

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

VIỆN DƯỢC LIỆU



TRẦN VĂN QUANG

**NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM THỰC VẬT,
THÀNH PHẦN HÓA HỌC, TÁC DỤNG CẢI
THIỆN TRÍ NHỚ TRÊN MÔ HÌNH RUỒI
GIẢM CHUYỂN GEN hAPP CỦA LOÀI VIỄN
CHÍ BA SỪNG (*Polygala karensium* Kurz) THU
HÁI Ở SA PA, LÀO CAI**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ DƯỢC HỌC

HÀ NỘI, NĂM 2022

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

VIỆN DƯỢC LIỆU

TRẦN VĂN QUANG

**NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM THỰC VẬT,
THÀNH PHẦN HÓA HỌC, TÁC DỤNG CẢI
THIỆN TRÍ NHỚ TRÊN MÔ HÌNH RUỒI
GIẢM CHUYỂN GEN hAPP CỦA LOÀI VIỄN
CHÍ BA SỪNG (*Polygala karensium* Kurz) THU
HÁI Ở SA PA, LÀO CAI**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ DƯỢC HỌC

CHUYÊN NGÀNH DƯỢC LIỆU- DƯỢC HỌC CỔ TRUYỀN
MÃ SỐ 972.02.06

Người hướng dẫn khoa học: **PGS.TS. Nguyễn Thượng Dong**
PGS.TS. Phạm Thị Nguyệt Hằng

HÀ NỘI, NĂM 2022

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của riêng tôi dưới sự hướng dẫn khoa học của PGS.TS. Nguyễn Thượng Dong và PGS.TS. Phạm Thị Nguyệt Hằng. Các số liệu, kết quả nêu trong luận án là trung thực và chưa từng được ai công bố trong bất kỳ công trình nào khác.

Tôi xin chịu trách nhiệm về các kết quả nghiên cứu của mình.

Tác giả

Trần Văn Quang

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 tiên, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc nhất tới PGS.TS. Nguyễn Thượng Dong và PGS.TS. Phạm Thị Nguyệt Hằng, những người Thầy đã định hướng nghiên cứu, tận tình hỗ trợ, chỉ bảo, giúp đỡ, tạo điều kiện thuận lợi nhất cho tôi hoàn thành luận án.

Tôi xin trân trọng cảm ơn các nhà khoa học, các tác giả của những công trình khoa học mà tôi đã trích dẫn trong luận án vì đã cung cấp nguồn tư liệu quý báu, những kiến thức liên quan trong quá trình nghiên cứu luận án.

Tôi xin trân trọng cảm ơn Ban Giám đốc Viện Dược liệu Trung Ương, Ban giám đốc, lãnh đạo Học viện Quân y, chỉ huy Viện Đào tạo Dược- Học viện Quân y và Bộ môn Dược liệu- Dược học cổ truyền, Viện Đào tạo Dược- Học viện Quân y đã tạo điều kiện cho tôi hoàn thành luận án.

Tôi xin chân thành cảm ơn tới các Khoa, Phòng và các đồng nghiệp tại Viện Dược liệu, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, Trường Đại học Dược Hà Nội, Viện nghiên cứu ứng dụng và dịch vụ phân tích thí nghiệm, Học viện Quân y đã giúp đỡ, tạo điều kiện và cộng tác để giúp tôi hoàn thành công trình này.

Cuối cùng xin gửi lời cảm ơn sâu sắc tới những người trong gia đình, bạn bè thân thiết đã luôn động viên, cổ vũ tôi trong suốt thời gian thực hiện luận án.

Trần Văn Quang

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN

LỜI CẢM ƠN

MỤC LỤC

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, TỪ VIẾT TẮT

DANH MỤC BẢNG

DANH MỤC HÌNH

ĐẶT VẤN ĐỀ..... 1

CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN..... 3

1.1. TỔNG QUAN VỀ THỰC VẬT HỌC CỦA CHI *POLYGALA* VÀ LOÀI *POLYGALA KARENSIUM* KURZ 3

1.1.1. Vài nét về thực vật học của chi *Polygala* trên thế giới và Việt Nam 3

1.1.2. Vài nét về thực vật học loài *Polygala karensium* Kurz..... 6

1.2. TỔNG QUAN VỀ THÀNH PHẦN HÓA HỌC CHI *POLYGALA* VÀ LOÀI *POLYGALA KARENSIUM* KURZ 8

1.2.1. Thành phần hóa học chi *Polygala* 8

1.2.2. Thành phần hóa học của loài *Polygala karensium* Kurz..... 23

1.3. TỔNG QUAN VỀ TÁC DỤNG CHỐNG SUY GIẢM TRÍ NHỚ CỦA MỘT SỐ LOÀI THUỘC CHI *POLYGALA* VÀ TÁC DỤNG SINH HỌC CỦA LOÀI *POLYGALA KARENSIUM* KURZ. 26

1.3.1. Vài nét về trí nhớ và hội chứng suy giảm trí nhớ..... 26

1.3.2. Một số nghiên cứu về tác dụng chống suy giảm trí nhớ của một số loài thuộc chi *Polygala*..... 28

1.3.3. Tác dụng sinh học của loài *Polygala karensium* Kurz 31

1.3.4. Tổng quan về mô hình nghiên cứu tác dụng chống suy giảm trí nhớ 33

CHƯƠNG 2: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU 36

2.1 ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU 36

2.1.1 Nguyên liệu nghiên cứu..... 36

2.1.2 Động vật thí nghiệm 37

2.1.3 Thuốc thử, hoá chất, dung môi, trang thiết bị nghiên cứu 38

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU 40

2.2.1. Phương pháp nghiên cứu thực vật học	40
2.2.2. Phương pháp nghiên cứu hóa học	42
2.2.3. Phương pháp nghiên cứu tác dụng sinh học.....	44
2.2.4. Phương pháp xử lý số liệu	53
2.3. ĐỊA ĐIỂM NGHIÊN CỨU	53
CHƯƠNG 3: THỰC NGHIỆM VÀ KẾT QUẢ	55
3.1. THỰC VẬT HỌC	55
3.1.1. Thảm định tên khoa học của Viễn chí ba sừng	55
3.1.2. Đặc điểm hình thái thực vật.....	55
3.1.3. Đặc điểm vi học.....	58
3.2. THÀNH PHẦN HÓA HỌC	61
3.2.1. Kết quả định tính các nhóm hợp chất.....	61
3.2.2. Chiết xuất và phân lập các hợp chất	62
3.2.3. Xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất phân lập từ rễ Viễn chí ba sừng	65
3.3. TÁC DỤNG SINH HỌC.....	99
3.3.1 Kết quả đánh giá ảnh hưởng của các phân đoạn cao chiết rễ cây Viễn chí ba sừng đối với hành vi di chuyển của ấu trùng ruồi giấm mang gen bệnh Alzheimer hAPP....	99
3.3.2. Kết quả đánh giá ảnh hưởng của các phân đoạn cao chiết rễ cây Viễn chí ba sừng đối với hành vi leo trèo của ruồi giấm trưởng thành mang gen bệnh Alzheimer hAPP.....	101
3.3.3. Kết quả đánh giá khả năng học tập và ghi nhớ mùi của ấu trùng ruồi giấm mang gen bệnh Alzheimer hAPP của các phân đoạn cao chiết	103
CHƯƠNG 4: BÀN LUẬN.....	106
4.1. VỀ THỰC VẬT HỌC	106
4.2. VỀ HÓA HỌC.....	107
4.2.1. Kết quả định tính	107
4.2.2. Kết quả phân lập và xác định cấu trúc các chất.....	107
4.3. VỀ TÁC DỤNG SINH HỌC	115
4.3.1. Về sự phù hợp của việc sử dụng mô hình ruồi giấm chuyển gen mang bệnh Alzheimer trong đánh giá tác dụng sinh học của loài Viễn chí ba sừng	115
4.3.2. Về căn cứ lựa chọn mức liều	117
4.3.3. Về kết quả nghiên cứu tác dụng sinh học.....	117

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	121
KẾT LUẬN	121
1. VỀ THỰC VẬT.....	121
2. VỀ HÓA HỌC.....	121
3. VỀ TÁC DỤNG SINH HỌC	122
KIẾN NGHỊ	123
DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN	
TIẾN SĨ ĐƯỢC HỌC	
TÀI LIỆU THAM KHẢO	
PHỤ LỤC	

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, TỪ VIẾT TẮT

Viết tắt	Viết đầy đủ	
	Tiếng Anh	Tiếng Việt
Ac	Acetyl	Acetyl
AD	Alzheimer diseases	Bệnh Alzheimer
AM		<i>n</i> -amyl acetat
Api	β – D-apiofuranose;	β – D-apiofuranose;
Ara	α – L-arabinopyranose	α – L-arabinopyranose
BACE1	beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1 (Beta-secretase 1)	enzyme cắt protein amyloid tiền tố beta 1
BL		Bệnh lí
BuOH	Butanol	Butanol
Bz	Benzoyl	Benzoyl
Cou	<i>p</i> -coumaroyl	<i>p</i> -coumaroyl
Cs		Cộng sự
CTHH		Công thức hóa học
D		Feruloyl
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer	Phổ DEPT
DMSO	Dimethylsulfoxid	Dimethylsulfoxid
DPPH	1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl	1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl
ESI-MS	Electron spray ionization mass spectrometry	Phổ khối lượng ion hóa phun điện tử
EtOAc	Ethyl acetate	Ethyl acetate
EtOH	Ethanol	Ethanol
Fru	Fructofuranosyl	Fructofuranosyl
Gla	β – D-galactopyranose	β – D-galactopyranose
Glc	Glucopyranosyl	Glucopyranosyl
HMBC	Heteronuclear multiple bond correlation	Phổ HMBC
HPLC	High performance liquid chromatography	Sắc ký lỏng hiệu năng cao

HSQC:	Heteronuclear single quantum coherence	Phổ HSQC
LPS	Lipopolysaccharide	Lipopolysaccharid
NMDA	N-methyl-D-aspartat	N-methyl-D-aspartat
MeOH	Methanol	Methanol
NMR	Nuclear magnetic resonance	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân
NO	Nitric oxide	Nitric oxid
OCT		Mùi 1-octanol
PD	Parkinson diseases	Bệnh Parkinson
<i>P.</i>	<i>Polygala</i>	<i>Polygala</i>
Rha	Rhamnopyranosyl	Rhamnopyranosyl
ROS	Reactive oxygen species	Các dạng oxy phản ứng
SD	Standard deviation	Độ lệch chuẩn
SE	Standard error	Sai số chuẩn
Sin	Sinapoyl	Sinapoyl
SL		Sinh lý
TLC	Thin layer chromatography	Sắc ký lớp mỏng
Tmc	3,4,5-trimethoxycinnamoyl	3,4,5-trimethoxycinnamoyl
TMD		Bộ phận trên mặt đất
VCA		Phân đoạn ethyl acetate của rễ cây Viễn chí ba sừng
VCD		Phân đoạn ethyl dichloromethan của rễ cây Viễn chí ba sừng
VCE		Cao chiết cồn tổng của rễ cây Viễn chí ba sừng
VCH		Phân đoạn n-hexan của rễ cây Viễn chí ba sừng
VCN		Căn nước của rễ cây Viễn chí ba sừng
Xyl	β -D-xylopyranose	β -D-xylopyranose

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1. Các saponin đã phân lập được từ các loài thuộc chi <i>Polygala</i>	8
Bảng 1.2. Các xanthon đã phân lập được từ các loài thuộc chi <i>Polygala</i>	13
Bảng 1.3. Các hợp chất oligosaccharid đã phân lập từ các loài thuộc chi <i>Polygala</i>	17
Bảng 1.4. Các hợp chất khác đã được phân lập từ các loài thuộc chi <i>Polygala</i>	19
Bảng 1.5. Cấu trúc một số hợp chất đã phân lập từ Viền chí ba sừng	25
Bảng 3.1. Kết quả định tính các nhóm hợp chất có trong rễ cây Viền chí ba sừng	61
Bảng 3.2. Số liệu NMR của hợp chất VC1 và hợp chất tham khảo	66
Bảng 3.3. Số liệu NMR của hợp chất VC2 và hợp chất tham khảo	69
Bảng 3.4. Số liệu NMR của hợp chất VC3 và hợp chất tham khảo	72
Bảng 3.5. Số liệu NMR của hợp chất VC4 và hợp chất tham khảo	75
Bảng 3.6. Số liệu NMR của hợp chất VC5 và hợp chất tham khảo	77
Bảng 3.7. Số liệu NMR của hợp chất VC6 và hợp chất tham khảo	79
Bảng 3.8. Số liệu NMR của hợp chất VC7 và hợp chất tham khảo	80
Bảng 3.9. Số liệu NMR của hợp chất VC8 và hợp chất tham khảo	82
Bảng 3.10. Số liệu NMR của hợp chất VC9 và hợp chất tham khảo	83
Bảng 3.11. Số liệu NMR của hợp chất VC10 và hợp chất tham khảo	84
Bảng 3.12. Số liệu NMR của hợp chất VC11 và hợp chất tham khảo	86
Bảng 3.13. Số liệu NMR của hợp chất VC12 và hợp chất tham khảo	88
Bảng 3.14. Số liệu NMR của hợp chất VC13 và hợp chất tham khảo	90
Bảng 3.15. Số liệu phổ của hợp chất VC14 và hợp chất tham khảo	92
Bảng 3.16. Số liệu NMR của hợp chất VC15 và hợp chất tham khảo	93
Bảng 3.17. Số liệu NMR của hợp chất VC16 và hợp chất tham khảo	94
Bảng 3.18. Số liệu NMR của hợp chất VC17 và hợp chất tham khảo	96
Bảng 3.19. Vận tốc trung bình của các lô ấu trùng ruồi giấm trong thực nghiệm Crawling assay.....	99

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1. Hình ảnh cây Viền chí ba sừng <i>Polygala karenium</i> Kurz	7
Hình 1.2. Cấu trúc khung của các Polygalasaponin phân lập từ chi <i>Polygala</i>	11
Hình 1.3. Các hợp chất sibiricasaponin.....	12
Hình 1.4. Cấu trúc khung của các onjisaponin phân lập từ chi <i>Polygala</i>	13
Hình 1.5. Cấu trúc khung cơ bản của các xanthon phân lập từ chi <i>Polygala</i>	16
Hình 1.6. Một số xanthon có cấu trúc đặc biệt phân lập được từ chi <i>Polygala</i>	17
Hình 1.7. Chu kỳ vòng đời của ruồi giấm.....	34
Hình 1.8. Vai trò của mô hình ruồi giấm trong nghiên cứu sàng lọc thuốc.....	35
Hình 2.1. Hình ảnh các đặc điểm chủng ruồi giấm Elav-GFP	37
Hình 2.2. Mô hình kiểm tra trí nhớ ngắn hạn của ấu trùng bậc ba ruồi giấm.	50
Hình 3.1. Tiêu bản mẫu Viền chí ba sừng nghiên cứu	56
Hình 3.2. Ảnh chụp các bộ phận của cây Viền chí ba sừng	57
Hình 3.3. Ảnh đặc điểm vi phẫu thân cây Viền chí ba sừng	58
Hình 3.4. Ảnh đặc điểm vi phẫu rễ cây Viền chí ba sừng	59
Hình 3.5. Ảnh đặc điểm vi phẫu của lá cây Viền chí ba sừng	59
Hình 3.6. Các đặc điểm của bột rễ cây Viền chí ba sừng	60
Hình 3.8. Sơ đồ phân lập các chất từ rễ Viền chí ba sừng	64
Hình 3.9. CTHH và tương tác HMBC chính của hợp chất VC1.....	67
Hình 3.12. Phổ HR ESI MS của hợp chất VC1.....	67
Hình 3.13. CTHH của hợp chất VC2 và hợp chất tham khảo VC1	70
Hình 3.14. Tương tác HMBC chính của hợp chất VC2	70
Hình 3.15. Phổ HR ESI MS của hợp chất VC3.....	71
Hình 3.16. Cấu trúc hóa học của hợp chất VC3 và hợp chất tham khảo	73
Hình 3.17. Tương tác HMBC chính của hợp chất VC3	74
Hình 3.18. CTHH và tương tác HMBC chính của hợp chất VC4.....	76
Hình 3.19. CTHH và tương tác HMBC chính của hợp chất VC5.....	78
Hình 3.20. CTHH và tương tác HMBC chính của hợp chất VC6.....	80
Hình 3.21. CTHH và tương tác HMBC chính của hợp chất VC7.....	81
Hình 3.22. CTHH và tương tác HMBC chính của hợp chất VC8.....	82
Hình 3.23. CTHH và tương tác HMBC chính của hợp chất VC9.....	83

Hình 3.24. CTHH và tương tác HMBC chính của hợp chất VC10.....	85
Hình 3.25. Phổ HR ESI MS của hợp chất VC11.....	85
Hình 3.26. CTHH của hợp chất VC11 và hợp chất tham khảo VC7	87
Hình 3.27. Tương tác HMBC chính của hợp chất VC11	87
Hình 3.28. CTHH của hợp chất VC12.	89
Hình 3.29. CTHH của hợp chất VC13	91
Hình 3.30. CTHH của hợp chất VC14	92
Hình 3.31. CTHH của hợp chất VC15	94
Hình 3.32. CTHH của hợp chất VC16	95
Hình 3.33. CTHH của hợp chất VC17	96
Hình 3.34. CTHH của 17 hợp chất đã phân lập được từ rễ của loài <i>Polygala karensium</i> Kurz	98
Hình 3.35. Hình minh họa quãng đường di chuyển của ấu trùng bậc ba ruồi giấm ở các lô thử nghiệm.....	100
Hình 3.36. Tác dụng của Viên chí ba sừng đối với khả năng di chuyển của ấu trùng bậc ba ruồi giấm mang gen bệnh Alzheimer hAPP	100
Hình 3.37. Tác dụng của Viên chí ba sừng đối với hành vi leo trèo của ruồi giấm trưởng thành mang gen bệnh Alzheimer ở 3, 7 và 10 ngày tuổi.....	102
Hình 3.38. Đánh giá khả năng ghi nhớ và học tập của các cao chiết Viên chí ba sừng..	104

ĐẶT VẤN ĐỀ

Việt Nam là quốc gia nằm trong vùng khí hậu nhiệt đới gió mùa nóng ẩm, có nguồn tài nguyên thực vật phong phú và đa dạng. Trong sự phát triển về việc kết hợp y học hiện đại với y học cổ truyền, dưới ánh sáng của tri thức và khoa học công nghệ, rất nhiều cây thuốc được nghiên cứu về thành phần hóa học, để chứng minh cơ chế tác dụng của các hoạt chất có tác dụng, để giải thích cho công dụng của y học cổ truyền, kinh nghiệm dân gian, cũng như cung cấp cơ sở khoa học cho việc hiện đại hóa cây thuốc. Tuy nhiên, vẫn còn rất nhiều cây thuốc chưa được nghiên cứu về thực vật, thành phần hóa học cũng như chưa nghiên cứu đầy đủ về tác dụng sinh học.

Cây Viễn chí ba sừng có tên khoa học là *Polygala karensium* Kurz, thuộc họ Viễn chí (Polygalaceae), là cây thuốc phân bố ở một số quốc gia Châu Á như Việt Nam, Bhutan, Trung Quốc...[1]. Ở nước ta, Viễn chí ba sừng phân bố chủ yếu ở vùng núi có độ cao trên 1000m như Sapa, Tam Đảo...[2],[3].

Viễn chí ba sừng là cây thuốc được sử dụng từ lâu trong y học cổ truyền và theo kinh nghiệm dân gian ở cả Trung Quốc và Việt Nam. Ở Trung Quốc, rễ và vỏ cây Viễn chí ba sừng được sử dụng để làm thuốc bổ tăng cường sinh lực, tăng cường trí nhớ. Người dân tộc vùng Sapa cũng dùng rễ Viễn chí ba sừng chữa các bệnh đau nhức xương khớp, bồi bổ sức khỏe và tăng cường trí nhớ cho người già, người ốm lâu ngày. Mặc dù trên thực tế cây thuốc được sử dụng có tác dụng tốt hỗ trợ chống suy giảm trí nhớ, tuy nhiên cho đến nay còn ít các nghiên cứu về thành phần hóa học và chưa có nghiên cứu tác dụng chống suy giảm trí nhớ của loài *Polygala karensium* Kurz được công bố ở cả Việt Nam và thế giới.

Xuất phát từ thực tế trên, nghiên cứu sinh lựa chọn đề tài “**nghiên cứu đặc điểm thực vật, thành phần hóa học, tác dụng cải thiện trí nhớ trên mô hình ruồi giấm chuyển gen hAPP của loài viễn chí ba sừng (*Polygala karensium* Kurz) thu hái ở Sa Pa, Lào Cai**” nhằm nghiên cứu đặc điểm thực vật, thành phần hóa học và một số tác dụng sinh học của cây Viễn chí ba sừng, từ đó tạo cơ sở khoa học cho việc giải thích công dụng của Viễn chí ba sừng trong y học cổ truyền và định hướng cho việc phát triển thuốc từ dược liệu này trong y học hiện đại.

Đề tài được nghiên cứu với các mục tiêu sau:

1. *Xác định được đặc điểm thực vật và thẩm định tên khoa học.*
2. *Xác định được thành phần hóa học của rễ cây Viễn chí ba sừng*
3. *Đánh giá được tác dụng dược lý về khả năng cải thiện trí nhớ ngắn hạn và hành vi vận động trên ruồi giấm của rễ cây Viễn chí ba sừng.*

Để đạt được mục tiêu trên, luận án tiến hành những nội dung sau:

Nghiên cứu về thực vật

- Thu thập mẫu, mô tả đặc điểm hình thái để thẩm định tên khoa học của cây Viễn chí ba sừng.

- Xác định các đặc điểm vi học của rễ cây Viễn chí ba sừng.

Nghiên cứu về hóa học

- Định tính các nhóm chất hữu cơ có trong rễ cây Viễn chí ba sừng.

- Chiết xuất, phân lập và xác định cấu trúc các chất phân lập được trong rễ cây Viễn chí ba sừng.

Nghiên cứu về tác dụng sinh học

- Đánh giá tác dụng của các phân đoạn cao chiết từ rễ cây Viễn chí ba sừng về cải thiện khả năng di chuyển trên mô hình vận động của ruồi giấm trưởng thành mang gen bệnh Alzheimer hAPP.

- Đánh giá tác dụng của các phân đoạn cao chiết từ rễ cây Viễn chí ba sừng về cải thiện khả năng di chuyển trên mô hình vận động của ấu trùng bậc ba ruồi giấm thành mang gen bệnh Alzheimer hAPP.

- Đánh giá tác dụng của các phân đoạn cao chiết từ rễ cây Viễn chí ba sừng về khả năng cải thiện sự suy giảm trí nhớ ngắn hạn trên mô hình đánh giá trí nhớ ngắn hạn của ấu trùng bậc ba ruồi giấm thành mang gen bệnh Alzheimer hAPP.

CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN

1.1. TỔNG QUAN VỀ THỰC VẬT HỌC CỦA CHI *POLYGALA* VÀ LOÀI *POLYGALA KARENSIUM* KURZ

1.1. Vài nét về thực vật học của chi *Polygala* trên thế giới và Việt Nam

Trên thế giới

Chi Polygala:

Chi *Polygala* (chi Viền chí) thuộc họ Polygalaceae (họ Viền chí) được Carl Linnaeus xác lập từ năm 1753 [4]. *Polygala* là chi lớn nhất trong họ Polygalaceae. Theo hệ thống phân loại của A. Jakhtajan thì họ Polygalaceae nằm trong bộ Đậu (Fabales), phân lớp Hoa hồng (Rosidae), lớp Ngọc lan (Magnoliopsida) hay là lớp Hai lá mầm (Dicotyledone), của ngành Ngọc lan (Magnoliophyta) hay là ngành Thực vật hạt kín (Angiospermae) trong giới Thực vật (Plantae) [4], [5].

Đặc điểm thực vật của chi Polygala

Theo các tài liệu [1], [5] đặc điểm chi *Polygala* được mô tả như sau:

Cây thảo hàng năm hoặc cây bụi, hiếm khi cây leo. Lá đơn, mọc so le, hiếm khi đối nhau hoặc vòng xoắn, có cuống lá; phiến lá mỏng, mép lá nguyên, có lông hoặc không. Chùm hoa tận cùng, mọc trong hoặc ngoài nách lá. Hoa lưỡng tính, đối xứng 2 bên, có 1 - 3 lá bắc, có lá bắc con. Đài 5, không đều, xếp thành 2 vòng; vòng ngoài cùng là 3 lá đài nhỏ, vòng trong là 2 lá đài lớn hình cánh hoa. Tràng 3, hàn liền phần dưới, màu trắng/vàng hoặc tím đỏ, hình thuyền hoặc hình mũ bao quanh lấy các nhị. Nhị 8; chi nhị dính nhau tạo thành bao hình lòng máng, hở phía trên; bao phấn dính gốc, gồm 1 - 2 ô phần, nứt dọc hoặc nứt lỗ. Có hoặc không có đĩa tuyến mật. Bầu 2 ô, mỗi ô mang 1 dây noãn đảo hoặc cong, 1 - 2 núm nhụy. Quả nang, tự mở, thường có cánh. Hạt 2, thường màu đen, hình trứng hoặc hình nêm, có hoặc không có lông, có mống hạt.

Về số loài thuộc chi Polygala trên thế giới:

Hiện chưa có thống kê đầy đủ về số loài thuộc chi *Polygala*. Theo hệ thống Cronquist, họ Polygalaceae được đặt trong một bộ riêng của chính nó với tên gọi Polygalales với ghi nhận số loài thuộc chi thực vật này có khoảng 500 loài [6]. Theo Chen S.k; Ma Haiying; John A. N. Parnell (2008), trong Thực vật chí Trung Quốc, tập 11, thì chi *Polygala* trên thế giới cũng có khoảng 500 loài [1]. Theo Paiva JA ghi nhận có khoảng 725 loài thuộc chi *Polygala* [7]. Trang chuyên khảo về thực vật *The Plant List* công bố có

khoảng 1554 loài được xếp vào chi *Polygala*. Trong đó có 654 loài được chấp nhận tên khoa học, 251 loài có tên đồng danh. Số loài tên chưa được chấp nhận còn nhiều. Như vậy, có thể thấy, chi *Polygala* là một chi thực vật lớn nhất của họ Viền chí (Polygalaceae) với số lượng loài lớn trên thế giới.

Phân bố chi Polygala trên thế giới

Phân bố rộng rãi gần như khắp thế giới, ngoại trừ vùng ven Bắc cực, Nam Cực và New Zealand. [1], [6]. Có khoảng 137 loài *Polygala* ở Mexico, Trung Mỹ và Bắc Ấn Độ. Ở Châu Á, phân bố các loài *Polygala* cũng đa dạng và không đều giữa các quốc gia, có nước có nhiều loài như Trung Quốc có khoảng 44 loài, với 21 loài đặc hữu; có nước chỉ có 6 loài như Đài Loan [1],[9],[10],[11],[12].

Ở Việt Nam

Ở Việt Nam, người đầu tiên nghiên cứu phân loại họ Viền chí – Polygalaceae là nhà thực vật học người Pháp F. Gagnepain. Trong Fascicule 3 thuộc Flore Générale de L’Indo – Chine [13], theo Jame Premier chi *Polygala* ở toàn Đông Dương có 10 loài, trong đó ở Việt Nam ghi nhận 8 loài và thứ sau:

Polygala cardiocarpa Kurz: Biên Hoà.

P. tonkinensis Chodat: Ba Vì, Ninh Bình.

P. japonica Houtt: Ninh Bình.

P. brachystachya DC: Ninh Bình.

P. glometara Lour: Bắc Bộ, Nam Bộ.

P. chinensis L.: Nam Bộ.

P. ciliata Wight. var. *laotica* Gagnep: Bắc Bộ.

P. aurata Gagnep. var. *macrostachya* Gagnep: Ninh Bình.

Như vậy, trong công bố [13] của Gagnepain F., khi đó chưa ghi nhận được loài *Polygala karensium* Kurz hay *Polygala tricornis* Gagnep.

Người thứ hai nghiên cứu thực vật họ Polygalaceae là Phạm Hoàng Hộ. Năm 2000, trong quyển II bộ “Cây cỏ Việt Nam”, ông mô tả tóm tắt ở Việt Nam có 26 loài thuộc chi *Polygala*. Lưu ý rằng, ngoài 8 loài do Gagnepain F. công bố trước đây, Phạm Hoàng Hộ đã bổ sung 18 loài nữa; trong đó có loài Kịch nữ trắng (*Polygala karensium* Kurz) có hoa màu trắng, phân bố ở vùng cao 1500m ở tỉnh Phú Khánh cũ, và loài Kịch nữ ba sừng (*Polygala tricornis* Gagnep.) có hoa hồng hay trắng, phân bố ở vùng núi cao Sapa, Lào Cai, Tam Đảo, Vĩnh Phú, Đà Lạt, Lâm Đồng [2].

Đến năm 2003, khi tổng hợp và rà soát lại các loài, để biên soạn “Danh mục các loài thực vật Việt Nam” tập 2, đối với họ Polygalaceae, Nguyễn Tiến Bản đã liệt kê ở Việt Nam thuộc chi *Polygala* có 24 loài và 4 thứ. Tương tự như Phạm Hoàng Hộ (2000), Nguyễn Tiến Bản vẫn ghi nhận *Polygala karensium* Kurz và *Polygala tricornis* Gagnep là 2 loài độc lập khác nhau [3].

Như vậy xét về mặt thời gian, sau năm 2008, theo quan điểm hầu hết các nhà thực vật trên thế giới đều cho rằng loài Kịch nhũ ba sừng (*Polygala tricornis* Gagnep.) do F. Gagnepain xác định vào năm 1909 chỉ là đồng danh của loài Kịch nhũ trắng (*Polygala karensium* Kurz). Hai công trình về chi *Polygala*/ họ Polygalaceae của Phạm Hoàng Hộ (2000) [2] và của Nguyễn Tiến Bản (2003) [3] với quan điểm cho rằng 2 loài *Polygala karensium* Kurz và *Polygala tricornis* Gagnep. là 2 loài độc lập khác nhau đều xuất bản trước “Flora of China”, Vol. 11 (có họ Polygalaceae) được xuất bản năm 2008 [1]. Lưu ý rằng, tập thể tác giả biên soạn họ Polygalaceae trong Thực vật chí Trung Quốc, tập 11 bao gồm các nhà khoa học Trung Quốc và Mỹ. Do biên soạn sau, các tác giả này đã thu thập được các thông tin mới, nên ghi nhận loài *Polygala karensium* Kurz có một số đồng danh, trong đó có loài *Polygala tricornis* Gagnep.

Phân bố của các loài thuộc chi Polygala ở Việt Nam

Tra cứu các tài liệu, Đỗ Tất Lợi [8] mô tả có 7 loài *Polygala* ở Việt Nam, Võ Văn Chi [14] mô tả có 13 loài *Polygala* và Phạm Hoàng Hộ [2] mô tả có 25 loài *Polygala* ở Việt Nam. Các tài liệu trên cho rằng, các loài *Polygala* phân bố ở nhiều vùng trải khắp đất nước từ miền Trung, vùng Tây Nguyên và miền Bắc Việt Nam. Trong đó hai khu vực Sa Pa, Lào Cai và Lâm Đồng với điều kiện riêng biệt về khí hậu được ghi nhận có sự tồn tại nhiều loài *Polygala* nhất. Khu vực Sa Pa, Lào Cai ghi nhận sự tồn tại của 5 loài *P. arillata*, *P. aureocauda*, *P. saxicota*, *P. mariesii* và loài *P. tatarinowii*. Khu vực Lâm Đồng ghi nhận sự tồn tại của 7 loài là *P. paniculata*, *P. persicariaefolia*, *P. sibirica*, *P. erioptera*, *P. chinensis*, *P. arvensis* và *P. karensium*. Phân bố của các loài thuộc chi *Polygala* ở Việt Nam được các tài liệu [2], [3], [8], [14] ghi nhận cụ thể như sau:

Loài *P. arvensis* phân bố ở các tỉnh Kon Tum, Lâm Đồng, Bình Thuận.

Loài *P. ciliata* phân bố ở Đồng Nai.

Loài *P. chinensis* phân bố ở vùng Ngọc Linh, Lâm Đồng (các huyện Lang Biang, Đơn Dương, Bảo Lộc).

Loài *P. crotalarioides* phân bố ở vùng rừng ở nhiều địa phương.

Loài *P. erioptera* phân bố ở các vùng Thừa Thiên Huế, Ninh Thuận, Lâm Đồng.

Loài *P. mariesii* phân bố ở Vĩnh Phúc (Tam Đảo), Lào Cai (Sa Pa).

Loài *P. paniculata* phân bố ở Lâm Đồng (Bảo Lộc, Di Linh, Lạc Dương, Đà Lạt).

Loài *P. persicariaefolia* phân bố ở các tỉnh Lâm Đồng, Kon Tum, Ninh Thuận.

Loài *P. sibirica* phân bố ở các tỉnh Thái Nguyên, Ninh Bình, Thanh Hóa, Lâm Đồng (Đà Lạt, Bảo Lộc).

1.2. Vài nét về thực vật học loài *Polygala karensium* Kurz

Loài *Polygala karensium* Kurz có tên gọi Việt Nam là Viễn chí ba sừng, kích nhũ ba sừng, kích nhũ trắng hay giả ba kích. Trong số các loài đã biết thuộc chi *Polygala*, họ Polygalaceae thì *Polygala karensium* sớm được xác định và công bố bởi nhà thực vật học người Áo – Kurz Wilhelm Sulpiz trên *Journal of the Asiatic Society of Bengal*, part 2, Nat. Hist. 41(4):292, năm 1872 [15]. Loài Viễn chí *P. karensium* Kurz này cũng được đề cập trong *Flora of Thailand*, Vol. 7 (3), năm 2001, với 1 đồng danh là *Polygala tricornis* Gagnep[16]. Năm 2008, khi xuất bản *Flora of China*, Vol. 11 bằng tiếng Anh ở Trung Quốc và Mỹ, Chen S.K và Cs(2008) có khẳng định, loài *Polygala karensium* Kurz ở Trung Quốc có thêm một thứ nữa là *Polygala karensium* Kurz var. *obcordata* [1].

Như vậy, để tương đồng về bậc phân loại, loài gốc (*Polygala karensium* Kurz) người ta có thể viết là *Polygala karensium* Kurz var. *karensium* [1]. Cũng trong tài liệu này các tác giả ghi kèm theo nhiều đồng danh của loài Viễn chí (*Polygala karensium* Kurz). Đó là:

P. congesta Reder et E. H. Wilson.

P. floribunda Dunn.

P. lancilimba Merrill.

P. tricornis Gagnep.

Về phân loại, loài này thuộc chi *Polygala* L., họ Viễn chí (Polygalaceae), bộ Đậu (Fabales), phân lớp Hoa hồng (Rosidae), lớp Ngọc lan/lớp Hai lá mầm (Magnoliopsida/Dicotyledones), ngành Ngọc lan/ngành Hạt kín (Magnoliophyta/Angiospermae), giới Thực vật (Phylla) [1], [5].

Đặc điểm thực vật của loài *Polygala karensium* Kurz

Tài liệu [14] mô tả cây Viễn chí ba sừng *Polygala karensium* Kurz: cây nhỏ cao đến 1m, nhánh non không lông. Lá có phiến thon, dài 10cm hay hơn, không lông, cuống có lông cứng. Chùm hoa ngắn; hoa trắng hay hồng hồng, cao 15-18mm; lá dài nhỏ, màu hồng,

xoan; mỏng 2-3 tua; nhị 8; bầu không lông. Quả nang đẹp, tròn, cao 5,5mm, có cánh; hạt
2. Ra hoa về mùa xuân đến mùa hè.



Hình 1.1. Hình ảnh cây Viễn chí ba sừng *Polygala karenium* Kurz
(ảnh chụp tại Sa Pa, 2015)

Trang chuyên khảo về thực vật e.floras và tài liệu [1] mô tả cụ thể cây như sau: Viễn chí ba sừng còn được gọi là “mi hua yuan zhi” (密花远志, phiên âm : mi hua yuan zhi, âm Hán Việt: mật hoa viễn chí), cây bụi cao 0,5-2 m. Cành non mỏng, có lông tơ, sau nhẵn. Cuống lá dài 2-2,5 cm, nhẵn hoặc có lông cứng ngắn; phiến lá màu xanh lá, dạng mác hoặc dạng mác hơi elip, hiếm khi hình elip, kích thước 7-12 (-18) × 1,5-4 (-6) cm, có màng hoặc mỏng như giấy, xa trục nhẵn, gần trục có lông cứng ngắn, gân chính hướng về trục, gân bên gồm 6 hoặc 7 cặp nối nhau gần mép lá, gân nhỏ không rõ ràng, góc lá nhọn, hiếm khi tròn, mép lá nguyên, đôi khi hơi gợn sóng, đỉnh lá nhọn.

Chùm hoa mọc đầu hoặc nách, 4-5 cm, 10 cm khi có quả, có lông tơ, sau nhẵn; lá bắc con hình tam giác khoảng 5 mm. Hoa dày, lớn, 2-2,5 cm. Đài hoa 5 cánh, không đều, dễ rụng khi nở hoa; 3 cánh ngoài nhỏ, cánh cao hơn cụp vào trong, kích thước khoảng 4 mm, đỉnh tù; 2 cánh trong có hình cánh hoa giống hình trứng ngược, kích thước khoảng 16-19 x 5 mm, góc nhọn, đỉnh tròn. Tràng hoa 3 cánh, dính dưới $\frac{3}{4}$, màu trắng pha hồng tím, trong suốt. Cánh bên thuôn, 2-2,5 cm, đỉnh cụt hoặc tròn, cánh thìa dạng mũ trùm, đỉnh có phần phụ 2 bó hoặc 2-3 thùy. Nhị 8, chỉ nhị dài 2-2.2 cm, dính dưới $\frac{3}{4}$; bao phấn dạng trứng. Đế hoa hình khuyên. Bầu nhụy dạng trứng, đường kính khoảng 2 mm; vòi nhụy dài 1,7-1,8 cm, từ gốc đến đỉnh mở rộng dần và cong; núm nhụy hình môi. Quả nang hình tứ giác đến hình thoi hoặc hình tim ngược, đường kính 8-9 mm, góc có đế và vết của bao hoa, đỉnh rộng, có mấu nhọn, cạnh rộng 1,5-2 mm và nổi gờ. Hạt đen, hình trứng, đường kính khoảng 1,5 mm, có nốt rỗ và lông tơ; mỏng hạt thường không có thùy, có cánh, trong mờ và nhô ra ở đỉnh.

Mùa hoa: tháng 12 - 4. Mùa quả: tháng 3 - 7.

Phân bố của loài *Polygala karensium* Kurz

Theo các tài liệu quốc tế, loài *Polygala karensium* Kurz được tìm thấy ở một số quốc gia Châu Á như Bhutan, Myanmar, Thái Lan, Việt Nam, Trung Quốc... Ở Trung Quốc, Viễn chí ba sừng phân bố trên các rừng mở hoặc rừng cây bụi trên sườn núi, đất rừng ẩm ướt, sườn dốc trên đồi; độ cao 1000 – 2500m ở Quảng Tây, Tây Tạng, Vân Nam [1], [5].

Do các tác tài liệu trong nước trước năm 2008 [2],[3],[8],[14] vẫn phân tách *P.karensium* và *P.tricornis* là 2 loài riêng biệt, nên tra cứu về phân bố của loài *Polygala karensium* Kurz theo các tài liệu này phải bao gồm sự phân bố của loài *Polygala karensium* Kurz và loài *Polygala tricornis* Gagnep. Theo nguyên tắc tra cứu này, các điểm phân bố của Viễn chí ba sừng bao gồm Lào Cai (Sapa), Vĩnh Phúc (Tam Đảo), Lâm Đồng (Đà Lạt), Lai Châu, Lạng Sơn.

1.2. TỔNG QUAN VỀ THÀNH PHẦN HÓA HỌC CHI POLYGALA VÀ LOÀI POLYGALA KARENSIUM KURZ

1.2.1. Thành phần hóa học chi *Polygala*

Thành phần hóa học các loài thuộc chi *Polygala* gồm nhiều hợp chất, thuộc nhiều nhóm hóa học, trong đó xanthon, saponin, oligosaccharid là 3 nhóm có nhiều hợp chất nhất. Ngoài ra còn một số hợp chất thuộc các nhóm khác [17].

1.2.1.1. Thành phần saponin

Saponin là thành phần chuyển hóa thứ cấp xuất hiện nhiều trong các loài thuộc chi *Polygala*. Các saponin đã phân lập và xác định cấu trúc từ các loài thuộc chi *Polygala* có phần aglycon chủ yếu thuộc khung olean.

Đã có khoảng 123 hợp chất saponin được phân lập từ chi *Polygala*. Tên của các saponin đã phân lập được trình bày theo bảng 1.1.

*Bảng 1.1. Các saponin đã phân lập được từ các loài thuộc chi *Polygala**

TT	Tên hợp chất	Loài	Bộ phận	Tài liệu
1.	Polygalasaponin I-XIX (1-19)	<i>P. japonica</i>	TMĐ	[18],[19]
2.	Polygalasaponins XX-XXVII (20-27)	<i>P. japonica</i>	Rễ, TMĐ	[20]
3.	Polygalasaponin XXVIII –XXXII (28-32)	<i>P. japonica</i> <i>P.tenuifolia</i> <i>P. amarelle</i>	Rễ Rễ Mô sẹo	[21] [22] [46]
5.	Polysalasaponin XXXIII-XLI (33-41)	<i>P. fallax</i> <i>P.tenuifolia</i>	Rễ Rễ	[23], [62]
6.	Polysalasaponin XLII-XLVI (42-46)	<i>P. glomerata</i>	Rễ	[24]

7.	Polygalasaponin XLVII-LIII (47-53)	<i>P. japonica</i>	Toàn cây	[25]
8.	Polygalasaponin D, E (54-55)	<i>P. japonica</i>	TMD	[27]
9.	Polygalasaponin F (56)	<i>P. japonica</i>	Toàn cây	[28]
	Polygalasaponin G, H, V (57-58)	<i>P. japonica</i>	Toàn cây	[29]
10.	Reinosid A -F (59-63)	<i>P. reinii</i>	Rễ	[30]
11.	Onjisaponin A-G (64- 68)	<i>P. tenuifolia</i>	Rễ	[31],[32]
12.	Onjisaponin V-Z(69-73) , Vg(74)	<i>P. tenuifolia</i>	Rễ	[33]
13.	E-onjisaponin H (75)	<i>P. tenuifolia</i>	Rễ	[34]
14.	Z-onjisaponin H (76)	<i>P. tenuifolia</i>	Rễ	[34]
15.	Senegin II (77)	<i>P. glomerata</i>	Rễ	[24]
16.	Z-segenin II, III, IV (78-80)	<i>P.sibirica</i> <i>P. senega</i>	Rễ Rễ	[35], [36]
17.	Arilloside A-F (81-86)	<i>P. arillata</i> <i>P. aureocauda</i>	Vỏ thân Rễ	[37], [38]
18.	E-Senegasaponin A (87)	<i>P. senega</i>	Rễ	[36],[39]
19.	Z-Senegasaponin A (88)	<i>P. senega</i>	Rễ	[36],[39]
20.	E-Senegasaponin B (89)	<i>P. senega</i>	Rễ	[36],[39]
21.	Z-Senegasaponin B (90)	<i>P. senega</i>	Rễ	[36],[39]]
22.	E-Senesasaponin C (91)	<i>P. senega</i>	Rễ	[36],[39]
23.	Z-Senegasaponin C (92)	<i>P. senega</i>	Rễ	[36],[39]
24.	3-O-β-D-glucopyranosyl medicagenic acid 28-O-[β-D-xylopyranosyl(1 →4)-[β- D-apiofuranosyl(1 →3)-α-L-rhamnopyranosyl (1 → 2)-β-D-glucopyranosyl] este (93)	<i>P. japonica</i>	Toàn cây	[40]
25.	3-O-β-D-glucopyranosyl-2-oxoolean-12-ene-23,28-dioic acid 28-O-[β-D-xylopyranosyl(1 →4)-[β-D-apiofuranosyl(1 →3)-α-L-rhamnopyranosyl (1→2)-β-D-glucopyranosyl] este (94)	<i>P. japonica</i>	Toàn cây	[40]
26.	3-O-β-D-glucopyranosyl bayogenin 28-O-{β-D-xylopyranosyl(1 →4)-α-L-rhamnopyranosyl (1 →2)-β-D-glucopyranosyl] este (95)	<i>P. japonica</i>	Toàn cây	[40]
27.	Bayogenin 3-O-β-D-glucopyranosid (96)	<i>P. japonica</i>	Toàn cây	[40]
28.	3-O-β-D-glucopyranosyl medicagenic acid 28-O-{α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-[β-D-apiofuranosyl-(1→3)]-[4-O-acetyl]}-β-D-fucopyranosyl este (97)	<i>P. flavescens</i>	TMD	[41]

29.	3- <i>O</i> - β -D-glucopyranosyl preseneenin 28- <i>O</i> -{ β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)]-[4- <i>O</i> -acetyl]}- β -D-fucopyranosyl este (98)	<i>P. flavescens</i>	TMĐ	[41]
30.	28- <i>O</i> -{ β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)]}- β -D-fucopyranosyl este (99)	<i>P. flavescens</i>	TMĐ	[41]
31.	Tenuifoside A (100)	<i>P. tenuifolia</i>	Rễ	[42]
32.	3- <i>O</i> - β -D-glucopyranosyl preseneenin 28- <i>O</i> - α -L-arabinopyranosyl(1 \rightarrow 3)- β -D-xylopyranosyl(1 \rightarrow 4)-[β -D-apiofuranosyl(1 \rightarrow 3)]- α -L-rhamnopyranosyl(1 \rightarrow 2)-[α -L-rhamnopyranosyl(1 \rightarrow 3)]- β -D-fucopyranosyl este (101)	<i>P. tenuifolia</i>	Rễ	[42]
33.	Tenuifolin (102)	<i>P. tenuifolia</i> <i>P. senega</i>	Rễ Rễ	[43], [44]
34.	Sibiricasaponin A-E (103-107)	<i>P. sibirica</i>	TMĐ	[45]
35.	Polygalasaponin A, B (108-109)	<i>P. japonica</i>	Toàn cây	[29]
36.	Onjisaponin T, R, O, S, Pg, Gg, Fg, Og, Ng, J, L, Sg, Ug, Tg, Wg (110-123)	<i>P. tenuifolia</i>	Rễ	[33],[62]

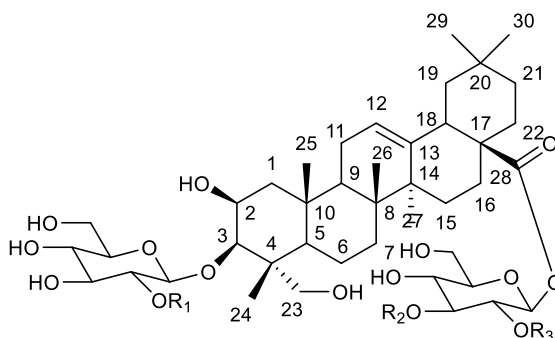
Như vậy, cho đến nay có 123 hợp chất saponin (**1-123**) đã được phân lập từ các loài thuộc chi *Polygala*. Chỉ có 4 hợp chất có phần genin dạng khung ursan (**103-106**), tức là cấu tạo khung gồm 30 carbon cấu tạo bởi 6 nhóm hemiterpen, có sự xuất hiện 1 nhóm thế vị trí C-20, và 1 nhóm thế ở vị trí C-19. Còn lại 119 hợp chất saponin có phần genin dạng khung olean, tức là 30 carbon cấu tạo bởi 6 nhóm hemiterpen với 2 nhóm thế đều gắn vào vị trí C-30, tuy nhiên có 20 hợp chất, gồm các Polygalasaponin I-XIX (**1-19**), và chất (**108**), vị trí C-20 chỉ có 1 nhóm thế. Nhiều hợp chất vị trí C-27 không phải nhóm methyl như thường gặp mà là nhóm CH₂OH hay CH₃O (các hợp chất **42-46,66-68,77,80- 92,102**)..

Ngoài ra, còn nhiều nghiên cứu về phân lập các hợp chất saponin từ các loài thuộc chi *Polygala*.

Hai loài thuộc chi *Polygala* phân lập được nhiều saponin nhất là loài *P. tenuifolia* và loài *P. japonica*, chưa thấy có nghiên cứu nào công bố phân lập được hợp chất saponin từ loài *P. karenium*.

Các saponin phân lập được từ chi *Polygala* có nhiều cấu trúc, trong đó có một số hợp chất saponin có cấu trúc khung giống nhau được gọi tên với phần bắt đầu giống nhau, như một số nhóm saponin dưới đây.

Các Polygalasaponin: đây là nhóm saponin cùng tên gọi tiếp đầu ngữ với số lượng nhiều nhất được phân lập từ các loài thuộc chi *Polygala*. Năm 1995, Zhang và Cs [18],[19] phân lập được 19 chất saponin khung olean từ rễ của loài *P. japonica* các hợp chất có cùng cấu trúc khung, chỉ khác về nhóm thế ở các vị trí R1-R6, với các nhóm thế này đều trên các phần đường glic nối với phần aglycon qua các cầu nối O ở vị trí C-3 và C-28, được ký hiệu Polygalasaponin I-XIX. Sau đó từ rễ của loài thuộc chi *Polygala* như *P. japonica*, *P. fallax*, *P. tenuifolia*, *P. glomerata*,..., các nhà khoa học đã phân lập được các chất có cấu trúc khung tương tự, chỉ khác về các nhóm thế đều gọi là Polygalasaponin. Cho đến nay từ các loài thuộc chi *Polygala* đã phân lập được 50 chất Polygalasaponin được đặt tên phân biệt theo chữ cái La Mã, gọi là các Polygalasaponin I- L (1-50). Đây đều là các chất có cấu trúc khung dạng olenan, chỉ khác nhau nhóm thế ở vị trí 3,4,27 và 28. Các Polygalasaponin sau này phân lập được tên theo chữ cái Latinh, gồm các Polygalasaponin E-H, G, J, V. Hợp chất tenuifolin (102), được tìm thấy trong *P. tenuifolia*, *P. senega*, có cấu trúc khung tương tự cũng được coi là một Polygalasaponin.

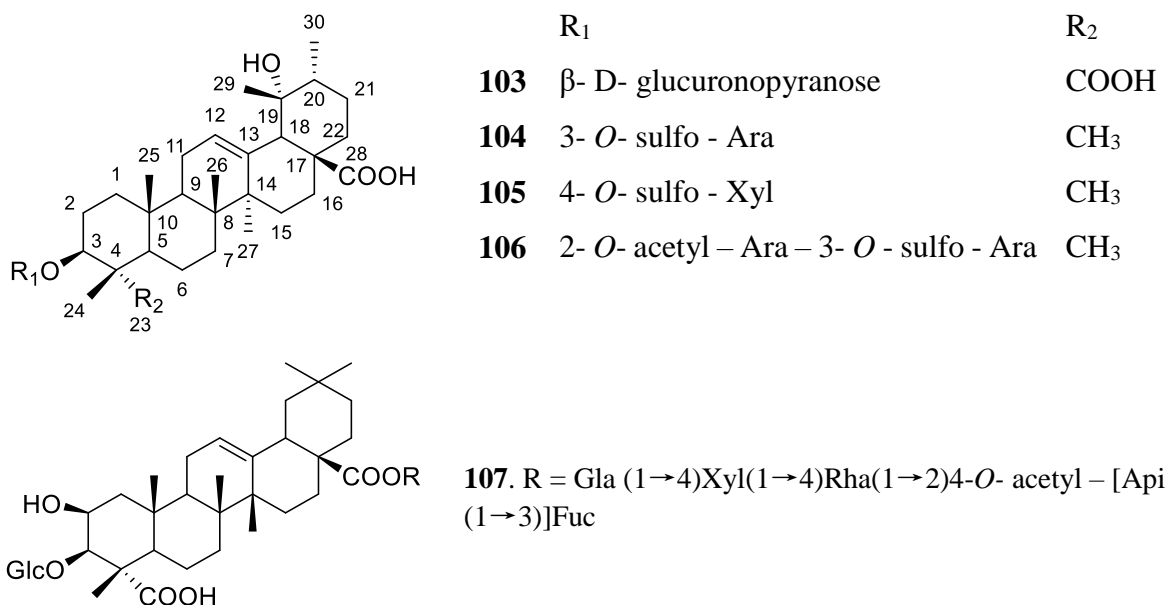


Hình 1.2. Cấu trúc khung của các Polygalasaponin phân lập từ chi *Polygala*

Các hợp chất *reinosid* A-F (59-63) được Miyase và Cs phân lập được từ rễ của loài *P. reinii*, đây là 6 saponin có khung olean tương tự với khung của các Polygalasaponin [30]. Các hợp chất senegasaponin (87-92) được Yoshikama M và Cs phân lập từ rễ của loài *P. senega* ở Nhật Bản và các hợp chất Z-segenin II, III, IV (78-80) được phân lập từ các loài

P. glomerata và *P. senega* có cấu trúc khung tương tự, đều có nhóm 4''-methoxycinamoyl và 3'',4''-dimethoxycinamoyl [36],[39].

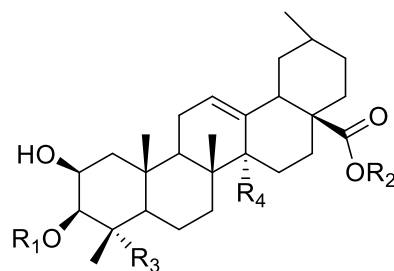
Năm hợp chất *sibiricasaponin* được Song và Cs [45] phân lập từ phần trên mặt của loài *P. sibirica*, trong đó các sibiricasaponin A, B, C, D (**103-106**) là 4 hợp chất saponin phân lập được từ chi *Polygala* có phần genin khung ursan. Hợp chất sibiricasaponin E (**107**), có phần genin dạng khung olenan, tuy nhiên lại khác biệt khi nhóm CH₃ ở vị trí C-27 có cấu hình β , so với các hợp chất thông thường có cấu hình α .



Hình 1.3. Các hợp chất sibiricasaponin

Chú thích: Ara: α – L-arabinopyranose; Api: β – D-apiofuranose; Fuc: β – D-fucopyranose; Gla: β – D-galactopyranose; Xyl: β -D-xylopyranose;

Trong tiếng Nhật Bản từ “onji” là tên dân gian thường gọi của loài *P. tenuifolia*, do đó một số hợp chất saponin có tên gọi bắt đầu bằng *onjisaponin*. Những năm đầu thập niên 80, Sakuma và Shoji [31], [32] phân lập được 5 triterpenoid saponin từ rễ của *P. tenuifolia*, gọi là onjisaponin A, B, và E-G (**64-70**). Năm 2006, Li và Cs [34] công bố phân lập được 6 triterpenoid saponin, ký hiệu onjisaponin V-W, Vg (**71-76**). Ngoài ra, các tác giả còn phân lập được acylated presenegenin glycosid mới, gồm (E)- và (Z)-onjisaponin H (**77-78**). Cho tới nay, đã có 29 chất onjisaponin được phân lập được chi *Polygala* gồm: Onjisaponin (A, B, E, F, G, V, W, X, Vg, Y, Z, T, R, O, S, Pg, Gg, Fg, Og, Ng, J,L, Sg, Ug, Tg, Vg,Wg), E-onjisaponin H và Z-Onjisaponin H.



Hình 1.4. Cấu trúc khung của các onjisaponin phân lập từ chi *Polygala*

1.2.1.2. Thành phần xanthon

Các xanthon là thành phần chuyển hóa thứ cấp được phân lập nhiều trong các loài thuộc chi *Polygala*. Thống kê tài liệu đã tra cứu cho thấy có 94 hợp chất xanthon được phân lập từ nhiều loài thuộc chi *Polygala* như *P. tenuifolia*, *P. japonica*, *P. arillata*, *P. tricornis*, *P. vulgaris*, *P. glomerata*, *P. caudata*... Phần lớn các xanthon ở chi *Polygala* được tiến hành phân lập từ bộ phận vỏ rễ, rễ, vỏ thân, thân. Các xanthon đã phân lập tồn tại dưới dạng tự do và dạng kết hợp. Về cấu trúc, đa số các xanthon tồn tại dưới dạng khung cơ bản.

Các xanthon phân lập được từ chi *Polygala* được liệt kê theo bảng 1.2., cấu trúc hóa học được trình bày theo phụ lục 2.2.

Bảng 1.2. Các xanthon đã phân lập được từ các loài thuộc chi *Polygala*

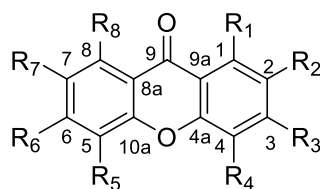
TT	Tên hợp chất	Loài	Bộ phận	Tài liệu
1.	1,3,7-trihydroxy-2,6-dimethoxyxanthon (124)	<i>P. alpestris</i>	Toàn cây	[47]
2.	1,3-dihydroxy-7-methoxyxanthon (125)	<i>P. alpestris</i> <i>P. cyparissias</i>	Toàn cây TMĐ	[47], [48]
3.	1,7-dihydroxy-2,3-dimethoxyxanthon (126)	<i>P. alpestris</i> <i>P. cyparissias</i>	Toàn cây Toàn cây	[47], [48]
4.	1,7-dihydroxy-3,4-dimethoxyxanthon (127)	<i>P. alpestris</i> <i>P. japonica</i>	Toàn cây TMĐ	[47], [49]
5.	2,3-methylendioxy-4,7-dihydroxyxanthon (128)	<i>P. alpestris</i>	Toàn cây	[47]
6.	1,7-dihydroxy-4-methoxyxanthon (129)	<i>P. nyikensis</i> <i>P. karensium</i>	Rễ Rễ	[50], [51]
7.	1,3-dihydroxyxanthon (130)	<i>P. karensium</i>	Rễ	[51]
8.	1,7-dimethoxyxanthon (131)	<i>P. wattersii</i> <i>P. arillata</i> <i>P. tenuifolia</i>	Rễ Rễ Rễ	[52] [53] [54]
9.	3-hydroxy-1,2-dimethoxyxanthon (132)	<i>P. arillata</i>	Rễ	[53],[55]
10.	1,6,7-trihydroxy-2,3-dimethoxyxanthon (133)	<i>P. wattersii</i>	Rễ	[52]

11.	1-hydroxy-2,3-dimethoxyxanthon (134)	<i>P. arillala</i>	Thân và rễ	[56]
12.	1,2,3-trimethoxyxanthon (135)	<i>P. arillala</i>	Thân và rễ	[56]
13.	1-hydroxy-2,3-methylendioxyxanthon (136)	<i>P. arillala</i>	Thân và rễ	[56]
14.	1,3,4-trimethoxyxanthon (137)	<i>P. arillala</i>	Thân và rễ	[56]
15.	Arillanin D (138)	<i>P. tricornis</i> <i>P. arillala</i>	Rễ Toàn cây	[57] [58]
16.	Arillanin E (139)	<i>P. arillala</i>	Toàn cây	[58]
17.	Polycaudosid A (140)	<i>P. caudata</i>	Rễ	[59]
18.	2'-benzoylmangiferin (141)	<i>P. caudata</i>	Rễ	[59]
19.	7-hydroxy-1-methoxyxanthon (142)	<i>P. caudata</i>	Rễ	[59]
20.	1,2,8-trihydroxyxanthon (143)	<i>P. caudata</i>	Rễ	[59]
21.	Wubangzsid A,B (144,145)	<i>P. caudata</i>	Rễ	[59],[60]
22.	Wubangzsid C (146)	<i>P. caudata</i>	Rễ	[61]
23.	Neolancerin (147)	<i>P. caudata</i>	Rễ	[59]
24.	2-hydroxy-1,6,7-trimethoxyxanthon (148)	<i>P. caudata</i>	Rễ	[59]
25.	1,4-dimethoxy-2,3-(methylendioxy)xanthon (149)	<i>P. caudata</i>	Rễ	[59]
26.	7-hydroxy-1,2-dimethoxyxanthon (150)	<i>P. caudata</i>	Rễ	[59]
27.	2,7-dihydroxy-1-methoxyxanthon (151)	<i>P. caudata</i>	Rễ	[59]
28.	Arillanin A (152)	<i>P. tenuifolia</i> <i>P. arillata</i>	Rễ	[62], [58]
29.	1,7-dihydroxyxanthon (Euxanthon) (153)	<i>P. caudata</i> <i>P. karensium</i> <i>P. telephioides</i> <i>P. tenuifolia</i>	Rễ Rễ Vỏ thân Rễ	[63], [51], [64], [54]
30.	1-methoxy-2,3-(methylendioxy)xanthon (154),	<i>P. wattersii</i> <i>P. karensium</i> <i>P. caudata</i>	Rễ Rễ Rễ	[52], [51], [63]
31.	1,6,8-trihydroxy-7-methoxy-2,3-(methylendioxy)xanthon (155)	<i>P. crotalarioides</i>	Rễ	[65]
32.	1,6-dihydroxy-7,8-dimethoxy-2,3-(methylendioxy)xanthon (156)	<i>P. crotalarioides</i>	Rễ	[65]
33.	1,7-dihydroxy-2,3-(methylendioxy)xanthon (157)	<i>P. cyparissias</i>	Toàn cây	[48]
34.	1,3,6,8-tetrahydroxy-2,7-dimethoxyxanthon (158)	<i>P. cyparissias</i>	Toàn cây	[48]
35.	1,3,7-trihydroxy-2-methoxyxanthon (159)	<i>P. cyparissias</i>	Toàn cây	[48]
36.	1,3,6-trihydroxy-2,7-dimethoxyxanthon (160)	<i>P. cyparissias</i>	Toàn cây	[48]

37.	1,3-dihydroxy-2-methoxyxanthon (161)	<i>P. wattersii</i> <i>P. caudata</i>	Rễ Rễ	[52] [63]
38.	Glomexanthon A-C (162-164)	<i>P. glomerata</i>	Toàn cây	[66]
39.	Polyhongkongenosid A, B (165,166)	<i>P. hongkongensis</i>	Toàn cây	[67]
40.	Mangiferin (167)	<i>P. hongkongensis</i>	Toàn cây	[67]
41.	Guazijinxanthon (168)	<i>P. japonica</i>	TMD	[49]
42.	1,3-dihydroxy-2,5,6,7-tetramethoxyxanthon (169)	<i>P. japonica</i>	Rễ	[68]
43.	3-hydroxy-1,2,5,6,7-pentamethoxyxanthon (170)	<i>P. japonica</i>	Rễ	[68]
44.	3,6-dihydroxy-1,2,7-trimethoxyxanthon (171)	<i>P. japonica</i>	Rễ	[69]
45.	3,7-dihydroxy-1,2-dimethoxyxanthon (172)	<i>P. japonica</i>	Rễ	[69]
46.	1,2,7-trihydroxy-3-methoxyxanthon (173)	<i>P. japonica</i>	Rễ	[69]
47.	4-methoxy-2,3-methylendioxyxanthon (174)	<i>P. karensium</i>	Rễ	[51]
48.	1,2-dimethoxy-4-hydroxyxanthon (175)	<i>P. karensium</i>	Rễ	[51]
49.	1,2,3,5-tetrahydroxyxanthon (176)	<i>P. karensium</i>	Rễ	[51]
50.	3,8-dihydroxy-1,2,6-trimethoxyxanthon (177)	<i>P. japonica</i>	Rễ	[68]
51.	Tricornosid B-F (178-182)	<i>P. karensium</i>	Rễ	[57]
52.	1-hydroxy-2, 3, 5-trimethoxyxanthon (183)	<i>P. paniculata</i>	Toàn cây	[70]
53.	1 -hydroxy-5-methoxy-2,3-(methylendioxy)xanthon (184)	<i>P. paniculata</i>	Toàn cây	[70]
54.	1,5-dihydroxy-2,3-dimethoxyxanthon (185)	<i>P. paniculata</i>	Toàn cây	[70]
55.	1-hydroxy-2,3,5-trimethoxyxanthon (186)	<i>P. paniculata</i>	Toàn cây	[70]
56.	1,7-dihydroxy-2,3,4-trimethoxyxanthon (187)	<i>P. virgata</i>	Rễ	[71]
57.	3-hydroxy-1,2,6,7,8-pentamethoxy xanthon (188)	<i>P. sibirica</i>	Toàn cây	[72]
58.	6-hydroxy-1,7-dimethoxyxanthon (189)	<i>P. tenuifolia</i>	Rễ	[54]
59.	Polygalaxanthon III-XI (190-198)	<i>P. tenuifolia</i> <i>P. sibirica</i> <i>P. alpestris</i> <i>P. cyparissias</i> <i>P.karensium</i> <i>P.hongkongensis</i>	Rễ,vỏ cây Rễ Rễ Toàn cây Rễ Rễ	[73],[74], [75], [47], [48], [57], [76]
60.	7-O-methylmangiferin (199)	<i>P. tenuifolia</i> <i>P.hongkongensis</i>	Vỏ cây Rễ	[74] [76]

61.	Lancerin (200)	<i>P. tenuifolia</i>	Vỏ cây	[74]
62.	Sibiricoxanthon B (201)	<i>P. tenuifolia</i> <i>P. sibirica</i>	Vỏ cây Rễ	[74], [75]
63.	1,3-dihydroxy-2,4,7-trimethoxyxanthon (202)	<i>P. vulgaris</i>	TMĐ	[77]
64.	7-chloro-1,2,3-trihydroxy-6-methoxyxanthon (203)	<i>P. vulgaris</i>	TMĐ	[77]
65.	Wattersiixanthon A-B (204-205)	<i>P. wattersii</i>	Rễ	[78]
66.	4,7-dihydroxy-2,3-(methylendioxy)xanthon (206)	<i>P. alpestris</i>	Rễ	[47]
67.	1,3,7-trihydroxyxanthon (207) (Gentisein)	<i>P. karensium</i> <i>P. caudata</i>	Rễ Rễ	[51], [63]
68.	3,6-dihydroxy-1,2-dimethoxyxanthon (208)	<i>P. karensium</i>	Rễ	[51]
69.	1,2,3,6,7-pentamethoxyxanthon (209)	<i>P. sibirica</i>	Rễ	[35]
70.	7-hydroxy-1-methoxyxanthon (210)	<i>P. karensium</i> <i>P. caudata</i>	Rễ Rễ	[51], [63]
71.	3,4-dimethoxy-2-hydroxyxanthon (211)	<i>P. karensium</i>	Rễ	[51]
72.	6-hydroxy-1,2,3,7-tetramethoxyxanthon (212)	<i>P. sibirica</i>	Rễ	[35]
73.	1,3,7-trihydroxy-2-methoxyxanthon (213)	<i>P. wattersii</i> <i>P. sibirica</i> <i>P. cyparissias</i>	Rễ Rễ Toàn cây	[52], [35], [48]
74.	Onjixanthon I, II (214,215)	<i>P. sibirica</i> <i>P. cyparissias</i> <i>P. tenuifolia</i>	Rễ Toàn cây Rễ	[35], [48], [79]
76.	Sibiricaxanthon A-B (216-217)	<i>P. sibirica</i>	Rễ	[75]

Như vậy, trong các hợp chất xanthon đã được phân lập từ chi *Polygala* có 70 xanthon tồn tại dạng khung cơ bản, 10 xanthon có nhóm methylendioxy và một số xanthon có cấu trúc đặc biệt.



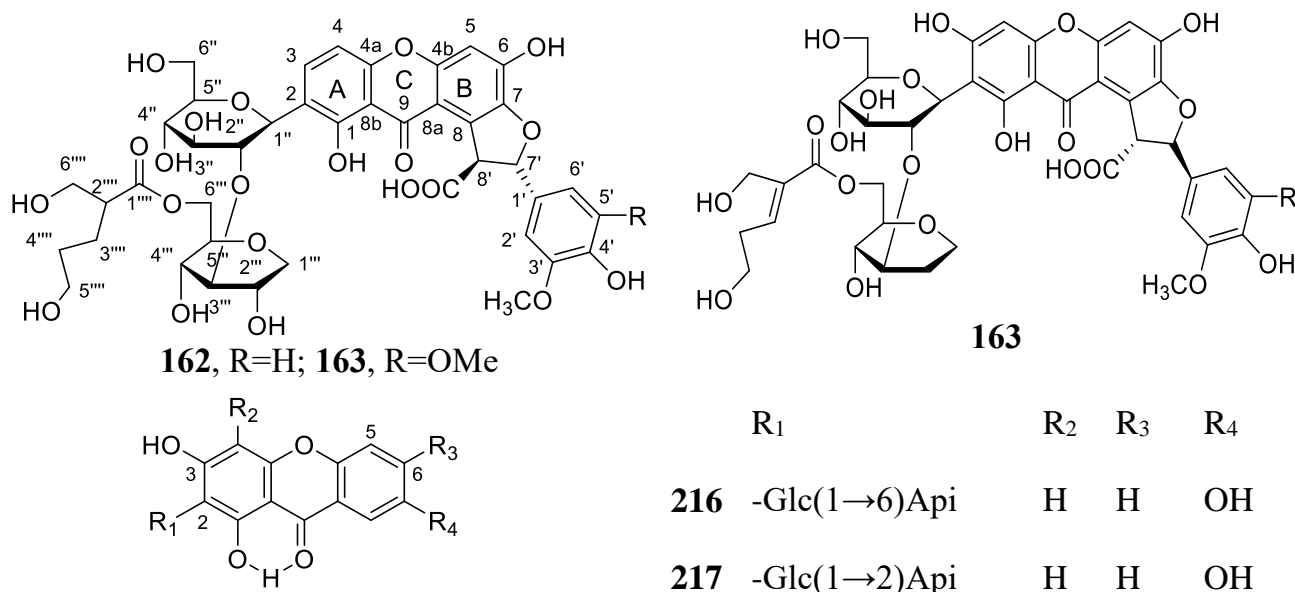
Hình 1.5. Cấu trúc khung cơ bản của các xanthon phân lập từ chi *Polygala*

Các xanthon có cấu trúc đặc biệt có thể liệt kê như sau :

Ba glomexanthonones A-C (**162-164**) được phân lập từ phân đoạn cao chiết ethanol của toàn cây *P. glomerata* [66] là các xanthon có gắn vòng dihydrobenzofuran ở dạng trans ở vòng B (vòng ngoài cùng bên phải trong cấu trúc khung cơ bản) và có gắn nhóm 2-hydroxylmethyl-5-hydroxyl-pentanoic acid ở phần đường.

Hai hợp chất sibiricaxanthon A-B (**216-217**) là các xanthon có vị trí thế R₂ tạo thành cầu nối với nguyên tố O vòng giữa (vòng C) khung cơ bản xanthon.

Hợp chất (**203**) là hợp chất xanthon duy nhất có gốc Chloro gắn ở nhóm thế (vị trí C-7). Các hợp chất có tên arillanin, ngoài các hợp chất A,D,E (**152,139,138**), Wu Z và Cs thuộc viện thực vật Côn Minh, Trung Quốc [58] còn công bố phân lập được các arillanin B,C,E,F,G từ phân đoạn cao chiết cồn vỏ thân loài *P. arillata* trên tạp chí Dược của tỉnh Vân Nam.



Hình 1.6. Một số xanthon có cấu trúc đặc biệt phân lập được từ chi *Polygala*

1.2.1.3. Oligosaccharid và một số thành phần khác

Tên các hợp chất oligosaccharid đã được phân lập từ các loài thuộc chi *Polygala* được trình bày theo bảng 1.3.

Bảng 1.3. Các hợp chất oligosaccharid đã phân lập từ các loài thuộc chi *Polygala*

TT	Tên hợp chất	Loài	Bộ phận	Tài liệu
1.	Arillatose A-F (218-223)	<i>P. arillata</i>	Rễ	[80]
	(6 <i>R</i> , 7 <i>E</i> , 9 <i>R</i>)-9,13-dihydroxy-4,7-megastigmadien-3-one-9- <i>O</i> -[β-D-apiofurano-syl (1→6)]-β-D-glucopyranosid (224)	<i>P. sibirica</i>	Toàn cây	[81]
3.	Sibiricose A1-A7 (225-231)	<i>P. arillata</i> <i>P. sibirica</i> <i>P. tenuifolia</i>	Rễ Rễ Rễ	[80], [35], [62],
	Sibiricose A6 (230)	<i>P. karenium</i>	Rễ	[82]
4.	Dalmaisiose A-P (232-247)	<i>P. dalmaisiana</i>	Rễ	[83]

5.	Tenuifolisid C (248)	<i>P. glometara</i> <i>P. karensium</i> <i>P. tenuifolia</i>	Rẽ Rẽ Rẽ	[24], [82], [62]
6.	Fallaxose A-E (249-253)	<i>P. fallax</i>	Rẽ	[26]
7.	1- <i>O</i> - (<i>n</i> -butyl-4-hydroxy-2-methylenbutaonat)- β - <i>D</i> -glycopynorose (254)	<i>P. tricornis</i>	Rẽ	[51]
8.	β - <i>D</i> -(6- <i>O</i> -benzoyl)fructofuranosyl-(2 \rightarrow 1)-[β - <i>D</i> -glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)]-6-acetyl- α - <i>D</i> -glucopyranosid (255)	<i>P. flavescens</i>	TMD	[41]
9.	β - <i>D</i> -(6- <i>O</i> -benzoyl)fructofuranosyl-(2 \rightarrow 1)-[β - <i>D</i> -glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)]- α - <i>D</i> -glucopyranosid (256)	<i>P. flavescens</i>	TMD	[41]
10.	Glomeratose A-G (257-263) Glomeratose A (257) Glomeratose E (261)	<i>P. glomerata</i> <i>P. karensium</i> <i>P. arillata</i>	Rẽ Rẽ Rẽ	[84], [82], [80]
12.	<i>Polygalajaponicose</i> I (264)	<i>P. japonica</i>	Rẽ	[25]
13.	Reiniose A-J (265-274) Reiniose G (271) Reiniose D (268)	<i>P. reinii</i> <i>P. dalmaisiana</i> <i>P. glomerata</i> <i>P. fallax</i>	Rẽ Rẽ Rẽ Rẽ	[85], [83], [84], [26]
14.	Senegose A-O (275-289)	<i>P. senega</i>	Rẽ	[86],[87], [88]
15.	Telephioses A-C (290-292)	<i>P. telephioides</i>	Toàn cây	[89]
16.	<i>Polygalatenosid</i> A-E (293-297)	<i>P. tenuifolia</i>	Rẽ	[90]
17.	Tenuifoliose A-F (298-303)	<i>P. tenuifolia</i>	Rẽ	[91]
18.	3- <i>O</i> -3,4,5-trimethoxy cinnamoyl-6'- <i>O</i> -(4-methoxybenzoyl)sucrose (304)	<i>P. tenuifolia</i>	Rẽ	[92]
19.	Tenuifoliose Q (305)	<i>P. tenuifolia</i>	Vỏ thân	[93]
20.	3,6' - Disinapoyl sucrose (hợp chất DISS) (306)	<i>P. tenuifolia</i> <i>P. arillata</i> <i>P. karensium</i>	Rẽ Toàn cây	[91], [58],[94] [82]
21.	Tenuifolisid A-D (307-310)	<i>P. tenuifolia</i> <i>P. sibirica</i>	Rẽ Toàn cây	[95], [35]
22.	3- <i>O</i> -(<i>E</i>)-feruloyl-6'- <i>O</i> -(<i>E</i>)-sinapoylsucrose (311)	<i>P. tenuifolia</i> <i>P. arillata</i>	Rẽ Toàn cây	[96], [58],[94]
23.	Tricornose A-L (312-323)	<i>P. tricornis</i>	Rẽ	[82]
24.	Waterose A-J (324-332)	<i>P. watersii</i>	Rẽ	[78]
25.	β - <i>D</i> -[3- <i>O</i> -(3,4,5-trimethoxycinnamoyl)]-furanosyl- α - <i>D</i> -[6- <i>O</i> -(4-	<i>P. tenuifolia</i>	Rẽ	[92]

	methoxybenzoyl)]- glucopyranosid (333)			
26.	6- <i>O</i> -benzoyl-3'- <i>O</i> -3,4,5- trimethoxycinnamoylsucrose (334)	<i>P.karensium</i> (<i>P.tricornis</i>)	Rễ	[82]
27.	6- <i>O</i> -benzoylsucrose (335)	<i>P.karensium</i>	Rễ	[82]
28.	4- <i>O</i> -benzoyl-3'-3,4,5- trimethoxycinnamoylsucrose (336)	<i>P.karensium</i>	Rễ	[82]
29.	6- <i>O</i> -benzoyl-3'- <i>O</i> - sinapoylsucrose (337)	<i>P.karensium</i>	Rễ	[82]

Ngoài các nhóm trên, một số hợp chất khác đã được phân lập từ các loài thuộc chi *Polygala*, được trình bày ở bảng 1.4, cấu trúc hóa học các hợp chất này được trình bày theo phụ lục 2.4.

Bảng 1.4. Các hợp chất khác đã được phân lập từ các loài thuộc chi *Polygala*

TT	Tên hợp chất	Loài	Bộ phận	Tài liệu
Các hợp chất là dẫn xuất của phenol				
1	Alestrin (338)	<i>P. alpestris</i>	Toàn cây	[97]
2	Apestriose A (339)	<i>P. alpestris</i>	Toàn cây	[97]
3	Acid protocatechuic (340)	<i>P. arillata</i>	Thân và rễ	[56]
4	Liriodendrin (341)	<i>P. arillata</i>	Toàn cây	[58]
5	Acid p-hydroxybenzoic (342)	<i>P. caudata</i>	Rễ	[59]
6	Dalmasion A-D (343-346)	<i>P. dalmaisiana</i>	Rễ	[102]
7	Polygalolid A-B (347-348)	<i>P. fallax</i>	Rễ và vỏ thân	[103]
8	4'-demethyldeoxypodophyllotoxin (349)	<i>P. macradenia</i>	Toàn cây	[119]
9	3',5'-dimethoxy-1,1'-biphenyl-4-ol (350)	<i>P. vulgaris</i>	Toàn cây	[77]
10	Methyl sinapat (351)	<i>P. vulgaris</i>	Toàn cây	[77]
11	Acid sinapic (352)	<i>P.karensium</i>	Rễ	[121]
Các hợp chất thuộc nhóm tannin				
12	Acid gallic (353)	<i>P. arillata</i>	Thân và rễ	[56]
13	Acid 3,4,5-trimethoxycinnamic (354)	<i>P. tenuifolia</i> <i>P. sibirica</i>	Rễ Rễ	[116], [117] [35]
Các hợp chất cấu trúc sterol và acid béo				
14	Acid cerotic (355)	<i>P. arillata</i>	Toàn cây	[58]
15	Stigmasterol (356)	<i>P. caudata</i>	Rễ	[59]
16	Stigmasterol 3- <i>O</i> - β - <i>D</i> - glucopyranosid (357)	<i>P. caudata</i> <i>P. arillata</i>	Rễ Toàn cây	[59]
17	<i>Polygalacerebrosid</i> (358)	<i>P. japonica</i>	TMĐ	[105]

18	α -spinasterol (359)	<i>P. sabulosa</i>	Toàn cây	[110]
19	Clionasterol (360)	<i>P. tenuifolia</i>	Thân rễ	[115]
20	Ethyl cholestan-22-enol (361)	<i>P. tenuifolia</i>	Thân rễ	[115]
21	3- <i>O</i> - β -D-glucopyranosyl ethyl cholestan-22-enol (362)	<i>P. tenuifolia</i>	Thân rễ	[115]
22	Daucosterol (363)	<i>P. tenuifolia</i> <i>P. japonica</i>	Rễ Toàn cây	[227] [228]
23	Aralia cerebrosid (364)	<i>P. karenium</i>	Rễ	[121]
Các hợp chất thuộc nhóm coumarin				
24	Poligalen (365)	<i>P. boliviensis</i>	TMĐ	[98]
25	Hongkongenin (366)	<i>P. hongkongensis</i>	Toàn cây	[76]
26	6-methoxy-7-(prenyloxy) coumarin (367)	<i>P. sabulosa</i>	Toàn cây	[109]
27	Scopoletin (368)	<i>P. sabulosa</i>	Toàn cây	[110]
28	Acetylscopoletin (369)	<i>P. sabulosa</i>	Toàn cây	[110]
29	Benzoylscopoletin (370)	<i>P. sabulosa</i>	Toàn cây	[110]
30	Polygalin H-I (371-372)	<i>P. sibirica</i>	Toàn cây	[111]
31	8-(1',2'-epoxy-3'-methylbut-3'-enyl)-7-methoxycoumarin (373)	<i>P. paniculata</i>	Toàn cây	[120]
32	8-(1'-hydroxy-2'-ethoxy-3'-methylbut-3'-enyl)-7-methoxycoumarin (374)	<i>P. paniculata</i>	Toàn cây	[120]
33	8-(1'-ethoxy-2'-hydroxy-3'-methylbut-3'-enyl)-7-methoxycoumarin (375)	<i>P. paniculata</i>	Toàn cây	[120]
Các hợp chất thuộc nhóm flavonoid				
34	Dihydroquercetin (376)	<i>P. caudata</i>	Rễ	[59]
35	Quercetin (377)	<i>P. caudata</i> <i>P. hongkongensis</i>	Rễ Toàn cây	[59],[99] [76]
36	Eupalitin-3- <i>O</i> - β -D- galactosid (378)	<i>P. chinensis</i>	Toàn cây	[100]
37	Ombuin-3- β -rutinosid (379)	<i>P. chinensis</i>	Toàn cây	[101]
38	Chinensinaphthol (380)	<i>P. chinensis</i>	Toàn cây	[101]
39	Chinensinaphihol methyl ether (381)	<i>P. chinensis</i>	Toàn cây	[101]
40	Quercetin-3- <i>O</i> -(5- <i>O</i> -benzoyl)- β -D-apiofuranosyl-(1 \rightarrow 2)- <i>O</i> -[α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]- β -D-glucopyranosid (382)	<i>P. flavescens</i>	TMĐ	[41]
41	Quercetin-3- <i>O</i> -(5- <i>O</i> -sinapoyl)- β -D-apiofuranosyl-(1 \rightarrow 2)- <i>O</i> -[α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]- β -D-glucopyranosid (383)	<i>P. flavescens</i>	TMĐ	[41]
42	Quercetin-3- <i>O</i> -(5- <i>O</i> -feruloyl)- β -D-apiofuranosyl-(1 \rightarrow 2)- <i>O</i> -[α -L-	<i>P. flavescens</i>	TMĐ	[41]

	rhamnopyranosyl-(1→6)]-β-D-glucopyranosid (384)			
43	Quercetin-3-O-(5-O-p-coumaroyl)-β-D-apiofuranosyl-(1→2)-O-[α-L-rhamnopyranosyl-(1→6)]-β-D-glucopyranosid (385)	<i>P. flavescens</i>	TMĐ	[41]
44	Astragalin (386)	<i>P. hongkongensis</i>	Toàn cây	[76]
45	Rutin (387)	<i>P. flavescens</i> <i>P. hongkongensis</i> <i>P. paniculata</i> <i>P. molluginifolia</i>	TMĐ Toàn cây Toàn cây Toàn cây	[41], [76], [70], [104]
46	Kaempferol 7,4'-dimethyl ether (388)	<i>P. japonica</i>	TMĐ	[106]
47	Rhamnetin (389)	<i>P. japonica</i>	TMĐ	[106]
48	3,5,7-trihydroxy-4'-methoxy-flavon-3-O-β-D-galactopyranosid (390)	<i>P. japonica</i>	TMĐ	[106]
49	3,5,3'-trihydroxy-7,4'-dimethoxy-flavon-3-O-β-D-galactopyranosid (391)	<i>P. japonica</i>	TMĐ	[106]
50	3,5,3',4'-tetrahydroxy-7-methoxy-flavon-3-O-β-D-galactopyranosid (392)	<i>P. japonica</i>	TMĐ	[106]
51	3,5,3',4'-tetrahydroxy-7-methoxy-flavon-3-O-β-D-glucopyranosid (393)	<i>P. japonica</i>	TMĐ	[106]
52	Polygalin A-C (394-396)	<i>P. japonica</i>	TMĐ	[106]
53	Kaempferol 3-gentiobiosid (397)	<i>P. japonica</i>	Lá	[107]
54	Kaempferol (398)	<i>P. japonica</i> <i>P. hongkongensis</i>	Lá Toàn cây	[107], [76]
55	Isorhamnetin (399)	<i>P. hongkongensis</i> <i>P. japonica</i>	Toàn cây Lá	[76], [107]
56	5,3',4'-trihydroxy-6'',6''-dimethylpyrano [2'',3'':7,6]isoflavon (400)	<i>P. molluginifolia</i>	Toàn cây	[104]
57	Quercetin-3-O-β-D-apiofuranosyl-(1→2)-O-[α-L-rhamnopyranosyl-(1→6)]-β-D-glucopyranosid (401)	<i>P. flavescens</i>		[41]
58	5,7,4'-trihydroxy-6,8-dimethoxyisoflavon (402)	<i>P. virgata</i>	Rễ	[71]
59	5,7-dihydroxy-6,8,4'-trimethoxyisoflavon (403)	<i>P. virgata</i>	Rễ	[71]
60	5,7-dihydroxy-8,4'-dimethoxyisoflavon (404)	<i>P. virgata</i>	Rễ	[71]
61	5, 3'-dihydroxy-7,4'-dimethoxyflavonol-3-O-β-D-glucopyranosid (405)	<i>P. sibirica</i>	Rễ	[35]

62	Rhamnetin 3- <i>O</i> - β -D-glucopyranosid (406)	<i>P. sibirica</i>	Rễ	[35]
Các hợp chất thuộc nhóm anthranoid				
63	Chrysophanol (407)	<i>P. japonica</i>	Lá	[107]
64	Emodin (408)	<i>P. japonica</i>	Lá	[107]
65	Aloe-emodin (409)	<i>P. japonica</i>	Lá	[107]
66	Emodin 8- <i>O</i> - β -D-glucopyranosid (410)	<i>P. japonica</i>	Lá	[107]
67	Trihydroxy anthraquinon (411)	<i>P. japonica</i>	Lá	[107]
68	Chrysoeriol (412)	<i>P. japonica</i>	Lá	[107]
69	Protohypericin (413)	<i>P. sabulosa</i>	Toàn cây	[109]
Các hợp chất có cấu trúc benzophenon glycosid				
70	Telephenone A-C (414-416) Telephenone D (417)	<i>P. telephioides</i>	Toàn cây Rễ	[112], [122]
71	Garcimangosone D (418)	<i>P. karensium</i> , <i>P. telephioides</i>	Rễ Toàn cây	[82], [112]
72	Tenuiphenone A-D (419-422)	<i>P. tenuifolia</i>	Vỏ thân	[113]
73	Tricornosid A (423)	<i>P. karensium</i>	Rễ	[57]
74	Glomeratide A-D (424-427)	<i>P. glomerata</i>	Toàn cây	[118]
75	Arrilanin G (428)	<i>P. wattesii</i> <i>P. karensium</i> <i>P. glomerata</i>	Rễ Rễ Rễ	[52], [57], [118]
76	Sibiriphenone A (429)	<i>P. sibirica</i>	Rễ	[35]
Các hợp chất khác				
77	Glyceryl palmitat (430)	<i>P. arillata</i>	Toàn cây	[58]
78	3 β -hydroxy-5,6-epoxy- β -ionol-9- <i>O</i> - β -D-apiofuranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosid (431)	<i>P. flavescens</i>	TMD	[41]
79	4-methoxy-6-[14-methoxy-11,12-(methyendioxy)styryl] pyran-2-on (432)	<i>P. sabulosa</i>	Toàn cây	[108]
80	4-methoxy-6-[10,14-dimethoxy-11,12-(methyendioxy)styryl] pyran-2-on (433)	<i>P. sabulosa</i>	Rễ và thân	[108]
81	4-methoxy-6-[11,12-(methyendioxy)styryl]pyran-2-on (434)	<i>P. sabulosa</i>	Rễ và thân	[108]
82	6-(11,12-dimethylstyryl)-4-methoxypyran-2-on (435)	<i>P. sabulosa</i>	Rễ và thân	[108]
83	4-methoxy-6-[dihydro-11,12-(methyendioxy)styryl]pyran-2-on (436)	<i>P. sabulosa</i>	Toàn cây	[109]
84	4-methoxy-6-[dihydro-14-methoxy-11,12-(methyendioxy)styryl]pyran-2-on (437)	<i>P. sabulosa</i>	Toàn cây	[109]

85	(S)-(+)-butyl-4-methylen-5-oxo-pyrrolidin-2-carboxylat (438)	<i>P. karensium</i>	Rẽ	[121]
86	(S)-(+)-methyl-4-methylen-5-oxo-pyrrolidin-2-carboxylat (439)	<i>P. karensium</i>	Rẽ	[121]
87	5-(hydroxymethyl) furfural (440)	<i>P. karensium</i>	Rẽ	[121]
88	(5-formylfuran-2-yl) methyl-4-hydroxy-2-methylenbutanoat (FMHM) (441)	<i>P. sibirica</i> <i>P. karensium</i>	Rẽ Rẽ	[35], [121]

Như vậy, ngoài các nhóm xanthon, saponin và oligosacharid thì còn có hơn 100 hợp chất thuộc các nhóm chất khác (**338-441**) đã được phân lập từ các loài thuộc chi *Polygala*. Trong đó flavonoid là nhóm có nhiều hợp chất nhất (31 chất). Nhiều hợp chất có cấu trúc hóa học thuộc nhiều nhóm khác nhau đã được phân lập từ chi *Polygala* như: coumarin (11 chất); anthranoid (23 chất); benzophenone glycosid (16 chất) và 12 chất thuộc nhóm khác như cerebroside, lignin,... Có hợp chất hiếm gặp như hợp chất apha-ionone (**431**).

Tổng kết, có khoảng 450 các hợp chất đã được phân lập từ các loài thuộc chi *Polygala*, cho thấy chi *Polygala* là chi được nghiên cứu nhiều về phân tách các hợp chất. Các hợp chất được chiết tách từ nhiều bộ phận của các loài thuộc chi *Polygala* như rễ, vỏ thân, lá, phần trên mặt đất và toàn cây.

1.2.2. Thành phần hóa học của loài *Polygala karensium* Kurz

Việc tra cứu cho thấy, cho đến nay còn ít nghiên cứu về thành phần hóa học của loài *Polygala karensium* Kurz hoặc loài đồng danh là *Polygala tricornis* Gapnep. Các công bố cho thấy thành phần hóa học của cây Viễn chí ba sừng bao gồm xanthon, các hợp chất glycosid, triterpenoid, flavonoid, acid hữu cơ, sterol, chất béo... Nhóm hợp chất saponin hay gặp trong các loài *Polygala*, chưa tìm thấy trong cây Viễn chí ba sừng.

Các hợp chất xanthon

Năm 2005, Li J và Cs [57] phân lập được 5 xanthon cấu trúc *O*-glycosid từ rễ của loài Viễn chí ba sừng, đặt tên là tricornosid B-F (**178-182**) cùng với xanthon đã biết là *Polygalaxanthon* V (1,3-dihydroxy-7-methoxyxanthon) (**192**). Các tricornosid B-F cụ thể gồm: Tricornosid B: 2-*O*-(6-*O*-*R*-*L*-rhamnopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl-3,4-dimethoxyxanthon (**178**); Tricornosid C: 3-*O*-(6-*O*- β -D-apiofuranosyl)- β -D-glucopyranosyl-1-hydroxyxanthon (**179**); Tricornosid D: 3-*O*-(6-*O*- α -*L*-rhamnopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl-1-hydroxyxanthon (**180**); Tricornosid E: 5-*O*- β -D-glucopyranosyl-1,6-dihydroxy-7-methoxyxanthon (**181**); Tricornosid F : 7-*O*-(6-*O*- α -*L*-arabinopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl-1-hydroxyxanthon (**182**).

Năm 2010, Dao và Cs [51] phân lập được 10 xanthon từ rễ của loài Viền chí ba sừng, gồm 1,7-dihydroxy-4-methoxy xanthon (**129**); 1,3-dihydroxyxanthon (**130**); 1,7-dihydroxyxanthon (**153**); 4-methoxy-2,3-methylendioxyxanthon (**174**); 1,2-dimethoxy-4-hydroxyxanthon (**175**); 1,2,3,5-tetrahydroxyxanthon (**176**); 1,3,7-trihydroxyxanthon (**207**); 3,6-dihydroxy-1,2-dimethoxyxanthon (**208**); 7-hydroxy-1-methoxyxanthon (**210**); 3,4-dimethoxy-2-hydroxy xanthon (**211**).

Các hợp chất oligosaccharid

Năm 2005, Jun Li và Cs [82] phân lập được 12 chất oligosaccharid, ký hiệu tricornose A-L (**312-323**) và 8 hợp chất sucrose este từ rễ của loài *Polygala karensium*.

Trong đó, các tricornose A,B (**312-313**) có cấu trúc gồm 2 đường glucose, có 3 nhóm thế ở các vị trí 1,3,7. Cấu trúc các chất còn lại, tricornose C-L (**314-323**) gồm 2 đường glucose nối với 1 đường fructose, có 4 nhóm thế, trong đó 2 nhóm thế nằm ở fructose, 2 nhóm thế còn lại gắn với 2 phần glucose tạo thành cấu trúc liên kết bền. Các nhóm thế gồm có acetyl (A); benzoyl (B); spinapoyl (C); feruloyl (D); 3,4,5- trimethoxycinnamoyl (E); p-coumaroyl (F) ; Glc : D-glucopyranosid.

Tám hợp chất sucrose este đã được phân lập từ rễ của loài *Polygala karensium*, bao gồm: sibiricose A6 (**230**), tenuifolisid C (**248**), glomeratose A (**257**), 3,6'-di-sinapoylsucrose (**306**), 6-O-benzoyl-3'-O-3,4,5-trimethoxycinnamoylsucrose(**334**),6-O-benzoylsucrose (**335**), 4-O-benzoyl-3'-3,4,5-trimethoxycinnamoylsucrose (**336**), 6-O-benzoyl-3'-O-sinapoylsucrose (**337**) [82].

Các nhóm hợp chất khác

Trong một công bố khác cũng trong năm 2005, từ rễ của loài *Polygala karensium*, Li và Cs thông báo tìm được một benzophenon O-glycosid mới đặt tên là tricornosid A (**423**), có danh pháp: 6-O-(2-O-β-D-apiofuranosyl)-β-D-glucopyranosyl-2,4-dihydroxybenzophenon. Ngoài ra, các tác giả còn phân lập được hai benzophenol glycosid đã biết là garcimangosone D (**418**) và arrilanin G (**428**) [57].

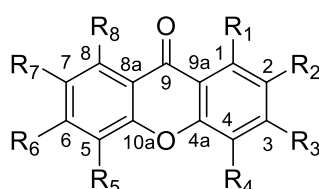
Năm 2012, từ phân đoạn ethanol của rễ loài *P. karensium*, Jun Li và Cs [121] tiếp tục phân lập được thêm 2 chất mới là (S)-(+)-butyl-4-methylen-5-oxo-pyrrolidin-2-carboxylat (**438**) và FMHM (**441**); cùng với đồng phân quang học (S)-(+)-methyl-4-methylen-5-oxo-pyrrolidin-2-carboxylat (**439**) của (**438**), với sự thay thế nhóm n-butyl bằng nhóm methyl, điều đáng lưu ý, đây là lần đầu tiên phân lập được đồng phân này trong tự nhiên, trước đó chất này thu được thông qua con đường tổng hợp hóa học Ngoài ra, các

tác giả còn phân lập được 3 chất đã biết gồm: acid sinapic (**352**), aralia cerebrosid (**364**), 5-(hydroxymethyl) furfural (**440**).

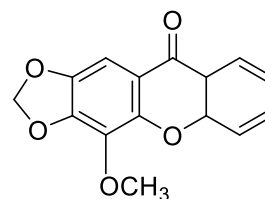
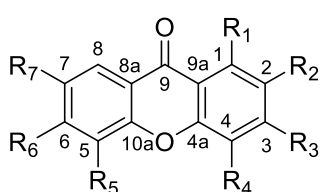
Như vậy, cho đến nay, tổng hợp các công trình đã công bố cho thấy đã có **45** hợp chất đã được phân lập được từ *Polygala karensium* Kurz, bao gồm 16 hợp chất xanthon (**178-182,192, 129, 130, 153, 174, 175, 176, 207, 208, 210, 211**), 12 hợp chất có cấu trúc oligosaccharid (**312-323**), 3 hợp chất benzophenon *O*-glycosid (**418, 423, 428**), 8 hợp chất sucrose este (**230, 248, 257, 306, 334, 335, 336, 337**) và 6 hợp chất thuộc cấu trúc khác (**352, 364, 438-441**). Cấu trúc các hợp chất đã phân lập từ loài *Polygala karensium* Kurz được trình bày theo bảng 1.5. dưới đây.

Bảng 1.5. Cấu trúc một số hợp chất đã phân lập từ Viền chí ba sừng

Các hợp chất xanthon

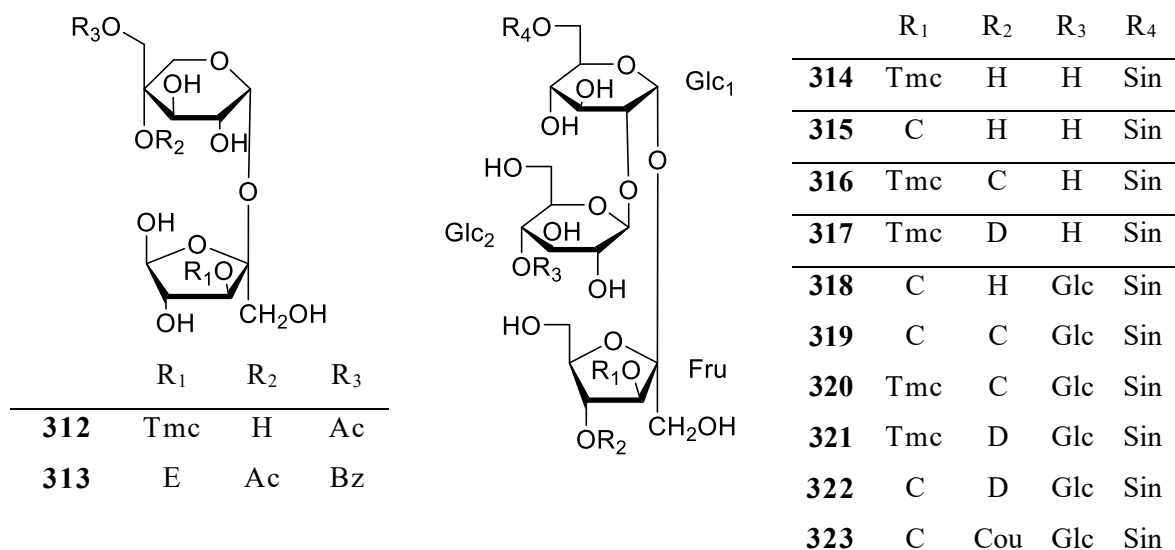


	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇	R ₈
178	H	Rha(1→6) GlcO	OCH ₃	OCH ₃	H	H	H	H
179	OH	H	Api(1→6) GlcO	H	H	H	H	H
180	OH	H	Rha(1→6) GlcO	H	H	H	H	H
181	OH	H	H	H	GlcO	OH	OCH ₃	H
182	OH	H	H	H	H	H	Ara(1→6) GlcO	H
192	OH	H	OH	H	H	Rha(1→2) GlcO	OCH ₃	H

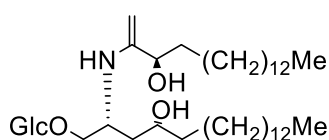


	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇
129	OH	H	H	OCH ₃	H	H	OH
130	OH	H	OH	H	H	H	H
153	OH	H	H	H	H	OH	OH
175	OCH ₃	OCH ₃	H	OH	H	H	H
176	OH	OH	OH	H	OH	H	H
207	OH	H	OH	H	H	H	OH
208	OCH ₃	OCH ₃	OH	H	H	OH	H
210	OCH ₃	H	H	H	H	H	OH
211	H	OH	OCH ₃	OCH ₃	H	H	H

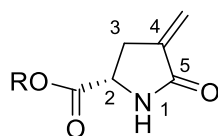
Các hợp chất oligosaccharid



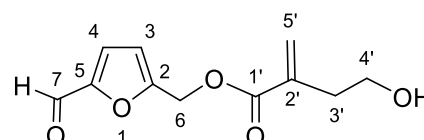
Các hợp chất nhóm khác



364



438



441

1.3. TỔNG QUAN VỀ TÁC DỤNG CHỐNG SUY GIẢM TRÍ NHỚ CỦA MỘT SỐ LOÀI THUỘC CHI POLYGALA VÀ TÁC DỤNG SINH HỌC CỦA LOÀI POLYGALA KARENSIUM KURZ.

Chi *Polygala* đã được nghiên cứu và chứng minh có nhiều tác dụng sinh học [17], nổi bật là các tác dụng chống viêm và giảm đau [53],[104],[107],[110], chống oxy hóa [63],[67],[76] và các tác dụng trên hệ thần kinh trung ương như an thần, giảm căng thẳng [114],[115],[116],[117], chống viêm thần kinh [121],[135],[136], chống suy giảm trí nhớ [132],[133],[137],[139].

1.3.1. Vài nét về trí nhớ và hội chứng suy giảm trí nhớ

Trí nhớ là khả năng lưu giữ thông tin về môi trường bên ngoài tác động lên cơ thể, cũng như các phản ứng xảy ra trong cơ thể tái hiện những thông tin đã được lưu giữ hoặc những kinh nghiệm cũ và sử dụng chúng trong lĩnh vực ý thức hoặc tập tính.

Trí nhớ liên quan đến quá trình học tập, nhờ đó mà chúng ta có được kỹ năng học tập, kỹ năng lao động và tiếp thu được các kiến thức khoa học. Bản chất của trí nhớ

(memory) là quá trình hoạt động thần kinh lặp lại trên một mạch nơron, lúc đầu dẫn truyền các xung động cảm giác từ ngoài vào trong trung tâm thần kinh (dẫn truyền hướng tâm) sau đó trở thành con đường mòn vết nhớ (memory traces). Khi ta nghĩ tới thì có thể hoạt hóa đường mòn đó và có thể nhớ lại được [123].

Hội chứng suy giảm trí nhớ là thuật ngữ tổng quát về việc mất trí nhớ và các khả năng tư duy nghiêm trọng đến nỗi gây trở ngại cho cuộc sống thường ngày. Hội chứng suy giảm trí nhớ thường liên quan đến hội chứng sa sút trí tuệ. Theo ước tính, trên toàn thế giới số lượng người bị suy giảm trí nhớ là 24 triệu trong năm 2005, ước tính lên đến 81 triệu vào năm 2040 [124],[125].

Bệnh Alzheimer chiếm khoảng 60% đến 80% trong các nguyên nhân làm suy giảm trí nhớ. Tỷ lệ mắc bệnh Alzheimer ở Việt Nam khoảng 5% dân số trên 60 tuổi và tăng dần theo thời gian. Các nguyên nhân khác gây ra suy giảm trí nhớ có thể kể đến như sa sút trí tuệ mạch (Vascular dementia), sa sút trí tuệ thể Lewy (Dementia with Lewy bodies), suy giảm trí nhớ do thoái hóa thùy trán - thái dương (Frontotemporal dementia) và suy giảm trí nhớ dạng hỗn hợp [126],[127], [128], [129], [130].

Bệnh Alzheimer và các bệnh khác gây suy giảm trí nhớ luôn đi kèm với một khoản ngân sách điều trị khổng lồ và một gánh nặng về thể chất cũng như tinh thần lên bệnh nhân và người thân của họ [125],[128]. Chứng mất trí nhớ nghiêm trọng thường xuyên gây ra các biến chứng như bất động, rối loạn nuốt và suy dinh dưỡng làm tăng đáng kể nguy cơ mắc các bệnh cấp tính nghiêm trọng, đặc biệt bệnh nhiễm trùng phổi, từ đó có thể gây ra tử vong. [126],[127].

Các thuốc điều trị Alzheimer gồm các thuốc chính là:

- Chất ức chế cholinestase như Cognex, Ericept, Exelon, Razadine.
- Chất đối kháng trên receptor NMDA như Memantin.
- Các chất tác dụng dinh dưỡng thần kinh như Cerebrolysin.
- Chất tác dụng trên protein Tau bệnh lý như Lithiumand valproate, methylthionium chlorid.
- Cải thiện chức năng ty thể như Latrepirdin.

Các thuốc này đều có giá thành cao và nhiều tác dụng không mong muốn. Vì vậy, nhu cầu nghiên cứu phát triển thuốc mới, đặc biệt các sản phẩm có nguồn gốc dược liệu để hỗ trợ và điều trị bệnh Alzheimer là rất cần thiết [125], [127], [131].

1.3.2. Một số nghiên cứu về tác dụng chống suy giảm trí nhớ của một số loài thuộc chi *Polygala*

Tác dụng cải thiện trí nhớ của các loài thuộc chi *Polygala* đã được loài người biết và sử dụng từ rất lâu. Năm 2005, Liu WB [132] thống kê 75 đơn thuốc cổ phương y học cổ truyền từ các triều đại Trung Quốc có tác dụng cải thiện trí nhớ, kết quả hơn 50% các đơn thuốc có thành phần là rễ của các loài thuộc chi *Polygala*. Một số loài *Polygala* như *P. tenuifolia*, *P. sibirica*, *P. japonica*, *P. karensium* được ghi chép có tác dụng an thần, ích trí trong các y văn [132], [133], [134].

Năm 2004, Lee và Cs thông báo, cao chiết methanol của loài *P. tenuifolia* ở nồng độ 0,05-5 $\mu\text{g/ml}$ có khả năng ức chế quá trình chết tế bào thần kinh gây ra bởi N-methyl-D-aspartat (NMDA), ức chế sự giải phóng glutamat và ức chế tăng sinh ROS [135]. Đây đều là những yếu tố gây tổn hại tế bào thần kinh, có thể gây suy giảm trí nhớ. Các nghiên cứu tương tự về tác dụng bảo vệ tế bào thần kinh, từ đó có tác dụng tăng cường khả năng học tập của các loài thuộc chi *Polygala* được báo cáo trong các nghiên cứu [33], [136].

Năm 2009, Xu XH và Cs [29] nghiên cứu tác dụng dược lý của Polygalasaponin G phân lập được từ *Polygala japonica*. Kết quả cho thấy Polygalasaponin G thúc đẩy sự phát triển của các neuron thần kinh nuôi cấy trên cơ chất Myelin cũng như ức chế sự kích hoạt RhoA. Điều này gợi ý cho việc sử dụng hoạt chất Polygalasaponin G trong hồi phục tổn thương tế bào thần kinh ở động vật có vú, tăng cường hồi phục trí nhớ trong những trường hợp suy giảm trí nhớ do tổn thương thần kinh.

Năm 2009, Kim SH và Cs [107] phân lập được 5 anthraquinon và 4 flavonoid từ *Polygala japonica*. Nghiên cứu tác dụng của các hợp chất này cho thấy, cả 6 hợp chất chrysophanol, emodin, aloe-emodin, emodin 8-O- β -D-glucopyranosid, kaempferol và chrysoeriol ở nồng độ từ 1 đến 100 mM có tác dụng ức chế lipopolysaccharid tạo thành nitric oxid (NO), một nguyên nhân gây thoái hóa thần kinh.

Rất nhiều bệnh suy giảm trí nhớ, bệnh AD và các bệnh thần kinh khác hiện nay liên quan đến tổn thương não do thiếu máu não cục bộ. Não tổn thương do thiếu máu cục bộ xảy ra trong điều kiện lưu lượng máu bị gián đoạn bởi hàng loạt yếu tố, bao gồm ngừng tim và hạ huyết áp nặng, tai nạn gây mê và có thể gây cái chết.

Nghiên cứu của Park và Cs năm 2006 [137] tìm kiếm khả năng ngăn ngừa sự thiếu máu cục bộ trên não từ loài *P. tenuifolia*. Kết quả cho thấy 2 phân đoạn chiết xuất ethanol và *n*-butanol có tác dụng ngăn ngừa sự suy giảm nồng độ ATP trong não, đồng thời ức chế sự tăng hàm lượng lactate và peroxid hóa lipid, tức là có thể làm giảm nguy hại ở não trong quá trình thiếu máu cục bộ, tái tưới máu và ngăn ngừa peroxid hóa lipid và bảo tồn sự

chuyển hoá năng lượng. Kết quả cũng cho thấy 2 phân đoạn này có sự thúc đẩy bảo vệ tế bào thần kinh chống lại tổn thương do thiếu máu cục bộ ở não đã được chứng minh trên chuột Mongolian.

Năm 2003, Yabe và Cs nghiên cứu về vai trò của *P. tenuifolia* trong bài thuốc cổ phương Ninjin – Yoei - To (Nhật Bản) đối với sự sản sinh yếu tố tăng trưởng thần kinh NGF (NGF: nerve growth factor) từ tế bào hình sao chuột nuôi cấy đã được kiểm tra trong ống nghiệm [138]. Kết quả cho thấy các thành phần saponin chính của rễ *P. tenuifolia*, các hợp chất Onjisaponin A, B, E, F và G gây tăng mạnh NGF. Những kết quả này cho thấy tiềm năng của các onjisaponin trong *P. tenuifolia* trong điều trị bệnh nhân mắc bệnh AD.

Năm 2004, Ikeya Y và Cs [92] đánh giá tác dụng của hai hợp chất chiết xuất từ rễ *P. tenuifolia* là tenuifoliasid B và 3,6'-disinapoylsucrose, cùng với các phân đoạn dịch chiết MeOH, ether và phân đoạn EtOAc/MeOH (4/1) đối với tác dụng cải thiện hành vi và nhận thức trên 3 loại mô hình thí nghiệm gồm: Mô hình gây thiếu oxy trên não chuột bằng KCN (potassium cyanid); Mô hình gây tổn thương chuột bằng scopolamine; Mô hình gây cơn run trên chuột bằng oxytremorin. Kết quả nghiên cứu cho thấy tenuifoliasid B và 3,6'-disinapoylsucrose có tác dụng bảo vệ tế bào não, cải thiện nhận thức trên cả 3 mô hình thực nghiệm. Nhóm tác giả cho rằng tác dụng này có liên quan đến sự tăng cường tiết acetylcholin. Bởi vì cả 2 chất tenuifoliasid B và 3,6'-disinapoylsucrose đều có gốc sinapoyl trong cấu trúc, nên Ikeya Y dự đoán rằng các chất có cấu trúc chứa gốc sinapoyl có khả năng ức chế KCN trong mô hình gây thiếu oxy huyết suy giảm trí nhớ trên động vật. Do vậy, năm 2007 Karakida F, Ikeya Y và Cs [139] chứng minh acid sinapic ức chế tình trạng thiếu oxy do KCN gây ra, ức chế tình trạng suy giảm trí nhớ do scopolamin gây ra và ức chế suy giảm chức năng vận động do thắt động mạch cảnh hai bên gây thiếu oxy trên chuột thực nghiệm gây ra. Vai trò của acid sinapic còn được làm rõ trong nghiên cứu [140].

Năm 2008, Zhang và Cs [141] đánh giá tác dụng của tenuifolin, một hợp chất phân lập được từ nhiều loài của chi *Polygala* (chất 102) đối với cải thiện việc học và nhớ ở chuột già và suy giảm trí nhớ trên mô hình chuột Y. Kết quả thực nghiệm cho thấy, tenuifolin đã cải thiện việc học và nhớ ở chuột già và suy giảm trí nhớ, tác động trên ba giai đoạn thu nhận, củng cố và tái hiện của quá trình nhớ.

Năm 2009, Jia H và Cs [43] tiếp tục nghiên cứu sâu hơn về cơ chế tác dụng tăng cường trí nhớ của tenuifolin. Kết quả cho thấy, hợp chất này tăng cường trí nhớ, với cơ chế tác dụng lên hệ cholinergic bằng cách ức chế sự sản sinh protein amyloid beta ($A\beta$) một

yếu tố quan trọng gây nên bệnh Alzheimer. Ngoài ra, tenuifolin cũng có khả năng ức chế hoạt động phân giải β -secretase, nguyên nhân hình thành các protein tiền chất amyloid. Cụ thể, tenuifolin có thể ức chế bài tiết $A\beta$ trong các tế bào SH-SY5Y APP 695 thông qua ức chế phân giải BACE1.

Trong nghiên cứu mới nhất về tenuifolin, năm 2019 Wang L và Cs đã làm rõ hơn cơ chế tenuifolin ức chế sự sản sinh $A\beta$ và cơ chế chống viêm thần kinh của tenuifolin. Cụ thể tenuifolin làm giảm $A\beta_{25-35}$ gây viêm trong tế bào, làm giảm các mức $A\beta_{1-40}$ và $A\beta_{1-42}$ thông qua kích hoạt BACE1 trong tế bào SH-SY5Y. Tenuifolin điều chỉnh quá trình autophagy thông qua con đường AMPK / mTOR / ULK1. Các kết quả nghiên cứu cho thấy triển vọng của tenuifolin trong điều trị bệnh Alzheimer [142].

Năm 2004, Chen và Cs [143] nghiên cứu về tác dụng của cao chiết nước từ rễ *P. tenuifolia*. kết quả cho thấy cao chiết nước của *P. tenuifolia* có tác dụng hồi phục trí nhớ và rối loạn hành vi trên chuột bị gây tổn thương tiền đình tai ngoài.

Năm 2009, Xue Wei và Cs [22] nghiên cứu tác dụng của Polygalasaponin XXXII (PGS32), một triterpenoid saponin chiết xuất từ *P. tenuifolia*. Kết quả cho thấy PGS32 có tác dụng ức chế sự suy giảm nhận thức ở chuột do scopolamin gây ra. Hợp chất này được cho là có khả năng cải thiện trí nhớ thông qua kích hoạt mitogen protein kinase, kích hoạt các yếu tố thần kinh có nguồn gốc ở não và tăng cường khả năng dẫn truyền xung động thần kinh qua synap.

Kết quả nghiên cứu năm 2001 của Chung I W và Cs [144] còn cho thấy rằng PGS32 còn có tác dụng an thần, có đặc tính đối kháng thụ thể dopamin và serotonin.

Jia H và Cs còn nghiên cứu về cơ chế tác dụng của Tenuigenin trong ức chế amyloid β -protein ($A\beta$). Kết quả nghiên cứu cho thấy Tenuigenin ức chế sự sản sinh $A\beta$ và APP (C99) trong các tế bào u nguyên bào thần kinh SH-SY5Y APP695) thông qua việc ức chế các hoạt động phân giải protein của BACE1 (β -secretase). Do đó giống như Tenuifolin, Tenuigenin là hợp chất đầy triển vọng trong điều trị chứng bệnh Alzheimer [145].

Methylglyoxal là một chất chuyển hóa của glucose. Ở bệnh nhân tiểu đường nặng, nồng độ methylglyoxal trong huyết thanh tăng cao dẫn đến biến chứng tổn thương tế bào thần kinh ở đôi mắt. Do đó, methylglyoxal có liên quan đến các biến chứng bệnh tiểu đường như suy giảm nhận thức. Nghiên cứu [114] chứng minh tác dụng của Tenuigenin chống suy giảm nhận thức, suy giảm trí nhớ ở bệnh nhân tiểu đường do methylglyoxal gây ra. Cụ thể Tenuigenin giảm các loại oxy phản ứng gây tăng ra bởi methylglyoxal. Ngoài

ra, tenuigenin còn ức chế kích hoạt caspase-3 và điều chỉnh giảm tỷ lệ Bcl-2 / Bax, cả hai đều được gây ra bởi methylglyoxal.

BT-11 là một dạng cao khô chiết từ rễ của *P. tenuifolia*, Nghiên cứu của các nhà khoa học Hàn Quốc cho thấy BT-11 có tác dụng bảo vệ thần kinh và có tác dụng tăng cường trí nhớ và nhận thức trong mô hình mất trí nhớ do scopolamin gây ra trên chuột. Cơ chế tác dụng của BT-11 do ức chế AChE, và bảo vệ tế bào thần kinh chống lại Glu, A β và CT. Cao chiết BT-11 đã được chứng minh trên lâm sàng có tác dụng tăng cường chức năng nhận thức, tăng cường trí nhớ ở người cao tuổi [146], [147], [148]. Sản phẩm được đưa ra thị trường dạng thực phẩm chức năng phục vụ những người già, mắc bệnh AD, PD, suy giảm trí nhớ. Gần đây, BT-11 được báo cáo không gây độc gen ở liều thích hợp và được Cheol và Cs [149] đánh giá cao chiết BT-11 có tác dụng an toàn đối với người từ 9-19 tuổi.

Naito và Cs trong nghiên cứu tương tự [150], chứng minh cao chiết *P. tenuifolia* có tác dụng chống viêm thần kinh trong mô hình gây tổn thương thần kinh bằng A β (25—35). Sun và Lee tiến hành các thử nghiệm tác dụng của cao chiết *P. tenuifolia* ở chuột gây suy giảm trí nhớ bằng scopolamin trong thử nghiệm mê lộ trí nhớ [140],[151]. Nghiên cứu của Chen và Kim cho thấy cao chiết *P. tenuifolia* có tác dụng hồi phục tế bào vùng não của chuột bị tổn thương [143],[152]. Nghiên cứu của Smriga và Cs cho thấy tác dụng tốt chống suy giảm trí nhớ của các cao chiết gồm 3 thành phần là *Polygala tenuifolia*, *Poria cocos*, *Panax ginseng* [153].

Các nghiên cứu [43],[114],[137],[141],[143], cũng đều chứng minh kết quả chống viêm thần kinh, chống suy giảm trí nhớ trên thực nghiệm của các loài thuộc chi *Polygala*.

1.3.3. Tác dụng sinh học của loài *Polygala karensium* Kurz

Cho đến nay, có rất ít nghiên cứu về tác dụng sinh học của loài Viễn chí ba sừng (*Polygala karensium* Kurz hoặc các đồng danh như *Polygala tricornis* Gapnep., *P. congesta* Reder et E. H. Wilson., *P. floribunda* Dunn., *P. lancilimba* Merrill.,) được công bố. Theo tra cứu, trong y học cổ truyền Trung Quốc, rễ của loài *Polygala karensium* Kurz có công năng định tâm an thần, chủ trị các trường hợp tâm thần bất an, hay hoảng sợ, mất ngủ, hay quên, cơ thể suy nhược, sắc uống ngày 9-12 g, được sử dụng như một loại thuốc bổ thể lực và trí lực, an thần, dùng trong trường hợp suy giảm trí nhớ [132],[134].

Tác dụng chống virus cúm

Năm 2012, Dao và Cs [51] nghiên cứu khả năng chống virus cúm của các chất phân lập từ Viền chí ba sừng. Năm trong 10 hợp chất xanthon phân lập được từ *Polygala tricornis* gồm (129), (130), (153), (207), (210) thể hiện ức chế mạnh nhiều chủng virus cúm H1N1, H9N2, H1N1 (WT). Ngoài ra, các hợp chất này làm giảm tác dụng tế bào học của virus cúm lợn H1N1 trong các tế bào MDCK. Cụ thể, các hợp chất này ức chế enzym neuraminidase từ các chủng virus trên với IC₅₀ từ 9,33-28,42 µg/ml.

Ức chế sự hình thành NO trong cơ chế chống viêm thần kinh.

Theo kết quả nghiên cứu của Li J và Cs, hai hợp chất (438,441) được thử tác dụng ức chế sự hình thành NO trên trên tế bào thần kinh đệm BV2 được kích thích bởi LPS. Hai hợp chất thể hiện tác dụng ức chế sự hình thành NO tốt với giá trị IC₅₀ lần lượt là 14,1 µM và 1,77 µM. Điều này chứng tỏ hai chất này có tác dụng chống viêm thần kinh [121].

Tác dụng ức chế Aldose reductase

Theo Zeng K W và Cs [154], FMHM, tên viết tắt của chất (441), được phân lập từ rễ của *Polygala tricornis* (*Polygala karensium*) là một chất ức chế AR có nguồn gốc tự nhiên. Kết quả nghiên cứu cho thấy tác dụng chống viêm thần kinh mạnh của FMHM trên cả *in vivo* và *in vitro* bằng cách ức chế kích hoạt vi mô và biểu hiện của các chất trung gian gây viêm.

Kết quả nghiên cứu cho thấy chất (441) có tác dụng ức chế sự hoạt động của AR trong tế bào thần kinh chuột BV2 được kích thích bởi LPS ở các nồng độ thử nghiệm 5µM và 10µM. Ngoài ra, chất FMHM còn có khả năng ức chế sự hình thành của các tác nhân gây viêm như NO, PGE2, TNF-α, IL-6, IL-1β, ức chế sự kích hoạt yếu tố nhân kappa B (NF-κB), sự hoạt động của protein kinase C. Kết quả nghiên cứu cho thấy FMHM ức chế sự kích hoạt yếu tố nhân kappa B (một yếu tố sao mã thiết yếu kiểm soát quá trình biểu hiện gen mã hóa của các cytokin viêm) cũng như giảm sự phosphoryl hóa của IKK và IκB, ức chế sự phosphoryl hóa của 3 protein mitogen-activatedkinase (MAPK) gồm ERK, JNK và p38. Ức chế AR bởi FMHM gây ra tác dụng bảo vệ thần kinh trong các kén tế bào thần kinh do lipopolysaccharid gây ra. Điều này cho thấy tác dụng chống viêm thần kinh tốt của hợp chất FMHM phân lập được từ *P. karensium* Kurz.

Có thể thấy, những kết quả nghiên cứu về tác dụng sinh học của loài *Polygala karensium* tuy còn ít nhưng cho thấy sự đúng đắn của người dân sử dụng loài này để chống viêm thần kinh, chống suy giảm trí nhớ.

1.3.4. Tổng quan về mô hình nghiên cứu tác dụng chống suy giảm trí nhớ

1.3.4.1. Các mô hình thực nghiệm không sử dụng ruồi giấm

Các mô hình thực nghiệm *in vitro* thường sử dụng gồm:

- Thử nghiệm ức chế acetylcholinestarea.
- Thử nghiệm sử dụng dòng tế bào SH- SY5Y APP695, tế bào thần kinh đệm BV2 được kích thích bởi LPS.

Các mô hình thực nghiệm *in vivo* thường sử dụng như:

- Gây bệnh lí tổn thương/ suy thoái tế bào thần kinh (sử dụng trimethyltin; các mô hình thất động cảnh hai bên gây thiếu oxy não cục bộ, cắt bỏ thùy khứu giác.
- Các mô hình sử dụng chuột knock-in gen FAD, gen hAPP, gen MAPT, sử dụng chuột biến đổi gen như chuột FAD- Tg, chuột MAPT-Tg, chuột APOE- Tg.

Một số nghiên cứu về tác dụng chống suy giảm trí nhớ của các loài thuộc chi *Polygala* như :

Sử dụng hóa chất gây suy giảm trí nhớ trên chuột:

Sử dụng scopolamin bromid, sodium nitrit và rượu, tạo mô hình gây suy giảm trí nhớ tạm thời và lâu dài ở chuột thực nghiệm. Sau đó cho chuột uống hoặc tiêm màng bụng cao phân đoạn của một số loài thuộc chi *Polygala* nghiên cứu, đánh giá tác dụng qua mê lộ nước, mô hình nhảy “step down test” ở chuột [140],[155],[156],[157].

Gây lão hóa ở não chuột tạo suy giảm trí nhớ:

Tiêm D - galactose, tạo ra mô hình lão hóa ở động vật thí nghiệm, thông qua mô hình nhảy “step down test” và thí nghiệm mê cung nước Morris ở chuột uống dịch chiết một số loài thuộc chi *Polygala* nghiên cứu [158],[159].

Tạo mô hình bệnh AD gây suy giảm trí nhớ ở động vật thực nghiệm:

Dùng D-galactose kết hợp ApoE4, acid ibitenic hoặc sodium nitrite đều có thể gây ra mô hình bệnh AD trên động vật thực nghiệm [160],[161],[162].

1.3.4.2. Mô hình sử dụng ruồi giấm trong nghiên cứu tác dụng sinh học

Mô hình sử dụng ruồi giấm trong nghiên cứu về tác dụng sinh học nói chung và các bệnh về thần kinh trung ương và tác dụng chống suy giảm trí nhớ nói riêng, do có những ưu điểm nên được sử dụng nhiều trong thời gian gần đây.

Ruồi giấm là một loài ruồi trong họ Drosophilidae, có tên khoa học là *Drosophila melanogaster*, phân bố ở khắp các châu lục. Về vị trí phân loại của ruồi giấm theo tài liệu [164] như sau

Giới: Animalia

Ngành: Arthropoda

Lớp: Insecta

Bộ: Diptera

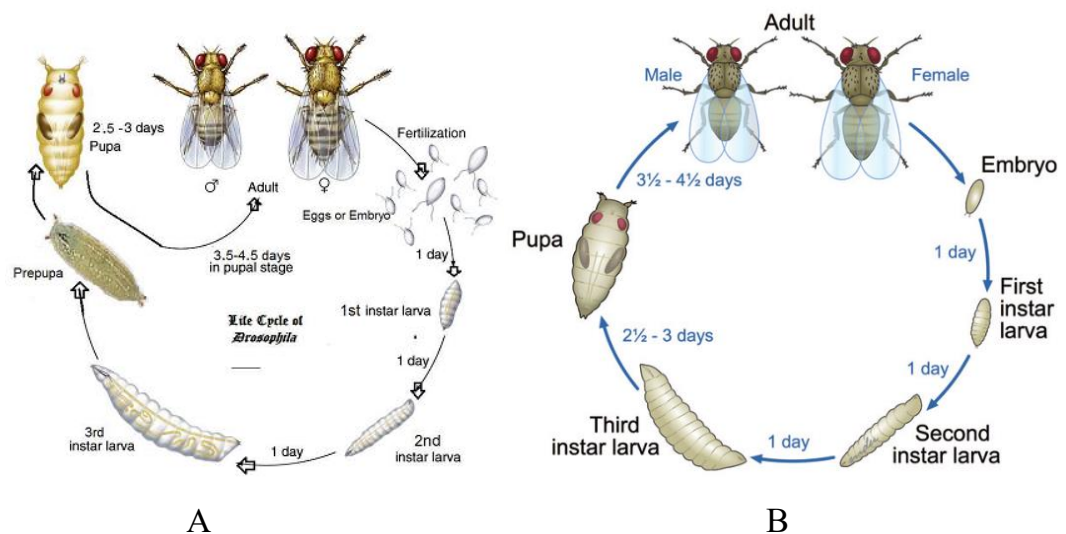
Họ: Drosophilidae

Chi: *Drosophila* Fallén, 1823

Loài: *Drosophila melanogaster*

Ruồi giấm có lịch sử hơn một trăm năm trong nghiên cứu di truyền. Đây là một trong những sinh vật đầu tiên có bộ gen được giải trình tự đầy đủ, có khoảng 13.600 gen mã hóa protein chỉ nằm trong 4 nhiễm sắc thể, và nó cho thấy có hơn 70% gen tương đồng với bộ gen của người [165],[166],[167]. Sử dụng ruồi giấm trong nghiên cứu không gặp phải vấn đề về đạo đức trong nghiên cứu.

Với ưu thế vòng đời ngắn, chu kỳ phát triển của ruồi giấm trải qua 4 giai đoạn: trứng, ấu trùng, nhộng và ruồi trưởng thành. Ruồi cái có thể tạo ra khoảng 750 - 1500 trứng trong suốt vòng đời của nó. Trứng sau khi thụ tinh sẽ phát triển thành phôi trong vòng 24h. Các phôi sau đó trải qua ba giai đoạn ấu trùng (larva) khác nhau (ấu trùng bậc một, ấu trùng bậc hai tương đương với 1, 2 ngày tuổi; đời sống ấu trùng bậc ba bắt đầu được tính từ 3 ngày tuổi và kéo dài đến sáu ngày tuổi. Ấu trùng bậc ba chuyển qua giai đoạn nhộng (pupa); tài liệu [168] cho rằng còn qua giai đoạn tiền nhộng (prepupa) cuối cùng trưởng thành thành một con ruồi giấm trưởng thành. Sự phát triển của một con ruồi trưởng thành khoảng 9 đến 10 ngày rưỡi kể từ khi thụ tinh. [164], [168]. Chu kỳ vòng đời của ruồi giấm được minh họa ở hình 1.7 dưới đây.



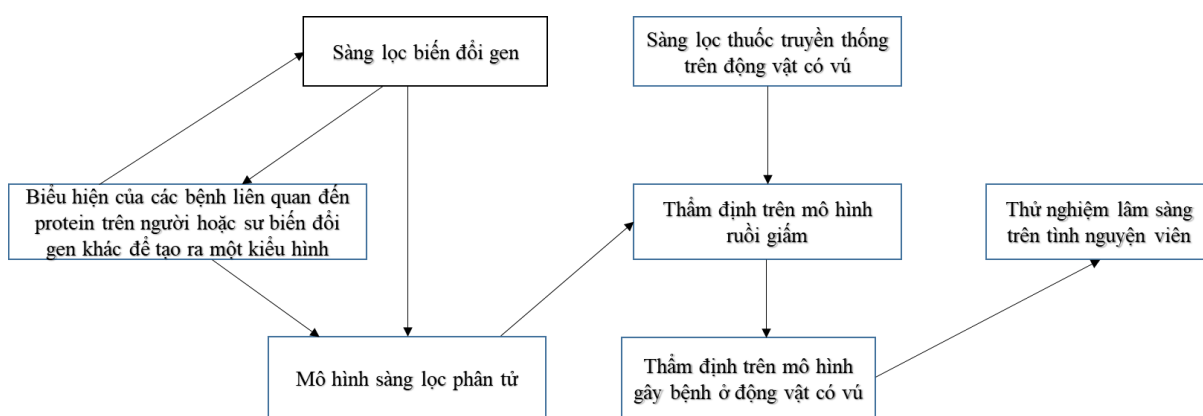
Hình 1.7. Chu kỳ vòng đời của ruồi giấm

Chú thích: A theo [164]; B theo [168]

Với ấu trùng bậc ba tiến hành thử nghiệm: ở ngày tuổi thứ 3 đến thứ 5 (72-90 giờ sau khi trứng nở), ấu trùng bậc ba có thể nhìn thấy, vẫn còn trong hỗn hợp thực phẩm nuôi ấu trùng, không bò lên bề mặt kính, được sử dụng cho các thử nghiệm Crawling assay và Odor-taste learning assay [169],[170].

Tuổi thọ trung bình của ruồi giấm khi nuôi ở 29°C khoảng 30-40 ngày, dễ nuôi trong phòng thí nghiệm và có thể cung cấp số lượng lớn trong cùng một thời điểm. Do đó ruồi giấm là nguồn gen thuận lợi cho việc nghiên cứu bệnh liên quan đến yếu tố di truyền cũng như có tiềm năng trở thành mô hình cho những nghiên cứu thử nghiệm và sàng lọc thuốc [164], [168].

Ruồi giấm đặc biệt có vai trò quan trọng trong sàng lọc thuốc, bao gồm cả thuốc hóa dược và các sản phẩm có nguồn gốc từ dược liệu. Do ưu điểm dễ tiến hành, kinh tế, thử nghiệm trên mô hình ruồi giấm thường được tiến hành để sàng lọc các dược liệu có tác dụng, sau khi trải qua quá trình nghiên cứu này, các dược liệu tiếp tục được nghiên cứu trên các mô hình động vật có vú, từ đó lựa chọn ra được các dược liệu để nghiên cứu trên lâm sàng. Theo Pandey và cs [167], vai trò trong sàng lọc thuốc bằng mô hình ruồi giấm được thể hiện như sau :



Hình 1.8. Vai trò của mô hình ruồi giấm trong nghiên cứu sàng lọc thuốc

Do các lợi thế về di truyền, giải phẫu, hành vi, kinh tế như vậy, cho nên hiện nay ruồi giấm đang được sử dụng như sinh vật mẫu chính cho các nghiên cứu thực nghiệm về sinh học nhân chuẩn đa bào. Nhận thức được tính cần thiết của việc nghiên cứu bệnh, tạo mô hình để nghiên cứu, cho đến nay đã có rất nhiều công trình nghiên cứu và sử dụng ruồi giấm làm mô hình nghiên cứu bệnh trên người như các bệnh về thần kinh, bệnh ung thư, bệnh về mạch vành, các bệnh viêm nhiễm. Các bệnh về thần kinh được ứng dụng nghiên cứu mô hình ruồi giấm nhiều nhất, gồm có các bệnh thoái hóa thần kinh, bệnh Alzheimer, bệnh Parkinson, bệnh Huntington, bệnh động kinh, rối loạn giấc ngủ,... [167]. Có thể liệt

kê ứng dụng mô hình ruồi giấm nghiên cứu bệnh thoái hóa thần kinh như nghiên cứu của Kazemi-Esfarjani P và Cs (2000) trong việc ức chế độc tính của polyglutamine trên mô hình ruồi giấm [171]. Năm 2005, Warrick và Cs ứng dụng mô hình tương tự trên ruồi giấm cho nghiên cứu tác dụng ức chế polyglutamine của Ataxin-3 [172]. Nhiều nghiên cứu sử dụng mô hình ruồi giấm chuyển gen alpha-synuclein làm mô hình nghiên cứu bệnh Parkinson và các yếu tố liên quan như các nghiên cứu của Auluck và Cs, Pendleton và Cs, Mizuno và Cs [173],[174],[175].

Do hầu hết các gen liên quan đến bệnh sinh Alzheimer đều có gen tương đồng ở *D. melanogaster* [167]; cho nên, các nghiên cứu về bệnh Alzheimer trên ruồi giấm được tiến hành nhiều thập kỷ qua với nhiều mô hình gây bệnh như : mô hình gây độc tính A β trong nghiên cứu của Rosen và Cs (1989), của Finelli và Cs (2004) [176],[177] ; mô hình tạo presenilin trong nghiên cứu của Boulinne và Cs (1997) [178]; mô hình gây độc tính Tau trong nghiên cứu của Heidary và Cs (2001) [179].

Tuy có nhiều ưu điểm như vậy, nhưng hiện nay tra cứu các tài liệu **chưa thấy có công bố về sử dụng mô hình ruồi giấm nghiên cứu tác dụng của các loài thuộc chi *Polygala*.**

CHƯƠNG 2: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

2.1.1 Nguyên liệu nghiên cứu

Mẫu dược liệu được Trần Văn Quang thu hái nhiều lần tại vùng núi thị trấn Sa Pa, Lào Cai trong năm 2015, được ThS. Nguyễn Quỳnh Nga khoa Tài nguyên dược liệu- Viện Dược liệu và ThS. Nghiêm Đức Trọng, Trường Đại học Dược Hà Nội định danh tên khoa học *Polygala karensium* Kurz, họ Viền chí, còn có tên đồng danh là *Polygala tricornis* Gagnep, thuộc họ Viền chí (Polygalaceae). Tên Việt Nam gọi là viền chí trắng, kích nhũ trắng, giả ba kích, Viền chí ba sừng... Mẫu được lưu giữ ở Viện Dược liệu, với mã số NIMM- 20123.

Bộ phận nghiên cứu là rễ dược liệu (*Polygala karensium* Kurz) được rút lõi, phơi khô, từ 25kg dược liệu tươi thu được 4 kg vỏ rễ dược liệu khô.

Mẫu nghiên cứu hóa học: từ các phân đoạn chiết xuất *n*-hexan (VCH), dichloromethan (VCD) và ethyl acetate (VCA) và cao phân đoạn nước (VCN) được điều chế như ở mục 2.2.2.2.

Mẫu nghiên cứu dược lý: phân đoạn ethanol toàn phần (VCE), phân đoạn *n*-hexan (VCH), phân đoạn ethyl acetate (VCA), phân đoạn nước (VCN) được điều chế như ở mục

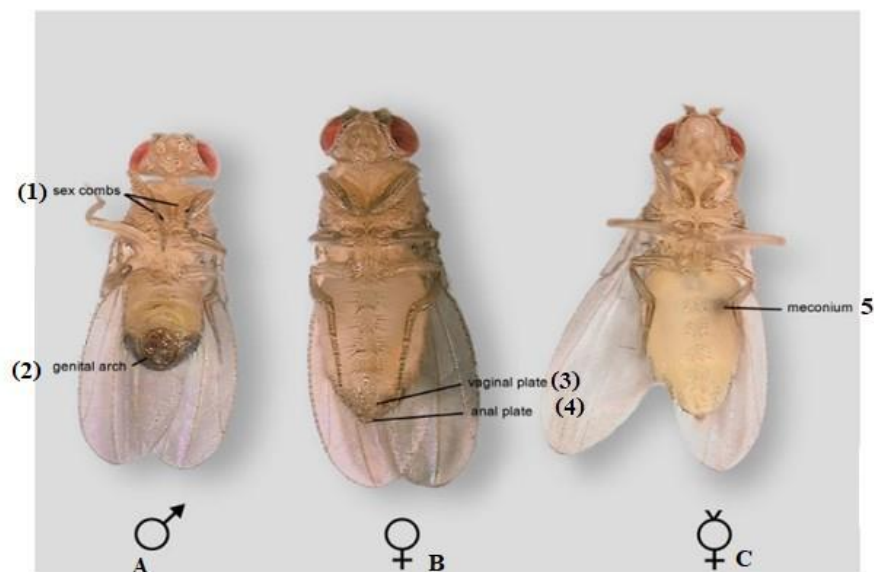
2.2.3.1. Trong nghiên cứu dược lý không sử dụng phân đoạn dichloromethan (VCD) do ức chế sinh sản thế hệ F1.

2.1.2 Động vật thí nghiệm

Trong nghiên cứu dược lý của luận án, các thí nghiệm sử dụng 2 chủng ruồi giấm (*Drosophila melanogaster*): ruồi giấm chuyển gen hAPP và ruồi Elavae. Hình ảnh và các đặc điểm của ruồi đực, ruồi cái và ruồi cái chưa giao phối chưa qua giao phối chủng ruồi Elav-GFP được trình bày theo hình 2.1.

Nhóm chứng sinh lý: chủng ruồi Elav-GFP (hay còn gọi là Elavae, Elav), là ruồi giấm hoang dại, mang phức hợp gen Elav-GFP, biểu hiện kiểu hình mắt đỏ do mang gen *GAL4* ở nhiễm sắc thể thứ 3, có tập tính sinh hoạt cũng như các đặc điểm sinh học tương tự ruồi bình thường.

Nhóm bệnh lý: Chủng ruồi UAS-Gal4>hAPP (hay còn gọi là hAPP, hAPP64385) là ruồi giấm chuyển gen hAPP với mã số 64385 mang bệnh Alzheimer. Cả 2 chủng ruồi giấm được cung cấp bởi GS Masamitsu Yamaguchi, Viện Công nghệ Kyoto, Đại học Kyoto, Nhật Bản.



Hình 2.1. Hình ảnh các đặc điểm chủng ruồi giấm Elav-GFP
 Chú thích: A: ruồi đực; B: ruồi cái; C: ruồi cái chưa qua giao phối

(1): lược giới tính; (2): dương vật; (3): âm đạo; (4): hậu môn; (5): phân su.
 (nguồn [180])

Ngoài các đặc điểm phân biệt các loại ruồi giấm như theo hình 2.1, tài liệu [180] còn mô tả một số đặc điểm để phân biệt các loại ruồi trên như sau:

	Ruồi đực	Ruồi cái	Ruồi cái chưa giao phối

Hình dáng cơ thể	Nhỏ hơn con cái	Bụng nhọn, bề mặt lưng có “mũi nhọn” (spike)	Bụng to căng tròn
Màu	Phía cuối bụng màu tối đồng nhất	Bụng có nhiều khoanh có dải màu sẫm	Màu nhạt
Cơ quan sinh dục	Nằm trên bề mặt bụng, quan sát được	Ít khi quan sát được	Có “phân su” (meconium) đặc trưng ở bụng
Lược giới tính (Sex comb)	Một hàng lông ngắn sẫm màu trên đoạn thứ 4 của chân trước (nhìn rõ khi bay)	Không	

Thử nghiệm đánh giá hành vi leo trèo (Climbing assay) được tiến hành trên ruồi giấm trưởng thành.

Thử nghiệm hành vi di chuyển của ấu trùng (Crawling assay) và thử nghiệm trí nhớ mùi (Odor-taste learning assay) được tiến hành trên ấu trùng ruồi giấm bậc ba (ấu trùng sau nở 72-90 giờ, tức là sau 3 đến 5 ngày).

Cách nuôi ruồi giấm trong điều kiện bình thường (khi chưa thực hiện thử nghiệm tác dụng sinh học):

Ruồi giấm được nuôi trong môi trường thức ăn cơ bản (chứa 5% cao nấm men, 5% đường, 1% agar, 3% sữa bột, 0,5% acid propionic và 0,4% natri benzoate) và ở điều kiện phòng thí nghiệm nhiệt độ $25 \pm 1^\circ\text{C}$, độ ẩm 50%, chu kỳ sáng - tối 12 giờ (sáng từ 7:00-19:00 h). Các thí nghiệm hành vi được thực hiện trong thời gian từ 9:00 - 18:00 h.

2.1.3 Thuốc thử, hoá chất, dung môi, trang thiết bị nghiên cứu

2.1.3.1. Thuốc thử, hoá chất, dung môi

Các hóa chất, thuốc thử dùng trong nghiên cứu thực vật: Cloramin B, xanhmetylen, đỏ carmain, sudan... và các thuốc thử cần thiết khác đạt yêu cầu của tiêu chuẩn Dược điển Việt Nam V.

Các hóa chất, dung môi, thuốc thử dùng trong nghiên cứu hóa học:

- Các dung môi: Ethanol, *n*-hexan, dichloromethan, ethyl acetate, methanol, acetone,...: đạt tiêu chuẩn dùng trong phân tích.

- Các hóa chất Fe_3Cl , NaOH, MgCl_2 , HCl, H_2SO_4 , Na_2CO_3 tinh thể,...

- Các thuốc thử Fehling A và B, thuốc thử Dragendoff, Mayer, Bouchardat, $\text{Cu}(\text{COOCH}_3)_2$, $\text{Pb}(\text{COOCH}_3)_2$,

- Silica gel pha thuận có cỡ hạt là 40 - 200 μm (Merck).
- Silica gel pha đảo YMC (30 - 50 μm , Fuji Silica Chemical Ltd.).
- Thuốc thử hiện màu dùng trong TLC: dung dịch H_2SO_4 10% / EtOH.
- Diaion HP20.

Các hóa chất, dung môi, thuốc thử cần thiết khác dùng trong phòng thí nghiệm đạt yêu cầu của tiêu chuẩn Dược điển Việt Nam V.

Các hóa chất, thuốc thử dùng trong nghiên cứu dược lý:

Chất đối chứng dương Tacrin (hãng Sigma-aldrich, Mỹ), đạt tiêu chuẩn USP.

Một số thuốc thử hóa chất khác như: 1-octanol, acid propionic, agar, dầu parafin, glycerol, *n*-amyl acetat, natri benzoat, men khô, dung dịch đệm phosphat: PBS (NaCl 8,0 g/l, KCl 0,2 g/l, Na_2HPO_4 1,44 g/l, KH_2PO_4 0,24 g/l, $\text{pH} = 7,4$), dung dịch Triton X-100 0,3% trong PBS: PBS-T 0,3%, dung dịch paraformaldehyde 4% trong PBS: PFA 4% ... và một số hóa chất, thuốc thử cần thiết khác. Các hóa chất đều đạt độ tinh sạch trong nghiên cứu sinh học phân tử. đạt yêu cầu của tiêu chuẩn Dược điển Việt Nam V.

2.1.3.2. Trang thiết bị nghiên cứu

- Kính hiển vi quang học Zeuss (Thụy Sĩ).
- Máy chụp ảnh Canon (Nhật Bản).
- Đèn soi tử ngoại 2 bước sóng 254 nm và 365 nm, Uvitec, Pháp.
- Thiết bị sắc ký lỏng điều chế cao áp Agilent 1100 Series DAD đầu dò UV ở các bước sóng 210; 230; 254 và 280 nm, cột điều chế cột J'sphere H-80 250 mm \times 20mm.
- Máy đo phổ khối lượng Agilent 1100 LC- MSD Trap
- Máy đo phổ khối lượng phân giải cao Waters Q/TOF premier.
- Máy đo phổ cộng hưởng từ Bruker AM500 FT-NMR Spectrometer, Bruker Biospin, Thụy Sĩ.
- Máy đo GC Shimadzu 2010, Nhật Bản.
- Thiết bị cất vi phẫu.
- Máy chiết siêu âm.

Các trang thiết bị khác như: bút lông để thu ấu trùng, chai, ống thủy tinh để đựng thức ăn, nuôi ấu trùng, đĩa petri 90 mm, nắp đục lỗ, đồng hồ bấm giờ, dụng cụ gây mê ruồi,

micropipet, máy quay phim, màn chắn, miếng lót mềm, ống climbing bằng thủy tinh có chia thành 5 mức điểm (0,1,2,3,4,5), mỗi mức tương ứng với 2 cm (ống thủy tinh có nắp đậy, nắp trên màu sáng để dễ thấy ruồi), giấy ghi các tên dòng ruồi, thông số ngày tuổi... và một số thiết bị dụng cụ cần thiết khác.

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.2.1. Phương pháp nghiên cứu thực vật học

Phương pháp làm tiêu bản thực vật:

Dựa theo các tài liệu [181], [182], phương pháp làm tiêu bản thực vật theo các bước sau:

- Chọn mẫu.
- Cố định mẫu.

Mục đích của cố định trong kiểm nghiệm dược liệu là giữ lại trong mô, tế bào dược liệu các cấu trúc, các hoạt chất cần thiết cho những quá trình nghiên cứu tiếp theo. Tùy thuộc vào nguyên liệu, mục đích nghiên cứu mà tiến hành cố định trong các điều kiện khác nhau. Đối với nghiên cứu giải phẫu thực vật, tế bào học, cần quan sát các thành phần cấu trúc chứa trong mô, tế bào, cần cố định bằng các chất định hình như Carnua, FAC, Navasin.

- Làm mềm nguyên liệu.

Sử dụng phương pháp làm mềm lạnh: bằng cách cho mẫu vào hỗn hợp nước - glycerin - ethanol (1:1:1) cho đến khi các mô thâm no chất lỏng.

- Phương pháp cắt mẫu: sử dụng phương pháp cắt trực tiếp

Mẫu được đặt lên một thớt gỗ, dùng lưỡi dao cạo cắt thành những lát mỏng. Các lát cắt sau đó được ngâm ngay vào đĩa petri đã có sẵn nước cất.

Chuẩn bị cốt khoai: Dùng dao bìa gọt một lõi khoai lang hình trụ, dài 2 – 3cm, sao cho vừa khít ống máy cắt. Chẻ đôi lõi khoai này theo chiều dọc thành 2 nửa đều nhau.

Cố định mẫu tiêu bản vào cốt khoai: Khoét ở cả hai mặt phẳng mới chẻ đôi này, theo chiều dọc, một khe nhỏ theo hình của mẫu tiêu bản cần cắt, sao cho khi ghép hai mảnh khoai này lại thì mẫu cần cắt được giữ chặt. Kẹp mẫu cần cắt vào giữa 2 miếng khoai rồi cho vào ống của máy cắt.

- Cắt tiêu bản: Đặt mặt phẳng của lưỡi dao áp sát với mặt phẳng của máy cắt, nghiêng một góc 45⁰ kéo chéo từ trái sang phải, cắt qua cốt khoai. Sau mỗi lần cắt, vặn ốc của máy cắt theo chiều kim đồng hồ để đẩy cốt khoai lên một chút. Mức độ vặn ít hay nhiều sẽ cho lát cắt tiêu bản mỏng hay dày. Dùng kim chỏ lông gạt vi phẫu đã cắt ngay vào đĩa petri có

sẵn nước cất. Sau đó dùng chổi lông chồn lấy các lát cắt chuyển sang mặt kính đồng hồ đã có sẵn cloramin B bão hòa.

-Tẩy tiêu bản

Tẩy mẫu bằng dung dịch Cloramin B trong thời gian ít nhất là 30 phút. Rửa sạch Cloramin 3 lần bằng nước cất. Nếu mẫu chứa nhiều tinh bột có thể ngâm trong dung dịch cloran hydrat trong 30 phút, sau đó rửa sạch. Ngâm mẫu trong acid acetic trong 15 phút. Rửa sạch mẫu 3 lần bằng nước cất.

- Nhuộm tiêu bản:

Nhuộm màu xanh bằng dung dịch xanh Methylen. Thời gian từ 5-30 giây. Rửa sạch mẫu 3 lần bằng nước cất.

Nhuộm màu đỏ bằng cách ngâm mẫu vào dung dịch đỏ Carmin khoảng 30 phút. Rửa sạch mẫu 3 lần bằng nước cất.

- Lên tiêu bản:

Vi phẫu sau khi được nhuộm, được lên kính theo phương pháp giọt ép. Cách thực hiện như sau. Nhỏ vào giữa phiến kính 1 giọt chất lỏng được dùng làm môi trường quan sát (nước, glycerin, ..), dùng kim mũi mác hoặc bút lông đặt vi phẫu cần quan sát vào giọt chất lỏng. Đậy lá kính lại bằng lamén, đặt một cạnh lamén tỳ vào bề mặt của phiến kính, bên cạnh giọt chất lỏng. Dùng kim mũi mác đỡ lấy cạnh đối diện rồi hạ từ từ xuống.

Chú ý: Tiêu bản đạt tiêu chuẩn phải mỏng, sáng, sạch, màu xanh và đỏ rõ ràng, chất lỏng dưới lá kính phải vừa đủ, chiếm toàn bộ diện tích lá kính, không chứa bọt khí, có thể quan sát dễ dàng.

Phương pháp làm tiêu bản bột dược liệu:

Dựa theo các tài liệu [181],[182], phương pháp làm tiêu bản bột dược liệu như sau:

- Chuẩn bị nguyên liệu
- Xay dược liệu: xay nhỏ dược liệu, rây qua rây số 250.
- Lên kính:

Sử dụng chloral hydrat làm chất lỏng lên kính. Lên kính bột dược liệu trong nước hay trong dung dịch Lugol để kiểm nghiệm tinh bột. Lên kính bột dược liệu trong dung dịch Sudan III để kiểm nghiệm dầu béo. Để nghiên cứu những mảnh mô riêng biệt cần quan sát trong dung dịch chloral hydrat sau khi đun nóng (làm sáng). Đặc điểm cấu tạo, phân bố của các mô dẫn (gỗ, libe), sự biến đổi của chúng trong quá trình phát triển cá thể

cùng với các đặc điểm giải phẫu khác (sợi, thể cứng, ống nhựa mù, túi chứa tinh dầu, nhựa, hạt tinh bột, tinh thể) có ý nghĩa quan trọng trong kiểm nghiệm.

Phương pháp giám định tên khoa học:

Dựa theo các tài liệu về thực vật, kiểm tra các đặc điểm hình thái và vi học dựa theo các tài liệu về khóa phân loại thực vật [1],[2],[3],... để so sánh và kết luận về tên khoa học của loài nghiên cứu.

2.2.2. Phương pháp nghiên cứu hóa học

2.2.2.1. Phương pháp định tính sơ bộ các nhóm chất

Định tính bằng các phản ứng hóa học sử dụng thuốc thử đặc trưng của mỗi nhóm chất theo tài liệu [181],[183].

2.2.2.2. Phương pháp phân lập các chất:

Phương pháp chiết xuất

Quy trình chuẩn bị các phân đoạn cao chiết như sau:

Rễ cây Viễn chí ba sừng *P. karenium* đã rút lõi, phơi khô, nghiền thành bột thô (4,0 kg, độ ẩm 8%) được ngâm, chiết siêu âm 3 lần với MeOH (nhiệt độ 70° C, thời gian 45 phút) thu được dịch chiết methanol. Sau khi loại dung môi dưới áp suất giảm, cặn chiết MeOH (700,0 g) được phân bố đều trong nước cất và chiết phân lớp lần lượt với *n*-hexan, dichloromethan và ethyl acetate thu được các phân đoạn cao chiết *n*-hexan (VCH, 10,3 g), CH₂Cl₂ (VCD, 21,0 g), EtOAc (VCA, 23,0 g) và phân lớp nước (VCN 633,6 g).

Sắc ký lớp mỏng

Sắc ký lớp mỏng pha thuận được thực hiện trên bản mỏng tráng sẵn DC- Kieselge 60 F₂₅₄ (Merck), sắc ký lớp mỏng pha đảo được thực hiện trên bản mỏng RP₁₈ F₂₅₄ (Merck). Phát hiện chất bằng đèn tử ngoại ở 2 bước sóng 254 nm và 365 nm hoặc dùng thuốc thử là dung dịch H₂SO₄ 10% trong ethanol được phun đều lên bản mỏng, sấy khô rồi hơi nóng từ từ cho đến khi hiện màu.

Sắc ký cột

Sắc ký cột được tiến hành với chất hấp phụ là silica gel pha thuận và pha đảo. Silica gel pha thuận có cỡ hạt là 0,040 – 0,200 mm. Silica gel pha đảo YMC 0,030- 0,050. Ngoài ra còn sử dụng chất nhồi cột là nhựa trao đổi ion HP-20.

Thiết bị sắc ký lỏng điều chế cao áp (P-HPLC)

Một số hợp chất phân lập được tinh chế trên thiết bị sắc ký lỏng điều chế cao áp Agilent 1100 Series DAD đầu dò UV ở các bước sóng 210, 230, 254 và 280 nm, cột điều

ché cột J'sphere H-80 250 mm×20 mm tại Viện Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

2.2.2.3. Phương pháp xác định cấu trúc hóa học các chất:

Xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất phân lập được dựa trên các phương pháp phổ khối lượng và các phổ cộng hưởng từ hạt nhân một chiều và hai chiều. Đối với chất mới tiến hành đo phổ khối lượng phun mù điện từ độ phân giải cao HR ESI MS.

Phổ khối lượng

Phổ khối lượng phun mù điện từ ESI MS được đo trên máy đo phổ khối lượng Agilent 1100 LC- MSD Trap của Viện Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Phổ khối lượng phun mù điện từ độ phân giải cao HR ESI MS được đo trên máy đo phổ khối lượng phân giải cao Waters Q/TOF premier tại Viện Hóa sinh biển, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Phổ cộng hưởng từ hạt nhân

Phổ cộng hưởng từ hạt nhân một chiều (1D- NMR): ^1H -NMR (500 MHz), phổ ^{13}C -NMR (125 MHz), phổ DEPT- NMR và các phổ 2 chiều (2D- NMR): HSQC, phổ HMBC được đo trên máy Bruker AM500 FT-NMR Spectrometer của Viện Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam với chất chuẩn nội là tetramethylsilan.

Phương pháp nhận dạng phân đường:

Dựa theo phương pháp của Thu và Cs [184]:

Mỗi hợp chất được hòa tan trong dung dịch HCl 0,1 N (dioxane - H₂O 1:1 v/v 1,0 mL) và gia nhiệt lên 80°C trong 3h. Dung dịch acid này được trung hòa với Ag₂CO₃, và dung môi được loại kiệt qua đêm bằng dòng khí N₂. Sau khi chiết với CHCl₃, pha nước được cô đến khô sử dụng N₂. Cặn thu được được hòa tan trong pyridin (0,1 mL) và cho thêm vào L-cysteine methyl este hydrochlorid (nồng độ 0,06 M, khối lượng 0,1 mL). Hỗn hợp phản ứng được gia nhiệt lên 60°C trong 2h, sau đó cho thêm vào phản ứng dung dịch trimethylsilylimidazol (0,1 mL) và gia nhiệt ở 60°C trong 1,5h. Sản phẩm khô được chia nhỏ với *n*-hexan và nước (0,1 mL mỗi mẫu) và pha hữu cơ được phân tích bằng GC với điều kiện sau: Cootk DB-5 (0,32 mm đường kính trong và 30 m chiều dài). Đầu dò: FID (Flame Ionization Detector), nhiệt độ cột 210°C, nhiệt độ đầu phun 270°C, nhiệt độ đầu dò: 300°C pha động: khí He (2,0 mL/phút). Các monosaccharid của các hợp chất được xác định dựa trên so sánh thời gian lưu của các dẫn xuất persilylated monosaccharid với các mẫu chuẩn của chúng.

Phương pháp xác định một chất là chất mới

Để xác định một chất là chất mới, cần tiến hành các bước sau.

Trước tiên cần kiểm tra là chất thu được có phải là chất sạch hay không bằng TLC theo nhiều hệ dung môi triển khai khác nhau (với 1 hệ triển khai trên bản mỏng TLC pha đảo và ít nhất là 3 hệ triển khai trên bản mỏng TLC pha thuận), hoặc tốt nhất là kiểm tra chất sạch bằng HPLC.

Sau khi khẳng định là chất sạch, cần tiến hành đo các phổ để xác định cấu trúc của chất thu được. Cần đo phổ khối lượng phun mù điện từ độ phân giải cao (HR ESI MS), để có khối lượng phân tử chính xác với 4 chữ số sau dấu phẩy của hợp chất thu được. Phổ HR ESI MS cho phép giả thiết được công thức phân tử chất thu được bằng cách thực hiện tính toán dựa vào pic ion phân tử trên phổ. Các phổ đầy đủ tiếp theo cần đo gồm các phổ cộng hưởng từ 1 chiều $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, phổ DEPT- NMR và các phổ cộng hưởng từ 2 chiều như HSQC, phổ HMBC và các phổ IR, UV/VIS.

Sau khi có các kết quả phổ, ứng dụng kết hợp việc đọc kết quả các phổ (giải phổ) nhằm xác định cấu trúc chất thu được.

Sau khi có cấu trúc chất, tra cứu, so sánh cấu trúc chất đã giải được trên kho dữ liệu các chất hóa học như cơ sở dữ liệu Scifinder. *Nếu trên cơ sở dữ liệu Scifinder chưa có chất thu được thì có thể kết luận được chất thu được là chất mới.*

Sau khi xác định được là chất mới, nếu điều kiện cho phép cần tiến hành đo thêm các dữ liệu cung cấp về chất mới như độ nóng chảy, góc quay cực....

2.2.3. Phương pháp nghiên cứu tác dụng sinh học

2.2.3.1. Chuẩn bị các phân đoạn cao chiết:

Chuẩn bị các phân đoạn cao chiết từ rễ cây Viễn chí ba sừng, gồm cao chiết ethanol toàn phần (VCE); phân đoạn *n*-hexan (VCH); phân đoạn ethyl acetate (VCA); cồn nước (VCN); phân đoạn dichloromethan (VCD); mẫu đối chứng dương Tacrin (THA).

Rễ Viễn chí ba sừng (*Polygala karensium* Kurz) được rút lõi, phơi khô, từ 25kg dược liệu tươi thu được 4,0 kg vỏ rễ dược liệu. 4,0 kg vỏ rễ sấy khô, xay thô, ngâm với cồn 80% theo tỷ lệ dược liệu/dung môi là 1/10 trong 48 h. Lọc rút lấy dịch chiết trong. Bã dược liệu được ngâm tiếp với cồn thêm 2 lần, mỗi lần 24 h. Dịch chiết của 3 lần được cô thu được 680,0 g cao chiết ethanol toàn phần (độ ẩm 19,49%, ký hiệu là VCE). Tiếp theo, cao chiết ethanol tiếp tục được phân bố đều trong nước cất và chiết phân lớp lần lượt với *n*-hexan, dichloromethan và ethyl acetate thu được các cao phân đoạn tương ứng *n*-hexan (ký hiệu là VCH), dichloromethan (ký hiệu là VCD), ethyl acetate (ký hiệu là VCA), có trọng

lượng các cao tương ứng là 10,7 g (độ ẩm 1,74%); 21,1 g (độ ẩm 3,80%) và 19,0 g (độ ẩm 16,15%). Lớp nước cuối cùng thu được 590,8 g (ký hiệu là VCN) (độ ẩm 15,70%).

2.2.3.2. Nhân dòng ruồi giấm chuyển gen hAPP mang bệnh Alzheimer

Trong nghiên cứu tác dụng sinh học đã sử dụng 2 phép lai để có thể thu được các nhóm ruồi khác nhau phục vụ cho nghiên cứu đánh giá hành vi của ruồi gồm *nhóm chứng sinh lý* và *nhóm bệnh lý*.

Phép lai được tiến hành trong 4-5 ngày để tạo thế hệ F1 biểu hiện hAPP, được sử dụng làm mô hình bệnh AD để đánh giá tác dụng của các dạng cao chiết từ vỏ rễ Viễn chí ba sừng.

Các bước cụ thể nhân dòng ruồi giấm chuyển gen hAPP mang bệnh Alzheimer như sau :

Bước 1: Chuẩn bị chủng hAPP BL64385 mang gen APP ở nhiễm sắc thể thứ 2 và chủng Elav mang GAL4 ở nhiễm sắc thể thứ 3.

Bước 2: Tách riêng biệt các con đực, cái và ruồi cái chưa qua giao phối của 2 chủng.

- Phân biệt đực, cái và ruồi cái chưa qua giao phối dựa theo một số đặc điểm như hình 2.1.

- Bắt ruồi cái chưa qua giao phối (Virgin female): Bắt ruồi chưa qua giao phối từ 3-6h sau khi kén. Gây mê ruồi trong ống nuôi bằng ether. Chọn những con cái có một chấm đen đặc trưng ở bụng trên (mecunium) của chủng Elav hoặc hAPP. Những ruồi không lựa chọn chuyển vào ống khác hoặc loại bỏ. Chuyển sang một ống mới ghi rõ nhãn và ngày chuyển.

- Bắt con đực của chủng APP hoặc Elav chuyển sang một ống mới.

Bước 3: Cho lai tạo đời P. Cho lai với tỷ lệ 10 con đực chuyển gen hAPP và 10 con cái Elav. Đây là đời P.

Bước 4: Ống chứa P sẽ được nuôi trong 3-4 ngày. Sau đó được chuyển sang ống mới để tránh lẫn giữa P và F1.

Bước 5: Cho lai tạo đời F1 từ đời P như bước 3 để tạo F1. F1 được sử dụng cho thí nghiệm.

Đối với nhóm chứng sinh lý (nhóm A), tiến hành phép lai giữa ruồi giấm đực Elav chưa qua giao phối (Virgin male) với ruồi cái Elav chưa qua giao phối theo tỷ lệ 10 con đực: 10 con cái trong chai có chứa thức ăn cơ bản trong 4-5 ngày để tạo thế hệ F1, sử dụng làm chứng sinh lý.

Đối với nhóm bệnh lý (nhóm B), tiến hành phép lai giữa ruồi giấm đực hAPP chưa qua giao phối với ruồi cái Elav chưa qua giao phối theo tỷ lệ 10 con đực: 10 con cái trong

chai có chứa thức ăn cơ bản sử dụng làm chứng bệnh lý hoặc chai chứa thức ăn cơ bản được bổ sung các phân đoạn cao chiết Viễ chí ba sừng hoặc thuốc đối chứng dương Tacrin.

Cách nuôi ruồi giấm:

Ruồi giấm được nuôi trong chai có chứa thức ăn. Tùy theo nhóm sinh lý hoặc bệnh lý và nhóm điều trị bằng các phân đoạn cao chiết Viễ chí ba sừng mà có sự khác biệt về thức ăn nuôi.

Nhóm ruồi sinh lý (nhóm A) được nuôi trong chai có chứa thức ăn cơ bản.

Nhóm ruồi chứng bệnh lý là nhóm B được nuôi trong chai có chứa thức ăn cơ bản.

Nhóm ruồi bệnh lý điều trị bằng các phân đoạn cao chiết Viễ chí ba sừng là nhóm B được nuôi trong chai chứa thức ăn cơ bản được bổ sung các phân đoạn cao chiết Viễ chí ba sừng (các phân đoạn còn VCE (2 và 4 mg/ml); hoặc các cao chiết phân đoạn VCH, VCD, VCA với nồng độ 0,8 và 2,0 mg/ml); hoặc Tacrin (THA) với nồng độ 0,1 mg/ml.

Ruồi được thay ống thức ăn 3 ngày/lần để đảm bảo cung cấp nguồn dinh dưỡng đầy đủ cho tới khi làm thí nghiệm.

Tất cả các ruồi mang gen nghiên cứu được nuôi trong phòng thí nghiệm ở nhiệt độ $25 \pm 1^\circ\text{C}$ với chu kỳ 12 giờ sáng - 12 giờ tối (sáng từ 7 giờ đến 19 giờ). Các thí nghiệm đánh giá hành vi được thực hiện trong khoảng thời gian từ 9 giờ đến 18 giờ.

2.3.3.3. Đánh giá tác dụng của Viễ chí ba sừng đối với hành vi di chuyển của ấu trùng bậc ba ruồi giấm mang gen bệnh Alzheimer hAPP

Phương pháp: Crawling assay.

Thử nghiệm hành vi di chuyển của ấu trùng (Crawling assay) được tiến hành theo quy trình mô tả bởi tác giả Nichols và Cs [169].

Quy trình nghiên cứu được mô tả tóm tắt như sau: Ấu trùng bậc ba của thế hệ F1 ở phép lai trong mục 2.2.3.1. được rửa sạch thức ăn bám trên cơ thể bằng nước cất 2 lần, sẽ được sử dụng làm thí nghiệm đánh giá hành vi di chuyển. Đặt 4 ấu trùng của từng lô thí nghiệm trên đĩa thạch agar 1%, sử dụng máy quay phim để ghi lại hình ảnh vận động của ấu trùng. Tiến hành quay khi ấu trùng bắt đầu vận động. Thời gian quay là 1 phút. Tổng số ấu trùng bậc ba trong mỗi lô nghiên cứu khoảng 30-32 con.

Các bước tiến hành cụ thể như sau.

Bước 1: Chuẩn bị đĩa

- Chuẩn bị đĩa petri đường kính 10-12 cm, làm sạch
- Đổ thạch Agar 1.5% lên đĩa, bề mặt láng đều, để ráo nước.

Bước 2: Chuẩn bị ấu trùng

- Thu ấu trùng đực bậc 3 (khoảng 3-5 ngày tuổi), nằm bên trong môi trường thức ăn, cách bề mặt môi trường khoảng 1-2 cm, các ấu trùng có khả năng bò ổn định, kích thước lớn đều nhau.

- Tiêu chí lựa chọn ấu trùng:

Không thu ấu trùng yếu do mật độ ấu trùng quá đông, môi trường quá cứng không phù hợp cho phát triển, tránh tổn thương đến ấu trùng trong quá trình bắt.

Dụng cụ thu ấu trùng dùng chổi lông mềm để tránh làm tổn thương đến ấu trùng.

Bước 3: Tiến hành thử nghiệm

- Sau khi thu ấu trùng, giữ ẩm trên khăn giấy tẩm PBS 1X.

- Chuẩn bị máy quay, đặt song song camera với bề mặt đĩa, tránh rung lắc trong suốt quá trình quay.

- Chuẩn bị thước scale; giấy tối màu, ít phản quang, đặt bên dưới đĩa agar.

- Chuyển ấu trùng lên đĩa agar, 4-6 cá thể ấu trùng/lần quay, bắt đầu quay, khung hình đề nghị 640*480, 30 khung hình/s.

- Bắt đầu quay khi ấu trùng bắt đầu di chuyển.

- Dừng quay sau khoảng 1 phút.

Thử nghiệm tiến hành trên các lô sau: lô sinh lí, lô bệnh lí, lô bệnh lí điều trị bằng thuốc thử dương Tacrin 0,1 mg/ml; các lô bệnh lí điều trị bằng các phân đoạn cao chiết VCA, VCE, VCH, VCN của rễ cây Viễn chí ba sừng *P.karesium* Kurz

Bước 4: Xử lý kết quả

Hành vi di chuyển được xử lý bằng phần mềm Pazera Free MOV to AVI Converter PORTABLE, sau đó kết quả được phân tích bằng phần mềm Image-J. Xử lý thống kê bằng phần mềm SPSS v23.

2.3.3.4. Đánh giá tác dụng của Viễn chí ba sừng đối với hành vi leo trèo của ruồi giấm trưởng thành mang gen bệnh Alzheimer hAPP

Phương pháp: Climbing assay.

Thử nghiệm đánh giá hành vi leo trèo của ruồi giấm trưởng thành (Climbing assay) được tiến hành theo quy trình được mô tả bởi nhóm tác giả Nichol và Cs, Liu và Cs [169],[185]. Quy trình được mô tả tóm tắt như sau: Lai ruồi đực và ruồi cái chưa qua giao

phối của chủng Elav trong 4-5 ngày để tạo thế hệ F1, ruồi giám trưởng thành F1 được sử dụng làm chứng sinh lý. Lai ruồi đực chưa qua giao phối của chủng hAPP với ruồi cái chủng Elav chưa qua giao phối 4-5 ngày trong môi trường thức ăn không/ hoặc có bổ sung mẫu VCE, VCH, THA và VCN với nồng độ 2 mg/ml để tạo nhóm bệnh lý. Thế hệ ruồi trưởng thành F1 tiếp tục được nuôi trong môi trường thức ăn có/ không bổ sung mẫu nghiên cứu như trên. Tiến hành thí nghiệm hành vi leo trèo của ruồi trưởng thành ở các ngày tuổi thứ 3, 7 và 10. Chia 10 con ruồi vào các ống thủy tinh đã chia vạch và đợi ít nhất 10 phút để ruồi được ổn định. Dùng sức của tay đập lực đủ mạnh liên tục 5 lần để đưa ruồi về đáy ống thủy tinh (về cùng vạch xuất phát); đợi 30 giây cho ruồi bò lên. Quá trình thí nghiệm này được lặp lại 5 lần liên tiếp. Dùng camera để quay hình ảnh leo trèo của ruồi. Phân tích khả năng leo trèo của ruồi ở 5 giây đầu tiên sau khi kết thúc 5 lần đập liên tục bằng phần mềm Image-J và xử lý thống kê bằng phần mềm SPSS v.23.. Tổng số ruồi được sử dụng cho mỗi lô thí nghiệm là khoảng 80 con (40 con ruồi đực và 40 con ruồi cái).

Mẫu nghiên cứu có tác dụng cải thiện khả năng vận động của ruồi giám khi điểu leo trèo ở lô sử dụng cao chiết có điểu cao hơn lô bệnh lý với sự khác biệt đạt ý nghĩa thống kê.

Thời gian thích hợp để làm climbing là vào buổi sáng (hoặc trễ nhất là trước 14h). Vì vào buổi sáng và buổi trưa khả năng leo trèo của ruồi là tốt nhất và ổn định nhất. Ngoài ra, cần tuân thủ nghiêm ngặt về không gian và thời gian, có nghĩa là toàn bộ quá trình làm climbing chỉ diễn ra tại 1 địa điểu xác định và tại 1 thời gian nhất định (điều này để tránh sai số do trong thí nghiệm bò ngược chiều trọng lực thì trọng lực tại mỗi địa điểu khác nhau vào những khoảng thời gian khác nhau là khác nhau). Ví dụ: chỉ làm climbing vào lúc 8 h sáng tại cùng 1 vị trí đó mà thôi. Climbing được tiến hành cách nhau cứ mỗi 5 ngày cho đến khi các dòng ruồi không còn khả năng bò lên được nữa (25-40 ngày).

Các bước tiến hành cụ thể như sau.

Bước 1: Chuẩn bị ruồi: Lai ruồi đực và ruồi cái chưa qua giao phối của chủng Elav trong 4-5 ngày để tạo thế hệ F1, ruồi giám trưởng thành F1 được sử dụng làm chứng sinh lý. Lai ruồi đực chưa qua qua giao phối của chủng hAPP với ruồi cái chủng Elav chưa qua qua giao phối 4-5 ngày trong môi trường thức ăn không/ hoặc có bổ sung mẫu VCE, VCH, và VCN với nồng độ 2 mg/ml. Thế hệ ruồi trưởng thành F1 tiếp tục được nuôi trong môi

trường thức ăn có/ không bổ sung mẫu nghiên cứu như trên. Tổng số ruồi được sử dụng cho mỗi lô thí nghiệm là khoảng 80 con (40 con ruồi đực và 40 con ruồi cái).

Bước 2: Vệ sinh ống thủy tinh (ống climbing): Ống thủy tinh đã chia vạch được rửa sạch bằng nước và để ráo trước khi sử dụng và được lau sạch bằng cồn (sử dụng giấy không bụi), sau khi lau cồn, để 15 phút cho cồn bay hơi hết, nếu không hơi cồn sẽ ảnh hưởng đến ruồi

Bước 3: Chuyển ruồi vào ống climbing: Chuyển từng ống môi trường có chứa từ 15 – 20 con ruồi đã được chuẩn bị sẵn sàng cho climbing vào ống thủy tinh chia vạch đã lau sạch bằng cồn; đợi ít nhất 10 phút cho ruồi ổn định (dừng đứng ống).

Bước 4: Chuẩn bị hệ thống quay phim: Chuẩn bị 1 khu vực trống, có một màn màu trắng (nền phía sau màu trắng để khi quay dễ thấy ruồi bò lên mà đếm), một miếng mouse mềm để lót phía dưới đáy ống (giống như miếng đập ruồi – loại tốt nhất là loại có màu sáng để dễ nhìn thấy ruồi); để các ống climbing chứa ruồi vào vị trí trước màn màu trắng (có thể dùng băng keo để liên kết các ống thủy tinh lại với nhau ở phần trên của ống hoặc phía dưới đáy ống); căn chỉnh tiêu cự máy quay sao cho phù hợp để quay được nét nhất, thấy ruồi bò lên rõ nhất và đầy đủ khung hình nhất.

Bước 5: Thực hiện climbing: Tiến hành thí nghiệm hành vi leo trèo của ruồi trưởng thành ở các ngày tuổi thứ 3, 7 và 10. Cho khoảng 10 con ruồi vào các ống thủy tinh đã chia vạch và đợi ít nhất 10 phút để ruồi được ổn định. Dùng sức của tay đập lực đủ mạnh liên tục 5 lần để đưa ruồi về đáy ống thủy tinh (về cùng vạch xuất phát); đợi 30 giây cho ruồi bò lên. Quá trình thí nghiệm này được lặp lại 5 lần liên tiếp. Dùng camera để quay hình ảnh leo trèo của ruồi. Sau 10 -15 phút ruồi đã ổn định, dùng sức của tay đập lực đủ mạnh liên tục 5 lần để đưa ruồi về đáy ống thủy tinh (về cùng vạch xuất phát); đợi 30 giây cho ruồi bò lên.

Sau đó, tiếp tục thực hiện lại bước 5 này 5 lần.

Trên thực tế, các clip climbing khi phân tích chỉ sử dụng 5 giây đầu tiên sau lần đập cuối cùng của 5 lần liên tục, thế nhưng trong thực nghiệm vẫn phải để máy quay đủ ít nhất 30 giây mà không rút ngắn thời gian này xuống được là vì 30 giây là khoảng thời gian cần thiết để ruồi hồi phục; trở nên mất cảnh giác hay không hình thành phản xạ phải chạy lên, leo lên hoặc bị lì với tác động của lực đập xuống; trở về trạng thái leo trèo tự nhiên.

Bước 6: Chuyển ruồi về ống môi trường: Sau khi hoàn thành thử nghiệm, ruồi được chuyển về lại ống môi trường. Môi trường nuôi ruồi lai climbing nên thay mới mỗi 2 ngày/lần.

Tiêu chí đánh giá:

Chỉ số vận động của ruồi giám ở mỗi nhóm được tính toán dựa theo phương pháp cho điểm như sau: 0 điểm đối với ruồi ở dưới vạch 2 cm; 1 điểm đối với ruồi ở giữa vạch 2 và 4 cm; 2 điểm đối với ruồi ở giữa vạch 4 và 6 cm; 3 điểm đối với ruồi ở giữa vạch 6 và 8 cm; 4 điểm đối với ruồi ở giữa vạch 8 và 10 cm; 5 điểm đối với ruồi ở trên vạch 10 cm.

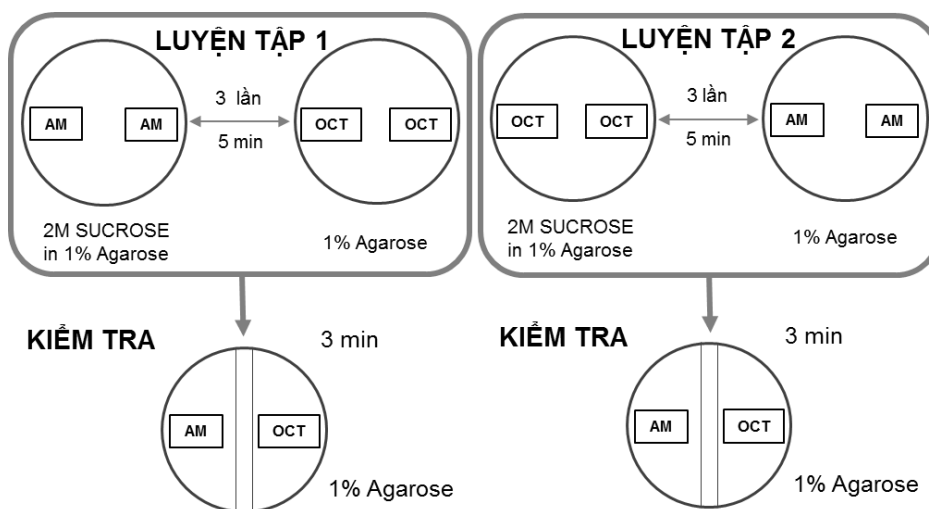
Xử lý số liệu:

Phân tích khả năng leo trèo của ruồi ở 5 giây đầu tiên sau khi kết thúc 5 lần đập liên tục bằng phần mềm Image-J và xử lý thống kê bằng phần mềm SPSS v.23.

2.3.3.5. Đánh giá tác dụng cải thiện trí nhớ ngắn hạn của Viễ chí ba sừng bằng thử nghiệm trí nhớ mùi trên ấu trùng ruồi giám bậc ba mang gen bệnh Alzheimer hAPP

Phương pháp: Odor-taste learning assay.

Phương pháp tiến hành theo mô tả của nhóm nghiên cứu Gerber và Cs năm 2013 [170]. Thử nghiệm được mô tả tóm tắt như sau:



Hình 2.2. Mô hình kiểm tra trí nhớ ngắn hạn của ấu trùng bậc ba ruồi giám.

Chú thích: AM: mùi n-amyl acetat; OCT: mùi 1-octanol

Ấu trùng bậc ba của thế hệ F1 ở phép lai trong mục 2.2.3.1. được rửa sạch thức ăn bám trên cơ thể bằng nước cất 2 lần, sẽ được sử dụng làm thí nghiệm trí nhớ mùi. Thử nghiệm được tiến hành gồm 3 bước: chuẩn bị, luyện tập và kiểm tra. Ở bước luyện tập được tiến hành theo 2 quá trình như sau. Ở quy trình thứ nhất (AM+/OCT), 12 ấu trùng ruồi giám bậc 3 được tiếp xúc 5 phút với mùi n-amyl acetat (AM) trong đĩa petri (đường

kinh 10cm) đã phủ 1 lớp thạch agar 1% có chứa phần thưởng là sucrose 2M; sau đó chúng tiếp tục được tiếp xúc với mùi 1-octanol (OCT) nhưng trong môi trường thạch agar không có phần thưởng sucrose. Bước luyện tập này được gọi là AM+/OCT, biểu thị “+” là phần thưởng. Ở quy trình thứ hai (OCT+/AM), 12 ấu trùng ruồi giấm bậc ba khác được tiếp xúc 5 phút với mùi OCT trong vào đĩa petri (đường kính 10cm) đã phủ 1 lớp thạch agar 1% có chứa phần thưởng là sucrose 2M; sau đó chúng tiếp tục được tiếp xúc với mùi AM, trong môi trường thạch agar không có bổ sung sucrose. Bước luyện tập này được gọi là OCT+/AM. Mỗi một lần luyện tập được tiến hành trong 5 phút và được kết hợp giữa AM, OCT với phần thưởng sucrose. Các quy trình luyện tập được lặp lại 3 lần. 10 µl chất tạo mùi (AM, OCT) được thêm vào ống eppendorf 0,2 ml có nắp đậy lỏng và được đặt ở vị trí đối diện trong đĩa petri có chứa thạch agar 1%. Mùi AM được sử dụng trực tiếp cho thí nghiệm, còn mùi OCT được pha loãng 50 lần bằng dầu paraffin. Mỗi đĩa petri được chia thành 2 vùng, cách nhau bởi vùng trung lập có kích thước 1 cm. Vùng trung lập được định nghĩa là khu vực ở đó ấu trùng nhận được cường độ của mỗi mùi là như nhau. Mỗi một quy trình luyện tập được tiến hành trên 12 ấu trùng. Sau khi bước luyện tập kết thúc, chuyển sang bước kiểm tra. 24 ấu trùng tham gia luyện tập được chia đều vào 3 đĩa thạch agar không chứa phần thưởng sucrose, đồng thời 2 chất tạo mùi AM và OCT đặt ở 2 vị trí đối diện trong đĩa (8 con/ đĩa). Số ấu trùng tập trung về 2 phía mùi khác nhau được ghi lại sau 3 phút. Phân tích chỉ số ưu tiên Pre_{AM} (chỉ số ưu tiên AM) và Pre_{OCT} (chỉ số ưu tiên OCT) được xử lý bằng phần mềm Image-J. Công thức tính các chỉ số được chỉ ra trong dưới đây:

$$PREF_{AM} = \frac{\text{Số ấu trùng bên AM} - \text{Số ấu trùng bên OCT}}{\text{Tổng số ấu trùng}}$$

$$PREF_{OCT} = \frac{\text{Số ấu trùng bên OCT} - \text{Số ấu trùng bên AM}}{\text{Tổng số ấu trùng}}$$

$$LI = \frac{PREF_{AM} - PREF_{OCT}}{2}$$

Trong đó, nếu: $LI > 0$ cho thấy ấu trùng có khả năng học tập hay ghi nhớ; $LI < 0$ cho thấy việc học tập gây khó chịu cho ruồi giấm (điều này sẽ thường xuất hiện khi mô hình nghiên cứu là đưa ra các hình phạt (vd: quinidin, muối nồng độ cao); $LI = 0$ cho thấy ấu trùng không có khả năng học tập hay ghi nhớ.

Mỗi lần thí nghiệm tiến hành trên 24 con ấu trùng ruồi giấm bậc 3 và được tiến hành lặp lại 5 lần. Số thí nghiệm tiến hành 20 lần, tổng số ấu trùng ruồi giấm trong thí nghiệm khoảng 480 con.

Các bước tiến hành cụ thể của thử nghiệm như sau:

Bước 1: chuẩn bị

Chuẩn bị pha thạch: đĩa petri X chứa 1,5% thạch agar và đường sucrose 2M. Đĩa petri Y chứa 1,5% thạch agar và không có đường.

Pha mùi:

Lấy 10 µl dung dịch mùi octanol cho vào ống đựng mùi. Đặt là mùi OCT.

Pha loãng dung dịch mùi *n*-amyl acetat với parafin (1:50), lấy 10 µl dịch pha loãng này cho vào các ống mùi còn lại. Đặt là mùi AM.

Đánh dấu các ống để phân biệt 2 mùi.

Chuẩn bị ấu trùng: Lựa chọn 24 ấu trùng 3-5 ngày tuổi còn ở dưới thức ăn, rửa sạch thức ăn còn bám trên ấu trùng.

Bước 2: Tiến hành tập luyện:

Tiến hành luyện tập AM+/OCT:

Đặt ống đựng mùi AM (*n*-amyl acetat) lên đĩa X, đậy nắp để yên trong 1 phút.

Lấy 12 ấu trùng đã rửa sạch ở trên cho vào đĩa X, cho chúng làm quen với mùi AM và môi trường đĩa X có đường trong thạch trong 5 phút.

Đến phút thứ 4 của quá trình trên, đặt ống đựng mùi OCT (mùi còn lại) vào đĩa Y, đậy nắp để yên trong 1 phút.

Sau khi hết 5 phút, chuyển các ấu trùng ở đĩa X sang đĩa Y, cho chúng làm quen với mùi OCT và đĩa Y không có đường trong thạch trong 5 phút.

Lặp lại quá trình trên 3 lần.

Tiến hành luyện tập OCT+/AM

Lấy 12 ấu trùng đã rửa sạch còn lại ở trên cho vào đĩa Y, cho chúng làm quen với mùi OCT và môi trường đĩa Y có đường trong thạch trong 5 phút.

Đến phút thứ 4 của quá trình trên, đặt ống đựng mùi AM (mùi còn lại) vào đĩa X, đậy nắp để yên trong 1 phút.

Sau khi hết 5 phút, chuyển các ấu trùng ở đĩa Y sang đĩa X, cho chúng làm quen với mùi AM và đĩa X không có đường trong thạch trong 5 phút.

Lặp lại quá trình trên 3 lần.

Bước 3: Tiến hành kiểm tra:

Đến phút thứ 4 của bước tập luyện cuối cùng, tiến hành đặt ống mùi vào 3 đĩa test. Đặt mùi AM lên 1 bên trên đĩa test (đã kẻ sẵn vạch ở giữa), đặt mùi OCT lên bên còn lại của đĩa test, đậy nắp và để yên trong 1 phút.

Sau khi hết 5 phút của bước tập luyện cuối cùng, lần lượt chuyển 8 ấu trùng lên từng đĩa test và tiến hành kiểm tra trong 3 phút.

Sau khi hết thời gian kiểm tra, đếm số ấu trùng ở 2 bên, phía mùi AM và OCT, ghi nhận kết quả.

Quá trình được tiến hành 3 lần, để hạn chế sai số tiến hành kết hợp mùi AM với đĩa X, mùi OCT với đĩa Y; lần kế tiếp làm ngược lại với mùi OCT đĩa X và mùi AM đĩa Y.

Các ấu trùng khi cho vào đĩa thạch, được đặt vào khoảng chính giữa đĩa thạch đã kẻ từ trước.

2.2.4. Phương pháp xử lý số liệu

- Kết quả thử nghiệm hành vi di chuyển (Crawling assay), thử nghiệm hành vi leo trèo (Climbing assay) và thử nghiệm trí nhớ mùi (Odor-taste learning assay) được xử lý bằng phần mềm Pazera Free MOV to AVI Converter PORTABLE, sau đó kết quả được phân tích bằng phần mềm Image-J.

- Kết quả thu được trong các thử nghiệm hành vi và thử nghiệm trí nhớ mùi được xử lý thống kê bằng phần mềm SPSS v23. So sánh giá trị trung bình các lô bằng one-way ANOVA và dùng hậu kiểm LSD test để so sánh giá trị trung bình của lô thử so với lô chứng.

Đối với các số liệu không thuộc phân phối chuẩn, kết quả được trình bày dưới dạng trung vị, tứ phân vị. Dùng kiểm định Kruskal Wallis để so sánh giữa các lô, Mann-Whitney U Test để so sánh kết quả giữa lô thử và lô chứng.

- Kết quả biểu đồ trình bày được xử lý bằng phương pháp One-Way ANOVA

2.3. ĐỊA ĐIỂM NGHIÊN CỨU

Các nghiên cứu về thực vật tiến hành tại Viện Đào tạo Dược, Học viện Quân y và khoa Tài nguyên dược liệu, Viện Dược liệu.

Các nghiên cứu về hóa học tiến hành tại Viện Đào tạo Dược, Học viện Quân y; Viện Hóa sinh biển, Viện Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam; Viện nghiên cứu ứng dụng và dịch vụ phân tích thí nghiệm thành phố Hồ Chí Minh.

Các nghiên cứu về tác dụng sinh học tiến hành tại khoa Dược lí- Sinh hóa, Viện Dược liệu.

CHƯƠNG 3: THỰC NGHIỆM VÀ KẾT QUẢ

3.1. THỰC VẬT HỌC

3.1.1. Thẩm định tên khoa học của Viền chí ba sừng

Trong quá trình nghiên cứu, mẫu cây Viền chí ba sừng được thu hái nhiều lần với mục đích quan sát và lấy đầy đủ được các bộ phận thực vật của cây. Qua phân tích, đối chiếu với các đặc điểm hình thái (thân, lá, rễ, cấu tạo hoa, quả) với khoá phân loại loài của chi *Polygala* (họ Polygalaceae) trong các bộ Thực vật chí của F. Gagnepain, Thực vật chí Trung Quốc, Phạm Hoàng Hộ (1999) cho thấy các mẫu Viền chí ba sừng thu thập ở Sa Pa (Lào Cai) có tên khoa học chính xác là *Polygala karenium* Kurz (có các đồng danh là *Polygala tricornis* Gagnep, *Polygala floribunda* Dunn, *Polygala congesta* Reder et E. H. Wilson, *Polygala lancilimba* Merrill.). Kết quả xác định tên khoa học trên đã được ThS. Nghiêm Đức Trọng – Bộ môn Thực vật, trường Đại học Dược và ThS. Nguyễn Quỳnh Nga – Khoa Tài nguyên dược liệu, Viện Dược liệu thẩm định. Mẫu tiêu bản hiện đang được lưu trữ tại Viện Dược liệu, số hiệu mẫu: NIMM- 20123.

(Phiếu giám định thực vật xem phụ lục 1.)

3.1.2. Đặc điểm hình thái thực vật

Cây bụi cao 0,5-1 m. Thân non có cạnh, hơi vắn. Cành non nhẵn, không lông.

Lá đơn, mọc so le, rất đa dạng, lá gốc hình elip, lá phía trên hình mác. Cuống lá dài 1-2,5 cm, nhẵn hoặc có lông ngắn. Phiến lá mỏng, nhẵn, mặt trên màu xanh, mặt dưới màu xanh hoặc có màu tím. Gân lá hình lông chim, có 6-7 cặp gân phụ, phân chia đến tận mép lá. Mép lá thường lượn sóng, có gai rất nhỏ và cách nhau không đều.

Cụm hoa dày, mọc ở đầu cành hoặc kẽ lá. Hoa xếp dày, nhiều, dài 2,5-4 cm. Đài 5, không đều, sớm bị rụng. Ngoài cùng có 3 lá đài nhỏ, hơi cụp vào trong, dài 8-10 mm, rộng 4-5 mm, đỉnh tù. Hai lá đài phía trong mỏng, giống cánh hoa, hình trứng ngược, lớn, dài 12-15 mm, rộng khoảng 8 mm. Cánh hoa có màu trắng phớt tím đến hồng, mỏng, xẻ 2 thùy.

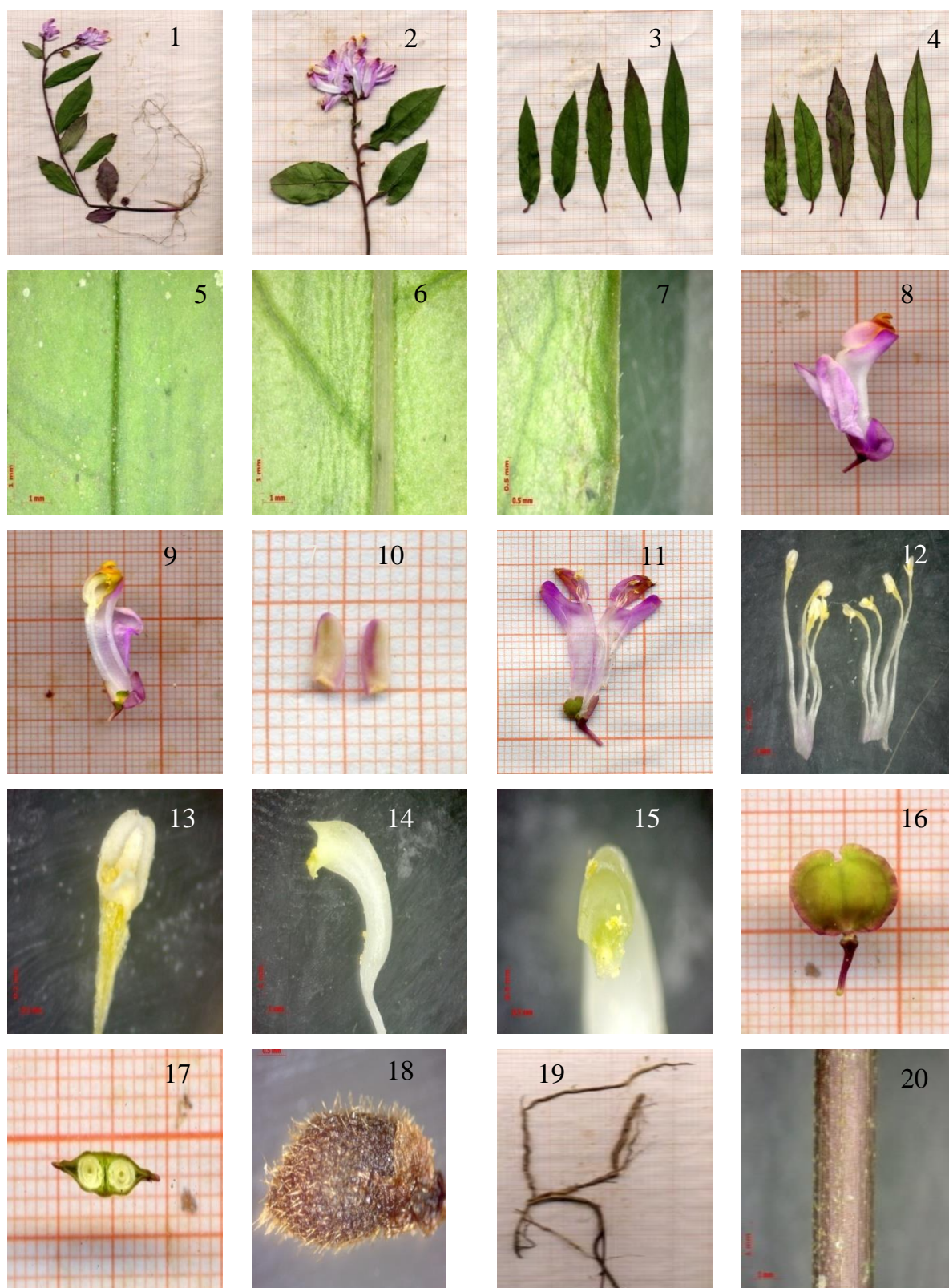
Bộ nhị 8, chỉ nhị dài 2-2,4 cm. Vòi nhụy dài khoảng 1,2-1,4 cm, rộng và cong dần từ dưới lên đỉnh. Núm nhụy hình môi. Bầu dẹt, ở trên, chia 2 ô. Hạt màu nâu đen, hình trứng, lông tơ.

Rễ củ mọng nước, cong queo, dài khoảng 15-30 cm. Mặt ngoài màu xám nâu nhạt, có những nếp nhăn ngang và dọc. Lớp vỏ dày dễ tách khỏi lớp gỗ. Lớp vỏ màu nâu nhạt, lớp gỗ màu ngà vàng.

Tiêu bản mẫu viễn chí nghiên cứu xem hình 3.1, đặc điểm hình thái của mẫu cây viễn chí xem hình 3.2:



Hình 3.1. Tiêu bản mẫu Viễn chí ba sừng nghiên cứu



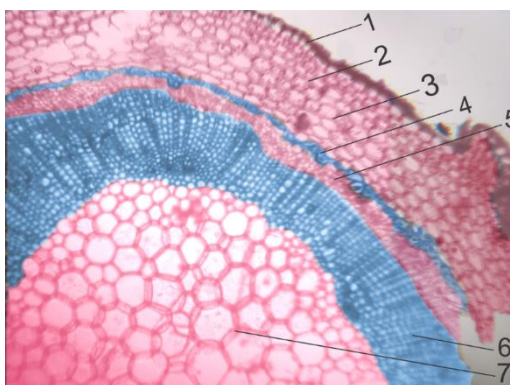
Hình 3.2. Ảnh chụp các bộ phận của cây Viễn chí ba sừng

Chú thích: (1) Toàn cây viễn chí, (2) Cành mang cụm hoa, (3) Lá (mặt trên), (4) Lá (mặt dưới), (5) Gân chính (mặt trên), (6) Gân chính (mặt dưới), (7) Mép lá mặt dưới, (8) Hoa nguyên vẹn, (9) Hoa cắt dọc, (10) Lá đài, (11) Cánh hoa, (12) Bộ nhị, (13) Bao phấn, (14) Vòi nhụy, (15) Nút nhụy, (16) Bầu nguyên vẹn, (17) Bầu cắt ngang, (18) Hạt, (19) Rễ, (20) Thân.

3.1.3. Đặc điểm vi học

3.1.3.1. Đặc điểm vi phẫu thân

Mặt cắt dọc dược liệu có hình tròn, từ ngoài vào trong có lớp biểu bì mỏng, mô dày, mô mềm mỏng, mô cứng, lớp libe, lớp gỗ, trong cùng là mô mềm ruột. Lớp biểu bì mỏng (1) gồm các tế bào đa giác thành mỏng bao quanh lớp mô dày (2) gồm những tế bào hình đa giác nhỏ, thành dày xếp đều đặn. Mô mềm vỏ (3) được cấu tạo bởi những tế bào đa giác lớn hơn, có thành mỏng. Lớp mô cứng (4) gồm những tế bào hình khối có vách dày, khoang rộng. Lớp libe (5) tương đối mịn nằm gần phần gỗ (6). Trong cùng là mô mềm ruột (7), gồm những tế bào hình lục giác, to, thành mỏng, xếp sát nhau. (Xem hình 3.3).

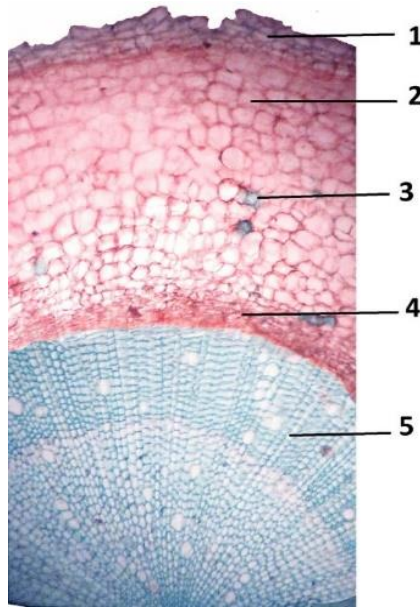


Hình 3.3. Ảnh đặc điểm vi phẫu thân cây Vienn chí ba sừng

Chú thích: (1) biểu bì mỏng; (2) mô dày; (3) mô mềm vỏ; (4) mô cứng; (5) lớp libe; (6) lớp gỗ; (7) mô mềm ruột

3.1.3.2. Đặc điểm vi phẫu rễ

Mặt cắt dọc dược liệu tròn, từ ngoài vào trong có lớp bần gồm 3-5 hàng tế bào (1). Mô mềm vỏ (2) gồm những tế bào đa giác tương đối lớn, thành mỏng. Tinh thể calci oxalat (3) hình cầu gai nằm xen kẽ với mô mềm vỏ. Lớp libe (4) mỏng nằm sát lớp gỗ (5). (Xem hình 3.4).

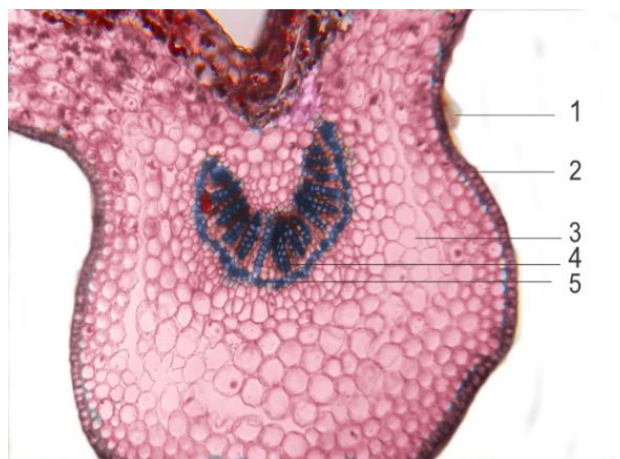


Hình 3.4. Ảnh đặc điểm vi phẫu rễ cây Viễn chí ba sừng

Chú thích:(1) lớp bần; (2) mô mềm vỏ;(3) tinh thể calci oxalat;(4) lớp libe;(5) lớp gỗ

3.1.3.3. Đặc điểm vi phẫu lá

Gân lá phía trên lõm, phía dưới lồi. Lông che chở (1) cấu tạo bởi 1 tế bào. Tiếp đến là lớp biểu bì (2) gồm 1 hàng những tế bào hình chữ nhật nhỏ xếp đều nhau. Mô mềm (3) gồm những tế bào hình đa giác to, có thành mỏng. Lớp libe – gỗ (4) tạo thành một đường cung trong đó phần libe bên ngoài bao bọc lấy phần gỗ phía trong. Bao quanh lớp libe – gỗ là lớp mô cứng (5) mỏng gồm những tế bào có thành dày hóa gỗ. (Xem hình 3.5).

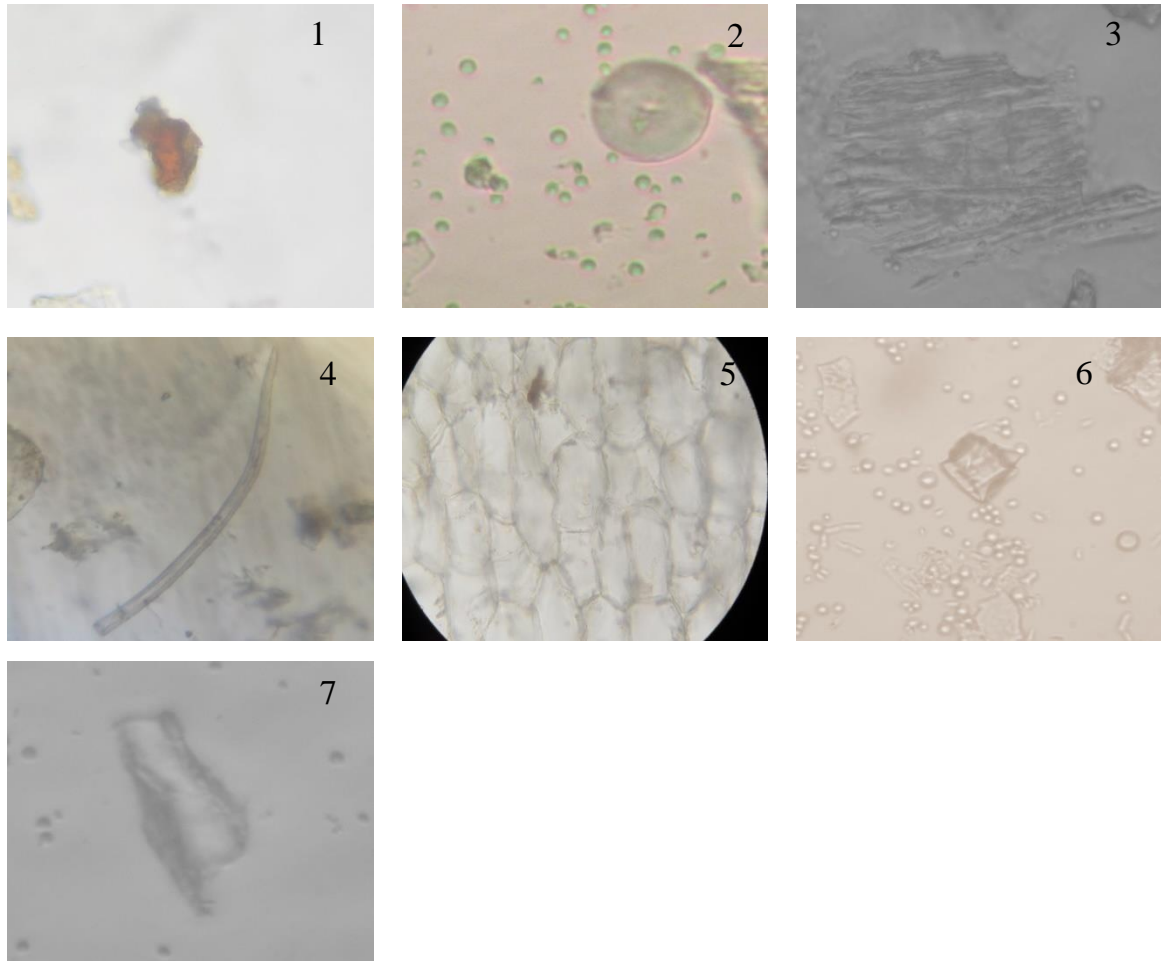


Hình 3.5. Ảnh đặc điểm vi phẫu của lá cây Viễn chí ba sừng

Chú thích:(1) lông che chở; (2) lớp biểu bì;(3) mô mềm;
(4) lớp libe-gỗ;(5) lớp mô cứng

3.1.3.4. Đặc điểm bột rễ viễn chí

Bột màu xám, không mùi, vị hơi đắng. Soi dưới kính hiển vi thấy mảnh mang màu đỏ nâu; hạt tinh bột hình tròn đứng riêng lẻ hoặc tụ lại thành đám; mô cứng có thành dày, khoang rộng; nhiều mảnh mô mềm gồm những tế bào đa giác xếp sát nhau; lông che chở đa bào có tế bào ở đầu dài và thuôn nhọn. (xem hình 3.6).



Hình 3.6. Các đặc điểm của bột rễ cây Viễn chí ba sừng

Chú thích: Mảnh mang màu (1), hạt tinh bột (2), bó sợi (3), lông che chở (4), mảnh bản(5), tinh thể calci oxalat hình khối (6), mô cứng (7).

3.2. THÀNH PHẦN HÓA HỌC

3.2.1. Kết quả định tính các nhóm hợp chất

Định tính sự có mặt của các hợp chất hữu cơ trong rễ cây Viễn chí ba sừng bằng các phản ứng với thuốc thử đặc trưng. Kết quả được trình bày trong bảng 3.1.

Bảng 3.1. Kết quả định tính các nhóm hợp chất có trong rễ cây Viễn chí ba sừng

STT	Nhóm chất	Phản ứng định tính	Kết quả	Nhận xét
1.	Saponin	Quan sát hiện tượng tạo bọt	++	Có saponin
		Phản ứng sơ bộ phân biệt saponin	Ống HCl có cột bọt cao bằng ống NaOH	
		Phản ứng Liebermann – Burchardt	++	
2.	Flavonoid	Phản ứng Cyanidin	++	Có flavonoid và hợp chất gốc OH- phenol
		Phản ứng với Sắt (III) clorid 5%	++	
3.	Tanin	Phản ứng với Gelatin 1%	-	Không có tanin
		Phản ứng với Chì acetat 10 %	-	
4.	Alcaloid	Phản ứng với TT Mayer	-	Không có alcaloid
		Phản ứng với TT Bouchardat	-	
		Phản ứng với TT Dragendoff	-	
5.	Coumarin	Phản ứng đóng mở vòng lacton	-	Không có coumarin
6.	Đường khử	Phản ứng với TT Fehling A,B	++	Có đường khử
7.	Anthranoid	Phản ứng Borntrager	-	Không có anthranoid
8.	Acid hữu cơ	Phản ứng với Na ₂ CO ₃ tinh thể	++	Có acid hữu cơ
9.	Sterol	Phản ứng với anhydride acetic + H ₂ SO ₄ đặc	+	Có sterol
10.	Chất béo	Để lại vết mờ trên giấy lọc	+	Có chất béo
11.	Glycosid tim	Phản ứng Keller – Kiliani	-	Không có glycosid tim
		Phản ứng Baljet	-	
		Phản ứng Liebermann	-	

(-): phản ứng âm tính

(+): phản ứng dương tính

(++): phản ứng dương tính rõ

Dựa vào kết quả định tính trong bảng, sơ bộ kết luận trong rễ cây Viễn chí ba sừng có các nhóm hợp chất saponin, flavonoid và có thể có hợp chất có gốc OH- phenol khác, đường khử, acid hữu cơ, chất béo, sterol.

3.2.2. Chiết xuất và phân lập các hợp chất

Rễ cây Viễn chí ba sừng *P. karensium* đã rút lõi, phơi khô, nghiền thành bột thô (4,0 kg, độ ẩm 8%) được ngâm, chiết siêu âm 3 lần với MeOH (nhiệt độ 70° C, thời gian 45 phút) thu được dịch chiết methanol. Sau khi loại dung môi dưới áp suất giảm, cặn chiết MeOH (700,0 g) được phân bố đều trong nước cất và chiết phân lớp lần lượt với *n*-hexan, dichloromethan và ethyl acetate thu được các phân đoạn cao chiết *n*-hexan (VCH, 10,3 g), CH₂Cl₂ (VCD, 21,0 g), EtOAc (VCA, 23,0 g) và phân lớp nước (VCN 633,3 g).

Một phần phân đoạn cao chiết VCA (15,0 g) được đưa lên cột pha đảo với hệ dung môi rửa giải bằng aceton/nước (1/1,5, v/v) thu được 6 phân đoạn, VCA₁-VCA₆. Phân đoạn VCA₁ tiếp tục được đưa lên cột pha đảo với hệ dung môi rửa giải bằng MeOH/nước (1/1, v/v) thu được 3 phân đoạn VCA₁₋₁-VCA₁₋₃. Phân đoạn VCA₁₋₁ được tinh chế bằng HPLC (cột J'sphere H-80 250 mm × 20 mm, sử dụng 44% acetonitril trong nước, tốc độ 3 mL/phút) thu được hai hợp chất **VC6** (8,0 mg) và **VC11** (7,0 mg). Hợp chất **VC3** (7,0 mg) thu được bằng cách tinh chế phân đoạn **VCA₁₋₃** trên máy HPLC (cột J'sphere H-80 250 mm × 20 mm, sử dụng 50% acetonitril trong nước, tốc độ 3mL/phút). Phân đoạn **VCA₃** được đưa lên cột pha đảo với hệ dung môi rửa giải bằng MeOH/nước (1,2/1, v/v) thu được 3 phân đoạn **VCA₃₋₁**- **VCA₃₋₃**. Phân đoạn **VCA₃₋₁** được tinh chế trên máy HPLC (cột J'sphere H-80 250 mm × 20 mm, sử dụng 62% acetonitril trong nước, tốc độ 3 mL/phút) thu được ba hợp chất **VC4** (7,0 mg), **VC10** (3,0 mg) và **VC9** (7,5 mg). Phân đoạn **VCA₅** được tinh chế bằng HPLC (cột J'sphere H-80 250 mm × 20 mm, sử dụng 60% acetonitril trong nước, tốc độ 3 mL/phút) thu được hợp chất **VC8** (8,0 mg).

Phần còn lại của phân đoạn cao chiết ethyl acetate (8,0 g) được đưa lên cột pha thuận với hệ dung môi khai triển dichloromethan – aceton theo gradient nồng độ với độ phân cực tăng dần từ tỷ lệ 30:1 đến 0:1, thu được 10 phân đoạn **VCA₇** - **VCA₁₇**. Phân đoạn **VCA₈** bốc hơi dung môi thu được chất 0,97 g, tiếp tục tinh chế bằng SKC pha thuận cỡ hạt 40 – 63 μm, hệ dung môi rửa giải là dichloromethan/methanol (70/1 → 0/1). Hứng dịch rửa giải vào các ống nghiệm 10ml, kiểm tra quá trình sắc ký bằng TLC, gộp các ống có cùng vết sắc ký, bốc hơi dung môi thu được 3 phân đoạn **VCA₈₋₁** -**VCA₈₋₃**. Tiếp tục đưa phân đoạn **VCA₈₋₂** lên cột sắc ký có đường kính 1cm, chiều dài 30cm với silica gel pha đảo C-18, hệ dung môi rửa giải là methanol và nước (7/3, v/v). Hứng dịch rửa giải vào ống nghiệm 5 ml, căn cứ vào sắc ký đồ TLC để gộp các ống có vết giống nhau, rồi loại bỏ hết

dung môi dưới áp suất giảm, thu được hợp chất **VC16** (10,2 mg) và hợp chất **VC17** (12,3 mg). (Các phân đoạn khác, VCA_7 và VCA_9-VCA_{17} chưa thu được chất sạch)

Phân đoạn nước VCN được cô quay loại bỏ dung môi hữu cơ sau đó đưa lên cột Diaion HP-20, loại bỏ đường bằng nước sau đó tăng dần nồng độ methanol trong nước (25, 50, 75 và 100%) thu được 4 phân đoạn, $VCN_1 - VCN_4$. Phân đoạn VCN_2 được đưa lên cột sắc ký silica gel với hệ dung môi rửa giải gradient dichloromethan/methanol (100/1 \rightarrow 0/1, v/v) thu được 4 phân đoạn, $VCN_{2-1} - VCN_{2-4}$. Phân đoạn VCN_{2-2} được đưa lên cột pha đảo với hệ dung môi rửa giải bằng aceton/nước (1/2, v/v) thu được 3 phân đoạn $VCN_{2-2-1} - VCN_{2-2-3}$. Phân đoạn VCN_{2-2-2} được tinh chế bằng HPLC (cột J'sphere H-80 250 mm \times 20 mm, sử dụng 30% acetonitril trong nước, tốc độ 3 mL/phút) thu được bốn hợp chất **VC5** (5,4 mg), **VC7** (10,5 mg), **VC2** (8,0 mg) và **VC1** (4,5 mg).

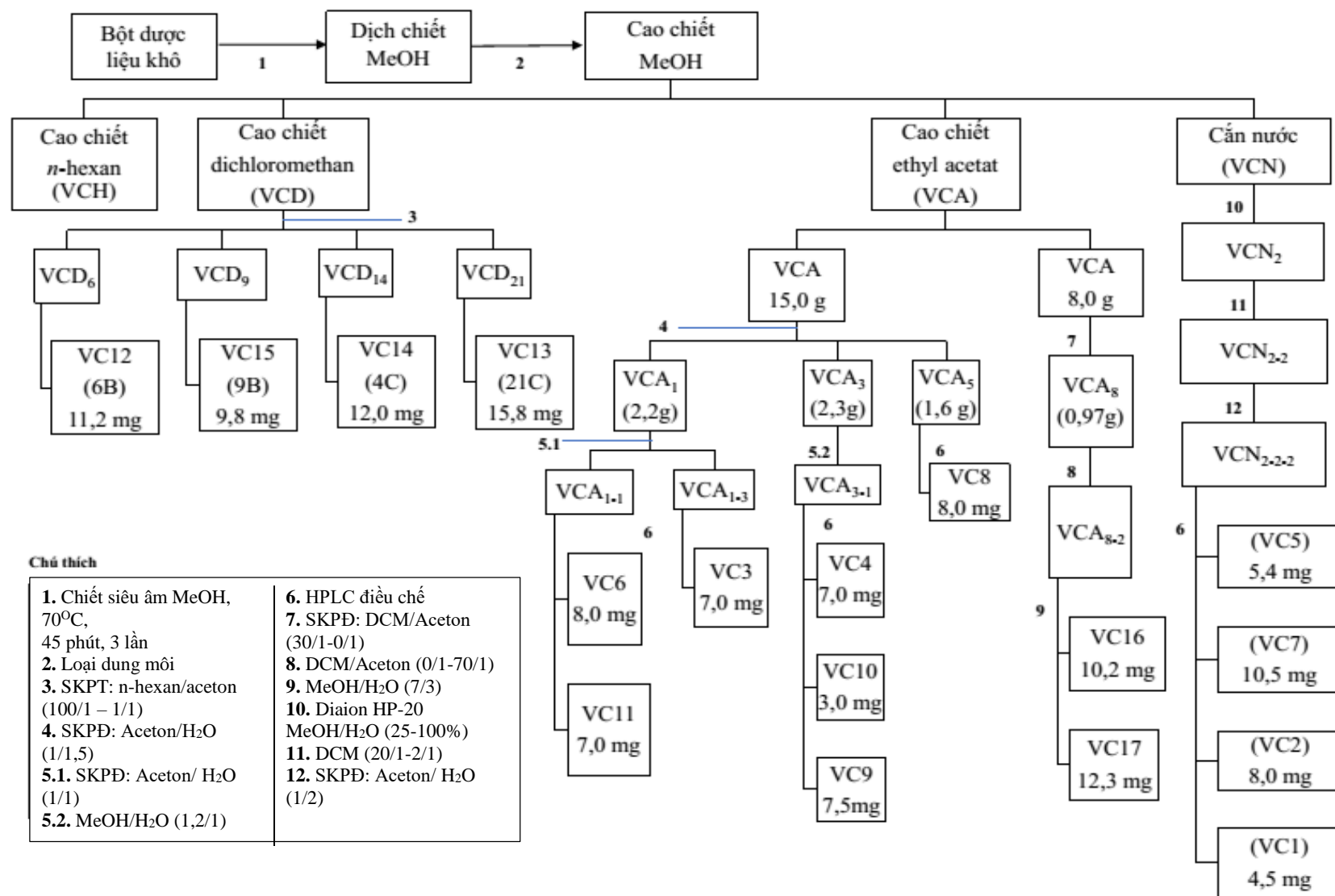
Phân đoạn cao chiết VCD (21,0 g) được đưa lên cột pha thuận với dung môi khai triển: *n*-hexan-aceton (lần lượt với các tỉ lệ 100:0 \rightarrow 1:1, v/v) thu được 26 phân đoạn, ký hiệu $VCD_1 - VCD_{26}$.

Phân đoạn VCD_6 thu được khi chạy hệ dung môi *n*-hexan/aceton (40/1). Tiến hành thu hồi dung môi được cặn, rửa cặn bằng *n*-hexan thu được tinh thể hình kim màu trắng. Kết tinh lại bằng *n*-hexan nhiều lần, kiểm tra bằng TLC đến khi thu được chất tinh khiết, thu được hợp chất **VC12** (11,2 mg).

Phân đoạn VCD_9 thu được khi chạy hệ dung môi rửa giải *n*-hexan/aceton (10/1), tiếp tục đưa phân đoạn này lên cột silica gel (kích thước 2x60 cm), rửa giải bằng hệ dung môi DCM: aceton (25:1) thu được hợp chất **VC15** (9,8 mg).

Phân đoạn VCD_{14} thu được khi chạy hệ dung môi rửa giải *n*-hexan/aceton (50/1) Sau khi cất thu hồi dung môi, thấy có kết tinh trắng, kết tinh lại nhiều lần bằng *n*-hexan thu được hợp chất **VC14** (12,0 mg).

Phân đoạn VCD_{21} thu được khi chạy hệ dung môi rửa giải *n*-hexan/aceton (1/1). Tiến hành thu hồi dung môi được cặn, rửa cặn bằng *n*-hexan sau đó rửa bằng aceton thu được tinh thể màu trắng. Tinh chế bằng cách hòa tan tinh thể trong dichloromethan rồi để bay hơi đến cặn, kết tinh lại bằng aceton. Lặp lại quá trình này nhiều lần thu được hợp chất **VC13** (15,8 mg).



Hình 3.8. Sơ đồ phân lập các chất từ rễ Viễn chí ba sừng

Như vậy, từ các phân đoạn thu được các hợp chất như sau:

Phân đoạn	Hợp chất thu được
Dichloromethan	VC12, VC13, VC14, VC15
Ethyl acetat	VC3, VC4, VC6, VC9, VC8, VC10, VC11, VC16, VC17
Căn nước	VC1, VC2, VC5, VC7

3.2.3. Xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất phân lập từ rễ Viễn chí ba sừng

Tiến hành xác định cấu trúc các chất phân lập được từ rễ Viễn chí ba sừng bằng các phương pháp xác định cấu trúc theo mục 2.2.2.3., kết quả thu được như sau.

3.2.3.1. Hợp chất VC1

Hợp chất **VC1** thu được dưới dạng bột vô định hình màu trắng. Trên phổ $^1\text{H-NMR}$ của **VC1** thấy xuất hiện tín hiệu: hai proton olefin tại δ_{H} 6,56 (1H, d, $J = 16,0$ Hz, H-8'') và 7,74 (1H, d, $J = 16,0$ Hz, H-7''), với hằng số tương tác lớn ($J = 16\text{Hz}$) cho thấy cấu trúc không gian của hợp chất **VC1** có cấu hình *E*. Năm proton thơm tại δ_{H} 7,49 (2H, t, $J = 8,0$ Hz, H-3''' và H-5'''), 7,61 (1H, t, $J = 8,0$ Hz, H-4''') và 8,06 (2H, d, $J = 8,0$ Hz, H-2''' và H-6'''), hai proton thơm của vòng có các nhóm thế đối xứng tại δ_{H} 6,97 (2H, s, H-2'' và H-6''), và ba nhóm methoxy tại δ_{H} 3,81 (3H, s, 4''-OMe) và 3,88 (6H, s, 3''-Ome và 5''-OMe). Ngoài ra, trên phổ còn xuất hiện tín hiệu của một proton anome tại δ_{H} 5,52 (1H, d, $J = 3,5$ Hz, H-1').

Trên phổ $^{13}\text{C-NMR}$ và HSQC của **VC1** thấy xuất hiện tín hiệu của ba mươi một (31) carbon trong đó có hai carbon carbonyl tại δ_{C} 167,7 và 168,1; sáu carbon không liên kết trực tiếp với hydro tại δ_{C} 104,9; 131,2; 131,5; 141,4 và 154,8 \times 2; mười bảy (17) carbon methine tại δ_{C} 71,6; 72,5; 73,1; 74,1; 74,9; 79,8; 84,2; 93,2; 107,0 \times 2; 117,8; 129,6 \times 2; 130,7 \times 2; 134,3 và 147,2; ba carbon methylen tại δ_{C} 63,3; 65,5 và 65,6; và ba carbon methoxy tại δ_{C} 56,8 \times 2 và 61,2. Phân tích phổ $^1\text{H-},^{13}\text{C-NMR}$ của hợp chất **VC1** cho thấy cấu trúc của hợp chất này tương tự với hợp chất 3-*O*-[(*E*)-3,4,5-trimethoxycinnamoyl]- β -D-fructofuranosyl-(2 \rightarrow 1)-(6-*O*-benzoyl)- α -D-glucopyranosid [96]. Vị trí của các nhóm thế và nhóm chức của **VC1** được xác định dựa trên các phân tích phổ HMBC. (Các phổ của hợp chất xem phụ lục 2.1.).

Độ dịch chuyển carbon tại δ_{C} 93,2; 73,1; 74,9; 71,6; 72,5 và 65,5 kết hợp với proton anome tại δ_{H} 5,52 (1H, d, $J = 3,5$ Hz); và độ dịch chuyển carbon tại δ_{C} 65,6; 104,9; 79,8; 74,1; 84,2 và 63,3; kết hợp với tương tác HMBC giữa glc H-1' (δ_{H} 5,52) và fru C-2 (δ_{C} 104,9) gợi ý sự có mặt của đường sucrose (β -D-fructofuranosyl-(2 \rightarrow 1)- α -D-glucopyranosid). Nhóm (*E*)-3,4,5-trimethoxycinnamoyl được xác định tại vị trí fru C-3 dựa

vào tương tác HMBC từ fru H-3 (δ_H 5,51) đến C-9'' (δ_C 167,7), từ H-6'' (δ_H 6,97) đến C-1'' (δ_C 131,5)/C-2'' (δ_C 107,0)/C-4'' (δ_C 141,4)/C-5'' (δ_C 154,8)/C-7'' (δ_C 147,2), từ H-7'' (δ_H 7,74) đến C-1'' (δ_C 131,5)/C-2'' (δ_C 107,0)/C-6'' (δ_C 107,0)/C-8'' (δ_C 117,8)/C-9'' (δ_C 167,7), từ nhóm methoxy (δ_H 3,88) đến C-3''/C-5'' (δ_C 154,8) và nhóm methoxy (δ_H 3,81) đến C-4'' (δ_C 141,4). Tương tác HMBC từ H-6''' (δ_H 8,06) đến C-2''' (δ_C 130,7)/C-4''' (δ_C 134,3)/C-7''' (δ_C 168,1), từ H-5''' (δ_H 7,49) đến C-1''' (δ_C 131,2)/C-3''' (δ_C 129,6), từ glc H-6' (δ_H 4,49/4,72) đến C-7''' (δ_C 168,1) gợi ý sự có mặt nhóm benzoyl tại vị trí glc C-6'.

Từ các phân tích phổ trên, cấu trúc của hợp chất **VC1** được xác định là **3-O-[(E)-3,4,5-trimethoxycinnamoyl]- β -D-fructofuranosyl-(2 \rightarrow 1)-(6-O-benzoyl)- α -D-glucopyranosid**, hợp chất này đã được công bố năm 1993 từ loài *Polygala tenuifolia* [96].

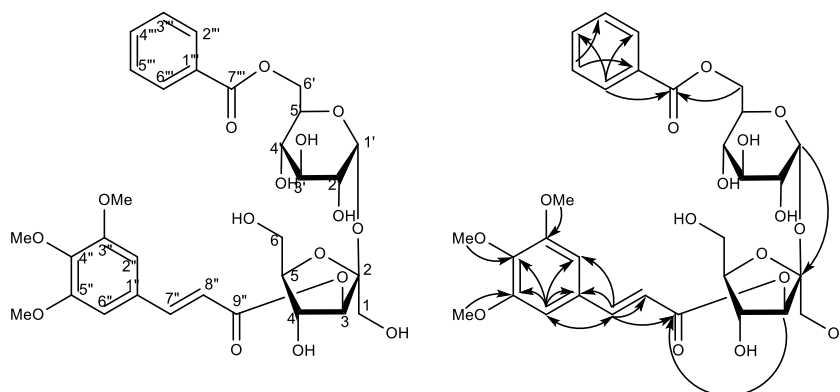
Bảng 3.2. Số liệu NMR của hợp chất **VC1** và hợp chất tham khảo

C	$\delta_C^{\#}$	δ_C^a	δ_H^a (mult., J = Hz)
Fru			
1	65,5	65,6	3,63 (d, 12,0) 3,68 (d, 12,0)
2	104,8	104,9	-
3	79,6	79,8	5,51 (d, 8,0)
4	73,9	74,1	4,40 (t, 8,0)
5	84,0	84,2	3,95 (m)
6	63,2	63,3	3,74 (dd, 3,0; 12,0) 3,81 (br d, 12,0)
Glc			
1'	93,0	93,2	5,52 (d, 3,5)
2'	73,0	73,1	3,51 (dd, 3,5; 9,0)
3'	74,8	74,9	3,72 (t, 9,0)
4'	71,4	71,6	3,50 (t, 9,0)
5'	72,3	72,5	4,28 (m)
6'	65,5	65,5	4,49 (dd, 5,0; 12,0) 4,72 (dd, 1,5; 12,0)
Tmc			
1''	131,3	131,5	-
2'', 6''	106,8	107,0	6,97 (s)
3'', 5''	154,6	154,8	-
4''	141,2	141,4	-
7''	147,2	147,2	7,74 (d, 16,0)
8''	117,6	117,8	6,56 (d, 16,0)
9''	167,7	167,7	-
3'', 5''-OMe	56,7	56,8	3,88 (s)
4''-OMe	61,1	61,2	3,81 (s)
Bz			
1'''	131,1	131,2	-

2''', 6'''	130,6	130,7	8,06 (d, 8,0)
3''', 5'''	129,5	129,6	7,49 (t, 8,0)
4'''	134,3	134,3	7,61 (t, 8,0)
7'''	167,9	168,1	-

Chú thích:

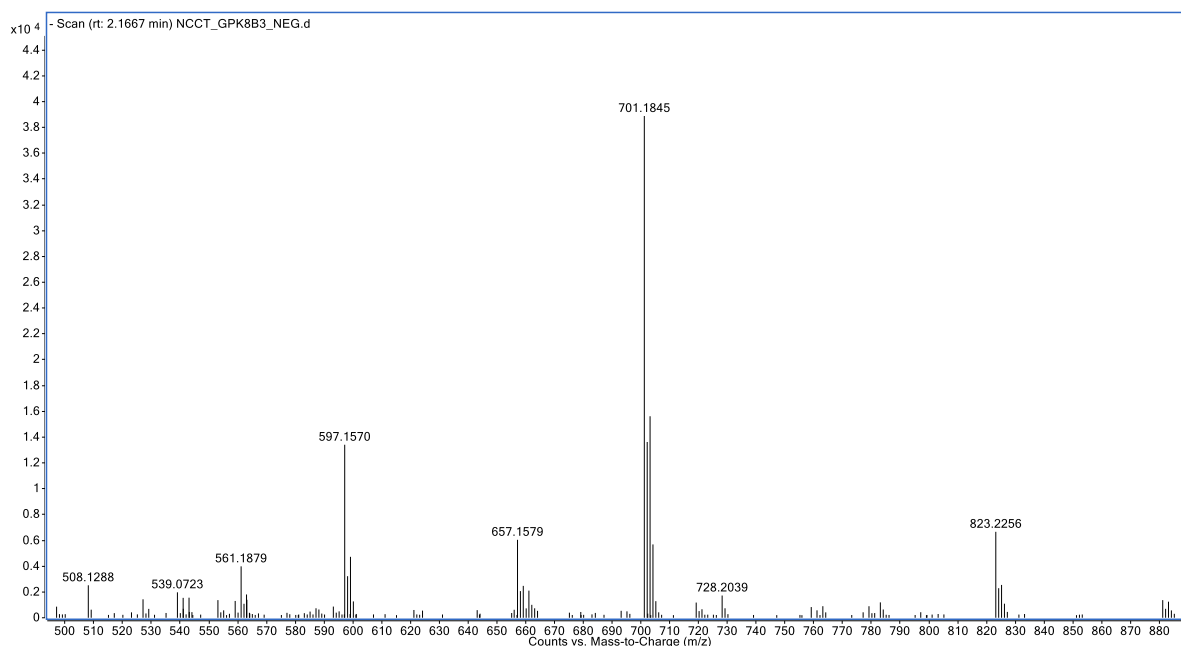
^ađo trong CD₃OD, # δ_C của 3-O-[(E)-3,4,5-trimethoxycinnamoyl]- β -D-fructofuranosyl-(2 \rightarrow 1)-(6-O-benzoyl)- α -D-glucopyranosid đo trong CD₃OD [96], Fru: fructofuranosyl, Glc: glucopyranosyl, Tmc: 3,4,5-trimethoxycinnamoyl, Bz: benzoyl.



Hình 3.9. CTHH và tương tác HMBC chính của hợp chất VC1

3.2.3.2. Hợp chất VC2: chất mới karensucrose A

Hợp chất số VC2 thu được dưới dạng bột vô định hình màu trắng. Công thức phân tử: C₃₁H₃₈O₁₆, M = 666 (Tính toán: M = 666,2160 và [M+³⁵Cl]⁻ = 701,1848). Trên phổ HR-ESI-MS của VC2 xuất hiện pic ion giả phân tử tại m/z 701,1845 [M+³⁵] cho phép kết luận công thức phân tử của VC2 được xác định là C₃₁H₃₈O₁₆.



Hình 3.12. Phổ HR ESI MS của hợp chất VC1

(dạng $[M+^{35}Cl]^-$)

Phổ 1H -NMR của **VC2** xuất hiện tín hiệu của hai proton olefin tại δ_H 6,06 (1H, d, $J = 12,0$ Hz) và 6,98 (1H, d, $J = 12,0$ Hz). So sánh với hợp chất **VC1** cho thấy, hằng số tương tác của 2 proton này thấp hơn ($12\text{Hz} < 16\text{ Hz}$) nên cấu hình không gian của hợp chất **VC2** không phải là cấu hình *E* mà là cấu hình *Z*, bên cạnh đó hợp chất **VC2** có cấu trúc khá lớn, điều này có thể dẫn đến nhiều tương tác làm xoay góc nhị diện của 2 proton olefin ở cùng phía của hợp chất **VC2** có cấu hình *Z* này dẫn đến việc làm tăng hằng số tương tác. Năm proton thơm tại δ_H 7,50 (2H, dd, $J = 7,5; 8,0$ Hz), 7,62 (1H, t, $J = 7,5$ Hz) và 8,07 (2H, d, $J = 8,0$ Hz), hai proton thơm của vòng có các nhóm thế đối xứng tại δ_H 7,19 (2H, s), và ba nhóm methoxy tại δ_H 3,82 (3H, s) và 3,87 (6H, s). Ngoài ra, trên phổ còn xuất hiện tín hiệu của một proton anome tại δ_H 5,49 (1H, d, $J = 4,0$ Hz).

Trên phổ ^{13}C -NMR và HSQC của **VC2** thấy xuất hiện tín hiệu của ba mươi một (31) carbon, bao gồm: hai carbon carbonyl tại δ_C 167,0 và 168,1; sáu carbon không liên kết trực tiếp với hydro tại δ_C 104,8; 131,3; 131,7; 140,5 và $154,0 \times 2$; mười bảy carbon methine tại δ_C 71,5; 72,3; 73,1; 73,9; 74,8; 79,5; 84,1; 93,2; $109,5 \times 2$; 118,7; $129,6 \times 2$; $130,7 \times 2$; 134,3 và 145,7; ba carbon methylen tại δ_C 63,3; 65,2 và 65,6; và ba carbon methoxy tại δ_C $56,8 \times 2$ và 61,1. Số liệu phổ 1H -, ^{13}C -NMR của hợp chất **VC2** giống với hợp chất **VC1**, ngoại trừ sự khác biệt cấu hình *Z*- của nhóm 3,4,5-trimethoxycinnamoyl tại C-7'' và C-8''. (Các phổ của hợp chất **VC2** xem phụ lục 2.2.).

Các đơn vị đường trong hợp chất **VC2** được xác định theo phương pháp ở mục 2.2.3. Dựa trên thời gian lưu các đỉnh trùng với thời gian lưu của các đường chuẩn, xác định được các đường trong **VC2** bao gồm glucose và fructose. (Các sắc kí đồ GC xem phụ lục 3.).

Tương tác HMBC giữa glc H-1' (δ_H 5,49) và fru C-2 (δ_C 104,8) gợi ý trật tự liên kết của các phân tử đường là β -D-fructofuranosyl-(2 \rightarrow 1)- α -D-glucopyranosid (đường sucrose). Nhóm (*Z*)-3,4,5-trimethoxycinnamoyl được xác định tại vị trí fru C-3 dựa vào tương tác HMBC từ fru H-3 (δ_H 5,48) đến C-9'' (δ_C 167,0), từ H-6'' (δ_H 7,19) đến C-1'' (δ_C 131,7)/C-2'' (δ_C 109,5)/C-4'' (δ_C 140,5)/C-5'' (δ_C 154,0)/C-7'' (δ_C 145,7), từ H-7'' (δ_H 6,98) đến C-2'' (δ_C 109,5)/C-6'' (δ_C 109,5)/C-8'' (δ_C 118,7)/C-9'' (δ_C 167,0), từ nhóm methoxy (δ_H 3,87) đến C-3''/C-5'' (δ_C 154,0) và nhóm methoxy (δ_H 3,82) đến C-4'' (δ_C 140,5). Tương tác HMBC từ H-5''' (δ_H 7,50) đến C-1''' (δ_C 131,3)/C-3''' (δ_C 129,6), từ H-6''' (δ_H 8,07) đến C-2''' (δ_C 130,7)/C-4''' (δ_C 134,3)/C-7''' (δ_C 168,1), từ glc H-6' (δ_H 4,52/4,66) đến C-7''' (δ_C 168,1) gợi ý sự có mặt nhóm benzoyl tại vị trí glc C-6'. Từ các phân tích phổ trên, cấu trúc

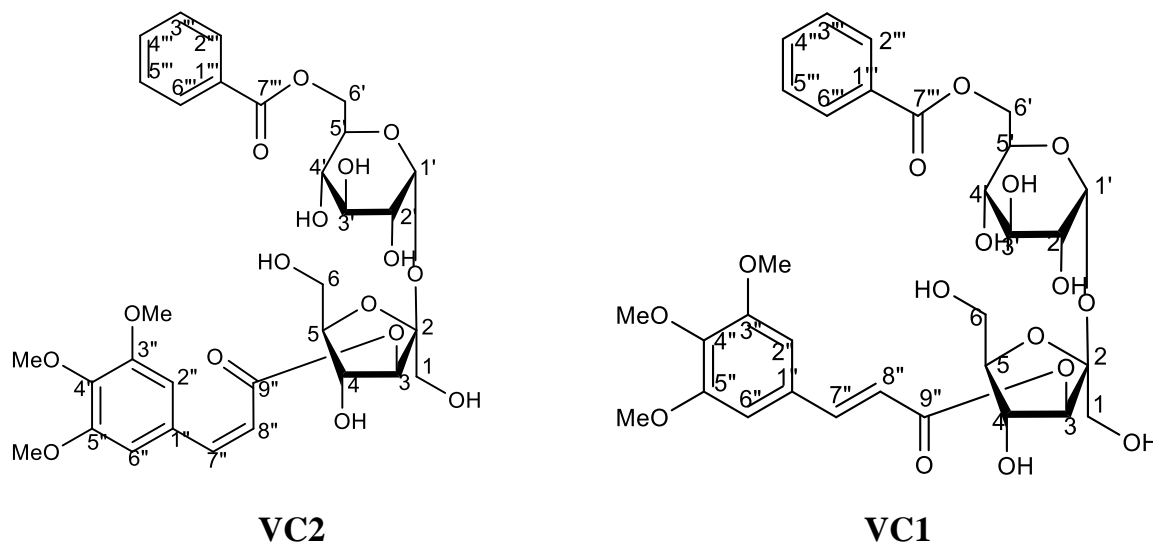
của hợp chất VC2 được xác định là **3-O-[(Z)-3,4,5-trimethoxycinnamoyl]- β -D-fructofuranosyl-(2 \rightarrow 1)-(6-O-benzoyl)- α -D-glucopyranosid**. Tra cứu trên cơ sở dữ liệu Scifinder cho thấy chưa có công bố nào thông báo về cấu trúc của hợp chất này. Vì vậy, đây là một hợp chất mới và được đặt tên là **karensucrose A**.

Bảng 3.3. Số liệu NMR của hợp chất VC2 và hợp chất tham khảo

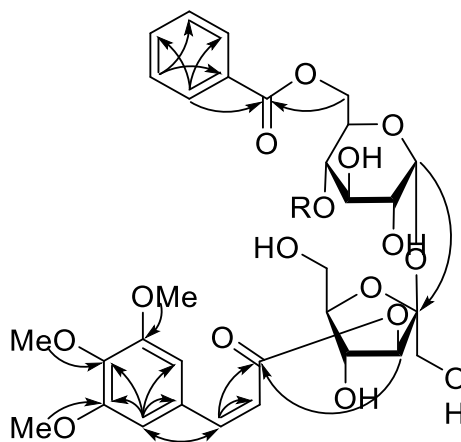
C	$\delta_C^{\#}$	δ_C^a	δ_H^a (mult., J = Hz)
Fru			
1	65,6	65,6	3,61 (d, 12,0) 3,67 (d, 12,0)
2	104,9	104,8	-
3	79,8	79,5	5,48 (d, 8,0)
4	74,1	73,9	4,34 (t, 8,0)
5	84,2	84,1	3,91 (m)
6	63,3	63,3	3,68 (dd, 4,5, 12,0) 3,77 (dd, 6,5, 12,0)
Glc			
1'	93,2	93,2	5,49 (d, 4,0)
2'	73,1	73,1	3,48 (dd, 4,0, 9,0)
3'	74,9	74,8	3,68 (t, 9,0)
4'	71,6	71,5	3,50 (t, 9,0)
5'	72,5	72,3	4,17 (m)
6'	65,5	65,2	4,52 (dd, 4,5, 12,0) 4,66 (dd, 2,0, 12,0)
Tmc			
1''	131,5	131,7	-
2'', 6''	107,0	109,5	7,19 (s)
3'', 5''	154,8	154,0	-
4''	141,4	140,5	-
7''	147,2	145,7	6,98 (d, 12,0)
8''	117,8	118,7	6,06 (d, 12,0)
9''	167,7	167,0	-
3'', 5''-OMe	56,8	56,8	3,87 (s)
4''-OMe	61,2	61,1	3,82 (s)
Bz			
1'''	131,2	131,3	-
2''', 6'''	130,7	130,7	8,07 (d, 8,0)
3''', 5'''	129,6	129,6	7,50 (dd, 7,5, 8,0)
4'''	134,3	134,3	7,62 (t, 7,5)
7'''	168,1	168,1	-

Chú thích:

a đo trong CD_3OD , $^{\#}\delta_C$ của hợp chất **VC2** đo trong CD_3OD , Fru: fructofuranosyl, Glc: glucopyranosyl, Tmc: 3,4,5-trimethoxycinnamoyl, Bz: benzoyl.



Hình 3.13. CTHH của hợp chất **VC2** và hợp chất tham khảo **VC1**

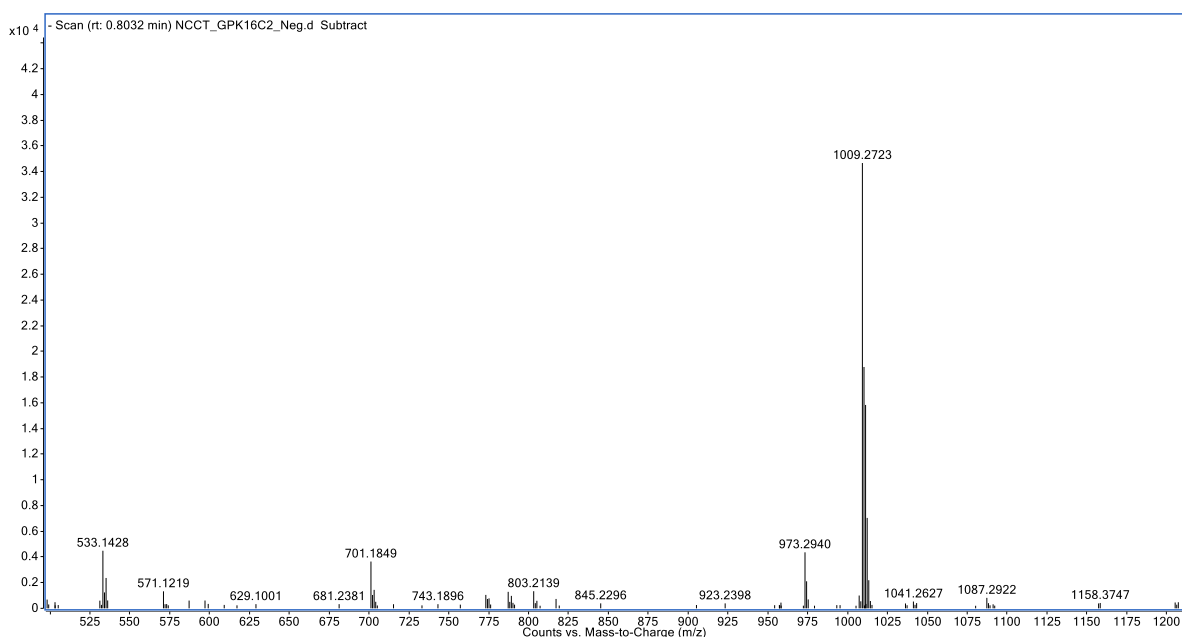


Hình 3.14. Tương tác HMBC chính của hợp chất **VC2**

3.2.3.3. Hợp chất **VC3** : chất mới *karensucrose B*

Hợp chất **VC3** thu được dưới dạng bột vô định hình, màu trắng.

Phổ HR-ESI-MS của **VC3** xuất hiện pic ion giả phân tử tại m/z 1009,2723 [M^{+35}] cho phép kết luận công thức phân tử của **VC3** được xác định là $C_{46}H_{54}O_{23}$. (Tính toán: $M = 974,3056$ và [$M^{+35}Cl$] $^- = 1009,2744$).



Hình 3.15. Phổ HR ESI MS của hợp chất VC3
(dạng $[M+^{35}Cl]^-$)

Phổ 1H -NMR của VC3 xuất hiện tín hiệu của sáu proton olefin tại δ_H 6,29 (1H, d, $J = 16.0$ Hz), 6,51 (1H, d, $J = 16.0$ Hz), 6,58 (1H, d, $J = 16,0$ Hz), 7,50 (1H, d, $J = 16,0$ Hz), 7,58 (1H, d, $J = 16,0$ Hz) và 7,5 (1H, d, $J = 16,0$ Hz). Các proton này đều có hằng số tương tác lớn ($J = 16$ Hz), điều này có thể kết luận được cấu trúc không gian của chúng là đồng phân *E*. Trên phổ HMBC cho thấy tương tác giữa H-2'' và H-6'' (δ_H 6,96) đến C-7'' (δ_C 147,7); (H-2''' và H-6''' (δ_H 6,80) đến C-7''' (δ_C 147,1); H-2'''' và H-6'''' (δ_H 6,85) đến C-7'''' (δ_C 148,2); ngoài ra sáu proton thơm của ba vòng có các nhóm thế đối xứng tại δ_H 6,96 (2H'', s), 6,80 (2H''', s), 6,85 (2H''', s) và điều này cho thấy các nhóm thế trên vòng thơm là đồng đều (3 nhóm methoxy ở vị trí 3,4,5 của vòng thơm số 2 và 2 nhóm methoxy ở vị trí 3,5 của vòng thơm số 3 và số 4). Bảy nhóm methoxy tại δ_H 3,79 (3H, s), 3,81 (6H, s), 3,86 (6H, s) và 3,87 (6H, s), và một proton anome tại δ_H 5,59 (1H, d, $J = 4,0$ Hz).

Trên phổ ^{13}C -NMR và HSQC của VC3 thấy xuất hiện tín hiệu của bốn mươi sáu (46) carbon, trong đó có: ba carbon carbonyl tại δ_C 167,4; 168,0 và 169,3; mười ba carbon không liên kết trực tiếp với hydro tại δ_C 105,4; 126,4; 126,7; 131,4; 139,6; 139,9; 141,4; 149,3 \times 2; 149,4 \times 2 và 154,8 \times 2; hai mươi carbon methine tại δ_C 72,2; 72,9; 73,1; 75,0; 76,5; 77,2; 82,9; 93,0; 107,0 \times 4; 107,2 \times 2; 114,7; 116,1; 117,6; 147,1; 147,7 và 148,2; ba carbon methylen tại δ_C 64,0; 65,2 và 66,0; và bảy carbon methoxy tại δ_C 56,8 \times 4; 56,9 \times 2 và 61,2. Phân tích số liệu phổ 1H -NMR, ^{13}C -NMR của hợp chất VC3 cho thấy cấu trúc hợp chất này giống với hợp chất (3,4-*O*-disinapoyl)- β -D-fructofuranosyl-(2 \rightarrow 1)-(6-*O*-

sinapoyl)- α -D-glucopyranosid (chất VC3'), ngoại trừ sự xuất hiện thêm một nhóm methoxy tại C-4". (Các phổ của hợp chất xem phụ lục 2.3.).

Thành phần đường của **VC3** dựa theo phương pháp ở mục 2.2.3. được xác định là glucose và fructose (các phổ GC của đường chuẩn và phân đường của VC3 xem phụ lục 3). Tương tác HMBC giữa glc H-1' (δ_H 5,59) và fru C-2 (δ_C 105,4) gợi ý trật tự liên kết trong phân tử đường là β -D-fructofuranosyl-(2 \rightarrow 1)- α -D-glucopyranosid (đường sucrose). Nhóm (*E*)-3,4,5-trimethoxycinnamoyl được xác định tại vị trí fru C-3 dựa vào tương tác HMBC từ fru H-3 (δ_H 5,87) đến C-9" (δ_C 167,4). Tương tác HMBC giữa glc H-6' (δ_H 4,22/4,78) đến C-9'" (δ_C 169,3) xác định vị trí nhóm sinapoyl tại glc C-6'. Nhóm sinapoyl tại vị trí fru C-4 được xác định dựa vào tương tác HMBC từ fru H-4 (δ_H 5,73) đến C-9'''' (δ_C 168,0). Như vậy, cấu trúc của hợp chất **VC3** được xác định là **[3-O-(*E*)-3,4,5-trimethoxycinnamoyl]-[4-O-sinapoyl]- β -D-fructofuranosyl-(2 \rightarrow 1)-(6-O-sinapoyl)- α -D-glucopyranosid**. Đây là một hợp chất mới và được đặt tên là **karensucrose B**.

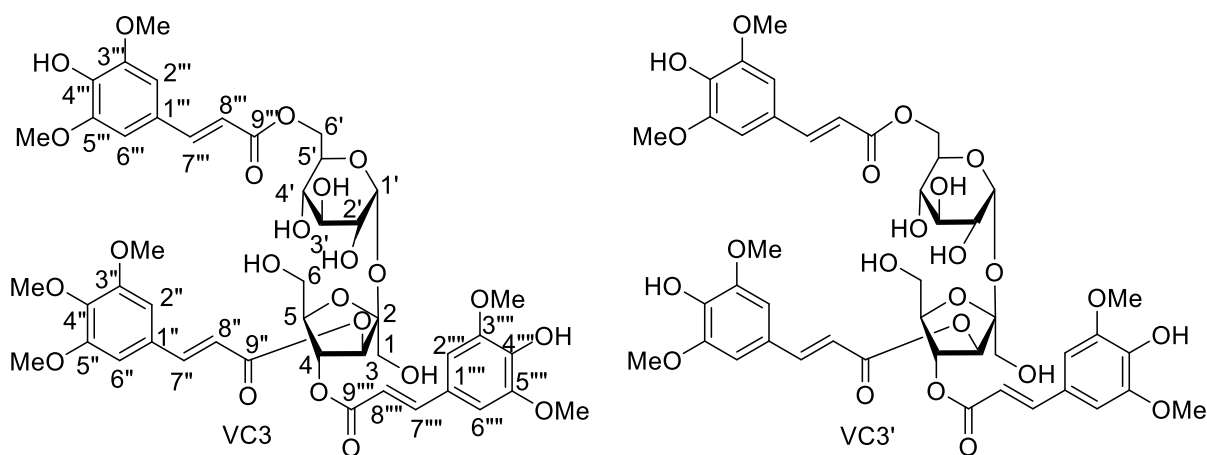
Bảng 3.4. Số liệu NMR của hợp chất VC3 và hợp chất tham khảo

C	$\delta_C^{\#}$	δ_C^a	δ_H^a (mult., $J = \text{Hz}$)
Fru			
1	65,2	65,2	3,65 (d, 12,0) 3,69 (d, 12,0)
2	105,5	105,4	-
3	77,1	77,2	5,87 (d, 7,5)
4	76,6	76,5	5,73 (t, 7,5)
5	83,0	82,9	4,21 (m)
6	64,2	64,0	3,96 (dd, 4,0; 12,0) 4,01 (dd, 7,0; 12,0)
Glc			
1'	93,0	93,0	5,59 (d, 4,0)
2'	73,2	73,1	3,54 (dd, 4,0; 9,0)
3'	75,1	75,0	3,73 (t, 9,0)
4'	72,3	72,2	3,32 (m)
5'	73,0	72,9	4,39 (m)
6'	66,1	66,0	4,22 (dd, 6,5; 11,5) 4,78 (dd, 1,5; 11,5)
	Sin	Tmc	
1"	126,6	131,4	-
2", 6"	107,2	107,2	6,96 (s)
3", 5"	149,5	154,8	-
4"	139,9	141,4	-
7"	148,5	147,7	7,75 (d, 16,0)
8"	115,3	117,6	6,58 (d, 16,0)
9"	167,9	167,4	-

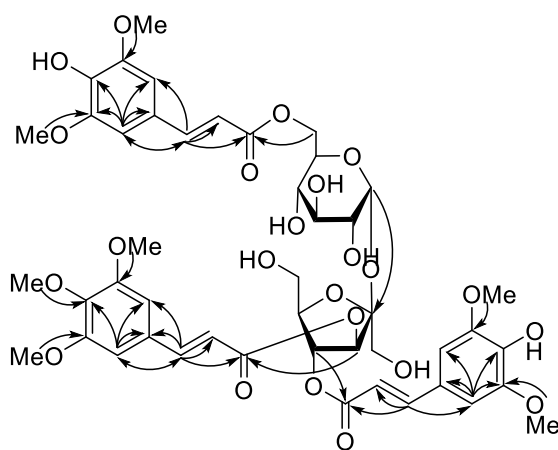
3'', 5''-OMe	57,0	56,8	3,86 (s)
4''-OMe		61,2	3,79 (s)
Sin			
1'''	126,7	126,4	-
2''', 6'''	107,2	107,0	6,80 (s)
3''', 5'''	149,4	149,4	-
4'''	139,6	139,9	-
7'''	147,2	147,1	7,58 (d, 16,0)
8'''	116,2	116,1	6,51 (d, 16,0)
9'''	169,4	169,3	-
3''', 5'''-OMe	57,0	56,9	3,87 (s)
Sin			
1''''	126,5	126,7	-
2''', 6''''	107,0	107,0	6,85 (s)
3''', 5''''	149,5	149,3	-
4''''	139,8	139,6	-
7''''	148,4	148,2	7,50 (d, 16,0)
8''''	114,8	114,7	6,29 (d, 16,0)
9''''	168,2	168,0	-
3''', 5''''-OMe	56,9	56,8	3,81 (s)

Chú thích:

^ađo trong CD₃OD, [#]δ_C của (3,4-O-disinapoyl)- β-D-fructofuranosyl-(2→1)-(6-O-sinapoyl)-α-D-glucopyranosid đo trong CD₃OD [96]; Fru: fructofuranosyl, Glc: glucopyranosyl, Tmc: 3,4,5-trimethoxycinnamoyl, Sin: Sinapoyl.



Hình 3.16. Cấu trúc hóa học của hợp chất VC3 và hợp chất tham khảo



Hình 3.17. Tương tác HMBC chính của hợp chất VC3

3.2.3.4. Hợp chất VC4

Hợp chất **VC4** thu được dưới dạng bột vô định hình màu trắng. Trên phổ $^1\text{H-NMR}$ của **VC4** thấy xuất hiện tín hiệu của hai proton olefin tại δ_{H} 6,59 (1H, d, $J = 16,0$ Hz) và 7,74 (1H, d, $J = 16,0$ Hz), năm proton thơm tại δ_{H} 7,49 (2H, dt, $J = 1,5; 8,0$ Hz), 7,62 (1H, dt, $J = 1,5; 8,0$ Hz) và 8,07 (2H, dd, $J = 1,5; 8,0$ Hz), hai proton thơm của vòng có các nhóm thế đối xứng tại δ_{H} 6,99 (2H, s), ba nhóm methoxy tại δ_{H} 3,81 (3H, s) và 3,89 (6H, s), ba proton methyl tại δ_{H} 1,83 (3H, s), và một proton anome tại δ_{H} 5,55 (1H, d, $J = 3,5$ Hz).

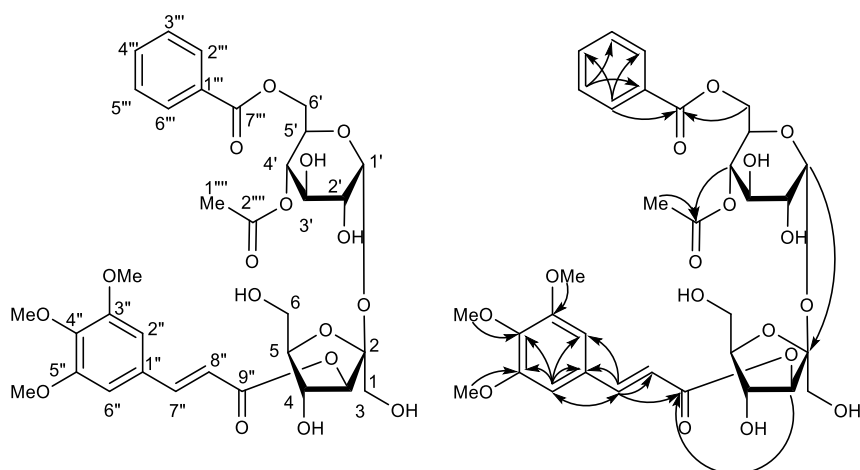
Trên phổ $^{13}\text{C-NMR}$ và HSQC của **VC4** thấy xuất hiện tín hiệu của ba mươi ba (33) carbon trong đó có ba carbon carbonyl; sáu carbon không liên kết trực tiếp với hydro; mười bảy carbon methine; ba carbon methylen; một carbon methyl và ba carbon methoxy. Số liệu phổ $^1\text{H-}, ^{13}\text{C-NMR}$ của hợp chất **VC4** thấy tương tự hợp chất **VC3**, ngoại trừ xuất hiện thêm một nhóm acetyl tại glc C-4'. So sánh số liệu phổ của hợp chất **VC4** với số liệu phổ công bố của tricornose B [82] thấy có sự tương đồng ở các vị trí tương ứng. Vị trí nhóm acetyl tại glc C-4' được xác định dựa trên tương tác HMBC từ glc H-4' (δ_{H} 4,93) đến Ac C-2''' (δ_{C} 171,9). (Các phổ của hợp chất xem phụ lục 2.4.).

Từ các phân tích phổ trên, hợp chất **VC4** được xác định là **tricornose B**, hợp chất này đã được phân lập từ loài nghiên cứu *Polygala karensium* Kurz vào năm 2005 [82]. Hợp chất này có danh pháp là **3-O-[(E)-3,4,5,-trimethoxycinnamoyl]- β -D-fructofuranosyl-(2 \rightarrow 1)-(4-O-acetyl)-(6-O-benzoyl)- α -D-glucopyranosid**.

Bảng 3.5. Số liệu NMR của hợp chất VC4 và hợp chất tham khảo

C	$\delta_C^{\#}$	δ_C^a	δ_H^a (mult., $J = \text{Hz}$)
Fru			
1	65,5	65,7	3,69 (d, 12,0) 3,72 (d, 12,0)
2	105,2	105,6	-
3	80,2	80,3	5,44 (d, 7,0)
4	73,9	74,6	4,35 (t, 7,0)
5	84,7	84,9	3,96 (m)
6	62,2	63,2	3,72 (dd, 4,0; 12,0) 3,77 (dd, 6,0; 12,0)
Glc			
1'	92,8	93,2	5,55 (d, 3,5)
2'	72,9	73,0	3,58 (dd, 3,5; 9,5)
3'	72,3	72,6	3,79 (m)
4'	71,5	72,5	4,93 (t, 9,5)
5'	69,8	70,2	4,36 (m)
6'	63,8	64,6	4,31 (dd, 5,0; 12,0) 4,54 (dd, 3,0; 12,0)
Tmc			
1''	131,0	131,5	-
2'', 6''	106,9	107,1	6,99 (s)
3'', 5''	154,6	154,9	-
4''	141,5	141,7	-
7''	146,6	147,3	7,74 (d, 16,0)
8''	117,6	117,6	6,59 (d, 16,0)
9''	166,7	167,6	-
3'', 5''-OMe	56,6	56,9	3,89 (s)
4''-OMe	60,6	61,2	3,81 (s)
Bz			
1'''	130,7	131,0	-
2''', 6'''	130,4	130,7	8,07 (dd, 1,5; 8,0)
3''', 5'''	129,3	129,6	7,49 (dt, 1,5; 8,0)
4'''	133,9	134,4	7,62 (dt, 1,5; 8,0)
7'''	166,6	167,8	-
Ac			
1''''	20,6	20,6	1,83 (s)
2''''	170,2	171,9	-

^ađo trong CD₃OD, [#] δ_C của tricornose B đo trong acetone-d₆[82], Fru: fructofuranosyl, Glc: glucopyranosyl, Tmc: 3,4,5-trimethoxycinnamoyl, Bz: benzoyl, Ac: acetyl.



Hình 3.18. CTHH và tương tác HMBC chính của hợp chất VC4

3.2.3.5. Hợp chất VC5

Phổ $^1\text{H-NMR}$ của **VC5** thấy xuất hiện tín hiệu: bốn proton olefin tại δ_{H} 6,43 (1H, d, $J = 16,0$ Hz), 6,56 (1H, d, $J = 16,0$ Hz), 7,64 (1H, d, $J = 16,0$ Hz) và 7,73 (1H, d, $J = 16,0$ Hz), hằng số tương tác J lớn cho phép kết luận cấu hình *E* cho cả 2 vị trí nối đôi (C-7''-C-8'' và C-7''' - C-8'''). Bốn proton thơm của vòng thế *para* tại δ_{H} 6,80 (2H, d, $J = 8,5$ Hz) và 7,47 (2H, d, $J = 8,5$ Hz), hai proton thơm của vòng có các nhóm thế đối xứng tại δ_{H} 6,99 (2H, s), ba nhóm methoxy tại δ_{H} 3,81 (3H, s) và 3,90 (6H, s), và một proton anome tại δ_{H} 5,51 (1H, d, $J = 4,0$ Hz).

Trên phổ $^{13}\text{C-NMR}$ và HSQC của **VC5** thấy xuất hiện tín hiệu của ba mươi ba (33) carbon trong đó có hai carbon carbonyl; sáu carbon không liên kết trực tiếp với hydro; mười chín carbon methine; ba carbon methylen; và ba carbon methoxy. Phân tích số liệu phổ $^1\text{H-},^{13}\text{C-NMR}$ của hợp chất **VC5** thấy giống hợp chất **VC3**, ngoại trừ sự thay nhóm benzyl bằng nhóm *p*-coumaroyl. So sánh số liệu phổ của hợp chất **VC5** với glomeratose C [84] thấy tương tự. Vị trí của nhóm *p*-coumaroyl được xác định tại vị trí glc C-6' dựa vào tương tác HMBC giữa H-6''' (δ_{H} 7,47) và C-2''' (δ_{C} 131,5)/C-4''' (δ_{C} 161,4)/C-7''' (δ_{C} 146,9), giữa H-5''' (δ_{H} 6,80) và C-1''' (δ_{C} 127,2)/C-3''' (δ_{C} 116,8), giữa H-7''' (δ_{H} 7,64) và C-2'''/C-6''' (δ_{C} 131,5)/C-8''' (δ_{C} 115,0)/C-9''' (δ_{C} 169,3), giữa glc H-6' (δ_{H} 4,27/4.66) và C-9''' (δ_{C} 169,3). (Các phổ của hợp chất xem phụ lục 2.5.).

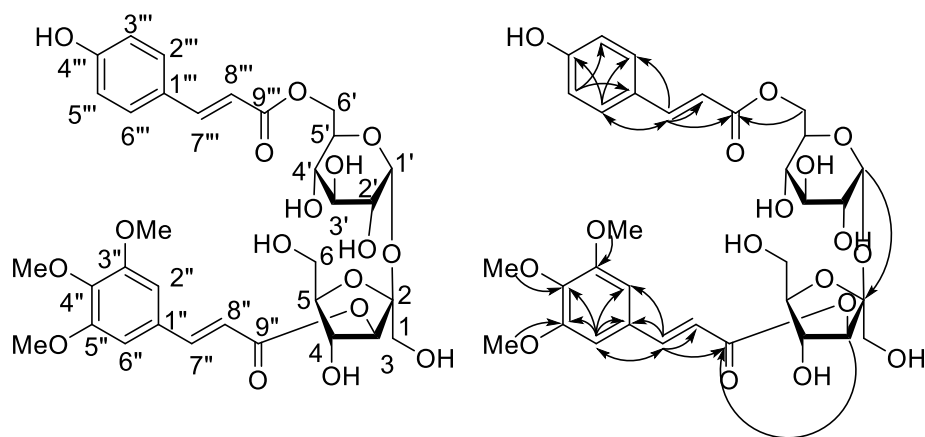
Như vậy, từ các phân tích phổ ở trên, hợp chất **VC5** được xác định là **glomeratose C**, hợp chất này đã được phân lập từ loài *Polygala glomerata* năm 1998 [84]. CTHH của hợp chất là **3-O-[(E)-3,4,5 trimethoxycinnamoyl]- β -D-fructofuranosyl(2 \rightarrow 1)-[6- O-(E)-*p*-coumaroyl]- α -D-glucopyranosid.**

Bảng 3.6. Số liệu NMR của hợp chất VC5 và hợp chất tham khảo

C	$\delta_C^{\#}$	δ_C^a	δ_H^a (mult., $J = \text{Hz}$)
Fru			
1	65,7	65,7	3,63 (d, 12,0) 3,65 (d, 12,0)
2	105,0	104,9	-
3	79,7	79,7	5,51 (d, 8,0)
4	74,3	74,3	4,46 (t, 8,0)
5	84,4	84,4	3,97 (m)
6	63,7	63,7	3,83 (br d, 12,0) 3,91 (dd, 5,0; 12,0)
Glc			
1'	92,9	92,9	5,51 (d, 4,0)
2'	73,1	73,1	3,48 (dd, 3,5; 9,5)
3'	75,1	75,0	3,69 (t, 9,5)
4'	71,9	71,9	3,33 (m)
5'	72,5	72,5	4,27 (m)
6'	65,4	65,4	4,27 (dd, 6,5; 11,0) 4,66 (br d, 11,0)
Tmc			
1''	131,5	131,5	-
2'', 6''	107,1	107,0	6,99 (s)
3'', 5''	154,8	154,8	-
4''	141,5	141,4	-
7''	147,2	147,2	7,73 (d, 16,0)
8''	117,8	117,8	6,56 (d, 16,0)
9''	167,8	167,8	-
3'', 5''-OMe	56,8	56,8	3,90 (s)
4''-OMe	61,2	61,2	3,81 (s)
Cou			
1'''	127,2	127,2	-
2''', 6'''	131,3	131,5	7,47 (d, 8,5)
3''', 5'''	116,8	116,8	6,80 (d, 8,5)
4'''	161,3	161,4	-
7'''	146,9	146,9	7,64 (d, 16,0)
8'''	115,1	115,0	6,43 (d, 16,0)
9'''	169,2	169,3	-

Chú thích:

^ađo trong CD₃OD, [#] δ_C của Glomeratose C đo trong CD₃OD [84], Fru: fructofuranosyl, Glc: glucopyranosyl, Tmc: 3,4,5-trimethoxycinnamoyl, Bz: benzoyl, Cou: p-coumaroyl.



Hình 3.19. CTHH và tương tác HMBC chính của hợp chất VC5

3.2.3.6. Hợp chất VC6

Phổ $^1\text{H-NMR}$ của **VC6** thấy xuất hiện tín hiệu: bốn proton olefin tại δ_{H} 6,48 (1H, d, $J = 16,0$ Hz), 6,56 (1H, d, $J = 16,0$ Hz), 7,61 (1H, d, $J = 16,0$ Hz) và 7,71 (1H, d, $J = 16,0$ Hz), hằng số tương tác J lớn cho phép kết luận cấu hình *E* cho cả 2 vị trí nối đôi (C-7''-C-8'' và C-7''' - C-8'''). Bốn proton thơm tại δ_{H} 6,90 (2H, s) và 6,96 (2H, s), năm nhóm methoxy tại δ_{H} 3,81 (3H, s), 3,87 (6H, s) và 3,88 (6H, s) và một proton anome tại δ_{H} 5,53 (1H, d, $J = 3,5$ Hz).

Trên phổ $^{13}\text{C-NMR}$ và HSQC của **VC6** thấy xuất hiện tín hiệu của ba mươi lăm (35) carbon trong đó có hai carbon carbonyl; chín carbon không liên kết trực tiếp với hydro; mười sáu carbon methin; ba carbon methylen; và năm carbon methoxy. Từ các dữ kiện phổ $^1\text{H-}, ^{13}\text{C-NMR}$ của hợp chất **VC6** thấy tương tự hợp chất **VC5**, ngoại trừ sự thêm hai nhóm methoxy tại C-3''' và C-5'''. (Các phổ của hợp chất xem phụ lục 2.6.).

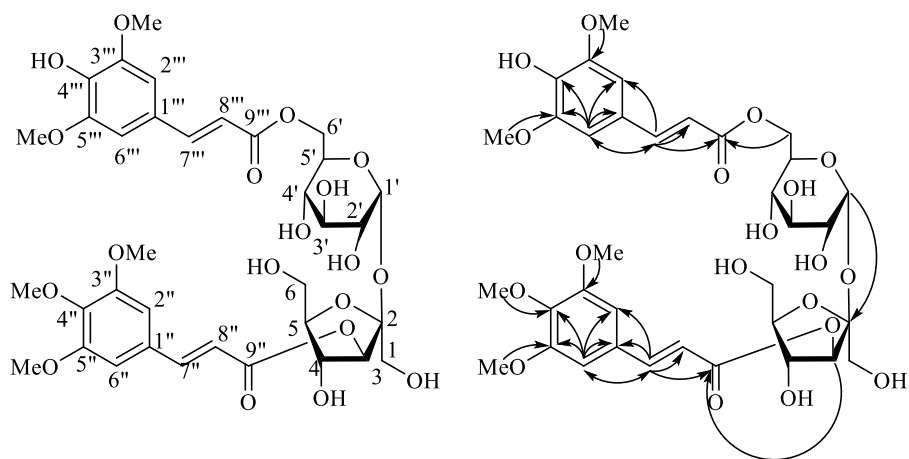
Số liệu phổ của hợp chất **VC6** cho thấy giống với số liệu phổ của Tenuifolisid C [96] ở các vị trí tương ứng. Vị trí của nhóm methoxy tại C-3''' và C-5''' được xác định dựa vào tương tác HMBC giữa H-6''' (δ_{H} 6,90) và C-1''' (δ_{C} 126,6)/C-2''' (δ_{C} 107,0)/C-4''' (δ_{C} 139,6)/C-5''' (δ_{C} 149,4)/C-7''' (δ_{C} 147,2), nhóm methoxy (δ_{H} 3,88) đến C-3'''/C-5''' (δ_{C} 149,4). Do đó, hợp chất **VC6** được xác định là **Tenuifolisid C**. Hợp chất này đã được phân lập từ loài *Polygala tenuifolia* năm 1991 [95].

CTHH của hợp chất là **β -D-[3-O-(3,4,5-trimethoxycinnamoyl)]-frucofuranosyl- α -D-(6-O-sinapoyl)-glucopyranosid.**

Bảng 3.7. Số liệu NMR của hợp chất VC6 và hợp chất tham khảo

C	$\delta_C^{\#}$	δ_C^a	δ_H^a (mult., $J = \text{Hz}$)
Fru			
1	65,5	65,7	3,62 (d, 12,0) 3,66 (d, 12,0)
2	104,7	104,9	-
3	79,4	79,5	5,54 (d, 8,0)
4	74,1	74,2	4,53 (t, 8,0)
5	84,2	84,4	4,00 (m)
6	63,7	63,8	3,85 (dd, 3,5; 12,0) 3,92 (dd, 7,0; 12,0)
Glc			
1'	92,6	92,7	5,53 (d, 3,5)
2'	73,0	73,1	3,50 (dd, 3,5; 9,5)
3'	75,0	75,1	3,69 (t, 9,5)
4'	71,8	72,0	3,33 (m)
5'	72,4	72,5	4,30 (m)
6'	65,6	65,6	4,24 (dd, 7,0, 12,0) 4,70 (dd, 1,5, 12,0)
Tmc			
1''	131,3	131,5	-
2'', 6''	106,8	107,0	6,96 (s)
3'', 5''	154,6	154,8	-
4''	141,4	141,4	-
7''	147,2	147,3	7,71 (d, 16,0)
8''	117,6	117,8	6,56 (d, 16,0)
9''	167,7	167,8	-
3'', 5''-OMe	56,7	56,8	3,87 (s)
4''-OMe	61,1	61,2	3,81 (s)
Sin			
1'''	126,4	126,6	-
2''', 6'''	106,8	107,0	6,90 (s)
3''', 5'''	149,2	149,4	-
4'''	139,3	139,6	-
7'''	147,2	147,2	7,61 (d, 16,0)
8'''	115,7	115,8	6,48 (d, 16,0)
9'''	169,0	169,1	-
3''', 5'''-OMe	56,8	56,9	3,88 (s)

Chú thích:^ađo trong CD₃OD, [#] δ_C của Tenuifolisid C đo trong CD₃OD [96], Fru: fructofuranosyl, Glc: glucopyranosyl, Tmc: 3,4,5-trimethoxycinnamoyl, Sin: Sinapoyl.



Hình 3.20. CTHH và tương tác HMBC chính của hợp chất VC6

3.2.3.7. Hợp chất VC7

Trên phổ $^1\text{H-NMR}$ của **VC7** thấy xuất hiện tín hiệu của ba proton thơm hệ ABX tại δ_{H} 7,55 (1H, d, $J = 9,0$ Hz), 7,64 (1H, dd, $J = 3,0; 9,0$ Hz) và 7,91 (1H, d, $J = 3,0$ Hz); tín hiệu ba proton thơm tại δ_{H} 6,79 (1H, d, $J = 8,5$ Hz), 7,00 (1H, d, $J = 8,5$ Hz) và 7,67 (1H, t, $J = 8,5$ Hz); và một proton anome tại δ_{H} 5,04 (1H, d, $J = 7,5$ Hz).

Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ và HSQC của **VC7** thấy xuất hiện tín hiệu của 19 carbon, bao gồm mười ba (13) carbon đặc trưng cho một xanthon và sáu carbon đặc trưng cho một đơn vị đường glucopyranosyl. (Các phổ của hợp chất xem phụ lục 2.7.).

Phân tích dữ liệu phổ $^1\text{H-}$ và $^{13}\text{C-NMR}$ của **VC7** thấy tương tự hợp chất **VC8**, ngoại trừ sự xuất hiện thêm một đường glucopyranosyl. Số liệu phổ của **VC7** giống với số liệu phổ của Wubangzsid B (euxanthon-7-O- β -D-glucopyranosid) [99] ở các vị trí tương ứng. Vị trí của đường glucopyranosyl được xác định tại C-7 dựa vào tương tác HMBC giữa glc H-1' (δ_{H} 5,04) và C-7 (δ_{C} 155,5).

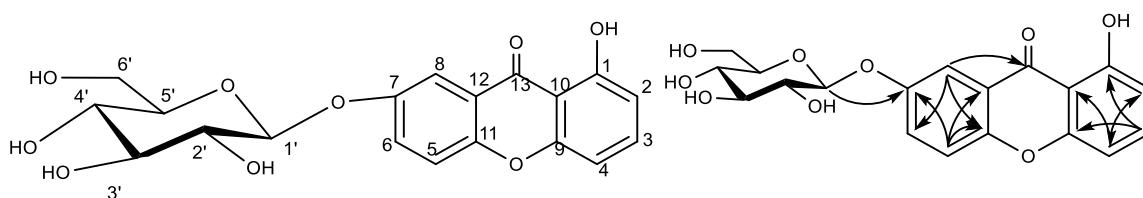
Vì vậy, cấu trúc của hợp chất **VC7** được xác định là **wubangzsid B (euxanthon-7-O- β -D-glucopyranosid)**, hợp chất này được phân lập từ loài *Polygala caudata* vào năm 1984 [99].

Bảng 3.8. Số liệu NMR của hợp chất VC7 và hợp chất tham khảo

C	$\delta_{\text{C}}^{\#}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (mult., $J = \text{Hz}$)
1	161,0	163,0	-
2	110,4	111,1	6,79 (d, 8,5)
3	137,4	138,2	7,67 (t, 8,5)
4	107,2	108,2	7,00 (d, 8,5)
5	119,4	120,4	7,55 (d, 9,0)
6	126,6	127,8	7,64 (dd, 3,0; 9,0)
7	154,0	155,5	-

8	110,0	111,9	7,91 (d, 3,0)
9	155,9	157,8	-
10	108,1	109,6	-
11	151,1	153,2	-
12	120,4	122,1	-
13	181,4	183,4	-
Glc			
1'	101,5	102,9	5,04 (d, 7,5)
2'	73,4	74,9	3,54 (m)
3'	76,5	78,3	3,56 (m)
4'	69,5	71,3	3,47 (m)
5'	77,2	78,0	3,53 (m)
6'	60,9	62,5	3,77 (dd, 5,0; 12,0) 3,95 (dd, 2,0; 12,0)

Chú thích: ^ađo trong CD₃OD, [#]δ_C của Wubangzsid B đo trong CD₃OD [99]



Hình 3.21. CTHH và tương tác HMBC chính của hợp chất VC7

3.2.3.8. Hợp chất VC8

Hợp chất **VC8** thu được dưới dạng bột vô định hình, màu vàng. Phổ ¹H-NMR của **VC8** thấy xuất hiện tín hiệu của ba proton thơm hệ ABX tại δ_H 7,35 (1H, dd, *J* = 3,0; 9,0 Hz), 7,43 (1H, d, *J* = 3,0 Hz) và 7,52 (1H, d, *J* = 9,0 Hz); và tín hiệu ba proton thơm tại δ_H 6,76 (1H, d, *J* = 8,5 Hz), 7,00 (1H, d, *J* = 8,5 Hz) và 7,68 (1H, d, *J* = 8,5 Hz).

Phổ ¹³C-NMR và HSQC của **VC8** thấy xuất hiện tín hiệu của mười ba (13) carbon, bao gồm: một carbon carbonyl tại δ_C 181,5; sáu carbon không liên kết trực tiếp với hydro tại δ_C 107,8; 120,4; 149,3; 154,1; 155,8 và 160,9; và sáu carbon methine tại δ_C 107,1; 107,8; 109,5; 119,3; 125,5 và 137,1. Phân tích dữ liệu phổ ¹H- và ¹³C-NMR của **VC8** gợi ý đây là một xanthon, giống với của hợp chất 1,7-dihydroxyxanthon [186]. (Các phổ của hợp chất xem phụ lục 2.8.).

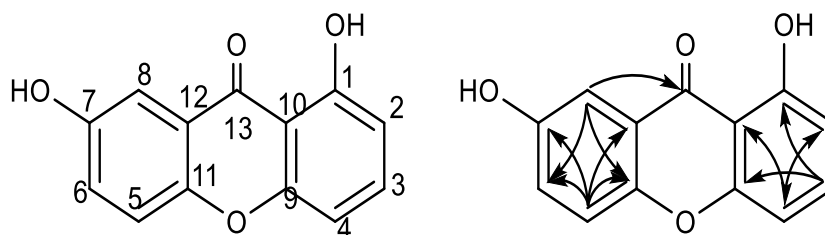
Tương tác HMBC giữa H-3 (δ_H 7,68) và C-1 (δ_C 160,9)/C-9 (δ_C 155,8); giữa H-4 (δ_H 7,00) và C-2 (δ_C 109,5)/C-9 (δ_C 155,8)/C-10 (δ_C 107,8) gợi ý vị trí nhóm hydroxy tại C-1. Vị trí nhóm hydroxy tại C-7 được xác định dựa trên tương tác HMBC giữa H-8 (δ_H 7,43) và C-6 (δ_C 125,5)/C-7 (δ_C 154,1)/C-11 (δ_C 149,3)/C-13 (δ_C 181,5); giữa H-5 (δ_H 7,52) và C-6 (δ_C 125,5)/C-7 (δ_C 154,1)/C-11 (δ_C 149,3)/C-12 (δ_C 120,4). Độ dịch chuyển carbon tại C-7 (δ_C 154,1) và C-9 (δ_C 155,8) được đổi lại so với tài liệu tham khảo [C-7 (δ_C 156,0)

và C-9 (δ_C 154,0)] dựa vào tương tác HMBC giữa H-3 (δ_H 7,68) và C-9 (δ_C 155,8); giữa H-5 (δ_H 7,52) và C-7 (δ_C 154,1). Vì vậy, cấu trúc của hợp chất **VC8** được xác định là **1,7-dihydroxyxanthon**, hợp chất này đã được phân lập từ loài *Polygala tenuifolia* vào năm 1992 [54].

Bảng 3.9. Số liệu NMR của hợp chất **VC8** và hợp chất tham khảo

C	$\delta_C^{\#}$	δ_C^a	δ_H^a (mult., $J = \text{Hz}$)
1	160,7	160,9	-
2	109,7	109,5	6,76 (d, 8,5)
3	137,3	137,1	7,68 (t, 8,5)
4	107,4	107,1	7,00 (d, 8,5)
5	119,5	119,3	7,52 (d, 9,0)
6	125,6	125,5	7,35 (dd, 3,0; 9,0)
7	156,0	154,1	-
8	107,9	107,8	7,43 (d, 3,0)
9	154,0	155,8	-
10	108,0	107,8	-
11	149,5	149,3	-
12	120,6	120,4	-
13	181,6	181,5	-
1-OH			12,62 (s)
7-OH			10,06 (s)

Chú thích:^ađo trong DMSO- d_6 , [#] δ_C của 1,7-dihydroxyxanthon đo trong DMSO- d_6 [186]



Hình 3.22. CTHH và tương tác HMBC chính của hợp chất **VC8**

3.2.3.9. Hợp chất **VC9**

Phổ $^1\text{H-NMR}$ của **VC9** thấy tín hiệu của ba proton thơm hệ ABX tại δ_H 7,26 (1H, dd, $J = 3,0; 9,0$ Hz), 7,40 (1H, d, $J = 9,0$ Hz) và 7,55 (1H, d, $J = 3,0$ Hz); tín hiệu ba proton thơm tại δ_H 6,94 (1H, d, $J = 8,5$ Hz), 7,10 (1H, d, $J = 8,5$ Hz) và 7,69 (1H, t, $J = 8,5$ Hz); và một nhóm methoxy tại δ_H 3,99 (3H, s).

Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ và HSQC của **VC9** thấy xuất hiện tín hiệu của mười bốn(14) carbon, bao gồm: một carbon carbonyl; sáu carbon không liên kết trực tiếp với hydro; sáu carbon

methine; và một carbon methoxy. Số liệu phổ ^1H - và ^{13}C -NMR của **VC9** cho thấy đây là một xanthon, tương tự hợp chất **VC8**, ngoại trừ sự xuất hiện thêm một nhóm methoxy. (Các phổ của hợp chất xem phụ lục 2.9.).

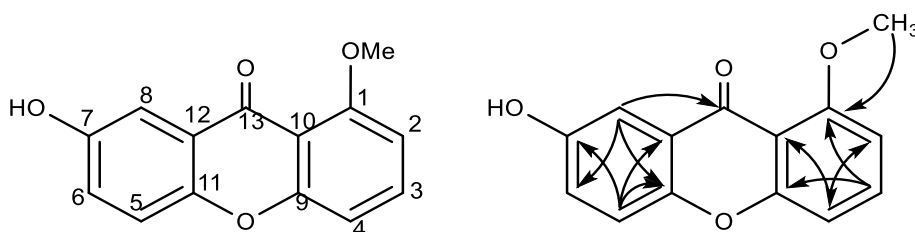
Số liệu phổ của hợp chất **VC9** cho thấy giống với số liệu phổ của 7-hydroxy- 1-methoxyxanthon [59] ở các vị trí tương ứng. Vị trí của nhóm methoxy tại C-1 được xác định dựa trên tương tác HMBC giữa nhóm methoxy (δ_{H} 3,99) và C-1 (δ_{C} 162,0). Vì vậy, cấu trúc của hợp chất **VC9** được xác định là **7-hydroxy- 1-methoxyxanthon**. Hợp chất này được phân lập từ loài *Polygala caudata* vào năm 1999 [59].

Bảng 3.10. Số liệu NMR của hợp chất **VC9** và hợp chất tham khảo

C	$\delta_{\text{C}}^{\#}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (mult., $J = \text{Hz}$)
1	160,1	162,0	-
2	109,6	111,0	7,10 (d, 8,5)
3	135,3	136,6	7,69 (t, 8,5)
4	105,8	106,5	6,94 (d, 8,5)
5	118,7	119,7	7,40 (d, 9,0)
6	123,6	125,1	7,26 (dd, 3,0; 9,0)
7	153,8	155,4	-
8	108,8	110,1	7,55 (d, 3,0)
9	157,4	159,6	-
10	111,1	112,6	-
11	147,9	150,4	-
12	123,0	124,4	-
13	178,7	178,3	-
1-OMe	56,1	56,7	3,99 (s)

Chú thích:

^ađo trong CD_3OD , [#] δ_{C} của 7-hydroxy- 1-methoxyxanthon đo trong $\text{DMSO}-d_6$ [59].



Hình 3.23. CTHH và tương tác HMBC chính của hợp chất **VC9**

3.2.3.10. Hợp chất VC10

Phổ $^1\text{H-NMR}$ của **VC10** thấy tín hiệu của năm proton thơm tại δ_{H} 6,88 (1H, s), 6,97 (1H, d, $J = 8,5$ Hz), 7,63 (1H, s), 7,68 (1H, t, $J = 8,5$ Hz) và 7,11 (1H, d, $J = 8,5$ Hz); và hai nhóm methoxy tại δ_{H} 3,99 (3H, s) và 4,00 (3H, s).

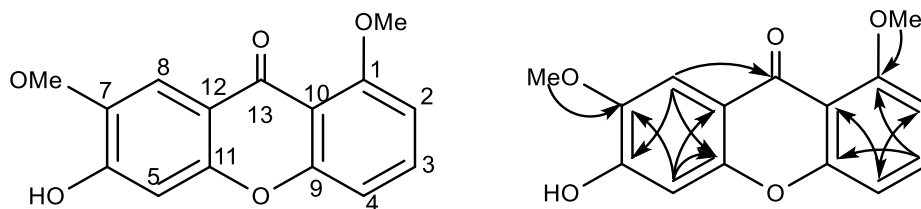
Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ và HSQC của **VC10** thấy xuất hiện tín hiệu của mười lăm (15) carbon, bao gồm: một carbon carbonyl; bảy carbon không liên kết trực tiếp với hydro; năm carbon methine; và hai carbon methoxy. Phân tích số liệu phổ $^1\text{H-}$ và $^{13}\text{C-NMR}$ của **VC10** gợi ý đây là một xanthon, tương tự số liệu phổ đã công bố của hợp chất 6-hydroxy -1,7-dimethoxyxanthon [188]. (Các phổ của hợp chất xem phụ lục 2.10.).

Tương tác HMBC giữa H-3 (δ_{H} 7,68) và C-1 (δ_{C} 161,8)/C-9 (δ_{C} 159,5); giữa H-4 (δ_{H} 7,11) và C-2 (δ_{C} 106,7)/C-9 (δ_{C} 159,5)/C-10 (δ_{C} 112,6); giữa nhóm methoxy (δ_{H} 4,00) và C-1 (δ_{C} 161,8) gợi ý vị trí nhóm methoxy tại C-1. Vị trí của nhóm hydroxy tại C-6 và nhóm methoxy tại C-7 được xác định dựa trên tương tác HMBC giữa H-8 (δ_{H} 7,63) và C-6 (δ_{C} 155,8)/C-7 (δ_{C} 147,6)/C-11 (δ_{C} 153,2)/C-13 (δ_{C} 177,6); giữa H-5 (δ_{H} 6,88) và C-7 (δ_{C} 147,6)/C-12 (δ_{C} 116,0); giữa nhóm methoxy (δ_{H} 3,99) và C-7 (δ_{C} 147,6). Từ các phân tích phổ trên, cấu trúc của hợp chất **VC10** được xác định là **6-hydroxy-1,7-dimethoxyxanthon**, hợp chất này đã được phân lập từ loài *Polygala tenuifolia* vào năm 1992 [54].

Bảng 3.11. Số liệu NMR của hợp chất **VC10** và hợp chất tham khảo

C	$\delta_{\text{C}}^{\#}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (mult., $J = \text{Hz}$)
1	160,0	161,8	-
2	106,1	106,7	6,97 (d, 8,5)
3	134,4	135,9	7,68 (t, 8,5)
4	109,5	111,0	7,11 (d, 8,5)
5	102,3	103,4	6,88 (s)
6	153,5	155,8	-
7	145,9	147,6	-
8	105,9	106,5	7,63 (s)
9	157,3	159,5	-
10	111,3	112,6	-
11	150,4	153,2	-
12	114,5	116,0	-
13	176,5	177,6	-
1-OMe	56,1	56,6	4,00 (s)
7-OMe	55,8	56,6	3,99 (s)

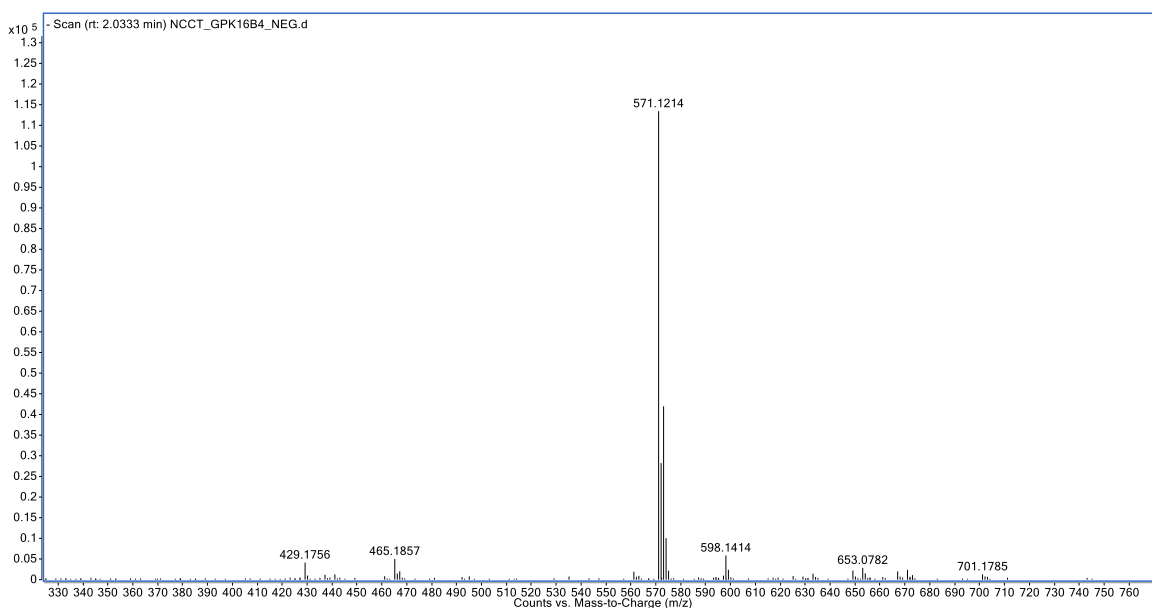
^ađo trong CD_3OD , [#] δ_{C} của 6-hydroxy -1,7-dimethoxyxanthon đo trong $\text{DMSO-}d_6$ [188].



Hình 3.24. CTHH và tương tác HMBC chính của hợp chất VC10

3.2.3.11. Hợp chất VC11 : chất mới karenxanthon

Hợp chất VC11 thu được dưới dạng bột vô định hình, màu vàng. Phổ HR-ESI-MS của VC11 xuất hiện pic ion giả phân tử tại m/z 571,1214 [M^{+35}] cho phép kết luận công thức phân tử của VC11 được xác định là $C_{25}H_{28}O_{13}$ (Tính theo lý thuyết $M = 533,1530$ và $M^{+Cl} = 571,1218$). Phổ 1H -NMR của VC11 thấy xuất hiện tín hiệu của vòng thơm thế ABX tại δ_H 7,55 (1H, d, $J = 9,0$ Hz), 7,60 (1H, dd, $J = 3,0; 9,0$ Hz) và 7,90 (1H, d, $J = 3,0$ Hz); và tín hiệu ba proton thơm tại δ_H 6,77 (1H, d, $J = 8,0$ Hz), 6,98 (1H, d, $J = 8,5$ Hz) và 7,66 (1H, dd, $J = 8,0; 8,5$ Hz). Ngoài ra, trên phổ còn xuất hiện tín hiệu của hai proton anome tại δ_H 4,73 (1H, brs), và 4,99 (1H, d, $J = 7,0$ Hz).



Hình 3.25. Phổ HR ESI MS của hợp chất VC11
(dạng $[M^{+35}Cl]^-$)

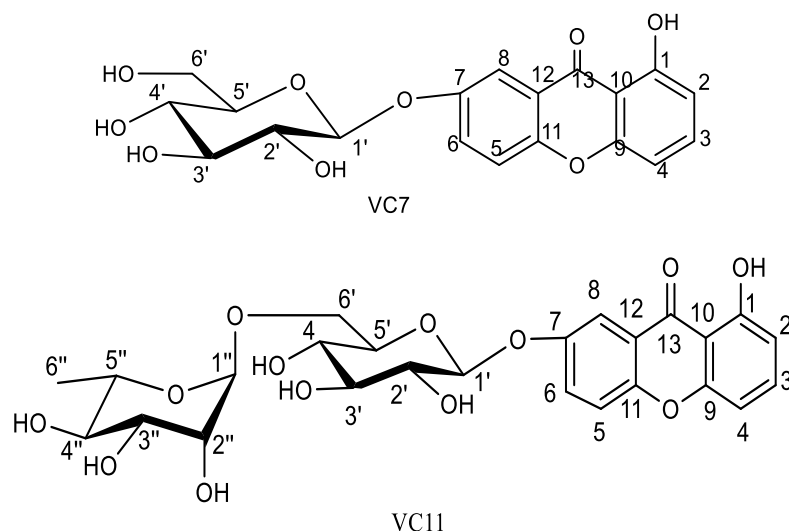
Phổ ^{13}C -NMR và HSQC của VC11 thấy xuất hiện tín hiệu của hai mươi lăm (25) carbon, bao gồm mười ba carbon đặc trưng cho một xanthon tại δ_C 108,1; 109,6; 111,1; 111,7; 120,4; 122,2; 127,7; 138,1; 153,2; 155,5; 157,8; 162,9 và 183,1; sáu carbon đặc trưng cho một đơn vị đường glucopyranosyl tại δ_C 67,7; 71,6; 74,9; 77,2; 78,0 và 102,8; có sáu carbon đặc trưng cho một đơn vị đường rhamnopyranosyl tại δ_C 17,9; 69,8; 72,1; 72,4; 74,2 và 102,2. (Các phổ của hợp chất xem phụ lục 2.11.).

Từ các phân tích dữ liệu phổ ^1H - và ^{13}C -NMR của **VC11** cho thấy đây là một xanthon, tương tự hợp chất **VC7**, ngoại trừ sự xuất hiện thêm một đường rhamnopyranosyl. Vị trí của đường rhamnopyranosyl được xác định tại glc C-6 dựa vào tương tác HMBC giữa rha H-1'' (δ_{H} 4,73) và glc C-6 (δ_{C} 67,7). Tra cứu trên cơ sở dữ liệu Scifinder cho thấy chưa có công bố nào thông báo về cấu trúc của hợp chất này. Vì vậy **VC11** được xác định là một hợp chất mới và được đặt tên là **karenxanthon**. CTHH của hợp chất là **1,7-dihydroxyxanthon 7-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosid**.

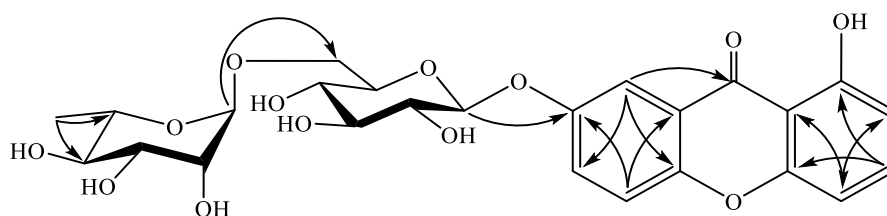
Bảng 3.12. Số liệu NMR của hợp chất **VC11** và hợp chất tham khảo

C	$\delta_{\text{C}}^{\#}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (mult., $J = \text{Hz}$)
1	163,0	162,9	-
2	111,1	111,1	6,77 (d, 8,0)
3	138,2	138,1	7,66 (dd, 8,0; 8,5)
4	108,2	108,1	6,98 (d, 8,5)
5	120,4	120,4	7,55 (d, 9,0)
6	127,8	127,7	7,60 (dd, 3,0; 9,0)
7	155,5	155,5	-
8	111,9	111,7	7,90 (d, 3,0)
9	157,8	157,8	-
10	109,6	109,6	-
11	153,2	153,2	-
12	122,1	122,2	-
13	183,4	183,1	-
Glc			
1'	102,9	102,8	4,99 (d, 7,0)
2'	74,9	74,9	3,54 (m)
3'	78,3	78,0	3,53 (m)
4'	71,3	71,6	3,40 (m)
5'	78,0	77,2	3,68 (m)
6'	62,5	67,7	3,63 (dd, 4,0; 11,0) 4,10 (dd, 1,0; 11,0)
Rha			
1''		102,2	4,73 (br s)
2''		72,1	3,95 (br d, 3,0)
3''		72,4	3,81 (dd, 3,0; 9,0)
4''		74,2	3,33 (m)
5''		69,8	3,67 (m)
6''		17,9	1,21 (d, 6,5)

Chú thích: ^ađo trong CD_3OD , [#] δ_{C} của **VC11** đo trong CD_3OD , Glc: glucopyranosyl, Rha: rhamnopyranosyl



Hình 3.26. CTHH của hợp chất **VC11** và hợp chất tham khảo **VC7**



Hình 3.27. Tương tác HMBC chính của hợp chất **VC11**

3.2.3.12. Hợp chất **VC12**

Hợp chất **VC12** thu được dưới dạng tinh thể hình kim màu trắng. Tan ít trong *n*-hexan, tan tốt trong acetone. Nhiệt độ nóng chảy 168-169°C. Trên phổ ESI-MS của **VC12** xuất hiện pic ion giả phân tử tại m/z 395,1 $[M - H_2O + H]^+$ phù hợp với công thức phân tử là $C_{29}H_{48}O$ ($M = 412$).

Phổ 1H -NMR thấy xuất hiện tín hiệu của sáu nhóm methyl, trong đó có hai nhóm methyl dưới dạng singlet ở δ_H 0,55 (3H, s, CH_3 -18); 0,79 (3H, s, CH_3 -19), có một nhóm methyl dưới dạng triplet ở δ_H 0,82 (3H, t, $J = 7,0$ Hz, CH_3 -29) và ba nhóm methyl xuất hiện dưới dạng doublet 1,03 (3H, d, $J = 6,5$ Hz, CH_3 -21), 0,85 (3H, d, $J = 6,5$ Hz, CH_3 -26); 0,84 (3H, d, $J = 6,5$ Hz, CH_3 -27). Ba tín hiệu của proton olefin ở δ_H 5,02 (1H, dd, $J = 9,0, 15,5$ Hz, H-23); 5,17 (1H, brs, H-7); 5,17 (1H, dd, $J = 9,0; 15,5$ Hz, H-22) và tín hiệu của một nhóm hydroxymethyl ở δ_H 3,60 (1H, m, H-3) cũng được quan sát thấy trên phổ 1H -NMR. Hằng số ghép lớn giữa H-22 và H-23 ($J = 15,5$ Hz) cho phép xác định cấu hình *trans* cho nối đôi C-22/C-23.

Phổ ^{13}C -NMR và phổ DEPT của **VC12** xuất hiện hai mươi chín (29) tín hiệu carbon, gồm có ba carbon bậc bốn, mười một (11) nhóm metin, chín nhóm methylen và

sáu nhóm methyl. Các dữ kiện phổ phân tích ở trên xác nhận đây là một hợp chất sterol có chứa hai nối đôi và một nhóm hydroxy.

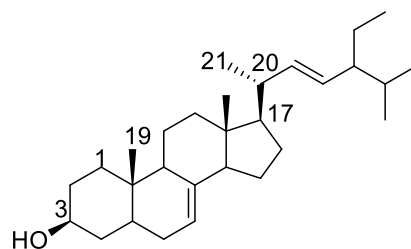
Trên phổ HMBC có tương tác xa giữa nhóm CH₃-19 (δ_H 0,79) và H-7 (δ_H 5,16) với C-5 (δ_C 40,3) cho phép xác định nối đôi ở vị trí C-7/C-8. Nối đôi còn lại được xác định ở vị trí C-22 và C-23 dựa vào tương tác giữa H-22 (δ_H 5,17) và H-21 (δ_H 1,03) với C-17 (δ_C 55,9). (Các phổ của hợp chất xem phụ lục 2.12.).

Kết hợp phổ ¹H-NMR, ¹³C-NMR, DEPT và so sánh với tài liệu tham khảo [189] cho phép kết luận hợp chất **VC12** chính là **spinasterol**.

Bảng 3.13. Số liệu NMR của hợp chất **VC12** và hợp chất tham khảo

C	$\delta_C^{\#}$	δ_C^a	δ_H , (mult., J= Hz)
1	37,2	37,2	1,09; 1,83
2	31,5	31,5	1,38; 1,78
3	70,1	71,1	3,60 (m)
4	38,0	38,0	1,27
5	40,3	40,3	1,40
6	29,6	29,7	1,22; 1,74
7	117,5	117,5	5,17 (brs,s)
8	139,6	139,6	---
9	49,5	49,5	1,65
10	34,2	34,3	---
11	21,6	21,6	1,48
12	39,5	39,5	1,23; 2,02
13	43,3	43,3	---
14	55,1	55,2	1,51
15	23,0	23,0	1,40;1,52
16	28,5	28,5	1,55
17	55,9	56,0	1,25
18	12,0	12,1	0,55 (s)
19	13,0	13,1	0,79 (s)
20	40,8	40,8	2,05
21	21,4	21,4	1,03 (d, 6,5)
22	138,1	138,2	5,17 (dd, 9,0; 15,5)
23	129,5	129,5	5,02 (dd, 9,0; 15,5)
24	51,2	51,3	1,55
25	31,9	31,9	1,55
26	21,1	21,1	0,85 (d, 6,5)
27	19,0	19,0	0,84 (d 6,5)
28	25,4	25,4	1,18; 1,42
29	12,2	12,2	0,82 (t, 7,0)

Ghi chú: ^aĐo trong CDCl₃; [#] δ_C của spinasterol đo trong CDCl₃; [189]



Hình 3.28. CTHH của hợp chất VC12.

3.2.3.13. Hợp chất VC13

Hợp chất **VC13** phân lập được dưới dạng tinh thể hình kim màu trắng, tan tốt trong dung môi diclorometan, ít tan trong aceton. Nhiệt độ nóng chảy 283-286°C. Trên phổ ESI-MS của **VC13** xuất hiện pic ion giả phân tử tại m/z 397,1 $[M - C_6H_{12}O_6 + H]^+$, phù hợp với CTPT là $C_{35}H_{60}O_6$ ($M = 576$).

Phổ 1H -NMR của hợp chất **VC13** thấy xuất hiện tín hiệu của sáu nhóm methyl, trong đó có hai nhóm methyl bậc ba ở δ_H 0,68 (3H, s, CH_3 -18); 1,01 (3H, s, CH_3 -19), có một nhóm methyl bậc một ở δ_H 0,84 (3H, t, $J = 7,5$ Hz, CH_3 -29); và ba nhóm methyl xuất hiện dưới dạng doublet 0,92 (3H, d, $J = 6,5$ Hz, CH_3 -21), 0,83 (3H, d, $J = 6,8$ Hz, CH_3 -26); 0,81 (3H, d, $J = 6,8$ Hz, CH_3 -28).

Một tín hiệu của proton olefin ở δ_H 5,37 (1H, brs, H-6), tín hiệu của một nhóm hydroxymetin ở δ_H 3,60 (1H, m, H-3), và sự xuất hiện của một phân tử đường glucosyl bởi tín hiệu proton anomeric tại δ_H 4,40 (d, $J = 8,0$ Hz) cũng được quan sát thấy trên phổ 1H -NMR.

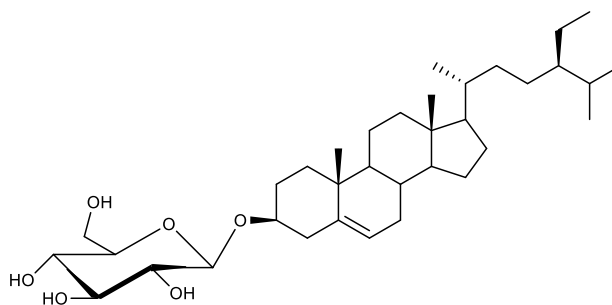
Phổ ^{13}C -NMR của **VC13** xuất hiện tín hiệu của ba lăm (35) carbon, trong đó có hai mươi chín (29) tín hiệu thuộc khung sterol và sáu tín hiệu còn lại thuộc phần đường glucose tại δ_C 101,2 (C-1'), 73,6 (C-2'), 76,5 (C-3'), 70,1 (C-4'), 75,8 (C-5'), 61,9 (C-6'). (Các phổ của hợp chất xem phụ lục 2.13.).

Dựa vào các tương tác trên phổ HSQC, độ chuyển dịch hóa học của các carbon được gắn với các proton tương ứng. Trên phổ HMBC, tín hiệu tương tác giữa proton anomeric δ_H 4,40 (d, $J = 8,0$ Hz, H-1'') với C-3 (δ_C 79,3) cho phép xác định vị trí liên kết của đơn vị đường vào vị trí C-3; tương tác giữa proton olefin δ_H 5,37 với C-4 (δ_C 39,9)/C-8 (32,0)/C-10 (36,8) cho thấy tồn tại một nối đôi tại C5/C6. Từ những dữ kiện phổ trên kết hợp với so sánh số liệu phổ ^{13}C -NMR của daucosterol được công bố trong tài liệu [190] thấy hoàn toàn phù hợp. Như vậy, **VC13** được xác định là **daucosterol** (còn gọi là **β -sitosterol-3-O- β -D-glucoside**), hợp chất này đã được phân lập từ loài *Polygala tenuifolia* vào năm 2003, từ loài *Polygala japonica* vào năm 2006 [227],[228].

Bảng 3.14. Số liệu NMR của hợp chất VC13 và hợp chất tham khảo

C	δ_C^a	$\delta_C^\#$	δ_H^a (mult., J = Hz)
1	37,4	37,0	1,08 (m) ; 1,88 (m)
2	31,9	31,6	1,62 (m) ; 1,91 (m)
3	79,3	78,9	3,60 (m)
4	39,9	39,5	2,28 (t, 10,0); 2,42 (d, 10,0)
5	140,4	141,6	---
6	122,3	121,9	5,37 (d, 5,0)
7	31,9	31,6	1,47 (m)
8	32,0	31,7	1,97 (m)
9	50,3	50,0	0,96 (m)
10	36,8	36,5	---
11	23,2	20,8	1,02 (m); 1,45 (m)
12	38,8	38,5	1,17 (m) ; 2,01 (m)
13	42,4	42,1	---
14	56,9	56,5	1,03 (m)
15	26,2	24,5	1,11 (m) ; 1,59 (m)
16	29,3	28,7	1,29 (m) ; 1,84 (m)
17	56,2	55,8	1,14 (m)
18	12,0	12,0	0,68 (s)
19	19,4	19,0	1,01 (s)
20	36,3	36,0	1,37 (m)
21	19,1	18,5	1,03 (d, 6,5)
22	34,1	34,0	1,04 (m); 1,34 (m)
23	28,3	28,0	1,19 (m)
24	46,0	45,7	0,93 (m)
25	29,7	28,9	1,68 (m)
26	19,9	19,5	0,83 (d, 6,8)
27	24,4	23,8	0,83 (d, 6,9)
28	18,9	18,7	1,21 (d, 6,8)
29	11,9	12,0	0,84 (t, 7,5)
1'	101,2	100,9	4,40 (d, 8,0)
2'	73,6	73,2	3,45 (m)
3'	76,5	76,2	3,28 (m)
4'	70,1	70,0	3,30 (m)
5'	75,8	75,4	3,48 (m)
6'	61,9	61,7	3,77 (dd, 12,0; 4,5) 3,84 (dd, 12,0; 4,5)

Chú thích: ^a Đo trong CDCl₃; [#] δ_C của daucosterol đo trong CDCl₃, [190].



Hình 3.29. CTHH của hợp chất VC13

3.2.3.14. Hợp chất VC14

Hợp chất **VC14** thu được dưới dạng tinh thể hình kim, màu trắng, $t_{nc}^{\circ} = 168-170^{\circ}\text{C}$, tan tốt trong aceton, methanol, ít tan trong *n*-hexan. Phổ khối ESI-MS cho pic ion giả phân tử tại m/z $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+ = 395,1$ cho dự đoán một công thức $\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}$ có M là 412,7 (xem phụ lục 3.14).

Phổ $^1\text{H-NMR}$ (aceton- d_6) của hợp chất **VC14** cho tín hiệu đặc trưng của một sterol với sáu nhóm methyl tại δ_{H} 0,81 (3H, s, H-18), 0,59 (3H, s, H-19), 1,05 (3H, d, $J = 6,5$ Hz, H-21), 0,87 (3H, d, $J = 7,5$ Hz, H-29), 0,83 (3H, d, $J = 7,5$ Hz, H-27), 0,82 (3H, t, $J = 7,5$ Hz, H-26). Sự có mặt của nhóm $\beta\text{-OH}$ tại vị trí C-3 được khẳng định bởi tín hiệu của nhóm metin với δ_{H} 3,49 (m, H-3), một nối đôi nội vòng δ_{H} 5,21 (1H, d, $J = 5,0$ Hz, H-6) và một nối đôi ngoại vòng tại δ 5,08 (1H, dd, $J = 9,0; 15,5$ Hz, H-22), 5,16 (1H, dd, $J = 9,0; 15,0$ Hz, H-23) tín hiệu nối đôi này cho phép khẳng định cấu trúc của hợp chất **VC14** không phải là β -sitosterol.

Trên phổ DEPT cho tín hiệu của hai mươi chín (29) carbon gồm: sáu nhóm CH_3 , chín nhóm CH_2 và mười một (11) nhóm CH và ba carbon bậc 4.

Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ (aceton- d_6) cho tín hiệu của hai nối đôi gồm: một nối đôi thế ba lần tại δ_{C} 140,2 (C5) và 118,3 (C-6) và một nối đôi ngoại vòng tại δ_{C} 139,2 (C-20) và 130,3 (C-21); tín hiệu của 6 nhóm methyl tại δ_{C} 21,8, 21,4, 19,3, 13,4, 12,5 và 12,3; một tín hiệu nhóm oxymetin tại 70,7. Các vị trí carbon khác được xác định thông qua việc gán các vị trí tương ứng của hợp chất stigmasterol (bảng 3.15.). Như vậy, thông qua các dữ liệu phổ thực nghiệm và so sánh với tài liệu [191], kết luận hợp chất **VC14** là **stigmasterol**. (Các phổ của hợp chất xem phụ lục 2.14.).

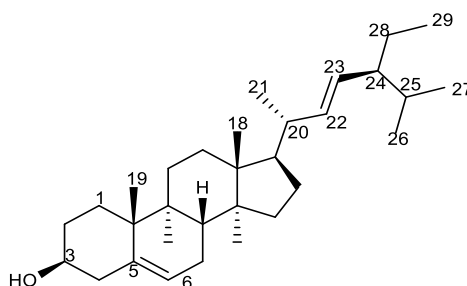
Hợp chất này có danh pháp là (3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-17-[(E,2R,5S)-5-ethyl-6-methylhept-3-en-2-yl]-10,13-dimethyl-2,3,4,7,8,9,11,12,14,15,16,17-dodecahydro-1H-

cyclopenta[a]phenanthren-3-ol. Hợp chất này đã được phân lập từ loài *Polygala arillata* năm 1996 [226], từ loài *Polygala caudata* năm 1998 [59].

Bảng 3.15. Số liệu phổ của hợp chất VC14 và hợp chất tham khảo

C	$\delta_C^{\#}$	δ_C^a	δ_H^a (mult., $J = \text{Hz}$)
1	37,3	39,0	
2	31,8	32,3	
3	71,9	70,7	
4	42,4	40,2	
5	140,8	140,2	
6	121,8	118,3	5,17 (1H, m)
7	32,0	30,3	
8	32,0	32,6	
9	50,2	50,4	
10	36,6	35,0	
11	21,2	22,2	
12	39,9	39,9	
13	42,4	44,0	
14	56,9	56,7	
15	24,4	23,6	
16	28,4	29,3	
17	56,1	55,9	
18	12,4	12,5	0,81 (3H, s)
19	14,5	13,4	0,59 (3H, s)
20	40,6	41,1	
21	21,3	21,8	1,05 (3H, d, $J = 6,5 \text{ Hz}$)
22	138,4	139,2	5,08 (1H, dd, $J = 9,0, 15,5 \text{ Hz}$)
23	129,3	130,3	5,16 (1H, dd, $J = 9,0, 15,0 \text{ Hz}$)
24	51,3	52,1	
25	29,2	29,8	
26	19,1	19,3	0,82 (3H, t, $J = 7,5 \text{ Hz}$)
27	21,2	21,4	0,83 (3H, d, $J = 7,5 \text{ Hz}$)
28	26,1	26,0	
29	12,1	12,4	0,87 (3H, d, $J = 7,5 \text{ Hz}$)

Chú thích: $\delta_C^{\#}$ số liệu của stigmasterol đo trong aceton- d_6 [191]; δ_C^a Đo trong aceton- d_6



Hình 3.30. CTHH của hợp chất VC14

3.2.3.15. Hợp chất VC15

Hợp chất **VC15** thu được dưới dạng bột màu vàng. Phổ khối lượng ESI-MS của hợp chất **VC15** xuất hiện pic ion giả phân tử tại m/z 242,8 $[M]^+$, tương ứng với CTPT của hợp chất **VC15** là $C_{14}H_{10}O_4$.

Phổ 1H – NMR của hợp chất **VC15** xuất hiện sáu tín hiệu của proton thơm xuất hiện dưới dạng hệ tương tác ABX và hệ tương tác AB_2 của vòng thơm. Cụ thể, hệ tương tác thứ nhất của vòng thơm là AB_2 gồm ba proton thơm xuất hiện tại δ_H 6,93, 7,06 (2H, d, $J = 8,5$ Hz, H-4 & H-2) và δ_H 7,68 (1H, t, $J = 8,5$ Hz, H-3), điều này cho thấy trong công thức cấu tạo của hợp chất **VC15**, có sự tồn tại của 1 vòng benzen bị thế tại 3 vị trí 1,2,3. Sự xuất hiện thêm của một vòng benzen bị thế tại 3 vị trí 1,2,4 được khẳng định bởi hệ tương tác ABX của vòng thơm dựa trên tín hiệu phổ proton tại δ_H 7,28 (1H, dd, $J = 8,5; 2,5$ Hz, H-6), 7,40 (1H, d, $J = 8,5$ Hz, H-5) và 7,58 (1H, d, $J = 2,4$ Hz, H-8). Ngoài ra có sự xuất hiện của 3 proton tại vị trí δ_H 3,95 (3H, s, 7-OCH₃).

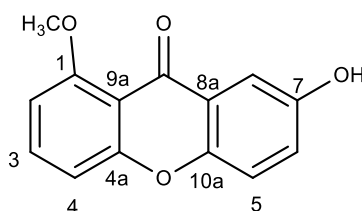
Phổ ^{13}C – NMR của hợp chất **VC15** cho thấy sự xuất hiện của mười bốn (14) tín hiệu carbon, trong đó có một tín hiệu của carbon carbonyl tại δ_C 175,5 (C-9), bốn carbon bậc 4 mang oxy, một carbon thuộc nhóm methoxy δ_C 56,5 (7-OCH₃). Từ các dữ liệu phổ đã phân tích ở trên có thể khẳng định **VC15** là một xanthon mang một nhóm thế hydroxyl và một nhóm thế methoxy. Trong đó, nhóm –OCH₃ phải nằm ở vị trí C – 1 do sự xuất hiện của nhóm carbon carbonyl (δ_C 175,5) tại vùng từ trường cao hơn (Δ 6,5) so sánh với sự xuất hiện của nhóm –OH ở cùng vị trí đó (δ_C 182,0) trên hợp chất 1,5-Dihydroxyxanthon [59]. Vậy vòng A là vòng 1,2,3- trisubstitued benzen. Nhóm –OH còn lại phải nằm ở vị trí C – 6 hay C – 7 để tạo thành vòng benzen bị thế tại vị trí 1,2,4. Proton thơm ghép cặp meta [7,58 (1H, d, $J = 2,4$ Hz), H-8] xuất hiện ở vùng từ trường thấp chứng tỏ proton này nằm trong vùng giảm chắn của nối đôi C=O, nghĩa là proton gắn ở vị trí C – 8. So sánh dữ liệu phổ của hợp chất với hợp chất 7-hydroxy-1-methoxyxanthon thấy hoàn toàn phù hợp [59]. Do vậy, hợp chất **VC15** là **7-hydroxy-1-methoxyxanthon**.

Bảng 3.16. Số liệu NMR của hợp chất **VC15** và hợp chất tham khảo

C	δ_C^a	$\delta_C^\#$	δ_H^a (mult., $J =$ Hz)
1	161,7	160,1	---
2	110,2	109,6	7,06 (1H, d, 8,5)
3	135,6	135,3	7,68 (1H, t, 8,5)
4	106,5	105,8	6,93 (1H, d, 8,5)
4a	159,0	158,4	---
10a	149,6	148,9	---

5	119,4	118,7	7,40 (1H, d, 8,5)
6	124,5	123,6	7,28 (1H, dd, 8,5, 2,5)
7	154,7	153,8	---
8	106,5	108,8	7,58 (1H, d, 2,4)
9	175,5	174,7	---
8a	124,0	123,0	---
9a	110,5	111,1	---
Me-1			3,95 (3H, s)

Chú thích: ^aĐo trong aceton-d₆; [#]δ_C của 7-hydroxy-1-methoxyxanthon đo trong aceton-d₆ [59];



Hình 3.31. CTHH của hợp chất VC15

3.2.3.16. Hợp chất VC16

Hợp chất **VC16** thu được dưới dạng bột màu vàng.

Phổ ESI-MS của **VC16** xuất hiện pic ion giả phân tử tại m/z 302,8 [M]⁺, cho phép xác định công thức phân tử của **VC16** là C₁₅H₁₀O₇ (M = 302,24).

Phổ ¹H-NMR của hợp chất **VC16** cho thấy sự xuất hiện của hai tín hiệu proton thế ở vị trí meta trên vòng A của khung flavonoid tại δ_H 6,20 (1H, d, J = 2,0 Hz, H-6) và 6,41 (1H, d, J = 2,0, H-8). Ba tín hiệu proton xuất hiện tại δ_H 6,90 (d, J = 8,5 Hz), 7,64 (1H, dd, J = 2,0, 8,5 Hz) và 7,75 (1H, d, J = 2,0 Hz), điều này chứng tỏ vòng B của khung flavonoid bị thế ở vị trí 3', 4'.

Phổ ¹³C-NMR của hợp chất **VC16** xuất hiện mười lăm (15) tín hiệu carbon, trong đó một tín hiệu của carbonyl carbon tại δ_C 175,9 (C-4). (Các phổ của hợp chất xem phụ lục 2.16.).

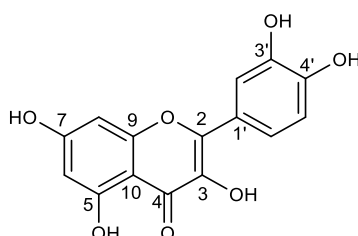
Căn cứ vào số liệu phổ ¹H-NMR, ¹³C-NMR và so với tài liệu đã công bố [99],[192] cho thấy hợp chất **VC16** là **quercetin**, một flavonoid cũng được phân lập từ chi *Polygala*, từ rễ của loài *Polygala caudata* [59],[99] và từ toàn cây của loài *Polygala hongkongensis* [76].

Bảng 3.17. Số liệu NMR của hợp chất VC16 và hợp chất tham khảo

C	δ _C ^d	δ _C [#]	δ _C ^a	δ _H ^a (mult., J = Hz)
2	147,5	156,1	147,4	
3	136,5	133,7	135,8	
4	176,5	175,7	175,9	

5	161,0	160,5	161,1	
6	99,5	98,0	97,9	6,20 (1H, d, $J = 2,0$)
7	166,0	163,7	164,2	
8	94,5	93,3	93,0	6,41 (1H, d, $J = 2,0$)
9	156,7	156,2	156,8	
10	104,0	103,9	103,1	
1'	123,0	121,9	122,8	
2'	116,5	115,0	114,8	7,75 (1H, d, $J = 2,0$)
3'	145,7	144,9	144,8	
4'	148,1	147,5	147,3	
5'	116,0	115,5	114,6	6,90 (d, $J = 8,5$)
6'	121,0	120,0	120,3	7,64 (1H, dd, $J = 2,0,8,5$)

Chú thích: ^aĐo trong CD₃OD; [#]δ_C số liệu của quercetin đo trong DMSO-d₆ [99]; ^dδ_C số liệu của quercetin đo trong DMSO-d₆ [192]



Hình 3.32. CTHH của hợp chất VC16

3.2.3.17. Hợp chất VC17

Hợp chất VC17 thu được dưới dạng tinh thể hình kim, màu vàng. Phổ ¹H-NMR của hợp chất VC17 thấy sự xuất hiện của năm proton thơm, hai tín hiệu proton thế ở vị trí meta trên vòng A của khung flavonoid tại δ_H 6,22 (1H, d, $J = 1,5$ Hz, H-6) và 6,41 (1H, d, $J = 1,5$, H-8). Ba tín hiệu proton xuất hiện tại δ_H 6,89 (d, $J = 8,0$ Hz), 7,64 (1H, dd, $J = 2,0; 8,0$ Hz) và 7,68 (1H, brs), điều này chứng tỏ vòng B của khung flavonoid bị thế ở vị trí 3', 4'. Ngoài ra, trên phổ ¹H-NMR của VC17 còn xuất hiện của gốc rhamnose và glucose dựa trên tín hiệu của anomeric proton của rhamnose là δ_H 4,54 và glucose là δ_H 5,12. Tín hiệu mũi đôi của gốc methyl thuộc đường rhamnose tại δ_H 1,14 (3H, d, $J = 6,0$ Hz).

Trên phổ ¹³C-NMR của chất VC17 thấy sự xuất hiện tín hiệu của hai mươi bảy (27) carbon, trong đó có mười lăm (15) carbon thuộc về phần aglycon và mười hai (12) tín hiệu carbon còn lại thuộc về phần đường dựa vào tín hiệu của hai anomeric carbon. (Các phổ của hợp chất xem phụ lục 3.17.).

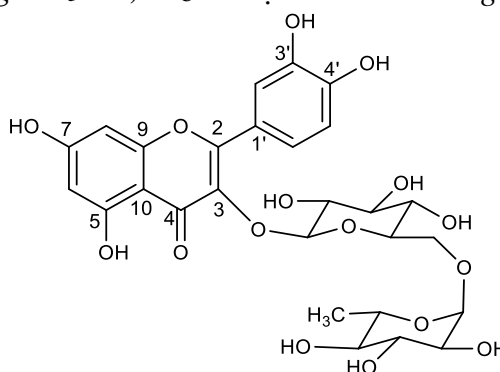
Dựa vào phân tích phổ ở trên, kết hợp với so sánh dữ liệu phổ của hợp chất VC16 cho thấy phần aglycon của hợp chất VC17 là quercetin, phần đường là rutinosit. Căn cứ dữ liệu phổ ¹H-NMR, ¹³C-NMR và dữ liệu phổ ở tài liệu [192] đã công bố, có thể khẳng

định hợp chất **VC17** là **rutin**, một flavonoid đã được phân lập từ một số loài thuộc chi *Polygala* như *P. flavescens*, *P. hongkongensis*, *P. molluginifolia*, *P. paniculata*. [41],[76],[70],[104].

Bảng 3.18. Số liệu NMR của hợp chất **VC17** và hợp chất tham khảo

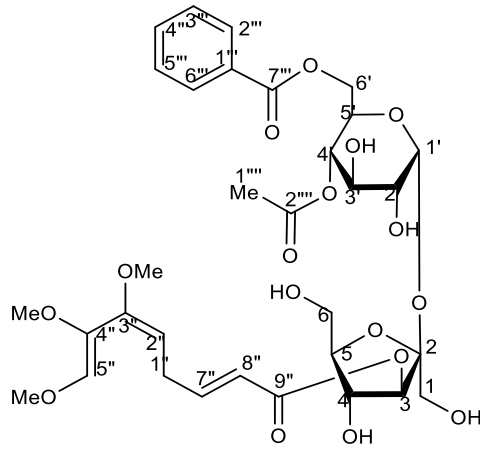
C	δ_C^a	$\delta_C^\#$	δ_H^a (mult., J = Hz)
2	158,6	156,9	
3	135,6	133,9	
4	179,4	178,0	
5	162,9	161,4	
6	100,1	99,7	6,22 (1H, d, J = 1,5 Hz)
7	166,4	166,3	
8	94,9	94,8	6,41 (1H, d, J = 1,5 Hz)
9	159,3	156,7	
10	105,5	104,9	
1'	123,1	122,0	
2'	117,7	116,0	7,68 (1H, brs,)
3'	145,9	145,2	
4'	149,8	148,9	
5'	116,9	117,1	6,89 (d, J = 8,0 Hz),
6'	123,6	122,6	7,64 (1H, dd, J = 2,0; 8,0 Hz)
1''	104,7	102,1	
2''	75,7	76,1	
3''	78,2	77,6	
4''	71,4	71,3	
5''	77,2	77,0	
6''	68,6	68,1	
1'''	102,4	101,7	
2'''	72,1	71,5	
3'''	72,3	71,5	
4'''	73,9	73,0	
5'''	69,7	69,4	
6'''	17,9	19,1	

Chú thích: ^a Đo trong CD₃OD; [#] δ_C Số liệu rutin đo trong CD₃OD [192]

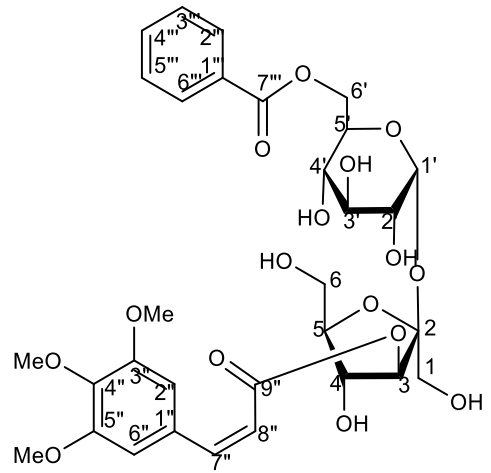


Hình 3.33. CTHH của hợp chất **VC17**

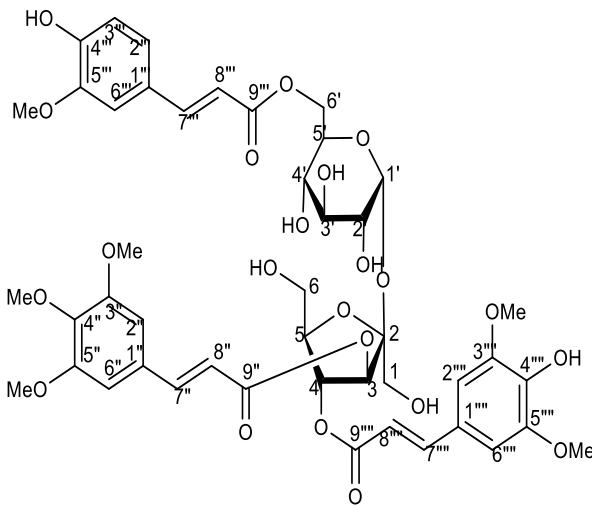
Công thức các hợp chất phân lập được trình bày ở hình 3.34 dưới đây:



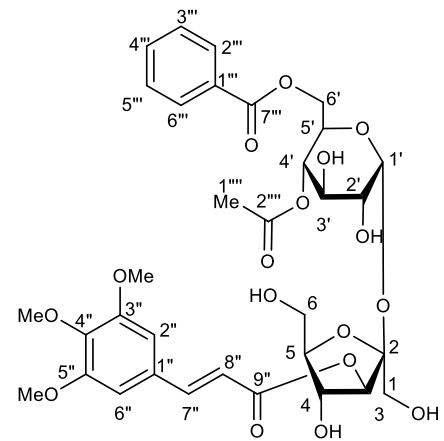
VC1



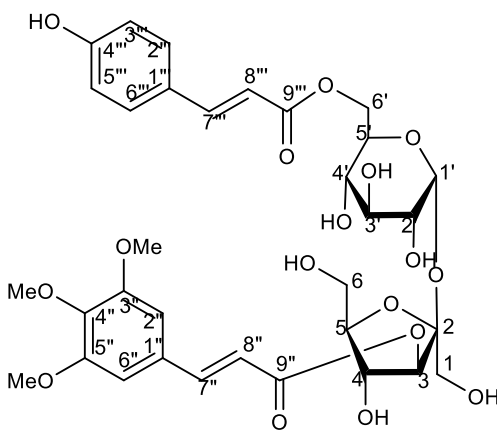
VC2 (chất mới)



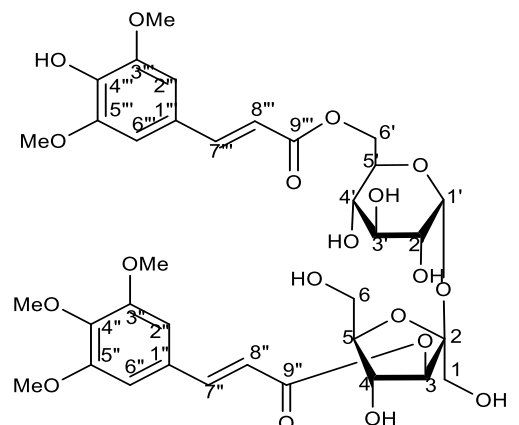
VC3 (chất mới)



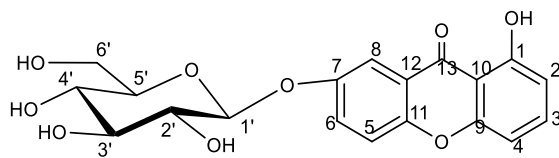
VC4



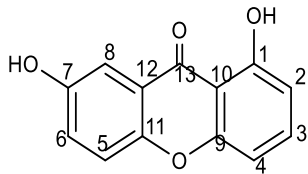
VC5



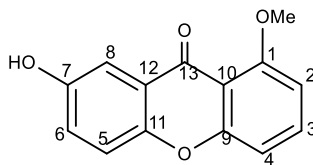
VC6



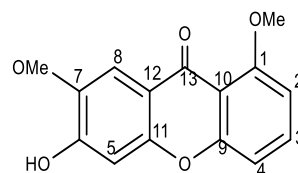
VC7



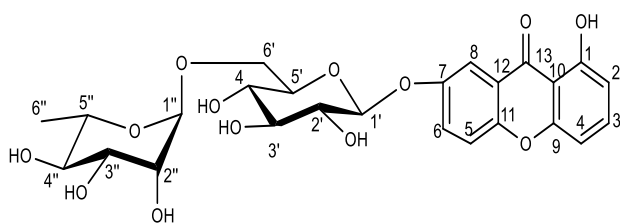
VC8



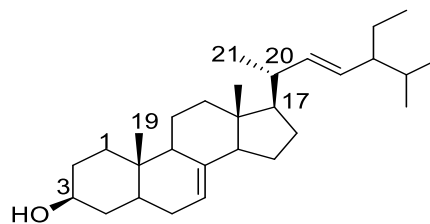
VC9



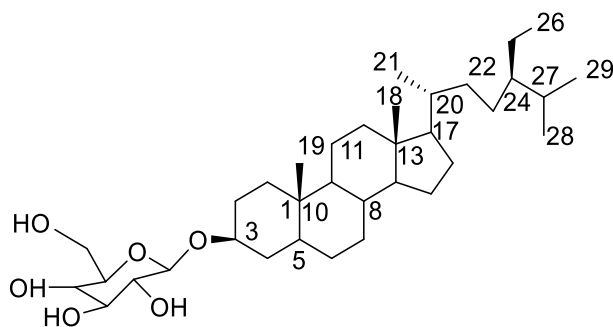
VC10



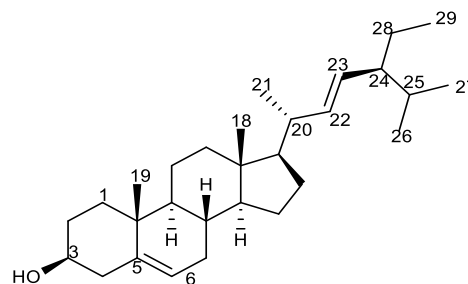
VC11 (chất mới)



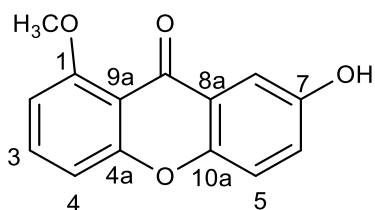
VC12



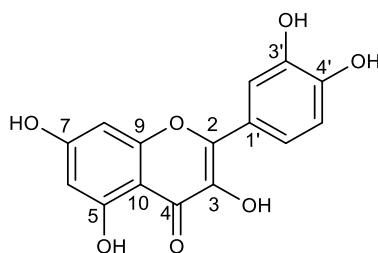
VC13



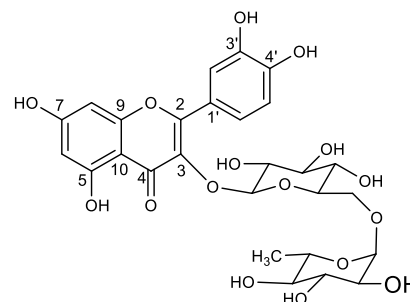
VC14



VC15



VC16



VC17

Hình 3.34. CTHH của 17 hợp chất phân lập được từ rễ của loài *Polygala karensium* Kurz

3.3. TÁC DỤNG SINH HỌC

3.3.1 Kết quả đánh giá ảnh hưởng của các phân đoạn cao chiết rễ cây Viễn chí ba sừng đối với hành vi di chuyển của ấu trùng ruồi giấm mang gen bệnh Alzheimer hAPP

Khi tiến hành lai giữa ruồi bố mẹ kết quả cho thấy mẫu cao chiết phân đoạn dichloromethan (VCD) gây ức chế sự sinh sản, do vậy không đủ lượng ấu trùng và ruồi trưởng thành ở thế hệ F1 để đánh giá hành vi. Do vậy, trong nghiên cứu này **không sử dụng mẫu phân đoạn dichloromethan**.

Cải thiện tốc độ di chuyển là một tiêu chí đánh giá hiệu quả tác dụng của các cao chiết Viễn chí ba sừng lên chức năng vận động của ấu trùng bậc ba ruồi giấm mang gen bệnh Alzheimer hAPP. Trong thử nghiệm này, tiến hành đánh giá tác dụng cải thiện suy giảm trí nhớ ngắn hạn của ấu trùng bậc ba ruồi giấm mang gen bệnh Alzheimer của các dạng cao chiết từ Viễn chí ba sừng (2 mg/ml) và Tacrin (0,1 mg/ml). Chỉ tiêu đánh giá hành vi di chuyển chính là vận tốc trung bình của ấu trùng trong 45 giây.

Kết quả thu được trình bày theo bảng 3.19 dưới đây

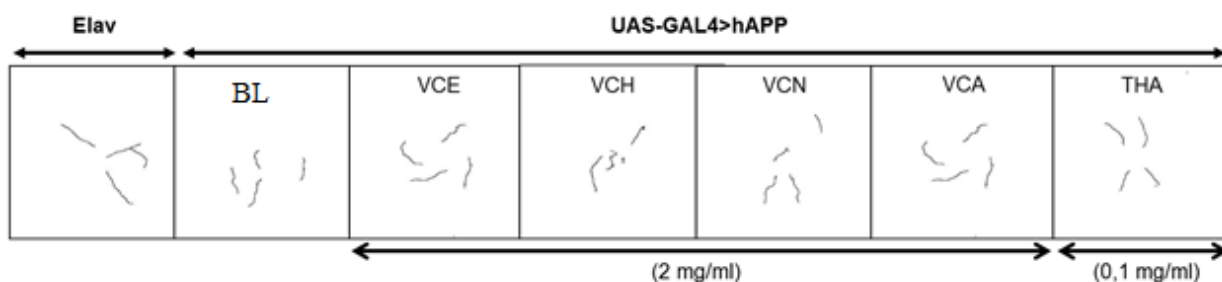
Bảng 3.19. Vận tốc trung bình của các lô ấu trùng ruồi giấm trong thực nghiệm

Crawling assay

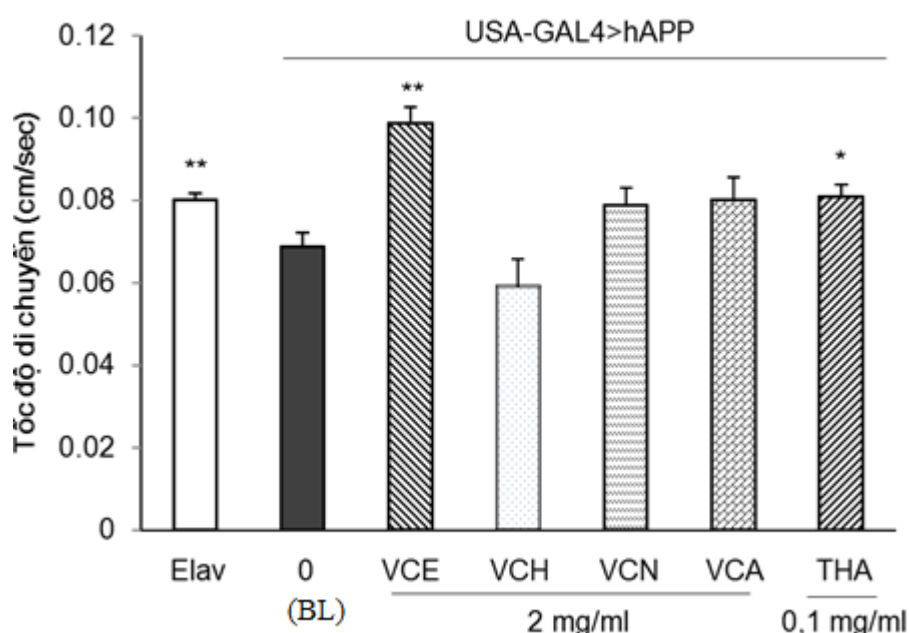
Lô	SL (1)	BL (2)	Tacrin(3)	VCE(4)	VCA(5)	VCH(6)	VCN(7)
Vtb	0,0803	0,0690	0,0810	0,0790	0,0790	0.0592	0,0802
SE	0,0010	0,0030	0,0028	0,0040	0,0040	0.0066	0,0056
P	P₁₋₂< 0,05		P₃₋₂< 0,01	P₄₋₂< 0,05	P ₅₋₂ > 0,05	P ₆₋₂ > 0,05	P ₇₋₂ > 0,05

Chú thích: Lô: Lô ấu trùng; Vtb: Vận tốc trung bình (cm/giây); SL: sinh lý (lô Elav) ; BL: bệnh lý (lô hAPP) ; P: khi so với lô BL

Minh họa kết quả thu được dưới dạng hình vẽ và biểu đồ theo các hình 3.35 và hình 3.36. Hình 3.35. là hình ảnh minh họa quãng đường bò của ấu trùng ruồi giấm ở các lô thử nghiệm, hình 3.36. là biểu đồ thể hiện tốc độ di chuyển của ấu trùng ở các lô thử nghiệm khác nhau. Trong thử nghiệm này VCE: cao chiết còn tổng; VCH: phân đoạn *n*-hexan; VCN: căn nước; VCA: phân đoạn ethyl acetate; cao chiết tổng và các phân đoạn đều thử nghiệm ở nồng độ 2 mg/ml, THA là lô thử nghiệm Tacrin nồng độ 0,1 mg/ml.



Hình 3.35. Hình minh họa quãng đường di chuyển của ấu trùng bậc ba ruồi giấm ở các lô thử nghiệm



Hình 3.36. Tác dụng của Viên chí ba sừng đối với khả năng di chuyển của ấu trùng bậc ba ruồi giấm mang gen bệnh Alzheimer hAPP

Chú thích: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ khi so sánh với lô chứng bệnh lý.

Từ các kết quả thu được cho thấy:

Tốc độ ở lô ấu trùng ruồi sinh lý khi so sánh với lô ấu trùng ruồi bệnh lý cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P_{1-2} < 0,05$), như vậy triển khai mô hình đánh giá khả năng vận động trên mô hình ruồi giấm Alzheimer thành công và phù hợp để đánh giá tác dụng của các cao chiết.

Lô ấu trùng bậc ba ruồi giấm mang gen bệnh Alzheimer được điều trị bằng cao chiết ethanol toàn phần (VCE, 2 mg/ml), và Tacrin (0,1 mg/ml) có tốc độ di chuyển nhanh hơn so với lô bệnh lý, đạt ý nghĩa thống kê với giá trị P_{3-2} và P_{4-2} đều $< 0,05$.

Mặc dù lô ấu trùng ruồi giấm chuyển gen Alzheimer được điều trị bằng cao phân đoạn ethyl acetate (VCA, 2 mg/ml) và cần nước (VCN, 2 mg/ml) ở nồng độ 2 mg/ml đều

có xu hướng tốc độ di chuyển cao hơn lô ấu trùng ruồi bệnh lý, tuy nhiên sự khác biệt này chưa có ý nghĩa thống kê với P_{5-2} và P_{7-2} đều $>0,05$.

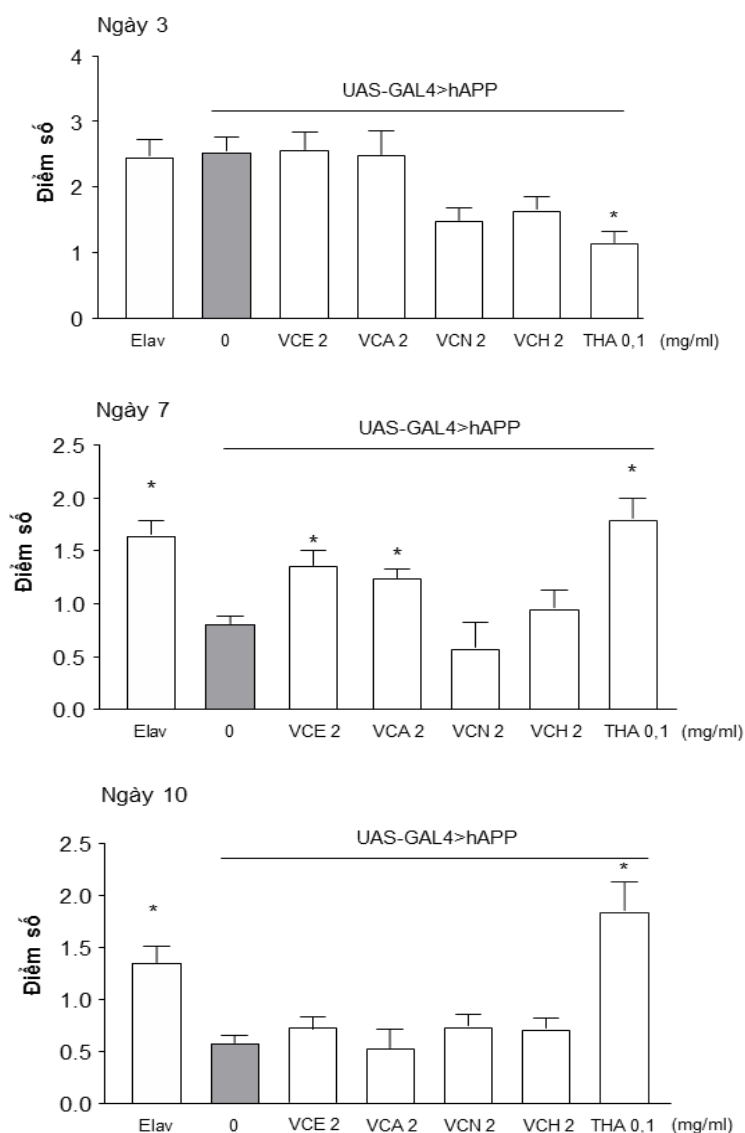
Lô ấu trùng ruồi giấm chuyển gen Alzheimer được điều trị bằng phân đoạn *n*-hexan (2 mg/ml) có tốc độ di chuyển thấp hơn lô ấu trùng ruồi bệnh lý, tuy nhiên sự khác biệt này chưa có ý nghĩa thống kê với $P_{6-2} > 0,05$.

Như vậy, kết quả thu được chứng minh cao chiết ethanol toàn phần có tác dụng cải thiện suy giảm hành vi vận động của ấu trùng ruồi giấm mang gen bệnh Alzheimer hAPP.

3.3.2. Kết quả đánh giá ảnh hưởng của các phân đoạn cao chiết rễ cây Viễn chí ba sừng đối với hành vi leo trèo của ruồi giấm trưởng thành mang gen bệnh Alzheimer hAPP

Cải thiện khả năng leo trèo là một tiêu chí đánh giá tác dụng của thuốc lên chức năng vận động của ruồi giấm trưởng thành. Do vậy, trong luận án tiến hành đánh giá tác dụng của các cao chiết Viễn chí ba sừng đối với hành vi leo trèo của ruồi giấm trưởng thành mang gen bệnh Alzheimer hAPP. Hành vi leo trèo được đánh giá ở các ngày thứ 3, 7 và 10 của ruồi thế hệ F1 trưởng thành, được ăn thức ăn có bổ sung các dạng cao chiết Viễn chí ba sừng liên tục từ thế hệ bố mẹ cho đến thế hệ F1 để đánh giá hành vi. Đánh giá khả năng vận động của ruồi giấm trưởng thành được tiến hành đánh giá qua số điểm trung bình mà ruồi giấm đạt được. Số điểm cho vận động của ruồi giấm theo tiêu chí đánh giá ở mục 2.3.3.3.

Các kết quả được xử lý và biểu diễn theo hình 3.37 (*Kết quả chi tiết của thử nghiệm climbing xem phụ lục 4.1-4.3*)



Hình 3.37. Tác dụng của Viên chí ba sừng đối với hành vi leo trèo của ruồi giấm trưởng thành mang gen bệnh Alzheimer ở 3, 7 và 10 ngày tuổi.

* $p < 0,05$ khi so sánh với nhóm chứng bệnh lý ở cùng thời điểm thử nghiệm

Kết quả được chỉ ra ở hình 3.37 cho thấy:

Khả năng leo của lô chứng sinh lý Elav so với nhóm ruồi giấm mang gen bệnh Alzheimer thể hiện sự khác biệt ở ngày 7 và ngày 10 có ý nghĩa thống kê (ngoại trừ ngày 3), đạt thống kê với giá trị $P < 0,05$. Điều này cho thấy mô hình phù hợp để đánh giá khả năng vận động của ruồi giấm ở ngày 7 và ngày 10 là thích hợp. Trong số các cao chiết thử nghiệm, chỉ có cao chiết ethanol toàn phần (VCE, 2 mg/ml) và cao phân đoạn ethyl acetate (VCA, 2 mg/ml) có tác dụng phục hồi suy giảm hành vi vận động ở ruồi giấm F1 trưởng thành 7 ngày tuổi ($P < 0,05$).

Tacrin (0,1 mg/ml) được sử dụng làm thuốc đối chứng dương thể hiện tác dụng cải thiện suy giảm hành vi vận động đáng kể trên ruồi giấm F1 trưởng thành ở cả 7 và 10 ngày tuổi ($P < 0,05$).

Như vậy, nghiên cứu tác dụng của Viễn chí ba sừng trên hành vi vận động của ruồi giấm mang gen bệnh Alzheimer hAPP đã chứng minh *cao chiết ethanol toàn phần có tác dụng cải thiện suy giảm hành vi trên cả 2 thử nghiệm hành vi di chuyển của ấu trùng bậc ba và thử nghiệm hành vi leo trèo của ruồi giấm trưởng thành; cao phân đoạn ethyl acetate thể hiện tác dụng trên thử nghiệm hành vi leo trèo của ruồi giấm trưởng thành.*

3.3.3. Kết quả đánh giá khả năng học tập và ghi nhớ mùi của ấu trùng ruồi giấm mang gen bệnh Alzheimer hAPP của các phân đoạn cao chiết

Bệnh lý Alzheimer là bệnh lý sa sút trí tuệ, biểu hiện giảm khả năng nhận thức và ghi nhớ, chính vì vậy trong luận án sử dụng thử nghiệm đánh giá khả năng ghi nhớ mùi của ấu trùng bậc ba của thế hệ F1 ruồi giấm mang gen bệnh Alzheimer để đánh giá tác dụng của một số dạng cao chiết từ vỏ rễ Viễn chí ba sừng. Trong số 5 mẫu cao chiết bao gồm: cao chiết ethanol toàn phần (VCE), cao chiết phân đoạn *n*-hexan (VCH), cao chiết phân đoạn dichloromethan (VCD), ethyl acetate (VCA), và cồn nước (VCN), khi tiến hành lai giữa ruồi bố mẹ kết quả cho thấy mẫu cao chiết phân đoạn dichloromethan (VCD) gây ức chế sự sinh sản, do vậy không đủ lượng ấu trùng và ruồi trưởng thành ở thế hệ F1 để đánh giá hành vi. Do vậy, mẫu phân đoạn VCD không được sử dụng trong nghiên cứu này.

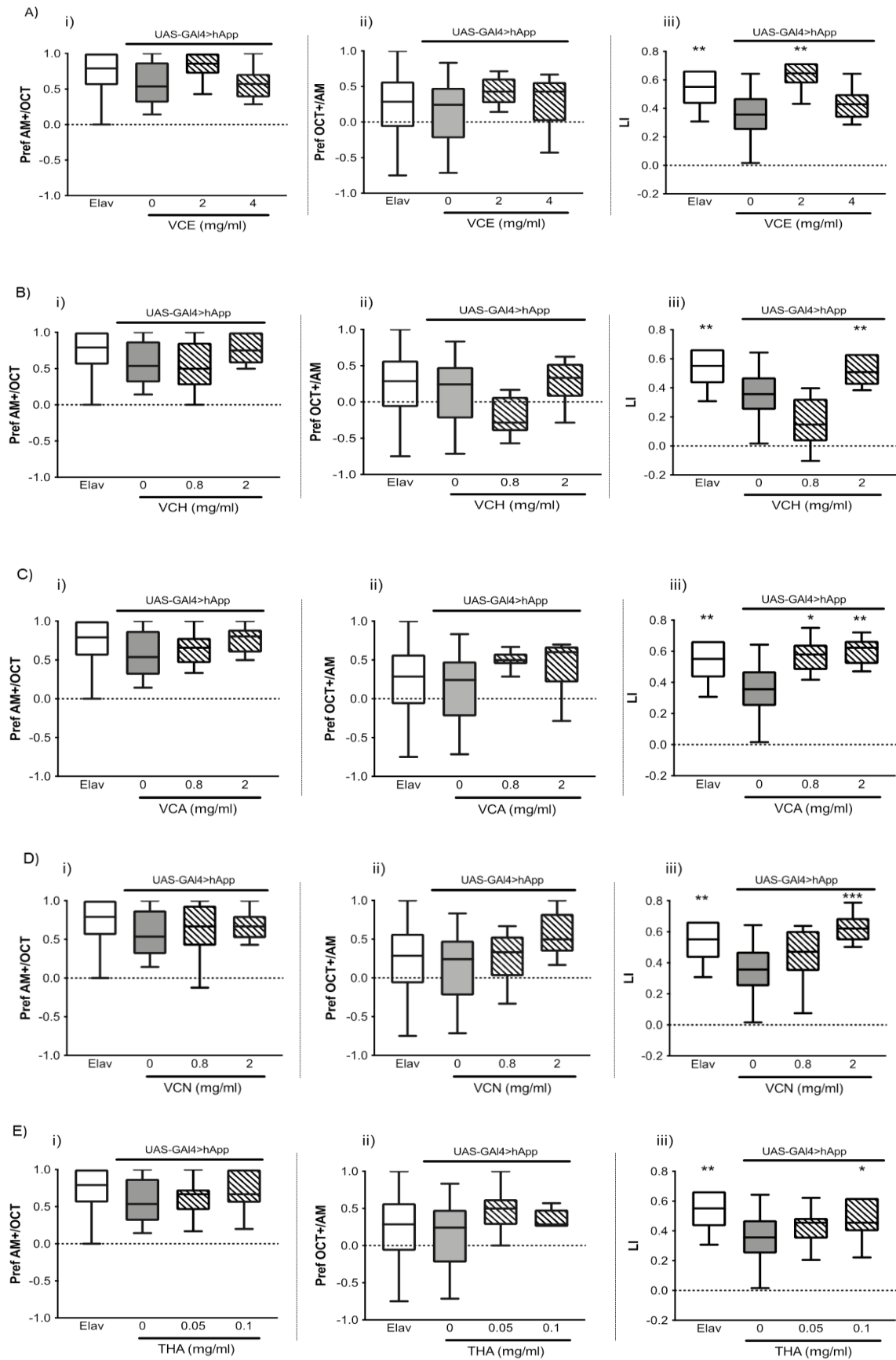
Chỉ tiêu đánh giá: các chỉ số $PREF_{AM}$, $PREF_{OCT}$ và LI. So sánh các chỉ số $PREF_{AM}$, $PREF_{OCT}$ và LI giữa các lô.

$PREF_{AM}$ là chỉ số ưu tiên mùi AM (*n*-amyl acetat), được tính ở những thí nghiệm mà mùi AM được kết hợp với phần thưởng để đo tỉ lệ ấu trùng nhớ mùi và đi về phía mùi AM.

$PREF_{OCT}$ là chỉ số ưu tiên mùi OCT (1-octanol), được tính ở những thí nghiệm mà mùi OCT được kết hợp với phần thưởng để đo tỉ lệ ấu trùng nhớ mùi và đi về phía mùi OCT.

Kết quả đánh giá tác dụng cải thiện trí nhớ mùi trên ấu trùng ruồi giấm F1 dựa trên các chỉ tiêu $PREF_{AM}$, $PREF_{OCT}$ và LI giữa các lô được trình bày ở phụ lục 4.4.

Thể hiện kết quả đánh giá tác dụng cải thiện trí nhớ mùi trên ấu trùng ruồi giấm F1 được biểu diễn bằng biểu đồ box-and-whisker plot ở hình 3.38. dưới đây.



Hình 3.38. Đánh giá khả năng ghi nhớ và học tập của các cao chiết Viễn chí ba sừng
 Chú thích: *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001 được so sánh với lô chứng bệnh lý.

Kết quả cho thấy: ở lô chứng sinh lý Elav, chỉ số học tập LI của ấu trùng bậc ba cao hơn đáng kể (khoảng 43%) so với nhóm ấu trùng ruồi mang gen bệnh Alzheimer, đạt sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 0,01$), như vậy mô hình này là phù hợp để đánh giá đánh giá khả năng ghi nhớ và học tập ngắn hạn của ấu trùng bậc ba ruồi giấm mang gen bệnh Alzheimer hAPP.

Điều trị bằng các cao chiết Viễn chí ba sừng, bao gồm: cao chiết ethanol toàn phần (2 mg/ml), cao chiết phân đoạn *n*-hexan (2 mg/ml), cao chiết phân đoạn ethyl acetate (0,8 và 2 mg/ml) và cồn phân đoạn nước (2 mg/ml) cũng như Tacrin (sử dụng làm đối chứng dương, liều 0,1 mg/ml) đều có tác dụng phục hồi suy giảm trí nhớ ngắn hạn trên ấu trùng bậc ba ruồi giấm mang gen bệnh Alzheimer hAPP, được thể hiện thông qua chỉ số học tập LI ở các lô điều trị cao hơn đáng kể so với lô bệnh lý, với giá trị P có ý nghĩa thống kê, đều $< 0,05$ (xem phụ lục 4.4.).

Những kết quả này đã cho thấy, **cao chiết ethanol toàn phần cũng như các phân đoạn chiết từ cao chiết ethanol đã thử nghiệm (phân đoạn *n*-hexan, ethyl acetate, cồn nước) đều tham gia vào tác dụng cải thiện suy giảm trí nhớ ngắn hạn trên ruồi giấm chuyển gen mang bệnh Alzheimer.**

CHƯƠNG 4: BÀN LUẬN

4.1. VỀ THỰC VẬT HỌC

Tên khoa học của mẫu nghiên cứu là *Polygala karensium* Kurz, có tên đồng danh là *Polygala tricornis* Gagnep., thuộc họ Viền chí Polygalaceae. Việc giám định đúng tên khoa học của mẫu nghiên cứu giúp cho các công bố về thành phần hóa học và tác dụng dược lý được rõ nguồn gốc.

Trong luận án này, thông qua việc nghiên cứu về thực vật học đã mô tả được các đặc điểm hình thái và đặc điểm vi học của thân và rễ viền chí.

Về đặc điểm hình thái thực vật. Đã mô tả được các đặc điểm của cây, thân, lá, hoa, quả và rễ phù hợp với đặc điểm chi *Polygala* ở phần tổng quan 1.1. So sánh mẫu nghiên cứu với các đặc điểm đặc trưng của loài *Polygala karensium* trên thế giới [1], [5], [11], kết quả cho thấy:

Đặc điểm *cây bụi*: phù hợp, mẫu nghiên cứu thuộc loại cây bụi cao 0,5-1 m.

Đặc điểm *phiến lá hình mác hoặc elip mác*: phù hợp, mẫu nghiên cứu có lá đơn, mọc so le, rất đa dạng, lá gốc hình elip, lá phía trên hình mác.

Đặc điểm *hạt có lông*: phù hợp, mẫu nghiên cứu có hạt màu nâu đen, hình trứng, lông tơ.

Đặc điểm *hoa 2–2.5 cm: có sự khác biệt, mẫu nghiên cứu có hoa kích thước 2,5-4cm, lớn hơn so với đặc điểm các loài Polygala karensium* đã được các tài liệu trên mô tả.

Như vậy, đặc điểm hình thái mẫu *Polygala karensium* thu hái tại Sa Pa, Lào Cai giống các loài *Polygala karensium* trên thế giới, ngoài trừ một đặc điểm khác biệt là kích thước hoa lớn hơn.

Về đặc điểm vi học, ***đây là lần đầu tiên mô tả các đặc điểm vi học về loài Polygala karensium Kurz ở Việt Nam.*** Thông qua nghiên cứu thực vật, đã xác định được đặc điểm vi học của các bộ phận cây như sau.

Đặc điểm vi học thân, xác định được 7 thành phần, gồm có lớp biểu bì, lớp bần, mô dày, mô mềm vỏ, mô cứng, lớp libe, lớp gỗ, mô mềm ruột.

Đặc điểm vi học rễ, xác định được 5 thành phần, gồm có lớp bần, mô mềm vỏ, tinh thể calci oxalat, lớp libe và lớp gỗ.

Đặc điểm vi học lá, xác định được 6 thành phần, gồm có lông che chở, lớp biểu bì, mô mềm, mô cứng, lớp libe và lớp gỗ.

Đã xác định được đặc điểm bột rễ loài nghiên cứu có 8 thành phần, gồm mảnh mang màu, hạt tinh bột, bó sợi, lông che chở, mô mềm, tinh thể calci oxalat, mô cứng.

Với những đặc điểm nghiên cứu được, có thể góp phần tiêu chuẩn hóa việc kiểm nghiệm nhận dạng loài *Polygala karensium* Kurz.

4.2. VỀ HÓA HỌC

Trên thế giới, các nghiên cứu về thành phần hóa học của cây Viền chí ba sừng *Polygala karensium* Kurz, Polygalaceae còn chưa có nhiều. **Ở Việt Nam, chưa có bất kỳ nghiên cứu nào về thành phần hóa học của loài Viền chí ba sừng.** Do đó, việc nghiên cứu thành phần hóa học, bao gồm xác định các nhóm chất, cấu trúc các hợp chất trong rễ cây Viền chí ba sừng là cần thiết. Thông qua việc tìm hiểu, tra cứu tài liệu về tác dụng của các nhóm hoạt chất, các hợp chất phân lập được sẽ cung cấp cơ sở khoa học góp phần giải thích công dụng trong y học cổ truyền cũng như tìm kiếm các tác dụng mới của rễ cây Viền chí ba sừng.

4.2.1. Kết quả định tính

Kết quả định tính bằng ống nghiệm cho thấy trong rễ cây Viền chí ba sừng có các chất có gốc OH-phenol, nhóm saponin, flavonoid, đường khử, acid hữu cơ, chất béo và sterol.

4.2.2. Kết quả phân lập và xác định cấu trúc các chất

Trong luận án này, thông qua khảo sát tài liệu, khảo sát bằng sắc ký lớp mỏng, tiến hành phân lập bằng các phương pháp sắc ký cột, sắc ký lỏng điều chế cao áp; tiến hành đo các phổ để nhận dạng các chất phân lập được. **Kết quả đã chiết xuất phân lập và xác định các cấu trúc 17 hợp chất từ các phân đoạn cao chiết ethyl acetate, phân đoạn cao chiết dichloromethan và phân đoạn cao chiết nước.**

Từ phân đoạn cao chiết ethyl acetate thu được 9 hợp chất gồm **2 hợp chất mới VC3** (7,0 mg), **VC11** (7,0 mg), cùng với 7 hợp chất **VC4** (7,0 mg), **VC6** (8,0 mg), **VC10** (3,0 mg) và **VC9** (7,5 mg), **VC8** (8,0 mg), **VC16**(10,2 mg), **VC17**(12,3 mg).

Từ phân đoạn cao chiết dichloromethan thu được 4 hợp chất gồm **VC12** (11,2 mg), **VC13** (15,8mg), **VC14** (12mg), **VC15** (9,8mg).

Từ phân đoạn cao chiết nước thu được **chất mới VC2** (8,0 mg) cùng với 3 hợp chất **VC1** (4,5 mg), **VC5** (5,4 mg), **VC7** (10,5 mg).

Thông qua việc đo các dữ liệu phổ vật lý, đã xác định được cấu trúc của 17 hợp chất phân lập được từ rễ của loài *Polygala karensium* Kurz (Polygalaceae). **Trong số 17 hợp chất đã phân lập được, có 3 hợp chất mới và 14 hợp chất đã biết.**

Ba hợp chất mới lần đầu phân lập được trong thiên nhiên gồm hai chất sucrose ester là karensucrose A (VC2), karensucrose B (VC3), một chất xanthon mới là karenxanthon (VC11).

Mười bốn hợp chất đã biết, gồm 3-(*E*)-3,4,5-trimethoxycinnamoyl-6'-benzoylsucrose (VC1), tricornose B (VC4), glomeratose C (VC5), tenuifolisid C (VC6), wubangzsid B (VC7), 1,7-dihydroxyxanthon (VC8), 7-hydroxy-1-methoxyxanthon (VC9), 6-hydroxy-1,7-dimethoxyxanthon (VC10), spinasterol (VC12), daucosterol (VC13), stigmasterol (VC14), 7-hydroxy-1-methoxyxanthon (VC15), quercetin (VC16), rutin (VC17).

Trong 14 hợp chất đã biết, theo tham khảo các tài liệu cho thấy **9 hợp chất VC5, VC7, VC9, VC19, VC12, VC13, VC14, VC16, VC17 là các hợp chất lần đầu tiên phân lập được từ loài *Polygala karensium* Kurz.**

Về cấu trúc hóa học của các hợp chất phân lập được. Có 7 hợp chất thuộc nhóm xanthon, gồm chất mới karenxanthon VC11, cùng 6 hợp chất VC5, VC7, VC8, VC9, VC10, VC15. Trong đó các hợp chất VC7, VC8, VC9, VC10, VC15 là các xanthon có khung cơ bản, chỉ khác nhau ở nhóm thế ở các vị trí C-1, C-6, C-7. Hợp chất VC7 (wubangzsid B), có danh pháp euxanthon-7-*O*- β -D-glucopyranosid, là dẫn xuất của euxanthon (1,7-dihydroxyxanthon) với nhóm thế hydroxy ở vị trí C-1 giữ nguyên, còn nhóm thế hydroxy ở vị trí C-7 bị thay thế bởi phần đường glucopyranosid. Chất mới karenxanthon VC7 ở vị trí C-7 của khung xanthon có gắn nhóm thế là đường phức hợp 7-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosid. Hợp chất VC5 (glomeratose C), có thể coi là một hợp chất xanthonoloid C-glycosid với nhóm dihydrobenzofuran dạng trans gắn vào vòng B của khung xanthon cơ bản.

Có 2 hợp chất có cấu trúc euflavonoid là VC16 và VC17.

Có 5 hợp chất có cấu trúc sucrose, tức là trong cấu trúc có glucose và fructose liên kết với nhau bằng liên kết (1 \rightarrow 2) glucoside, gồm 2 chất mới karensucrose A-B (VC2, VC3) và các hợp chất (VC1, VC4, VC6). Hợp chất glomeratose C (VC5), ngoài xếp vào nhóm xanthon, còn có thể coi là một sucrose với biểu hiện trong cấu trúc có glucose và fructose liên kết với nhau bằng liên kết (1 \rightarrow 2) glucoside.

Các hợp chất còn lại (VC12, VC13, VC14) có cấu trúc sterol.

Như vậy, kết quả phân lập được các chất có cấu trúc phù hợp với các kết quả định tính nhóm chức. Các hợp chất phân lập được cũng phù hợp với nhóm các chất hóa học của chi *Polygala* và loài *Polygala karensium* Kurz, thường là các nhóm xanthon, oligosacharid đã trình bày trong phần tổng quan.

Thông tin về các chất cụ thể như dưới đây.

Các hợp chất mới, hợp chất VC2, VC3, VC11

Hợp chất VC2 (chất mới karensucrose A), có danh pháp được xác định là 3-*O*-[(*Z*)-3,4,5-trimethoxycinnamoyl]- β -D-fructofuranosyl-(2 \rightarrow 1)-(6-*O*-benzoyl)- α -D-glucopyranosid.

Hợp chất VC3 (chất mới karensucrose B), có danh pháp được xác định là [3-*O*-(*E*)-3,4,5-trimethoxycinnamoyl]-[4-*O*-sinapoyl]- β -D-fructofuranosyl-(2 \rightarrow 1)-(6-*O*-sinapoyl)- α -D-glucopyranosid.

Đây là các sucrose este, có cấu trúc gần giống nhau, chỉ khác cấu hình Z- của nhóm 3,4,5 trimethoxycinnamoyl ở vị trí C-7'' và C-8'' (thông qua cầu nối Oxy của C- 3 của phân tử glucose trong cấu trúc khung sucrose).

Hợp chất VC11 (chất mới karenxanthon), hợp chất xanthon mới này có danh pháp được xác định là 1,7-dihydroxyxanthon 7-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosid. Đây là một xanthon có cấu trúc khung cơ bản, cấu tạo hợp chất này tương tự hợp chất VC7 (wubangzsid B), ngoại trừ sự xuất hiện thêm một đường rhamnopyranosyl ở vị trí của glc C-6.

Hợp chất VC1:

Hợp chất VC1, có danh pháp là 3-*O*-[(*E*)-3,4,5-trimethoxycinnamoyl]- β -D-fructofuranosyl-(2 \rightarrow 1)-(6-*O*-benzoyl)- α -D-glucopyranosid. Hợp chất này trước đây được Jun Li phân lập được từ loài *P. tricornis* [82]. Ngoài ra hợp chất này còn được tìm thấy ở các loài *Polygala* khác như *P. tenuifolia* [96], *P. glometara* [84].

Hiện chưa thấy có tài liệu nào nghiên cứu về tác dụng dược lý của hợp chất này. Một nghiên cứu về tác dụng của một hợp chất có cấu trúc tương tự, hợp chất β -D-[3-*O*-(3,4,5-trimethoxycinnamoyl)]-fructofuranosyl- α -D-[6-*O*-(4-methoxybenzoyl)]-glucopyranosid phân lập từ loài *P. japonica* cho thấy hợp chất này có tác dụng chống viêm, ở nồng độ 20 và 40 μ M có tác dụng ức chế NO và PGE2 với IC₅₀ bằng 11,7 và 22,5 μ M [192]. Năm 2004, Kawashima K và Cs công bố acid 3,4,5-trimethoxycinnamic (TMCA) phân lập được từ loài *P. tenuifolia* có tác dụng kéo dài thời gian gây ngủ của barbiturat, có

tác dụng an thần trên chuột [117]. Điều này gợi ý về các chất có chứa TMCA hoặc có chứa nhóm 3,4,5-trimethoxycinnamoyl như hợp chất số 1,2 và hợp chất số 3, có thể có tác dụng trên thần kinh trung ương và tác dụng chống viêm, tuy nhiên cần các nghiên cứu thực nghiệm để chứng minh.

Hợp chất VC4: tricornose B

Hợp chất tricornose B có danh pháp là 3-*O*-[(*E*)-3,4,5,-trimethoxycinnamoyl]- β -D-fructofuranosyl-(2 \rightarrow 1)-(4-*O*-acetyl)-(6-*O*-benzoyl)- α -D-glucopyranosid. Hợp chất này đã được Li và Cs phân lập từ loài *P. karensium* vào năm 2005 [82]. Hợp chất này có thể coi như một phenylpropanoid sucrose este với nhóm thế ở vị trí 3'. Hiện nay chưa thấy có công bố nào về tác dụng của hợp chất này.

Hợp chất VC5: glomeratose C

Glomeratose C là tên viết tắt của hợp chất có danh pháp là 3-*O*-[(*E*)-3,4,5-trimethoxycinnamoyl]- β -D-fructofuranosyl(2 \rightarrow 1)-[6-*O*-(*E*)-*p*-coumaroyl]- α -D-glucopyranosid.

Đây là lần đầu tiên, hợp chất glomeratose C phân lập được từ loài *Polygala karensium* Kurz Năm 1998, Zhang D và Cs đã phân lập được hợp chất này từ rễ loài *Polygala glometara* [84]. Hợp chất này có thể coi như một phenylpropanoid sucrose este với nhóm thế ở vị trí 3' và 6'. So về cấu trúc với các hợp chất 1 và 2, hợp chất số 5 cũng có mang nhóm thế 3,4,5 trimethoxycinnamoyl tuy nhiên ở dạng cấu hình E, gắn ở vị trí C-7". Các hợp chất có cấu trúc khung tương tự glomeratose B, C, D, E, F, G cũng được phân lập trong một số loài thuộc chi *Polygala*. Trước đó, cũng từ loài *Polygala karensium*, Li và Cs đã phân lập được hợp chất có cấu trúc gần tương tự đặt tên là glomeratose A [82].

Hiện chưa thấy có tài liệu công bố về tác dụng dược lý của glomeratose C. Một chất có cấu trúc tương tự, glomeratose A, đã được nghiên cứu về tác dụng dược lý thực nghiệm bảo vệ tế bào, bảo vệ tế bào thần kinh bị tổn thương. Nghiên cứu của Li và Cs năm 2017 cho thấy glomeratose A ở nồng độ 52.49 μ g/mL có tác dụng bảo vệ tế bào PC12 trong mô hình sử dụng OGD (oxygen-glucose deprivation) gây tổn hại tế bào PC12 tương tự cơ chế gây sốc, đột quỵ trên người từ đó có thể coi hoạt chất này có tiềm năng nghiên cứu khai thác tác dụng trong bảo vệ tế bào não chống sốc và đột quỵ [194].

Một chất có cấu trúc gần tương tự với glomeratose C, hợp chất glomexanthone A đã được thử nghiệm về tác dụng bảo vệ thần kinh của chúng đối với tổn thương tế bào do acid L-glutamic (30 mM) gây ra trong tế bào SK-N-SH của bệnh u nguyên bào thần kinh ở người, bằng phương pháp sử dụng xét nghiệm MTT với chất đối chứng dương là resveratrol. Kết

quả cho thấy glomexanthon A ở nồng độ 10 μM làm tăng khả năng sống của tế bào bị tổn thương do acid L-glutamic (30 mM) gây ra so với chất đối chiếu dương, nói cách khác glomexanthon A có tác dụng bảo vệ tế bào thần kinh. Các tác giả cho rằng tác dụng bảo vệ tế bào thần kinh của hợp chất này có liên quan đến gốc 2-hydroxymethyl-5-hydroxy-2-pentenoic [66]. Các hợp chất glometarose B- F còn lại với cấu trúc khung tương tự, đặc biệt glometarose C cũng có gốc 2-hydroxymethyl-5-hydroxy-2-pentenoic trong cấu trúc cho thấy có tiềm năng tác dụng bảo vệ tế bào thần kinh, tuy nhiên cần có nghiên cứu dược lý để khẳng định glometarose C có tác dụng bảo vệ tế bào thần kinh hay không.

Hợp chất VC6: tenuifolisid C

Hợp chất này đã được phân lập từ loài *Polygala karensium* Kurz vào năm 2005 [82]. Trước đó hợp chất này được phân lập từ *Polygala tenuifolia* năm 1991 [95] và loài *Polygala glometara* vào năm 1998 [24].

Nghiên cứu của Li và Cs cho thấy tenuifolisid C, ở nồng độ 57.35 $\mu\text{g/mL}$ có tác dụng bảo vệ tế bào PC12 trong mô hình sử dụng OGD (oxygen-glucose deprivation) gây tổn hại tế bào PC12 tương tự cơ chế gây sốc, đột quỵ trên người từ đó có thể coi hoạt chất này có tiềm năng nghiên cứu khai thác tác dụng bảo vệ tế bào não chống sốc và đột quỵ [194]. Ngoài ra báo cáo [195] cho thấy, hợp chất này có ảnh hưởng đến cytochrom P450 ở gan, cụ thể tenuifolisid C thể hiện hoạt tính ức chế chlorzoxazone 6-hydroxylation xúc tác bởi chlorzoxazone với IC_{50} bằng 38.73 $\mu\text{mol/L}$

Hợp chất VC7: wubangzsid B

Đây là lần đầu tiên phân lập được hợp chất này từ loài *Polygala karensium* Kurz. Wubangzsid B (**145**) là một hợp chất thuộc nhóm xanthon, có danh pháp là euxanthon-7-O- β -D-glucopyranosid lần đầu tiên được các nhà khoa học Trung Quốc phân lập từ loài *Polygala caudata* vào năm 1984 [60]. Loài *Polygala caudata* ở Trung Quốc được gọi là 乌棒子, phiên âm quốc tế « wubangzi », nên một số xanthon được các nhà khoa học Trung Quốc phân lập được từ loài này được đặt tên wubangzsid A, B, C. Cấu trúc 2 hợp chất wubangzsid A, B giống nhau đều cùng khung cơ bản xanthon, chỉ khác nhau nhóm thế ở vị trí số 7 [60], [61].

Hợp chất wubangzsid B (**145**) đã được tìm thấy ở một số loài khác thuộc chi *Polygala* như *P. tenuifolia*, *P. wattersii*, *P. crotalarioides*. Ngoài ra, hợp chất này cũng được phân lập từ các loài không thuộc chi *Polygala* như *Veratrilla baillonii* Franch [65],[78],[204], [205].

Hiện tại, chưa thấy có nghiên cứu về tác dụng dược lý của các hợp chất wubangzsid này.

Hợp chất VC8: 1,7-dihydroxyxanthon

Hợp chất này thường được gọi là euxanthon (**153**), được tìm thấy từ nhiều loài thuộc chi *Polygala* như *P. arillata*, *P. caudata*, *P. telephioides*, *P. tenuifolia* [51], [54], [63],[64]. Euxanthone còn phân lập được ở nhiều loài không thuộc chi *Polygala* như : *Weddellina squamulosa*, *Mammea americana* L, *Hypericum mysorense*, *Poeciloneuron pauciflorum*, *Mammea acuminata*, *Garcinia hombroniana*, *Garcinia dulcis*, *Vismia rubescens* (Guttiferae) , *Garcinia succifolia*...

Hợp chất này được công bố một số kết quả về tác dụng dược lý thực nghiệm như:

-Tác dụng chống vi khuẩn và nấm.

Có tác dụng ức chế 4 chủng vi khuẩn *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus* và *Pseudomonas aeruginosa* với MIC = 3,12–100 µg/ml, ức chế các chủng nấm *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* và *Cryptococcus neoformans*. Hợp chất euxanthone còn có khả năng hiệp đồng tăng tác dụng của oxacillin, ức chế hoạt tính của GFR-tyrosine kianse, với IC₅₀ = 223nM [196],[197].

-Tác dụng chống vi sinh vật gây sốt rét.

Theo Likhitwitayawuid và Cs [198], hợp chất euxanthon có tác dụng chống vi sinh vật gây sốt rét trên thực nghiệm. Hợp chất euxanthon được chiết xuất từ vỏ thân của loài *Garcinia dulcis*, có tác dụng ức chế tương đối mạnh chủng *Plasmodium falciparum* với IC₅₀ là 3,88 µg/ml so với thuốc đối chiếu pyrimethamine và chloroquinie có IC₅₀ là 2,80 và 0,03 µg/ml.

-Tác dụng dọn gốc tự do, tác dụng giãn mạch vành.

Nghiên cứu của Lin và Cs cho thấy euxanthon ở các nồng độ 2 µg/ml và 10 µg/ml có tác dụng làm giãn mạch vành tương đối mạnh trên chuột thí nghiệm Wistar trong mô hình gây co thắt động mạch vành chuột bằng KCl, ở liều lượng 20 µg/ml, có tác dụng giãn bằng 60% so với thuốc đối chứng verapamil [63].

-Tác dụng chống độc do thuốc mê sevoflurane gây ra.

Sevoflurane là một thuốc gây mê được sử dụng rộng rãi. Một loạt các nghiên cứu gần đây đã chỉ ra rằng việc tiếp xúc với sevoflurane là yếu tố nguy cơ gây ra suy giảm trí nhớ và khả năng học tập. Nghiên cứu năm 2019 về euxanthon của Zhou H và Cs [199] chứng minh được euxanthon có liên quan đến giảm sự chết tế bào apoptosis gây ra bởi

sevoflurane và viêm thần kinh. Hơn nữa, kết quả nghiên cứu cung cấp bằng chứng thực nghiệm rằng euxanthon có tác dụng bảo vệ thần kinh bằng cách điều chỉnh tăng biểu hiện Nrf2. Do đó, euxanthon có tiềm năng điều trị trong phòng ngừa nhiễm độc thần kinh do sevoflurane gây ra.

Hợp chất VC9: 7-hydroxy- 1-methoxyxanthon

Đây là lần đầu tiên phân lập được hợp chất này từ loài *Polygala karensium* Kurz. Trước đó, hợp chất này được Li W và Cs phân lập từ một loài khác thuộc chi *Polygala* [59]. Hợp chất này cũng được tìm thấy ở loài *Hypericum perforatum* và *Calophyllum membranaceum*. Theo nghiên cứu của Ming và Cs năm 2002, hợp chất này có hoạt tính ức chế đáng kể ức chế phiên mã của RXR α , là yếu tố gây ra ung thư [200], [201].

Hợp chất VC10: 6-hydroxy -1,7-dimethoxyxanthon

Hợp chất này được phân lập từ một loài thuộc chi *Polygala* là *Polygala tenuifolia* vào năm 1992 [54].

Hợp chất này đã cũng được phân lập ở các loài không thuộc chi *Polygala* như từ *Mammea acuminata* và *Mammea siamensis* [188],[202]. Hiện nay, chưa thấy có nghiên cứu tác dụng sinh học của hợp chất này.

Năm 2020, trong một nghiên cứu của Shi và Cs [203] về tác dụng dược lý của hợp chất có cấu trúc tương tự 1,7-dihydroxy-4-methoxy xanthon cùng với các dẫn xuất xanthon khác phân lập từ phần trên mặt đất của loài *Polygala tenuifolia* về tác dụng ức chế NO do LPS gây ra trong các tế bào BV-2 microglia. Kết quả cho thấy hợp chất 1,7-dihydroxy-4-methoxy xanthon thể hiện tác dụng ức chế đáng kể NO với IC₅₀ là 7,4 μ M, so với đối chứng dương indomethacin có IC₅₀ là 7,1 μ M. Ngoài ra bốn dẫn xuất xanthon khác có cấu trúc tương tự với nhóm OH ở vị trí C7 cũng có tác dụng ức chế đáng kể NO, khi nhóm 7-OH được thay thế bằng nhóm 7-OCH₃, sự ức chế giảm rõ ràng. Do đó, các tác giả phán đoán rằng các xanthon tương tự với nhóm OH ở vị trí số 7 dường như có đóng góp đáng kể cho hoạt động ức chế NO; điều này chứng tỏ hợp chất số 10 phân lập được, do trong cấu trúc có nhóm 7-OH, cũng có khả năng ức chế NO, một chất quan trọng trong cơ chế gây viêm thần kinh. Tuy nhiên điều này cần nghiên cứu thực nghiệm để chứng minh.

Hợp chất VC12: spinasterol

Đây là lần đầu tiên phân lập được hợp chất spinasterol từ loài *P. karensium*. Hợp chất spinasterol đã được phân lập từ loài *P. cyparissias* vào năm 1998 [48], và được phân lập từ nhiều loài thuộc chi khác như từ rễ của *Pueraria mirifica* (Thái Lan), *Pueraria lobata*

(Hàn Quốc) [206]. Một số nghiên cứu đã chỉ ra tác dụng nổi bật của spinasterol là chống khối u, chống ung thư [207],[208], chống viêm và chống oxy hóa [209]. Nghiên cứu của Uchida K và Cs [210] cho thấy hợp chất spinsaterol có tác dụng ức chế sự hấp thu cholesteol nên làm giảm lượng cholesteol trong huyết tương và trong gan cũng như giảm lượng acid mật ở chuột thử nghiệm. Ngoài ra hợp chất còn có tác dụng chống độc [207].

Hợp chất VC13: daucosterol

Daucosterol, một steroid thực vật tự nhiên, đã được phân lập được từ hai loài thuộc chi *Polygala* là *P.tenuifolia* và *P.japonica* [227],[228] và từ nhiều loài khác không thuộc chi *Polygala*. Các nghiên cứu cho thấy đặc tính hoạt động thần kinh của daucosterol trong việc thúc đẩy sự gia tăng của các tế bào gốc thần kinh [211], bảo vệ thần kinh trong việc ngăn chặn thiếu oxy-glucose gây tổn thương tế bào thần kinh qua trung gian tái tưới máu [212] và chết tế bào u nguyên bào thần kinh do H₂O₂ [213]. Nghiên cứu của Ji và Cs [214] cung cấp bằng chứng đầu tiên cho tác dụng bảo vệ thần kinh của dẫn xuất daucosterol palmitate trong cải thiện khả năng học tập và tăng cường trí nhớ do A β gây ra suy giảm trí nhớ và khả năng học tập ở chuột trên mô hình mê lộ nước Morris. Các tác giả cho rằng các cơ chế cơ bản tác dụng bảo vệ thần kinh và tăng cường trí nhớ, tăng khả năng học tập của daucosterol palmitate có thể là: ức chế A β gây ra sản xuất ROS ở hải mã; ngăn chặn sự tổn hại tế bào thần kinh CA1 ở hồi hải mã do A β gây ra; phục hồi mức độ biểu hiện synaptophysinexpal của hồi hải mã. Ngoài ra, còn có báo cáo cho thấy daucosterol có khả năng ức chế sự phát triển của tế bào ung thư đại tràng và tác dụng tăng cường miễn dịch [215], [216].

Hợp chất VC14: stigmasterol

Stigmasterol (356), một phytosterol thực vật, theo tác giả Kaur N (2011) hợp chất này lần đầu được phân lập vào năm 1906 từ Calabarbohne sau đó đã được phân lập từ rất nhiều loài thực vật [217]. Hợp chất này đã được phân lập vào năm 1998 từ loài *P. caudata* [59]. Đây là lần đầu tiên stigmasterol được phân lập từ loài *P. karensium*.

Rất nhiều nghiên cứu về các tác dụng sinh học của stigmasterol, như chống loãng xương, thoái hóa khớp [218], ức chế sinh tổng hợp cholesteol thông qua sự ức chế của sterol Δ 24-reductase trong CaCo-2 và làm giảm sự dự trữ cholesteol trong huyết thanh [219], chống oxy hóa, hạ đường huyết và ảnh hưởng đến tuyến giáp [220], chống viêm [221],[222], chống khối u, chống ung thư trên thực nghiệm [223],[224].

Hợp chất VC15: 7-hydroxy-1-methoxyxanthon

Hợp chất 7-hydroxy-1-methoxyxanthon (**210**) đã được phân lập từ rễ của loài *P. caudata* vào năm 2005 [63], và được Dao và Cs [51] phân lập từ rễ của loài *P. karensium* vào năm 2012, thể hiện tính kháng virus cúm A ở mức độ nhất định. Trong nghiên cứu này các tác giả đã phân lập được 10 xanthon từ loài *Polygala karensium* và kết quả thực nghiệm cho thấy hợp chất VC15 cùng với 4 hợp chất xanthon khác có cấu trúc một nhóm hydroxy gắn ở C-1 có tác dụng ức chế mạnh đối với neuraminidase từ các chủng vi rút cúm H1N1, H9N2, H1N1 (WT). Ngoài ra, các hợp chất này làm giảm tác dụng tế bào của vi rút cúm lợn H1N1 trong các tế bào MDCK. Kết quả cho thấy tiềm năng của các xanthon phân lập từ *P. karensium* trong việc phòng ngừa và điều trị bệnh do vi rút cúm

Hợp chất VC16: quercetin

Hợp chất quercetin (**377**) đã được phân lập từ 2 loài thuộc chi *Polygala*, từ toàn cây của loài *P. hongkongensis* [76], và từ rễ của loài *P. caudata* [59],[99]. Đây là lần đầu tiên phân lập được hợp chất này từ loài Viễn chí ba sừng *P. karensium*. Đây là hợp chất có nhiều tác dụng sinh học với tác dụng nổi bật là chống oxy hóa, làm bền thành mạch.

Hợp chất số 17: rutin

Hợp chất rutin (**387**) đã được phân lập từ 3 loài thuộc chi *Polygala*, từ phần trên mặt đất của loài *P. flavescens* [41], và từ toàn cây của các loài *P. paniculata* [70], *P. hongkongensis* [76], *P. molluginifolia* [104]. Đây là lần đầu tiên phân lập được hợp chất này từ loài Viễn chí ba sừng *P. karensium*. Rutin là phần aglycon của hợp chất quercetin, giống như hợp chất quercetin, hợp chất rutin là hợp chất có nhiều tác dụng sinh học với tác dụng nổi bật chống oxy hóa, làm bền thành mạch.

4.3. VỀ TÁC DỤNG SINH HỌC

4.3.1. Về sự phù hợp của việc sử dụng mô hình ruồi giấm chuyển gen mang bệnh Alzheimer trong đánh giá tác dụng sinh học của loài Viễn chí ba sừng

Đây là lần đầu, nghiên cứu về tác dụng sinh học của một loài thuộc chi Polygala sử dụng mô hình ruồi giấm chuyển gen mang bệnh Alzheimer.

Do hầu hết các gen liên quan đến bệnh sinh Alzheimer đều có gen tương đồng ở *D. melanogaster* [167]; cho nên, các nghiên cứu về bệnh Alzheimer trên ruồi giấm được tiến hành nhiều thập kỷ qua với nhiều mô hình gây bệnh như: mô hình gây độc tính A β trong nghiên cứu của Rosen và Cs (1989), của Finelli và Cs (2004) [176],[177]; mô hình tạo presenilin trong nghiên cứu của Boulinne và Cs (1997) [178]; mô hình gây độc tính Tau trong nghiên cứu của Heidary và Cs (2001) [179].

Tuy nhiên, trước đây chưa có nghiên cứu tác dụng sinh học của các loài thuộc chi *Polygala* trên mô hình ruồi giấm.

Xuất phát từ trên y văn ghi lại loài viễ chí ba sừng có tác dụng hỗ trợ chống suy giảm trí nhớ, và từ thực tế loại cây viễ chí ba sừng được người dân tộc vùng Sapa sử dụng có tác dụng tốt hỗ trợ chống suy giảm trí nhớ, tuy nhiên cho đến nay chưa có nghiên cứu tác dụng chống suy giảm trí nhớ của loài *Polygala karensium* Kurz được công bố ở cả Việt Nam và thế giới. Do mô hình này có nhiều ưu điểm dễ dàng quan sát và định lượng được và đã được ứng dụng nghiên cứu về bệnh Alzheimer đối với nhiều loại dược liệu nên trong luận án xác định lựa chọn mô hình này để nghiên cứu tác dụng sinh học của các phân đoạn cao chiết Viễ chí ba sừng *Polygala karensium* Kurz. Việc lựa chọn là phù hợp với xu hướng nghiên cứu trên thế giới về tác dụng chống suy giảm trí nhớ và hỗ trợ điều trị bệnh Alzheimer.

Chính vì áp dụng mô hình mới trong nghiên cứu, nên trong luận án đã khảo sát sự phù hợp và tính khả thi của mô hình trong việc đánh giá các dụng sinh học của Viễ chí ba sừng, cụ thể trên cả 3 loại thực nghiệm vận động Crawling assay, Climbing assay và thử nghiệm trí nhớ mùi Odor-taste learning assay.

Trong thực nghiệm Crawling assay, kết quả cho thấy tốc độ của lô ấu trùng ruồi sinh lý khi so sánh với lô ấu trùng ruồi bệnh lý cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Như vậy triển khai mô hình hoàn toàn thích hợp để đánh giá khả năng tác dụng của các cao chiết Viễ chí ba sừng lên vận động của ấu trùng bậc ba ruồi giấm chuyển gen mang bệnh Alzheimer.

Trong thực nghiệm Climbing assay, kết quả cho thấy khả năng leo của lô chứng sinh lý Elav so với nhóm ruồi giấm mang gen bệnh Alzheimer thể hiện sự khác biệt ở ngày 7 và ngày 10 có ý nghĩa thống kê với giá trị $P < 0,05$. Điều này cho thấy mô hình phù hợp để đánh giá tác dụng của các cao chiết Viễ chí ba sừng lên khả năng vận động của ruồi giấm ở ngày 7 và ngày 10.

Trong thực nghiệm trí nhớ mùi, kết quả cho thấy chỉ số học tập LI của ấu trùng bậc ba lô chứng sinh lý Elav cao hơn khoảng 43% so với nhóm ấu trùng ruồi mang gen bệnh Alzheimer lô bệnh lý, với giá trị P có ý nghĩa thống kê $< 0,01$. Điều này cho thấy mô hình phù hợp để đánh giá tác dụng của các cao chiết Viễ chí ba sừng trong thử nghiệm trí nhớ mùi.

Như vậy, kết quả đánh giá sự phù hợp của mô hình trong cả 3 thử nghiệm đều cho

thấy mô hình là phù hợp để đánh giá tác dụng của các phân đoạn cao chiết Viễn chí ba sừng lên khả năng khắc phục sự thiếu hụt hành vi và khả năng ghi nhớ và học tập ngắn hạn của ruồi giấm trưởng thành và ấu trùng bậc ba ruồi giấm mang gen bệnh Alzheimer hAPP. Đây là lần đầu áp dụng mô hình ruồi giấm trong nghiên cứu tác dụng của một loài thuộc chi *Polygala* lên khả năng vận động và khả năng ghi nhớ của ruồi giấm chuyển gen mang bệnh Alzheimer hAPP. Kết quả nghiên cứu cho thấy mô hình ruồi giấm hoàn toàn có thể áp dụng được ở nước ta trong đánh giá tác dụng sinh học của dược liệu. Với các đặc tính của loài ruồi giấm, nghiên cứu trên mô hình để tiến hành, có tính khả thi triển khai đánh giá tác dụng tương tự đối với nhiều loại dược liệu.

4.3.2. Về căn cứ lựa chọn mức liều

Kinh nghiệm dân gian thường dùng mức liều 20 g dược liệu khô cho người trong một ngày. Tính toán lượng cao chiết được và quy đổi liều sử dụng ở người cho động vật, việc nghiên cứu tác dụng sinh học đã được tiến hành dò liều trên một dải nồng độ lớn từ 0,2 mg/ml đến 10 mg/ml, căn cứ vào tỷ lệ sống sót của ruồi trưởng thành và tác dụng cải thiện triệu chứng của bệnh Alzheimer, kết quả cho thấy **nồng độ 0,8 mg/ml và 2 mg/ml là phù hợp** để đưa vào nghiên cứu chính thức.

4.3.3. Về kết quả nghiên cứu tác dụng sinh học

4.3.3.1. Kết quả thử nghiệm Crawling assay:

Cải thiện tốc độ di chuyển là một tiêu chí đánh giá tác dụng của Viễn chí ba sừng lên chức năng vận động của ấu trùng ruồi giấm.

Kết quả thu được trong luận án cho thấy:

Lô ấu trùng bậc ba ruồi giấm mang gen bệnh Alzheimer được điều trị bằng cao chiết ethanol toàn phần (VCE, 2 mg/ml), và Tacrin (0,1 mg/ml) có tốc độ di chuyển nhanh hơn so với lô bệnh lý, đạt ý nghĩa thống kê với các giá trị P đều < 0,05.

Mặc dù lô ấu trùng ruồi giấm chuyển gen Alzheimer được điều trị bằng cao phân đoạn ethyl acetate (VCA, 2mg/ml) và căn nước (VCN, 2 mg/ml) ở nồng độ 2 mg/ml đều có xu hướng tốc độ di chuyển cao hơn hơn lô ấu trùng ruồi bệnh lý, tuy nhiên sự khác biệt này chưa có ý nghĩa thống kê với các giá trị P đều >0,05.

Lô ấu trùng ruồi giấm chuyển gen Alzheimer được điều trị bằng phân đoạn *n*-hexan (2 mg/ml) có tốc độ di chuyển thấp hơn lô ấu trùng ruồi bệnh lý, tuy nhiên sự khác biệt này chưa có ý nghĩa thống kê với giá trị P >0,05.

Như vậy, kết quả thu được chứng minh ***cao chiết ethanol toàn phần có tác dụng cải thiện suy giảm hành vi vận động của ấu trùng ruồi giấm mang gen bệnh Alzheimer hAPP.***

Kết quả thử nghiệm crawling cho thấy Viễn chí ba sừng có tiềm năng trong điều trị các vấn đề suy giảm chức năng vận động do bệnh Alzheimer gây ra.

4.3.3.2. Kết quả thử nghiệm Climbing assay

Cải thiện khả năng leo trèo là một tiêu chí đánh giá tác dụng của Viễn chí ba sừng lên chức năng vận động của ruồi giấm trưởng thành.

Kết quả thu được cho thấy:

Cao chiết ethanol toàn phần và cao phân đoạn ethyl acetate (VCA, 2 mg/ml) có tác dụng phục hồi suy giảm hành vi vận động ở ruồi giấm F1 trưởng thành 7 ngày tuổi ($P < 0,05$).

Tacrin (0,1 mg/ml) được sử dụng làm thuốc đối chứng dương thể hiện tác dụng cải thiện suy giảm hành vi vận động đáng kể trên ruồi giấm F1 trưởng thành ở cả 7 và 10 ngày tuổi ($P < 0,05$).

Như vậy, nghiên cứu tác dụng của Viễn chí ba sừng trên hành vi vận động của ruồi giấm mang gen bệnh Alzheimer hAPP đã chứng minh ***cao chiết ethanol toàn phần có tác dụng cải thiện suy giảm hành vi bò trên cả 2 thử nghiệm hành vi di chuyển và leo trèo; cao phân đoạn ethyl acetate thể hiện tác dụng trên thử nghiệm hành vi leo trèo.*** Điều này cho thấy Viễn chí ba sừng có tiềm năng trong điều trị các vấn đề suy giảm vận động bệnh Alzheimer gây ra.

4.3.3.3. Kết quả thử nghiệm trí nhớ mùi Odor-taste learning assay

Đặc trưng của bệnh Alzheimer là suy giảm trí nhớ ngắn hạn, khó nhớ các sự việc mới xảy ra và không có khả năng tiếp thu thông tin mới. Để đánh giá khả năng ghi nhớ và học tập của ruồi giấm, trong luận án đã sử dụng mô hình thử nghiệm khả năng nhớ mùi của ruồi giấm ở giai đoạn ấu trùng (Odor-taste learning assay) nhằm mục đích đánh giá trí nhớ ngắn hạn của ấu trùng ruồi giấm.

Kết quả thu được cho thấy:

Cao chiết ethanol toàn phần (2 mg/ml), phân đoạn *n*-hexan (2 mg/ml), phân đoạn ethyl acetate (0,8 và 2 mg/ml) và phân đoạn nước (2 mg/ml) cũng như Tacrin (sử dụng làm đối chứng dương, liều 0,1 mg/ml) đều có tác dụng phục hồi suy giảm trí nhớ ngắn hạn trên ấu trùng bậc ba ruồi giấm mang gen bệnh Alzheimer hAPP, được thể hiện thông qua chỉ số học tập LI ở các lô điều trị cao hơn đáng kể so với lô bệnh lý, với giá trị P có ý nghĩa thống kê.

Những kết quả này đã chỉ *cao chiết ethanol toàn phần cũng như các phân đoạn chiết từ cao chiết ethanol đã thử nghiệm (phân đoạn n-hexan, ethyl acetate, cồn nước) đều tham gia vào tác dụng cải thiện suy giảm trí nhớ ngắn hạn trên ruồi giấm chuyển gen mang bệnh Alzheimer.*

Từ những kết quả nghiên cứu tác dụng sinh học thu được trong Luận án này có thể rút ra kết luận rằng *Viễn chí ba sừng có tác dụng cải thiện hành vi thần kinh bệnh Alzheimer của ruồi giấm chuyển gen biểu hiện protein APP ở người thông qua các tiêu chí bao gồm cải thiện suy giảm trí nhớ ngắn hạn bằng thử nghiệm trí nhớ mùi của ấu trùng ruồi giấm bậc ba; cải thiện thiếu hụt hành vi vận động bằng thử nghiệm tốc độ di chuyển của ấu trùng ruồi giấm mang gen bệnh hAPP và thử nghiệm leo trèo của ruồi giấm trưởng thành mang gen bệnh hAPP.*

Cho đến nay, có rất ít nghiên cứu về tác dụng sinh học của loài Viễn chí ba sừng *P.kaensium (P.tricornis)* được công bố. *Những kết quả nghiên cứu luận án phù hợp với kết quả các nghiên cứu đã chứng minh một số hợp chất phân lập từ Viễn chí ba sừng như có tác dụng trong điều trị viêm thần kinh, tăng cường trí nhớ. Các nghiên cứu về Tenuifolisid C; 6-O-benzoyl-3'-O-sinapoylsucrose; 3,6'-di-O-sinapoylsucrose; glomeratose A; (S)-(+)-butyl-4-methylen-5-oxo-pyrrolidin-2-carboxylat; và (5-formylfuran-2-yl) methyl-4-hydroxy-2-methylenbutanoate có tác dụng chống viêm thần kinh thông qua khả năng ức chế sự hình thành NO trên tế bào thần kinh đệm BV2 được kích thích bởi LPS, qua đó tham gia vào khả năng làm giảm quá trình phát triển của các bệnh thoái hóa thần kinh như Parkinson, Alzheimer [121], [154]. Cơ chế chống viêm thần kinh của một số hợp chất này đã được chứng minh là do ức chế aldose reductase, enzym có khả năng giảm sự hình thành và biểu hiện của các yếu tố viêm thông qua giảm sự phosphoryl hóa của PLC PKC, IKK, I κ B và MAPK. Hơn nữa, mặc dù chưa có công bố liên quan đến tác dụng sinh học của acid sinapic phân lập từ cây Viễn chí ba sừng, tuy nhiên đã có nghiên cứu về tác dụng sinh học của acid sinapic, một số tác giả đã chứng minh *acid sinapic* của cao chiết rễ cây *P. tenuifolia* có tác dụng cải thiện suy giảm trí nhớ ngắn hạn trên chuột bị gây suy giảm trí nhớ bằng scopolamin [139], [140]. Hợp chất *3,6'-di-O-sinapoylsucrose* cũng được chứng minh về tác dụng bảo vệ tế bào não, tăng cường khả năng nhận thức và trí nhớ trên thực nghiệm [92], hợp chất này cũng được chứng minh có tác dụng chống trầm cảm trong thực nghiệm [225]*

Từ những kết quả nghiên cứu của các nhóm tác giả trên thế giới cũng như kết quả

thu được trong luận án đã cho thấy **tác dụng cải thiện hành vi thần kinh bệnh Alzheimer của ruồi giấm chuyển gen hAPP của Viễn chí ba sừng là do cao chiết ethanol toàn phần cũng như các thành phần hợp chất có mặt ở trong các phân đoạn khác nhau.**

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

1. VỀ THỰC VẬT

Thảm định được tên của cây Viền chí ba sừng thu hái tại thị trấn Sa Pa, tỉnh Lào Cai là *Polygala karensium* Kurz, còn có các tên đồng danh là *Polygala tricornis* Gapnep., *Polygala floribunda* Dunn, *Polygala congesta* Reder et E. H. Wilson, *Polygala lancilimba* Merrill. thuộc họ Viền chí (Polygalaceae).

Đã mô tả được đặc điểm hình thái và đặc điểm vi học của loài nghiên cứu. Về đặc điểm hình thái của loài *Polygala karensium* Kurz thu hái tại thị trấn Sa Pa, tỉnh Lào Cai, có đặc điểm khác biệt là kích thước hoa lớn hơn so với các loài *Polygala karensium* đã được mô tả trên thế giới.

Về đặc điểm vi học, đã phân tích lá, thân, rễ, hoa, quả, hạt và xác định đặc điểm giải phẫu lá, thân, rễ của cây loài nghiên cứu. Đã xác định được trong vi phẫu thân, rễ và lá có 7, 5 và 6 thành phần tương ứng. Đây là lần đầu tiên mô tả về các đặc điểm giải phẫu thực vật của Viền chí ba sừng *Polygala karensium* Kurz ở Việt Nam. Với các đặc điểm thực vật nghiên cứu, hoàn toàn có thể phân biệt được loài *Polygala karensium* Kurz với các loài khác thuộc chi *Polygala*.

2. VỀ HÓA HỌC

Đã xác định trong rễ cây Viền chí ba sừng có các nhóm hợp chất saponin, flavonoid, đường khử, acid hữu cơ, chất béo, các chất có gốc OH-phenol và sterol.

Đã phân lập và xác định được cấu trúc của 17 hợp chất từ rễ cây Viền chí ba sừng. Trong số 17 hợp chất đã phân lập được, ***các hợp chất VC2, VC3, VC11 là 3 hợp chất mới lần đầu tiên được phân lập từ thiên nhiên.*** Tham khảo các tài liệu cho thấy 9 hợp chất ***VC5, VC7, VC9, VC10, VC12, VC13, VC14, VC16, VC17*** là các hợp chất lần đầu tiên phân lập được từ loài *Polygala karensium* Kurz.

Các hợp chất phân lập được là 3-(*E*)-3,4,5-trimethoxycinnamoyl-6'-benzoylsucrose (**VC1**), karensucrose A (**VC2**), karensucrose B (**VC3**), tricornose B (**VC4**), glomeratose C (**VC5**), tenuifolisid C (**VC6**), wubangzsid B (**VC7**), 1,7-dihydroxyxanthon (**VC8**), 7-hydroxy-1-methoxyxanthon (**VC9**), 6-hydroxy-1,7-dimethoxyxanthon (**VC10**), karenxanthon (**VC11**), spinasterol (**VC12**), daucosterol (**VC13**), stigmasterol (**VC14**), 7-hydroxy-1-methoxyxanthon (**VC15**), quercetin (**VC16**), rutin (**VC17**).

3. VỀ TÁC DỤNG SINH HỌC

Luận án đã đánh giá được tác dụng của cao chiết toàn phần và các phân đoạn cao chiết của rễ Viễn chí ba sừng (*Polygala karensium* Kurz) trên mô hình ruồi giấm chuyển gen mang bệnh Alzheimer. Các kết quả thu được như sau:

Các phân đoạn cao chiết ethanol toàn phần và cao chiết phân đoạn ethyl acetate của **mẫu nghiên cứu có tác dụng cải thiện đối với hành vi di chuyển của ấu trùng bậc ba ruồi giấm và ruồi giấm trưởng thành chuyển gen mang bệnh Alzheimer.**

Các phân đoạn cao chiết ethanol toàn phần, phân đoạn cao chiết ethyl acetate và cồn phân đoạn nước của **mẫu nghiên cứu có tác dụng cải thiện trí nhớ ngắn hạn của ấu trùng bậc ba ruồi giấm chuyển gen mang bệnh Alzheimer.**

Từ những kết quả thu được trong nghiên cứu này có thể kết luận rằng **Viễn chí ba sừng *Polygala karensium* Kurz có tác dụng cải thiện hành vi thần kinh bệnh Alzheimer của ruồi giấm chuyển gen biểu hiện protein APP ở người thông qua các tiêu chí bao gồm cải thiện sự suy giảm trí nhớ ngắn hạn bằng thử nghiệm trí nhớ mùi của ấu trùng bậc ba ruồi giấm; cải thiện thiếu hụt hành vi vận động bằng thử nghiệm bò của ấu trùng bậc ba ruồi giấm và thử nghiệm leo trèo của ruồi giấm chuyển gen mang bệnh Alzheimer trưởng thành.** Điều này góp phần giải thích kinh nghiệm sử dụng của loài này trong y học dân gian và y học cổ truyền, định hướng sản xuất thuốc mới trong tương lai.

Đây là lần đầu, nghiên cứu về tác dụng của một loài thuộc chi *Polygala* sử dụng mô hình ruồi giấm chuyển gen mang bệnh Alzheimer. Kết quả khảo sát cho thấy **mô hình ruồi giấm hoàn toàn phù hợp để đánh giá tác dụng của các phân đoạn dịch chiết Viễn chí ba sừng lên khả năng vận động và khả năng ghi nhớ ngắn hạn của ấu trùng bậc ba và ruồi giấm trưởng thành.**

KIẾN NGHỊ

Nghiên cứu thêm về thành phần hóa học, đánh giá mối liên quan giữa thành phần hóa học và tác dụng sinh học.

Nghiên cứu tác dụng của rễ Viễn chí ba sừng trên mô hình chuột Alzheimer thực nghiệm.

NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN

Về thực vật học

Luận án là tài liệu đầu tiên mô tả chi tiết đặc điểm hình thái thực vật, đặc điểm vi phẫu thân, rễ cây Viễn chí ba sừng thu hái tại Sa Pa, Lào Cai.

Về hóa học

Lần đầu tiên ở Việt Nam thành phần hóa học từ rễ của loài Viễn chí ba sừng *Polygala karensium* Kurz (Polygalaceae) được nghiên cứu, đã xác định được cấu trúc của 17 hợp chất, trong đó có 3 hợp chất mới và 9 hợp chất lần đầu tiên phân lập được từ loài.

Về tác dụng sinh học

Đây là lần đầu, nghiên cứu về tác dụng sinh học của một loài thuộc chi *Polygala* sử dụng mô hình ruồi giấm chuyển gen mang bệnh Alzheimer. Luận án là lần đầu tiên nghiên cứu về tác dụng của Viễn chí ba sừng trên mô hình ruồi giấm chuyển gen mang bệnh Alzheimer ở Việt Nam.

Luận án lần đầu tiên đã chứng minh cao chiết ethanol toàn phần và cao chiết phân đoạn ethyl acetate của loài Viễn chí ba sừng có tác dụng cải thiện đối viowski hành vi di chuyển của ấu trùng bậc ba ruồi giấm và ruồi giấm trưởng thành chuyển gen mang bệnh Alzheimer. Lần đầu tiên đã chứng minh cao chiết ethanol toàn phần, cao chiết phân đoạn ethyl acetate và cao chiết nước có tác dụng cải thiện trí nhớ ngắn hạn của ấu trùng bậc ba ruồi giấm mang gen bệnh Alzheimer. Từ đó có thể dự kiến kết luận Viễn chí ba sừng có tác dụng cải thiện hành vi thần kinh bệnh Alzheimer của ruồi giấm chuyển gen biểu hiện protein APP ở người thông qua các tiêu chí bao gồm cải thiện sự suy giảm trí nhớ ngắn hạn, cải thiện thiếu hụt hành vi vận động, để giải thích về kinh nghiệm sử dụng loài này trong y học dân gian và y học cổ truyền và định hướng cho việc nghiên cứu sản xuất thuốc hỗ trợ điều trị Alzheimer Viễn chí ba sừng.

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN
LUẬN ÁN TIẾN SĨ DƯỢC HỌC

1. Trần Văn Quang, Nguyễn Thượng Dong, Nguyễn Quỳnh Nga, Nguyễn Thế Thanh Hà. (2016), Đặc điểm hình thái và giải phẫu của rễ cây Viễn chí Việt Nam (*Polygala karensium* Kurz) thuộc họ Viễn chí Polygalaceae, Tạp chí Y Dược học Quân sự, Số chuyên đề Dược -2016, 5-11.
2. Tran Van Quang, Dao Anh Dung, Nguyen Thuong Dong, Pham Thi Nguyet Hang, Nguyen Minh Khoi, Vu Van Doan, Nguyen Thi Cuc, Bui Huu Tai, Phan Van Kiem, Nguyen Xuan Nhim. (2020), Sucrose esters and xanthonones from *Polygala karensium*, Phytochemistry Letters, 37(2020),75-79.
3. Trần Văn Quang, Trần Nguyên Hồng, Nguyễn Thượng Dong, Phạm Thị Nguyệt Hằng, (2020), Tác dụng của Viễn chí ba sừng trên hành vi của ruồi giấm chuyển gen mang bệnh Alzheimer, Tạp chí Dược liệu, Viện Dược liệu, 25(6/2020),368-376

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chen Shukun (陈书坤), Ma Haiying (马海英); John A. N. Parnell, (2008), *Flora of China*, Science Press (Beijing) Missouri Botanical Garden (St. Louis) vol 11, 139.
2. Phạm Hoàng Hộ, (1999). *Cây cỏ Việt Nam*, NXB Trẻ Thành phố Hồ Chí Minh, Tập II. 1168-1174.
3. Nguyễn Tiến Bân, (2003), *Danh lục các loài thực vật Việt Nam*, NXB Nông nghiệp, Hà Nội
4. Linnaeus, C. (1957). *Species Plantarum: A Facsimile of the First Edition pl2:701, 1753*. Adlard & Son for the Ray Society.
5. Takhtajam A L, (1997). *Diversity and classification of flowering plants*, Columbia University Press, New York.
6. Cronquist A. (1981) Polygalaceae. 'An integrated system of classification of flowering plants', 775-778.
7. Paiva J A R., de Cuba A D C., (1998). *Polygalarum africanarum et madagascariensium prodromus atque gerontogaei generis' Heterosamara'Kuntze, a genere Polygala L. segregati et a nobis denuo recepti, synopsis monographica. Cyanus.*
8. Đỗ Tất Lợi, (2004). *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, NXB y học, 1168-1174.
9. Blake S F., (1916). A revision of the genus *Polygala* in Mexico, Central America, and the West Indies. *Contributions from the Gray Herbarium of Harvard University*, 1-122.
10. Yang A. T., Chen C. F., (2013). A revision of the genus *Polygala* L. (Polygalaceae) in Taiwan. *Taiwania*, 58(3), 156-162.
11. Wu Z Y., Raven P H., Hong D Y., (2008), *Polygala. Flora of China*, Science Press (Beijing), Missouri Botanical Garden (St. Louis), 11, 141-158.
12. Chodat R., (1893). *Monographia Polygalacearum* (Vol. 31). Impr. Aubert-Schuchardt.
13. Jame Premier, (1933), *Flore Générale de L'Indo – Chine*, vol 3, Masson et Cie, éditeurs 120, Boulevard Saint- Germain (VI^e)
14. Võ Văn Chi, (1997). *Từ điển cây thuốc Việt Nam*, NXB Y học, Tập II, 1288-1334.
15. The journal of the Asiatic Society of Bengal, (1872) part 2, Nat. Hist. 41(4):292
16. Flora of Thailand, Vol. 7 (3), năm 2001.

17. Klein Júnior L C., Faloni de Andrade S., Filho V. C., (2012). A pharmacognostic approach to the *Polygala* genus: phytochemical and pharmacological aspects. *Chemistry Biodiversity*, 9(2), 181-209.
18. Zhang D, Miyase T, Kuroyanagi et al., (1995). Studies on the constituents of *Polygala japonica* Houtt. I. Structures of Polygalasaponins IX. *Chemical and Pharmaceutical bulletin*, 43(1), 115-120.
19. Zhang D, Miyase T, Kuroyanagi M, et al., (1995). Studies on the constituents of *Polygala japonica* Houtt. II. Structures of Polygalasaponins XI-XIX., *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 43(6), 966-970.
20. Zhang D, Miyase T, Kuroyanagi et al., (1996). Studies on the constituents of *Polygala japonica* Houtt. III. Structures of Polygalasaponins XX-XXVII. *Chemical and Pharmaceutical bulletin*, 44(1), 173-179.
21. Zhang D., Miyase, T., Kuroyanagi, et al., (1996). Five New Triterpene Saponins, Polygalasaponins XXVIII-XXXII from the root of *Polygala japonica* Houtt. *Chemical and Pharmaceutical bulletin*, 44(4), 810–815.
22. Xue W., Hu J., Yuan Y. et al., (2009). Polygalasaponin XXXII from *Polygala tenuifolia* root improves hippocampal-dependent learning and memory. *Acta Pharmacologica Sinica*, 30(9), 1211–1219.
23. Zhang D, Miyase T, Kuroyanagi M, et al., (1996). Nine new triterpene saponins, Polygalasaponins XXXIII--XLI from the roots of *Polygala fallax* Hemsl. *Chemical and Pharmaceutical bulletin* , 44(11), 2092-2099.
24. Zhang D, Miyase T, Kuroyanagi M, et al., (1998). Polygalasaponins XLII-XLVI from roots of *Polygala glomerata*. *Phytochemistry*, 47(3), 459-66.
25. Fu J., Zuo L., Yang J., et al., (2008). Oligosaccharide polyeste and triterpenoid saponins from the roots of *Polygala japonica*. *Phytochemistry*, 69(7), 1617-1624.
26. Zhang D., Miyase, T., Kuroyanagi, M., et al., (1997). Oligosaccharide polyestes from roots of *Polygala fallax*. *Phytochemistry*, 45(4), 733–741.
27. Li T Z., Zhang W D., Yang G J., et al., (2006). Saponins from *Polygala japonica* and their effects on a forced swimming test in mice. *Journal of natural products*, 69(4), 591-594.
28. Sun F., Sun J D., Han N., et al. (2012). Polygalasaponin F induces long-term potentiation in adult rat hippocampus via NMDA receptor activation. *Acta Pharmacologica Sinica*, 33(4), 431-437.

29. Xu X H., Zhou J F., Li T. Z., et al., (2009). Polygalasaponin G promotes neurite outgrowth of cultured neuron on myelin. *Neuroscience letters*, 460(1), 41-46.
30. Miyase K., Saitoh T., Shiokawa H. et al., (1995). Six new presenegenin glycosides, reiniosides A-F, from *Polygala reinii* root. *Chemical and Pharmaceutical bulletin*, 43(3), 466-472.
31. Sakuma S., Shoji J., (1981). Studies on the constituents of the root of *Polygala tenuifolia* Willdenow. I. Isolation of saponins and the structures of onjisaponins G and F. *Chemical and Pharmaceutical bulletin*, 29(9), 2431-2441.
32. Sakuma S., Shoji J., (1981). Studies on the constituents of the root of *Polygala tenuifolia* Willdenow. II. On the structures of Onjisaponin A, B, E. *Chemical and Pharmaceutical bulletin*, 30(3), 810-821
33. Li C., Yang J., Yu S., Chen N., et al., (2008). Triterpenoid saponins with neuroprotective effects from the roots of *Polygala tenuifolia*. *Planta Medica*, 74(02), 133-141.
34. Li J., Jiang Y., Tu P F. (2006). New acylated triterpene saponins from *Polygala tenuifolia* willd. *Journal of Asian Natural Products Research*, 8(6), 499–503.
35. Zhou Y H., Zhang S Y., Guo Q., et al (2014). Chemical investigation of the roots of *Polygala sibirica* L. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 12(3), 225–228.
36. Yoshikawa M., Murakami T., Matsuda H., et al (1996). Bioactive saponins and glycosides. II. Senegae Radix.(2): chemical structures, hypoglycemic activity, and ethanol absorption-inhibitory effect of E-senegasaponin c, Z-senegasaponin c, and Z-senegins II, III, and IV. *Chemical and Pharmaceutical bulletin*, 44(7), 1305-1313.
37. Mingan O., Chongren Y., Hanqing W.,(1999). Triterpenoid saponins from yellowflower milkwort root (*Polygala arillata*). *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 30(12), 881-887.
38. Quang T H., Yen D T H., Nhiem N X., et al. (2019). Oleanane-type triterpenoid saponins from the roots of *Polygala aureocauda* Dunn. *Phytochemistry Letters*, 34, 59-64.
39. Yoshikawa M., Murakami T., Matsuda H., et al. (1995). Bioactive saponins and glycosides. I. Senegae radix.(1): E-senegasaponins a and b and Z-senegasaponins a and b, their inhibitory effect on alcohol absorption and hypoglycemic activity. *Chemical and Pharmaceutical bulletin*, 43(12), 2115-2122.
40. Wang H., Gao J., Zhu D., Yu B., (2006). Two new triterpenoid saponins isolated from *Polygala japonica*. *Chemical and Pharmaceutical bulletin*, 54(12), 1739-1742.

41. De Leo M., Peruzzi L., Granchi C., et al. (2017). Constituents of *Polygala flavescens* ssp. *flavescens* and their activity as inhibitors of human lactate dehydrogenase. *Journal of natural products*, 80(7), 2077-2087.
42. Xu T H., Lv G., Xu Y J., et al., (2008). A novel triterpenoid saponin from *Polygala tenuifolia* Willd. *Journal of Asian natural products research*, 10(8), 803-806.
43. Lv J., Jia H., Jiang Y., Ruan Y., Zhang D., (2009). Tenuifolin, an extract derived from tenuigenin, inhibits amyloid- β secretion *in vitro*. *Acta Physiologica*, 196(4), 419-425.
44. Pelletier S W., Nakamura S., Soman R., (1971). Constituents of *Polygala* species: The structure of tenuifolin, a prosapogenin from *P. senega* and *P. tenuifolia*. *Tetrahedron*, 27(19), 4417-4427.
45. Song Y L., Zeng K W., Shi T X., et al., (2013). Sibiricasaponins A–E, five new triterpenoid saponins from the aerial parts of *Polygala sibirica* L. *Fitoterapia*, 84, 295-301.
46. Desbène S., Hanquet B., Shoyama Y et al., (1999). Biologically active triterpene saponins from Callus tissue of *Polygala amarella*. *Journal of natural products*, 62(6), 923-926.
47. Dall' Acqua S, Viola G, Cappelletti EM et al.,(2004). Xanthenes from *Polygala alpestris* (Rchb.). *Zeitschrift für Naturforschung C*, 59(5-6), 335-338.
48. Pinheiro T R., Filho V C., Santos, et al., (1998). Three xanthenes from *Polygala cyparissias*. *Phytochemistry*, 48(4), 725–728.
49. Li T Z., Zhang W D., Yang G J., et al., (2006). New flavonol glycosides and new xanthone from *Polygala japonica*. *Journal of Asian natural products research*, 8(5), 401–409.
50. Marston A., Hamburger M., Sordat-Diserens I, et al., (1993). Xanthenes from *Polygala nyikensis*. *Phytochemistry*, 33(4), 809-812.
51. Dao TT, Dang TT, Nguyen PH, et al., (2012). Xanthenes from *Polygala karensium* inhibit neuraminidases from influenza A viruses, *Bioorganic Medicinal Chemistry Letters*, 22(11), 3688-3692.
52. Zhou Y H., Guo Q., Jiang Y., Tu P. F., (2014). Chemical constituents from the roots of *Polygala wattersii* Hance. *Journal China Pharmaceutical science*, 23, 723-730.
53. Nguyen D H., Doan H T., Vu T V., et al., (2020). Oligosaccharide and glucose esters from the roots of *Polygala arillata*. *Natural product research*, 34(20), 2900-2906.
54. Fujita T., Da-You L., Ueda S et al., (1992). Xanthenes from *Polygala tenuifolia*. *Phytochemistry*, 31(11), 3997-4000.

55. Xiong H P., Wu Z J., Chen F T., et al., (2011). 3-Hydroxy-1,2-dimethoxyxanthone. *Acta Crystallographica Section E: Structure Reports Online*, 67(7), o1667-o1667.
56. Ghosal S., Banerjee S., Chauhan R B P., Srivastava R S., (1977). Extractives of *Polygala*. Part 5. New trioxygenated xanthenes of *P. arillata*. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, (7), 740-743.
57. Li J., Jiang Y., Tu P F., (2005). Xanthone O-Glycosides and Benzophenone O-Glycosides from the roots of *Polygala tricornis*. *Journal of natural products*, 68(12), 1802-1804.
58. Wu Z., Ouyang M., Yang C., (2000). Oligosaccharide esters and phenol compounds from *Polygala arillata*. *Acta Botanica Yunnanica*, 22(4), 482-494. (–in China).
59. Li W., Chan C. L., Leung H. W., et al.,(1999). Xanthenes from *Polygala caudata*. *Phytochemistry*, 51(7), 953-958.
60. Pan M D., Mao Q., (1984). Isolation and identification of wubangzsid A and B from *Polygala caudata* Rehd et Wils. *Yao Xue Xue Bao*, 19(12), 899-903. (–in China).
61. Pan M D., Mao Q., (1985). Isolation and identification of wubangzsid C from *Polygala caudata* Rehd et Wils. *Acta Pharm Sin*, 20, 662-5.
62. Wu D., He J., Jiang Y et al., (2015). Quality analysis of *Polygala tenuifolia* root by ultrahigh performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry and gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of food and drug analysis*, 23(1), 144-151.
63. Lin L L., Huang F., Chen S B., Yang D J., et al., (2005). Xanthenes from the roots of *Polygala caudata* and their antioxidation and vasodilatation activities *in vitro*. *Planta medica*, 71(04), 372-375.
64. Chang H T., Niu F., Wen, J., et al., (2007). Studies on xanthenes from herbs of *Polygala telephioides*. *China journal of Chinese materia medica*, 32(21), 2259-2261.
65. Hua Y., Chen C X., Liu Y Q., (2007). Two new xanthenes from *Polygala crotalarioides*. *Journal of Asian natural products research*, 9(3), 273-275.
66. Li C J, Yang J Z, Yu S S, et al., (2014), Glomerxanthenes A-C, three xanthonolignoid C-glycosides from *Polygala glomerata* Lour, *Fitoterapia*, 93, 175-181.
67. Wu J F., Chen S B., Gao J C., et al., (2008). Xanthone glycosides from herbs of *Polygala hongkongensis* Hemsl and their antioxidant activities. *Journal of Asian Natural Products Research*, 10(7), 665–670.

68. Xue Q C., Li C J., Zuo L., Yang J Z., et al., (2009). Three new xanthenes from the roots of *Polygala japonica* Houtt. *Journal of Asian natural products research*, 11(5), 465-469.
69. Fu J., Zhang D M., Chen R Y., (2006). Three new xanthenes from the roots of *Polygala japonica* Houtt. *Journal of Asian natural products research*, 8(1-2), 41-46.
70. Cristiano R., Pizzolatti M G., Delle Monache, et al., (2003). Two xanthenes from *Polygala paniculata* and confirmation of the 1-hydroxy-2, 3, 5-trimethoxy-xanthone at trace level by HRGC-MS. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 58(7-8), 490-494.
71. Bashir A., Hamburger M., Msonthi J D., et al., (1992). Isoflavons and xanthenes from *Polygala virgata*. *Phytochemistry*, 31(1), 309-311.
72. Zhou L Y., Peng J L., Wang J. M., et al., (2018). Structure–activity relationship of xanthenes as inhibitors of xanthine oxidase. *Molecules*, 23(2), 365.
73. Jiang Y., Tu P F., (2002). Xanthone O-glycosides from *Polygala tenuifolia*. *Phytochemistry*, 60(8), 813-816.
74. Jiang Y., Zhang W., Tu P., Xu X., (2005). Xanthone glycosides from *Polygala tenuifolia* and their conformational analyses. *Journal of natural products*, 68(6), 875-879.
75. Miyase T., Noguchi H., Chen X. M., (1999). Sucrose esters and xanthone C-glycosides from the roots of *Polygala sibirica*. *Journal of natural products*, 62(7), 993-996.
76. Wu J F., Chen S B., Gao J C., et al. (2007). Antioxidants and a new dihydroisocoumarins from *Polygala hongkongensis* Hemsl. *Natural product research*, 21(7), 580-584.
77. Dall'Acqua S., Innocenti G., Viola G., et al., (2002). Cytotoxic compounds from *Polygala vulgaris*. *Chemical and Pharmaceutical bulletin*, 50(11), 1499-1501.
78. Kobayashi W., Miyase T., Suzuki S., et al., (2000). Tetrasaccharide multi-esters and xanthone glycosides from the roots of *Polygala wattersii*. *Journal of natural products*, 63(8), 1121-1126.
79. Ikeya Y., Sugama K., Okada M., et al., (1991). Two xanthenes from *Polygala tenuifolia*. *Phytochemistry*, 30(6), 2061-2065.
80. Kobayashi W., Miyase T., Suzuki S., et al., (2000). Oligosaccharide esters from the roots of *Polygala arillata*. *Journal of natural products*, 63(8), 1066–1069.
81. Zhou LY ,Wang J M., Huang, Y J., et al., (2016). Two new glycosids isolated from *Polygala sibirica* L. var. *megalopha* Fr. *Phytochemistry Letters*, 16, 174–177.

82. Jun Li, Yong Jiang, Peng-Fei Tu, (2005). Tricornoses A-L, Oligosaccharide multi-estes from the roots of *Polygala tricornis*. *Journal of natural products*, 68,739-744.
83. Kobayashi S., Miyase T., Noguchi H., (2002). Polyphenolic glycosides and Oligosaccharide multiestes from the roots of *Polygala dalmaisiana*. *Journal of natural products*, 2002, 65, 319.
84. Zhang D., Miyase T., Kuroyanagi M., et al., (1998). Oligosaccharide polyestes from roots of *Polygala glomerata*. *Phytochemistry*, 47(1), 45-52.
85. Saitoh H., Miyase T., Ueno A., (1994). Reinioses A-J, Oligosaccharide Multi-Estes from the roots of *Polygala reinii* Fr. et Sav. *Chemical and Pharmaceutical bulletin*, 42(9), 1879-1885.
86. Saitoh H., Miyase T., Ueno A., (1993). Senegoses A- E, oligosaccharide multi-estes from *Polygala senega* var. *latifolia* Torr. et Gray. *Chemical and Pharmaceutical bulletin*, 41(6), 1127-1131.
87. Saitoh H., Miyase T., Ueno A., (1993). Senegoses F- I, oligosaccharide multi-estes from the roots of *Polygala senega* var. *latifolia* Torr. et Gray. *Chemical and Pharmaceutical bulletin*, 41(12), 2125-2128.
88. Saitoh H., Miyase T., Ueno A., et al., (1994). Senegoses J- O, oligosaccharide multi-estes from the roots of *Polygala senega* L. *Chemical and Pharmaceutical bulletin*, 42(3), 641-645.
89. Li J C., Ono M., Nohara T., (2000). Three oligosaccharide estes, telephioses A-C, from *Polygala telephioides*. *Chemical and Pharmaceutical bulletin*, 48(8), 1223-1225.
90. Cheng M C., Li C Y., Ko H C., et al., (2006). Antidepressant principles of the roots of *Polygala tenuifolia*. *Journal of Natural Products*, 69(9), 1305-1309.
91. Miyase T., Iwata Y., Ueno A., (1991). Tenuifolioses A- F, oligosaccharide multi-estes from the roots of *Polygala tenuifolia* Wild. *Chemical and Pharmaceutical bulletin*, 39(11), 3082-3084.
92. Ikeya Y., Takeda S., Tunakawa M., et al., (2004). Cognitive improving and cerebral protective effects of acylated oligosaccharides in *Polygala tenuifolia*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 27(7), 1081-1085.
93. Jiang Y., Tu P F., (2003). Tenuifoliose Q, a new oligosaccharide este from the root of *Polygala tenuifolia* willd. *Journal of Asian natural products research*, 5(4), 279-283.

94. 吴志军,欧阳明安., (2000). 黄花远志茎皮的寡糖酯和酚类成分. *云南植物研究*, 22(4), 482-494.
95. Ikeya Y., Sugama K., Okada M., et al., (1991). Four new phenolic glycosides from *Polygala tenuifolia*. *Chemical and Pharmaceutical bulletin*, 39(10), 2600-2605.
96. Miyase T., Ueno A., (1993). Sucrose derivatives from the roots of *Polygala tenuifolia*, *The Japanese journal of pharmacognosy*, 1993, 47, 267-278.
97. Cervellati R., Innocenti G., Dall'Acqua S., et al., (2004). Polyphenols from *Polygala spp.* and their antioxidant activity. *Chemistry & biodiversity*, 1(3), 415-425.
98. Silva D F., Alves C Q., Brandão H N., et al., (2016). Poligalen, a new coumarin from *Polygala boliviensis*, reduces the release of TNF and IL-6 independent of NF-kB downregulation. *Fitoterapia*, 113, 139-143.
99. W Li C., Chan H., Leung H., et al., (1998), Xanthones and flavonoids of *Polygala caudata*, *Pharmacy and Pharmacology Communications*, 4, 415-417.
100. Rao M S., Rao P S., Kumar J. K., et al., (2003). A rare flavonol glycoside from *Polygala chinensis*. *Biochemical systematics and ecology*, 6(31), 635-636.
101. Ghosal S., Chauhan R P., Srivastava R S., (1974). Two new aryl naphthalide lignans from *Polygala chinensis*. *Phytochemistry*, 13(9), 1933-1936.
102. Kobayashi S., Miyase T., Noguchi H., (2002). Polyphenolic glycosides and oligosaccharide multiestes from the roots of *Polygala dalmaisiana*. *Journal of natural products*, 65(3), 319-328.
103. Ma W., Wei X., Ling T., et al., (2003). New phenolics from *Polygala fallax*. *Journal of natural products*, 66(3), 441-443.
104. Nucci-Martins C., Nascimento L F., Venzke D., et al., (2016). Antinociceptive effect of hydroalcoholic extract and isoflavon isolated from *Polygala molluginifolia* in mice: Evidence for the involvement of opioid receptors and TRPV1 and TRPA1 channels. *Phytomedicine*, 23(5), 429-440.
105. Zhang W., Li T., Liu R., Yang G., Chen H., (2006). A new cerebroside from *Polygala japonica*. *Fitoterapia*, 77(4), 336-337.
106. Li T Z., Zhang W D., Yang G J., et al., (2006). New flavonol glycosides and new xanthone from *Polygala japonica*. *Journal of Asian natural products research*, 8(5), 401-409.

107. Kim S H., Jang S D., Lee K Y., et al.,(2009). Chemical constituents isolated from *Polygala japonica* leaves and their inhibitory effect on nitric oxide production *in vitro*. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 24(1), 230-233.
108. Pizzolatti M G., Luciano C., Delle Monache F., (2000). Styryl-and dihydrostyryl-2-pyrones derivatives from *Polygala sabulosa*. *Phytochemistry*, 55(7), 819-822.
109. Pizzolatti M G., Cunha Jr A., Pereira W S., et al., (2004). A new styryl-2-pyrone derivative from *Polygala sabulosa* (Polygalaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 32(6), 603-606.
110. Ardenghi J V., Pretto J B., Souza, et al., (2006). Antinociceptive properties of coumarins, steroid and dihydrostyryl-2-pyrones from *Polygala sabulosa* (Polygalaceae) in mice. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 58(1), 107-112.
111. Huang Y J., Zhou L Y., Wang J M., et al., (2015). Two new flavonol glycosides from *Polygala sibirica* L. var *megalopha* Fr. *Molecules*, 20(12), 21494-21500.
112. Li J C., Nohara T., (2000). Benzophenone C-glucosides from *Polygala telephioides*. *Chemical and Pharmaceutical bulletin*, 48(9), 1354-1355.
113. Jiang Y., Tu P., (2005). Four new phenones from the cortexes of *Polygala tenuifolia*. *Chemical and Pharmaceutical bulletin*, 53(9), 1164-1166.
114. Chen Y J., Huang X B., Li Z X., et al., (2010). Tenuigenin protects cultured hippocampal neurons against methylglyoxal-induced neurotoxicity. *European journal of pharmacology*, 645(1-3), 1-8.
115. Van Le T K., Jeong J J., Kim D H., (2012). Clionosterol and ethyl cholestan-22-enol isolated from the rhizome of *Polygala tenuifolia* inhibit phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 35(8), 1379-1383.
116. Chen C Y., Wei X D., Chen C R., (2016). 3, 4, 5-Trimethoxycinnamic acid, one of the constituents of *Polygalae* radix exerts anti-seizure effects by modulating GABAergic systems in mice. *Journal of Pharmacological Sciences*, 131(1), 1-5.
117. Kawashima K., Miyako D., Ishino Y., et al., (2004). Anti-stress Effects of 3,4,5-trimethoxycinnamic acid, an active constituent of roots of *Polygala tenuifolia* (Onji). *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 27(8), 1317–1319.
118. Li C J., Zhang D M., Yu S S., (2008). Benzophenone C-glucosides from *Polygala glomerata* Lour. *Journal of Asian Natural Products Research*, Vol. 10, No. 4, April 2008, 293–297.

119. Hoffmann J J., Wiedhopf R M., Cole J R., (1977). Cytotoxic and tumor inhibitory agent from *Polygala macradenia* gray (Polygalaceae): 4'-demethyldeoxypodophyllotoxin. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 66(4), 586-587.
120. Pizzolatti M G., Cristiano R., Monache F. D., et al., (2002). Artefatos cumarínicos isolados de *Polygala paniculata* L.(Polygalaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 12(1), 21-26.(in Brazil).
121. Li J., Zeng K W., Shi S P., et al., (2012). Anti-neuroinflammatory constituents from *Polygala tricornis* Gagnep. *Fitoterapia*, 83(5), 896-900.
122. Ma T J., Shi X C., Jia C X., (2010). A new benzophenone C-glycoside from *Polygala telephioides* Willd. *Chinese Chemical Letters*, 21(5), 584-586.
123. Phạm Thị Minh Đức, (2019), *Sinh lý học*, Bộ môn Sinh lý học, Trường Đại học Y Hà Nội, Nhà xuất bản Y học.
124. Hoàng Thị Kim Huyền & Brouwers J R B J., (2014). *Dược lâm sàng: những nguyên lý cơ bản và sử dụng thuốc trong điều trị*, tập 1: các nguyên lý cơ bản trong dược lâm sàng, NXB Y học.
125. Phạm Thắng, (2010), *Bệnh Alzheimer và các thể sa sút khác*, NXB Y học.
126. *2018 Alzheimer's disease facts and figures*,(2018). *Alzheimer's & Dementia*, 14(3), 367–389.
127. *NICE clinical guideline* (2011), Donepezil, galantamine, rivastigmine and memantine for the treatment of Alzheimer's disease, Review of NICE technology appraisal guidance 11.1.
128. Iadecola C. (2013). The pathobiology of vascular dementia. *Neuron*, 80(4), 844-866.
129. McKeith I. (2007). *Dementia with Lewy bodies*. In *Handbook of clinical Neurology* (Vol. 84, pp. 531-548). Elsevier.
130. Neary D., Snowden J., Mann D., (2005). Frontotemporal dementia. *The Lancet Neurology*, 4(11), 771-780.
131. Jeffrey L C, Harry V V, Gregory M C et al., (2002). Alzheimer disease. *American medical association*. 287(18): 2335-2338.
132. Liu W B., Liu W Z., (2005). Disciplinary investigation of Chinese complex prescription with promoting intelligence in past dynasties. *Jiangxi Journal Traditional China Medical*. 36, 62–63.
133. Hugel M., Jackson H., May N H., et al., (2012). Chinese herbs for dementia diseases. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 12(5), 371-379.

134. 中华人民共和国药典 2010 年版- 国家药典委员会
135. Lee H J., Ban J Y., Koh S B., et al., (2004). Granule Cells Against Damage Induced by NMDA. *The American Journal of Chinese Medicine*, 32(04), 599–610.
136. Farina M., Franco J L., Ribas C M., et al., (2005). Protective effects of *Polygala paniculata* extract against methylmercury-induced neurotoxicity in mice. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 57(11), 1503–1508.
137. Park J H., Kim J S., Jang D S., et al., (2006). Effect of *Polygala tenuifolia* root extract on cerebral ischemia and reperfusion. *The American journal of Chinese medicine*, 34(01), 115-123.
138. Yabe T., Tuchida H., Kiyohara H., et al., (2003). Induction of NGF synthesis in astrocytes by onjisaponins of *Polygala tenuifolia*, constituents of Kampo (Japanese herbal) medicine, Ninjin-Yoei-To. *Phytomedicine*, 10(2-3), 106–114.
139. Karakida F., Ikeya Y., Tsunakawa M., et al., (2007). Cerebral Protective and Cognition-Improving Effects of Acid sinapic in Rodents. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 30(3), 514–519.
140. Sun X L., Ito H., Masuoka T., (2007). Effect of *Polygala tenuifolia* root extract on scopolamine-induced impairment of rat spatial cognition in an eight-arm radial maze task. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 30(9), 1727-1731.
141. Zhang H., Han T., Zhang L., et al., (2008). Effects of tenuifolin extracted from radix *Polygalae* on learning and memory: A behavioral and biochemical study on aged and amnesic mice. *Phytomedicine*, 15(8), 587–594.
142. Wang L., Jin G., Yu H., et al., (2019). Protective effect of Tenuifolin against Alzheimer's disease. *Neuroscience letters*, 705, 195-201.
143. Chen Y L., Hsieh C L., Wu P H B., et al., (2004). Effect of *Polygala tenuifolia* root on behavioral disorders by lesioning nucleus basalis magnocellularis in rat. *J. Ethnopharmacol.* 95, 47–55.
144. Chung IW, Moore NA, Oh WK, et al., (2002). Behavioural pharmacology of Polygalasaponins indicates potential antipsychotic efficacy, *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 71(1-2), 191-195.
145. Jia H., Jiang Y., Ruan Y., et al., (2004). Tenuigenin treatment decreases secretion of the Alzheimer's disease amyloid β -protein in cultured cells. *Neuroscience letters*, 367(1), 123-128.

146. Jung H., Lee J Y., Kim S H., et al., (2007). P.5.a.001 Effect of functional diet *Polygala tenuifolia* Willdenow extract (BT-11) on memory function of healthy general population. *European Neuropsychopharmacology*, 17, S526.
147. Shin K Y., Lee J Y., Won B Y., et al., (2009a). BT-11 is effective for enhancing cognitive functions in the elderly humans. *Neuroscience letters*. 465, 157–159.
148. Shin, K Y., Won B. Y., Heo C., et al., (2009b). BT-11 improves stress-induced memory impairments through increment of glucose utilization and total neural cell adhesion molecule levels in rat brains. *Journal of Neuroscience Research*. 87, 260–268.
149. Park C H., Yang P S., Yoon Y S., et al., (2019). Study on the safety of *Polygala tenuifolia* Willdenow root extract powder (BT-11) in young person aged from 9 to 19 years old. *Journal of ethnopharmacology*, 232, 119-129.
150. Naito R., Tohda C., (2006). Characterization of anti-neurodegenerative effects of *Polygala tenuifolia* in $A\beta$ (25—35)-treated cortical neurons. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 29(9), 1892-1896.
151. Lee M R., Yun B S., Park S Y., et al., (2010). Anti-amnesic effect of Chong–Myung–Tang on scopolamine-induced memory impairments in mice. *Journal of ethnopharmacology*, 132(1), 70-74.
152. Kim H M., Lee E H., Na H J., et al.,(1998). Effect of *Polygala tenuifolia* root extract on the tumor necrosis factor- α secretion from mouse astrocytes. *Journal of ethnopharmacology*, 61(3), 201-208.
153. Smriga M., Saito H., Nishiyama N., (1995). Hoelen (*Poria Cocos* Wolf) and ginseng (*Panax Ginseng* CA Meyer), the ingredients of a Chinese prescription DX-9386, individually promote hippocampal long-term potentiation *in vivo*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 18(4), 518-522.
154. Zeng K W., Li J., Dong X., et al., (2013). Anti-neuroinflammatory efficacy of the aldose reductase inhibitor FMHM via phospholipase C/protein kinase C-dependent NF- κ B and MAPK pathways. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 273(1), 159–171.
155. 谈运良, 王美婵, 刘汴生(1997) 远志醇提物对小鼠学习记忆的影响. 中国中西医结合杂志, 17:186-188. (-in China).
156. 张耀春, 王立为. (2006)远志提取物对小鼠学习记忆的影响. 中国新药杂志, 15(15):1254-1257. (-in China).
157. 魏本立, 张敏. (2011)远志煎剂改善学习记忆障碍的初步实验研究. 中国民康医学, 23(10):1186-1187. (-in China).

158. 耿志辉, 宣兆宇, 张丽娇, 等(2010) 中药远志改善 D - 半乳糖模型鼠学习记忆能力及其机制研究. 神经解剖学杂志, 26 (2):189-191. (-in China).
159. 郭宇飞, 李新毅, 郭芬, 等 (2011)中药远志对 D - 半乳糖致衰大鼠学习记忆及海马长时程增强的影响. 中国老年学杂志, 31:632-634. (-in China).
160. 李新毅, 郭锋, 崔丽霞, 等(2008)远志对双侧海马注射 ApoE4 致大鼠 学习记忆障碍的影响. 山西中医学院学报, 9(2):20-21. (-in China).
161. 穆俊霞, 李新毅 (2007)中药远志对阿尔茨海默病大鼠模型学习记忆和胆碱酯酶活性的影响. 世界中西医结合杂志, 2(1):18-20. (-in China).
162. 温静, 杨伯宁, 薛昌强, 等(2010)远志促进 AD 模型小鼠神经发生的研究. 神经解剖学杂志, 26(2):145-149. (-in China).
163. 石成男, 李秀国, 许青松, 等(2011)远志水提物对阿尔茨海默病模型小鼠学习记忆的影响. 中风与神经疾病杂志, 28 (7):620-622. (-in China).
164. Perveen F K. (Ed.), (2018). *Drosophila Melanogaster: Model for Recent Advances in Genetics and Therapeutics*. BoD–Books on Demand.
165. Celniker S E., Rubin G M., (2003). The *Drosophila melanogaster* genome. *Annual review of genomics and human genetics*, 4(1), 89-117.
166. Reiter L T., Potocki L., Chien S., et al., (2001). A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in *Drosophila melanogaster*. *Genome research*, 11(6), 1114-1125.
167. Pandey U B., Nichols C D., (2011). Human disease models in *Drosophila melanogaster* and the role of the fly in therapeutic drug discovery. *Pharmacological reviews*, 63(2), 411-436.
168. Ong C., Yung L Y L., Cai Y., et al., (2015). *Drosophila melanogaster* as a model organism to study nanotoxicity. *Nanotoxicology*, 9(3), 396-403.
169. Nichols C D., Becnel J., Pandey U B., (2012). Methods to assay *Drosophila* behavior. *Journal of Visualized Experiments*, (61), e3795.
170. Gerber B., Biernacki R., Thum J., (2013). Odor–taste learning assays in *Drosophila* larvae. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2013(3), pdb-prot071639.
171. Kazemi-Esfarjani P., Benzer S., (2000). Genetic suppression of polyglutamine toxicity in *Drosophila*. *Science*, 287(5459), 1837-1840.

172. Warrick J M., Morabito L M., Bilen J., et al., (2005). Ataxin-3 suppresses polyglutamine neurodegeneration in *Drosophila* by a ubiquitin-associated mechanism. *Molecular cell*, 18(1), 37-48.
173. Auluck P K., Chan H E., Trojanowski J Q., et al., (2002). Chaperone suppression of α -synuclein toxicity in a *Drosophila* model for Parkinson's disease. *Science*, 295(5556), 865-868.
174. Pendleton R G., Parvez F., Sayed M., et al., (2002). Effects of pharmacological agents upon a transgenic model of Parkinson's disease in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 300(1), 91-96.
175. Mizuno H., Fujikake N., Wada K., et al., (2011). α -Synuclein transgenic *Drosophila* as a model of Parkinson's disease and related synucleinopathies. *Parkinson's Disease, 2011*.
176. Rosen D R., Martin-Morris L., Luo L Q et al., (1989). A *Drosophila* gene encoding a protein resembling the human beta-amyloid protein precursor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(7), 2478-2482.
177. Finelli A., Kelkar A., Song H J., et al., (2004). A model for studying Alzheimer's A β 42-induced toxicity in *Drosophila melanogaster*. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 26(3), 365-375.
178. Boulianne G L., Livne-Bar I., Humphreys J M., et al., (1997). Cloning and characterization of the *Drosophila* presenilin homologue. *Neuroreport*, 8(4), 1025-1029.
179. Heidary G., Fortini M E., (2001). Identification and characterization of the *Drosophila* tau homolog. *Mechanisms of development*, 108(1-2), 171-178.
180. Markow T A., O'Grady P., (2005). *Drosophila: a guide to species identification and use*. Elsevier.
181. Trung tâm Đào tạo - Nghiên cứu dược (2012), *Thực tập dược liệu*, Trường Học viện quân y. NXB Quân đội nhân dân.
182. Nguyễn Việt Thân, (2003). Kiểm nghiệm dược liệu bằng phương pháp hiển vi, Tập 1, NXB khoa học- kỹ thuật.
183. Nguyễn Văn Đán, Nguyễn Việt Tựu, (1985). Phương pháp nghiên cứu hóa học cây thuốc. NXB khoa học kỹ thuật.
184. Thu V K., Van Thang N., Nhiem N X., Kim, S. H., et al., (2015). Oleanane-type saponins from *Glochidion glomerulatum* and their cytotoxic activities. *Phytochemistry*, 116, 213-220.

185. Liu Q F., Lee J H., Kim Y M., et al., (2015). *In vivo* screening of traditional medicinal plants for neuroprotective activity against A β 42 cytotoxicity by using *Drosophila* models of Alzheimer's disease. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, b15-00459.
186. Wang H., Ye G., Ma C H., et al., (2007). Identification and determination of four metabolites of mangiferin in rat urine. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 45(5), 793-798.
187. Mak N K., Li W K., Zhang M., et al., Effects of euxanthone on neuronal differentiation, *Life Sciences*, 1999, 66, 347-354.
188. Tosa H., Iinuma M., Murakami K I., et al., (1997), Three xanthones from *Poeciloneuron pauciflorum* and *Mammea acuminata*, *Phytochemistry*, 45, 133-136.
189. Kojima H., Sato N., Hatano A. et al., (1990) Sterol glucosides from *Prunella vulgaris*. *Phytochemistry*, 29(7):2351-2355.
190. Laurence V., Catherine L., Georges M. et al., (1999) Cytotoxic polyisoprenes and glycosides of long-chain fatty alcohols from *Dimocarpus fumatus*. *Phytochemistry*, 50:63-69.
191. Soekamto N H., Ahmad F., Appa F E., (2019). Potential of stigmasterol from EtOAc extract *Melochia umbellata* (Houtt) Stapf var. *Visenia* as Dengue Antivirus. *In Journal of Physics: Conference Series* (Vol. 1341, No. 3, p. 032044). IOP Publishing.
192. Lallemand J Y., Duteil M., (1977). ¹³C nmr spectra of quercetin and rutin. *Organic Magnetic Resonance*, 9(3), 179-180.
193. Trần Hồng Quang, Phạm Thành Công, Dương Thị Hải Yến, et al., (2018). Một số hợp chất triterpenoid saponin và xanthone glucoside từ cây viền chí nhật (*Polygala japonica* Houtt.). *Vietnam Journal of Chemistry*, 56(1), 86–93.
194. Li S., Liu Z., Liu C., et al., (2017). Bioactivity screening, extraction, and separation of lactate dehydrogenase inhibitors from *Polygala tenuifolia* Willd. based on a hyphenated strategy. *Journal of separation science*, 40(6), 1385-1395.
195. Li Z L., Dong X Z., Wang D X., et al. (2014). Effect of oligosaccharide esters and *Polygalaxanthone* III from *Polygala tenuifolia* willd towards cytochrome P450. *China journal of Chinese materia medica*, 39(22), 4459.
196. Saputri F C., Jantan I., (2012). Inhibitory Activities of Compounds from the Twigs of *Garcinia hombroniana* Pierre on Human Low - density Lipoprotein (LDL) Oxidation and Platelet Aggregation. *Phytotherapy Research*, 26(12), 1845-1850.

197. Duangrisai S., Choowongkamon K., Bessa L J., et al. (2014). Antibacterial and EGFR-tyrosine kinase inhibitory activities of polyhydroxylated xanthons from *Garcinia succifolia*. *Molecules*, 19(12), 19923-19934.
198. Likhitwitayawuid K., Chanmahasathien W., Ruangrunsi N., et al., (1998). Xanthons with antimalarial activity from *Garcinia dulcis*. *Planta Medica*, 64(03), 281-282.
199. Zhou H., Li S., Wang G., (2019). Euxanthone ameliorates sevoflurane-induced neurotoxicity in neonatal mice. *Journal of Molecular Neuroscience*, 68(2), 275-286.
200. Yin Z Q., Wang Y., Ye W C., Zhao S X., (2004). Chemical constituents of *Hypericum perforatum* (St. John's wort) growing in China. *Biochemical systematics and ecology*.
201. Ming M., Zhang X., Chen H F et al.,(2016). RXR α transcriptional inhibitors from the stems of *Calophyllum membranaceum*. *Fitoterapia*, 108, 66-72.
202. Ngo N T N., Nguyen V T., Van Vo, H., et al., (2010). Cytotoxic coumarins from the bark of *Mammea siamensis*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 58(11), 1487-1491.
203. Shi T X., Wang S., Zeng K W., et al., (2013). Inhibitory constituents from the aerial parts of *Polygala tenuifolia* on LPS-induced NO production in BV2 microglia cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 23, 5904-5908.
204. Tang W., Eisenbrand G., (1992). *Polygala tenuifolia* Willd. In *Chinese Drugs of Plant Origin* (pp. 781-786). Springer, Berlin, Heidelberg.
205. Yanbin Y., Jun Z., (1980). Studies on the xanthos of *Veratilla baillonii* Franch. Structures of veratrilosid and veratrilogenin, *Journal Acta Pharmaceutica Sinica*, 10.
206. Jeon G C., Park M S., Yoon D Y., et al., (2005). Antitumor activity of spinasterol isolated from *Pueraria* roots. *Experimental & Molecular Medicine*, 37(2), 111-120.
207. El K Y, Samadi M., Lopez T., et al., (2014) Biological activities of Schottenol and Spinasterol, two natural phytosterols present in argan oil and in cactus pear seed oil, on murine microglial BV2 cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 446(3):798-804.
208. Villaseñor I M., Domingo A P., (2000). Anticarcinogenicity potential of spinasterol isolated from squash flowers. *Teratogenesis, carcinogenesis, and mutagenesis*, 20(3), 99-105.
209. Jeong G S., Li B., Lee D S., et al., (2010). Cytoprotective and anti-inflammatory effects of spinasterol via the induction of heme oxygenase-1 in murine hippocampal and microglial cell lines. *International immunopharmacology*, 10(12), 1587-1594.

210. Uchida K., Mizuno H., Hirota K. et al., (1983). Effects of spinasterol and sitosterol on plasma and liver cholesteol levels and biliary and fecal sterol and bile acid excretions in mice. *Japanese journal of pharmacology*, 33(1), 103-112.
211. Jiang L H., Yang N Y., Yuan X L., et al., (2014). Daucosterol promotes the proliferation of neural stem cells. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 140, 90-99.
212. Jiang L H., Yuan X L., Yang N Y., et al., (2015). Daucosterol protects neurons against oxygen–glucose deprivation/reperfusion-mediated injury by activating IGF1 signaling pathway. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 152, 45-52.
213. Chung M J., Lee S., Park Y I., et al., (2016). Neuroprotective effects of phytosterols and flavonoids from *Cirsium setidens* and *Aster scaber* in human brain neuroblastoma SK-N-SH cells. *Life sciences*, 148, 173-182.
214. Ji Z H., Xu Z Q., Zhao H., et al., (2017). Neuroprotective effect and mechanism of daucosterol palmitate in ameliorating learning and memory impairment in a rat model of Alzheimer's disease. *Steroids*, 119, 31-35.
215. Wang G Q, Gu J F, Gao Y C, et al., (2016). Daucosterol inhibits colon cancer growth by inducing apoptosis, inhibiting cell migration and invasion and targeting caspase signalling pathway. *Bangladesh journal of pharmacology*, 11(2):395-401.
216. Lee J H, Lee J Y, Park J H, et al., (2007) Immunoregulatory activity by daucosterol, a beta-sitosterol glycoside, induces protective Th1 immune response against disseminated Candidiasis in mice. *Vaccine*, 25(19):3834-40.
217. Kaur N., Chaudhary J., Jain A., et al., (2011). Stigmasterol: a comprehensive review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 2(9), 2259.
218. Gabay O., Sanchez C., Salvat C., et al., (2010). Stigmasterol: a phytosterol with potential anti-osteoarthritic properties. *Osteoarthritis and cartilage*, 18(1), 106-116.
219. Batta A K., Xu G., Honda A., et al., (2006). Stigmasterol reduces plasma cholesteol levels and inhibits hepatic synthesis and intestinal absorption in the rat. *Metabolism*, 55(3), 292-299.
220. Panda S., Jafri M., Kar A., et al., (2009). "Thyroid inhibitory, antiperoxidative and hypoglycemic effects of stigmasterol isolated from *Butea monosperma*". *Fitoterapia*. 80 (2): 123–126.

221. Navarro A., De Las Heras B., Villar A., (2001). Anti-inflammatory and immunomodulating properties of a sterol fraction from *Sideritis foetens* Clem. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 24(5), 470-473.
222. Garcia M D., Saenz M T., Gomez M A., et al., (1999). Topical antiinflammatory activity of phytosterols isolated from *Eryngium foetidum* on chronic and acute inflammation models. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 13(1), 78-80.
223. Gao Z., Maloney D J., Dedkova L M., et al., (2008). Inhibitors of DNA polymerase β : activity and mechanism. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 16(8), 4331-4340.
224. Kasahara Y., Kumaki K., Katagiri S., et al., (1994). *Carthami* flos extract and its component, stigmasterol, inhibit tumour promotion in mouse skin two stage carcinogenesis. *Phytotherapy Research*, 8(6), 327-331.
225. Hu Y, Liao H B, Liu P, et al., (2009), A bioactive compound from *Polygala tenuifolia* regulates efficiency of chronic stress on hypothalamic-pituitary-adrenal axis, *Pharmazie*, 64(9), 605-608.
226. Mao S L., Liao S X., Wu J H., et al., (1996). Studies on chemical constituents of *Polygala arillata* Buch-Ham. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 31, 121-124.(in China)
227. Wang, H., Tong, Y. X., Ye, W. C., & Zhao, S. X. (2003). Studies on chemical constituents in roots of *Polygala tenuifolia*. *China journal of Chinese materia medica*, 28(9), 828-830. (in China)
228. 李廷钊, 张卫东, 柳润辉, 陈海生, 张川, 苏娟, & 徐希科. (2006). Studies on chemical constituents of *Polygala japonica* Houtt. *Journal of Medical Colleges of PLA*, 中国人民解放军军医大学学报(英文版), 编辑部邮箱, 2006年05期(in China)