. (2015), "*In vitro* and *in vivo* antiparasitic activity of *Physalis angulata* L. concentrated ethanolic extract against *Trypanosoma cruzi*", *Phytomedicine*, 22(11), pp.969-974.
102. Meira C. S., Guimaraes E. T., Bastos T. M., Moreira D. R., Tomassini T. C., Ribeiro I. M., Dos Santos R. R., Soares M. B. (2013), "Physalins B and F, seco-steroids isolated from *Physalis angulata* L., strongly inhibit proliferation, ultrastructure and infectivity of *Trypanosoma cruzi*", *Parasitology*, 140(14), pp.1811-1821.
103. dos Santos J. A. A., Tomassini T. C. B., Xavier D. C. D., Ribeiro I. M., Da Silva M. T. G., Morais Filho Z. B. de (2003), "Molluscicidal activity of *Physalis angulata* L. extracts and fractions on *Biomphalaria tenagophila* (d'Orbigny, 1835) under laboratory conditions", *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 98(3), pp.425-428.

104. Rathore C., Dutt K. R., Sahu S., Deb L. (2011), "Antiasthmatic activity of the methanolic extract of *Physalis angulata* Linn", *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(22), pp.5351-5355.
105. Nanumala S. K., Gunda K., Runja C., Sriram Chandra M. (2012), "Evaluations of diuretic activity of methanolic extract of *Physalis angulata* L. leaves", *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review & Resear*, 16(2), pp.40-42.
106. Nguyễn Văn Đản, Nguyễn Việt Tựu (1985), *Phương pháp nghiên cứu hóa học cây thuốc*, Nhà xuất bản Y học.
107. Fan G. W., Zhang Y., Jiang X., Zhu Y., Wang B., Su L., Cao W., Zhang H., Gao X. (2013), "Anti-inflammatory activity of baicalein in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages via estrogen receptor and NF- $\kappa$ B-dependent pathways", *Inflammation*, 36(6), pp.1584-1591.
108. Lee H. S., Kim D. H., Hong J. E., Lee J. Y., Kim E. J. (2015), "Oxyresveratrol suppresses lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in murine macrophages", *Human & Experimental Toxicology*, 34(8), pp.808-818.
109. Verma N., Tripathi S. K., Sahu D., Das H. R., Das R. H. (2010), "Evaluation of inhibitory activities of plant extracts on production of LPS-stimulated pro-inflammatory mediators in J774 murine macrophages", *Molecular and Cellular Biochemistry*, 336(1-2), pp.127-135.
110. Seo S., Lee K. G., Shin J. S., Chung E. K., Lee J. Y., Kim H. J., Lee K. T. (2016), "60-*O*-Caffeoyldihydroxyringin isolated from *Aster glehni* suppresses lipopolysaccharide-induced iNOS, COX-2, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6 expression via NF- $\kappa$ B and AP-1 inactivation in RAW 264.7 macrophages", *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 26(19), pp.4592-4598.
111. Ibrahim A. D (2006), "Immunoassay methods and their applications in pharmaceutical analysis: Basic methodology and recent advances", *International Journal of Biomedical Science*, 2(3), pp.217-235.
112. Fan H., Qi D., Yang M., Fanga H., Liua K., Zao F. (2013), "*In vitro* and *in vivo* anti-inflammatory effects of 4-methoxy-5-hydroxycanthin-6-one, a natural alkaloid from *Picrasma quassioides*", *Phytomedicine*, 20, pp.319-323.

113. Jeong D., Yang M. S., Yang Y., Nam G., Kim J. H., Yoon D. H., Noh H. J., Lee S., Kim T. W., Sung G. H., Cho J. Y. (2013), "*In vitro* and *in vivo* inflammatory effects of *Rhomyrtus tomentosa* methanol extract", *Journal of Ethnopharmacology*, 146, pp.205-213.
114. Yu T., Lee Y. G., Byeon S. E., Kim M. H., Sohn E. H., Lee S. G., Cho J. Y. (2010), "*In vitro* and *in vivo* anti-inflammatory effects of ethanol extract from *Acer tegmentosum*", *Journal of Ethnopharmacology* 128, pp.139-147.
115. Viện Dược liệu (2006), *Phương pháp nghiên cứu tác dụng dược lý của cây thuốc từ dược thảo*, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, tr.377-387.
116. Winter C. A., Risley E. A., Nuss G. W. (1962), "Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs", *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 111, pp.544-547.
117. Vogel H. G. (2008), *Drug discovery and evaluation: Pharmacological assays, 3rd ed*, Springer.
118. Vane J. R., Botting R. M. (1998), "Mechanism of action of nonsteroidal anti-inflammatory drugs", *The American Journal of Medicine*, 104(3S1), pp.2S-8S.
119. Hughes J. P., Rees S., Kalindjian S. B., Philpott K. L. (2011), "Principles of early drug discovery", *British Journal of Pharmacology*, 162(6), pp.1239-1249.
120. Skehan P., Storeng R., Scudiero D., Monks A., McMahon J., Vistica D., Warren J. T., Bokesch H., Kenney S., Boyd M. R. (1990), "New colorimetric cytotoxic assay for anticancer-drug screening", *Journal of the National Cancer Institute*, 82(13), pp.1107-1112.
121. Exarchou V., Troganis A., Gerothanassis I. P., Tsimidou M., Boskou D. (2001), "Identification and quantification of caffeic and rosmarinic acid in complex plant extracts by the use of variable-temperature two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(1), pp.2-8.
122. Khalil H. E., Kamel M. S. (2015), "Phytochemical and biological studies of *Cichorium endivia* L. leaves", *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 7(8), pp.509.

123. Pauli G. F., Kuczkowiak U., Nahrstedt A. (1999), "Solvent effects in the structure dereplication of caffeoyl quinic acids", *Magnetic Resonance in Chemistry*, 37(11), pp.827-836.
124. Bui T. T., Nguyen H. T., Duong T. L. H., Le T. T. H., Vu D. L., Nguyen H. T. (2015), "Flavonoids from leaves of *Tetracera scandens* L.", *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 7(3), pp.2123-2126
125. Cota B. B., Siqueira E. P., Oliveira D. M. D., Alves T., Sobral M. E., Rabello A., Zani C. L. (2012), "Chemical constituents and leishmanicidal activity from leaves of *Kielmeyera variabilis*", *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 22(6), pp.1253-1258.
126. Nguyễn Thị Thanh Ngân, Đỗ Ngọc Liên, Nguyễn Thị Thúy Quỳnh, Chử Lương Luân, Nguyễn Huỳnh Minh Quyên, Trần Văn Ôn (2010), "Xác định cấu trúc của quercetin 3-O-b-D-glucopyranosid và myricitrin tinh sạch từ phân đoạn dịch chiết là khế (*Averrhoa carambola* L.) có tác dụng hạ glucose huyết trên chuột gây đái tháo đường thực nghiệm", *VNU Journal of Science: Natural Sciences and Technology*, 26(4), tr.242-247.
127. Nguyễn Thị Hồng Vân, Trịnh Anh Viên, Phạm Quốc Long, Nguyễn Mạnh Cường, Lưu Tuấn Anh (2015), "Một số flavonoid và dẫn xuất bergenin phân lập từ lá cây com ngội đảo *Ardisia insularis*", *Tạp chí Hóa học*, 53(3), tr.310-316.
128. Selvaraj K., Chowdhury R., Bhattacharjee C. (2013), "Isolation and structural elucidation of flavonoids from aquatic fern *Azolla microphylla* and evaluation of free radical scavenging activity", *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5(3), pp.743-749.
129. Kongduang D., Wungsintaweekul J., De-Eknamkul W. (2008), "Biosynthesis of  $\beta$ -sitosterol and stigmasterol proceeds exclusively via the mevalonate pathway in cell suspension cultures of *Croton stellatopilosus*", *Tetrahedron Letters*, 49(25), pp.4067-4072.
130. Lendl A., Werner I., Glasl S., Kletter C., Mucaji P., Presser A., Reznicek G., Jurenitsch J., Taylor D. W. (2005), "Phenolic and terpenoid compounds from *Chione venosa* (SW.) Urban var. *venosa* (Bois Bande´)", *Phytochemistry*, 66(19), pp.2381-2387.

131. Jiménez Q. G. P. (2016), *Estudio quísmico de Physalis patula*, Maestro en ciencias, Universidad nacional autónoma de México, pp.67.
132. de Riccardis F., Minale L., Iorizzi M., Debitus C., Lévi C. (1993), "Marine sterols. Side-chain-oxygenated sterols, possibly of abiotic origin, from the new Caledonian sponge *Stelodoryx chlorophylla*", *Journal of Natural Products*, 56(2), pp.282-287.
133. Sinha S. C., Ali A., Bagchi A., Sahai M., Ray A. B. (1987), "Physalindicanols, new biogenetic precursors of C28-steroidal lactones from *Physalis minima* var. *indica*", *Planta Medica*, 53(01), pp.55-57.
134. Nguyễn Thị Tố Uyên, Trần Thị Thanh Phúc, Lương Văn Dũng, Trịnh Thị Điệp (2019), "Các hợp chất phytosterol, triterpen, và alcol mạch dài phân lập từ lá trà Đà Lạt (*Camellia dalatensis* Luong, Tran & Hakoda)", *Tạp chí Khoa học Đại học Đà Lạt*, 9(2), tr.70-80.
135. Võ Văn Chi (2004), *Từ điển Thực vật thông dụng, Tập 2*, Nhà xuất bản Khoa học Kỹ thuật, tr.1950-1951.
136. Kuang K. Z., Lu A. M. (1978), *Flora Reipublicae Popularis sinicae, Solanaceae, Vol 67(1)*, pp.50-59.
137. Bonati G. (1912), *Flore Générale de L'Indo-chine, Vol 4*, Paris masson et Cie, Editeurs., pp.334-335.
138. Saleem T. M., Chetty C., Ramkanth S., Alagusundaram M., Gnanaprakash K., Rajan V. T., Angalaparameswari S. (2009), "*Solanum nigrum* Linn.-A review", *Pharmacognosy Reviews*, 3(6), pp.342.
139. Jayanthi G., Sathishkumar T., Senthilkumar T., Jegadeesan M. (2012), "Essential oil from the seeds of *Cardiospermum halicacabum* L. var. *microcarpum*", *Asian Journal of Pharmaceutical & Biological Research (AJPBR)*, 2(3), pp.177-179.
140. Touaibia M., Jean-Francois J., Doiron J. (2011), "Caffeic acid, a versatile pharmacophore: An overview", *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 11(8), pp.695-713.
141. de Oliveira Silva E., Batista R. (2017), "Ferulic acid and naturally occurring compounds bearing a feruloyl moiety: a review on their structures, occurrence,



- and potential health benefits", *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(4), pp.580-616.
142. Naveed M., Hejazi V., Abbas M., Kamboh A. A., Khan G. J., Shumzaid M., Ahmad F., Babazadeh D., FangFang X., Modarresi-Ghazani F., WenHua L. (2018), "Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research", *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 97, pp.67-74.
  143. Wang W., Sun C., Mao L., Ma P., Liu F., Yang J., Gao Y. (2016), "The biological activities, chemical stability, metabolism and delivery systems of quercetin: A review", *Trends in Food Science & Technology*, 56, pp.21-38.
  144. Camuesco D., Comalada M., Rodríguez - Cabezas M. E., Nieto A., Lorente M. D., Concha A., Zarzuelo A., Gálvez J. (2004), "The intestinal anti - inflammatory effect of quercitrin is associated with an inhibition in iNOS expression", *British journal of Pharmacology*, 143(7), pp.908-918.
  145. Tang J., Diao P., Shu X., Li L., Xiong L. (2019), "Quercetin and quercitrin attenuates the inflammatory response and oxidative stress in LPS-induced RAW264. 7 cells: *in vitro* assessment and a theoretical model", *Biomed Research International*, DOI: 10.1155/2019/7039802.
  146. Pham T. V., Le T. Q., Le A. T., Vo H. Q., Ho D. V. (2020), "Phytochemical constituents of *Annona reticulata* and their cytotoxic activity", *Letters in Organic Chemistry*, 17(3), pp.206-210.
  147. Jayachandran M., Wu Z., Ganesan K., Khalid S., Chung S. M., Xu B. (2019), "Isoquercetin upregulates antioxidant genes, suppresses inflammatory cytokines and regulates AMPK pathway in streptozotocin-induced diabetic rats", *Chemico-biological Interactions*, 303, pp.62-69.
  148. Domitrović R., Rashed K., Cvijanović O., Vladimir-Knežević S., Škoda M., Višnić A. (2015), "Myricitrin exhibits antioxidant, anti-inflammatory and antifibrotic activity in carbon tetrachloride-intoxicated mice", *Chemico-biological Interactions*, 230, pp.21-29.
  149. Weng W., Wang Q., Wei C., Man N., Zhang K., Wei Q., Adu-Frimpong M., Toreniyazov E., Ji H., Yu J., Xu X. (2019), "Preparation, characterization, pharmacokinetics and anti-hyperuricemia activity studies of myricitrin-loaded proliposomes", *International Journal of Pharmaceutics*, 572, pp.118735.

150. Ganeshpurkar A., Saluja A. K. (2017), "The pharmacological potential of rutin", *Saudi Pharmaceutical Journal*, 25(2), pp.149-164.
151. Kaur N., Chaudhary J., Jain A., Kishore L. (2011), "Stigmasterol: A comprehensive review", *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 2(9), pp.2259-2265.
152. Han B., Jiang P., Liu W., Xu H., Li Y., Li Z., Ma H., Yu Y., Li X., Ye X. (2018), "Role of daucosterol linoleate on breast cancer: studies on apoptosis and metastasis", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(24), pp.6031-6041.
153. Lee J. H., Lee J. Y., Park J. H., Jung H. S., Kim J. S., Kang S. S., Kim Y. S., Han Y. (2007), "Immunoregulatory activity by daucosterol, a  $\beta$ -sitosterol glycoside, induces protective Th1 immune response against disseminated Candidiasis in mice", *Vaccine*, 25(19), pp.3834-3840.
154. Jang J., Kim S. M., Yee S. M., Kim E. M., Lee E. H., Choi H. R., Lee Y. S., Yang W. K., Kim H. Y., Kim K. H., Kang H. S. (2019), "Daucosterol suppresses dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice", *International Immunopharmacology*, 72, pp.124-130.
155. Pollier J., Goossens A. (2012), "Oleanolic acid", *Phytochemistry*, 77, pp.10-15.
156. Sultana N., Ata A. (2008), "Oleanolic acid and related derivatives as medicinally important compounds", *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 23(6), pp.739-756.
157. Howard S. S. (2006), "Arachidonic acid pathways in nociception", *Journal of Supportive Oncology*, 4, pp.277-287.
158. Ha do T., Oh J., Khoi N. M., Dao T. T., Dung le V., Do T. N., Lee S. M., Jang T. S., Jeong G. S., Na M. (2013), "In vitro and in vivo hepatoprotective effect of ganodermanontriol against t-BHP-induced oxidative stress", *Journal of Ethnopharmacology*, 150(3), pp.875-885.
159. Intayoung P., Limtrakul P., Yodkeeree S. (2016), "Antiinflammatory activities of crebanine by inhibition of NF- $\kappa$ B and AP-1 activation through suppressing MAPKs and Akt signaling in LPS-induced RAW264.7 macrophages", *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 39(1), pp.54-61.

160. Tao J. Y., Zheng G. H., Zhao L., Wu J. G., Zhang X. Y., Zhang S. L., Huang Z. J., Xiong F. L., Li C. M. (2009), "Anti-inflammatory effects of ethyl acetate fraction from melilotus suaveolens Ledeb on LPS-stimulated RAW 264.7 cells", *Journal of Ethnopharmacology*, 123(1), pp.97-105.
161. Guha M., Mackman N. (2001), "LPS induction of gene expression in human monocytes", *Cell Signal*, 13(2), pp.85-94.
162. Mosser D. M., Edwards J. P. (2008), "Exploring the full spectrum of macrophage activation", *Nature Reviews Immunology*, 8(12), pp.958-969.
163. Davies G., Martin L. A., Sacks N., Dowsett M. (2002), "Cyclooxygenase -2 (COX-2), aromatase and breast cancer: a possible role for COX-2 inhibitors in breast cancer chemoprevention", *Annals of Oncology*, 13, pp.669-678.
164. Luis V., Angel M. P., Mercedes C., Alfonso B., Sonia A., Nuria P. M., Marta S., Rosa A., Juan-Carlos S., Jordi F., Jose-Manuel S. (2010), "Heritability of thromboxane A2 and prostaglandin E2 biosynthetic machinery in a spanish population", *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 30, pp.128-134.
165. Wallace J. L. (2001), "Prostaglandian biology in inflammatory bowel disease", *Gastroenterology Clinics*, 30(4), pp.971-980.
166. Griffith O. W., Stuehr D. J. (1995), "Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism", *Annual Review of Physiology*, 57, pp.707-736.
167. Moncada S., Palmer R. M., Higgs E. A. (1991), "Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology", *Pharmacological Reviews*, 43, pp.109-142.
168. Weiming X. U., Li Z. L., Marilena L., Mohamed A., Ian G. C (2002), "The role of nitric oxide in cancer", *Cell Research*, 12(5-6), pp.311-320.
169. Ren K., Torres R. (2009), "Role of interleukin-1 $\beta$  during pain and inflammation", *Brain Research Reviews*, 60(1), pp.57-64.
170. Baeuerle P. A., Baltimore D (1996), "Nf- $\kappa$ B: ten years after", *Cell*, 87(1), pp.13-20.
171. Pahl H. L. (1999), "Activators and target genes of Rel/NF- $\kappa$ B transcription factors", *Oncogene*, 18(49), pp.6853-6866.

172. Chao W. W., Hong Y. H., Chen M. L., Lin B. F. (2010), "Inhibitory effects of *Angelica sinensis* ethyl acetate extract and major compounds on NF- $\kappa$ B trans-activation activity and LPS-induced inflammation", *Journal of Ethnopharmacology*, 29(2), pp.244-249.
173. Winston B. W., Krein P., Shehzad I., Yong H., Connie M. (1999), "TNF $\alpha$ -regulated insulin-like growth factor-I (IGF-I) promoter activity in macrophages", *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 159(3), pp.442.
174. Israf D. A., Tham C. L., Syahida A., Lajis N. H., Sulaiman M. R., Mohamad A. S., Zakaria Z. A. (2010), "Atrovirone inhibits proinflammatory mediator synthesis through disruption of NF-kB nuclear translocation and MAPK phosphorylation in the murine monocytic macrophage RAW264.7", *Phytomedicine*, 17, pp.732-739.
175. Dương Thị Ly Hương, Nguyễn Thanh Thảo, Trần Văn On (2016), "Tác dụng kháng khuẩn, chống viêm của cây Tâm phòng (*Cardiospermum halicacabum* L.)", *Tạp chí Dược học*, 5, tr.30-34.
176. Hồ Thị Thanh Huyền (2014), *Nghiên cứu đặc điểm thực vật, thành phần hoá học và một số tác dụng sinh học của cây Gạo*, Luận án Tiến sĩ Dược học, tr.46-48.
177. Phạm Quốc Tuấn, Nguyễn Minh Khởi, Na MinKyun, Nguyễn Thùy Dương, Hà Hương Lan, Phương Thiện Thương (2015), "Nghiên cứu tác dụng chống viêm và giảm đau của cao phần dưới mặt đất cây Lạc tân phụ", *Tạp chí Dược học*, 55(2), tr.62-66.
178. Vinegar R., Schreiber W., Hugo R. (1969), "Biphasic development of carrageenin edema in rats", *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 166(1), pp.96-103.
179. Brunton L. L., Lazo J. S., Parker K. L. (2010), *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics 12th ed*, pp.959-1000.
180. Guardia T., Rotelli A. E., Juarez A. O., Pelzer L. E. (2001), "Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat", *Il farmaco*, 56(9), pp.683-687.

181. Misico R. I., Nicotra V. E., Oberti J. C., Barboza G., Gil R. R., Burton G. (2011), "Withanolides and related steroids", *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products Vol. 94*, pp.127-229.
182. Bukhari I. A., Khan R. A., Gilani A. U., Shah A. J., Hussain J., Ahmad V. U. (2007), "The analgesic, anti-inflammatory and calcium antagonist potential of *Tanacetum artemisioides*", *Archives of Pharmacal Research*, 30(3), pp.303-312.
183. Lim H., Jung H. A., Choi J. S., Kim Y. S., Kang S. S., Kim H. P. (2009), "Anti-inflammatory activity of the constituents of the roots of *Aralia continentalis*", *Archives of Pharmacal Research*, 32(9), pp.1237-1243.
184. Liu X., Hu Z., Shi Q., Zeng H., Shen Y., Jin H., Zhang W. (2010), "Anti-inflammatory and anti-nociceptive activities of compounds from *Tinospora sagittata* (Oliv.) Gagnep", *Archives of Pharmacal Research*, 33(7), pp.981-987.
185. Verma P. R., Joharapurkar A. A., Chatpalliwar V. A., Asnani A. J. (2005), "Antinociceptive activity of alcoholic extract of *Hemidesmus indicus* R.Br. in mice", *Journal of Ethnopharmacology*, 102(2), pp.298-301.
186. Bộ Y tế (2007), *Dược lý tập 2*, Nhà xuất bản Y học.
187. Maurya R., Singh A. B., Srivastava A. K. (2008), "Coagulanolide, a withanolide from *Withania coagulans* fruits and antihyperglycemic activity", *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 18(24), pp.6534-6537.
188. Browning J. D., Horton J. D. (2004), "Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury", *The Journal of Clinical Investigation*, 114(2), pp.147-152.
189. Clark J. M., Brancati F. L., Diehl A. M. (2003), "The prevalence and etiology of elevated aminotransferase levels in the United States", *The American Journal of Gastroenterology*, 98(5), pp.960-967.
190. Angulo P. (2002), "Nonalcoholic fatty liver disease", *New England Journal of Medicine*, 346(16), pp.1221-1231.
191. Nomura H., Kashiwagi S., Hayashi J., Kajiyama W., Tani S., Goto M. (1988), "Prevalence of fatty liver in a general population of Okinawa, Japan", *Japanese Journal of Medicine*, 27(2), pp.142-149.

192. Hilden M., Christoffersen P., Juhl E., Dalgaard J. B. (1977), "Liver histology in a 'normal' population-examinations of 503 consecutive fatal traffic casualties", *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 12(5), pp.593-597.
193. Bellentani S., Saccoccio G., Masutti F., Crocè L. S., Brandi G., Sasso F., Cristanini G., Tiribelli C. (2000), "Prevalence of and risk factors for hepatic steatosis in Northern Italy", *Annals of Internal Medicine*, 132(2), pp.112-119.
194. Ludwig J., Viggiano T. R., McGill D. B., Oh B. J. (1980), "Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease", *Mayo Clinic Proceedings*, 55(7), pp.434-438.
195. Matteoni C. A., Younossi Z. M., Gramlich T., Boparai N., Liu Y. C., McCullough A. J. (1999), "Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity", *Gastroenterology*, 116(6), pp.1413-1419.
196. Nakamuta M., Kohjima M., Morizono S., Kotoh K., Yoshimoto T., Miyagi I., Enjoji M. (2005), "Evaluation of fatty acid metabolism-related gene expression in nonalcoholic fatty liver disease", *International Journal of Molecular Medicine*, 16(4), pp.631-635.
197. Kohjima M., Enjoji M., Higuchi N., Kato M., Kotoh K., Yoshimoto T., Fujino T., Yada M., Yada R., Harada N., Takayanagi R. (2007), "Re-evaluation of fatty acid metabolism-related gene expression in nonalcoholic fatty liver disease", *International Journal of Molecular Medicine*, 20(3), pp.351-358.
198. Andersson U., Filipsson K., Abbott C. R., Woods A., Smith K., Bloom S. R., Carling D., Small C. J. (2004), "AMP-activated protein kinase plays a role in the control of food intake", *Journal of Biological Chemistry*, 279(13), pp.12005-12008.
199. Carling D., Hardie D. G. (1989), "The substrate and sequence specificity of the AMP-activated protein kinase. Phosphorylation of glycogen synthase and phosphorylase kinase", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1012(1), pp.81-86.
200. Hardie D. G., Hawley S. A., Scott J. W. (2006), "AMP - activated protein kinase-development of the energy sensor concept", *The Journal of Physiology*, 574(1), pp.7-15.

201. McGarry J. D., Mannaerts G. P., Foster D. W. (1977), "A possible role for malonyl-CoA in the regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketogenesis", *The Journal of Clinical Investigation*, 60(1), pp.265-270.
202. Wang X., Sato R., Brown M. S., Hua X., Goldstein J. L. (1994), "SREBP-1, a membrane-bound transcription factor released by sterol-regulated proteolysis", *Cell*, 77(1), pp.53-62.
203. Yellaturu C. R., Deng X., Cagen L. M., Wilcox H. G., Mansbach C. M., Siddiqi S. A., Park E. A., Raghov R., Elam M. B. (2009), "Insulin enhances post-translational processing of nascent SREBP-1c by promoting its phosphorylation and association with COPII vesicles", *Journal of Biological Chemistry*, 284(12), pp.7518-7532.
204. Li Y., Xu S., Mihaylova M. M., Zheng B., Hou X., Jiang B., Park O., Luo Z., Lefai E., Shyy J. Y. J., Gao B. (2011), "AMPK phosphorylates and inhibits SREBP activity to attenuate hepatic steatosis and atherosclerosis in diet-induced insulin-resistant mice", *Cell Metabolism*, 13(4), pp.376-388.
205. Kim J. B., Sarraf P., Wright M., Yao K. M., Mueller E., Solanes G., Lowell B. B., Spiegelman B. M. (1998), "Nutritional and insulin regulation of fatty acid synthetase and leptin gene expression through ADD1/SREBP1", *The Journal of Clinical Investigation*, 101(1), pp.1-9.
206. Magaña M. M., Lin S. S., Dooley K. A., Osborne T. F. (1997), "Sterol regulation of acetyl coenzyme A carboxylase promoter requires two interdependent binding sites for sterol regulatory element binding proteins", *Journal of Lipid Research*, 38(8), pp.1630-1638.
207. Shimomura I., Shimano H., Korn B. S., Bashmakov Y., Horton J. D. (1998), "Nuclear sterol regulatory element-binding proteins activate genes responsible for the entire program of unsaturated fatty acid biosynthesis in transgenic mouse liver", *Journal of Biological Chemistry*, 273(52), pp.35299-35306.
208. Kim J. B., Spiegelman B. M. (1996), "ADD1/SREBP1 promotes adipocyte differentiation and gene expression linked to fatty acid metabolism", *Genes & Development*, 10(9), pp.1096-1107.
209. Klemm D. J., Leitner J. W., Watson P., Nesterova A., Reusch J. E. B., Goalstone M. L., Draznin B. (2001), "Insulin-induced adipocyte differentiation

- activation of creb rescues adipogenesis from the arrest caused by inhibition of prenylation", *Journal of Biological Chemistry*, 276(30), pp.28430-28435.
210. Zhou G., Myers R., Li Y., Chen Y., Shen X., Fenyk-Melody J., Wu M., Ventre J., Doebber T., Fujii N., Musi N. (2001), "Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action", *The Journal of Clinical Investigation*, 108(8), pp.1167-1174.
  211. Woods A., Azzout-Marniche D., Foretz M., Stein S. C., Lemarchand P., Ferré P., Foufelle F., Carling D. (2000), "Characterization of the role of AMP-activated protein kinase in the regulation of glucose-activated gene expression using constitutively active and dominant negative forms of the kinase", *Molecular and Cellular Biology*, 20(18), pp.6704-6711.
  212. Pham Thi Hai Yen, Nguyen Thi Nga, Trieu Ha Phuong, Nguyen Thi Cuc, Do Thi Phuong (2022), "Determination of apoptotic inductive activities of physagulin P from *Physalis angulata* plant in Vietnam", *Vietnam Journal of Biotechnology*, 20(1), pp.81-87.