BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO BỘ Y TẾ

VIỆN DƯỢC LIỆU



NGUYỄN VĂN LIỆU

NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN HOÁ HỌC VÀ TÁC DỤNG THEO HƯỚNG ĐIỀU HÒA MIỄN DỊCH, CHỐNG VIÊM *IN VITRO* CỦA CÀNH, LÁ LOÀI NIỆT DÓ (*Wikstroemia indica* (L.) C.A.Mey.)

LUẬN ÁN TIẾN SĨ DƯỢC HỌC

HÀ NỘI, NĂM 2026

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO BỘ Y TẾ

VIỆN DƯỢC LIỆU



NGUYỄN VĂN LIỆU

NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN HOÁ HỌC VÀ TÁC DỤNG THEO HƯỚNG ĐIỀU HÒA MIỄN DỊCH, CHỐNG VIÊM *IN VITRO* CỦA CÀNH, LÁ LOÀI NIỆT DÓ (*Wikstroemia indica* (L.) C.A.Mey.)

LUẬN ÁN TIẾN SĨ DƯỢC HỌC

CHUYÊN NGÀNH: Dược liệu - Dược học Cổ truyền

MÃ SỐ: 9720206

Người hướng dẫn khoa học: **PGS.TS. Đỗ Thị Hà**

PGS.TS. Hoàng Việt Dũng

HÀ NỘI, NĂM 2026

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan luận án này là công trình nghiên khoa học của của riêng tôi dưới sự hướng dẫn của **PGS.TS. Đỗ Thị Hà** và **PGS.TS. Hoàng Việt Dũng**

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

Tác giả luận án

NCS. Nguyễn Văn Liệu

LỜI CẢM ƠN

Trong quá trình nghiên cứu và hoàn thành luân án này, tôi đã nhận được rất nhiều sự giúp đỡ quý báu của các thầy cô giáo, các nhà khoa học, cùng quý cơ quan, bạn bè đồng nghiệp và gia đình.

Trước hết, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc nhất tới **PGS.TS. Đỗ Thị Hà** và **PGS.TS. Hoàng Việt Dũng**, những người thầy đã tận tình hướng dẫn, chỉ bảo, giúp đỡ và hỗ trợ tôi hết mình trong quá trình học tập, nghiên cứu và hoàn thành luận án.

Tôi xin chân thành cảm ơn Ban lãnh đạo Viện Dược liệu, Ban giám đốc Học Viện Quân y, cùng lãnh đạo chỉ huy các phòng, ban, khoa, trung tâm và bộ môn trực thuộc hai cơ quan đã luôn quan tâm, tạo điều kiện thuận lợi và giúp đỡ tôi trong quá trình học tập, nghiên cứu và thực hiện đề tài.

Tôi xin chân thành cảm ơn Đề tài Nghị định thư Việt Nam – Hàn Quốc "**Nghiên cứu hoạt tính kháng ung thư và điều hòa miễn dịch của một số cây thuốc ở Việt Nam**" (Mã số: 09/2020/HĐ-NĐT) đã hỗ trợ về kinh phí để tôi hoàn thành phần thực nghiệm của luận án này.

Tôi xin gửi lời cảm ơn trân trọng tới các anh chị em cán bộ, nhân viên, nghiên cứu viên, kỹ thuật viên tại Khoa Hóa Phân tích Tiêu chuẩn - Viện Dược liệu đã nhiệt tình giúp đỡ, tạo điều kiện và cộng tác giúp tôi hoàn thành công trình này.

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

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

NCS. Nguyễn Văn Liệu

MỤC LỤC

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CHỮ VIẾT TẮT
DANH MỤC CÁC BẢNG
DANH MỤC CÁC HÌNH
ĐẶT VẤN ĐỀ 1
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN 3
1.1. TỔNG QUAN VỀ LOÀI NIỆT DÓ 3
1.1.1. Thực vật học 3
1.1.1.1. Vị trí phân loại 3
1.1.1.2. Đặc điểm thực vật 3
1.1.1.3. Phân bố 4
1.1.2. Thành phần hóa học 4
1.1.2.1. Flavonoid 4
1.1.2.2. Biflavonoid 5
1.1.2.3. Coumarin 7
1.1.2.4. Lignan 9
1.1.2.5. Sesquiterpen 13
1.1.2.6. Các hợp chất khác 14
1.1.3. Tác dụng sinh học 17
1.1.3.1. Tác dụng chống viêm 17
1.1.3.2. Tác dụng chống oxy hóa 19
1.1.3.3. Tác dụng kháng ung thư 19
1.1.3.4. Tác dụng kháng vi sinh vật và ký sinh trùng 22
1.1.3.5. Một số tác dụng khác 23
1.1.4. Tác dụng và công dụng theo Y học cổ truyền 24
1.2. TỔNG QUAN VỀ PHẢN ỨNG VIÊM VÀ ĐÁP ỨNG MIỄN DỊCH 24
1.2.1. Mối liên hệ giữa viêm và đáp ứng miễn dịch 24
1.2.1.1. Khái niệm về viêm và miễn dịch 24
1.2.1.2. Các nhánh đáp ứng miễn dịch và cơ chế phối hợp 25
1.2.2. Vai trò của đại thực bào và cytokin IL-1β, IL-10 26
1.2.2.1. Thụ thể nhận diện và tín hiệu hoạt hóa của đại thực bào 26
1.2.2.2. Vai trò của IL-1β và IL-10 trong phản ứng viêm 27
1.2.3. Vai trò của tế bào T CD4+ và INF-γ, IL-17, Foxp3 29

1.2.3.1. Sự kích hoạt và biệt hóa của tế bào T CD4+ 29
1.2.3.2. Vai trò của cytokin INF-γ 30
1.2.3.3. Vai trò của cytokin IL-17.....30
1.2.3.4. Vai trò của yếu tố phiên mã Foxp3 30
CHƯƠNG 2. NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU 32
2.1. NGUYÊN VẬT LIỆU NGHIÊN CỨU 32
2.1.1. Nguyên liệu nghiên cứu 32
2.1.2. Thuốc thử, hóa chất, dung môi và dòng tế bào 33
2.1.3. Máy móc, thiết bị 34
2.2. ĐỊA ĐIỂM NGHIÊN CỨU 35
2.2.1. Địa điểm nghiên cứu thực vật 35
2.2.2. Địa điểm nghiên cứu thành phần hóa học.....35
2.2.3. Địa điểm nghiên cứu tác dụng dược lý 35
2.3. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....35
2.3.1. Phương pháp nghiên cứu thành phần hóa học 36
2.3.1.1. Phương pháp chiết xuất và phân lập.....36
2.3.1.2. Phương pháp xác định cấu trúc của các hợp chất.....37
2.3.2. Phương pháp nghiên cứu tác dụng dược lý.....38
2.3.2.1. Phương pháp đánh giá ảnh hưởng của cao chiết và chất chiết đối tế bào RAW 264.7 38
2.3.2.2. Phương pháp đánh giá mức độ sản sinh một số cytokin liên quan đến viêm và miễn dịch.....39
2.3.3. Xử lý số liệu 44
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU 45
3.1. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VỀ THÀNH PHẦN HÓA HỌC.....45
3.1.1. Chiết xuất và phân lập các hoạt chất.....45
3.1.1.1. Chiết xuất.....45
3.1.1.2. Phân lập các hợp chất 46
3.1.2. Xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất phân lập được 51
3.1.2.1. Hợp chất **WI1** (methyl 4-hydroxybenzoat) 51
3.1.2.2. Hợp chất **WI2** (syringin) 51
3.1.2.3. Hợp chất **WI3** (umbelliferon).....53
3.1.2.4. Hợp chất **WI4** (adicardin).....54
3.1.2.5. Hợp chất **WI5** (daphnoretin) 56

3.1.2.6. Hợp chất **WI6** (daphnorin) 57
3.1.2.7. Hợp chất **WI7** (wikstronutin) 59
3.1.2.8. Hợp chất **WI8** (triumbelletin-7-O-β-D-glucosid).....61
3.1.2.9. Hợp chất **WI9** (genkwanin).....64
3.1.2.10. Hợp chất **WI10** (kaempferol 3-O-α-L-rhamnopyranosid) 65
3.1.2.11. Hợp chất **WI11** (yuankanin).....67
3.1.2.12. Hợp chất **WI12** (*erythro*-syringylglycerol-8-O-4′-sinapyl ether 4-O-β-D-glucopyranosid) 69
3.1.2.13. Hợp chất **WI13** (*erythro*-citrusin B).....71
3.1.2.14. Hợp chất **WI14** (*threo*-citrusin B) 72
3.1.2.15. Hợp chất **WI15** (isonitidanin-4-O-β-D-glucosid).....78
3.1.2.16. Hợp chất **WI16** ((7S,*8R*)-dehydrodiconiferyl alcohol 4-O-β-D-glucopyranosid) 82
3.1.2.17. Hợp chất **WI17** ((7S*,8R*)-5-methoxydehydrodiconiferyl alcohol 4-O-β-D-glucopyranosid).....84
3.1.2.18. Hợp chất **WI18** (pinoresinol di-O-β-D-glucopyranosid).....86
3.1.2.19. Hợp chất **WI19** (liriodendrin).....88
3.2. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU TÁC DỤNG SINH HỌC 90
3.2.1. Kết quả sàng lọc hoạt tính của cao chiết trên mức độ sản sinh IL-1β và IL-10 90
3.2.1.1. Chuẩn bị mẫu cao chiết cho nghiên cứu sàng lọc hoạt tính.....90
3.2.1.2. Đánh giá ảnh hưởng của các cao chiết đến khả năng sống sót của tế bào RAW 264.7. 90
3.2.1.3. Sàng lọc hoạt tính trên mức độ sản sinh IL-1β và IL-10 của cao tổng và cao chiết phân đoạn từ Niệt dó. 91
3.2.2. Kết quả sàng lọc hoạt tính của các hợp chất phân lập được từ Niệt dó trên mức độ sản sinh IL-1β và IL-10.....93
3.2.2.1. Đánh giá ảnh hưởng của các hợp chất phân lập được đến khả năng sống sót của tế bào RAW 264.7 93
3.2.2.2. Sàng lọc hoạt tính trên sản sinh IL-1β và IL-10 của các hợp chất phân lập được từ Niệt dó 94
3.2.3. Kết quả đánh giá hoạt tính của một số hợp chất phân lập từ Niệt dó lên sự sản sinh IL-1β và IL-10 trên tế bào RAW 264.7.....97
3.2.3.1. Đánh giá ảnh hưởng của một số hợp chất phân lập được đến khả năng sống sót của tế bào RAW 264.7.....97
3.2.3.2. Kết quả đánh giá hoạt tính ức chế IL-1β và kích thích IL-10 của một số hợp chất trên tế bào RAW 264.7 98

3.2.4. Kết quả đánh giá hoạt tính của một số hợp chất phân lập từ Niệt dó lên sự sản sinh INF-γ, IL-17 và Foxp3 trên dòng tế bào T CD4+ 100
3.2.4.1. Đánh giá ảnh hưởng của một số chất phân lập được đến khả năng sống sót của tế bào T CD4+ 101
3.2.4.2. Kết quả đánh giá hoạt tính ức chế INF-γ in vitro của một số hợp chất phân lập từ Niệt dó.....101
3.2.4.3. Kết quả đánh giá hoạt tính ức chế sản sinh IL-17 in vitro của một số hợp chất phân lập từ Niệt dó 103
3.2.4.4. Kết quả đánh giá hoạt tính ức chế Foxp3 in vitro của một số hợp chất phân lập từ Niệt dó.....104
CHƯƠNG 4. BÀN LUẬN 107
4.1. VỀ THÀNH PHẦN HÓA HỌC 107
4.1.1. Về chiết xuất.....107
4.1.2. Về phân lập các hợp chất 108
4.1.2.1. Về các hợp chất phenolic 111
4.1.2.2. Về các hợp chất coumarin.....112
4.1.2.3. Về các hợp chất lignan.....117
4.2. VỀ TÁC DỤNG SINH HỌC 120
4.2.1. Định hướng lựa chọn nghiên cứu hoạt tính trên một số cytokin liên quan đến viêm và miễn dịch 120
4.2.2. Về sàng lọc hoạt tính trên IL-1β và IL-10.....121
4.2.3. Về tác dụng của một số chất tiềm năng trên mức độ sản sinh IL-1β và IL-10 .123
4.2.4. Về tác dụng của một số chất tiềm năng trên INF-γ, IL-17 và Foxp3.....124
4.2.5. Về liên quan giữa cấu trúc và tác dụng sinh học.....126
4.3. ĐÓNG GÓP MỚI CỦA ĐỀ TÀI 127
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....129
DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ
TÀI LIỆU THAM KHẢO

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CHỮ VIẾT TẮT

TT	Ký hiệu, viết tắt	Tiếng Anh	Diễn giải tiếng Việt
1	^{13}C-NMR	Carbon-13 Nuclear magnetic Resonance Spectrometry	Phổ cộng hưởng từ carbon 13
2	^{1}H-NMR	Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectrometry	Phổ Cộng hưởng từ hạt nhân proton
3	Akt	Protein Kinase B	Kinase protein B (enzym tín hiệu nội bào)
4	BAX	BCL2 Associated X Protein	Protein kích hoạt apoptosis (chết tế bào)
5	BCL-2	B-cell lymphoma 2	Protein ức chế apoptosis (chết tế bào)
6	COX-2	Cyclooxygenase-2	
7	CS		Cộng sự
8	DCM	Dichloromethane	
9	DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer	
10	DNCB	2,4-dinitrochlorobenzen	
11	DPPH	1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl	
12	ELISA	Enzym-Linked Immunosorbent Assay	Phương pháp ét nghiệm miễn dịch hấp thụ liên kết với enzym
13	ESI-MS	Electrospray Ionisation - Mass Spectrometry	Phổ khối ion hóa phun mù điện tử
14	EtOH	Ethanol	Cồn ethylic
15	Foxp3	Forkhead box P3	
16	Glc	Glucopyranosyl	
17	HeLa	Henrietta Lacks cells	Dòng tế bào ung thư cổ tử cung người
18	HIV	Human Immunodeficiency Virus	Virus gây suy giảm miễn dịch ở người
19	HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation	Phổ tương quan dị hạt nhân đa liên kết
20	HR-ESI-MS	High-resolution electrospray ionisation mass spectrometry	Phổ khối phân giải cao ion hóa phun mù điện tử
21	IC_{50}	Half maximal effective concentration	Nồng độ ức chế 50%
22	Ig	Immunoglobulin	

TT	Ký hiệu, viết tắt	Tiếng Anh	Diễn giải tiếng Việt
23	IL	Interlerkin	
24	INF	Interferon	
25	*J*		Hằng số tương tác (đơn vị là Hz)
26	LPS	Lipopolysaccharide	Yếu tố gây viêm
27	*m/z*	Mass to charge ratio	Tỉ lệ khối lượng/điện tích
28	MCA	Metal Chelating Activity	Hoạt tính tạo phức chelat với kim loại
29	MeOH	Methanol	
30	MHC	Major Histocompatibility Complex	Phức hợp hòa hợp tổ chức chính
31	MIC	Minimum Inhibitory Concentration	Nồng độ ức chế tối thiểu
32	MTT	(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide	
33	NaV1.7	Voltage-gated sodium channel subtype 1.7	Kênh Natri điện thế 1.7
34	ND		Niệt dó
35	NF-κB	Nuclear Factor Kappa B	Yếu tố phiên mã điều hòa miễn dịch, viêm
36	NLRs	NOD-Like Receptors	Các thụ thể giống NOD
37	NO	Nitric oxide	
38	NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy	
39	OVL	Overlap	Tín hiệu bị chồng chập
40	PAMPs	Pathogen-Associated Molecular Patterns	Các mẫu cấu trúc phân tử gắn liền với tác nhân gây bệnh
41	PC50	Preferential Cytotoxicity	
42	PI3K	Phosphoinositide 3-kinase	
43	PRRs	Pattern Recognition Receptors	Các thụ thể nhận diện mẫu
44	Rha	Rhamnopyranosyl	
45	ROS	Reactive Oxygen Species	Các gốc oxy hóa hoạt động
46	RSV	Respiratory Syncytial Virus	Virus hợp bào hô hấp
47	STT		Số thứ tự

TT	Ký hiệu, viết tắt	Tiếng Anh	Diễn giải tiếng Việt
48	TGF-β	Transforming Growth Factor-beta	Yếu tố sinh trưởng chuyển đổi beta
49	TLRs	Toll-Like Receptors	Các thụ thể giống Toll
50	TLTK		Tài liệu tham khảo
51	TNF	Tumor Necrosis Factors	Yếu tố hoại tử khối u
52	TME	Tumor microenvironment	Vi môi trường khối u

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 1.1. Các hợp chất flavonoid phân lập từ Niệt dó 4
Bảng 1.2. Các hợp chất biflavonoid phân lập từ Niệt dó 6
Bảng 1.3. Các hợp chất coumarin phân lập từ Niệt dó.....8
Bảng 1.4. Các hợp chất lignan phân lập từ Niệt dó.....9
Bảng 1.5. Các hợp chất sesquiterpen phân lập từ Niệt dó.....14
Bảng 1.6. Các hợp chất khác phân lập từ Niệt dó 14
Bảng 1.7. Tác dụng ức chế sản sinh NO trên dòng tế bào RAW 264.7 được kích thích bằng LPS của cao chiết và một số hợp chất phân lập từ Niệt dó 18
Bảng 1.8. Hoạt tính gây độc tế bào ung thư của các hợp chất phân lập từ Niệt dó 21
Bảng 3.1. Số liệu phổ NMR của **WI1** và hợp chất tham khảo.....51
Bảng 3.2. Số liệu phổ NMR của **WI2** và hợp chất tham khảo.....52
Bảng 3.3. Số liệu phổ NMR của **WI3** và hợp chất tham khảo.....53
Bảng 3.4. Số liệu phổ NMR của **WI4** và hợp chất tham khảo.....54
Bảng 3.5. Số liệu phổ NMR của **WI5** và hợp chất tham khảo.....56
Bảng 3.6. Số liệu phổ NMR của **WI6** và hợp chất tham khảo.....57
Bảng 3.7. Số liệu phổ NMR của hợp chất **WI7** và hợp chất tham khảo.....59
Bảng 3.8. Số liệu phổ NMR của hợp chất **WI8** và hợp chất tham khảo.....62
Bảng 3. 9. Số liệu phổ NMR của hợp chất **WI9** và hợp chất tham khảo.....64
Bảng 3.10. Số liệu phổ NMR của hợp chất **WI10** và hợp chất tham khảo.....66
Bảng 3.11. Số liệu phổ NMR của hợp chất **WI11** và hợp chất tham khảo.....68
Bảng 3.12. Số liệu phổ NMR của hợp chất **WI12** và hợp chất tham khảo.....69
Bảng 3.13. Số liệu phổ NMR của hợp chất **WI13**, **WI14** và hợp chất tham khảo 74
Bảng 3.14. So sánh số liệu phổ ^{1}H-NMR của hợp chất **WI13**, **WI14** 78
Bảng 3.15. Số liệu phổ NMR của hợp chất **WI15** 79
Bảng 3.16. Số liệu phổ NMR của hợp chất **WI16** và hợp chất tham khảo.....82
Bảng 3.17. Số liệu phổ NMR của hợp chất **WI17** và hợp chất tham khảo.....85
Bảng 3.18. Số liệu phổ NMR của hợp chất **WI18** và hợp chất tham khảo.....87
Bảng 3.19. Số liệu phổ NMR của hợp chất **WI19** và hợp chất tham khảo.....88
Bảng 3.20. Giá trị IC_{50} của một số hợp chất phân lập từ Niệt dó trên ức chế sản sinh IL-1β..99
Bảng 3.21. Giá trị IC_{50} của một số hợp chất phân lập từ Niệt dó trên ức sản sinh INF-γ.....102
Bảng 3.22. Giá trị IC_{50} của một số hợp chất phân lập từ Niệt dó trên ức chế sản sinh IL-17 ...103
Bảng 3.23. Giá trị IC_{50} của một số hợp chất phân lập từ Niệt dó trên ức chế Foxp3..105
Bảng 4.1. Chỉ số chọn lọc tương đối (RSI) của các hợp chất tiềm năng trên tế bào T CD4+ ..126

DANH MỤC CÁC HÌNH

Hình 1.1. Cấu trúc hóa học của các hợp chất flavonoid phân lập từ Niệt dó.....5
Hình 1.2. Cấu trúc hóa học của các hợp chất biflavonoid phân lập từ Niệt dó.....7
Hình 1.3. Cấu trúc hóa học của các hợp chất coumarin phân lập từ Niệt dó.....9
Hình 1.4. Cấu trúc hóa học của các lignan khung dibenzylbutyrolacton.....12
Hình 1.5. Cấu trúc hóa học của các dẫn xuất 7′,9-epoxy-8,8′-lignan phân lập từ Niệt dó .13
Hình 1.6. Cấu trúc hóa học của các lignan khung furofuran phân lập từ Niệt dó.....13
Hình 1.7. Cấu trúc hóa học của các lignan khung benzofuran.....13
Hình 1.8. Cấu trúc hóa học của các neolignan secolignan phân lập từ Niệt dó.....13
Hình 1.9. Cấu trúc hóa học của các sesquiterpen phân lập từ Niệt dó.....14
Hình 1.10. Cấu trúc hóa học của các hợp chất khác phân lập từ Niệt dó.....16
Hình 1.11. Sơ đồ con đường nhận diện LPS qua thụ thể TLR4 và các con đường truyền tín hiệu nội bào sản sinh cytokin tiền viêm IL-1β.....28
Hình 1.12. Các con đường truyền tín hiệu và vai trò sinh học của IL-10 cùng một số cytokin trong đáp ứng viêm và miễn dịch 29
Hình 2.1. Niệt dó (*Wikstroemia indica* (L.) C.A.Mey.) 32
Hình 2.2. Sơ đồ thiết kế nghiên cứu của luận án.....36
Hình 2.3. Phản ứng nhuộm màu tế bào sống bằng phương pháp MTT 38
Hình 3.1. Sơ đồ tóm tắt quá trình chiết cao toàn phần và các cao phân đoạn từ 46
Hình 3.2. Sơ đồ tóm tắt quá trình phân lập các hợp chất từ cao EtOAc của cành và lá Niệt dó.....49
Hình 3.3. Sơ đồ tóm tắt quá trình phân lập các hợp chất từ cao nước của cành và lá Niệt dó.....50
Hình 3.4. Cấu trúc hóa học của hợp chất **WI1** 51
Hình 3.5. Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC chính (→) của hợp chất **WI2** 53
Hình 3.6. Cấu trúc hóa học của hợp chất **WI3** 54
Hình 3.7. Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC (→) chính của hợp chất **WI4** 55
Hình 3.8. Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC (→) chính của hợp chất **WI5** 57
Hình 3.9. Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC (→) chính của hợp chất **WI6** 59
Hình 3.10. Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC (→) chính của hợp chất **WI7** ..61
Hình 3.11. Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC (→) chính của hợp chất **WI8** ..64
Hình 3. 12. Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC (→) chính của hợp chất **WI9**. 65
Hình 3.13. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC (→) chính của hợp chất **WI10**.....67
Hình 3.14. Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC (→) chính của hợp chất **WI11** 69
Hình 3.15. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC (→) chính của hợp chất **WI12**.....71
Hình 3.16. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC (→) chính của hợp chất **WI13**.....72
Hình 3.17. So sánh phổ ^{1}H-NMR của **WI13** và **WI14** tại vùng H-7 và H-9a,b 77
Hình 3.18. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC (→) và ^{1}H-^{1}H COSY (–) chính của hợp chất **WI14** 78
Hình 3.19. Phổ ECD thực nghiệm và tính toán của hợp chất **WI15** 81
Hình 3.20. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC (→) và ^{1}H-^{1}H COSY (—) chính của hợp chất **WI15** 82
Hình 3.21. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC (→) chính của hợp chất **WI16**.....84
Hình 3.22. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC (→) chính của hợp chất **WI17**.....86

Hình 3.23. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC (→) chính của hợp chất **WI18**.....88
Hình 3.24. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC (→) chính của hợp chất **WI19**.....89
Hình 3.25. Ảnh hưởng của các cao chiết cành và lá Niệt dó đến khả năng sống sót của tế bào RAW 264.7 90
Hình 3.26. Hoạt tính ức chế IL-1β và kích thích IL-10 cao chiết cành và lá Niệt dó trên tế bào RAW264.7 91
Hình 3.27. Ảnh hưởng của các hợp chất phân lập từ cành và lá Niệt dó đến khả năng sống sót của tế bào RAW 264.7.....93
Hình 3.28. Sàng lọc hoạt tính ức chế IL-1β và kích thích IL-10 của các hợp chất phân lập từ Niệt dó trên tế bào RAW264.7 95
Hình 3.29. Ảnh hưởng của một số hợp chất phân lập từ cành và lá Niệt dó đến khả năng sống sót của tế bào RAW 264.7.....98
Hình 3.30. Hoạt tính ức chế IL-1β và kích thích IL-10 của một số hợp chất 99
Hình 3.31. Ảnh hưởng của một số hợp chất phân lập từ cành và lá Niệt dó đến khả năng sống sót của tế bào T CD4+.....101
Hình 3.32. Hoạt tính ức chế sản sinh INF-γ của một số hợp chất.....102
Hình 3.33. Hoạt tính ức chế sản sinh IL-17 của một số hợp chất phân lập từ Niệt dó103
Hình 3.34. Hoạt tính ức chế Foxp3 của một số hợp chất phân lập được từ Niệt dó ...105
Hình 4.1. Cấu trúc hóa học của các hợp chất phân lập được từ Niệt dó 110

ĐẶT VẤN ĐỀ

Việt Nam nằm trong khu vực khí hậu nhiệt đới gió mùa, sở hữu dải địa hình trải dài gần 15 vĩ độ Bắc – Nam, tạo điều kiện thuận lợi cho hệ thực vật phát triển đa dạng, đặc biệt là nguồn tài nguyên cây thuốc phong phú. Nhiều loài dược liệu quý đã và đang được nghiên cứu, khai thác và ứng dụng rộng rãi, qua đó đóng góp tích cực vào công tác chăm sóc sức khỏe cộng đồng cũng như phát triển kinh tế địa phương. Bên cạnh đó, một số loài thảo dược mang giá trị tiềm năng vẫn chưa nhận được sự quan tâm và nghiên cứu thỏa đáng để có thể khai thác và ứng dụng một cách hiệu quả.

Loài Niệt dó (*Wikstroemia indica* (L.) C.A.Mey.) thuộc họ Trầm (Thymelaeaceae), là cây bụi nhỏ mọc hoang tại nhiều vùng trung du, miền núi ở Việt Nam. Theo y học dân gian, vỏ rễ và vỏ thân của cây thường dùng để chữa viêm hạch, hen suyễn, ho gà, viêm amidan, viêm tuyến mang tai; lá tươi dùng ngoài chữa nhọt, sưng tấy, vết thương, rắn cắn [1], [2]. Các công trình nghiên cứu trong và ngoài nước đã cho thấy Niệt dó chứa đa dạng các nhóm chất như flavonoid, biflavonoid, coumarin, lignan, acid béo, với nhiều hợp chất lần đầu tiên phân lập được trong tự nhiên. Về tác dụng dược lý, một số báo cáo khoa học cũng cho thấy cao chiết và các hợp chất tinh khiết từ Niệt dó thể hiện hoạt tính sinh học phong phú như kháng viêm, chống dị ứng, độc tế bào, chống ung thư, kháng HIV…[3], [4]. Những công dụng theo Y học cổ truyền và tác dụng sinh học của Niệt dó có mối liên quan mật thiết đến quá trình viêm và hoạt động điều hoà miễn dịch của cơ thể. Trong khi đó, phần lớn những nghiên cứu trước đây về Niệt dó tập trung vào các tín hiệu viêm kinh điển trong mô hình đại thực bào, việc nghiên cứu về các tác động lên các dòng tế bào miễn dịch chuyên biệt thông qua các cytokin tiền viêm và yếu tố điều hòa miễn dịch tế bào còn hạn chế [4], [5], [6].

Ngày nay, những nghiên cứu về các tác nhân điều hòa và tăng cường miễn dịch mới là một hướng đi đầy triển vọng nhằm hỗ trợ, phòng và điều trị các bệnh liên quan đến viêm mạn tính, các bệnh tự miễn và ung thư [7], [8]. Bên cạnh đó, kết quả sàng lọc hoạt tính sinh học kháng ung thư và điều hòa miễn dịch của một số của cây dược liệu ở Việt Nam trong Đề tài Nghị định thư Việt Nam – Hàn Quốc (2019–2022) "**Nghiên cứu hoạt tính kháng ung thư và điều hòa miễn dịch của một số cây thuốc ở Việt Nam**" (Mã số: 09/2020/HĐ-NĐT) đã xác định Niệt dó là ứng viên tiềm năng cho các nghiên cứu tiếp theo về tác dụng điều hòa miễn dịch.

Từ thực trạng nêu trên, nhằm góp phần bổ sung những minh chứng cho tác động sinh học dựa trên cơ sở khoa học hóa thực vật – dược lý; làm rõ giá trị khai thác và sử dụng loài Niệt dó như một cây dược liệu, luận án "**Nghiên cứu thành phần hoá học và tác dụng theo hướng điều hòa miễn dịch, chống viêm *in vitro* của cành, lá loài Niệt dó (*Wikstroemia indica* (L.) C.A.Mey.)**" được thực hiện với hai mục tiêu chính:

1. Chiết xuất, phân lập và xác định được cấu trúc hóa học của một số hợp chất từ cành và lá của loài Niệt dó theo định hướng tác dụng sinh học.

2. Sàng lọc và đánh giá hoạt tính *in vitro* trên một số cytokin liên quan đến viêm và miễn dịch của các chất tiềm năng từ cành và lá Niệt dó.

Để đạt được 2 mục tiêu trên đề tài đã thực hiện một số nội dung sau:

1. Về thành phần hóa học:

- Chiết xuất cao toàn phần và cao các phân đoạn từ cành và lá của Niệt dó.

- Phân lập và xác định cấu trúc các hợp chất từ các phân đoạn tiềm năng của cành và lá Niệt dó.

2. Về tác dụng sinh học:

- Sàng lọc hoạt tính của cao tổng, cao chiết các phân đoạn và các hợp chất từ cành và lá Niệt dó trên sản sinh IL-1β và IL-10.

- Đánh giá hoạt tính *in vitro* của một số chất tiềm năng từ cành và lá Niệt dó đối với ức chế sản sinh IL-1β và kích thích sản IL-10 trên mô hình đại thực bào RAW 264.7 được kích thích bằng LPS.

- Đánh giá hoạt tính *in vitro* của một số chất tiềm năng từ cành và lá Niệt dó lên ức chế biểu hiện của yếu tố phiên mã Foxp3 và một số cytokin liên quan đến viêm và miễn dịch trên dòng tế bào T CD4+ được kích thích bằng LPS.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN

1.1. TỔNG QUAN VỀ LOÀI NIỆT DÓ

1.1.1. Thực vật học

1.1.1.1. Vị trí phân loại

Niệt dó còn gọi với một số tên khác là Niệt dó Ấn độ, Dó miết Ấn, Dó chuột, Dó cánh, Gió móc, Héo, Cam toại nam, Liễu kha vương [9], có tên khoa học là *Wikstroemia indica* (L.) C.A.Mey. synonym: *Daphne cannabina* Lour., *W. viridiflora* Meisn., *W. indica* var. *viridiflora* Hook.f. [10].

Theo hệ thống phân loại của Armen Takhtajan công bố năm 2009 và một số tác giả khác [9], [10], [11], loài Niệt dó thuộc:

Ngành: Ngọc lan (Magnoliophyta)

Lớp: Ngọc lan (Magnoliopsida)

Bộ: Trầm (Thymelaeales)

Họ: Trầm (Thymelaeaceae)

Chi: *Wikstroemia* Endl.

Trên thế giới, chi *Wikstroemia* Endl. là một chi nhỏ gồm 55 – 70 loài cây bụi có hoa và cây nhỏ trong họ Thymelaeaceae. Ở Việt Nam, chi này có 7 loài: *W. androsaemifolia* Decne., *W. cochinchinensis* Phamh., *W. indica* (L.) C.A.Mey., *W. dolichantha* Diels, *W. meyeniana* Warb., *W. nutans* Champ. ex Benth. và *W. poilanei* Leandri [9], [10].

1.1.1.2. Đặc điểm thực vật

Niệt dó là cây bụi, mọc sum suê, quanh năm xanh tươi, cao 0,3 – 1,0 m, mang nhiều cành gầy, màu đỏ nhạt, nhiều khi mọc đối, có những sẹo lá nổi rõ lên. Lá mọc đối, phiến lá mỏng, hình trứng thuôn, dài 3 – 4 cm, rộng 1 – 2 cm, hai đầu tù hay hơi nhọn, hai mặt nhẵn, mặt trên màu lục sẫm, mặt dưới nhạt; cuống rất ngắn. Hoa màu vàng lục mọc thành chùm ở đầu cành hay thành bông rất ngắn (0,5 – 1 cm). Cuống hoa dài 1 – 2 mm. Đài màu xanh lá, hình ống hơi phình ở họng, chia 4 răng dài ngắn không đều; tràng 0; nhị 8, xếp thành 2 hàng dọc trên ống đài, chỉ nhị rất ngắn; bầu có 1 ô, có ít lông ở đỉnh. Quả mọng hình trứng, kèm theo vết tích của bao hoa, khi chín màu đỏ tươi, phần cơm hơi dầy. Hạt có vỏ mỏng và mềm, vỏ trong cứng và đen nhạt. Mùa hoa: tháng 5 – 9. Mùa quả: tháng 8 – 11 [1], [9], [10].

1.1.1.3. Phân bố

Ở Việt Nam, cây mọc hoang khắp nơi núi rừng, bụi bờ, từ vùng núi thấp đến các tỉnh Trung du Bắc Bộ và Bắc Trung Bộ [9].

Trên thế giới, cây mọc nhiều ở đồi, núi đá dốc, nơi có nhiều cây bụi, độ cao dưới 1500 m. Phân bố chủ yếu ở Trung Quốc (Phúc Kiến, Quảng Đông, Quảng Tây, Quý Châu, Hải Nam, Hồ Nam, Tứ Xuyên, Đài Loan, Vân Nam, Chiết Giang), Ấn Độ, Malaysia, Myanma, Philippin, Thái Lan, Úc, quần đảo phía đông, nam Thái Bình Dương, Mauritius, Sri Lanka [10].

1.1.2. Thành phần hóa học

Thành phần hóa học trong các bộ phận khác nhau của Niệt dó (thân, rễ và lá) rất đa dạng, bao gồm nhiều nhóm hợp chất như flavonoid, biflavonoid, coumarin, lignan… Qua tổng hợp và phân tích các tài liệu đã công bố, đã ghi nhận 129 hợp chất là các chất chuyển hóa thứ cấp được phân lập và xác định cấu trúc từ loài Niệt dó.

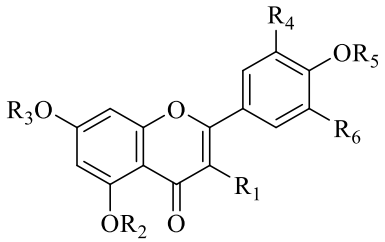
1.1.2.1. Flavonoid

Cho đến nay, đã có 14 hợp chất thuộc nhóm flavonoid (1–14) được tìm thấy ở các bộ phận khác nhau của Niệt dó bao gồm lá, thân và rễ (**Bảng 1.1** và **Hình 1.1**). Các flavonoid này đều thuộc nhóm euflavonoid (flavonon và flavononol).

Bảng 1.1. Các hợp chất flavonoid phân lập từ Niệt dó

STT	Tên chất	Bộ phận	TLTK
1	Tricin **(1)**	Vỏ thân, rễ	[12], [13]
2	Genkwanin **(2)**	Thân rễ	[12], [14]
3	Thevetiaflavon **(3)**	Thân rễ	[15]
4	Ombuin **(4)**	Thân rễ	[16]
5	Quercetin **(5)**	Vỏ thân	[17]
6	Kaempferol **(6)**	Lá	[14], [18]
7	Apigenin **(7)**	Vỏ thân	[19]
8	Kaempferol-3-*O*-*β*-D-glucopyranosid **(8)**	Vỏ rễ	[13]
9	Yuankanin **(9)**	Thân rễ	[17], [20]
10	Quercitrin **(10)**	Vỏ thân	[5], [17]
11	Kaempferol 3-rutinosid **(11)**	Vỏ thân	[17]
12	Myricitrin **(12)**	Vỏ rễ	[21]
13	Rutin **(13)**	Vỏ rễ	[21]
14	Isorhamnetin-3-*O*-robinosid **(14)**	Thân rễ	[22]

Trong cấu trúc của các flavonoid phân lập từ Niệt dó, các nhóm thế tại vị trí C-3 và C-5 thường là hydroxyl hoặc glycosyl. Ngược lại, các vị trí C-7, C-3′, C-4′ và C-5′ chủ yếu mang nhóm hydroxyl, một số hợp chất có sự methoxy hóa tại các vị trí này. Flavonoid trong cây có thể tồn tại ở dạng aglycon hoặc glycosid; phần đường có thể là đường đơn hoặc đường đôi, bao gồm glucopyranosyl, rhamnopyranosyl hoặc xylosyl, liên kết với phần aglycon thông qua liên kết *O*-glycosid.



	R_1	**R_2**	**R_3**	**R_4**	**R_5**	**R_6**
1	H	H	H	OCH_3	H	OCH_3
2	H	H	CH_3	H	H	H
3	H	CH_3	H	H	H	H
4	OH	H	CH_3	H	CH_3	OH
5	OH	H	H	OH	H	H
6	OH	H	H	H	H	H
7	H	H	H	H	H	H
8	OGlc	H	H	H	H	H
9	H	OGlc(1←6)Xyl	CH_3	H	H	H
10	ORha	H	H	H	H	OH
11	OGlc(1←6)Rham	H	H	H	H	H
12	ORha	H	H	OH	H	OH
13	OGlc(1←6)Rham	H	H	OH	H	H
14	OGal (1←6)Rham	H	H	OMe	H	H

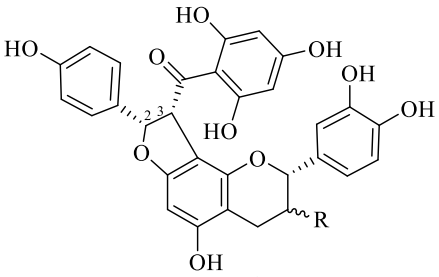
Hình 1.1. Cấu trúc hóa học của các hợp chất flavonoid phân lập từ Niệt dó

1.1.2.2. Biflavonoid

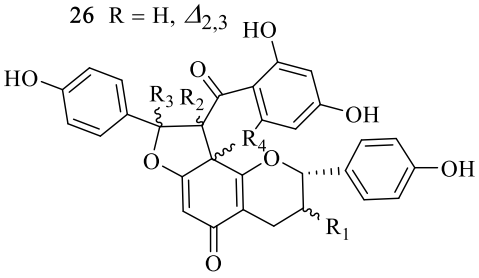
Biflavonoid là thành phần hóa học đặc trưng và phần lớn chúng được tìm thấy trong rễ Niệt dó, nhiều trong số chúng được phát hiện lần đầu tiên trong tự nhiên. Cho đến nay, các công bố trong và ngoài nước cho thấy có 28 biflavonoid (**15**–**42**) đã được phân lập và xác định cấu trúc từ loài cây này (**Bảng 1.2** và **Hình 1.2**).

Bảng 1.2. Các hợp chất biflavonoid phân lập từ Niệt dó

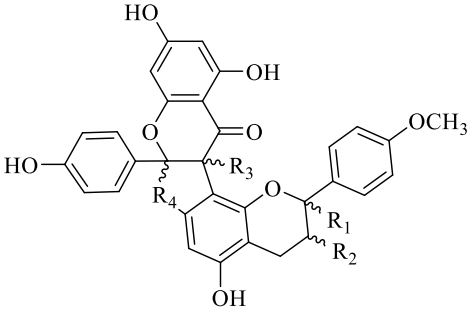
STT	Tên chất	Bộ phận	TLTK
1	Daphnodorin B (**15**)	Thân rễ và vỏ rễ	[23]
2	Daphnodorin C (**16**)	Thân rễ	[23]
3	Daphnodorin D1 (**17**)	Thân rễ	[23], [24]
4	Daphnodorin D2 (**18**)	Thân rễ	[23], [24]
5	Daphnodorin G (**19**)	Thân rễ	[23]
6	Daphnodorin H (**20**)	Thân rễ	[23]
7	Daphnodorin M (**21**)	Thân rễ	[24]
8	Daphnodorin J (**22**)	Thân rễ	[23]
9	Dihydrodaphnodorin B (**23**)	Vỏ rễ	[25]
10	Genkwanol A (**24**)	Thân rễ	[26]
11	Genkwanol B (**25**)	Thân rễ	[23]
12	3′-Hydroxydaphnodorin A (**26**)	Thân rễ	[23]
13	4′-Methoxydaphnodorin D1 (**27**)	Thân rễ	[24]
14	4′-Methoxydaphnodorin D2 (**28**)	Thân rễ	[24]
15	4′-Methoxydaphnodorin E (**29**)	Thân rễ	[27]
16	Stelleranol (**30**)	Thân rễ	[23]
17	Wikstrol A (**31**)	Rễ và vỏ rễ	[24], [26]
18	Wikstrol B (**32**)	Thân rễ	[24], [26]
19	Wikstaiwanon A (**33**)	Thân rễ	[23], [28], [22]
20	Wikstaiwanon B (**34**)	Thân rễ	[23], [28], [22]
21	Wikstroflavon A (**35**)	Thân rễ	[28]
22	Wikstroflavon B (**36**)	Thân rễ	[29]
23	Chamaejasmenin A (**37**)	Thân, vỏ thân và rễ	[19], [30]
24	Neochamaejasmin A (**38**)	Thân rễ	[24]
25	Sikokianin A (**39**)	Thân rễ	[31], [32]
26	Sikokianin B (**40**)	Thân rễ	[31], [33], [34]
27	Sikokianin C (**41**)	Thân rễ	[23], [33], [34]
28	Sikokianin D (**42**)	Thân rễ	[31]



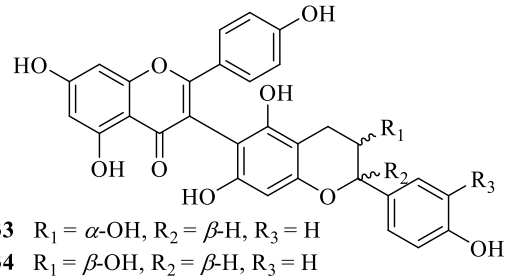
15 R = β-OH, $\Delta_{2,3}$
22 R = H
23 R = β-OH
26 R = H, $\Delta_{2,3}$



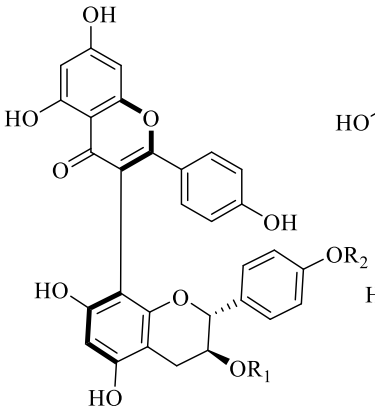
21 R_1 = H, R_2 = β-OH, R_3 = α-H, R_4 = α-O
25 R_1 = β-OH, R_2 = β-OH, R_3 = α-H, R_4 = α-O
30 R_1 = β-OH, R_2 = α-OH, R_3 = β-H, R_4 = β-O



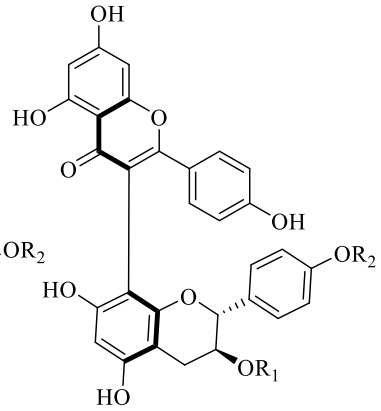
19 R_1 = α-H, R_2 = α-OH, R_3 = β-OH, R_4 = α-O
20 R_1 = α-H, R_2 = α-OH, R_3 = α-OH, R_4 = β-O
29 R_1 = β-H, R_2 = H, R_3 = α-OH, R_4 = α-O



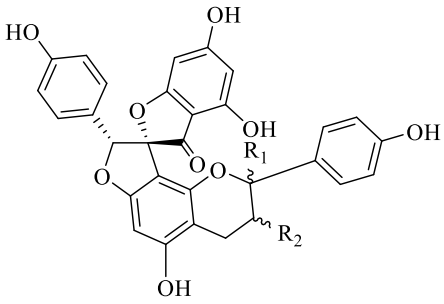
33 R_1 = α-OH, R_2 = β-H, R_3 = H
34 R_1 = β-OH, R_2 = β-H, R_3 = H
35 R_1 = β-OH, R_2 = α-H, R_3 = OH
36 R_1 = β-OH, R_2 = β-H, R_3 = OH



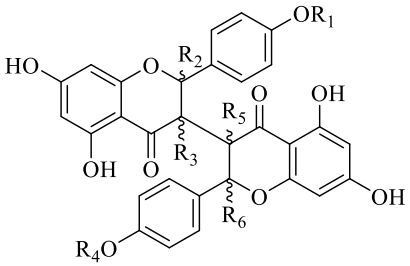
17 R_1 = H, R_2 = H
27 R_1 = H, R_2 = CH_3
31 R_1 = OH, R_2 = H



18 R_1 = H, R_2 = H
28 R_1 = H, R_2 = CH_3
32 R_1 = OH, R_2 = H



16 R_1 = α-H R_2 = H
24 R_1 = β-H R_2 = β-OH



37 R_1 = R_4 = CH_3, R_2 = R_5 = α-H, R_3 = R_6 = β-H
38 R_1 = R_4 = H, R_2 = β-H, R_3 = R_5 = R_6 = β-H
39 R_1 = R_4 = H, R_2 = R_3 = α-H, R_5 = R_6 = β-H
40 R_1 = R_4 = CH_3, R_2 = β-H, R_3 = R_5 = R_6 = α-H
41 R_1 = R_4 = CH_3, R_2 = β-H, R_3 = β-H, R_5 = R_6 = α-H
42 R_1 = CH_3, R_2 = R_5 = β-H, R_3 = R_6 = α-H

Hình 1.2. Cấu trúc hóa học của các hợp chất biflavonoid phân lập từ Niệt dó

1.1.2.3. Coumarin

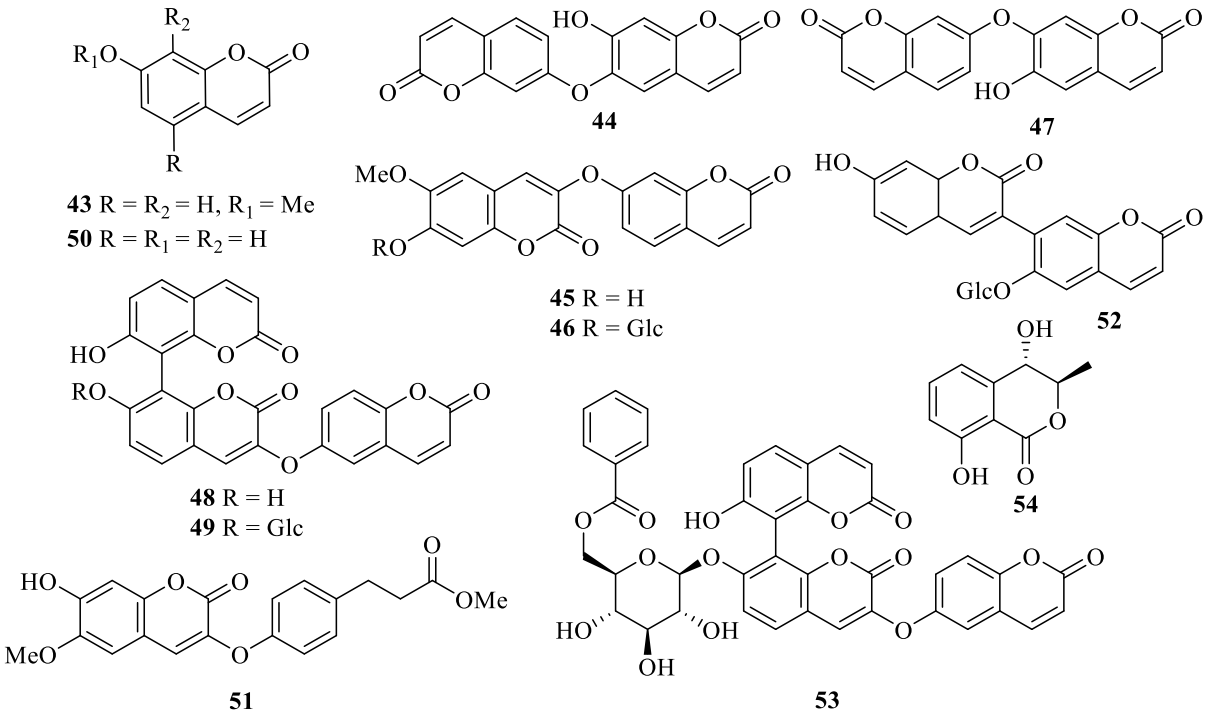
Coumarin được tìm thấy chủ yếu trong vỏ thân và vỏ rễ của Niệt dó. Số lượng của các coumarin đã được tìm thấy trong loài này chỉ với 12 hợp chất (**43**–**54**), tuy nhiên, chúng có cấu trúc đa dạng từ các coumarin đơn giản đến các tricoumarin và có thể tồn tại ở dạng tự do hoặc gắn thêm mạch đường (**Bảng 1.3** và **Hình 1.3**).

Bảng 1.3. Các hợp chất coumarin phân lập từ Niệt dó

STT	Tên chất	Bộ phận	TLTK
1	Ayapanin (**43**)	Thân rễ	[35]
2	Daphnogitin (**44**)	Thân rễ	[35]
3	Daphnoretin (**45**)	Rễ, vỏ rễ	[12], [13], [19], [21], [25], [22], [35], [36], [37], [26]
4	Daphnoretin-7-*O*-*β*-D-glucopyranosid (**46**)	Vỏ rễ và vỏ thân	[17], [25]
5	6′-Hydroxy-7-*O*-7′-dicoumarin (**47**)	Vỏ thân	[12]
6	Triumbelletin (**48**)	Thân rễ	[22]
7	Triumbelletin-7-*O*-*β*-D-glucopyranosid (**49**)	Thân rễ	[28]
8	Umbelliferon (**50**)	Rễ, thân và phần trên mặt đất	[5], [12], [19], [20], [35]
9	Wikstrocoumarin (**51**)	Rễ, thân và phần trên mặt đất	[5], [20], [26]
10	Wikstrorin A (**52**)	Vỏ rễ	[25]
11	Wikstrorin B (**53**)	Vỏ rễ	[25]
12	(3*R*,4*S*)-4-Hydroxymellein (**54**)	Thân rễ	[20]

Các dicoumarin chiếm khoảng một nửa trong số các coumarin phân lập được từ loài cây này. Về cấu trúc, dicoumarin gồm hai đơn vị C_6-C_3 liên kết qua cầu oxy (*C*–*O*–*C*) hoặc liên kết trực tiếp (*C*–*C*), tiêu biểu là hợp chất wikstrocoumarin (**52**). Trong số các coumarin, daphnoretin (**45**) là dicoumarin chính trong cây, với hàm lượng chiết được trong vỏ rễ chiếm 0,218% so với khối lượng dược liệu khô [38].

Tricoumarin trong Niệt dó là các dẫn xuất của triumbelletin (**48**), được Shao Meng và cs phân lập từ rễ năm 2014 [22]. Năm 2018, nhóm tác giả này đã tiếp tục phân lập được từ rễ loài này hợp chất triumbelletin-7-*O*-*β*-D-glucopyranosid (**49**), một hợp chất mới trong tự nhiên với cấu trúc triumbelletin có gắn thêm mạch đường [28].



Hình 1.3. Cấu trúc hóa học của các hợp chất coumarin phân lập từ Niệt dó

1.1.2.4. Lignan

Lignan là thành phần phổ biến trong Niệt dó và phần lớn được phân lập từ rễ cây, một số từ vỏ thân cây. Số lượng các lignan đã và đang được phát hiện trong loài này ngày càng nhiều. Cho đến nay, đã có 42 lignan được phân lập và xác định cấu trúc từ Niệt dó bởi các nhà khoa học trong và ngoài nước (**Bảng 1.4** và **Hình 1.4–1.7**).

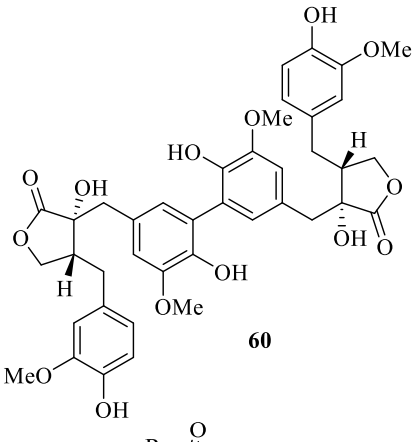
Bảng 1.4. Các hợp chất lignan phân lập từ Niệt dó

STT	Tên chất	Bộ phận	TLTK
Dẫn xuất khung dibenzylbutyrolacton			
1	(+)-Arctigenin (**54**)	Rễ và thân cây	[19],[35], [39], [40]
2	(–)-Arctigenin (**55**)	Thân rễ	[20]
3	Bis-5,5′-(+)-Matairesinol (**56**)	Thân rễ	[39]
4	Bis-5′,5′-(+)-Matairesinol (**57**)	Thân rễ	[39]
5	Bis-5,5-nortrachelogenin (**58**)	Thân rễ	[39], [41]
6	Bis-5,5′-nortrachelogenin (**59**)	Thân rễ	[39], [41]
7	Bis-5′,5′-nortrachelogenin (**60**)	Thân rễ	[42]
8	(+)-Hinokinin (**61**)	Thân rễ	[35]

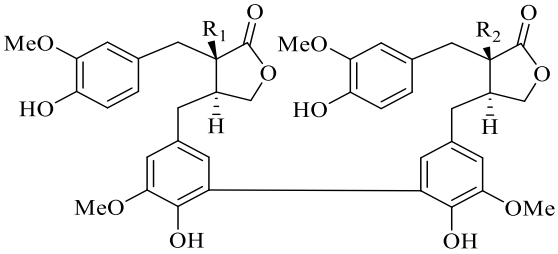
STT	Tên chất	Bộ phận	TLTK
9	2-Hydroxy-2-(3′,4′-dihydroxyphenyl)methyl-3-(3″,4″-dimethoxyphenyl) methyl-γ-butyrolacton (**62**)	Thân rễ	[39]
10	(–)-7′-Hydroxymatairesinol (**63**)	Thân rễ	[39]
11	(+)-Kusunokinin (**64**)	Thân rễ	[35]
12	(+)-Matairesinol (**65**)	Rễ và thân cây	[19],[22], [35], [39]
13	5-(5″-Matairesinol)nortrachelogenin (**66**)	Thân rễ	[39], [42]
14	5-(5‴-Matairesinol)nortrachelogenin (**67**)	Thân rễ	[39], [42]
15	Wikstromol (**68**)	Rễ và thân cây	[13],[26], [22],[35], [43], [41]
16	(–)-Nortrachelogenin (**69**)	Thân rễ	[20], [39]
17	5-*O*-(4″-Nortrachelogenin)nortrachelogenin (**70**)	Thân rễ	[42]
18	(+)-Nortrachelosid (**71**)	Vỏ rễ	[25]
19	(–)-Nortrachelosid (**72**)	Rễ, vỏ rễ	[25], [41]
20	(+)-Trachelogenin (**73**)	Thân rễ	[35]
21	(–)-Trachelogenin (**74**)	Thân rễ	[39]
22	Wikstronin A (**75**)	Thân rễ	[39]
23	Wikstronin B (**76**)	Thân rễ	[39]
Dẫn xuất 7′,9-epoxy-8,8′-lignan			
24	Acetylwikstresinol (**77**)	Thân rễ	[39]
25	Ciwujiaton (**78**)	Thân rễ	[22]
26	(+)-Lariciresinol (**79**)	Vỏ thân, phần trên mặt đất	[5], [36]
27	(+)-5′-Methoxylariciresinol (**80**)	Thân rễ	[39]
28	Wikstresinol (**81**)	Thân rễ	[39]
Dẫn xuất khung furofuran			
29	(+)-Epipinoresinol (**82**)	Thân rễ	[39]
30	(+)-Pinoresinol (**83**)	Thân rễ	[22], [39]
31	(+)-Pinoresinol-4-*O*-β-D-glucopyranosid (**84**)	Thân rễ	[20]
32	(–)-Pinoresinol (**85**)	Thân rễ	[35]
33	Salicifoliol (**86**)	Thân rễ	[35]

STT	Tên chất	Bộ phận	TLTK
34	(+)-Syringaresinol ((+)-Lirioresinol B) (**87**)	Rễ và phần trên mặt đất	[5], [22], [35], [41]
Dẫn xuất khung benzofuran			
35	Balanophonin (**88**)	Thân rễ	[39]
36	Dehydrodiconiferyl alcohol (**89**)	Thân rễ	[39]
37	2-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-hydroxymethyl-5-(3-methoxyallyl)-7-methoxyco-umaran (**90**)	Thân rễ	[39]
38	Ficusal (**91**)	Thân rễ	[39]
Dẫn xuất tetrahydronaphthalen			
39	(+)-Isolariciresinol (**92**)	Thân rễ	[22]
Dẫn xuất neolignan			
40	Diospyrosin (**93**)	Rễ	[39]
41	*Erythro*-guaiacylglycerol-*β*-coniferyl ether (**94**)	Phần trên mặt đất	[5]
Dẫn xuất secolignan			
42	(–)-Secoisolariciresinol (**95**)	Rễ và vỏ thân	[36], [39]

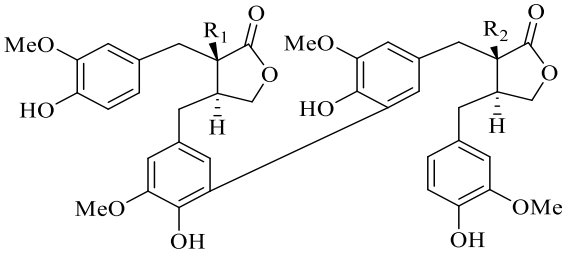
Các lignan được phát hiện trong Niệt dó phần lớn chứa các trung tâm carbon bất đối, do đó thường tồn tại dưới dạng các đồng phân quang học, tương tự như nhóm biflavonoid. Trong số các lignan đã được xác định, nhóm có khung dibenzylbutyrolacton chiếm ưu thế với hơn một nửa tổng số lignan được phân lập (**54**–**76**). Các hợp chất thuộc nhóm này chủ yếu được tìm thấy ở thân rễ, tồn tại ở dạng monomer hoặc dimer, phần lớn là aglycon, tuy nhiên, một số ít dẫn xuất glycosid cũng đã được ghi nhận. Ngoài ra, các lignan có khung 7′,9-epoxy-8,8′-lignan, đặc trưng bởi cầu nối epoxy giữa C-9 và C-7′ cùng liên kết 8–8′ giữa hai đơn vị phenylpropanoid, cũng đã được phát hiện với số lượng hạn chế (**77**–**81**) trong đó, có một số hợp chất được xác định là mới trong tự nhiên. Bên cạnh đó, các lignan mang khung furofuran (**82**–**87**) và khung benzofuran (**88**–**91**) được ghi nhận với số lượng ít hơn, tìm thấy chủ yếu ở thân rễ Niệt dó. Một số dẫn xuất thuộc các nhóm cấu trúc này tồn tại ở cả dạng aglycon và glycosid, cho thấy sự đa dạng về kiểu cấu trúc và mức độ oxy hóa của nhóm lignan trong loài này. Ngoài ra, còn có một hợp chất thuộc dẫn xuất tetrahydronaphthalen (**92**) được phân lập từ rễ Niệt dó. Bên cạnh các khung thuộc lớp lignan cổ điển, Niệt dó còn chứa một số lignan thuộc phân lớp neolignan (**93** và **94**) và seco-lignan (**95**) với số lượng hạn chế.



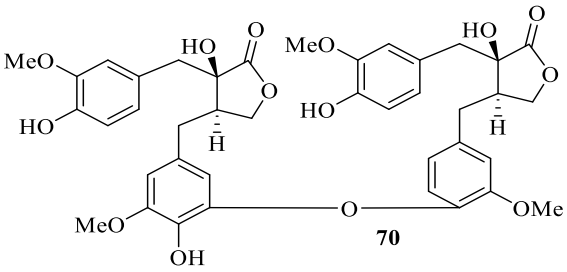
60



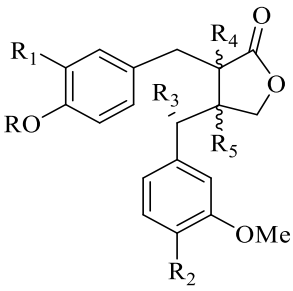
57: $R_1 = R_2 = H$
58: $R_1 = R_2 = OH$
66: $R_1 = OH, R_2 = H$



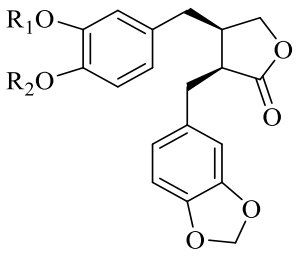
56: $R_1 = R_2 = H$
59: $R_1 = R_2 = OH$
67: $R_1 = OH, R_2 = H$



70

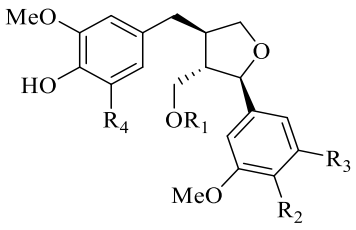


	R	R1	R2	R3	R4	R5
54	H	OMe	OMe	H	*β*-H	α-H
55	H	OMe	OMe	H	α-H	*β*-H
62	H	OH	OMe	H	*β*-OH	α-H
63	H	OMe	OH	OH	α-H	*β*-H
65	H	OMe	OH	H	*β*-H	α-H
68	H	OMe	OH	H	*β*-OH	α-H
69	H	OMe	OH	H	α-OH	α-H
71	Glc	OMe	OH	H	*β*-OH	α-H
72	Glc	OMe	OH	H	α-OH	α-H
73	H	OMe	OMe	H	*β*-OH	*β*-H
74	H	OMe	OMe	H	α-OH	*β*-H
75	H	OMe	OH	OMe	α-OH	*β*-H
76	H	OMe	OH	OMe	*β*-OH	α-H



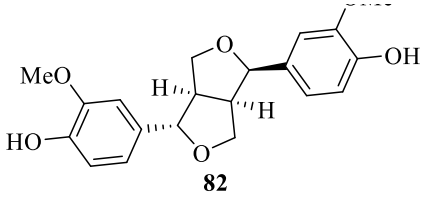
61: $R_1 + R_2 = CH_2, R_3 = H$
64: $R_1 + R_2 = OMe, R_3 = H$

Hình 1.4. Cấu trúc hóa học của các lignan khung dibenzylbutyrolacton phân lập từ Niệt dó

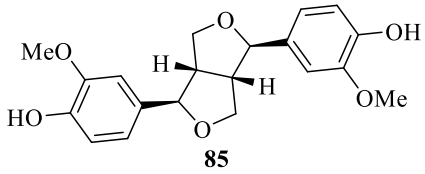


77 R_1 = Ac, R_2 = R_4 = H, R_3 = OH
78 R_1 = H, R_2 = OH, R_3 = R_4 = OH
79 R_1 = R_3 = R_4 = H, R_2 = OH
80 R_1 = R_4 = H, R_2 = OH, R_3 = OMe
81 R_1 = R_2 = R_4 = H, R_3 = OMe

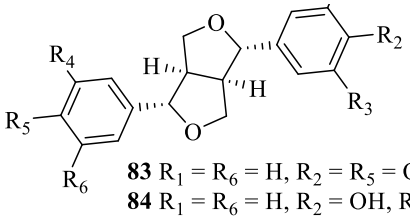
Hình 1.5. Cấu trúc hóa học của các dẫn xuất 7′,9-epoxy-8,8′-lignan phân lập từ Niệt dó



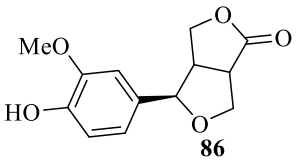
82



85

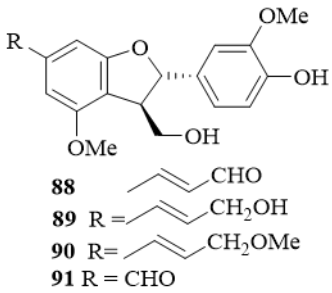


83 R_1 = R_6 = H, R_2 = R_5 = OH, R_3 = R_4 = OMe
84 R_1 = R_6 = H, R_2 = OH, R_3 = R_4= OMe, R_5 = OGlc
87 R_1 = R_3= R_4 = R_6 = OMe, R_2 = R_5 = OH

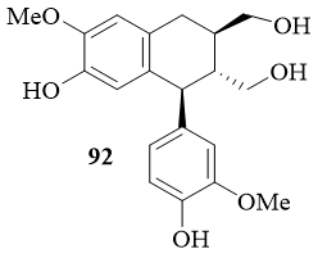


86

Hình 1.6. Cấu trúc hóa học của các lignan khung furofuran phân lập từ Niệt dó

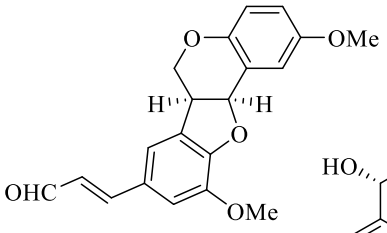


88
89 R = CH_2OH
90 R= CH_2OMe
91 R = CHO

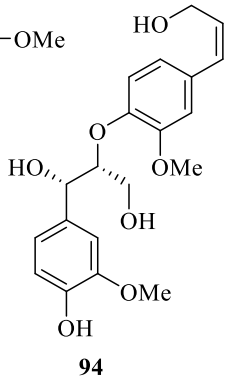


92

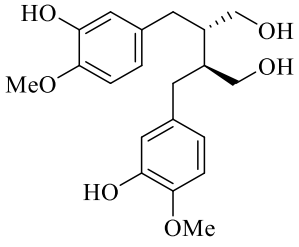
Hình 1.7. Cấu trúc hóa học của các lignan khung benzofuran và tetrahydronaphthalen phân lập từ Niệt dó



93



94



95

Hình 1.8. Cấu trúc hóa học của các neolignan secolignan phân lập từ Niệt dó

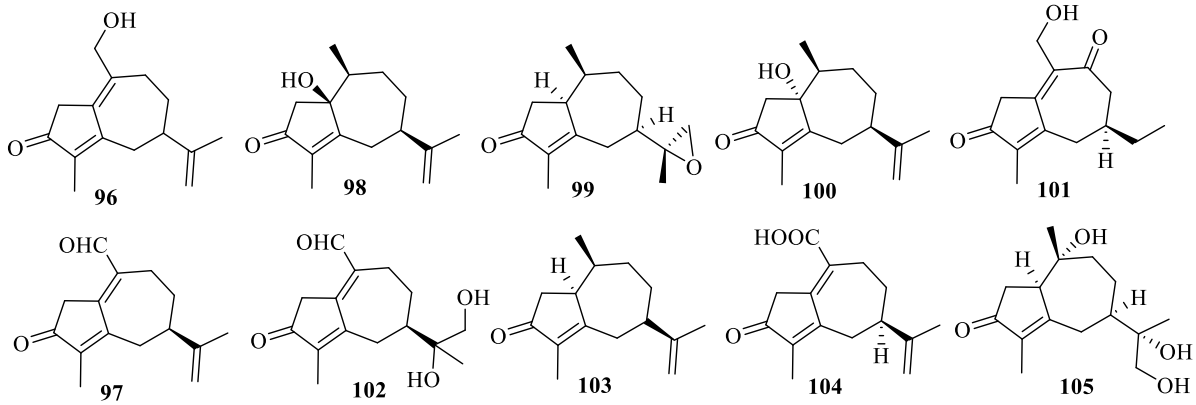
1.1.2.5. Sesquiterpen

Nhóm sesquiterpen được phân lập chủ yếu từ rễ Niệt dó với 10 hợp chất đã được ghi nhận (**96**–**105**). Nhiều hợp chất trong số này được xác định là mới trong tự nhiên,

cho thấy sự đa dạng về cấu trúc và tiềm năng hóa học đáng kể của loài. Về mặt cấu trúc, các sesquiterpen chủ yếu thuộc khung guaian và các dẫn xuất oxy hóa liên quan, góp phần mở rộng phổ cấu trúc của nhóm terpenoid trong Niệt dó (**Bảng 1.5** và **Hình 1.9**)

Bảng 1.5. Các hợp chất sesquiterpen phân lập từ Niệt dó

STT	Tên chất	Bộ phận	TLTK
1	Indicanon (**96**)	Rễ	[33]
2	Oleodaphnal (**97**)	Rễ	[33]
3	Wikstronon A (**98**)	Rễ	[44]
4	Wikstronon B (**99**)	Rễ	[44]
5	Wikstronon C (**100**)	Rễ	[44]
6	Wikstronon D (**101**)	Rễ	[44]
7	Wikstronon E (**102**)	Rễ	[44]
8	1*α*,7*α*,10*αH*-Guaia-4,11-dien-3-on (**103**)	Rễ	[35], [44]
9	Acid 4,10,11-guaiatrien-3-on-14-oic (**104**)	Rễ	[35]
10	Wikstrorin D (**105**)	Rễ	[25]



Hình 1.9. Cấu trúc hóa học của các sesquiterpen phân lập từ Niệt dó

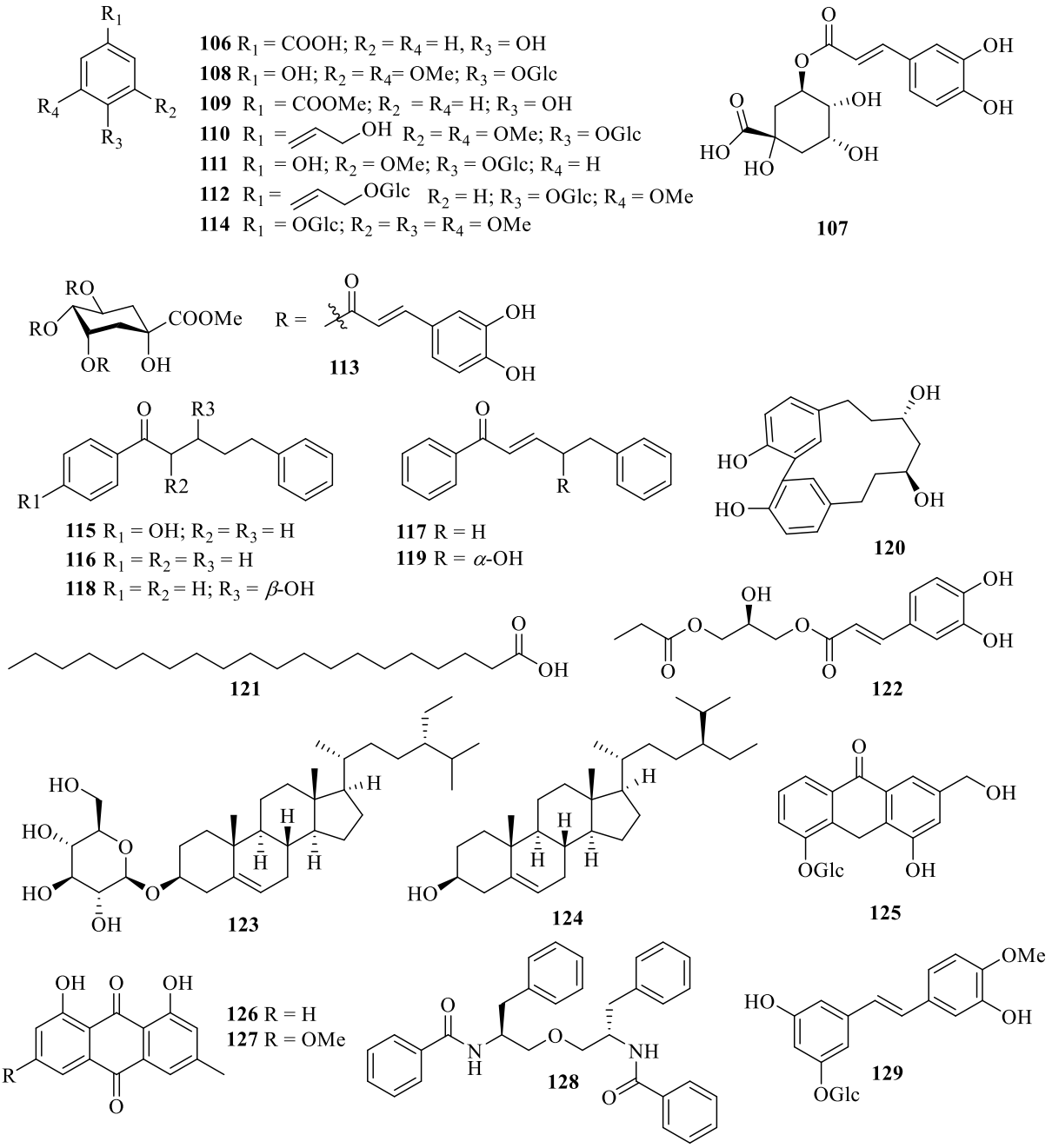
1.1.2.6. Các hợp chất khác

Ngoài các nhóm hợp chất kể trên, một số hợp chất khác như phenolic đơn giản, dẫn xuất của diphenylpentanon, diphenylheptanol, acid béo, các hợp chất sterol, anthranoid, amid và stilbenoid cũng đã được báo cáo (**Bảng 1.6** và **Hình 1.10**).

Bảng 1.6. Các hợp chất khác phân lập từ Niệt dó

STT	Tên chất	Bộ phận	TLTK
	Phenolic đơn giản		
1	Acid 4-hydroxybenzoic (**106**)	Thân rễ	[22]
2	Acid chlorogenic (**107**)	Thân rễ	[22]

STT	Tên chất	Bộ phận	TLTK
3	Leonurisid A (**108**)	Vỏ rễ	[25]
4	Methylparaben (**109**)	Thân rễ	[20]
5	Syringin (**110**)	Vỏ rễ	[25]
6	Tachinosid (**111**)	Vỏ rễ	[25]
7	*Trans*-isoconiferin (**112**)	Vỏ rễ	[25]
8	3,4,5-Tricaffeoylquinic acid methyl ester (**113**)	Thân rễ	[20]
9	3,4,5-Trimethoxyphenyl-*β*-D-glucopyranosid (**114**)	Vỏ rễ	[25]
Diphenylpentanon			
10	Daphnolon (**115**)	Rễ	[45]
11	1,5-Diphenyl-1-pentanon (**116**)	Rễ	[45]
12	1,5-Diphenyl-2-penten-1-on (**117**)	Rễ	[45]
13	(+)-3-Hydroxy-1,5-diphenyl-1-pentanon (**118**)	Rễ	[45]
14	4(*S*)-Hydroxy-1,5-diphenyl-2(*E*)-en-1-pentanon (**119**)	Rễ	[45]
Diphenylheptanol			
15	Alnusdiol (**120**)	Rễ	[22]
Acid béo và dẫn xuất			
16	Acid eicosanoic (**121**)	Vỏ rễ	[19]
17	Feruloylated acylglycerol (**122**)	Vỏ thân và lá	[46]
Sterol			
18	Daucosterol (**123**)	Vỏ thân	[12]
19	*β*-Sitosterol (**124**)	Vỏ thân	[12]
Anthranoid			
20	Aloe-emodin-8-*O*-*β*-D-glucopyranosid (**125**)	Rễ	[17], [19], [21], [22]
21	Chrysophanol (**126**)	Vỏ rễ và rễ	
22	Emodin-3-methyl ether (physcion) (**127**)	Vỏ rễ và vỏ thân	
Amid			
23	Anabellamid (**128**)	Vỏ thân	[17]
Stilbenoid			
24	Rhaponticin (**129**)	Rễ	[20]



Hình 1.10. Cấu trúc hóa học của các hợp chất khác phân lập từ Niệt dó

Ngoài các hợp chất đã được chiết xuất, phân lập và xác định cấu trúc trên, bằng phương pháp cất kéo hơi nước kết hợp với sắc ký khí khối phổ, Liang và cs (2005) đã xác định được trong tinh dầu Niệt dó có chứa 37 thành phần, trong đó có các thành chính là acid hexadecanoic, acid 9-octadecenoic, acid 9,12-octadecadienoic, acid 9-hexadecenoic, acid pentadecanoic, acid dodecanoic và acid decanoic [47].

1.1.3. Tác dụng sinh học

Các công trình nghiên cứu dựa trên mô hình dược lý học hiện đại cho thấy Niệt dó có một số tác dụng sinh học đáng chú ý như chống viêm, kháng khuẩn, kháng virus và kháng nấm, gây độc tế bào và một số tác dụng khác.

1.1.3.1. Tác dụng chống viêm

Cho đến nay, đã có nhiều bằng chứng cho thấy cao chiết và một số hợp chất phân lập từ Niệt dó có khả năng chống viêm hiệu quả trên cả mô hình *in vitro* và *in vivo*.

Trên mô hình *in vitro*, Wang L. Y. và cs (2005) đã tiến hành sàng lọc tác dụng chống viêm của các phân đoạn thu được từ cao methanol 80% của rễ Niệt dó. Tác dụng chống viêm được đánh giá thông qua khả năng ức chế sự sản sinh nitric oxid (NO) được kích thích bởi lipopolysaccharid (LPS) hoặc interferon-gamma (INF-γ) trên tế bào RAW 264.7. Kết quả cho thấy phân đoạn ethyl acetat thể hiện hoạt tính mạnh nhất. Từ phân đoạn này, nhóm tác giả đã phân lập được hợp chất indicanon (**96**) và đã đánh giá tác dụng chống viêm của hợp chất này thông qua ức chế sản sinh NO với giá trị IC_{50} = 9,3 µM [33]. Trong một nghiên cứu khác của Lu C. L. và cs (2012), cao ethanol 95% và các phân đoạn của vỏ rễ Niệt dó cũng cho thấy khả năng ức chế sự sản sinh NO do LPS gây ra trên tế bào RAW 264.7 ở các mức độ khác nhau, trong đó, phân đoạn ether dầu hỏa thể hiện tác dụng mạnh nhất với IC_{50} = 7,22 µg/mL [21]. Nghiên cứu của Liu Z. và cs đã phân lập được 05 dẫn xuất sesquiterpen từ rễ Niệt dó, bao gồm wikstronon A–E (**98**–**102**) và tiến hành đánh giá tác dụng chống viêm *in vitro* của các hợp chất này. Kết quả cho thấy wikstronon A (**98**) thể hiện khả năng ức chế sự sản sinh NO do LPS kích thích trên tế bào RAW 264.7 với giá trị IC_{50} = 41,3 ± 0,89 µM, tương đương với chất đối chứng dương indomethacin (IC_{50} = 39,7 ± 0,44 µM) [44]. Bên cạnh đó, Wang L. Y. và cs đã đánh giá tác dụng chống viêm của 5 hợp chất lignan được phân lập từ rễ Niệt dó. Kết quả cho thấy bis-5′,5′-(+)-matairesinol (**57**) thể hiện khả năng ức chế sự sản sinh NO mạnh nhất so với các hợp chất được thử nghiệm, với giá trị IC_{50} đạt 48,6 µM. Tuy nhiên, tác dụng chống viêm của hợp chất này vẫn thấp hơn đáng kể so với chất đối chứng dương NG-monomethyl-L-arginin (IC_{50}= 20,5 µM) [41].

Bảng 1.7. Tác dụng ức chế sản sinh NO trên dòng tế bào RAW 264.7 được kích thích bằng LPS của cao chiết và một số hợp chất phân lập từ Niệt dó

Phân đoạn	IC_{50} (µg/mL)	TLTK	Hợp chất	IC_{50} (µM)	TLTK	Hợp chất	IC_{50} (µM)	TLTK
Ethanol	70,87	[21]	**57**	48,6	[41]	**98**	41,3	[44]
Ether dầu hỏa	7,22	[21]	**59**	>200	[41]	**99**	>100	[44]
Ethyl acectat	40,19	[21]	**68**	>200	[41]	**100**	>100	[44]
n-Butanol	>100	[21]	**87**	53,5	[41]	**101**	97,5	[44]
Nước	>100	[21]	**96**	9,3	[33]	**102**	93,5	[44]

Trên mô hình *in vivo*, Lee S. Y. và cs (2020) đã nghiên cứu tác dụng của cao ethanol từ Niệt dó trên mô hình viêm da dị ứng gây ra bởi 2,4-dinitrochlorobenzen (DNCB) ở chuột. Sau 2 tuần bôi cao chiết ethanol lên da, chuột suy giảm miễn dịch nhạy cảm với DNCB cho thấy sự cải thiện rõ rệt các triệu chứng viêm da như ban đỏ, bong vảy và phù nề trên mô hình động vật thực nghiệm. Ở nồng độ 1%, cao chiết giúp cải thiện mức độ hydrat hóa da và làm giảm đáng kể sự mất nước qua biểu bì. Đồng thời, nồng độ IgE (Immunoglobulin E) và IL-4 (Interleukin-4) trong huyết thanh cũng giảm rõ rệt. Các kết quả này cho thấy Niệt dó có tiềm năng sử dụng như một tác nhân điều trị tại chỗ và hỗ trợ kiểm soát viêm da dị ứng tiếp xúc [6]. Jegal J. và cs (2020) đã đánh giá tác dụng chống viêm và chống dị ứng của các hợp chất phân lập từ Niệt dó trên dòng tế bào RBL-2H3 và trên mô hình chuột bị quá mẫn tiếp xúc do DNCB. Trong số tám hợp chất được phân lập, quercitrin (**10**) thể hiện hoạt tính chống dị ứng mạnh nhất thông qua việc ức chế sự giải phóng hexosaminidase do dị nguyên gây ra và làm giảm biểu hiện mRNA của IL-4. Sau khi chuột được ổn định trong 7 ngày, DNCB được bôi lên da, đơn lẻ hoặc kết hợp với pimecrolimus (1%) hoặc quercitrin (0,5%). Phân tích mô học của mô da lưng, đồng thời máu động mạch chủ bụng được lấy để xác định nồng độ IgE và IL-4 trong huyết thanh. Kết quả cho thấy quercitrin làm giảm đáng kể sự gia tăng IgE và IL-4 do DNCB gây ra, đồng thời hạn chế mất nước qua biểu bì. Những phát hiện này khẳng định tiềm năng của quercitrin trong điều trị các bệnh dị ứng và viêm da tiếp xúc dị ứng [5].

Ngoài các nghiên cứu *in vitro* và *in vivo*, Lu C. L. và cs (2020) đã sử dụng phương pháp dược lý mạng để dự đoán cơ chế chống viêm của các chất chiết từ Niệt dó. Mô hình nghiên cứu được xây dựng dựa trên sự tương tác giữa 39 hợp chất từ Niệt dó với

152 đích liên quan đến các bệnh viêm. Kết quả cho thấy các hợp chất này có khả năng tương tác chéo với nhiều đích sinh học quan trọng, trong đó, nhóm flavonoid được xác định đóng vai trò then chốt trong tác dụng chống viêm. Trên cơ sở dự đoán lý thuyết và so sánh với các thuốc chống viêm đang được sử dụng trên lâm sàng, Niệt dó cho thấy tiềm năng chống viêm tốt, đặc biệt là khả năng ức chế chọn lọc enzym cyclooxygenase (COX) [21].

1.1.3.2. Tác dụng chống oxy hóa

Cao tổng, cao phân đoạn và một số hợp chất phân lập từ Niệt dó cho thấy khả năng chống oxy hóa rõ rệt. Hoạt tính chống oxy hóa của Niệt dó được đánh giá thông qua nhiều mô hình khác nhau, bao gồm khả năng dọn gốc tự do 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), 2,20-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonic acid (ABTS), phosphomolybdenum (PBD), khả năng khử ion sắt (FRAP), khử ion đồng (II) (CUPRAC) và khả năng tạo phức chelat với kim loại (MCA). Theo Suroowan S. và cs (2023), cao methanol từ lá Niệt dó thể hiện hoạt tính chống oxy hóa mạnh nhất khi đánh giá bằng các phương pháp DPPH, ABTS, FRAP và CUPRAC, với các giá trị lần lượt là 188,38 ± 0,22; 421,31 ± 14,54; 397,10 ± 2,68 và 651,19 ± 16,90 mg TE/g. Cao nước có hoạt tính thấp hơn, với các giá trị tương ứng là 180,95 ± 1,11; 413,84 ± 8,81; 344,46 ± 3,31 và 445,91 ± 5,00 mg TE/g. Cao ethyl acetat cho thấy hoạt tính yếu nhất trên cả bốn phương pháp trên. Tuy nhiên, ở các mô hình MCA và PBD, cao ethyl acetat lại thể hiện hoạt tính cao nhất với giá trị lần lượt là 17,42 ± 0,46 và 3,11 ± 0,16 mg TE/g. Trong khi đó, khả năng tạo phức chelat kim loại của cao nước và cao methanol thấp hơn, lần lượt đạt 10,94 ± 0,39 và 10,32 ± 0,57 mg EDTAE/g [48]. Năm 2005, Wang L. Y. đã đánh giá hoạt tính chống oxy hóa của các hợp chất lignan phân lập từ rễ Niệt dó bằng phương pháp DPPH. Kết quả cho thấy các lignan (**52**), (**58)**, (**59**) và (**72**) đều có khả năng dọn gốc tự do. Trong đó, bis-5,5′-nortrachelogenin (**59**) thể hiện hoạt tính mạnh nhất với giá trị IC_{50} là 19,5 µM, cao hơn hoạt tính của chất đối chứng dương acid L-ascorbic (IC_{50} = 20,3 µM) [41].

1.1.3.3. Tác dụng kháng ung thư

Cho đến nay, nhiều nghiên cứu đã được công bố về tác dụng kháng ung thư của Niệt dó trên cả mô hình *in vitro* và *in vivo*. Một số nghiên cứu tập trung làm rõ cơ chế tác dụng chống ung thư của các cao chiết và hợp chất phân lập từ loài này, qua đó cho

thấy tiềm năng ứng dụng của Niệt dó trong việc phát triển các sản phẩm hỗ trợ điều trị ung thư.

Theo Sun L. X. và cs (2012), cao ethanol 95% từ rễ Niệt dó thể hiện tác dụng gây độc tế bào đối với hai dòng tế bào ung thư HeLa và SGC-7901 với giá trị IC_{50} lần lượt là 169,45 ± 2,81 μg/mL và 369,89 ± 5,46 μg/mL. Các cao phân đoạn ether dầu hỏa, cloroform và ethyl acetat cho thấy hoạt tính ức chế mạnh hơn đối với hai dòng tế bào này, với các giá trị IC_{50} dao động từ 63,66 đến 112,06 μg/mL. Ngoài ra các cao phân đoạn nhỏ thu được từ phân đoạn ethyl acetat cũng thể hiện hoạt tính gây độc tế bào với IC_{50} trong khoảng 41,86–107,41 μg/mL [19].

Ngoài cao chiết, các hợp chất phân lập từ Niệt dó cũng được sàng lọc hoạt tính gây độc tế bào ung thư. Nghiên cứu của Chang H. và cs (2017) đã đánh giá hoạt tính gây độc tế bào của các lignan phân lập từ rễ Niệt dó trên dòng tế bào ung thư tuyến tụy người PANC-1 thông qua chỉ số PC_{50} (nồng độ tại đó 50% tế bào ưu tiên bị tiêu diệt trong môi trường NDM, môi trường nghèo dinh dưỡng, mà không gây độc trong môi trường DMEM, môi trường giàu dinh dưỡng). Kết quả cho thấy các lignan thuộc nhóm dibenzylbutyrolacton có hoạt tính mạnh hơn các nhóm hợp chất khác. Đáng chú ý, các hợp chất có cấu hình tuyệt đối (8*R*,8*R*′) thể hiện hoạt tính mạnh hơn so với các hợp chất có cấu hình (8*S*,8*S*′) [39]. Năm 2018, Wang Q. R. và cs đã nghiên cứu hoạt tính gây độc tế bào của các oligophenol phân lập từ rễ Niệt dó trên các dòng tế bào ung thư biểu mô đại trực tràng (HCT116 và SW480) và u thần kinh đệm (T98G, U87), taxol được sử dụng làm đối chứng dương. Kết quả cho thấy các hợp chất (**33**), (**34**) và (**35**) có hoạt tính gây độc tế bào ở mức trung bình trên cả bốn dòng tế bào được khảo sát [28]. Ngoài ra, nghiên cứu của Liu Z. H. và cs (2021) cho thấy hợp chất daphnolon (**115**) có tác dụng gây độc tế bào mạnh đối với dòng tế bào ung thư phổi A549 với giá trị IC_{50} là 66,54 μM, tương đương với tác dụng của chất đối chứng dương cisplatin (IC_{50} = 63,28 μM) [45].

Một số hợp chất phân lập từ Niệt dó cũng được nghiên cứu về cơ chế chống ung thư. Wikstroflavon B (**36**) được chứng minh có tác dụng hiệp đồng với curcumin trong việc ức chế sự tăng sinh và di căn của các dòng tế bào ung thư biểu mô vòm họng người, bao gồm CNE1, CNE2, C666-1 và HONE1. Hỗn hợp curcumin và wikstroflavon B (CUR/WFB) làm thay đổi đáng kể biểu hiện của các gen liên quan đến tăng sinh tế bào (survivin, cyclin D1, p53, p21) và di căn tế bào (MMP-2, MMP-9, FAK), đồng thời ức

chế sự phosphoryl hóa của các protein FAK và STAT3. Khi tế bào được tiền xử lý bằng chất ức chế FAK, khả năng sống sót và di căn giảm rõ rệt, cho thấy vai trò trung tâm của con đường tín hiệu này trong tác dụng của hỗn hợp CUR/WFB [29]. Năm 2021, Yao H. và cs đã báo cáo rằng wikstromol (**68**) ở nồng độ 10 µM ức chế đáng kể sự tăng sinh của tế bào ung thư vú MDA-MB-231 trong thử nghiệm MTT. Hợp chất này gây cảm ứng quá trình apoptosis thông qua hoạt hóa caspase-3, giảm biểu hiện Bcl-2, tăng biểu hiện Bax, cắt PARP và phosphoryl hóa p53. Ở nồng độ thấp hơn (0,1 µM), wikstromol ức chế sự di chuyển của tế bào ung thư thông qua việc làm giảm hoạt tính của NF-κB và MMP-9, đồng thời ức chế con đường tín hiệu PI3K/Akt [49].

Bên cạnh các nghiên cứu *in vitro*, một số nghiên cứu về tác dụng kháng ung thư *in vivo* của cao chiết và chất tinh khiết cũng được báo cáo. Cao methanol từ thân cây Niệt dó ở liều 50 mg/kg/ngày cho thấy khả năng ức chế 97% sự phát triển của khối u cổ trướng Ehrlich ở chuột, đồng thời ức chế sự phát triển của bệnh bạch cầu dòng P-388 với tỷ lệ T/C đáng kể [13]. Hợp chất daphnoretin (**45**) cũng ức chế 97% sự phát triển của khối u cổ trướng Ehrlich ở liều 3 mg/kg/ngày. Ngoài ra, daphnoretin ở nồng độ 31,25 µg/mL gây ức chế 32,46% sự tăng sinh của dòng tế bào ung thư phổi A549 [21].

Bảng 1.8. Hoạt tính gây độc tế bào ung thư của các hợp chất phân lập từ Niệt dó

Hợp chất	Dòng tế bào	Hoạt tính (IC_{50}, µM)	TL TK	Hợp chất	Dòng tế bào	Hoạt tính (IC_{50}, µM)	TL TK
2	SGC-7901	162,1 ± 21,1	[19]	**37**	HepG2	29,2 ± 3,2	[19]
22	CNE2	13,8 ± 3,5	[23]		MCF-7	46,1 ± 1,5	
26	HepG2	65,5 ± 11,4		**41**	CNE2	11,6 ± 4,2	[23]
	CNE2	53,6 ± 10,1		**45**	HeLa	28,89	[25]
33	HCT116	28,7 ± 0,27	[28]	**54**	PANC-1*	32,9	[39]
	SW480	30,4 ± 0,23		**56**		73,2	
	U87	32,5 ± 0,36		**57**		80,4	
	T98G	27,3 ± 0,32		**59**		74,2	
35	HCT116	87,6 ± 0,65		**63**		75,8	
	SW480	71,0 ± 0,44		**65**		74,4	
	U87	88,4 ± 0,93		**66**		85,2	
	T98G	83,5 ± 0,33		**74**		13,3	
	CNE1	31,6	[29]	**75**		52,1	

Hợp chất	Dòng tế bào	Hoạt tính (IC_{50}, µM)	TL TK	Hợp chất	Dòng tế bào	Hoạt tính (IC_{50}, µM)	TL TK
36	CNE2	20,85		**77**		70,8	
	C666-1	126,60		**88**		74,8	
	HONE1	122,90		**89**		61,8	
37	HeLa	29,0 ± 0,4	[19]	**90**		57,8	
	SGC-7901	54,0 ± 7,6	[19]	**91**	PANC-1*	85,0	[39]
	Bel-7402	43,7 ± 1,6	[19]				

**Hoạt tính thể hiện qua giá trị PC_{50} (µM).*

1.1.3.4. Tác dụng kháng vi sinh vật và ký sinh trùng

Nhiều nghiên cứu đã chứng minh cao chiết và hợp chất phân lập từ các bộ phận khác nhau của Niệt dó có hoạt tính kháng khuẩn, kháng virus và kháng nấm.

Yang Z. Y. và cs đã sử dụng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch để đánh giá hoạt tính kháng khuẩn của cao nước Niệt dó trên bốn chủng vi khuẩn gồm *Bacillus coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* và *Sarcina lutea*. Kết quả cho thấy giá trị MIC (nồng độ ức chế tối thiểu) của cao nước đối với các chủng vi khuẩn trên lần lượt là 156; 78; 78 và 39 mg/mL, trong khi các giá trị MBC (nồng độ diệt khuẩn tối thiểu) tương ứng là 312; 156; 156 và 78 mg/mL [50]. Nghiên cứu của Lu C. L. và cs cho thấy cao chiết giàu flavonoid từ Niệt dó ở các nồng độ 0,85 g/mL và 0,425 g/mL có khả năng ức chế sự phát triển của *Staphylococcus aureus* và *Escherichia coli*. Hoạt tính kháng khuẩn được thể hiện qua đường kính vùng ức chế dao động từ 7,06 đến 9,81 mm khi đánh giá bằng phương pháp đĩa thạch [21]. Trong nghiên cứu của Chang và cs (2016), các phân đoạn ether dầu hỏa, cloroform, ethyl acetat, *n*-butanol và cắn nước từ Niệt dó đã được khảo sát hoạt tính kháng khuẩn trên *E. coli*. Kết quả cho thấy cao phân đoạn ethyl acetat có hoạt tính mạnh nhất với giá trị IC_{50} là 92,4 µg/mL [51].

Bên cạnh hoạt tính kháng khuẩn, Niệt dó còn thể hiện tiềm năng kháng virus. Ho W. S. và cs đã phân lập các hợp chất có tác dụng kháng virus hợp bào hô hấp (RSV) từ Niệt dó. Cao phân đoạn ethyl acetat cho thấy khả năng ức chế RSV mạnh nhất với giá trị IC_{50} < 3,9 µg/mL và chỉ số chọn lọc (SI) > 64,1. Từ phân đoạn này, daphnoretin (**45**) đã được phân lập và chứng minh có khả năng làm giảm sự bám dính của virus với giá trị IC_{50} là 5,87 µg/mL và SI đạt 28,17 [37]. Trong thử nghiệm *in vitro* bằng phương pháp đánh giá giảm hiệu ứng tế bào, hợp chất 4′-methoxydaphnodorin E (**29**) phân lập từ rễ

Niệt dó cũng thể hiện tác dụng ức chế RSV với giá trị IC_{50} là 2,8 μM và chỉ số chọn lọc SI là 5,4 [27].

Ngoài ra, Hu K. và cs đã phân lập từ rễ Niệt dó một số hợp chất biflavonoid (**15**, **24**, **31**, **32** và **45**) và đánh giá các hoạt tính kháng nấm, kháng nguyên phân và kháng HIV-1. Kết quả cho thấy các hợp chất này gây biến dạng hình thái sợi nấm *Pyricularia oryzae* với giá trị MMDC dao động từ 31,3 ± 1,8 đến 73,7 ± 1,6 μM. Hoạt tính kháng nấm *in vitro* của các hợp chất này được ghi nhận với giá trị IC_{50} trong khoảng 112 ± 4 đến 184 ± 6 μM [26].

Bên cạnh các vi sinh vật trên, hoạt tính kháng ký sinh trùng sốt rét *Plasmodium falciparum* kháng chloroquin của hai hợp chất biflavonoid sikokianin B và C (**39**–**40**) phân lập từ rễ Niệt dó cũng được đánh giá. Kết quả cho thấy cả hai hợp chất đều có hoạt tính mạnh với giá trị IC_{50} lần lượt là 0,54 và 0,56 μg/mL [34].

1.1.3.5. Một số tác dụng khác

Ngoài các tác dụng đã được đề cập, Niệt dó còn thể hiện nhiều hoạt tính sinh học khác đáng chú ý. Nghiên cứu của Rahman M. K. và cs (2015) cho thấy cao methanol từ Niệt dó có tác dụng chống tiêu chảy và chống huyết khối. Ở liều 200 và 400 mg/kg, cao chiết này giảm tiêu chảy với tỷ lệ lần lượt là 18,64% và 28,96%, đồng thời làm giảm đáng kể sự tích tụ dịch trong lòng ruột [52]. Ngoài ra, daphnoretin (**41**) phân lập từ Niệt dó đã ghi nhận có khả năng gây kết tập tiểu cầu ở thỏ thông qua cơ chế hoạt hóa protein kinase C [53]. Gần đây, Zhang và cs (2024) đã đánh giá tác dụng giảm đau của cao ethanol từ Niệt dó trên các mô hình đau do tác nhân vật lý và hóa học. Khi sử dụng ở các liều 5, 25 và 50 mg/kg, cao Niệt dó làm tăng đáng kể ngưỡng đau ở chuột lên lần lượt là 23,50 ± 1,47; 29,39 ± 1,31 và 26,95 ± 3,49 giây, so với ngưỡng đau của nhóm chứng là 12,16 ± 1,43 giây. Đồng thời, cao chiết này làm giảm phản ứng đau quặn do acid acetic gây ra với tỷ lệ tương ứng là 19,18%, 43,29% và 50,68% [54]. Bên cạnh đó, nhóm nghiên cứu của Zhang đã cung cấp thêm bằng chứng về vai trò quan trọng của kênh natri NaV1.7 trong quá trình dẫn truyền tín hiệu đau từ hệ thần kinh ngoại biên đến hệ thần kinh trung ương. Kết quả cho thấy cao Niệt dó ở nồng độ 0,5 mg/L có khả năng ức chế kênh NaV1.7 lên đến 72,16%, góp phần làm rõ cơ chế tác dụng giảm đau của loài này [54].

1.1.4. Tác dụng và công dụng theo Y học cổ truyền

Tính vị: Niệt dó có vị đắng, cay, tính hơi lạnh.

Tác dụng: Theo Y học cổ truyền, Niệt dó có tác dụng tán kết tiêu sưng, thanh nhiệt giải độc, tán ứ trục thuỷ [2], [9], [55].

Công dụng: Vỏ thân cây Niệt dó có tác dụng lợi tiểu, tán kết và được sử dụng trong điều trị bệnh cổ trướng [1], [2]. Ngoài ra, vỏ rễ và vỏ thân còn được dùng để chữa viêm hạch, hen suyễn, ho gà, viêm amidan và viêm tuyến mang tai. Lá tươi thường được giã nát để đắp ngoài, điều trị các chứng đinh nhọt, sưng tấy, vết thương, rắn cắn, viêm vú cấp tính và viêm mô tế bào [2], [9]. Ở Trung Quốc và Đài Loan, lá Niệt dó được sử dụng dưới dạng giã nát để đắp chữa sưng tấy và điều trị bệnh sán máng. Ở Ấn Độ, vỏ cây được coi là có tác dụng gây phồng rộp da, dùng làm thuốc tẩy và duốc cá. Tại New Caledonia, Niệt dó được sử dụng như thuốc gây nôn, thuốc tẩy và trong điều trị các bệnh lây truyền qua đường tình dục như giang mai và lậu [1]. Ngoài ra, nước sắc từ rễ Niệt dó, khi phối hợp với một số dược liệu khác, đã được sử dụng để phòng và điều trị nhiều bệnh lý, bao gồm các bệnh đường hô hấp, nhiễm khuẩn, viêm gan, viêm tuyến vú và hội chứng thận hư [3].

1.2. TỔNG QUAN VỀ PHẢN ỨNG VIÊM VÀ ĐÁP ỨNG MIỄN DỊCH

1.2.1. Mối liên hệ giữa viêm và đáp ứng miễn dịch

1.2.1.1. Khái niệm về viêm và miễn dịch

Viêm về bản chất không phải là một bệnh lý mà là một phản ứng thích nghi thiết yếu của hệ thống miễn dịch đối với các kích thích độc hại như nhiễm trùng và tổn thương mô [56]. Mục đích cuối cùng của quá trình này là loại bỏ tác nhân gây hại, khu trú tổn thương và khởi động quá trình sửa chữa để đưa mô trở lại trạng thái cân bằng nội môi [56], [57], [58]. Song hành với viêm, miễn dịch là khả năng sinh học căn bản của cơ thể nhằm nhận diện và loại bỏ các vật thể lạ (kháng nguyên) như vi khuẩn, virus, ký sinh trùng, hoặc các tế bào ung thư và tế bào chết [59].

Về mặt sinh lý bệnh học, phản ứng viêm và đáp ứng miễn dịch là hai tiến trình lồng ghép, cấu thành hệ thống phòng ngự thống nhất của vật chủ [60], [61]. Một phản ứng viêm cấp tính sinh lý bình thường sẽ trải qua hai pha: bùng phát viêm để tiêu diệt tác nhân xâm hại, tiếp nối bằng pha giải quyết viêm chủ động để dọn dẹp tế bào chết và tái cấu trúc mô [61], [62]. Tuy nhiên, nếu tác nhân gây hại không được loại bỏ triệt để, hoặc các cơ

chế điều hòa phản hồi âm tính của cơ thể bị suy giảm, phản ứng viêm cấp tính sẽ kéo dài và chuyển sang viêm mạn tính [61], [62], [63]. Trạng thái viêm kéo dài này làm phá vỡ sự dung nạp tự thân, kích hoạt các phản ứng tự miễn phá hủy mô lành (như viêm khớp dạng thấp, lupus ban đỏ hệ thống) hoặc thiết lập vi môi trường thuận lợi cho sự hình thành và phát triển khối u [62], [63], [64].

1.2.1.2. Các nhánh đáp ứng miễn dịch và cơ chế phối hợp

Hệ thống miễn dịch được chia thành hai nhánh chính hoạt động phối hợp và bổ trợ chặt chẽ với nhau bao gồm: Miễn dịch bẩm sinh và Miễn dịch thích ứng [59], [60].

a) Đáp ứng miễn dịch bẩm sinh

Miễn dịch bẩm sinh (Innate Immunity*)* là hàng rào phòng thủ đầu tiên của cơ thể, xuất hiện ngay từ khi sinh ra và mang tính di truyền [59]. Đặc trưng của nhánh miễn dịch này là khả năng phản ứng cực kỳ nhanh chóng (trong vài phút đến vài giờ) nhưng không mang tính đặc hiệu cao đối với từng mầm bệnh cụ thể và không tạo ra trí nhớ miễn dịch [59], [60]. Cấu trúc hệ thống gồm các hàng rào giải phẫu - sinh hóa (da, niêm mạc, pH acid dạ dày, lysozym) và hệ thống tế bào hiệu lực (đại thực bào, bạch cầu trung tính, tế bào tua - DC, tế bào NK, tế bào mast) [60]. Tế bào bẩm sinh nhận diện mầm bệnh thông qua các thụ thể nhận diện mẫu (PRRs, tiêu biểu là TLRs và NLRs) để gắn kết với các cấu trúc phân tử bảo tồn của mầm bệnh (PAMPs) hoặc tín hiệu báo động tổn thương tế bào nội sinh (DAMPs), từ đó phát động dòng thác tín hiệu nội bào thúc đẩy phản ứng viêm cấp [59], [60].

b) Đáp ứng miễn dịch thích ứng

Ngược lại với miễn dịch bẩm sinh, đáp ứng miễn dịch thích ứng (Adaptive Immunity) là phản ứng phát triển chậm hơn (cần vài ngày đến vài tuần để kích hoạt đầy đủ) nhưng lại có tính đặc hiệu cực kỳ cao đối với từng loại kháng nguyên riêng biệt. Đặc điểm ưu việt nhất của nhánh này là khả năng tạo ra trí nhớ miễn dịch, giúp cơ thể phản ứng nhanh chóng và mạnh mẽ hơn nhiều lần ở những lần phơi nhiễm kháng nguyên sau đó [59], [60]. Miễn dịch thích ứng bao gồm hai con đường là miễn dịch dịch thể miễn dịch qua trung gian tế bào. Miễn dịch dịch thể do tế bào lympho B đảm nhiệm. Sau khi nhận diện kháng nguyên, tế bào B biệt hóa thành tương bào để sản xuất các kháng thể đặc hiệu (IgA, IgG, IgM, IgE) và phóng thích vào dịch tuần hoàn. Các kháng thể này sẽ thực hiện nhiệm vụ trung hòa độc tố, opsonin hóa mầm bệnh hoặc kích hoạt hệ thống bổ thể để tiêu diệt các vi sinh vật ngoại bào [59]. Trong khi đó, miễn dịch qua trung

gian tế bào được điều hành chủ yếu bởi tế bào lympho T nhằm loại trừ mầm bệnh nội bào. Hệ thống này vận hành qua sự phối hợp chặt chẽ giữa T CD4+ (tiết cytokin để hoạt hóa đại thực bào) và T CD8+ (trực tiếp phóng thích độc tố để tiêu diệt tế bào nhiễm virus hoặc tế bào ung thư) [59].

c) Sự liên kết giữa hai nhánh miễn dich

Phản ứng viêm và đáp ứng miễn dịch vận hành dựa trên mạng lưới tương tác hai chiều phức tạp giữa hệ thống bẩm sinh và thích ứng. Trong đó, miễn dịch bẩm sinh đóng vai trò điều kiện tiên quyết khởi động miễn dịch thích ứng thông qua các tế bào trình diện kháng nguyên (APC, đặc biệt là tế bào tua và đại thực bào) [60]. Trong khi đó, ở nhánh miễn dịch thích ứng (tế bào T CD4+ giữ vai trò trung tâm) được định hướng và khuếch đại hoạt động của miễn dịch bẩm sinh thông qua mạng lưới cytokin tiền viêm (như: IL-1β, INF-γ, IL-6, IL-17…) và cytokin kháng viêm (IL-4**,** IL-10, IL-4…) và yếu tố phiên mã quy định kiểu hình dung nạp Foxp3 [8], [65]. Điển hình, lympho Th1 giải phóng INF-γ để hoạt hóa tối đa đại thực bào; trong khi dòng lympho T điều hòa (Treg) tiết IL-10 và TGF-β nhằm ức chế ngược APC, góp phần kết thúc phản ứng viêm và bảo tồn cấu trúc mô [60], [66], [65].

1.2.2. Vai trò của đại thực bào và cytokin IL-1β, IL-10

1.2.2.1. Thụ thể nhận diện và tín hiệu hoạt hóa của đại thực bào

Mỗi dòng tế bào của hệ miễn dịch bẩm sinh có chức năng và vị trí khác nhau. Trong đó, đại thực bào là những tế bào đóng vai trò trung tâm và thiết yếu nhất trong phản ứng miễn dịch bẩm sinh và viêm [60], [61], Đại thực bào liên tục hoạt động như các cảm biến mầm bệnh để giám sát môi trường vi mô tại các mô [67]. Để thực hiện chức năng này, đại thực bào được trang bị một hệ thống các thụ thể nhận diện mẫu (Pattern Recognition Receptors - PRRs) trên màng tế bào hoặc trong bào tương, điển hình nhất là họ thụ thể giống Toll (Toll-like receptors – TLRs) [61]. Thông qua thụ thể TLR4, đại thực bào có khả năng phát hiện cực kỳ nhạy bén các mẫu phân tử liên quan đến mầm bệnh (PAMPs), mà đại diện tiêu biểu nhất là LPS - một thành phần chủ chốt nằm trên vách tế bào của vi khuẩn Gram âm [61]. Không chỉ giới hạn ở việc phản ứng với mầm bệnh ngoại lai, TLR4 còn đóng vai trò quan trọng trong việc nhận diện các tín hiệu nguy hiểm nội sinh (Danger-Associated Molecular Patterns - DAMPs hay alarmins). Đây là các phân tử của chính cơ thể bị rò rỉ ra ngoài do tế bào bị tổn thương hoặc hoại tử, ví dụ như protein HMGB1 hay ATP [61], [68].

Sự gắn kết của PAMPs (như LPS) hoặc DAMPs vào thụ thể TLR4 sẽ kích hoạt một chuỗi truyền tín hiệu nội bào phức tạp, chủ yếu được trung gian qua phân tử tiếp hợp MyD88. Quá trình này dẫn đến sự phosphoryl hóa và hoạt hóa của các con đường tín hiệu then chốt, bao gồm yếu tố phiên mã NF-κB và con đường Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK). Khi phức hợp NF-κB được giải phóng khỏi chất ức chế IκB, nó sẽ di chuyển vào nhân tế bào và bám vào các vùng khởi động gen, thúc đẩy quá trình phiên mã. Kết quả của sự kích hoạt này là việc tế bào tổng hợp và giải phóng ồ ạt các cytokin tiền viêm, đặc biệt là IL-1β, IL-6 và yếu tố hoại tử khối u alpha (TNF-α) [61]. Tuy nhiên, khi phân cực thành kiểu hình M2 (đại thực bào kháng viêm) hoặc hoạt động như một cơ chế phản hồi âm tính (negative feedback) nhằm kiểm soát và giới hạn phản ứng viêm, đại thực bào sẽ sản sinh ra IL-10 và thúc đẩy dọn dẹp tế bào chết nhằm tái thiết cân bằng nội môi [68], [69].

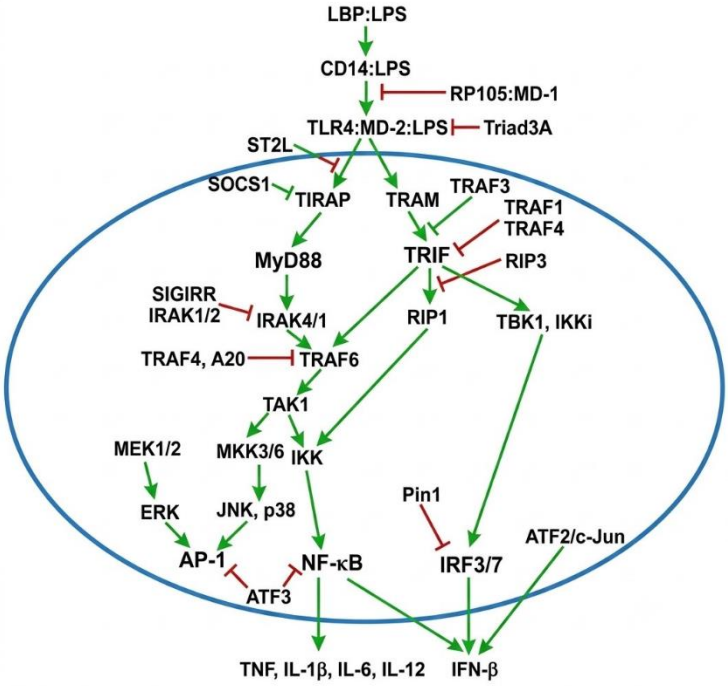
1.2.2.2. Vai trò của IL-1β và IL-10 trong phản ứng viêm

a) Cytokin tiền viêm IL-1β

Interleukin-1 beta (IL-1β) là cytokin tiền viêm nguyên phát sở hữu hoạt tính sinh học mạnh mẽ, đóng vai trò khuếch đại phản ứng viêm bẩm sinh. Dưới sự điều hòa trực tiếp của NF-κB và AP-1, gen IL1B được kích hoạt phiên mã để tạo ra tiền chất không có hoạt tính sinh học là pro-IL-1β tích tụ trong bào tương. Để chuyển thành dạng IL-1β hoạt tính giải phóng ra ngoại bào, pro-IL-1β cần phải trải qua quá trình cắt xẻ proteolytic chuyên biệt bởi enzym Caspase-1 [8], [70]. Enzym này chỉ được hoạt hóa khi phức hợp đại phân tử inflammasome (tiêu biểu là NLRP3) được lắp ráp hoàn chỉnh khi đại thực bào nhận thêm tín hiệu cảnh báo thứ hai [65], [70].

Khi tiết ra ngoại bào, IL-1β gắn đặc hiệu vào thụ thể IL-1R1 và tuyển mộ protein phụ trợ IL-1RAcP để tạo thành phức hợp ba phân tử [8]. Thông qua miền tương đồng nội bào TIR (Toll/IL-1 Receptor domain), phức hợp này tiếp tục tuyển mộ MyD88, IRAK4, IRAK1 và TRAF6, tái kích hoạt dòng thác tín hiệu NF-κB và MAPKs [8], [70]. Vòng phản hồi dương này giúp khuếch đại sự sản sinh của chính IL-1β và các yếu tố tiền viêm khác [8]. IL-1β đóng vai trò là một chất gây sốt nội sinh, kích thích tế bào nội mô tăng biểu hiện các phân tử kết dính và tiết chemokin để chiêu mộ bạch cầu thâm nhiễm vào mô. Đồng thời, IL-1β gửi tín hiệu hoạt hóa tế bào T CD4+, thúc đẩy sự phân cực sang các dòng hiệu lực gây bệnh như Th17 và Th1 [8], [70]. Sự sản sinh mất kiểm

soát hoặc dai dẳng của IL-1β là động lực cốt lõi gây phá hủy mô mạn tính trong các bệnh tự viêm và tự miễn dịch [70].



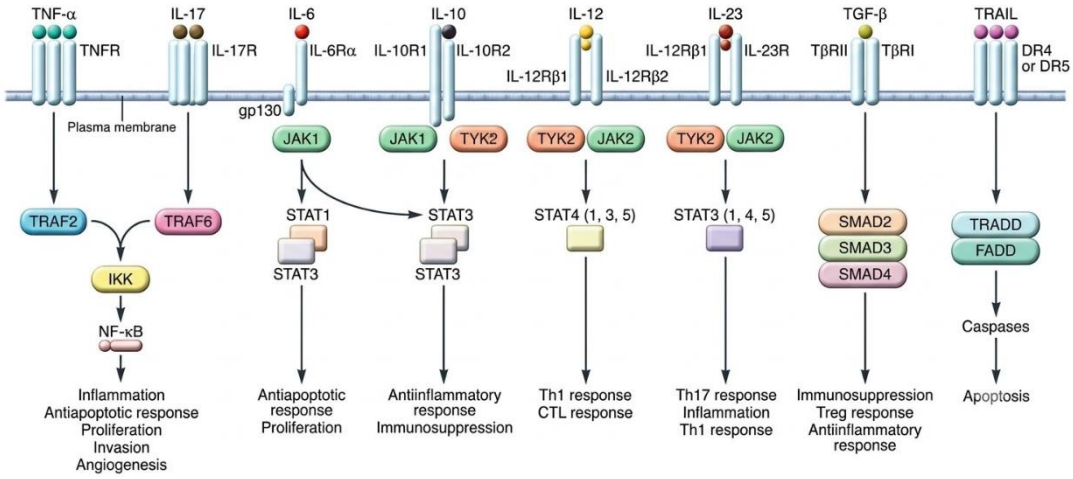
Hình 1.11. Sơ đồ con đường nhận diện LPS qua thụ thể TLR4 và các con đường truyền tín hiệu nội bào sản sinh cytokin tiền viêm IL-1β

(Nguồn: McAleer và Anthony T. Vella [71])

b) Cytokin kháng viêm IL-10

Trái ngược với IL-1β, Interleukin-10 (IL-10) là cytokin kháng viêm quan trọng nhất do đại thực bào và các tế bào điều hòa tiết ra nhằm kiểm soát và kết thúc phản ứng viêm [63], [66]. Khi bị kích thích bởi LPS, đại thực bào không chỉ phát động phản ứng viêm mà còn đồng thời kích hoạt chu trình phản hồi âm tính bằng cách thúc đẩy tổng hợp IL-10 [72]. Cytokin này gắn vào phức hợp thụ thể màng IL-10R (IL-10R1/IL-10R2), kích hoạt con đường tín hiệu nội bào JAK1/STAT3 [66]. Yếu tố phiên mã STAT3 sau khi được phosphoryl hóa (p-STAT3) sẽ chuyển vị vào nhân và thực thi các cơ chế dập tắt viêm bao gồm: Ức chế trực tiếp sự bám của NF-κB và AP-1 lên vùng khởi động của các gen tiền viêm (như IL1B, TNFA, IL6) và thúc đẩy quá trình phân hủy mRNA tiền viêm chứa các trình tự giàu AU (ARE) [63], [70].

IL-10 gây ức chế biểu hiện của phức hợp hòa hợp mô chính MHC lớp II và các phân tử đồng kích thích (CD80/CD86) trên bề mặt đại thực bào, cản trở khả năng trình diện kháng nguyên kích thích tế bào T CD4+. Đồng thời, IL-10 thúc đẩy đại thực bào chuyển dịch sang kiểu hình dọn dẹp tế bào chết, ngăn ngừa hoại tử thứ phát và khôi phục trạng thái cân bằng nội môi [62], [63], [73].



Hình 1.12. Các con đường truyền tín hiệu và vai trò sinh học của IL-10 cùng một số cytokin trong đáp ứng viêm và miễn dịch

(*Nguồn: Wan-Wan Lin và Michael Karin [63]*)

1.2.3. Vai trò của tế bào T CD4+ và INF-γ, IL-17, Foxp3

1.2.3.1. Sự kích hoạt và biệt hóa của tế bào T CD4+

Tế bào T CD4+ chưa mẫn cảm (naive T cells), sau khi rời tuyến ức đi vào tuần hoàn và định cư tại các cơ quan lympho ngoại vi. Quá trình kích hoạt và định hướng chức năng của tế bào T CD4+ diễn ra qua mô hình ba tín hiệu phân tử chặt chẽ:

Đại thực bào và tế bào tua (DCs) sau khi thực bào và xử lý kháng nguyên ngoại lai sẽ bộc lộ các đoạn peptid kháng nguyên này trên phức hợp hòa hợp mô chính MHC lớp II ở bề mặt tế bào [60], [61]. Sự liên kết đặc hiệu giữa phức hợp MHC-II - peptid của APC với thụ thể TCR trên tế bào T CD4+ chưa mẫn cảm cung cấp tín hiệu kích hoạt thứ nhất [60], [66]. Đồng thời, các tín hiệu cảnh báo bẩm sinh sẽ kích hoạt APC tăng cường biểu hiện các phân tử đồng kích thích bề mặt CD80/CD86 để liên kết với CD28 trên màng tế bào T CD4+ [74], [71]. Tương tác này tạo nên tín hiệu đồng kích thích thứ hai bắt buộc, giúp tế bào T sống sót, tăng sinh và khởi động chương trình biệt hóa [74], [75]. Tiếp nối chuỗi hoạt hóa, dưới tác động điều hướng của môi trường cytokin vi mô tại chỗ do tế bào bẩm sinh tiết ra (đóng vai trò là tín hiệu thứ ba), tế bào T CD4+ sẽ phân cực thành các phân nhóm tế bào hiệu lực (Th1, Th2, Th17) hoặc tế bào điều hòa (Treg) chuyên biệt [65], [66], [71].

Sự duy trì cân bằng động giữa các phân nhóm T CD4+ hiệu lực và T điều hòa (Treg) là điều kiện cốt lõi quyết định để cơ thể vừa loại trừ hiệu quả tác nhân gây bệnh, vừa bảo toàn tính dung nạp miễn dịch tự thân [65], [76].

1.2.3.2. Vai trò của cytokin INF-γ

Interferon-gamma (INF-γ) là cytokin hiệu lực nguyên phát của dòng Th1, đồng thời được sản sinh bởi tế bào NK và tế bào T CD8+ [66]. Cytokin này thể hiện một số tác động sinh học đáng chú ý như sau:

- *Hoạt hóa đại thực bào*: INF-γ là yếu tố hoạt hóa đại thực bào (MAF) mạnh nhất, kích thích tăng biểu hiện phân tử MHC lớp II, tăng sản sinh các gốc oxy hóa (ROS) và nitric oxide (NO) thông qua enzym iNOS, nâng cao tối đa hiệu suất thực bào và diệt khuẩn nội bào [75], [77].

- *Điều hòa ngược dòng Th1*: INF-γ kích thích đại thực bào tiết thêm IL-12, đồng thời tăng biểu hiện IL-12Rβ2 trên tế bào T CD4+, tạo thành vòng phản hồi dương củng cố sự biệt hóa dòng Th1 [66], [75].

- *Ức chế dòng Th2 và Th17*: INF-γ cản trở trực tiếp sự bộc lộ yếu tố phiên mã GATA-3 (của Th2) và RORγt (của Th17), giúp cố định định hướng miễn dịch tế bào [66].

Mặc dù INF-γ cần thiết để bảo vệ cơ thể chống lại vi khuẩn nội bào và vi-rút, sự tiết dư thừa dai dẳng của INF-γ lại là nhân tố bệnh sinh hàng đầu thúc đẩy các tổn thương viêm mạn tính và tàn phá mô trong các bệnh lý tự miễn [66], [65], [75]

1.2.3.3. Vai trò của cytokin IL-17

Interleukin-17 (điển hình là IL-17A và IL-17F) là họ cytokin gây viêm mạnh mẽ do dòng tế bào Th17 chuyên biệt sản sinh dưới sự chỉ đạo của yếu tố phiên mã RORγt [66], [65]. IL-17 thể hiện một số tác động sinh học và vai trò trong bệnh tự miễn như:

- *Chiêu mộ bạch cầu trung tính*: IL-17 kích thích các tế bào mô tiết các chemokin (CXCL1, CXCL8/IL-8) và yếu tố tăng trưởng, dẫn đến sự thâm nhiễm ồ ạt của bạch cầu trung tính vào vị trí tổn thương [8], [63].

- *Khuếch đại tín hiệu viêm*: IL-17 phối hợp hiệp đồng với TNF-α và IL-1β để gia tăng sản sinh các cytokin tiền viêm khác (IL-6, IL-1β), duy trì chuỗi phản ứng viêm hệ thống [63].

- *Phá hủy cấu trúc mô xương khớp*: Trong bệnh sinh viêm khớp dạng thấp (RA), IL-17 kích thích tế bào sụn và tế bào màng hoạt dịch tiết các metalloproteinase (MMPs) và RANKL, trực tiếp thúc đẩy quá trình hủy xương và tiêu cartilage [66], [65].

1.2.3.4. Vai trò của yếu tố phiên mã Foxp3

Tế bào T điều hòa (Treg) đóng vai trò là "chốt chặn" sinh lý duy trì sự dung nạp tự thân và ngăn ngừa các đáp ứng miễn dịch quá mức [66], [65]. Trong khi đó, Foxp3

(Forkhead box P3) là yếu tố phiên mã trung tâm quy định sự phát triển, duy trì tính ổn định kiểu hình và chức năng ức chế của tế bào Treg [66], [74], [76]. Foxp3 kiểm soát chương trình biểu hiện gen của tế bào Treg [74], [76]. Thông qua cơ chế tái cấu trúc nhiễm sắc thể, Foxp3 thực hiện chức năng điều hòa kép: một mặt, nó ức chế trực tiếp sự phiên mã các gen mã hóa cytokin tiền viêm (như IL2, INFG, IL17) và phong lập yếu tố phiên mã RORγt để cản trở sự biệt hóa dòng Th17 [74], [76]. Mặt khác, Foxp3 kích hoạt và duy trì ổn định các gen quy định đặc tính Treg, bao gồm chuỗi alpha thụ thể IL-2 (CD25), phân tử kiểm soát miễn dịch CTLA-4 và các cytokin kháng viêm hòa tan (IL-10, TGF-β) [74], [76], [78]. Tầm quan trọng của Foxp3 còn được chứng minh qua các đột biến mất chức năng trên gen FOXP3 mã hóa trên nhiễm sắc thể X, nguyên nhân trực tiếp gây ra hội chứng tự miễn đa cơ quan IPEX nghiêm trọng ở người và bệnh lý xơ hóa lympho Scurfy ở chuột [66], [74], [76], [78]. Do đó, trong bối cảnh các bệnh lý tự miễn và viêm mạn tính, việc củng cố tính ổn định của Foxp3 và mở rộng quần thể Treg là chiến lược hàng đầu nhằm khôi phục hàng rào dung nạp miễn dịch tự thân và dập tắt tổn thương mô [65], [76].

Ngược lại với các bệnh lý tự miễn, trong lĩnh vực ung thư học, việc ức chế tế bào Treg (đặc biệt là nhắm mục tiêu vào yếu tố phiên mã Foxp3) lại đóng vai trò là một hướng tiếp cận điều trị tiềm năng. Trong vi môi trường khối u (TME), các tế bào Treg tập trung với số lượng lớn và hoạt động như những tác nhân ức chế nội tại (enemies within), tạo ra lớp rào chắn dung nạp bảo vệ khối u khỏi sự tấn công của hệ miễn dịch [76]. Chúng tiết ra các cytokin ức chế (như IL-10, TGF-β, IL-35) và làm suy giảm hoạt động cũng như sự tăng sinh của các tế bào T gây độc (CD8+) và tế bào NK, tạo điều kiện cho khối u lẩn tránh miễn dịch và tiến triển [76]. Do đó, việc ức chế Foxp3 (ví dụ thông qua các peptid chuỗi xoắn alpha dạng ghim - SAH) hoặc làm suy giảm đặc hiệu Treg tại khối u sẽ vô hiệu hóa hàng rào chế ngự này, giúp tái hoạt hóa đáp ứng miễn dịch chống ung thư nội sinh của cơ thể [76], [79].

CHƯƠNG 2. NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. NGUYÊN VẬT LIỆU NGHIÊN CỨU

2.1.1. Nguyên liệu nghiên cứu

❖ ***Mẫu nghiên cứu thực vật:***

Cây Niệt dó (gồm đầy đủ các bộ phận rễ, thân, lá và hoa) được thu hái tại xã Minh Đức, huyện Việt Yên, tỉnh Bắc Giang (địa chỉ sau sát nhập là phường Việt Yên, tỉnh Bắc Ninh) vào tháng 9 năm 2022. Mẫu nghiên cứu được ThS. Nguyễn Quỳnh Nga và ThS. Phan Văn Trường, Trung tâm Tài nguyên, Viện Dược liệu giám định tên khoa học là *Wikstroemia indica* (L.) C.A.Mey., họ Trầm (Thymelaeaceae) (**Phụ lục 1**). Tiêu bản được lưu tại Trung tâm Tài nguyên Dược liệu, Viện Dược liệu (số hiệu mẫu DV-080922).

❖ ***Mẫu nghiên cứu hóa học:***

Dược liệu được dùng trong nghiên cứu hóa học là cành và lá của Niệt dó (*W. indica*) thu hái tại xã Minh Đức, huyện Việt Yên, tỉnh Bắc Giang (địa chỉ sau sát nhập là Phường Việt Yên, Tỉnh Bắc Ninh) vào tháng 9 năm 2022 (**Hình 2.1**).



a. Phần trên mặt đất b. Cành và lá cắt nhỏ

Hình 2.1. Niệt dó (*Wikstroemia indica* (L.) C.A.Mey.)

❖ ***Mẫu nghiên cứu tác dụng dược lý:***

- Mẫu cao chiết dùng để sàng lọc hoạt tính bao gồm: Cao chiết toàn phần EtOH 70% của cành và lá Niệt dó và cao các phân đoạn của cao toàn phần: *n*-hexan (**WIH**), ethyl acetat (**WIE**) và cắn nước (**WIW**) được điều chế theo phương pháp trình bày ở **Mục 2.3.1.1**.

- Một số hợp chất phân lập được từ các phân đoạn tiềm năng của cành và lá Niệt dó.

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

❖ ***Nghiên cứu hóa học:***

- Dung môi dùng trong chiết xuất, phân lập: Dung môi công nghiệp ethanol (EtOH, Việt Nam), methanol (MeOH, Trung Quốc), *n*-hexan (Thái Lan), ethyl acetat (EtOAc, Trung Quốc), dichloromethan (DCM, Đài Loan) và aceton (Thái Lan), dung môi Trung Quốc (MeOH, DCM, *n*-hexan, EtOAc và aceton) đạt tiêu chuẩn phân tích và dung môi MeOH, ACN đạt tiêu chuẩn phân tích HPLC.

- Dung môi đo phổ: Aceton-d_6 (Apollo Scientific, Anh), CD_3OD và DMSO-d_6 (Energy Chemical, Trung Quốc) đạt tiêu chuẩn phân tích NMR.

- Silica gel pha thường (0,040–0,063 mm, Merck, Đức), silica gel pha đảo YMC RP-C_{18} (30–50 µm, Fuji Silysia Chemical Ltd., Nhật Bản), MCI-Gel™ (40–200 µm, Mitsubishi Chemical Corporation, Nhật Bản), Diaion HP-20 (500 µm, Mitsubishi Chemical Corporation, Nhật Bản).

- Bản mỏng tráng sẵn DC-Alufolien 60 F_{254} (silica gel, 0,25 mm, Merck, Đức) và bản mỏng pha đảo RP-18 F_{254} (0,25 mm, Merck, Đức).

- Acid H_2SO_4 (Trung Quốc)

- Đường chuẩn D-glucose và L-glucose được cung cấp bởi công ty Sigma-Aldrich (St, Louis, MO, Mỹ).

❖ ***Nghiên cứu tác dụng dược lý:***

- MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yI)-2,5-diphenyltetrazolium bromid, cat: M2128) của hãng Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Mỹ).

- Chất gây viêm lipopolysaccharid (LPS, cat: L4391) và MTT (cat: M2128) của hãng Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Mỹ).

- DMSO (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, Mỹ).

- Huyết thành thai bò (FBS), môi trường nuôi cấy DMEM, RPMI, trypsin từ Gibco BRL (Grand Island, NY, Mỹ).

- Huyết thanh người pooled (H6914, Sigma)

- Penicillin-streptomycin (MediaTech, Herndon, VA, Mỹ).

- β-Mercaptoethanol (Gibco, Invitrogen, Grand Island, Mỹ).

- L-Glutamin (Gibco, Carlsbad, CA, Mỹ).

- IL-2 (Chiron, California, Mỹ)

- IL-7 và IL-15 (R&D Systems, Minneapolis, MN)

- Dòng tế bào murine monocyte/macrophage RAW 264.7 (ATCC TIB-71) được lấy từ American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, VA, Mỹ) và được duy trì không quá 25 lần truyền.

- Tế bào T CD4+ được cung cấp bởi trung tâm tế bào gốc, đại học Lund Thuỵ Điển.

- Các bộ kit ELISA gồm: human Foxp3 ELISA Kit (ab289644, Abcam); human IL-17 ELISA Kit (ab119535, Abcam); human IFN-γ ELISA Kit (#KHC4021, Thermo Fisher); mouse IL-1β ELISA Kit và mouse IL-10 ELISA Kit (Thermo Fisher).

2.1.3. Máy móc, thiết bị

❖ ***Nghiên cứu hóa hóa học:***

- Máy đo phổ khối lượng ion hóa phun mù điện tử (ESI-MS): Hệ thống sắc ký lỏng ghép nối 2 lần khối phổ LC-MS/MS 8045 (Shimadzu, Nhật Bản), Viện Dược liệu.

- Phổ khối phân giải cao HR-ESI-MS/MS được thực hiện trên hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng siêu cao (UHPLC) Vanquish kết nối với khối phổ kế Orbitrap Exploris 120 (Thermo Fisher Scientific, Sunnyvale, CA, Mỹ) tại Khoa Dược, Đại học Quốc gia Suncheon, Hàn Quốc.

- Máy đo phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR): Máy Bruker AM600 FT-NMR Spectrometer của Viện Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, chất nội chuẩn là tetramethyl silan.

- Máy đo phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR): Máy Bruker ASCEND 500 MHz Spectrometer của Khoa Hóa, Đại học Khoa học tự nhiên, ĐHQG Hà Nội.

- Máy sắc ký lỏng bán điều chế HPLC Waters bơm 1525, đầu dò UV-Vis 2489.

- Phân tích đường bằng máy HPLC Waters, bơm e 2695, đầu dò PDA 2998.

- Phổ CD được đo trên máy ChirascanTM CD spectrometer (Applied. Photophysics Ltd., Surrey, UK), Viện Hóa Sinh biển, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

- Máy cất quay Rotavapor R-220 Pro 20L, Rotavapor R-124 và Rotavapor R-220 (Buchi, Flawil, Thụy Sỹ).

- Tủ sấy Binder FD 115 (Tuttlingen, Đức) và Memmert UF110 (Schwabach, Đức).

- Cân kỹ thuật điện tử (Ohaus, Parsippany, New Jersey, Hoa Kỳ) độ chính xác 0,01 g; cân phân tích Precisa XT 220A (Precisa, Zürich, Thụy Sỹ), độ chính xác 0,0001 g.

- Đèn tử ngoại VL-6.LC hai bước sóng 254 nm và 365 nm (Vilber, Marne-la-Vallée, Pháp).

- Các dụng cụ cần thiết trong phòng thí nghiệm như: Cột sắc ký, bình gạn, bình nón, phễu lọc, giấy lọc, cốc có mỏ, ống nghiệm, ống đong, pipet…

❖ **Nghiên cứu tác dụng sinh học**

- Máy ELISA Plate Reader (Muclecular Devices Co., Menlo Park, CA, Mỹ).

- Đĩa 96 giếng (Corning, USA), pipet (eppendorf)…

2.2. ĐỊA ĐIỂM NGHIÊN CỨU

2.2.1. Địa điểm nghiên cứu thực vật

- Trung tâm Tài nguyên Dược liệu, Viện Dược liệu.

2.2.2. Địa điểm nghiên cứu thành phần hóa học

- Khoa Hóa Thực vật, Viện Dược liệu.

- Khoa Hóa Phân tích Tiêu chuẩn, Viện Dược liệu.

- Bộ môn Dược liệu, Viện Đào tạo Dược, Học viện Quân Y.

- Viện Hóa Sinh biển, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

- Trung tâm các phương pháp phổ ứng dụng, Viện Hóa học, Viện Hàn lâm khoa học và Công nghệ Việt Nam.

- Khoa Hóa, Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội.

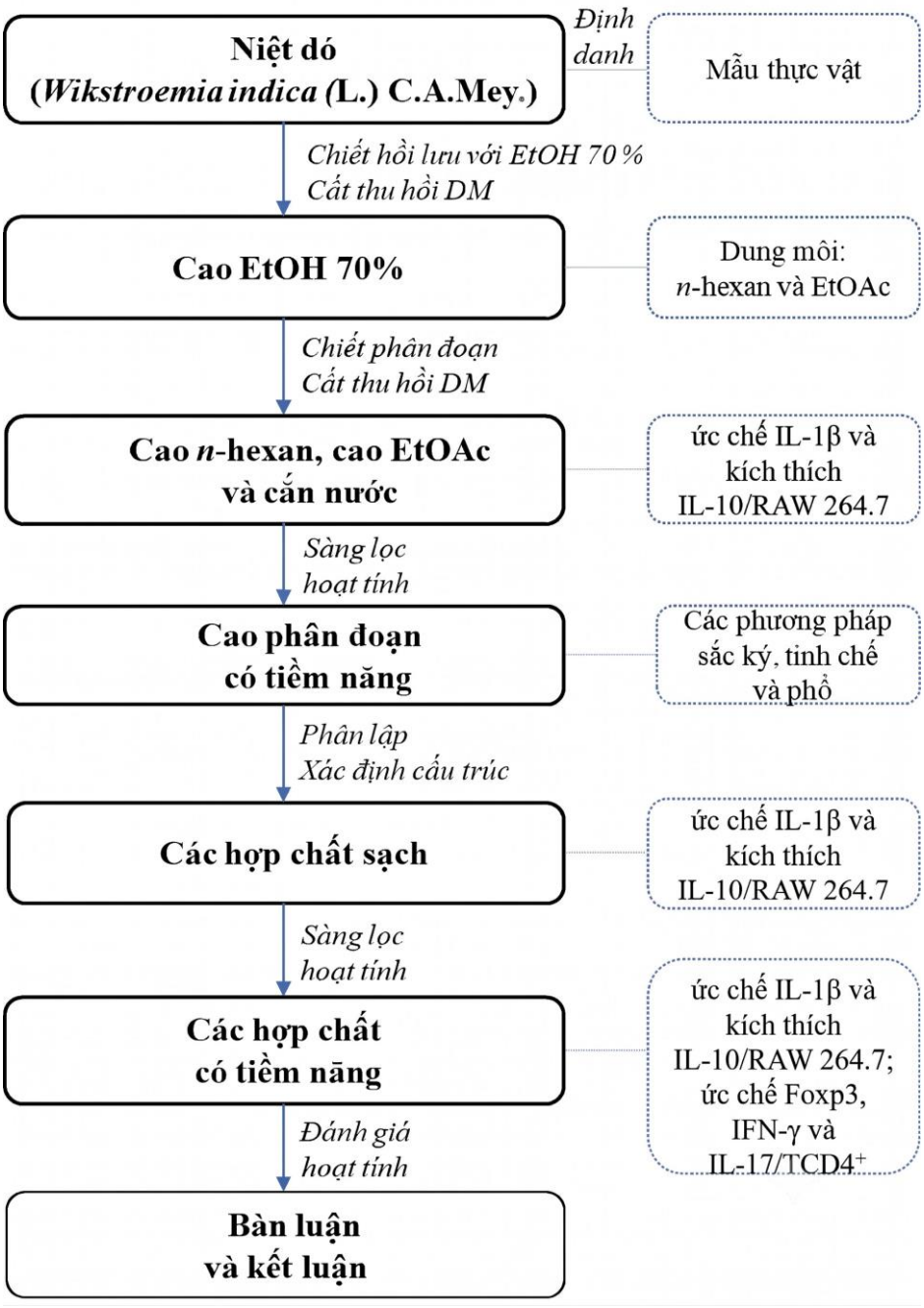
- Khoa Dược, Đại học Quốc gia Suncheon, Hàn Quốc.

2.2.3. Địa điểm nghiên cứu tác dụng dược lý

- Khoa Khoa học Y khoa Thực nghiệm, Khoa Y, Đại học Lund, Thụy Điển.

2.3. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Sơ đồ thiết kế nghiên cứu của luận án được trình bày ở **Hình 2.2** dưới đây:



Hình 2.2. Sơ đồ thiết kế nghiên cứu của luận án

2.3.1. Phương pháp nghiên cứu thành phần hóa học

2.3.1.1. Phương pháp chiết xuất và phân lập

❖ ***Chiết xuất:***

- *Chiết xuất cao toàn phần*: Cành và lá Niệt dó được chiết hồi lưu với EtOH 70% 3 lần, mỗi lần 3 giờ với tỷ lệ dược liệu/ dung môi là 1:7 (kg/L). Lọc, gộp dịch chiết và cất thu hồi dung môi dưới áp suất giảm thu được cao chiết toàn phần (EtOH 70%).

- *Chiết xuất cao phân đoạn*: Phân tán cao toàn phần trong nước nóng sau đó chiết lỏng - lỏng lần lượt với các dung môi có độ phân cực tăng dần *n*-hexan và EtOAc, mỗi

dung môi 3 lần với tỷ lệ 1:1, *v/v*. Gộp các dịch chiết tương ứng và cất thu hồi dung môi dưới áp suất giảm thu được cao *n*-hexan, cao EtOAc và cao nước.

❖ ***Phân lập và tinh chế:***

Phân lập các hợp chất bằng các phương pháp sắc ký cột hở kết hợp với theo dõi quá trình sắc ký bằng sắc ký lớp mỏng (TLC). Phát hiện sắc ký đồ TLC bằng thuốc thử (H_2SO_4 10%/EtOH) và quan sát dưới ánh sáng tử ngoại, bước sóng 254 và 366 nm. Tinh chế bằng phương pháp sắc ký lỏng bán điều chế (semi-preparative HPLC), kết hợp với phương pháp kết tinh lại và lọc rửa với các dung môi và hệ dung môi thích hợp.

2.3.1.2. Phương pháp xác định cấu trúc của các hợp chất

❖ ***Xác định cấu trúc:***

Cấu trúc hóa học của các các hợp chất phân lập được xác định dựa trên các phương pháp phổ, bao gồm: Phổ khối (HR, MS/MS), phổ cộng hưởng từ hạt nhân một chiều (^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, ^{13}C-APT NMR) và phổ cộng hưởng từ hạt nhân 2 chiều (HMBC, HSQC, COSY…), phổ ECD lý thuyết và thực nghiệm kết hợp so sánh với tài liệu tham khảo.

❖ ***Phương pháp tính toán ECD lý thuyết***

Các cấu dạng (conformer) cho mỗi đồng phân tiềm năng được tìm kiếm bằng phần mềm MAESTRO (Schrödinger LLC, New York, NY, Mỹ), với ngưỡng cửa sổ năng lượng là 1 kJ/mol. Phép thử được tiến hành với 10.000 bước bằng phương pháp cực tiểu đa điểm Monte Carlo (Monte Carlo multiple minimum), kết hợp tối ưu hóa năng lượng theo thuật toán PRCG sử dụng trường lực chuẩn Merck (MMFF) trong pha khí. Các cấu dạng thu được sau đó được tối ưu hóa cấu trúc hình học và tính toán tần số dao động ở mức lý thuyết DFT/ωB97XD/TZVP (môi trường methanol, mô hình IEFPCM) bằng phần mềm Gaussian 16 A.03 (Gaussian Inc., Wallingford, CT, Mỹ). Các cấu dạng đã tối ưu hóa tiếp tục được tính toán phổ hấp thụ lưỡng sắc tròn (ECD) ở mức lý thuyết TD-DFT/CAM-B3LYP/TZVP (môi trường methanol, mô hình IEFPCM). Cuối cùng, các đường cong phổ ECD được tính trung bình theo phân bố Boltzmann và trích xuất bằng phần mềm SpecDis v.1.7 với độ rộng nửa băng phổ là 0,3 eV.

❖ ***Thủy phân và xác định cấu hình tuyệt đối của đường***

Các hợp chất lignan mới (khoảng 0,5 mg) được hòa tan trong HCl 3 N (1,0 mL) và tiến hành thủy phân ở 90°C trong 1 giờ. Sau khi làm nguội, hỗn hợp phản ứng được chiết lỏng–lỏng với EtOAc để loại bỏ phần aglycon. Lớp nước chứa đường thủy phân

được làm khô, sau đó hòa tan trong pyridin (0,5 mL) có chứa *L*-cystein methyl ester hydrochlorid (0.5 mg) và ủ nhiệt ở 60°C trong 1 giờ. Sau đó thêm 10 µL dung dịch *O*-phenyl isothiocyanat vào hỗn hợp và tiếp tục đun nóng trong 1 giờ nữa. Hỗn hợp sau phản ứng được phân tích trực tiếp bằng HPLC (triển khai sắc ký theo gradient từ 6% đến 80% MeOH trong H_2O trong 45 phút). So sánh thời gian lưu của đường thủy được từ các hợp chất mới với các mẫu glucose chuẩn bao gồm D-glucose và L-glucose cùng điều kiện HPLC, từ đó xác định được cấu hình tuyệt đối của đơn vị đường trong các hợp chất mới [80].

2.3.2. Phương pháp nghiên cứu tác dụng dược lý

2.3.2.1. Phương pháp đánh giá ảnh hưởng của cao chiết và chất chiết đối tế bào RAW 264.7

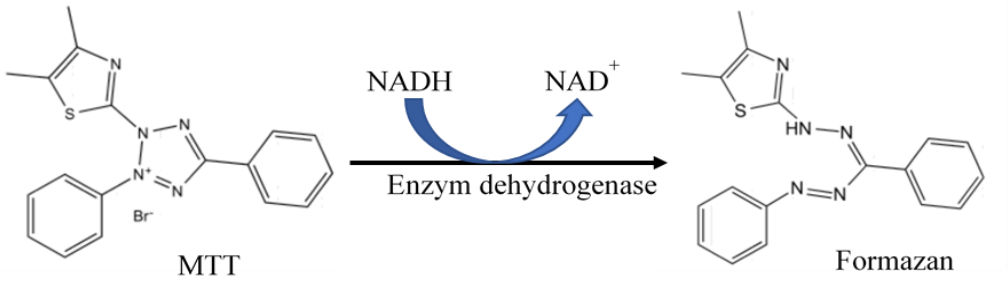
❖ ***Nuôi cấy tế bào RAW 264.7***

Tế bào RAW 264.7 được nuôi cấy ở 37ºC, 5% CO_2 trong môi trường có chứa 10% huyết thanh bào thai bò (FBS), 1% kháng sinh penicillin (100 đơn vị/mL) và streptomycin (100 µg/mL). Đối với tất cả các thí nghiệm, các tế bào được nuôi đến mật độ 80 – 90% và chịu không quá 25 phân chia tế bào.

❖ ***Đánh giá ảnh hưởng của mẫu thử đến khả năng sống sót của tế bào RAW 264.7 bằng phương pháp MTT.***

➢ ***Nguyên tắc:***

Khả năng sống sót của tế bào dưới tác động của các mẫu nghiên cứu được đánh giá dựa trên hoạt tính của enzym dehydrogenase trong ty thể. Ở các tế bào còn sống, enzym này xúc tác quá trình khử muối tetrazolium (màu vàng nhạt) thành tinh thể formazan (màu tím); hàm lượng formazan tạo thành tỷ lệ thuận với số lượng tế bào sống và được xác định bằng phương pháp đo độ hấp thụ quang học tại bước sóng λ = 570 nm [81], [82], [83].



Hình 2.3. Phản ứng nhuộm màu tế bào sống bằng phương pháp MTT

➢ ***Tiến hành:***

Các mẫu thử và mẫu chứng được pha loãng bằng DMSO ở các nồng độ khác nhau.

Thiết kế đĩa: Mỗi đĩa (96 giếng) bao gồm 1 chứng dương, 1 chứng âm (môi trường), một giếng chứng gồm môi trường có pha mẫu thử nhưng không có tế bào và 5 giếng lặp lại cho mỗi nồng độ của cao chiết và chất thử.

Ủ đĩa: Tế bào RAW 264.7 được nuôi cấy trong đĩa ổn định với mật độ tế bào đạt 90% ở điều kiện 37ºC và 5% CO_2 trong môi trường DMEM có chứa 10% huyết thanh bò (FBS), 100 đơn vị penicillin và 100 µg/mL streptomycin. Tế bào được chuyển sang đĩa. Sau 24 h ổn định, các mẫu thuốc thử sẽ được đưa vào ủ trong 48 h. Tế bào sống sẽ được ủ và nhuộm màu với môi trường nuôi cấy tế bào có chứa MTT (2 mg/mL, trong 4 h). Loại bỏ môi trường và hòa tan các tinh thể formazan bằng cách thêm vào 200 mL dimethylsulfoxid. Xác định tỷ lệ tế bào còn sống giữa mẫu chuẩn và mẫu thử bằng máy đo quang ở bước sóng 570 nm.

❖ ***Tính kết quả:***

Phần trăm sống sót của tế bào được tính theo công thức:

$$\%\ \text{Tế bào sống sót} = \left[\frac{\text{OD (mẫu thử)} - \text{OD (mẫu trắng)}}{\text{OD (mẫu DMSO)} - \text{OD (mẫu trắng)}} \times 100\right]$$

Trong đó: OD là mật độ quang đo ở bước sóng λ= 570 nm.

2.3.2.2. Phương pháp đánh giá mức độ sản sinh một số cytokin liên quan đến viêm và miễn dịch.

❖ ***Nguyên tắc:***

Phương pháp miễn dịch gắn kết enzym ELISA (Enzym-Linked Immunosorbent Assay) dùng để định lượng các cytokin IL-1β và IL-10 sản sinh từ tế bào RAW 264.7. và Foxp3, INF-γ và IL-17 từ dòng tế bào T CD4+. Quá trình bắt đầu bằng việc gắn kháng nguyên (các cytokin) có trong dịch nuôi cấy lên bề mặt đĩa ELISA. Sau khi ủ mẫu, đĩa được rửa để loại bỏ kháng nguyên không gắn kết. Tiếp theo, kháng thể đặc hiệu được thêm vào, kháng thể này thường được liên kết với một enzym có khả năng tạo ra tín hiệu để phát hiện. Sau khi rửa sạch một lần nữa để loại bỏ kháng thể không gắn, cơ chất được thêm vào. Enzym sẽ tương tác với cơ chất và tạo ra một sản phẩm có màu hoặc phát huỳnh quang. Sự biến đổi màu sắc hoặc phát sáng này được đo bằng máy đọc độ hấp thụ với sự

thay đổi tỷ lệ thuận với nồng độ của cytokin trong mẫu. Các bước thử được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất các kít thử [84], [85], [86], [87].

❖ ***Chuẩn bị mẫu:***

- Mẫu thử: Các mẫu cao chiết hoặc hợp chất tinh khiết được hòa tan trong DMSO bằng cách lắc xoáy ở tốc độ 300–500 rpm trong 1–2 phút cho đến khi dung dịch đồng đều và không còn lắng cặn.

- Đối với thử nghiệm sàng lọc trên IL-1β và IL-10: Nồng độ cao chiết phân đoạn là 20 µg/mL và chất tinh khiết là 10 µM.

- Đối với thử nghiệm đánh giá mức độ sản sinh một số cytokin: Nồng độ các chất thử nghiệm là 1, 3, 10 và 30 µM.

- Các mẫu được lưu giữ ở nhiệt độ -20°C trong tủ lạnh.

- Nhóm LPS: Sử dụng LPS với nồng độ 5 ng/mL để xác định hiệu ứng kích thích.

❖ ***Các bước tiến hành thí nghiệm đánh giá mức độ sản sinh IL-1β và IL-10 trên tế bào RAW 264.7***

Bước 1: Nuôi cấy tế bào RAW 264.7 trong môi trường DMEM bổ sung 10% huyết thanh phôi bò trong 6 ngày.

Bước 2: Tách tế bào, rửa sạch và pha lại trong môi trường mới, sau đó chuyển vào đĩa 96 giếng với mật độ 10^4 tế bào/giếng và ủ qua đêm.

Bước 3: Thêm mẫu thử vào các giếng với nồng độ thích hợp và ủ trong 24 giờ; đồng thời sử dụng LPS làm chất kích thích. Sau 24 giờ, nồng độ IL-1β và IL-10 trong dịch nuôi cấy được định lượng bằng phương pháp ELISA theo hướng dẫn của nhà sản xuất như sau:

- Đối với bộ kit mouse IL-1β ELISA

+ *Rửa giếng:* Rửa các giếng 2 lần với khoảng 400 µL đệm rửa mỗi giếng. Vỗ mạnh đĩa lên giấy thấm để loại bỏ dịch thừa

+ *Chuẩn bị dãy chuẩn*: Thêm 100 µL dung dịch pha loãng mẫu vào tất cả các giếng chuẩn. Thêm 100 µL dung dịch chuẩn đã hoàn nguyên (1000 pg/mL) vào giếng đầu tiên, sau đó pha loãng bậc 2 liên tiếp để có dãy nồng độ từ 500 pg/mL đến 7,8 pg/mL.

+ *Thêm mẫu:*

- ✓ Thêm 100 µL dung dịch pha loãng mẫu vào các giếng trắng.
- ✓ Thêm 50 µL dung dịch pha loãng mẫu vào các giếng mẫu.
- ✓ Thêm 50 µL mẫu thử vào các giếng mẫu tương ứng

+ *Ủ lần 1:* Thêm 50 µL kháng thể liên hợp Biotin đã pha loãng vào tất cả các giếng. Đậy đĩa và ủ 2 giờ ở nhiệt độ phòng 18^0 C đến 25^0 C trên máy lắc.

+ *Rửa:* Loại bỏ dịch và rửa giếng 4 lần.

+ *Ủ lần 2:* Thêm 100 µL Streptavidin gắn enzym HRP đã pha loãng vào tất cả các giếng. Đậy đĩa và ủ 1 giờ ở nhiệt độ phòng trên máy lắc.

+ *Rửa:* Loại bỏ dịch và rửa giếng 4 lần.

+ *Phản ứng màu:* Thêm 100 µL dung dịch cơ chất TMB vào tất cả các giếng, tiến hành ủ khoảng 10 phút ở nhiệt độ phòng, tránh ánh sáng mạnh.

+ *Dừng phản ứng:* Thêm nhanh 100 µL dung dịch dừng phản ứng vào mỗi giếng

+ *Đọc kết quả:* Đo độ hấp thụ tại bước sóng 450 nm trong vòng 1 giờ.

- Đối với bộ kit mouse IL-10 ELISA

+ *Rửa giếng:* Tiến hành như đối với kit mouse IL-1β ELISA

+ *Chuẩn bị dãy chuẩn:* Thêm 100 µL dung dịch pha loãng mẫu vào tất cả các giếng chuẩn. Thêm 100 µL dung dịch chuẩn đã hoàn nguyên (5000 pg/mL) vào giếng chuẩn 1 (A1, A2) để đạt nồng độ từ 2500 pg/mL. Pha loãng bậc 2 liên tiếp để tạo dãy nồng độ từ 2500 pg/mL đến 39 pg/mL. Loại bỏ 100 µL dịch từ giếng cuối cùng.

+ *Thêm 100 µL dung dịch pha loãng vào giếng trắng*. Thêm 50 µL dung dịch pha loãng và 50 µL mẫu thử vào các giếng mẫu.

+ *Ủ hỗn hợp phản ứng:* Thêm 50 µL kháng thể liên hợp Biotin đã pha loãng vào tất cả các giếng (bao gồm cả giếng trắng). Đậy đĩa và ủ 2 giờ ở nhiệt độ phòng (18^0 C - 25^0 C) trên máy lắc.

+ *Rửa:* Loại bỏ dịch và rửa giếng 3 lần.

+ *Phản ứng màu:* Thêm 100 µL dung dịch cơ chất TMB vào tất cả các giếng. Ủ khoảng 10 phút, tránh ánh sáng mạnh.

+ *Dừng phản ứng:* Thêm nhanh 100 µL dung dịch dừng phản ứng vào mỗi giếng

+ *Đọc kết quả:* Đo độ hấp thụ tại bước sóng 450 nm trong vòng 1 giờ.

❖ ***Các bước tiến hành đánh giá mức độ sản sinh Foxp3, INF-γ và IL-17 trên tế bào T CD4+***

Bước 1. Tế bào lympho T CD4+ được nuôi cấy *in vitro* trong môi trường RPMI 1640 chứa 1% penicillin/streptomycin, 50 µM β-mercaptoethanol và 1% L-glutamine. Môi trường nuôi cấy được bổ sung 10% huyết thanh người gộp lô. Các cytokin tái tổ hợp ở người gồm IL-2, IL-7 và IL-15 đạt chuẩn vô trùng, không chứa lipopolysaccharid, không chứa chất gây sốt và không nhiễm Mycoplasma được sử dụng ở các nồng độ lần

lượt là 10 IU/ml, 10 ng/ml và 10 ng/ml. Toàn bộ cytokin được nhà sản xuất cung cấp dưới dạng không chứa protein mang và được hoàn nguyên trong dung dịch albumin huyết thanh người 1% pha trong đệm muối phosphate (PBS).

Bước 2. Gieo tế bào: Tế bào được gieo vào đĩa 96 giếng với mật độ 1×10^4 tế bào/giếng trong RPMI-1640 có bổ sung 10% huyết thanh người gộp. Ủ 12 giờ để tế bào thích ứng.

Bước 3. Xử lý mẫu: Sau khi ổn định, tế bào được kích hoạt bằng LPS (5 ng/mL) trong điều kiện có hoặc không có chất thử ở các nồng độ 1, 3, 10 và 30 μM. Ủ tiếp 24 giờ ở 37°C, 5% CO_2.

Bước 4. Thu mẫu: Thu dịch nổi (INF-γ, IL-17) và dịch ly giải tế bào (Foxp3) từ mỗi giếng để tiến hành phân tích.

Bước 5. Định lượng INF-γ, IL-17 và Foxp3 bằng ELISA theo đúng hướng dẫn của từng bộ kit.

- Đối với bộ kit human INF- γ ELISA

+ *Thêm mẫu và chuẩn:* Cho 100 μL dung dịch đệm pha loãng chuẩn vào giếng trắng (blank). Thêm 100 μL các mức chuẩn hoặc mẫu thử vào các giếng tương ứng.

+ *Ủ lần 1*: Đậy đĩa và ủ trong 2 giờ ở nhiệt độ phòng.

+ *Rửa:* Hút bỏ dịch và rửa giếng 4 lần.

+ *Thêm kháng thể* (Biotin): Thêm 100 μL Biotinylated anti-INF-γ (kháng thể gắn Biotin) vào mỗi giếng (trừ giếng trắng).

+ *Ủ lần 2*: Đậy đĩa và ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng.

+ *Rửa:* Hút bỏ dịch và rửa giếng 4 lần.

+ Thêm enzym: Thêm 100 μL Streptavidin-HRP 1X vào mỗi giếng.

+ *Rửa:* Hút bỏ dịch và rửa giếng 4 lần.

+ Phản ứng màu: Thêm 100 μL dung dịch cơ chất TMB vào các giếng. Ủ 30 phút trong tối.

+ Dừng phản ứng: Thêm 100 μL dung dịch dừng phản ứng vào mỗi giếng và đo mất độ quang tại bước sóng 450 nm.

- Đối với bộ kit human IL-17 ELISA

+ *Chuẩn bị đĩa:* Xác định số lượng giếng cần dùng. Rửa các giếng 2 lần với 400 μL dung dịch đệm rửa.

+ *Thêm mẫu và chuẩn:*

- ✓ Thêm 100 μL các mức chuẩn (ống 1-8) vào giếng tương ứng

✓ Thêm 50 µL dung dịch pha loãng mẫu vào các giếng mẫu.

✓ Thêm 50 µL mẫu thử vào các giếng mẫu (*tỷ lệ pha loãng 1:2*)

+ *Thêm Biotin:* Thêm 50 µL kháng thể liên hợp Biotin đã pha loãng vào tất cả các giếng.

+ *Ủ lần 1:* Đậy đĩa và ủ trong 2 giờ ở nhiệt độ phòng trên máy lắc (400 rpm).

+ *Rửa:* Hút bỏ dịch và rửa giếng 3 lần bằng 400µL đệm rửa.

+ Thêm enzym: Thêm 100 µL Streptavidin-HRP 1X vào mỗi giếng.

+ *Ủ lần 2*: Đậy đĩa và ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng.

+ *Rửa:* Hút bỏ dịch và rửa giếng 3 lần.

+ Phản ứng màu: Thêm 100 µL dung dịch cơ chất TMB vào các giếng. Ủ 10 - 20 phút trong tối.

+ Dừng phản ứng: Thêm 100 µL dung dịch dừng phản ứng vào mỗi giếng. Màu sẽ chuyển từ xanh sang vàng.

+ *Đọc kết quả:* Đo độ hấp thụ tại bước sóng 450 nm.

- Đối với bộ kit human Foxp3 ELISA

+ *Thêm mẫu và chuẩn:* Cho 50 µL các mức nồng độ chuẩn hoặc mẫu thử vào các giếng tương ứng trên đĩa SimpleStep.

+ *Thêm kháng thể:* Cho 50 µL hỗn hợp kháng thể đã pha vào mỗi giếng.

+ *Ủ lần 1:* Đậy đĩa và ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng trên máy lắc (400 rpm)

+ *Rửa giếng:* Rửa mỗi giếng 3 lần bằng 350 µL dung dich đệm rửa PT 1x. Sau lần rửa cuối, vỗ mạnh đĩa lên giấy thấm để loại bỏ hoàn toàn dịch thừa.

+ *Phát triển màu:* Thêm 100 µL dung dịch cơ chất TMB vào mỗi giếng. Ủ trong 10 phút trong tối trên máy lắc.

+ *Dừng phản ứng:* Thêm 100 µL dung dịch dừng phản ứng vào mỗi giếng. Lắc nhẹ đĩa trong 1 phút để trộn đều.

+ *Đọc kết quả:* Đo độ hấp thụ tại bước sóng 450 nm.

❖ ***Tính kết quả:***

- Tính phần trăm ức chế sản sinh Foxp3 và các cytokin theo công thức sau:

$$\%\ \text{Ức chế} = \left[\frac{\text{OD (mẫu LPS)} - \text{OD (mẫu thử)}}{\text{OD (mẫu LPS)} - \text{OD (mẫu DMSO)}} \times 100\right]$$

Trong đó: OD là mật độ quang đo ở bước sóng λ = 450 nm

- Sử dụng phần mềm GraphPad Prism® 9.5.0 với hàm số sau đây để tính giá trị IC_{50} (nồng độ hoạt chất ức chế 50% sản sinh Foxp3 và các cytokin)

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

Trong đó: X là % ức chế của mẫu thử

2.3.3. Xử lý số liệu

Các thí nghiệm được lặp lại 5 lần độc lập. Số liệu thu nhận có phân phối chuẩn và được trình bày dưới dạng số giá trị trung bình ± sai số chuẩn của giá trị trung bình (M ± SEM) và được xử lý bằng phần mềm GraphPad Prism® 9.5.0. Phép kiểm định t độc lập (Student's unpaired *t*-test) được áp dụng khi so sánh giữa hai nhóm dữ liệu; phân tích phương sai một yếu tố (one-way ANOVA) kèm kiểm định hậu kiểm Dunnett (Dunnett's post hoc test) được sử dụng để so sánh giá trị trung bình giữa các nhóm thử nghiệm với nhóm đối chứng. Sự khác biệt được xem là có ý nghĩa thống kê khi: $^{*}p < 0,05$; $^{**}p < 0,01$; $^{***}p < 0,001$ và $^{****}p < 0,0001$.

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VỀ THÀNH PHẦN HÓA HỌC

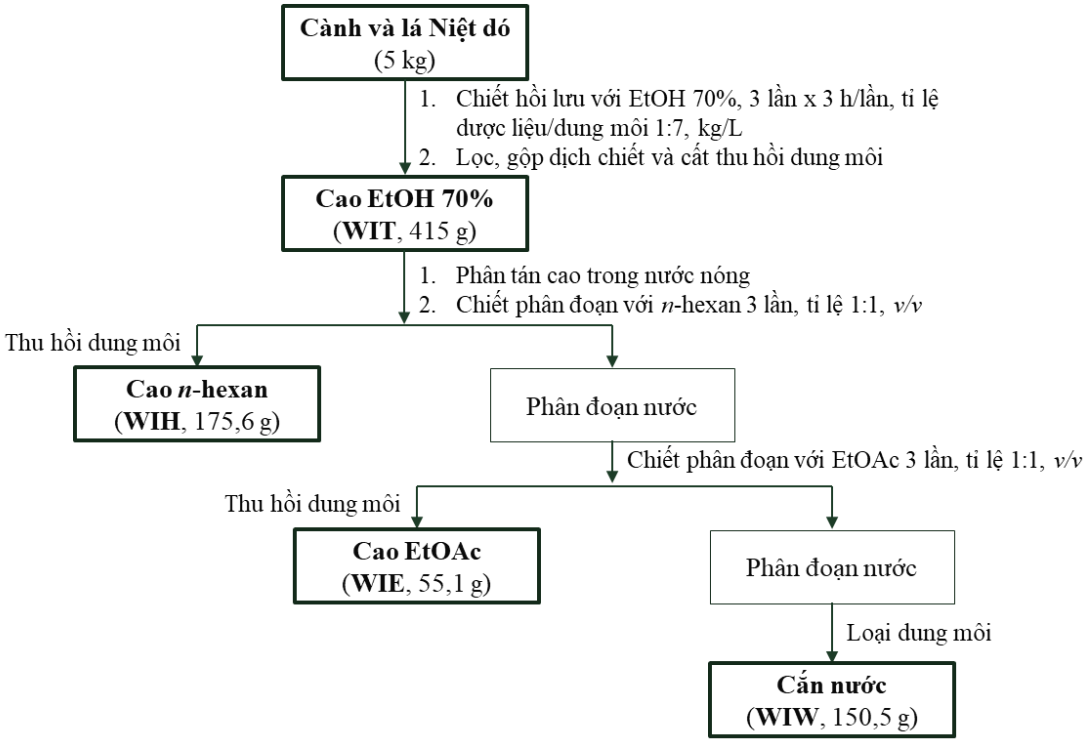
Từ kết quả sàng lọc về hoạt tính của cao chiết toàn phần EtOH 70% với cao chiết các phân đoạn từ cành và lá Niệt dó trên sản sinh IL-1β và IL-10 (xem **Mục 3.2.1**) cho thấy cao phân đoạn ethyl acetat (**WIE**) và cao phân đoạn nước (**WIW**) thể hiện hoạt tính tương đương nhau và tốt hơn cao chiết toàn phần (**WIT**) và phân đoạn *n*-hexan (**WIH**). Do đó, hai phân đoạn **WIE** và **WIW** được xác định là các phân đoạn tiềm năng cho nghiên cứu tiếp theo về thành phần hóa học và tác dụng sinh học của loài Niệt dó. Trên cơ sở kết quả sàng lọc này, luận án tiến hành chiết xuất và phân lập với khối lượng 5,0 kg cành và lá Niệt dó nhằm tìm kiếm các hợp chất tiềm năng từ loài cây này theo định hướng tác dụng sinh học.

3.1.1. Chiết xuất và phân lập các hoạt chất

3.1.1.1. Chiết xuất

5,0 kg cành và lá Niệt dó được chiết hồi lưu với EtOH 70% 3 lần, mỗi lần 3 giờ với tỷ lệ dược liệu/ dung môi là 1:7 kg/L. Lọc, gộp dịch chiết và cất thu hồi dung môi dưới áp suất giảm thu được 415 g cao chiết toàn phần (EtOH 70%, **WIT**). Phân tán cao EtOH 70% trong nước nóng và chiết lỏng - lỏng lần lượt với các dung môi có độ phân cực tăng dần *n*-hexan và EtOAc, mỗi dung môi 3 lần với tỷ lệ giữa 2 dung môi là 1:1, v/v. Gộp các dịch chiết tương ứng và cất thu hồi dung môi dưới áp suất giảm thu được 175,6 g cao *n*-hexan (**WIH**), 55,1 g cao EtOAc (**WIE**) và 150,5 g cao nước (**WIW**).

Sơ đồ mô tả quy trình chiết xuất cao toàn phần và các cao phân đoạn từ cành và lá của Niệt dó được tóm tắt theo **Hình 3.1.** dưới đây:



Hình 3.1. Sơ đồ tóm tắt quá trình chiết cao toàn phần và các cao phân đoạn từ cành và lá Niệt dó

3.1.1.2. Phân lập các hợp chất

- **Phân lập các hợp chất từ cao ethyl acetat**

Cao EtOAc (55,1 g) được phân tách bằng sắc ký cột silica gel, rửa giải bằng hệ dung môi gradient *n*-hexan – aceton (100:0 → 1:9) thu được 4 phân đoạn (E1–E4). Phân đoạn E1 (1,1 g) được phân lập bằng sắc ký cột MCI với hệ dung môi rửa giải là MeOH – H_2O (3:7 → 100:0, *v/v*) thu được hợp chất **WI1** (11,6 mg). Tinh chế phân đoạn E2 (1,08 g) bằng sắc ký cột pha đảo RP-C_{18} với hệ dung môi rửa giải aceton – nước (1:1 → 100:0, *v/v*) thu được 2 hợp chất **WI3** (20 mg) và **WI9** (16,6 mg). Phân tách phân đoạn E3 (30,0 g) bằng sắc ký cột pha đảo RP-C_{18} với hệ dung môi rửa giải MeOH – H_2O (3:7 → 100:0, *v/v*) thu được 3 phân đoạn (E3.1 – E3.3). Tinh chế phân đoạn E3.1 (30,8 mg) bằng sắc ký cột pha đảo RP-C_{18} với hệ dung môi rửa giải aceton – H_2O (1:1 → 100:0, *v/v*) thu được hợp chất **WI10** (12 mg). Rửa tủa phân đoạn E3.3 (612 mg) bằng aceton thu được hợp chất **WI5** (420 mg). Phân đoạn E4 (2,1 g) được phân tách bằng sắc ký cột MCI với hệ dung môi MeOH – H_2O (1:1 → 100:0, *v/v*) thu được hai phân đoạn (E4.1 và E4.2). Kết tinh phân đoạn E4.2 (11 mg) trong MeOH thu được hợp chất **WI6** (5,5 mg).

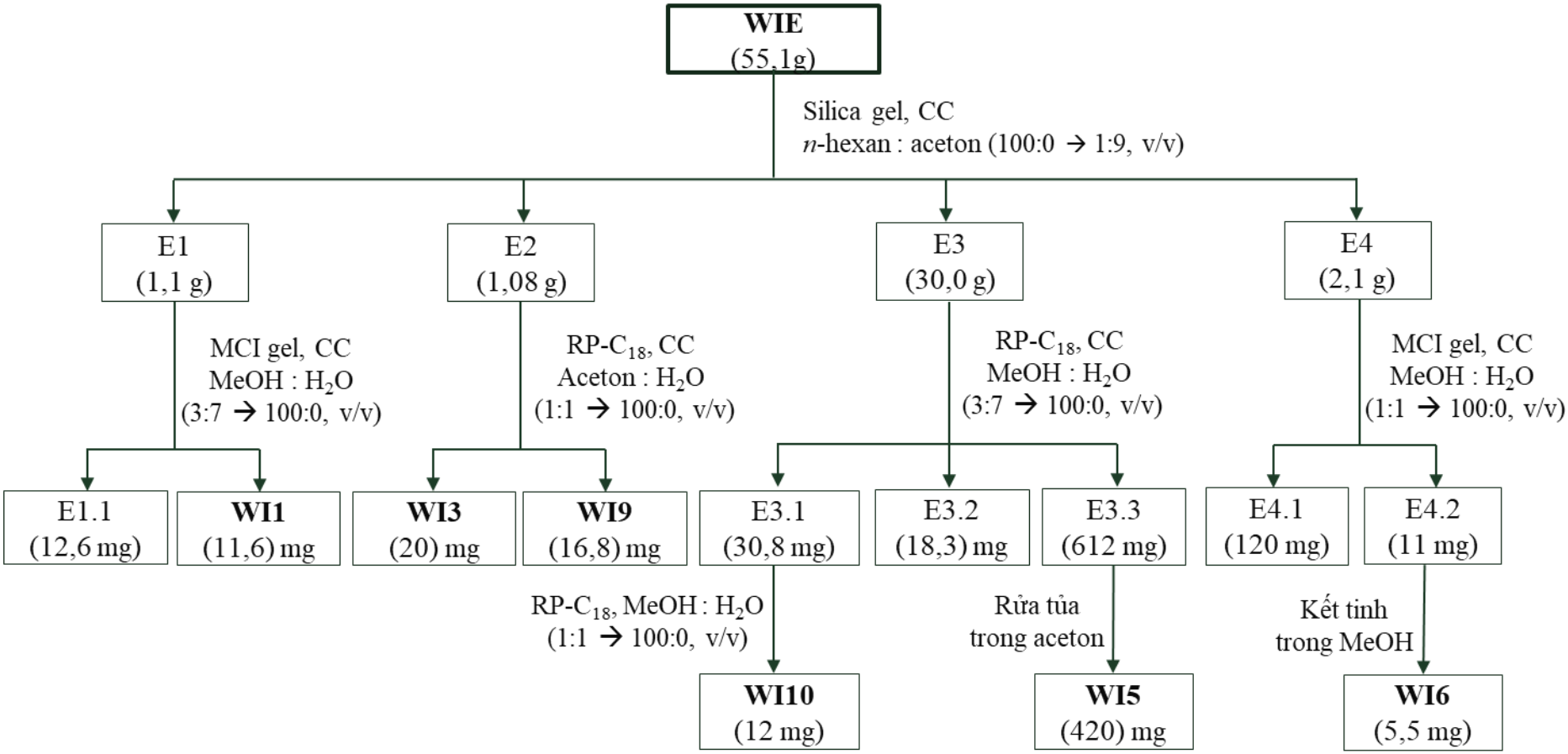
Quá trình phân lập và tinh chế các hợp chất từ phân đoạn EtOAc được mô tả tóm tắt trong **Hình 3.2**.

- **Phân lập các hợp chất từ cắn nước**

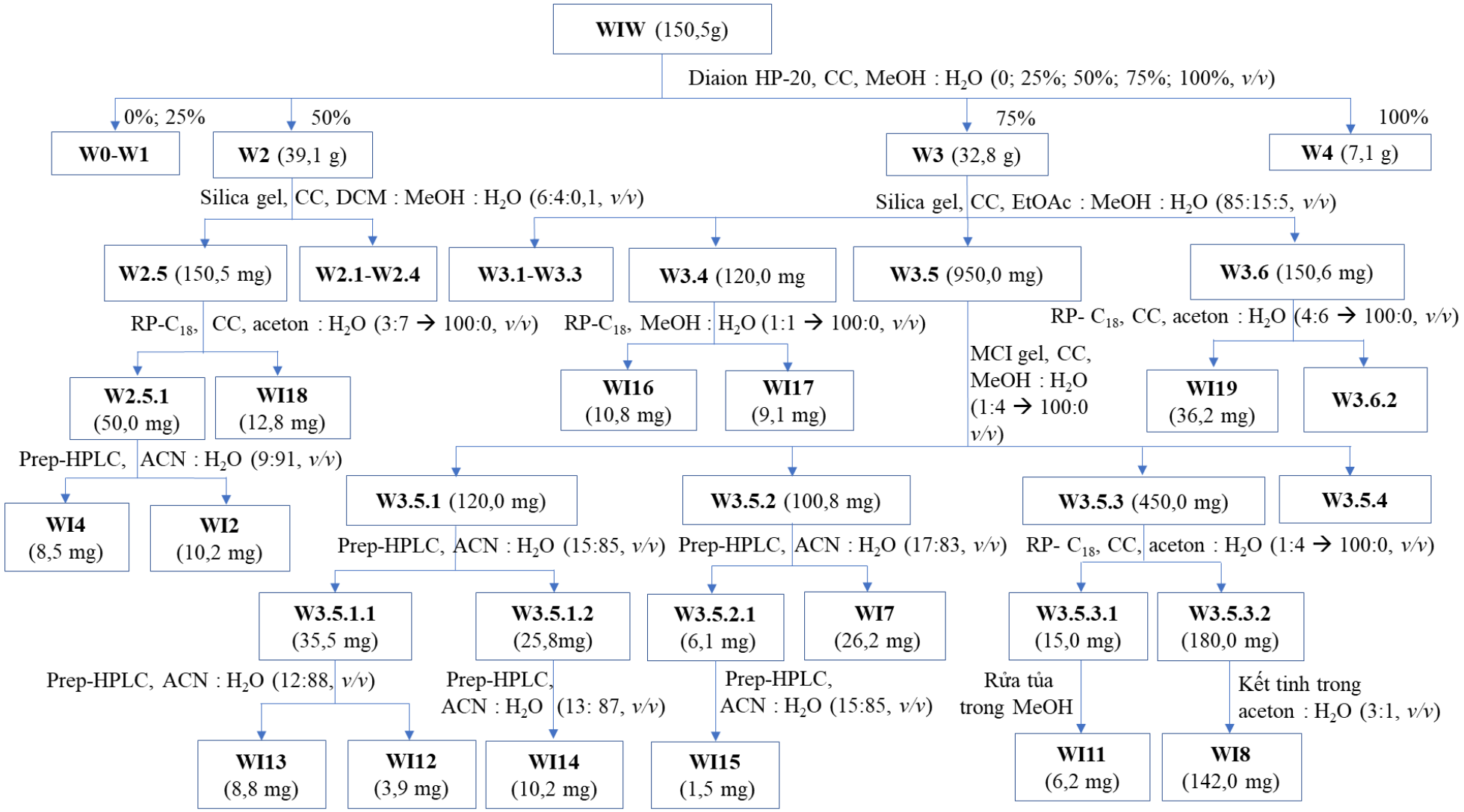
Cắn nước (150,5 g) được phân tách bằng sắc ký cột Diaion HP-20 với hệ dung môi MeOH – H_2O (0%, 25%, 50%, 75% và 100%) thu được 05 phân đoạn (W0 – W4). Phân đoạn W2 (39,1 g) được phân tách bằng sắc ký cột silica gel với hệ dung môi rửa giải DCM – MeOH – H_2O (6:4:0,1 → 1:1:0,1, *v/v/v*) thu được 05 phân đoạn (W2.1 – W2.5). Phân đoạn W2.5 (150,5 mg) được phân tách bằng sắc ký cột pha đảo RP-C_{18} với hệ dung môi rửa giải aceton – H_2O (3:7 → 100:0, v/v) thu được phân đoạn W2.5.1 (50 mg) và hợp chất **WI18** (12,8 mg). Phân đoạn W2.5.1 được phân lập bằng HPLC bán điều chế, hệ dung môi ACN – H_2O (9:91, *v/v*), tốc độ dòng 2,0 mL/phút, bước sóng 220 nm, thu được hợp chất **WI4** (t_R = 25 phút, 8,5 mg) và **WI2** (t_R = 28 phút, 10,2 mg). Phân tách phân đoạn W3 (32,8 g) bằng sắc ký cột silica gel với hệ dung môi EtOAc – MeOH – H_2O (85:15:5 – 45:50:5, *v/v/v*) thu được 6 phân đoạn (W3.1 – W3.6). Phân đoạn W3.4 (120 mg) được phân tách bằng sắc ký cột pha đảo RP-C_{18} với hệ dung môi rửa giải MeOH – H_2O (1:1 → 100:0, *v/v*) thu được 2 hợp chất **WI16** (10,8 mg) và **WI17** (9,1 mg). Phân đoạn W3.5 (950 mg) được phân tách bằng sắc ký cột MCI với hệ dung môi MeOH – H_2O (1:4 → 100:0, *v/v*) thu được 4 phân đoạn (W3.5.1 – W3.5.4). Phân tách phân đoạn W3.5.1 (120 mg) bằng HPLC bán điều chế, hệ dung môi ACN/H_2O (15:85, v/v.) thu được 2 phân đoạn (W3.5.1.1 và W3.5.1.2). Phân đoạn W3.5.1.1 (35,5 mg) tiếp tục được tinh chế bằng HPLC bán điều chế với hệ dung môi ACN – H_2O (12:88, v/v), tốc dòng 2 mL/phút, bước sóng 220 nm, thu được hợp chất **WI13** (t_R = 35 phút, 8,8 mg) và **WI12** (t_R = 39 phút, 3,9 mg). Phân đoạn W3.5.1.2 (25,8 mg) tiếp tục được được tinh chế bằng HPLC bán điều chế với hệ dung môi ACN – H_2O (13:87, v/v), tốc dòng 2 mL/phút, bước sóng 220 nm, thu được hợp chất **WI14** (t_R = 36 phút, 5,2 mg). Phân đoạn W3.5.2 (100,8 mg) được phân tách bằng HPLC bán điều chế với hệ dung môi ACN – H_2O (17:83, *v/v*), tốc dòng 2 mL/phút, bước sóng 220 nm, thu được phân đoạn W3.5.2.1 (6,1 mg) và hợp chất **WI7** (t_R = 30 phút, 26,2 mg). Phân đoạn W3.5.2.1 (6,1 mg) tiếp tục được tinh chế bằng bằng HPLC bán điều chế với hệ dung môi ACN – H_2O (15:85, *v/v*), tốc dòng 2 mL/phút, bước sóng 220 nm, thu được hợp chất **WI15** (t_R = 45 phút, 1,5 mg). Phân đoạn W3.5.3 (450 mg) được phân tách bằng sắc ký cột pha đảo RP-C_{18} với hệ dung môi aceton – H_2O (1:4 → 100:0, *v/v*) thu được 2 phân đoạn (W3.5.3.1 và

W3.5.3.2). Phân đoạn W3.5.3.1 (15 mg) được rửa 3 lần bằng MeOH thu được hợp chất sạch **WI11** (6,2 mg). Phân đoạn W3.5.3.2 (180 mg) được kết tinh trong hệ dung môi aceton – H_2O (3:1, *v/v*) thu được hợp chất **WI8** (142,0 mg). Phân đoạn W3.6 (150,6 mg) được tinh chế bằng sắc ký pha đảo RP-C_{18} với hệ dung môi aceton – H_2O (3:7 → 100:0, v/v) thu được hợp chất **WI19** (36,2 mg).

Quá trình phân lập và tinh chế các hợp chất từ cắn nước của cành và lá Niệt dó được mô tả tóm tắt trong **Hình 3.3**.



Hình 3.2. Sơ đồ tóm tắt quá trình phân lập các hợp chất từ cao EtOAc của cành và lá Niệt dó



Hình 3.3. Sơ đồ tóm tắt quá trình phân lập các hợp chất từ cao nước của cành và lá Niệt dó

3.1.2. Xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất phân lập được

3.1.2.1. Hợp chất WI1 (methyl 4-hydroxybenzoat)

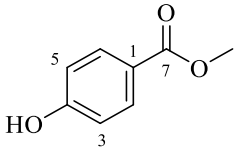
Hợp chất **WI1** được phân lập dưới dạng bột màu trắng. Phổ ESI-MS xuất hiện pic ion giả phân tử tại *m/z* = 151,20 $[M–H]^-$ phù hợp với công thức phân tử $C_8H_8O_3$ (M = 152,15 Da). Phổ ^{1}H-NMR (600 MHz, CD_3OD) và phổ ^{13}C-NMR (150 MHz, CD_3OD): xem **Bảng 3.1**.

Bảng 3.1. Số liệu phổ NMR của WI1 và hợp chất tham khảo

Vị trí	**WI1**		**Methyl 4-hydroxybenzoat** [88]	
	δ_H[a,b] **(mult., *J* = Hz)**	δ_C[a,c]	δ_H[d,e] **(mult., *J* = Hz)**	δ_C[d,f]
1	–	122,3	–	120,4
2, 6	7,86 (2H, d, 8,4)	132,7	7,80 (2H, d, 8,8)	131,5
3, 5	6,82 (2H, d, 8,4)	115,2	6,84 (2H, d, 8,8)	115,4
4	–	163,5	–	162,0
7	–	168,7	–	166,2
-OCH_3	3,84 (3H, s)	52,2	3,77 (3H, s)	51,7

[a] CD_3OD, [b] 600 MHz, [c] 150 MHz, [d] DMSO-d_6, [e] 500 MHz, [f] 125 MHz

Phổ ^{1}H-NMR cho thấy tín hiệu của các proton thuộc hệ AA′BB′ tại δ_H 7,86 (2H, d, *J* = 8,4 Hz) và 6,82 (2H, d, *J* = 8,4 Hz). Ngoài ra, trên phổ proton còn xuất hiện tín hiệu của nhóm methoxy tại δ_H 3,84 (3H, s). Phổ ^{13}C-NMR cũng cho thấy tín hiệu của vòng thơm thế *para* tại δ_C 122,3 (C-1), 132,7 (C-2, C-6), 115,2 (C-3, C-5) và 163,5 (C-4). Tín hiệu tại δ_C 168,7 (C-7) đặc trưng cho carbon carbonyl. Tín hiệu của nhóm methoxy liên kết với C-7 được quan sát tại δ_C 52,2 (đối với 4-OCH_3, δ_C 55 – 56 [89]). Từ các Số liệu từ phổ NMR, kết hợp so sánh với tài liệu tham khảo [88], **WI1** được xác định là methyl 4-hydroxybenzoat (**Hình 3.4**).



Hình 3.4. Cấu trúc hóa học của hợp chất WI1

3.1.2.2. Hợp chất WI2 (syringin)

Hợp chất **WI2** được thu nhận dưới dạng bột vô định hình không màu. Phổ ^{1}H-NMR (500 MHz, CD_3OD) và phổ ^{13}C-NMR (125 MHz, CD_3OD): xem **Bảng 3.2**.

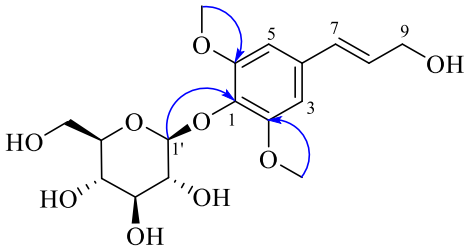
Bảng 3.2. Số liệu phổ NMR của WI2 và hợp chất tham khảo

Vị trí	**WI2**		**Syringin** [90]	
	δ_H[a,b] **(mult., *J* = Hz)**	δ_C[a,c]	δ_H[a,d] **(mult., *J* = Hz)**	δ_C[a,e]
1	–	135,9	–	135,9
2, 6	–	154,4	–	154,4
3, 5	6,78 (2H, s)	105,5	6,78 (2H, s)	105,5
4	–	135,3	–	135,3
7	6,57 (1H, d, 15,9)	131,3	6,58 (1H, dt, 15,9; 1,6)	131,3
8	6,35 (1H, dt, 15,9; 5,6)	130,1	6,35 (1H, dt, 15,9; 5,6)	130,0
9	4,25 (1H, dd, 5,6; 1,4)	63,6	4,25 (1H, dd, 5,6; 1,6)	63,6
2,6-OCH_3	3,88 (6H, s)	57,1	3,89 (6H, s)	57,0
1′	4,89 (1H)*	105,4	4,90 (1H, d, 7,5)	105,4
2′	3,41–3,54 (3H, m)	75,8	3,41–3,54 (3H)*	75,7
3′		78,4		78,4
4′		71,4		71,4
5′	3,24 (1H, m)	77,9	3,24 (1H, m)	77,8
6′	3,80 (1H, dd, 12,0; 2,3) 3,69 (1H, dd, 12,0; 5,1)	62,6	3,81 (1H, dd 11,9; 2,4) 3,69 (1H, dd 11,9; 5,2)	62,6

*[a] CD_3OD, [b]500 MHz, [c] 125 MHz, [d] 600 MHz, [e] 150 MHz, *: tín hiệu bị chồng chập*

Phân tích phổ NMR cho thấy **WI2** có các tín hiệu đặc trưng của một phenylpropanoid glycosid. Trên phổ ^{1}H-NMR, tín hiệu singlet tại δ_H 6,78 (2H, s, H-3, H-5) đặc trưng cho vòng benzen thế 1,2,4,6, phù hợp với các tín hiệu carbon thơm trên phổ ^{13}C-NMR tại δ_C 135,9 (C-1), 154,4 (C-2, C-6), 105,5 (C-3, C-5) và 135,3 (C-4). Ngoài ra, trên phổ proton còn xuất hiện tín hiệu của 1 nối đôi có cấu hình *trans* tại δ_H 6,57 (1H, d, *J* = 15,9 Hz, H-7) và 6,35 (1H, dt, *J* = 15,9; 5,6 Hz, H-8) và 1 nhóm oxymethylen tại δ_H 4,25 (1H, dd, *J* = 5,6; 1,4 Hz, H-9) tương ứng với các carbon tại δ_C 131,3 (C-7), 130,1 (C-8) và 63,6 (C-9). Tín hiệu của nhóm methoxy cũng được quan sát tại δ_H 3,88 (6H, s) và δ_C 57,1 (2,6-OCH_3). Vị trí của nhóm methoxy được xác định thông qua tương tác HMBC giữa các proton δ_H 3,88 (-OCH_3) và 6,78 (H-3, H-5) với carbon δ_C 154,4 (C-2, C-6). Các Số liệu này hoàn toàn phù hợp với cấu trúc aglycon của syringin [90]. Gốc đường glucopyranosyl được xác định thông qua tín hiệu proton anomeric tại δ_H 4,89 cùng với các proton hydroxymethin [δ_H 3,24 (1H, m) và 3,41–3,54 (3H, m)] và

hydroxymethylen [δ_H 3,80 (1H, dd, J = 12,0; 2,3 Hz) và 3,69 (1H, dd, J = 12,0; 5,1 Hz] và các carbon tại δ_C 105,4 (C-1′), 75,8 (C-2′), 78,4 (C-3′), 71,4 (C-4′), 77,9 (C-5′) và 62,6 (C-6′). Vị trí của gốc đường được xác định tại C-1 thông qua tương tác HMBC giữa δ_H 4,89 (H-1′) với carbon tại δ_C 135,9 (C-1). Từ Số liệu trên kết hợp với so sánh, đối chiếu với tài liệu tham khảo [90], có thể kết luận **WI2** là syringin (**Hình 3.5**).



Hình 3.5. Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC chính (→) của hợp chất WI2

3.1.2.3. Hợp chất WI3 (umbelliferon)

Hợp chất **WI3** được phân lập dưới dạng tinh thể màu trắng ngà. Phổ ESI-MS xuất hiện pic ion giả phân tử $[M–H]^-$ tại *m/z* 161,15, phù hợp với công thức phân tử $C_9H_6O_3$ (M = 162,14 Da). Phổ ^{1}H-NMR (600 MHz, aceton-d_6) và phổ ^{13}C-NMR (150 MHz, aceton-d_6): xem **Bảng 3.3**.

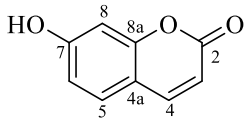
Bảng 3.3. Số liệu phổ NMR của WI3 và hợp chất tham khảo

Vị trí	**WI3**		**Umbelliferon** [91]	
	$\delta_H^{a,b}$ (mult., J = Hz)	**$\delta_C^{a,b}$**	**$\delta_H^{d,b}$ (mult., J = Hz)**	**$\delta_C^{d,b}$**
2	–	162,3	–	162,0
3	6,15 (1H, d, 9,6)	112,6	6,12 (1H, d, 9,6)	112,8
4	7,85 (1H, d, 9,6)	144,9	7,71 (1H, d, 9,6)	144,8
4a	–	112,6	–	112,9
5	7,48 (1H, d, 8,4)	130,4	7,37 (1H, d, 8,4)	130,2
6	6,82 (1H, dd, 8,4; 1,8)	113,9	6,77 (1H, dd, 8,4; 1,8)	114,0
7	–	161,3	–	161,9
8	6,74 (1H, d, 1,8)	103,2	6,72 (1H, d, 1,8)	103,6
8a	–	156,9	–	156,8

[a)]Aceton-d_6, [b)] 600 MHz, [c)]150 MHz, [d)] $CDCl_3$: aceton-d_6 (1:1)

Trên phổ ^{1}H-NMR của **WI3** cho thấy tín hiệu của 5 proton, trong đó có 2 proton double tại δ_H 6,15 và 7,85 với hằng số ghép 9,6 Hz được gán cho các proton gắn ở vị trí C-3 và C-4. Tương tự, hai proton khác ở δ_H 6,82 (J = 8,4; 1,8 Hz), δ_H 7,48 (J = 8,4 Hz)

và một nhóm singlet ở δ_H 6,64, lần lượt được gán cho các proton gắn với C-6, C-5 và C-8. Phổ ^{13}C-NMR cho thấy 9 tín hiệu carbon. Tín hiệu tại δ_C 162,3 được gán cho nhóm carbonyl (C-2) của các dẫn xuất coumarin trong khi tín hiệu ở δ_C 161,7 cho thấy sự hiện diện của nhóm hydroxyl ở vị trí C-7. Các tín hiệu khác tại δ_C 103,2, 112,6, 113,9, 130,4, 144,6 và 156,9 được quy cho C-8, C-3, C-4a, C-6, C-5, C-4 và C-8a. Từ các Số liệu phổ trên kết hợp với so sánh tài liệu tham khảo [91] có thể kết luận **WI3** là umbelliferon (**Hình 3.6**).



Hình 3.6. Cấu trúc hóa học của hợp chất WI3

3.1.2.4. Hợp chất WI4 (adicardin)

Hợp chất **WI4** được phân lập dưới dạng chất rắn màu trắng. Phổ ^{1}H-NMR (500 MHz, CD_3OD) và ^{13}C-APT NMR (125 MHz, CD_3OD): xem **Bảng 3.4**.

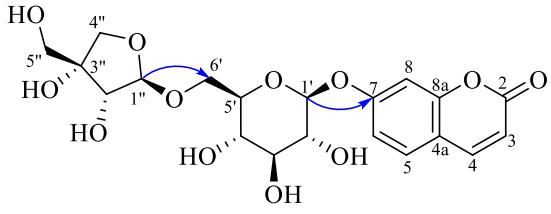
Bảng 3.4. Số liệu phổ NMR của WI4 và hợp chất tham khảo

Vị trí	WI4		Adicardin [92]	
	$\delta_H^{a,b}$ (mult., J = Hz)	$\delta_C^{a,c}$	$\delta_H^{d,b}$ (mult., J = Hz)	$\delta_C^{d,c}$
1	–	–	–	–
2	–	162,0	–	160,2
3	6,32 (1H, d, 9,5)	112,9	6,32 (1H, d, 9,2)	l13,2
4	7,93 (1H, d, 9,5)	144,3	7,99 (1H, d, 8,2)	144,2
4a	–	113,9		l13,3
5	7,60 (1H, d, 8,6)	129,0	7,64 (1H, d, 8,2)	129,5
6	7,11 (1H, d, 8,6)	114,0	7,02–7,00 (1H, m)	l13,4
7	–	160,7		160,1
8	7,15 (1H, s)	103,7	7,02–7,00 (1H, m)	103,3
8a	–	155,3		155,0
1′	5,00 (1H)*	100,6	4,98 (1H, d, 7,2)	99,9
2′	3,72 (1H, m)	75,8	3,73 (1H, dd, 6,4; 3,2)	73,4
3′	3,51 (1H, m)	73,4	3,59–3,57 (1H, m)	73,1
4′	3,36 (1H, m)	70,3	3,59–3,57 (1H, m)	69,8
5′	3,99 (1H, m)	76,9	3,44 (1H, dd, 11,2; 3,2)	76,4

Vị trí	WI4		Adicardin [92]	
	δ_H[a,b] (mult., *J* = Hz)	δ_C[a,c]	δ_H[d,b] (mult., *J* = Hz)	δ_C[d,c]
6′	4,07 (1H, m) 3,63 (1H, m)	67,6	3,16–3,11 (2H, m)	67,6
1″	5,00 (1H)*	109,8	4,79 (1H, d, 3,6)	109,3
2″	3,52 (1H, m)	76,6	3,88 (1H, d, 9,2)	75,9
3″	–	79,1		78,7
4″	4,07 (1H, m) 3,79 (1H, m)	73,6	3,30–3,25 (2H, m)	75,5
5″	3,63 (2H, m)	64,2	3,39–3,31 (2H, m)	63,2

*[a] CD_3OD, [b] 500 MHz, [c] 125 MHz, *: tín hiệu bị chồng chập, [d] DMSO-d_6*

Phổ NMR của **WI4** cho thấy sự tương đồng với **WI3** ngoại trừ sự xuất hiện thêm các tín hiệu thuộc 2 gốc đường hexose và pentose. Phổ ^{1}H-, ^{13}C-NMR kết hợp với phổ HMQC cho thấy gốc đường hexose là glucopyranosyl với các tín hiệu tại δ_H 5,00 (1H, H-1′), 3,72 (1H, m, H-2′), 3,51 (1H, m, H-3′), 3,36 (1H, m, H-4′), 3,99 (1H, m, H-5′), 4,07 (1H, m, H-6′), 3,63 (1H, m, H-6′) và δ_C 100,6 (C-1′), 75,8 (C-2′), 73,4 (C-3′), 70,3 (C-4′), 76,9 (C-5′) và 67,6 (C-6′). Gốc đường aipose cũng được xác định thông qua các tín hiệu tại δ_H 5,00 (1H, H-1″), 3,52 (1H, m, H-2″), 4,07 (1H, m, H-4″), 3,79 (1H, m, H-4″) và 3,63 (1H, m, H-5″) và δ_C 109,8 (C-1″), 76,6 (C-2″), 79,1 (C-3″), 73,6 (C-4″) và 64,2 (C-5″) thông qua phổ ^{1}H-, ^{13}C-NMR và HMQC. Vị trí của gốc đường glucopyranosyl được xác định tại C-7 thông qua tương tác HMBC giữa H-1′ (δ_H 5,00) với carbon δ_C 160,7 (C-7). Gốc đường apiose được xác định tại C-6″ thông qua tương tác HMBC giữa H-1″ (δ_H 5,00) với carbon δ_C 67,6 (C-6″) cũng như sự chuyển dịch về phía trường thấp của C-6″ (δ_C 67,6) so với dạng tự do (δ_C 62,6) như trong cấu trúc đường của **WI2**. Từ Số liệu phổ NMR và đối chiếu tài liệu tham khảo [92], hợp chất **WI4** được xác định là *β*-D-apiofuranosyl-(1→6)-*β*-D-glucopyranosylumbelliferon hay adicardin (**Hình 3.7**).



Hình 3.7. Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC (→) chính của hợp chất WI4

3.1.2.5. Hợp chất WI5 (daphnoretin)

Hợp chất **WI5** được phân lập dưới dạng tinh thể màu vàng nhạt. Phổ ESI-MS xuất hiện pic ion giả phân tử tại *m/z* 351,15 $[M–H]^-$, phù hợp với công thức phân tử $C_{19}H_{12}O_7$ (M = 352,30 Da). Phổ ^{1}H-NMR (600 MHz, aceton-d_6) và ^{13}C-NMR (150 MHz, aceton-d_6): xem **Bảng 3.5**.

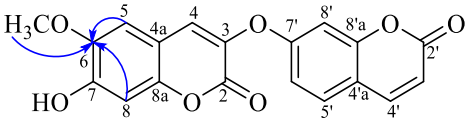
Bảng 3.5. Số liệu phổ NMR của WI5 và hợp chất tham khảo

Vị trí	**WI5**		**Daphnoretin** [93]	
	δ_H[a,c] **(mult., *J* = Hz)**	δ_C[a,b]	δ_H[d,c] **(mult., *J* = Hz)**	δ_C[d,b]
2	–	161,0	–	160,4
3	–	137,0	–	136,2
4	7,82 (1H, s)	131,5	7,88 (1H, s)	131,2
4a	–	111,1	–	110,6
5	7,21 (1H, s)	110,1	7,22 (1H, s)	110,0
6	–	146,8	–	146,1
7	–	151,7	–	150,8
8	6,88 (1H, s)	103,8	6,87 (1H, s)	103,2
8a	–	148,8	–	147,9
6-OCH_3	3,89 (3H, s)	56,6	3,92 (3H, s)	56,5
2′	–	160,5	–	160,1
3′	6,31 (1H, d, 9,6)	114,8	6,39 (1H, d, 9,5)	114,3
4′	7,97 (1H, d, 9,6)	144,3	8,05 (1H, d, 9,5)	144,5
4′a	–	115,3	–	114,9
5′	7,68 (1H, d, 8,4)	130,5	7,72 (1H, d, 8,6)	130,3
6′	7,08 (1H, dd, 8,4; 2,4)	114,1	7,12 (1H, dd, 8,6; 2,4)	113,9
7′	–	157,6	–	157,4
8′	7,06 (1H, d, 2,4)	104,7	7,20 (1H, d, 2,4)	104,5
8′a	–	156,3	–	155,5

[a] Aceton-d_6, [b] 600 MHz, [c] 150 MHz, [d] DMSO-d_6,

Phổ NMR của **WI5** cho thấy các tín hiệu của một bicoumarin với 6 proton của umbelliferon [δ_H 6,31 (1H, d, *J* = 9,6 Hz), 7,97 (1H, d, *J* = 9,6 Hz), 7,68 (1H, d, *J* = 8,4 Hz), 7,08 (1H, dd, *J* = 8,4; 2,4 Hz) và 7,06 (1H, d, *J* = 2,4 Hz)] và 3 tín hiệu của proton

thơm còn lại tại δ_H 7,82 (1H, s), 7,21 (1H, s) và 6,88 (1H, s) thuộc đơn vị coumarin thứ 2. Ngoài ra, trên phổ ^{1}H-NMR còn xuất hiện tín hiệu của nhóm methoxy tại δ_H 3,89. Phổ ^{13}C-NMR cho thấy chất **WI5** có 19 carbon trong đó 1 nhóm methoxy, 8 nhóm CH, 10 carbon không liên kết với hydro. Tín hiệu của nhóm methoxy được quan sát tại δ_C 56,6; các tín hiệu của nhóm carbonyl cũng được quan sát tại δ_C 161,0 (C-2) và δ_C 160,5 (C-2′); bên cạnh đó còn các tín hiệu của 2 carbon bậc 4 của vòng thơm ở δ_C 146,8 và δ_C 151,7 được gán cho C-6 và C-7, cùng với các tín hiệu của carbon trong vòng benzen và carbon nối đôi ở vùng trường thấp. Vị trí của nhóm methoxy được xác định thông qua tương tác HMBC giữa các proton δ_H 3,89 (-OCH_3), H-5 (δ_H 7,21) và H-8 (δ_H 6,88) với C-6 (δ_C 146,8). Từ các Số liệu phổ NMR và MS kết hợp so sánh với tài liệu tham khảo [93], có thể khẳng định **WI5** là daphnoretin (**Hình 3.8**).



Hình 3.8. Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC (→) chính của hợp chất WI5

3.1.2.6. Hợp chất WI6 (daphnorin)

Hợp chất **WI6** được phân lập dưới dạng chất rắn màu trắng. Phổ ^{1}H-NMR (600 MHz, DMSO-d_6) và ^{13}C-NMR (150 MHz, DMSO-d_6): xem **Bảng 3.6**.

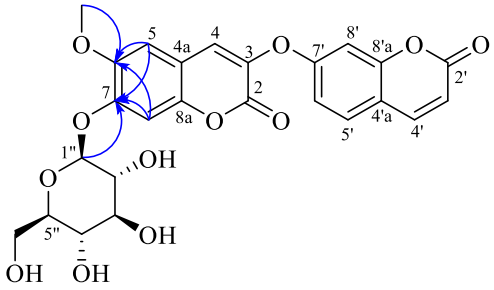
Bảng 3.6. Số liệu phổ NMR của WI6 và hợp chất tham khảo

Vị trí	**WI6**		**Daphnorin** [94]	
	δ_H[a,b] (mult., *J* = Hz)	**δ_C[a,c]**	**δ_H[a,b] (mult., *J* = Hz)**	**δ_C[a,c]**
2	–	156,9	–	156,9
3	–	137,1	–	137,1
4	7,87 (1H, s)	129,9	7,86 (1H, s)	129,8
5	7,24 (1H, s)	109,5	7,27 (1H, s)	109,5
6	–	146,4	–	146,4
7	–	149,1	–	149,0
8	7,28 (1H, s)	103,0	7,23 (1H, s)	103,0
8a	–	146,7	–	146,7
4a	–	112,2	–	112,2
2′	–	160,0	–	159,9
3′	6,38 (1H, d, 9,6)	114,0	6,38 (1H, d, 9,6)	114,0

Vị trí	WI6		Daphnorin [94]	
	δ_H[a,b] (mult., *J* = Hz)	δ_C[a,c]	δ_H[a,b] (mult., *J* = Hz)	δ_C[a,c]
4′	8,04 (1H, d, 9,6)	144,0	8,03 (1H, d, 9,6)	144,0
5′	7,72 (1H, d, 8,4)	129,9	7,71 (1H, d, 8,8)	129,9
6′	7,14 (1H, dd, 8,4; 2,4)	113,7	7,13 (1H, dd, 8,8; 2,4)	113,7
7′	–	159,4	–	159,4
8′	7,22 (1H, d, 1,8)	104,4	7,22 (1H, d, 2,4)	104,4
8′a	–	155,0	–	155,0
4′a	–	114,6	–	114,6
1″	5,04 (1H, d, 5,4)	99,7	5,04 (1H, d, 5,6)	99,7
2″	3,32 (1H, m)	73,1	–	73,1
3″	3,32 (1H, m)	76,8	–	76,7
4″	3,18 (1H, m)	69,6	–	69,6
5″	3,43 (1H, m)	77,1	–	77,1
6″	3,69 (1H, m) 3,43 (1H, m)	60,7	4,55 (2H, t, 5,4)	60,6
6-OCH_3	3,81 (3H, s)	56,1	3,71 (3H, s)	56,0

[a] DMSO-d_6, [b] 600 MHz, [c] 150 MHz

Phổ NMR của **WI6** tương tự như **WI5** ngoại trừ sự xuất hiện của liên kết *β*-glucopyranosyl tại δ_H 5,04 (1H, d, *J* = 5,4 Hz, H-1″), 3,32 (1H, m, H-2″), 3,32 (1H, m, H-3″), 3,18 (1H, m, H-4″), 3,43 (1H, m, H-5″), 3,69 (1H, m, H-6″), 3,43 (1H, m, H-6″) và các carbon tại δ_C 99,7 (C-1″), 76,8 (C-2″), 73,1 (C-3″), 69,6 (C-4″), 77,1 (C-5″) và 60,7 (C-6″). Vị trí của gốc đường được xác định tại C-7 thông qua tương tác HMBC giữa các proton δ_H 5,04 (H-1″), H-5 (δ_H 7,24) và H-8 (δ_H 7,28) với carbon δ_C 149,1 (C-7). Ngoài ra, vị trí của nhóm methoxy tại C-6 cũng được xác định thông qua tương tác HMBC giữa các proton δ_H 3,81 (-OCH_3), H-5 và H-8 với carbon δ_C 146,4 (C-6). Từ các Số liệu phổ thu được kết hợp so sánh với tài liệu tham khảo [94] có thể kết luận hợp chất **WI6** là daphnorin (**Hình 3.9**).



Hình 3.9. Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC (→) chính của hợp chất WI6

3.1.2.7. Hợp chất WI7 (wikstronutin)

Hợp chất **WI7** được phân lập dưới dạng bột vô định hình màu vàng nhạt. Phổ ESI-MS cho thấy pic ion giả phân tử $[M+Na]^+$ tại *m/z* 639,48, tương ứng với công thức phân tử $C_{29}H_{28}O_{15}$. Phổ ^{1}H-NMR (500 MHz, CD_3OD) và phổ ^{13}C-NMR (125 MHz, CD_3OD); xem **Bảng 3.7**.

Bảng 3.7. Số liệu phổ NMR của hợp chất WI7 và hợp chất tham khảo

Vị trí	**WI7**		**Wikstronutin** [95]	
	$\delta_H^{a,b}$ (**mult., *J* = Hz**)	$\delta_C^{b,c}$	$\delta_H^{d,e}$ (**mult., *J* = Hz**)	$\delta_C^{d,f}$
2	–	163,0	–	161,3
3	6,36 (1H, d, 9,5)	115,4	6,40 (1H, d, 9,5)	115,4
4	7,89 (1H)*	145,5	7,70 (1H, d, 9,5)	143,7
4a	–	114,5	–	114,3
5	7,45 (1H, s)	122,1	7,40 (1H, s)	121,4
6	–	153,9	–	153,5
7	–	154,0	–	154,0
8	7,48 (1H, s)	106,6	7,81 (1H, s)	106,5
8a	–	142,1	–	141,5
2′	–	162,9		161,1
3′	6,29 (1H, d, 9,5)	115,3	6,34 (1H, d, 9,5)	115,0
4′	7,89 (1H)*	145,0	7,67 (1H, d, 9,5)	144,2
4′a	–	115,6	–	114,7
5′	7,57 (1H, d, 8,6)	130,7	7,46 (1H, d, 8,5)	130,3
6′	6,95 (1H, dd, 8,6; 2,2)	114,9	7,01 (1H, dd, 8,5; 2,4)	114,2
7′	–	163,0	–	162,2
8′	6,83 (1H, d, 2,2)	105,1	7,02 (1H, d, 2,4)	105,3

Vị trí	**WI7**		**Wikstronutin** [95]	
	δ_H[a,b] (**mult., *J* = Hz**)	δ_C[b,c]	δ_H[d,e] (**mult., *J* = Hz**)	δ_C[d,f]
8′a	–	156,7	–	156,4
Glc-C-1″	5,05 (1H, d, 7,8)	101,9	5,71 (1H, d, 7,7)	103
Glc-C-2″	3,29 (1H)*	74,6	4,10–4,15 (1H, m)	74,8
Glc-C-3″	3,29 (1H)*	77,9	4,35–4,42 (1H, m)	77,9
Glc-C-4″	3,29 (1H)*	71,0	4,35–4,42 (1H, m)	71,4
Glc-C-5″	3,77 (1H, m)	77,2	4,10–4,15 (1H, m)	79,0
Glc-C-6″	4,07 (1H, d, 10,7) 3,64 (1H, m)	70,7	4,35–4,42 (1H, m) 4,75–4,77 (1H, m)	70,6
Xyl-C-1‴	4,30 (1H, d, 7,0)	105,9	4,94 (1H, d, 7,1)	106,8
Xyl-C-2‴	3,29 (1H)*	75,0	4,10–4,15 (1H, m)	75,4
Xyl-C-3‴	3,41 (1H, t, 9,1)	78,0	4,30 (1H, t, 9,0)	78,9
Xyl-C-4‴	3,29 (1H)*	71,4	4,20 (1H, t, 9,0)	71,5
Xyl-C-5‴	3,92 (1H, dd, 11,4; 5,4) 3,17 (1H, t, 10,9)	66,9	3,65–3,68 (1H, m) 4,35–4,42 (1H, m)	67,7

*[a] CD_3OD, [b] 500 MHz, [c] 125 MHz, *: tín hiệu bị chồng chập, [d] pyridine-d_5, [e] 600 MHz, [f] 150 MHz.*

Phổ ^{1}H-NMR của **WI7** cho thấy sự hiện diện của hai bộ proton olefinic đặc trưng cho hai nhân coumarin. Cụ thể, tín hiệu đôi của H-3 và H-3′ lần lượt ghi nhận tại δ_H 6,36 (1H, d, J = 9,5 Hz) và 6,29 (1H, d, J = 9,5 Hz), trong khi các proton tương ứng H-4 và H-4′ xuất hiện dưới dạng tín hiệu chồng lặp tại δ_H 7,89. Hằng số ghép J = 9,5 Hz đặc trưng cho proton ở vị trí 3,4 trên vòng α-pyron, chứng minh sự hiện diện của hai khung coumarin trong phân tử.

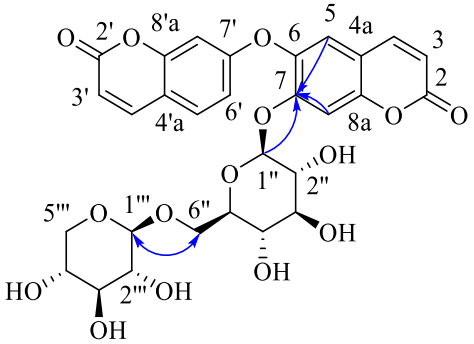
Ngoài ra, phổ ^{1}H-NMR thể hiện hệ ABX đặc trưng cho vòng benzen 1,2,3-thế tại δ_H 7,57 (1H, d, J = 8,6 Hz, H-5′), 6,95 (1H, dd, J = 8,6; 2,2 Hz, H-6′) và 6,83 (1H, d, J = 2,2 Hz, H-8′). Các tín hiệu singlet thơm còn lại tại δ_H 7,45 (H-5) và 7,48 (H-8) phù hợp với cấu trúc của nhân coumarin ban đầu. Những tín hiệu này phù hợp với Số liệu NMR của wikstronutin trong tài liệu [95]. Bên cạnh đó trên phổ NMR, hợp chất **WI7** còn thể hiện hai proton anomeric tại δ_H 5,05 (1H, d, J = 7,8 Hz, H-1″, glucose) và δ_H 4,30 (1H, d, J = 7,0 Hz, H-1‴, xylose), khẳng định sự có mặt của hai đơn vị đường. Hằng số ghép đôi của proton anomeric ≥ 7 Hz cho thấy cả hai đường đều mang cấu hình beta.

Hai chín tín hiệu carbon được ghi nhận dựa trên phổ ^{13}C APT NMR phù hợp với công thức cấu tạo của một *bis*-coumarin diglycosid, kết hợp với HSQC giúp phân loại các nguyên tử carbon trong phân tử thành 4 loại dựa trên số lượng proton gắn trực tiếp. Trong đó, hai carbonyl ester đặc trưng của coumarin xuất hiện tại δ_C 163,0 (C-2) và 162,9 (C-2′). Bảy carbon sp^2 không mang proton trong khoảng δ_C 141,5–163,0. Tín hiệu của các carbon sp^2 mang proton được ghi nhận tại δ_C 115,4; 145,5; 122,1; 106,6; 115,3; 145,0; 130,7; 114,9 và 105,1, tương ứng với các cabon sp^2 và hai vòng benzen thế 1,2,4- và 1,2,4,5.

Tín hiệu của hai đơn vị đường cũng được ghi nhận, tương ứng với glucose δC 101,9 (C-1″), 74,6 (C-2″), 77,9 (C-3″), 71,0 (C-4″), 77,2 (C-5″), 70,7 (C-6″) và xylose với δ_C 105,9 (C-1‴), 75,0 (C-2‴), 78,0 (C-3‴), 71,4 (C-4‴) và 66,9 (C-5‴).

Số liệu HMBC cho phép xác định mối liên kết giữa đường và aglycon. Tương tác HMBC giữa H-1″ (δ_H 5,05), H-5 (δ_H 7,45), H-8 (δ_H 7,48) với C-7 (δ_C 154,0) cho thấy đơn vị glucose gắn trực tiếp vào C-7 của nhân coumarin, hình thành liên kết *O*-glycosid. Tương tác HMBC giữa H-6″a,b (δ_H 4,07/3,64) và C-1‴ (δ_C 105,9), cùng với tương tác từ H-1‴ (δ_H 4,30) về C-6″ (δ_C 70,7), chứng minh liên kết glycosid *β*-D-xylopyranosyl-(1→6)-*β*-D-glucopyranosid.

Dựa trên Số liệu phổ 1D, 2D và ESI-MS, kết hợp với đối chiếu với tài liệu tham khảo [68], có thể xác định hợp chất **WI7** là wikstronutin (**Hình 3.10**).



Hình 3.10. Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC (→) chính của hợp chất WI7

3.1.2.8. Hợp chất WI8 (triumbelletin-7-O-β-D-glucosid)

Hợp chất **WI8** được phân lập dưới dạng chất rắn vô định hình màu vàng nhạt. Phổ HR-ESI-MS hiển thị các ion tại *m/z* 645,1150 phù hợp với các ion $[M+H]^+$ của phân tử có khối lượng phân tử 644,12 Da. Khối lượng này trùng khớp với công thức phân tử $C_{33}H_{24}O_{14}$ (M= 644,1166 Da). Phổ ^{1}H-NMR (500 MHz, CD_3OD) và phổ ^{13}C-NMR (125 MHz, CD_3OD); xem **Bảng 3.8**.

Bảng 3.8. Số liệu phổ NMR của hợp chất WI8 và hợp chất tham khảo

Vị trí	WI8		Triumbelletin-7-*O*-*β*-D-glucosid [28]	
	δ_H[a,b] (**mult., *J* = Hz**)	δ_C[a,c]	δ_H[d,e] (**mult., *J* = Hz**)	δ_C[d,f]
2	–	159,0	–	158,1
3	–	138,8	–	138,3
4	7,73 (1H, s)	130,9	7,85 (1H, s)	130,6
5	7,52 (1H, d, 8,4)	130,3	7,66 (1H)*	129,8
6	7,42 (1H, d, 8,4)	115,4	7,97 (1H, d, 8,7)	115,2
7	–	159,4	–	160,1
8	–	111,9	–	112,7
9	–	151,8	–	152,0
10	–	115,1	–	115,0
2′	–	160,8	–	161,0
3′	6,30 (1H, d, 9,6)	115,4	6,41 (1H, d, 9,6)	115,2
4′	7,84 (1H)*	146,1	7,79 (1H, d, 9,6)	144,1
5′	7,51 (1H, d, 8,4)	130,5	7,56 (1H, d, 8,4)	130,5
6′	6,94 (1H, d, 8,4)	114,9	7,07 (1H, d, 8,4; 1,8)	114,5
7′	–	160,6	–	160,5
8′	7,0 (1H)*	106,1	7,13 (1H, d, 1,8)	105,6
9′	–	156,5	–	156,4
10	–	116,4	–	115,8
2″	–	163,9	–	162,1
3″	6,13 (1H, d, 9,6)	113,5	6,26 (1H, d, 9,3)	113,1
4″	7,84 (1H)*	146,1	7,68 (1H)*	144,6
5″	7,61 (1H, d, 9,0)	130,5	7,42 (1H, d, 8,4)	130,0
6″	7,02 (1H)*	114,1	7,22 (1H, d, 8,4)	114,0
7″		162,7		161,4
8″		108,2		108,7
9″		154,9		155,3
10″		112,5		112,9

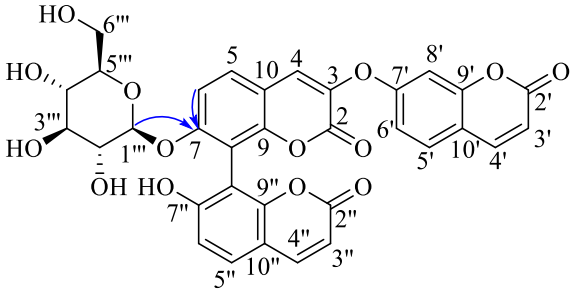
Vị trí	WI8		Triumbelletin-7-*O*-*β*-D-glucosid [28]	
	δ_H[a,b] (**mult., *J* = Hz**)	δ_C[a,c]	δ_H[d,e] (**mult., *J* = Hz**)	δ_C[d,f]
1‴	5,07 (1H, d, 7,8)	102,6	5,80 (1H, d, 7,8)	103,8
2‴	3,18 (1H, m)	74,7	4,02 (1H, m)	75,2
3‴	3,42 (1H, m)	78,2	4,33 (1H, m)	79,1
4‴	3,33 (1H, m)	71,2	4,16 (1H, m)	71,8
5‴	3,47 (1H, m)	78,3	4,19 (1H, m)	79,7
6‴	3,91 (dd, 12,0, 2,4) 3,68 (dd, 12,0, 6,0)	62,6	4,37 (1H, m) 4,62 (d, 12,0)	63.0

*[a] CD_3OD, [b] 500 MHz, [c] 125 MHz, *: tín hiệu bị chồng chập, [d] pyridine-d_5, [e] 600 MHz, [f] 50 MHz.*

Phổ ^{1}H-NMR (500 MHz, CD_3OD) của **WI8** thể hiện nhiều bộ tín hiệu đặc trưng cho ba nhân coumarin, bao gồm hai bộ đôi của proton olefinic tại δ_H 6,30 (1H, d, *J* = 9,6 Hz, H-3′)/7,84 (H-4′, ovl) và δ_H 6,13 (1H, d, *J* = 9,6 Hz, H-3″)/7,84 (H-4″, ovl). Hằng số ghép đôi *J* = 9,6 Hz đặc trưng cho hệ proton H-3/H-4 trong vòng *α*-pyron của coumarin. Bên cạnh đó, hệ proton ABX điển hình của vòng benzen 1,3,4-thế được nhận diện tại δ_H 7,51 (1H, d, *J* = 8,4 Hz, H-5′), 6,94 (1H, d, *J* = 8,4 Hz, H-6′) và 7,01 (1H, ovl, H-8′). Tín hiệu singlet vùng trường thấp δ_H 7,73 (1H, s, H-4) cho thấy cấu trúc coumarin bị thế tại vị trí C-3, vốn là đặc điểm phổ của các *tri*-coumarin. Sự xuất hiện của proton anomeric tại δ_H 5,07 (1H, d, *J* = 7,8 Hz, H-1‴) cho thấy đơn vị đường của **WI8** thuộc dạng *β*-D-glucopyranose. Số liệu HSQC và ^{13}C-NMR xác nhận sự hiện diện của sáu carbon đường, bao gồm carbon anomeric tại δ_C 102,6 và các carbon sp^3 oxy hóa tại δ_C 74,7; 78,2; 71,2; 78,3 và 62,6. Phổ ^{13}C-NMR ghi nhận tổng cộng 33 tín hiệu carbon, bao gồm 6 carbon đường và 27 carbon thuộc hệ tricoumarin. Ba carbonyl lacton xuất hiện tại δ_C 159,0 (C-2), 160,8 (C-2′) và 163,9 (C-2″), xác nhận sự hiện diện của ba vòng coumarin.

Tương tác HMBC giữa proton anomeric H-1‴ (δ_H 5,07), và H-6 (δ_H 7,42) với C-7 (δ_C 159,4) xác nhận glucose gắn tại vị trí C-7 của khung tricoumarin.

Từ Số liệu phổ ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, HSQC, HMBC và so sánh với tài liệu tham khảo [28], hợp chất **WI8** được xác định là triumbelletin-7-*O*-*β*-D-glucosid (**Hình 3.11**).



Hình 3.11. Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC (→) chính của hợp chất WI8

3.1.2.9. Hợp chất WI9 (genkwanin)

Hợp chất **WI9** được phân lập dưới dạng bột vô định hình màu vàng. Giá trị của ^{1}H-NMR và ^{13}C-NMR của hợp chất **WI9** đo trong aceton-d_6 và hợp chất tham khảo đo trong dung môi DMSO-*d6* được trình bày trong **Bảng 3.9**.

Bảng 3. 9. Số liệu phổ NMR của hợp chất WI9 và hợp chất tham khảo

Vị trí	WI9		Genkwanin [96]	
	$^{a,b}\delta_H$ (mult., J = Hz)	$\delta_C^{a,c}$	$\delta_H^{d,e}$ (mult., J = Hz)	$\delta_C^{d,f}$
2	–	163,1	–	164,11
3	6,67 (1H, s)	104,2	6,63 (1H, s)	103,0
4	–	183,2	–	181,9
5	–	162,1	–	161,2
6	6,33 (1H, d, 1,8)	98,7	6,21 (1H, d, 2,0)	97, 9
7	–	166,6	–	165,1
8	6,69 (1H, d, 1,8)	93,2	6,46 (1H, d, 2,0)	92,7
9	–	158,7	–	157,2
10	–	106,0	–	104,7
1′	–	123,1	–	121,1
2′, 6′	7,96 (2H, d, 9,0)	129,3	7,94 (2H, d, 9,0)	128,5
3′, 5′	7,30 (2H, d, 9,0)	116,9	7,08 (2H, d, 9,0)	116,0
4′	–	165,4	–	164,11
-OMe	3,93 (3H, s)	56,4	3,88 (3H, s)	56,61
5-OH	12,97 (1H, s)	-	-	-

[a] Aceton-d_6, [b] 600 MHz, [c] 150 MHz, [d] DMSO-d_6, [e] 500 MHz, [f] 125 MHz

Phổ ^{1}H-NMR (600 MHz, acetone-d_6) cho thấy các tín hiệu đặc trưng của một dẫn xuất flavon. Trong đó, hệ proton thơm kiểu AA′BB′ của vòng B được quan sát tại δ_H

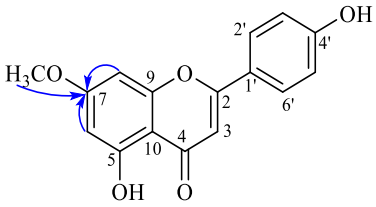
7,96 (2H, d, J = 9,0 Hz, H-2′,6′) và δ_H 7,30 (2H, d, J = 9,0 Hz, H-3′,5′). Kiểu ghép đôi này xác nhận vòng B là vòng benzen thế *para*, thường gặp trong các flavon *O*-methyl hóa. Phần vòng A thể hiện hai proton ghép *meta* điển hình tại δ_H 6,33 (1H, d, J = 1,8 Hz, H-6) và δ_H 6,69 (1H, d, J = 1,8 Hz, H-8), cùng với một tín hiệu singlet tại δ_H 6,67 (1H, s, H-3). Mô hình ghép này cho thấy dấu hiệu đặc trưng cho flavon có nhóm thế hút điện tử mạnh tại C-5 và C-7 (như OH hoặc O-Me). Sự xuất hiện của tín hiệu singlet methoxy tại δ_H 3,93 (3H, s) gợi ý sự có mặt của một nhóm methoxy gắn vào vòng A.

Phổ ^{13}C-NMR (150 MHz, acetone-d_6) ghi nhận tổng cộng 16 carbon, phù hợp với cấu trúc flavon monomer và một nhóm methoxy. Carbonyl của vòng chromen-4-on được ghi nhận tại δ_C 183,2 (C-4), là đặc trưng của hệ flavon. Carbon của nhóm methoxy xuất hiện tại δ_C 56,4, trùng khớp với tín hiệu proton tương ứng.

Tín hiệu carbon của vòng B tương ứng cấu trúc vòng benzen đối xứng thế 1,4 do có một cặp tín hiệu, mỗi tín hiệu tương ứng với 2 cacbon tại δ_C 129,3 (C-2′,6′) và 116,9 (C-3′,5′), phù hợp với Số liệu ^{1}H-NMR. Ở vòng A, các carbon không mang proton gồm C-5 (δ_C 162,1), C-7 (δ_C 166,6) và C-9 (δ_C 158,7), trong khi các carbon mang proton H-6 và H-8 được quan sát tại δ_C 98,7 và 93,2.

Số liệu HMBC cho phép xác định vị trí gắn của nhóm methoxy. Tương tác từ proton O-Me ở δ_H 3,93 tới carbon δ_C 166,6 (C-7), kết hợp với tương tác giữa H-6/H-8 và C-7, có thể khẳng định nhóm methoxy được gắn tại C-7, tạo hợp chất 7-*O*-methoxyflavon.

Từ các Số liệu phổ của **WI9** bao gồm ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, HMBC kết hợp với so sánh và đối chiếu với tài liệu tham khảo [96], có thể xác định hợp chất **WI9** là genkwanin (**Hình 3.12**) .



Hình 3. 12. Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC (→) chính của hợp chất WI9

3.1.2.10. Hợp chất WI10 (kaempferol 3-O-α-L-rhamnopyranosid)

Hợp chất **WI10** được phân lập dưới dạng bột vô định hình màu vàng. Phổ ^{1}H-NMR (600 MHz, CD_3OD) và phổ ^{13}C-NMR (150 MHz, CD_3OD); xem **Bảng 3.10**.

Bảng 3.10. Số liệu phổ NMR của hợp chất WI10 và hợp chất tham khảo

Vị trí	WI10		Kaempferol 3-*O*-*α*-L-rhamnopyranosid [97]	
	δ_H[a,b] (**mult., *J* = Hz**)	δ_C[a,c]	δ_H[d,e](**mult., *J* = Hz**)	δ_C[d,f]
2	–	159,3	–	157,1
3	–	136,2	–	134,2
4	–	179,7	–	177,6
5	–	163,2	–	161,2
6	6,23 (1H, brs)	99,9	6,22 (1H, d, 2,0)	98,7
7	–	166,0	–	164,2
8	6,41 (1H, brs)	94,8	6,42 (1H, d, 2,0)	93,7
9	–	158,6	–	156,4
10	–	105,9	–	104,1
1′	–	122,7	–	120,5
2′, 6′	7,79 (2H, d, 8,4)	131,9	7,76 (2H, d, 8,8)	130,5
3′, 5′	6,96 (2H, d, 8,4)	116,6	6,92 (2H, d, 8,8)	115,3
4′	–	161,6	–	159,9
1″	5,40 (1H, d, 1,2)	103,5	5,30 (1H, d, 1,5)	101,7
2″	4,24 (1H, brs)	71,9	–	70,0
3″	3,73 (1H, m)	72,2	–	70,5
4″	3,33 – 3,36 (1H)*	73,2	–	71,1
5″	3,33 – 3,36 (1H)*	72,0	–	70,3
6″	0,94 (3H, d, 5,4)	17,6	0,80 (3H, d, 5,8)	17,4

*[a] CD_3OD,[b] 600 MHz, [c] 150 MHz, * : tín hiệu bị chồng chập, [d] DMSO-d_6, [e] 500MHz, [f] 125 MHz.*

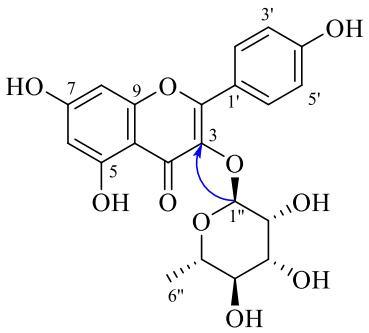
Trên phổ ^{1}H-NMR (600 MHz, CD_3OD) của **WI10** thể hiện các tín hiệu đặc trưng của khung flavonol. Trên vòng A, hai tín hiệu singlet rộng lần lượt tại δ_H 6,23 (1H, brs, H-6) và δ_H 6,41 (1H, brs, H-8) cho thấy hai proton cô lập, không ghép đôi, đặc trưng cho các flavonol có nhóm hydroxyl tại C-5 và C-7. Hệ proton thơm kiểu AA′BB′ của vòng B được quan sát tại tại δ_H 7,79 (2H, d, *J* = 8,4 Hz, H-2′/H-6′) và δ_H 6,96 (2H, d, *J* = 8,4 Hz, H-3′/H-5′), tương ứng với mô hình thế điển hình của kaempferol. Sự xuất hiện của một proton anomeric tại δ_H 5,40 (1H, d, *J* = 1,2 Hz, H-1″) cùng với một tín hiệu methyl doublet tại 0,94 δ_H (3H, d, *J* = 5,4 Hz, H-6″) là dấu hiệu của đường rhamnose,

cùng với hằng số ghép đôi rất nhỏ của proton anomeric ($J \approx 1{,}0$ Hz) gợi ý rằng đường có cấu hình alpha.

Phổ ^{13}C-NMR (150 MHz, CD_3OD) cho thấy tổng cộng 21 tín hiệu carbon. Trong đó 15 carbon thuộc aglycon kaempferol, gồm các giá trị đặc trưng như: δ_C 179,7 (C-4, carbonyl của flavonol), 163,2 (C-5), 166,0 (C-7) và 158,6 (C-9). Các carbon mang proton tương ứng với H-6 và H-8 lần lượt nằm tại δ_C 99,9 (C-6) và 94,8 (C-8). Vòng B thể hiện đầy đủ các carbon thơm tại δ_C 131,9 (C-2′/6′), 116,6 (C-3′/5′) và 161,6 (C-4′). Sáu carbon còn lại thuộc về đường rhamnose được ghi nhận tại δ_C 103,5 (C-1″), 71,9 (C-2″), 72,2 (C-3″), 73,2 (C-4″), 72,0 (C-5″) và 17,6 (C-6″), với carbon C-6″ là nhóm methyl đặc trưng (δ_H 0,94, 3H, d, J = 5,4 Hz).

Tương tác HMBC giữa proton anomeric H-1″ (δ_H 5,40) và carbon C-3 của aglycon tại δ_C 136,2 cho phép xác định đường rhamnose kết nối với aglycon tại vị trí C-3 thông qua liên kết *O*-glycosid.

Dựa trên các Số liệu phổ ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, HSQC và HMBC kết hợp với Số liệu trong tài liệu tham khảo [97], có thể kết luận hợp chất **WI10** là kaempferol 3-*O*-*α*-L-rhamnopyranosid (**Hình 3.13**).



Hình 3.13. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC (→) chính của hợp chất WI10

3.1.2.11. Hợp chất WI11 (yuankanin)

Hợp chất **WI11** được phân lập dưới dạng bột vô định hình màu vàng nhạt. Phổ ESI-MS cho thấy ion giả phân tử tại *m/z* 601,46 $[M+Na]^+$, phù hợp với công thức phân tử $C_{27}H_{30}O_{14}$ (M = 578,16 Da). Số liệu ^{1}H-NMR và ^{13}C-NMR (CD_3OD) của **WI11**; xem **Bảng 3.11**.

Bảng 3.11. Số liệu phổ NMR của hợp chất WI11 và hợp chất tham khảo

Vị trí	**WI11**		**Yuankanin** [98]	
	$\delta_H^{a,b}$ (**mult., *J* = Hz**)	$\delta_C^{a,c}$	$\delta_H^{a,d}$ (**mult., *J* = Hz**)	$\delta_C^{a,e}$
2	–	162,6	–	161,3
3	6,60 (1H, s)	106,8	6,65 (1H, s)	105,3
4	–	180,3	–	178,9
5	–	159,6	–	158,2
6	6,92 (1H, d, 2,2)	104,4	6,94 (1H, d, 2,5)	102,9
7		164,5		163,1
8	6,95 (1H, d, 2,2)	97,2	6,97 (1H, d, 2,5)	95,7
9	–	160,7	–	159,3
10	–	110,3	–	108,9
1′	–	123,0	–	121,5
2′, 6′	7,86 (2H, d, 8,4)	129,4	7,89 (2H, d, 8,5)	127,9
3′, 5′	6,94 (2H, d, 8,4)	117,1	6,95 (2H, d, 8,5)	115,6
4′	–	166,1	–	164,7
-OMe	3,97 (3H, s)	56,8	3,99 (3H, s)	55,3
1″	4,87 (1H, d, 7,8)	104,7	4,88 (1H, d, 7,5)	103,2
2″	3,63 (1H, t, 8,4)	74,7	3,63 (1H, t)	73,6
3″	3,35 (1H, t, 9,0)	77,7		76,3
4″	3,52 (1H, t, 9,0)	71,1	3,51 (1H, t)	69,7
5″	3,53 (1H, m)	77,2	3,51 (1H, dd)	75,8
6″	4,15 (1H, dd, 12,0; 1,8) 3,72 (1H, m)	70,5	4,14 (1H, d) 3,85 (1H, dd)	69,1
1‴	4,35 (1H, d, 7,2)	105,7	4,34 (1H, d, 7,5)	104,3
2‴	3,25 (1H, t, 8,4)	75,0	3,23 (1H)	73,6
3‴	3,53 (1H, m)	77,5	3,72 (1H, t)	76,0
4‴	3,44 (1H, t, 9,0)	71,5	3,43 (1H, m)	70,1
5‴	3,86 (1H, dd, 12,0; 6,6) 3,22 (1H, t, 10,8)	66,9	3,20 (1H, dd) 3,20 (1H, t)	65,4

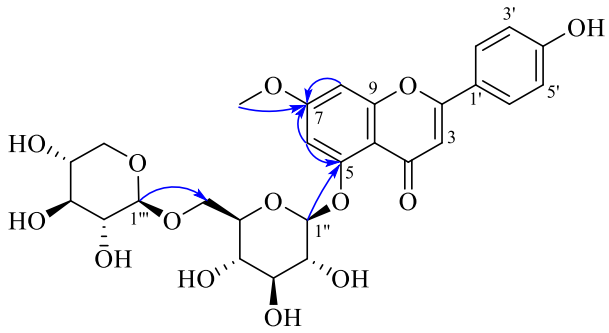
[a] CD_3OD, [b] 600 MHz, [c] 150 MHz, [d] 400 MHz, [e] 100 MHz

Phân tích phổ ^{1}H-NMR và ^{13}C-NMR (CD_3OD) của **WI11** cho thấy phần aglycon hoàn toàn tương đồng với **WI9**, chứng tỏ **WI11** mang khung genkwanin. Tuy nhiên, **WI11** có thêm hai đơn vị đường thể hiện qua các tín hiệu trong vùng δ_H 3,22–4,15 và δ_C 65–105. Hai proton anomeric xuất hiện tại δ_H 4,87 (1H, d, J = 7,8 Hz, H-1″) và δ_H 4,35 (1H, d, J = 7,2 Hz, H-1‴), đặc trưng cho các đường có cấu hình beta.

Phổ ^{13}C-NMR thể hiện 11 carbon thuộc phần đường, gán tương ứng cho một đơn vị β-D-glucopyranose và một đơn vị β-D-xylopyranose. Các tín hiệu carbon anomeric tại δ_C 104,7 (C-1″) và 105,7 (C-1‴) phù hợp với tài liệu tham khảo [98].

Số liệu HMBC cho phép xác định vị trí gắn của đường: proton anomeric của glucose H-1″ (δ_H 4,87) và H-6 (δ_H 6,92) cho tương tác với C-5 (δ_C 159,6) của aglycon, xác nhận glucose gắn tại vị trí C-5. Đồng thời, proton anomeric của xylose H-1‴ (δ_H 4,35) cho tương tác với C-6″ (δ_C 70,5), chỉ ra liên kết β-D-xylopyranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranoside.

Kết hợp Số liệu phổ NMR 1D/2D và phổ ESI-MS, kết hợp với so sánh, đối chiếu tài liệu tham khảo [98], có thể xác định **WI11** là yuankanin (**Hình 3.14**).



Hình 3.14. Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC (→) chính của hợp chất WI11

3.1.2.12. Hợp chất WI12 (erythro-syringylglycerol-8-O-4′-sinapyl ether 4-O-β-D-glucopyranosid)

Hợp chất **WI12** được phân lập dưới dạng bột màu trắng. Số liệu ^{1}H-NMR và ^{13}C-NMR của **WI12** đo trong CD_3OD; xem **Bảng 3.12**

Bảng 3.12. Số liệu phổ NMR của hợp chất WI12 và hợp chất tham khảo

Vị trí	WI12		***Syn*-syringylglycerol-8-*O*-4′-sinapyl ether 4-*O*-*β*-D-glucopyranosid** [99]	
	$\delta_H^{a,b}$ (**mult., *J* = Hz**)	$\delta_C^{a,c}$	$\delta_H^{a,b}$ (**mult., *J* = Hz**)	$\delta_C^{a,c}$
1	–	139,5	–	139,5
2	6,77 (2H, s)	106,0	6,77 (2H, s)	105,7
3	–	153,8	–	153,8
4	–	135,5	–	135,6

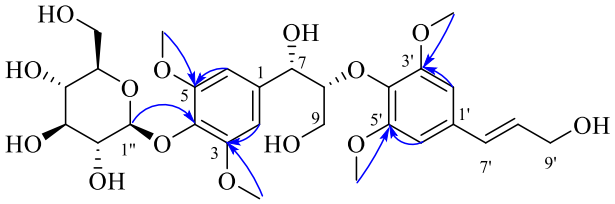
Vị trí	WI12		***Syn*-syringylglycerol-8-*O*-4′-sinapyl ether 4-*O*-*β*-D-glucopyranosid** [99]	
	$\delta_H^{a,b}$ (**mult., *J* = Hz**)	$\delta_C^{a,c}$	$\delta_H^{a,b}$ (**mult., *J* = Hz**)	$\delta_C^{a,c}$
5	–	153,8	–	153,8
6	6,77 (2H, s)	106,0	6,77 (2H, s)	105,7
7	4,94 (1H, d, 5,7)	74,0	4,95 (1H, d)	74,0
8	4,29 (1H, m)	87,1	4,30 (1H, m)	87,0
9	3,93 (1H, dd, 12,1; 5,1) 3,63 (1H, dd, 12,1; 3,5)	61,6	3,95 (1H, dd) 3,62 (1H, dd)	61,6
1′	–	134,7	–	134,7
2′	6,74 (1H, s)	104,9	6,75 (1H, s)	104,9
3′	–	154,5	–	154,5
4′	–	136,4	–	136,4
5′	–	154,5	–	154,5
6′	6,74 (1H, s)	104,9	6,75 (1H, s)	104,9
7′	6,56 (1H, d, 15,8)	131,3	6,55 (1H, d)	131,3
8′	6,34 (1H, dd, 15,8, 5,6)	129,9	6,35 (1H, dt)	129,9
9′	4,25 (2H, dd, 5,6, 1,3)	63,6	4,25 (2H, dd)	63,5
3,5-OCH_3	3,85 (6H, s)	56,7	3,86 (6H, s)	56,7
3′,5′-OCH_3	3,83 (6H, s)	57,0	3,83 (6H, s)	57,0
1″	4,81 (1H, d, 7,5)	105,7	4,80 (1H, d)	105,6
2″	3,49 (1H, m)	75,7	3,50 (1H, m)	75,7
3″	3,44 (1H, m)	77,8	3,44 (1H, m)	77,8
4″	3,43 (1H, m)	71,3	3,43 (1H, m)	71,4
5″	3,22 (1H, m)	78,3	3,22 (1H, m)	78,4
6″	3,87 (1H, m) 3,69 (1H, m)	62,6	3,87 (1H, m) 3,70 (1H, m)	62,6

[a)] CD_3OD, [b)] 500 MHz, [c)] 125 MHz

Phổ ^{1}H NMR của hợp chất (đo trong CD_3OD) thể hiện các tín hiệu proton đặc trưng cho hai vòng thơm đối xứng tại δ_H 6,77 (2H, s, H-2 và H-6), và δ_H 6,74 (2H, s, H-2′ và H-6′). Các nhóm methoxy được đặc trưng bởi các tín hiệu singlet tại δ_H 3,85 (6H, s) và 3,83 (6H, s). Hai olefinic proton tại δ_H 6,56 (1H, d, *J* = 15,8 Hz; H-7′) và 6,34 (1H, dd, *J* = 15,8; 5,6 Hz; H-8″), với hằng số ghép cặp lớn chỉ ra rằng liên kết đôi $\Delta^{7',8'}$ có cấu hình *E*. Thêm vào đó, sự xuất hiện của proton anomeric tại δ_H 4,81 (1H, d, *J* = 7,5 Hz), cùng với các tín hiệu vùng đường δ_H 3,20-3,67 cho thấy sự hiện diện của một đơn vị đường có cấu hình beta. Phổ ^{13}C NMR thể hiện các carbon thơm tại δ_C 139,5 (C-1), 153,8 (C-3, C-5), 135,5 (C-4), 106,0 (C-2, C-6); và δ_C 134,7 (C-1′), 154,5 (C-3′, C-5′),

136.4 (C-4′), 104.9 (C-2′, C-6′), phù hợp với hai vòng benzen đối xứng với các nhóm thế tại vị trí C-1,3,4,5. Các carbon mạch nhánh quan sát được tại δ_C 74,0 (C-7), 87,1 (C-8), 61,6 (C-9) và 131.3 (C-7′), 129.9 (C-8′), 63.6 (C-9′), kết hợp với 2 vòng benzen, gợi ý sự tồn tại của 2 đơn vị phenylpropanoid (C6-C3). Thêm vào đó, carbon anomeric (C-1″) của đường xuất hiện tại δ_C 105,7 ppm và 5 carbon còn lại của đường (δ_C 62,6 –78,3 ppm) cũng được ghi nhận, gợi ý rằng đơn vị đường trong phân tử là đường hexose.

Tương tác HMBC từ H-2,6 (δ 6,77) và -OCH_3 (δ 3,85) tới C-3,5 (δ 153,8); từ H-2′,6′ (δ 6,74) và -OCH_3 (δ 3,83) tới C-3,5 (δ 154,5) chỉ ra sự hiện diện của các nhóm methoxy tại vị trí C-3,5 và C3′,5′. Thêm vào đó, tương tác HMBC của anomeric proton (H-1″, δ 4,81) và H-2,6 (δ 6,77) với C-4 (δ_C 135,5 ppm), chỉ ra rằng đường liên kết với aglycon tại vị trí C-4. Phân tích phổ 1D và 2D NMR, kết hợp so sánh với tài liệu tham khảo [99], cho phép xác định hợp chất **WI12** là *erythro*-syringylglycerol-8-*O*-4′-sinapyl ether 4-*O*-*β*-D-glucopyranosid (**Hình 3.15**).



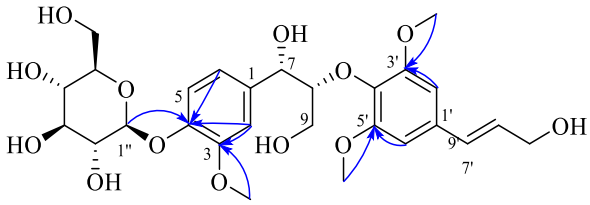
Hình 3.15. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC (→) chính của hợp chất WI12

3.1.2.13. Hợp chất WI13 (erythro-citrusin B)

Hợp chất **WI13** được phân lập dưới dạng chất rắn màu trắng. Phân tích phổ NMR cho thấy hợp chất này từ **Bảng 3.13** cho thấy đặc điểm của cấu trúc thuộc nhóm 8-*O*-4′ neolignan glycosid, và Số liệu ^{1}H và ^{13}C NMR thu được của **WI13** trùng khớp với Số liệu đã công bố của citrusin B trong tài liệu [100].

Trên phổ ^{1}H-NMR (CD_3OD), proton H-7 của **WI13** xuất hiện tại δ_H 4,94 (d, J = 5,3 Hz) và proton H-8 tại δ_H 4,10–4,24 (m). Hằng số ghép đôi của H-7 và H-8 ($^3J_{7,8}$ = 5,3 Hz) tương đương với giá trị báo cáo cho citrusin B (5,4 Hz trong CD_3OD). Theo cách phân loại cấu hình của nhóm 8-*O*-4′ neolignan [100], giá trị $^3J_{7,8}$ khoảng 5 Hz là dấu hiệu đặc trưng của cấu hình *erythro* tại C-7/C-8. Điều này khẳng định phần khung aglycon của **WI13** mang cấu hình *erythro*, tương tự citrusin B đã được báo cáo [100]. Tuy nhiên, Số liệu phổ 1D NMR cho thấy có sự chẻ pic ở một số proton và carbon quanh vùng C-7 và C-8, chỉ ra rằng **WI13** không phải là một chất đồng nhất mà bao gồm hỗn hợp hai đồng phân quang học nghịch đảo (7*S*,8*R*) và (7*R*,8*S*). Hai cấu hình này có dịch

chuyển hóa học gần như trùng nhau nên không thể tách rời bằng các phương pháp sắc ký thông thường, do đó **WI13** được phân lập dưới dạng hỗn hợp diastereomer *erythro*. So sánh Số liệu ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR của **WI13** đối chiếu với tài liệu tham khảo [100], có thể xác định **WI13** là *erythro*-citrusin B (**Hình 3.16**).



Hình 3.16. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC (→) chính của hợp chất WI13

3.1.2.14. Hợp chất WI14 (threo-citrusin B)

Hợp chất **WI14** được phân lập dưới dạng chất rắn màu trắng. Phổ HR-ESI-MS/MS của **WI14** ghi nhận pic ion giả phân tử $[M+NH_4]^+$ tại *m/z* 586,2462, phù hợp với công thức phân tử $C_{27}H_{36}O_{13}$ (khối lượng tính toán cho $[M+NH_4]^+$ = 586,2494). Số liệu ^{1}H-NMR và ^{13}C-NMR của **WI14** đo trong CD_3OD và được trình bày ở **Bảng 3.13**.

Phân tích phổ ^{1}H-NMR (CD_3OD) của **WI14** thể hiện các tín hiệu đặc trưng của bộ khung neolignan loại citrusin B, bao gồm: hai proton thơm vòng A tại δ_H 7,12 (2H, olv, H-2/H-5), một proton thơm tại δ_H 6,99 (1H, d, J = 8,2 Hz, H-6), và hai proton vòng B ở δ_H 6,74 (2H, s, H-2′/H-6′). Hệ olefin *trans* trên mạch propenyl xuất hiện với các tín hiệu tại δ_H 6,54 (1H, d, J = 15,9 Hz, H-7′) và δ_H 6,31 (1H, dd, J = 15,9; 5,6 Hz, H-8′). Ba nhóm methoxy cho tín hiệu bị chồng chập tại δ_H 3,84 (9H, s), phù hợp với kiểu thế 3-OMe và 3′,5′-OMe của citrusin B. Ngoài ra, vùng proton 3,35–5,04 ppm thể hiện nhiều tín hiệu của proton gắn trên carbon *sp*^{3} oxy hóa, cho thấy sự hiện diện của một đơn vị đường. Các tín hiệu ^{13}C-NMR của đường tại δ_C 103,0 (C-1″), 62,5-78,3 (C-2″ - C-6″) chỉ ra rằng đơn vị đường là hexose.

Các Số liệu phổ 1D và 2D-NMR (^{1}H, ^{13}C, HSQC, HMBC) của **WI14** gần như trùng khớp với **WI13** và với *erythro*-citrusin B tham khảo. Tuy nhiên, có sự khác biệt rõ ràng ở hằng số ghép đôi giữa H-7 và H-8. Số liệu phổ ^{1}H của **WI14** cho thấy tín hiệu H-7 xuất hiện tại δ_H 4,94 (d, J = 6,3 Hz), lớn hơn so với giá trị này của **WI13** (J = 5,3 Hz). Theo nghiên cứu của Zhao và cs (2023) [101], nhóm D của 8-*O*-4′ oxyneolignan cho thấy $^{3}J_{7,8}$ của *threo* lớn hơn của *erythro*, và $\Delta\delta_{(H\text{-}9a\ –\ H\text{-}9b)}$ của *threo* cũng lớn hơn *erythro*. Khi so sánh trong cùng dung môi CD_3OD, **WI14** có: $^{3}J_{7,8}$ = 6,3 Hz, $\Delta\delta_{(H\text{-}9a,b)}$ =

0,45, trong khi **WI13** có: $^{3}J_{7,8}$ = 5,3 Hz, $\Delta\delta_{(H\text{-}9a,b)}$ = 0,33 (**Hình 3.17** và **Bảng 3.14**). Giá trị của **WI14** phù hợp với đặc điểm của *threo*-8-*O*-4′ neolignan, trong khi **WI13** phù hợp với dạng *erythro*, như các tài liệu tham khảo đã mô tả. Mặc dù vậy, phổ NMR của **WI14** cũng cho thấy hai bộ tín hiệu rất gần nhau của một số proton và carbon lân cận với C-7 và C-8, tương tự như **WI13**. Điều này cho thấy **WI14** tồn tại dưới dạng hỗn hợp hai diastereomer *threo* không tách rời gồm cấu hình (7*R*,8*R*) và (7*S*,8*S*). Trên cơ sở phân tích phổ HR-ESI-MS/MS, ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR và so sánh với Số liệu trong tài liệu tham khảo [100], kết hợp với các tiêu chuẩn phân loại của Zhao và cs (2023) [101]. Cấu trúc của **WI14** được thiết lập là một stereoisomer mới của citrusin B, tồn tại dưới dạng hỗn hợp của hai diastereomer (7*R*,8*R*) và (7*S*,8*S*) và được đặt tên là *threo*-citrusin B (**Hình 3.18**)

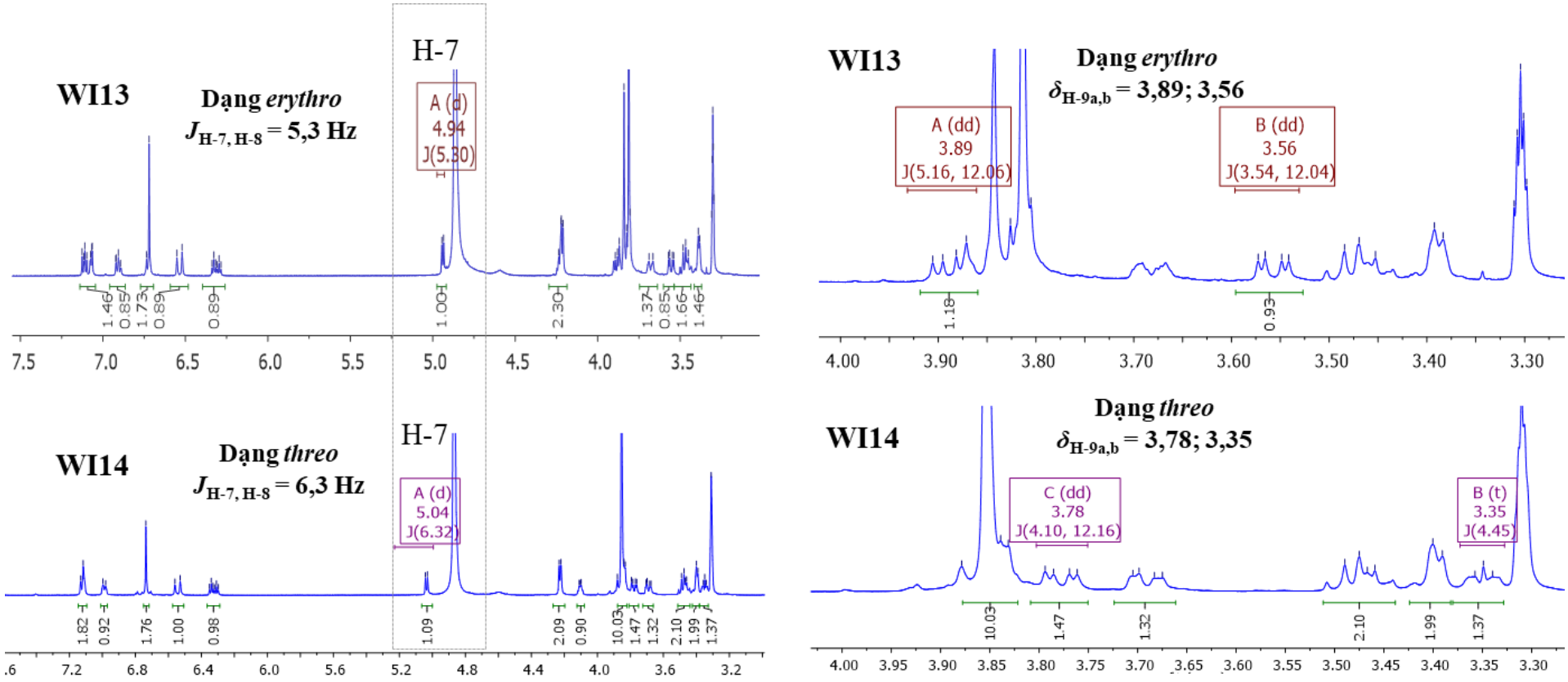
Bảng 3.13. Số liệu phổ NMR của hợp chất WI13, WI14 và hợp chất tham khảo

Vị trí	***Erythro*-citrusin B** (7*S*,8*R*) [100]		**WI13** (*erythro*-citrusin B) (hỗn hợp 7*S*,8*R* và 7*R*,8*S*)		**WI14** (*threo*-citrusin B) (hỗn hợp 7*R*,8*R* và 7*S*,8*S*)	
	$\delta_H^{a,b}$ (**mult., *J* = Hz**)	$\delta_C^{a,c}$	$\delta_H^{a,b}$ (**mult., *J* = Hz**)	$\delta_C^{a,c}$	$\delta_H^{a,b}$ (**mult., *J* = Hz**)	$\delta_C^{a,c}$
1	–	137,5	–	137,5	–	137,2 137,1
2	7,07 (1H, d, 1,8)	112,3	7,07 (1H, d, 1,7) 7,08 (1H, d, 1,7)	112,4	7,12, *	112,6 112,5
3	–	150,4	–	150,5 150,4	–	150,5
4	–	147,2	–	147,2	–	147,4
5	7,12 (1H, d, 8,5)	117,5	7,12 (1H, d, 8,3) 7,13 (1H, d, 8,3)	117,6 117,5	7,12, *	117,7
6	6,91 (1H, m)	120,8	6,91(1H, m)	120,8	6,99 (1H, d, 8,2)	120,8
7	4,94 (1H, d, 5,4)	73,7	4,94 (1H, d, 5,3)	73,8	5,04 (1H, d, 6,3)	74,2 74,1
8	–	87,3	4,24 (1H, m)	87,3	4,10 (1H, m)	88,7
9	–	61,4	3,89 (1H, dd, 12,1; 5,2) 3,56 (1H, dd, 12,1; 5,2)	61,5	3,78 (1H, dd, 12,2; 4,1) 3,35 (1H, m)	61,8
1′	–	134,7	–	134,8	–	134,8

Vị trí	***Erythro*-citrusin B** (7*S*,8*R*) [100]		**WI13** (*erythro*-citrusin B) (hỗn hợp 7*S*,8*R* và 7*R*,8*S*)		**WI14** (*threo*-citrusin B) (hỗn hợp 7*R*,8*R* và 7*S*,8*S*)	
	δ_H[a,b] (**mult., *J* = Hz**)	δ_C[a,c]	δ_H[a,b] (**mult., *J* = Hz**)	δ_C[a,c]	δ_H[a,b] (**mult., *J* = Hz**)	δ_C[a,c]
2′	6,72 (1H, s)	104,8	6,72 (1H, s)	104,9	6,74 (1H, s)	104,8
3′	–	154,5	–	154,6 154,5	–	154,3
4′	–	136,3	–	136,3	–	136,9
5′	–	154,5	–	154,6 154,5	–	154,3
6′	6,72 (1H, s)	104,8	6,72 (1H, s)	104,9	6,74 (1H, s)	104,8
7′	6,54 (1H, d, 15,9)	131,4	6,54 (1H, d, 15,9)	131,4	6,54 (1H, d, 15,9)	131,3
8′	6,31 (1H, dd, 15,6; 5,4)	129,9	6,31 (1H, dd, 15,9; 5,6)	129,9	6,31 (1H, dd, 15,9; 5,6)	130,0
9′	4,22 (2H, dd, 5,4, 1,2)	63,6	4,22 (2H, dd, 5,6; 1,3)	63,6	4,23 (2H, d, 5,5)	63,6
3-OMe	3,84 (3H, s)	–	3,84 (3H, s)	56,6	3,86 (3H, s)	56,6
3′,5′-OMe	3,81 (6H, s)	–	3,81 (6H, s)	56,6	3,86 (6H, s)	56,6
Glc	–	–	–	–	–	
1″	–	102,9	4,88, *	103,0 102,9	4,86, *	103,0 102,9
2″	–	74,9	3,48, *	74,9	3,48, *	74,9
3″	–	78,2	3,39, *	78,2	3,40, *	78,2
4″	–	71,4	3,39, *	71,3	3,40, *	71,3

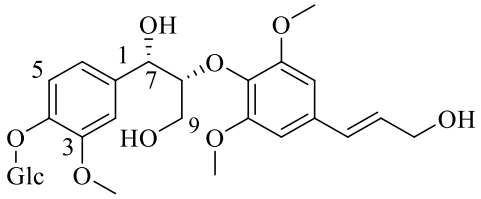
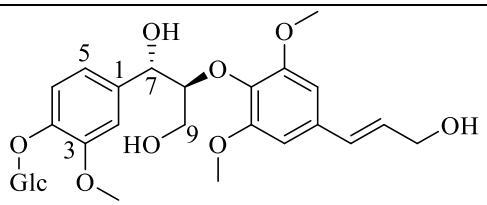
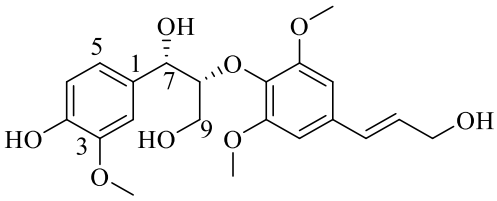
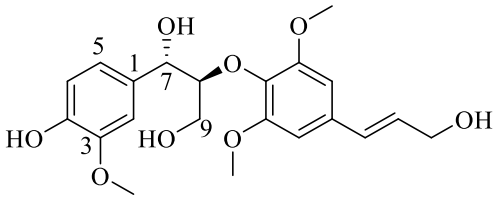
Vị trí	***Erythro*-citrusin B** (7*S*,8*R*) [100]		**WI13** (*erythro*-citrusin B) (hỗn hợp 7*S*,8*R* *và* 7*R*,8*S*)		**WI14** (*threo*-citrusin B) (hỗn hợp 7*R*,8*R* *và* 7*S*,8*S*)	
	δ_H[a,b] (**mult., *J* = Hz**)	δ_C[a,c]	δ_H[a,b] (**mult., *J* = Hz**)	δ_C[a,c]	δ_H[a,b] (**mult., *J* = Hz**)	δ_C[a,c]
5″	–	77,8	3,46, *	77,8	3,49, *	77,8
6″	–	62,5	3,87, * 3,68 (1H, m)	62,5	3,88, * 3,69 (1H, dd, 11,4; 3,6)	62,5

*[a] CD_3OD, [b] 500 MHz, [c] 125 MHz, *: tín hiệu bị chồng chập.*

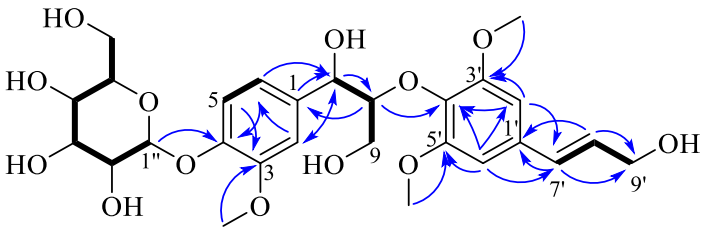


Hình 3.17. So sánh phổ ^{1}H-NMR của WI13 và WI14 tại vùng H-7 và H-9a,b

Bảng 3.14. So sánh số liệu phổ ^{1}H-NMR của hợp chất WI13, WI14 và hợp chất tham khảo

Hợp chất	Cấu hình	Cấu trúc	$\delta_{H\text{-}9a,b}$	$\Delta\delta_{H\text{-}9a,b}$	$J_{H\text{-}7}$ (Hz)
WI13*	*erythro*		3,89; 3,56	0,33	5,3
WI14*	*threo*		3,78; 3,35	0,45	6,3
D-4*	*erythro*		—	< 0,35	4,9
D-3*	*threo*		—	> 0,40	7,2

* *Đo trong CD_3OD, hợp chất tham khảo **D-3** và **D-4** [101]*



Hình 3.18. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC (→) và ^{1}H-^{1}H COSY (–) chính của hợp chất WI14

3.1.2.15. Hợp chất WI15 (isonitidanin-4-O-β-D-glucosid)

Hợp chất **WI15** được phân lập dưới dạng chất rắn màu trắng. Trên phổ HR-ESI-MS/MS của **WI15** ghi nhận pic ion giả phân tử $[M+NH_4]^+$ tại *m/z* 584,2335 phù hợp với công thức phân tử $C_{27}H_{34}O_{13}$ (giá trị tính toán lý thuyết cho $[M+NH_4]^+$ là 584,2338), tương ứng với mười một độ bất bão hòa. Thông tin về giá trị ^{1}H-NMR và ^{13}C-NMR của hợp chất **WI15** đo trong dung môi DMSO-d_6 được liệt kê trong **Bảng 3.15**.

Bảng 3.15. Số liệu phổ NMR của hợp chất WI15

Vị trí	δ_H[a,b] (mult., *J* = Hz)	δ_C[a,c]
1	–	125,1
2,6	6,77 (2H, s)	106,0
3,5	–	152,6
4	–	134,7
7	4,92 (1H, d, 7,5)	75,6
8	4,13 (1H, m)	77,5
9	3,72 (1H)* 3,32 (1H)*	60,0
1′	–	129,2
2′	6,71 (1H, s)	102,4
3′	–	148,6
4′	–	132,0
5′	–	144,7
6′	6,61 (1H, s)	107,3
7′	6,41 (1H, d, 15,5)	128,5
8′	6,25 (1H, dt, 15,5; 4,9)	129,1
9′	4,08 (2H, m)	61,5
3,5-OMe	3,76 (6H, s)	56,4
3′-OMe	3,80 (3H, s)	55,6
1″	4,97 (1H)*	102,4
2″	3,20 (1H, m)	74,2
3″	3,20 (1H, m)	76,5
4″	3,50 (1H, m)	69,9
5″	3,15 (1H, m)	77,2
6″	3,58 (1H, m) 3,37 (1H, m)	60,9

[a] DMSO-d_6,[b] 500 MHz, [c] 125 MHz,: tín hiệu bị chồng chập.*

Phân tích phổ ^{1}H-NMR của hợp chất **WI15** cho thấy ba tín hiệu thơm dạng singlet tại δ_H 6,77 (2H, H-2 và H-6), 6,71 (1H, H-2′) và 6,61 (1H, H-6′); hai proton olefin ở δ_H

6,41 (1H, d, J = 15,5 Hz, H-7′) và 6,25 (1H, dt, J = 15,5; 4,9 Hz, H-8′); hai tín hiệu singlet của nhóm methoxy tại δ_H 3,80 (3H, 3′-OMe) và 3,76 (6H, 3,5-OMe); cùng các tín hiệu proton gắn với carbon sp^3 mang oxy trong vùng δ_H 3,15–4,97.

Từ Số liệu phổ HSQC và DEPT-135 cho thấy hợp chất **WI15** có sáu carbon sp^2 mang proton tại δ_C 102,4–129,1, sáu carbon methin oxy hóa tại δ_C 69,9–77,5, ba carbon methylen oxy hóa tại δ_C 60,0–61,5 và ba carbon methoxy tại δ_C 55,6 (3′-OMe) và 56,4 (3,5-OMe). Các tương tác COSY liên tiếp giữa H-7 (δ_H 4,92) → H-8 (δ_H 4,13) → H-9a,b (δ_H 3,72 và 3,32) xác nhận mảnh cấu trúc propan-1,2,3-oxy hóa. Thêm vào đó, các tương tác HMBC giưa H-7 (δ_H 4,92) với C-2,6 (δ_C 106,0), H-2,6 (δ_H 6,77) với C-7 (δ_C 75,6), H-2 với C-3 (δ_C 152,6), H-6 với C-5 (δ_C 152,6), H-2,6 với C-4 (δ_C 134,7) và 3,5-OCH_3 (δ_H 3,76) với C-3,5 (δ_C 152,6) chứng minh sự hiện diện của mảnh cấu trúc 1-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)-propan-1,2,3-oxy hóa.

Các tương tác COSY liên tục của H-7′ (δ_H 6,41)/H-8′ (δ_H 6,25)/H_2-9′ (δ_H 4,08) thiết lập mảnh cấu trúc prop-2-en-1-ol. Ngoài ra, các tương tác HMBC của H-7′ với C-6′ (δ_C 107,3) và C-2′ (δ_C 102,4); H-2′ (δ_H 6,71) với C-6′ (δ_C 107,3) và C-7′ (δ_C 128,5); H-6′ (δ_H 6,61) với C-2′ (δ_C 102,4) và C-7′ (δ_C 128,5); H-6′ với C-5′ (δ_C 144,7); H-2′ với C-3′ (δ_C 148,6); và 3′-OMe (δ_H 3,80) với C-3′ (δ_C 148,6) cho thấy sự hiện diện của tiểu đơn vị 5-(3-hydroxyprop-1-en-1-yl)-3-methoxybenzene-1,2-diol.

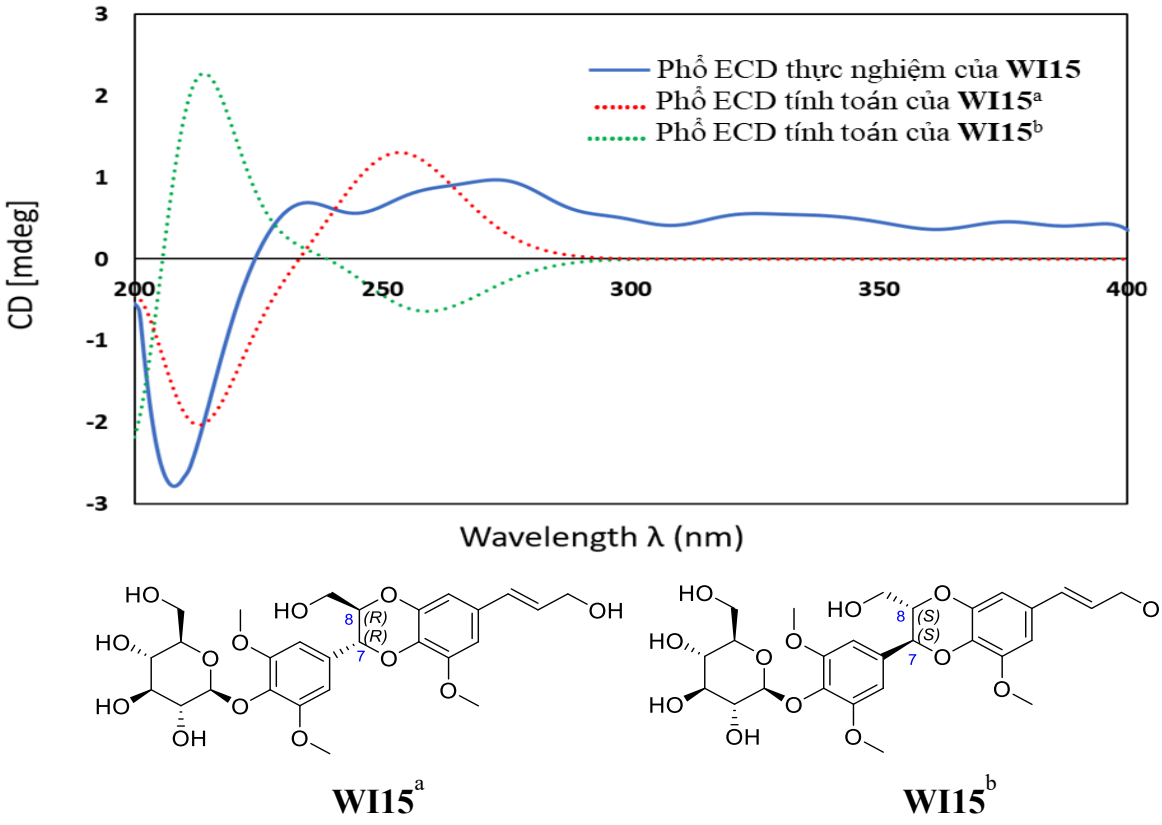
Sự kết nối giữa hai đơn vị phenylpropanoid qua nguyên tử oxy (7-*O*-4′) được chứng minh bởi các tương tác HMBC của H-7 (δ_H 4,92), H-2′ (δ_H 6,71) và H-6′ (δ_H 6,61) với C-4′ (δ_C 132,0). Giữa C-8 và C-5′ có thể mở hoặc tạo liên kết ether để tạo thành vòng dioxan. Trong trường hợp mở vòng $\delta_{C\text{-}8}$ 86,4 ppm [102]. Ngược lại, nếu tạo thành vòng dioxan thì $\delta_{C\text{-}8}$ 75,4 - 78,3 [103], phù hợp với giá trị $\delta_{C\text{-}8}$ 77,5 ppm của **WI15.** Bên cạnh đó, hai tiểu đơn vị phenylpropanoid và một đơn vị đường chiếm mười trong số mười một độ bất bão hòa. Độ bất bão hòa còn lại gợi ý sự hình thành vòng dioxan giữa C-7/C-4′ và C-8/C-3′, phù hợp với đặc trưng cấu trúc của nhóm neolignan 8-*O*-4′. Tín hiệu proton anomeric (δ_H-1″ 4,97) xuất hiện ở vùng trường thấp cho thấy đơn vị đường gắn vào nhóm phenolic còn lại ở C-4 [104], [105]. Từ những biện giải trên có thể xác định được cấu trúc phẳng của **WI15**.

Dạng (*E*) của liên kết đôi $\Delta^{7',8'}$ được xác định bởi hằng số ghép đôi lớn giữa H-7′ và H-8′ (J = 15,5 Hz). Hằng số ghép đôi của proton anomeric trong CD_3OD (δ_H 4,96, d, J = 7,6 Hz) cho thấy đơn vị đường gắn với aglycon bằng liên kết β-glycosid. Hợp chất

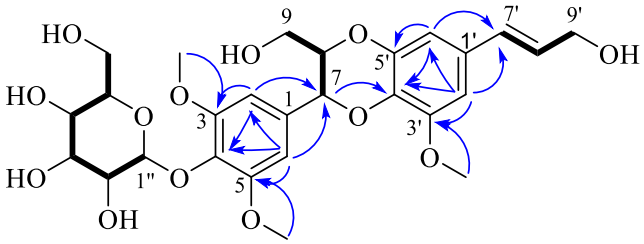
WI15 sau khi thủy phân tách phần đường bằng acid và làm phản ứng. Hỗn hợp sau phản ứng được phân tích bằng HPLC và so sánh với L- và D-glucose chuẩn [106]. Kết quả đã xác định đơn vị đường của **WI15** là *β*-D-glucose.

Hằng số ghép đôi lớn giữa H-7 và H-8 (J = 7,5 Hz) cho thấy cấu hình *trans* tại C-7 và C-8 trên vòng dioxan [107]. Do đó, cấu hình tuyệt đối của cặp C-7/C-8 có thể là 7*R*,8*R* (**WI15^a**) hoặc 7*S*,8*S* (**WI15^b**) (Hình 3.19). Để phân biệt hai khả năng này, phổ ECD lý thuyết của cả **WI15^a** và **WI15^b** được tính toán và so sánh. Kết quả cho thấy phổ ECD thực nghiệm của **WI15** có mức độ trùng khớp cao hơn với dạng **WI15^a**, cho phép gán cấu hình tuyệt đối của **WI15** là 7*R*,8*R* [108], [109].

Dựa trên những phân tích các Số liệu phổ thực nghiệm, nghiên cứu và so sánh với các tài liệu tham khảo liên quan và tính toán ECD lý thuyết có thể khẳng định hợp chất **WI15** được xác định có cấu trúc như **Hình 3.20** và được đặt tên là isonitidanin-4-*O*-*β*-D-glucosid.



Hình 3.19. Phổ ECD thực nghiệm và tính toán của hợp chất WI15



Hình 3.20. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC (→) và ^{1}H-^{1}H COSY (—) chính của hợp chất WI15

*3.1.2.16. Hợp chất WI16 ((7S,*8R*)-dehydrodiconiferyl alcohol 4-O-β-D-glucopyranosid)*

Hợp chất WI16 được phân lập dưới dạng bột màu trắng. Phổ ESI-MS của hợp chất **WI16** ghi nhận một ion đặc trưng tại m/z 543,49 $[M+Na]^+$, phù hợp với công thức $C_{26}H_{32}O_{11}$(M = 520,26 Da). Thông tin về Số liệu ^{1}H-NMR và ^{13}C-NMR của hợp chất **WI15** đo trong dung môi CD_3OD được liệt kê trong **Bảng 3.16.**

Bảng 3.16. Số liệu phổ NMR của hợp chất WI16 và hợp chất tham khảo

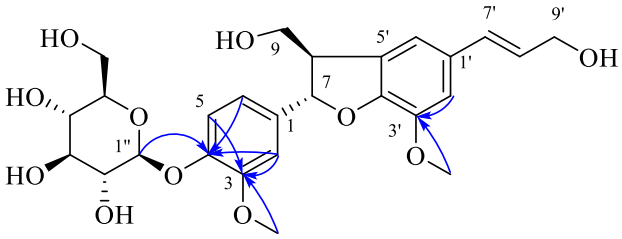
Vị trí	WI16		(7*S**,8*R**)-dehydrodiconiferyl alcohol 4-*O*-*β*-D-glucopyranosid [110]	
	δ_H[a,b] (mult., *J* = Hz)	δ_C [a,c]	δ_H[d,b] (mult., *J* = Hz)	δ_C[d,c]
1	–	138,1	–	136,3
2	7,03 (1H, s)	111,2	7,10 (1H, s)	110,2
3	–	151,0	–	148,9
4	–	147,7	–	145,5
5	7,14 (1H, d, 8,4)	118,1	7,18 (1H, d, 9,1)	115,9
6	6,93 (1H, dd, 8,6; 1,9)	119,4	7,01 (1H, dd, 8,9; 1,8)	118,7
7	5,58 (1H, d, 5,9)	88,8	5,68 (1H, d, 5,6)	87,8
8	3,48 (1H, m)	55,4	–	52,9
9	3,78 (1H, m) 3,87 (1H, m)	64,9	–	62,9
1′	–	132,7	–	131,5
2′	6,95 (1H, s)	112,2	7,11 (1H, s)	110,7
3′	–	145,5	–	143,7
4′	–	149,2	–	147,1

Vị trí	WI16		(7*S**,8*R**)-dehydrodiconiferyl alcohol 4-*O*-*β*-D-glucopyranosid [110]	
	δ_H[a,b] (mult., *J* = Hz)	δ_C [a,c]	δ_H[d,b] (mult., *J* = Hz)	δ_C[d,c]
5′	–	130,0	–	128,5
6′	6,95 (1H, s)	116,5	7,06 (1H, s)	115,5
7′	6,53 (1H, d, 15,8)	131,9	6,57 (1H, d, 15,5)	131,1
8′	6,23 (1H, dt, 15,8; 5,8)	127,7	6,28 (1H, dt, 15,5; 5,1)	126,3
9′	4,20 (2H, d, 5,9)	63,8	4,28 (2H, d, 5,1)	62,5
3′-OMe	3,88 (3H, s)	56,8	3,94 (3H, s)	56,0
3-OMe	3,83 (3H, s)	56,7	3,87 (3H, s)	55,9
1″	4,90 (1H)*	102,7	5,12 (1H, m)	100,5
2″	3,48 (1H)*	74,9	–	72,9
3″	3,40 (1H)*	78,2	–	76,2
4″	3,40 (1H)*	71,3	–	69,3
5″	3,48 (1H)*	77,8	–	75,6
6″	3,85 (1H)* 3,67 (1H)*	62,5	–	60,5

*[a] CD_3OD, [b] 500 MHz, [c] 125 MHz, *: tín hiệu bị chồng chập, [d] D_2O.*

Phổ ^{1}H-NMR cho thấy sự hiện diện của các proton kiểu ABX, tại δ_H 7,03 (1H, s, H-2), 7,14 (1H, d, *J* = 8,4 Hz, H-5), 6,93 (1H, dd, *J* = 8,6; 1,9 Hz, H-6) và 2 proton singlet khác tại δ_H 6,95 (1H, s, H-2′), 6,95 (1H, s, H-6′), cho thấy sự tồn tại của hai vòng thơm đặc trưng cho khung lignan. Ngoài ra, tín hiệu olefinic tại δ_H 6,53 (1H, d, *J* = 15,8 Hz, H-7′), 6,23 (1H, dt, *J* = 15,8; 5,8 Hz, H-8′), cùng với proton methine oxy hóa tại δ_H 5,58 (1H, d, *J* = 5,9 Hz, H-7) và các tín hiệu methylene oxy hóa tại δ_H 3,78 và 3,87 (H-9a,b) gợi ý sự hiện diện của bộ khung dehydrodiconiferyl alcohol. Hai tín hiệu methoxy xuất hiện tại δ_H 3,88 (3H, s) và 3,83 (3H, s), tương ứng với các carbon tại δ_C 56,8 và 56,7, cho thấy sự hiện diện của hai nhóm –OCH_3 gắn trên nhân thơm. Sự xuất hiện của

proton anomeric tại δ_H 4,90 (1H, ovl) và các tín hiệu proton gắn với cacbon sp^3 oxy hóa tại δ_H 3,40-3,85 chỉ ra sự hiện diện của một đơn vị đường. Phổ ^{13}C-NMR cho thấy các tín hiệu carbon đặc trưng. Các carbon OCH_3 xuất hiện tại δ_C 56,8 và 56,7 ppm. Các carbon vòng thơm của vòng A được ghi nhận tại δ_C 138,1 (C-1), 111.2 (C-2), 151.0 (C-3), 147.7 (C-4), 118,1 (C-5), 119,4 (C-6); và của vòng B tại δ_C 132,7 (C-1′), 112,2 (C-2′), 145,5 (C-3′), 149,2 (C-4′), 130,0 (C-5′), và 116,5 (C-6′). Các carbon của vòng dihydrofuran được quan sát tại δ_C 88,8 (C-7), 55,4 (C-8), và 64,9 (C-9). Sáu carbon của đơn vị đường được ghi nhận với carbon anomeric (C-1″) tại δ_C 102,7 ppm và 62,5-78,2 (C-2″-C6″), gợi ý rằng đường là hexose. Các tương tác HMBC quan trọng cho phép xác định vị trí gắn các nhóm thế trong cấu trúc của **WI16**. Cụ thể, các tương tác HMBC từ các proton thơm H-2 (δ_H 7,03) và H-5 (δ_H 7,14), cùng với tín hiệu methoxy tại δ_H 3,83 (3-OMe) đến các carbon thơm oxy hóa tại δ_C 151,0 (C-3) cho thấy sự hiện diện của nhóm methoxy gắn tại vị trí C-3 trên vòng thơm thứ nhất. Tương tự, các tương tác HMBC từ các proton thơm H-2′ (δ_H 6,95) cùng với tín hiệu methoxy tại δ_H 3,88 (3′-OMe) đến các carbon thơm tại δ_C 145,5 (C-3′) xác nhận sự hiện diện của nhóm methoxy tại vị trí C-3′ của vòng thơm thứ hai. Ngoài ra, vị trí liên kết của đường được xác định dựa trên tương tác HMBC đặc trưng của proton anomeric H-1″(δ_H 4,90) với carbon thơm oxy hóa tại δ_C 147,7 (C-4). Đồng thời, các proton thơm H-2 và H-6 cũng cho thấy tương tác HMBC với C-4, qua đó cho thấy phần đường được liên kết với aglycon thông qua liên kết *O*-glycosid tại vị trí C-4. Dựa trên các Số liệu phổ thu được, kết hợp so sánh với tài liệu tham khảo [111], hợp chất **WI16** được xác định là (7*S**,8*R**)-dehydrodiconiferyl alcohol 4-*O*-*β*-D-glucopyranosid (**Hình 3.21**).



Hình 3.21. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC (→) chính của hợp chất WI16

3.1.2.17. Hợp chất WI17 ((7S*,8R*)-5-methoxydehydrodiconiferyl alcohol 4-O-β-D-glucopyranosid)

Hợp chất **WI17** được phân lập dưới dạng bột màu trắng. Số liệu phổ ^{1}H-NMR và ^{13}C-NMR đo trong CD_3OD được liệt kê ở **Bảng 3.17**.

Bảng 3.17. Số liệu phổ NMR của hợp chất WI17 và hợp chất tham khảo

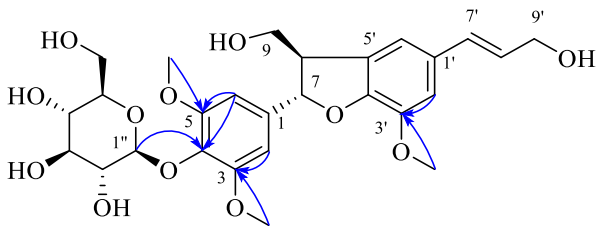
Vị trí	WI17		(7*S**,8*R**)-5-methoxydehydrodiconiferyl alcohol 4-*O*-*β*-D-glucopyranosid [112]	
	δ_H[a,b] (mult., *J* = Hz)	δ_C[a,c]	δ_H[a,d] (mult., *J* = Hz)	δ_C[a,e]
1	–	135,8	–	135,8
2	6,73 (2H, s)	104,5	6,73 (2H, s)	104,5
3	–	154,5	–	154,5
4	–	140,1	–	140,1
5	–	154,5	–	154,5
6	6,73 (2H, s)	104,5	6,73 (2H, s)	104,5
7	5,59 (1H, d, 5,8)	88,9	5,59 (1H, d, 5,9)	88,9
8	3,47 (1H, m)	55,5	3,47 (1H, m)	55,6
9	3,80 (1H, m)	65,1	3,79(1H, s)	65,0
	3,87 (1H, m)		3,88 (1H, m)	
1′	–	132,9	–	132,9
2′	6,95 (1H, br s)	112,3	6,96 (1H, br s)	112,2
3′	–	145,6	–	145,6
4′	–	149,2	–	149,2
5′	–	130,0	–	130,0
6′	6,95 (1H, br s)	116,6	6,96 (1H, br s)	116,5
7′	6,53 (1H, br d, 15,8)	132,0	6,54 (1H, br d, 15,9)	131,9
8′	6,23 (1H, dt, 15,8; 5,9)	127,8	6,23 (1H, dt, 15,9; 5,9)	127,8
9′	4,19 (1H, br d, 5,9)	63,9	4,19 (1H, dd, 5,9; 1,5)	63,9
3′ –OCH_3	3,81 (3H, s)	57,1	3,82 (3H, s)	57,1
3,5 –OCH_3	3,89 (6H, s)	56,9	3,90 (6H, s)	56,8
1″	4,87 (1H, d, 7,6)	105,3	4,89 (1H, d, 7,8)	105,3
2″	3,47 (1H)*	75,8	3,30 (1H, dd, 9,0; 7,8)	75,7

Vị trí	WI17		(7*S**,8*R**)-5-methoxydehydrodiconiferyl alcohol 4-*O*-*β*-D-glucopyranosid [112]	
	δ_H[a,b] (mult., *J* = Hz)	δ_C[a,c]	δ_H[a,d] (mult., *J* = Hz)	δ_C[a,e]
3″	3,20 (1H, m)	78,4	3,36 (1H, br t, 9,0)	78,4
4″	3,41 (1H, dd, 9,12; 4,1)	71,4	3,40 (1H, br t, 9,0)	71,4
5″	3,40 (1H)*	77,9	3,19 (1H, ddd, 9,0; 5,1; 2,2)	77,9
6″	3,64 (1H)*	62,6	3,65 (2H, dd, 12,0; 5,1)	62,6
	3,78 (1H)*		3,77 (2H, dd, 12,0; 2,2)	

*[a] CD_3OD, [b] 500 MHz, [c] 125 MHz, [d] 400 MHz, [e] 100 MHz *: tín hiệu bị chồng chập.*

Số liệu phổ thu được của hợp chất **WI17** tương tự như phổ của hợp chất **WI16**, ngoại trừ sự xuất hiện thêm của 1 nhóm methoxy tại δ_H 3,89 (6H, s, 3,5-OCH_3) và các proton ABX của vòng thơm thứ nhất chuyển thành proton thơm đối xứng tại δ_H 6,73 (2H, s, H-2,6). Số liệu phổ trên chỉ ra rằng hợp chất **WI17** có nhiều hơn 1 nhóm thế methoxy so với hợp chất **WI16**, do đó vòng thơm thứ nhất có cấu trúc đối xứng. Vị trí của nhóm methoxy ở vị trí C-5 được xác định bằng tương tác HMBC từ H-6 (δ_H 6,73) và 5-OCH_3 (δ_H 3,89) tới C-5 (δ_C 154,5).

Dựa trên phân tích phổ 1D và 2D NMR kết hợp so sánh với Số liệu phổ đã được công bố đo trong cùng dung môi trong tài liệu tham khảo [112], hợp chất **WI17** được xác định là (7*S**,8*R**)-5-methoxydehydrodiconiferyl alcohol 4-*O*-*β*-D-glucopyranosid (**Hình 3.22**).



Hình 3.22. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC (→) chính của hợp chất WI17

3.1.2.18. Hợp chất WI18 (pinoresinol di-O-β-D-glucopyranosid)

Hợp chất **WI18** được phân lập dưới dạng bột màu trắng. Số liệu phổ ^{1}H- NMR và ^{13}C-NMR đo trong CD_3OD được liệt kê ở **Bảng 3.18**.

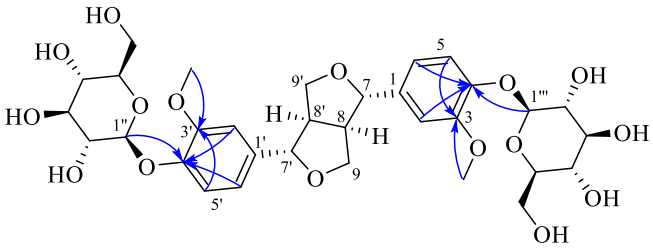
Bảng 3.18. Số liệu phổ NMR của hợp chất WI18 và hợp chất tham khảo

Vị trí	WI18		pinoresinol di-*O*-*β*-D-glucopyranosid [113]	
	δ_H[a,b] (mult., *J* = Hz)	δ_C[a,c]	δ_H[a,b] (mult., *J* = Hz)	δ_C[a,d]
1, 1′	–	137,4	–	137,5
2, 2′	7,03 (2H, d, 1,6)	111,6	7,02 (2H, d, 2,0)	111,7
3, 3′	–	151,0	–	151,0
4, 4′	–	147,5	–	147,5
5, 5′	7,15 (2H, d, 8,40)	118,0	7,14 (2H, d, 8,40)	118,1
6, 6′	6,92 (2H, dd, 8,4; 1,7)	119,8	6,91 (2H, d, 8,50)	119,8
7, 7′	4,76 (2H, d, 3,7)	87,1	4,75 (2H, d, 4,20)	87,1
8, 8′	3,13 (2H, m)	55,5	3,11 (2H, m)	55,5
9, 9′	4,25 (2H, dd, 8,8; 6,7) 3,89 (2H, m)	72,8	4,24 (2H, dd, 8,90; 6,95) 3,89 (2H, m)	72,8
3, 3′-OCH_3	3,87 (6H, s)	56,8	3,89 (6H, s)	56,8
1 ″, 1‴	4,89 (2H)*	102,8	4,84 (2H, d, 7,2)	102,9
2″, 2‴	3,49 (2H)*	74,9	–	74,9
3″, 3‴	3,49 (2H)*	77,8	–	77,8
4″, 4‴	3,40 (2H)*	71,3	–	71,3
5″, 5‴	3,40 (2H, m)	78,2	–	78,2
6″, 6‴	3,88 (2H, m) 3,69 (2H, dd, 11,5; 4,3)	62,5	–	62,5

*[a] CD_3OD, [b] 500 MHz, [c] 125 MHz, d) 100 MHz, *: tín hiệu bị chồng chập*

Phổ NMR của hợp chất **WI18** xuất hiện các tín hiệu của vòng thơm thế ABX tại δ_C 111,7/δ_H 7,03 (2H, d, *J* = 1,6 Hz), δ_C 119,8/δ_H 6,92 (2H, dd, *J* = 8,4, 1,7 Hz), δ_C 118,1/δ_H 7,14 (1H, d, *J* = 8,4 Hz), tín hiệu carbon CH nối với oxi tại δ_C 87,1/δ_H 4,76 (d, *J* = 4.2 Hz), nhóm CH_2 nối với oxi tại δ_C 72,8/ δ_H 3,89 (2H, m) và 4,25 (dd, *J* = 8,8; 6,7 Hz), một nhóm CH tại δ_C 55,5/δ_H 3,13 (m), nhóm methoxy tại δ_C 56,8/δ_H 3,87 (s). Ngoài ra, sự có mặt của phân tử đường glucose được nhận biết bởi tín hiệu carbon anome tại δ_C 102,9 cùng với proton anome tương ứng tại δ_H 4,89 (2H,m) và các tín hiệu CH (δ_C 74,9, 77,8, 71,3, 78,2), CH_2 (δ_C 62,5). Các số liệu nêu trên được xác định thông qua phổ ^1H, ^{13}C APT NMR và HMQC. Việc xác định vị trí liên kết của nhóm methoxy và đường

glucose vào vòng thơm được xác định thông qua các tương tác HMBC. Với hệ tương tác ABX đã được xác định trên thì hai nhóm thế sẽ được cho là gắn vào vị trí 3,4 của vòng thơm. Tương tác HMBC của proton methoxy với C-3 (δ 151,0), cùng với các tương tác giữa H-2 với C-4/C-6, giữa H-6 với C-2/C-4, giữa H-5 với C-1/C-3 và không có tương tác HMBC giữa H-6 với C-3 (151,0) chứng tỏ C-3 có độ dịch chuyển hóa học là 151,0 và đây chính là vị trí nối của nhóm methoxy với vòng thơm. Thêm vào đó, vị trí liên kết của đường tại C-4 được xác định thông qua tương tác HMBC của proton anomeric (δ 4,89) với C-4 (δ 147,5). Phân tích tổng hợp số liệu NMR 1D/2D và so sánh với tài liệu tham khảo [113], cho phép xác định **WI18** là pinoresinol di-*O*-β-D-glucopyranosid (**Hình 3.23**).



Hình 3.23. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC (→) chính của hợp chất WI18

3.1.2.19. Hợp chất WI19 (liriodendrin)

Hợp chất **WI19** được phân lập dưới dạng bột màu trắng. Phổ ESI-MS của **WI19** ghi nhận một pic ion giả phân tử tại *m/z* 765,73, được gán cho ion $[M+Na]^+$. Giá trị này phù hợp với công thức phân tử $C_{34}H_{46}O_{18}$ (M = 742,27 Da). Thông tin về giá trị ^{1}H-NMR và ^{13}C-NMR của hợp chất **WI19** và hợp chất tham khảo đo trong dung môi DMSO-*d6* được liệt kê trong **Bảng 3.19**.

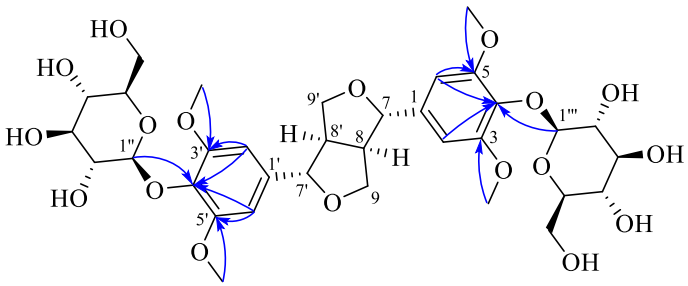
Bảng 3.19. Số liệu phổ NMR của hợp chất WI19 và hợp chất tham khảo

Vị trí	**WI19**		**Liriodendrin** [114]	
	$\delta_H^{a,b}$ (**mult., *J* = Hz**)	$\delta_C^{a,c}$	$\delta_H^{a,d}$ (**mult., *J* = Hz**)	$\delta_C^{a,e}$
1, 1′	–	137,1	–	137,1
2, 2′ 6, 6′	6,66 (4H, s,)	104,3	6,66 (4H, s,)	104,2
3, 3′ 5, 5′	–	152,6	–	152,6
4, 4′	–	133,7	–	133,7
7, 7′	4,67 (2H, d, 3,3)	85,1	4,67 (2H, d, 3,6)	85,1
8, 8′	3,09 (2H, m)	53,6	3,09 (2H, m)	53,6

Vị trí	WI19		Liriodendrin [114]	
	δ_H[a,b] (**mult., *J* = Hz**)	δ_C[a,c]	δ_H[a,d] (**mult., *J* = Hz**)	δ_C[a,e]
9, 9′	4,20 (2H, m) 3,83 (2H, dd, 9,1; 2,7)	71,4	4,20 (2H, dd, 9,2; 6,4) 3,83 (2H, dd, 9,2; 3,6)	71,4
3, 3′, 5, 5′ -OCH_3	3,76 (12H, s)	56,4	3,76 (12H, s)	56,4
1″, 1‴	4,88 (2H)*	102,7	4,88 (2H, d, 8,0)	102,7
2″, 2‴	3,18 (2H, m)	74,2	–	74,2
3″, 3‴	3,18 (2H, m)	76,5	–	76,5
4″, 4‴	3,12 (2H, m)	69,9	–	69,9
5″, 5‴	3,02 (2H, m)	77,2	–	77,2
6″, 6‴	3,59 (2H, dd, 10,7; 3,8) 3,40 (2H, m)	60,9	–	60,9

*[a] DMSO-d_6, [b] 500 MHz, [c] 125 MHz, [d] 400 MHz, [e] 100 MHz *: tín hiệu bị chồng chập*

Số liệu phổ thu được của hợp chất **WI19** tương tự như phổ của hợp chất **WI18**, ngoại trừ sự xuất hiện thêm của 2 nhóm methoxy tại δ_H 3,76 (12H, s, 3, 3′,5,5′-OCH_3) và các proton ABX của vòng thơm chuyển thành proton thơm đối xứng tại δ_H 6,66 (4H, s, H-2,2′,6,6′). Số liệu phổ trên chỉ ra rằng hợp chất **WI19** có nhiều hơn 2 nhóm thế methoxy so với hợp chất **WI18**, do đó 2 vòng thơm có cấu trúc đối xứng. Vị trí của nhóm methoxy ở vị trí C-5,5′ được xác định bằng tương tác HMBC từ H-6,6′ (δ_H 6,66) và 5,5′-OCH_3 (δ_H 3,76) tới C-5,5′ (δ_C 152,6). Từ phân tích các Số liệu phổ kết hợp với đối chiếu với số liệu tham khảo của liriodendrin đo trong cùng dung môi DMSO-d_6 [115], có thể kết luận rằng **WI19** là syringaresinol 4,4′-di-*O*-*β*-D-glucopyranosid, còn được gọi là liriodendrin (**Hình 3.24**).



Hình 3.24. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC (→) chính của hợp chất WI19

3.2. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU TÁC DỤNG SINH HỌC

3.2.1. Kết quả sàng lọc hoạt tính của cao chiết trên mức độ sản sinh IL-1β và IL-10

3.2.1.1. Chuẩn bị mẫu cao chiết cho nghiên cứu sàng lọc hoạt tính

Mẫu cây Niệt dó (cành và lá) sau khi sơ chế và làm khô (hàm ẩm 11,6%), dược liệu được chiết xuất với EtOH 70% để điều chế cao toàn phần và cao phân đoạn theo quy trình đã mô tả tại **Mục 3.1.1.1** và **Hình 3.1**. Quá trình này được thực hiện ở quy mô nhỏ nhằm phục vụ cho thử nghiệm sàng lọc hoạt tính sinh học, kết quả điều chế cao cụ thể như sau:

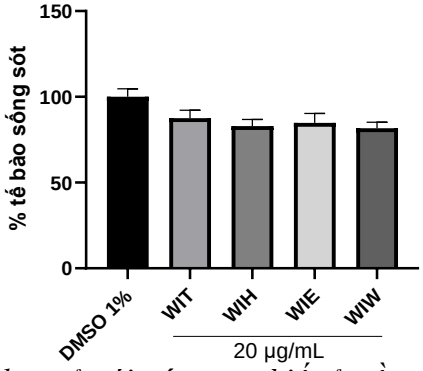
+ Chiết cao toàn phần: Từ 150 g dược liệu khô, tiến hành chiết hồi lưu bằng dung môi ethanol 70%, sau khi cất thu hồi dung môi thu được 12,8 g cao đặc toàn phần (**WIT**). Hiệu suất chiết đạt 8,5% (tính theo dược liệu khô), độ ẩm cao chiết là 11,2%.

+ Chuẩn bị các cao phân đoạn: Từ 10 g cao tổng **WIT**, phân tán trong nước nóng sau đó tiến hành chiết lỏng – lỏng với các dung môi có độ phân cực tăng dần, sau khi cô loại bỏ dung môi thu được các phân đoạn cao đặc tương ứng:

- Phân đoạn *n*-hexan (**WIH**): Khối lượng 3,9 g; hiệu suất 39%; độ ẩm 10,1%.
- Phân đoạn ethyl acetat (**WIE**): Khối lượng 1,8 g; hiệu suất 18%; độ ẩm 10,7%.
- Phân đoạn nước (**WIW**): Khối lượng 3,5 g; hiệu suất 35 %; độ ẩm 11,5%.

3.2.1.2. Đánh giá ảnh hưởng của các cao chiết đến khả năng sống sót của tế bào RAW 264.7.

Phương pháp MTT được áp dụng để đánh giá ảnh hưởng của cao toàn phần **WIT** và cao các phân đoạn; **WIH**, **WIE** và **WIW** đến khả năng sống sót của tế bào RAW 264.7. Nồng độ thử nghiệm của các cao phân đoạn là 20 µg/mL. Kết quả được thể hiện ở và **Hình 3.25.**



Tế bào RAW 264.7 được ủ với các cao chiết ở nồng độ 20 µg/mL trong 24 giờ. Khả năng sống sót của tế bào được xác định bằng phương pháp MTT. Mẫu trắng được xử lý bằng DMSO 1%. Dữ liệu được biểu thị dưới dạng giá trị trung bình ± SEM (n = 5).

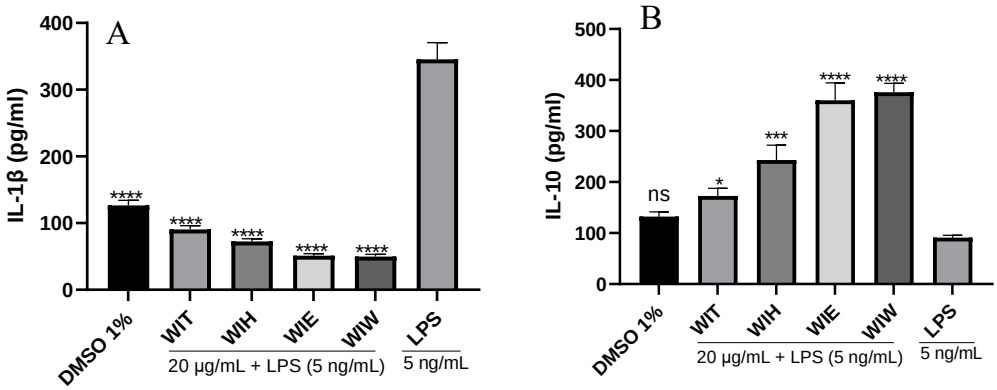
Hình 3.25. Ảnh hưởng của các cao chiết cành và lá Niệt dó đến khả năng sống sót của tế bào RAW 264.7

Kết quả từ Hình 3.25 cho thấy sau khi ủ 24 giờ với cao tổng (**WIT**) và cao các phân đoạn (**WIH**, cao **WIE** và **WIW**) của cành và lá Niệt dó ở nồng độ 20 µg/mL, tỷ lệ sống sót của tế bào RAW 264.7 đều đạt trên 80%.

3.2.1.3. Sàng lọc hoạt tính trên mức độ sản sinh IL-1β và IL-10 của cao tổng và cao chiết phân đoạn từ Niệt dó.

Thí nghiệm này nhằm xác định phân đoạn cao chiết có tiềm năng nhất cho nghiên cứu tiếp theo. Tiêu chí lựa chọn là tác động kép: phân đoạn phải đồng thời làm giảm nồng độ cytokin tiền viêm IL-1β và làm tăng (hoặc ít nhất duy trì) nồng độ cytokin kháng viêm IL-10 so với nhóm chứng mô hình LPS. Mục tiêu là xác định được 1–2 phân đoạn đáp ứng đồng thời cả hai tiêu chí trên.

Tế bào Raw 264.7 được ủ cùng với các cao **WIT**, **WIH**, **WIE** và **WIW** ở nồng độ 20 µg/mL để đánh giá khả ức chế IL-1β hoặc kích thích sản sinh IL-10 nhằm tìm ra các phân đoạn tiềm năng cho tác dụng kháng viêm và điều hòa miễn dịch của Niệt dó. Kết quả cho thấy ở **Hình 3.26**



*Tế bào RAW 264.7 được ủ với các cao chiết Niệt dó ở nồng độ 20 µg/mL trong 24 giờ có hoặc không có LPS (5 ng/mL). Các nhóm đối chứng bao gồm: nhóm chứng âm (chỉ xử lý DMSO 1%) và nhóm đối chứng LPS (chỉ xử lý LPS 5 ng/mL). Định lượng các cytokin bằng phương pháp ELISA. Số liệu được biểu thị dưới dạng giá trị trung bình Mean ± SEM (n = 5); Phân tích thống kê bằng One-way ANOVA kết hợp kiểm định Dunnett's post-hoc test để so sánh các nhóm thử nghiệm với nhóm đối chứng LPS: ns, không có ý nghĩa thống kê; *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001 so với nhóm tế bào chỉ được xử lý bằng LPS.*

Hình 3.26. Hoạt tính ức chế IL-1β và kích thích IL-10 cao chiết cành và lá Niệt dó trên tế bào RAW264.7

Nhận xét:

- Đối với thử nghiệm ức chế sản sinh IL-1β trên dòng tế bào RAW 264.7

+ Ở điều kiện sinh lý bình thường, nồng độ IL-1β tiết nền ở nhóm chứng âm (DMSO 1%) là 126,36 ± 7,87 pg/mL. Khi kích thích bằng LPS 5 ng/mL (nhóm LPS), nồng độ cytokin này tăng mạnh lên 345,61 ± 24,64 pg/mL (gấp 2,7 lần so với nhóm chứng âm, $p < 0,0001$).

+ Khi xử lý đồng thời với các mẫu cao chiết ở nồng độ 20 µg/mL, toàn bộ các mẫu khảo sát đều thể hiện hoạt tính ức chế sản sinh IL-1β có ý nghĩa thống kê so với nhóm LPS ($p < 0,0001$):

- Mẫu cao tổng **WIT** làm giảm nồng độ IL-1β xuống còn 90,58 ± 5,45 pg/mL (thấp hơn 3,8 lần so với nhóm LPS, $p < 0,0001$).
- Phân đoạn **WIH** làm giảm nồng độ IL-1β về mức 72,38 ± 4,20 pg/mL (thấp hơn 4,8 lần so với nhóm LPS, $p < 0,0001$).
- Hai phân đoạn **WIE** và **WIW** cho thấy xu hướng ức chế mạnh nhất, đưa nồng độ cytokin này xuống mức rất thấp, (thấp hơn 6,7 lần) và 49,75 ± 3,35 pg/mL (thấp hơn 6,9 lần) so với nhóm LPS ($p < 0,0001$). Thậm chí, nồng độ IL-1β ở hai nhóm này còn thấp hơn mức tiết nền sinh lý của tế bào ở nhóm chứng âm.

- Đối với thử nghiệm đánh giá khả năng kích thích sản sinh IL-10 trên dòng tế bào RAW 264.7:

+ Nồng độ IL-10 nền ở nhóm chứng âm (DMSO 1%) đạt 132,13 ± 9,24 pg/mL. Khi kích thích bằng LPS 5 ng/mL, nồng độ cytokin này ghi nhận ở mức 90,91 ± 4,56 pg/mL, sự sai khác không có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng âm (*ns*).

+ Khi ủ đồng thời với các mẫu cao chiết ở nồng độ 20 µg/mL, các phân đoạn đều ghi nhận khả năng kích thích tế bào tăng tiết cytokin kháng viêm IL-10 so với nhóm LPS:

- Phân đoạn **WIT** và **WIH** kích thích tăng tiết IL-10 với nồng độ đo được lần lượt là 172,82 ± 14,90 pg/mL (tăng 1,9 lần, $p < 0,05$) và 243,19 ± 29,33 pg/mL (tăng 2,7 lần, $p < 0,001$).
- Hai phân đoạn **WIE** và **WIW** thể hiện hiệu quả kích thích tăng tiết IL-10 vượt trội về mặt trị số; nồng độ cytokine đo được lần lượt đạt 360,41 ± 33,85 pg/mL (tăng

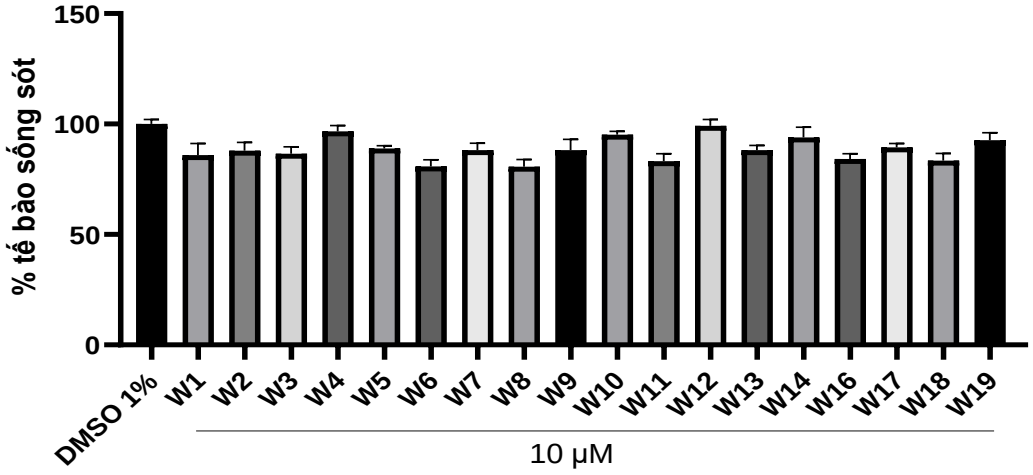
4,0 lần) và 375,90 ± 17,77 pg/mL (tăng 4,2 lần) so với nhóm LPS với độ tin cậy cao ($p < 0,0001$).

Dựa trên các kết quả sàng lọc ban đầu, ở nồng độ 20 µg/mL, hai phân đoạn **WIE** và **WIW** thể hiện tác động sinh học kép tiềm năng: vừa ức chế mạnh mẽ cytokin tiền viêm IL-1β, vừa kích thích tăng tiết cytokin kháng viêm IL-10 so với nhóm LPS. Do đó, **WIE** và **WIW** được lựa chọn là hai phân đoạn mục tiêu để tiếp tục phân lập thành phần hóa học và khảo sát sâu hơn các cơ chế dược lý ở các nội dung tiếp theo.

3.2.2. Kết quả sàng lọc hoạt tính của các hợp chất phân lập được từ Niệt dó trên mức độ sản sinh IL-1β và IL-10

3.2.2.1. Đánh giá ảnh hưởng của các hợp chất phân lập được đến khả năng sống sót của tế bào RAW 264.7

Theo định hướng tác dụng sinh học, hai cao phân đoạn **WIE** và **WIW** được sử dụng để phân lập các hoạt chất và mười chín hợp chất (**WI1-WI19)** đã được phân lập và xác định cấu trúc hóa học từ hai phân đoạn này. Ngoại trừ hợp chất **WI15** do khối lượng phân lập được quá nhỏ, không đủ để thực hiện thí nghiệm về sàng lọc và đánh giá tác tác dụng sinh học, 18 hợp chất còn lại được đánh giá nhằm xác định ảnh hưởng của chúng đến khả năng sống sót của tế bào RAW 264.7. Trước khi thực hiện các thí nghiệm tiếp theo với dòng tế bào này, phương pháp MTT đã được áp dụng để đánh giá ảnh hưởng của các chất thử đến khả năng sống sót của tế bào RAW 264.7. Nồng độ chất sử dụng trong thử nghiệm là 10 µM. Kết quả chỉ ra ở **Hình 3.27**.



Tế bào RAW 264.7 được ủ với các chất thử ở nồng độ 10 µM trong 24 giờ. Khả năng sống sót của tế bào được xác định bằng phương pháp MTT. Mẫu trắng được xử lý bằng DMSO 1%. Dữ liệu được biểu thị dưới dạng giá trị trung bình ± SEM (n = 5).

Hình 3.27. Ảnh hưởng của các hợp chất phân lập từ cành và lá Niệt dó đến khả năng sống sót của tế bào RAW 264.7

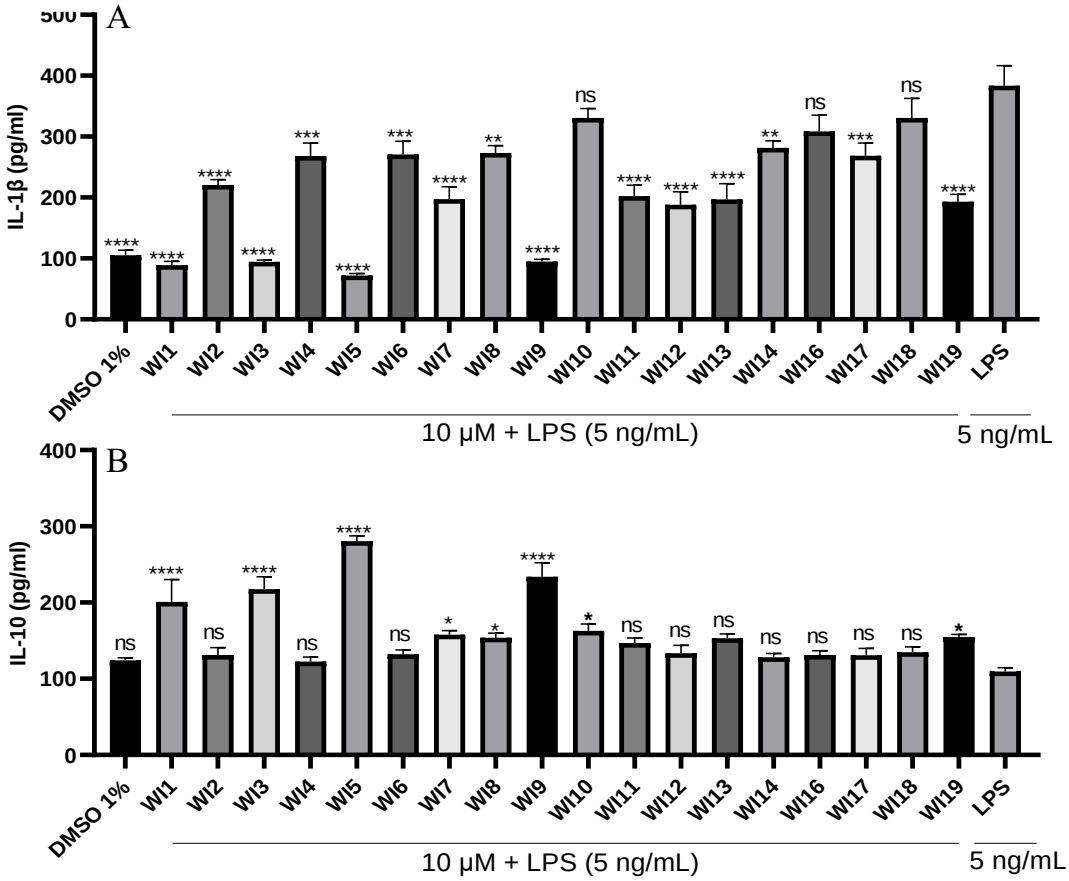
Nhận xét:

Hình 3.27 cho thấy sau khi tế bào RAW 264.7 được ủ với DMSO 1% và với từng hợp chất ở nồng độ 10 μM, tỉ lệ sống sót của tế bào RAW 264.7 đều đạt trên 80%. Trong đó, đối với mẫu chỉ chứa DMSO 1%, tỉ lệ sống sót của tế bào RAW 264.7 đạt 100% sau 5 lần thử nghiệm. Kết quả này cho thấy tế bào RAW 264.7 có thể được sử dụng để thực hiện các thí nghiệm tiếp theo cho các hợp chất phân lập được ở nồng độ 10 μM.

3.2.2.2. Sàng lọc hoạt tính trên sản sinh IL-1β và IL-10 của các hợp chất phân lập được từ Niệt dó

Thí nghiệm này nhằm xác định các hợp chất mang hoạt tính trong hai phân đoạn tiềm năng. Tiêu chí lựa chọn gồm ba điều kiện: (i) có tác động kép trên IL-1β và IL-10 với mức ý nghĩa thống kê so với nhóm LPS; (ii) khối lượng phân lập đủ lớn để thực hiện các thí nghiệm theo dải nồng độ tiếp theo; (iii) đại diện cho các nhóm hợp chất đặc trưng của loài Niệt dó (coumarin, flavonoid, lignan). Kết quả kỳ vọng là chọn ra khoảng 5–6 hợp chất tiềm năng.

Các hợp chất phân lập được sử dụng với nồng độ 10 μM để đánh giá hoạt tính ức chế sản sinh IL-1β và kích thích sản sinh IL-10 trên tế bào RAW 264.7 được kích thích bằng LPS. Kết quả được chỉ ra ở **Hình 3.28**



*Tế bào RAW 264.7 được ủ trong 24 giờ với các hợp chất (10 μM) có hoặc không có LPS (5 ng/mL). Các nhóm đối chứng bao gồm: nhóm chứng âm (chỉ xử lý DMSO 1%) và nhóm đối chứng LPS (chỉ xử lý LPS 5 ng/mL). Định lượng các cytokin bằng phương pháp ELISA. (**A**) Hoạt tính ức chế sản sinh IL-1β, (**B**) Hoạt tính kích khích sản sinh IL-10. Số liệu biểu thị dưới dạng giá trị trung bình Mean ± SEM (n = 5). Phân tích thống kê bằng One-way ANOVA kết hợp kiểm định Dunnett's post-hoc test để so sánh các nhóm thử nghiệm với nhóm LPS: ns: không có ý nghĩa thống kêns: không có ý nghĩa thống kê; *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,00, ****p < 0,0001 so với nhóm LPS.*

Hình 3.28. Sàng lọc hoạt tính ức chế IL-1β và kích thích IL-10 của các hợp chất phân lập từ Niệt dó trên tế bào RAW264.7

Nhận xét:

- Đối với thử nghiệm sàng lọc hoạt tính ức chế cytokin tiền viêm IL-1β

+ Kết quả Hình 3.28 (A) cho thấy khi tế bào RAW 264.7 được ủ với DMSO 1% (nhóm chứng âm, phản ánh mức đáp ứng nền tự nhiên của tế bào) trong 24 giờ, nồng độ IL-1β đo được là 105,32 ± 8,01 pg/mL. Khi tế bào được kích thích bằng LPS 5 ng/mL, nồng độ IL-1β là 383,73 ± 32,68 pg/mL, cao hơn gấp khoảng 3,7 lần so với mẫu chỉ được ủ với DMSO 1%. Sự khác biệt đáng kể này có ý nghĩa thống kê với $p < 0,0001$.

+ Khi ủ đồng thời ở nồng độ 10 µM kết hợp với LPS 5 ng/mL, các hợp chất khảo sát cho thấy khả năng làm giảm nồng độ IL-1β so với nhóm LPS theo các mức độ khác nhau:

- Nhóm hợp chất cho thấy xu hướng ức chế mạnh nhất về mặt giá trị số học gồm **WI3**, **WI5** và **WI9**; các chất này đưa nồng độ IL-1β xuống dưới 100 pg/mL (thấp hơn cả mức tiết nền sinh lý của tế bào) với độ tin cậy thống kê cao ($p < 0,0001$ so với nhóm LPS). Trong đó, **WI5** ghi nhận giá trị nồng độ IL-1β thấp nhất (71,80 ± 3,47 pg/mL), thấp hơn 5,3 lần so với nhóm LPS; tiếp theo là **WI3** (94,35 ± 3,10 pg/mL) và **WI9** (94,99 ± 3,57) pg/mL.
- Nhóm hợp chất thể hiện mức độ ức chế trung bình bao gồm **WI2**, **WI7**, **WI11**, **WI12**, **WI13**, **WI14**, **WI17** và **WI19**, làm giảm nồng độ IL-1β về khoảng từ 187 đến 280 pg/mL; sự suy giảm này có ý nghĩa thống kê rõ rệt so với nhóm LPS ($p < 0,01$ đến $p < 0,0001$).
- Ngược lại, ba hợp chất **WI10**, **WI16** và **WI18** không ghi nhận sự sai khác có ý nghĩa thống kê về nồng độ IL-1β so với nhóm LPS (*ns*, $p > 0,05$), cho thấy các hợp chất này hầu như không có tác dụng ức chế cytokin tiền viêm này ở nồng độ khảo sát

- Đối với thử nghiệm sàng lọc hoạt tính kích thích cytokin ức chế viêm IL-10:

+ Kết quả Hình 3.28 (b) cho thấy, ở nhóm chứng âm (DMSO 1%), nồng độ IL-10 nền đạt 124,26 ± 3,25 pg/mL. Khi tế bào chỉ được kích thích với LPS 5 ng/mL, nồng độ IL-10 ghi nhận ở mức 109,43 ± 5,12 pg/mL (sai khác không có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng âm, *ns*).

+ Khi xử lý đồng thời với các hợp chất ở nồng độ 10 µM, tác động điều hòa tăng tiết IL-10 được ghi nhận như sau:

- Bốn hợp chất thể hiện xu hướng kích thích tăng tiết IL-10 vượt bậc về mặt trị số gồm **WI1**, **WI3**, **WI5** và **WI9**; toàn bộ các chất này đều kích thích tăng nồng độ IL-10 có ý nghĩa thống kê rất cao so với nhóm LPS ($p < 0,0001$). Cụ thể: **WI5** ghi nhận mức nồng độ IL-10 cao nhất, đạt 280,51 ± 7,04 pg/mL (tăng khoảng 2,6 lần so với nhóm LPS); theo sau là **WI9 (**233,98 ± 18,41 pg/mL, tăng 2,1 lần), **WI3** (217,18 ± 16,56 pg/mL, tăng 2,0 lần) và **WI1** (200,87 ± 29,31 pg/mL, tăng 1,8 lần).
- Ba hợp chất gồm **WI7**, **WI8**, và **WI19** thể hiện mức độ kích thích vừa phải; nồng độ IL-10 đo được lần lượt là 157,78 ± 5,53 pg/mL (**WI7**), 153,97 ± 5,74 pg/mL (**WI8**),

154,75 ± 3,33 pg/mL (**WI19**), đều ghi nhận sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nhóm LPS ($p < 0,05$)

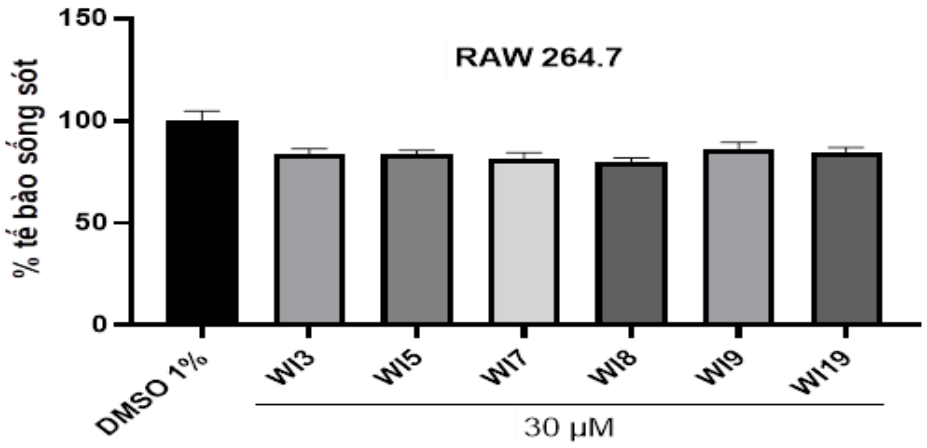
- Các hợp chất còn lại (**WI2**, **WI4**, **WI6**, **WI10**, **WI11**, **WI12**, **WI13**, **WI14**, **WI16**, **WI17** và **WI18**) không thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê so với nhóm LPS (*ns*, $p > 0,05$).

Để lựa chọn các phân tử mục tiêu cho các thử nghiệm chuyên sâu, tiêu chí đặt ra là hợp chất vừa có xu hướng ức chế tốt IL-1β, vừa kích thích tăng tiết IL-10, đồng thời đảm bảo hàm lượng phân lập đủ lớn và đại diện cho nhóm hợp chất đặc trưng của cây Niệt dó. Mặc dù **WI1** (methyl 4-hydroxybenzoat) thể hiện hoạt tính sinh học tốt, song đây là hợp chất có cấu trúc đơn giản, hàm lượng phân lập thấp và không đặc trưng cho loài. Do đó, 6 hợp chất tiềm năng được lựa chọn để tiếp tục nghiên cứu sâu hơn về hoạt tính trên một số chỉ báo liên quan đến viêm và miễn dịch bao gồm: **WI3**, **WI5**, **WI7**, **WI8**, **WI9** và **WI19**.

3.2.3. Kết quả đánh giá hoạt tính của một số hợp chất phân lập từ Niệt dó lên sự sản sinh IL-1β và IL-10 trên tế bào RAW 264.7.

3.2.3.1. Đánh giá ảnh hưởng của một số hợp chất phân lập được đến khả năng sống sót của tế bào RAW 264.7

Dựa trên kết quả sàng lọc hoạt tính đối với hai cytokine IL-1β và IL-10, sáu hợp chất bao gồm **WI3**, **WI5**, **WI7**, **WI8**, **WI9** và **WI19** đã được lựa chọn để tiếp tục đánh giá sâu hơn về hoạt tính sinh học. Nhằm loại trừ khả năng ảnh hưởng của độc tính tế bào lên sự sản sinh cytokin, thử nghiệm MTT được thực hiện để khảo sát tác động của các hợp chất này ở nồng độ cao nhất (khảo sát ở 30 μM) lên tỷ lệ sống sót của dòng tế bào đại thực bào RAW 264.7. Kết quả đánh giá độc tính tế bào được thể hiện trong **Hình 3.29**.



Tế bào RAW 264.7 được ủ với các chất thử ở nồng độ 30 µM trong 24 giờ. Khả năng sống sót của tế bào được xác định bằng phương pháp MTT. Mẫu trắng được xử lý bằng DMSO 1%. Dữ liệu được biểu thị dưới dạng giá trị trung bình ± SEM (n = 5).

Hình 3.29. Ảnh hưởng của một số hợp chất phân lập từ cành và lá Niệt dó đến khả năng sống sót của tế bào RAW 264.7

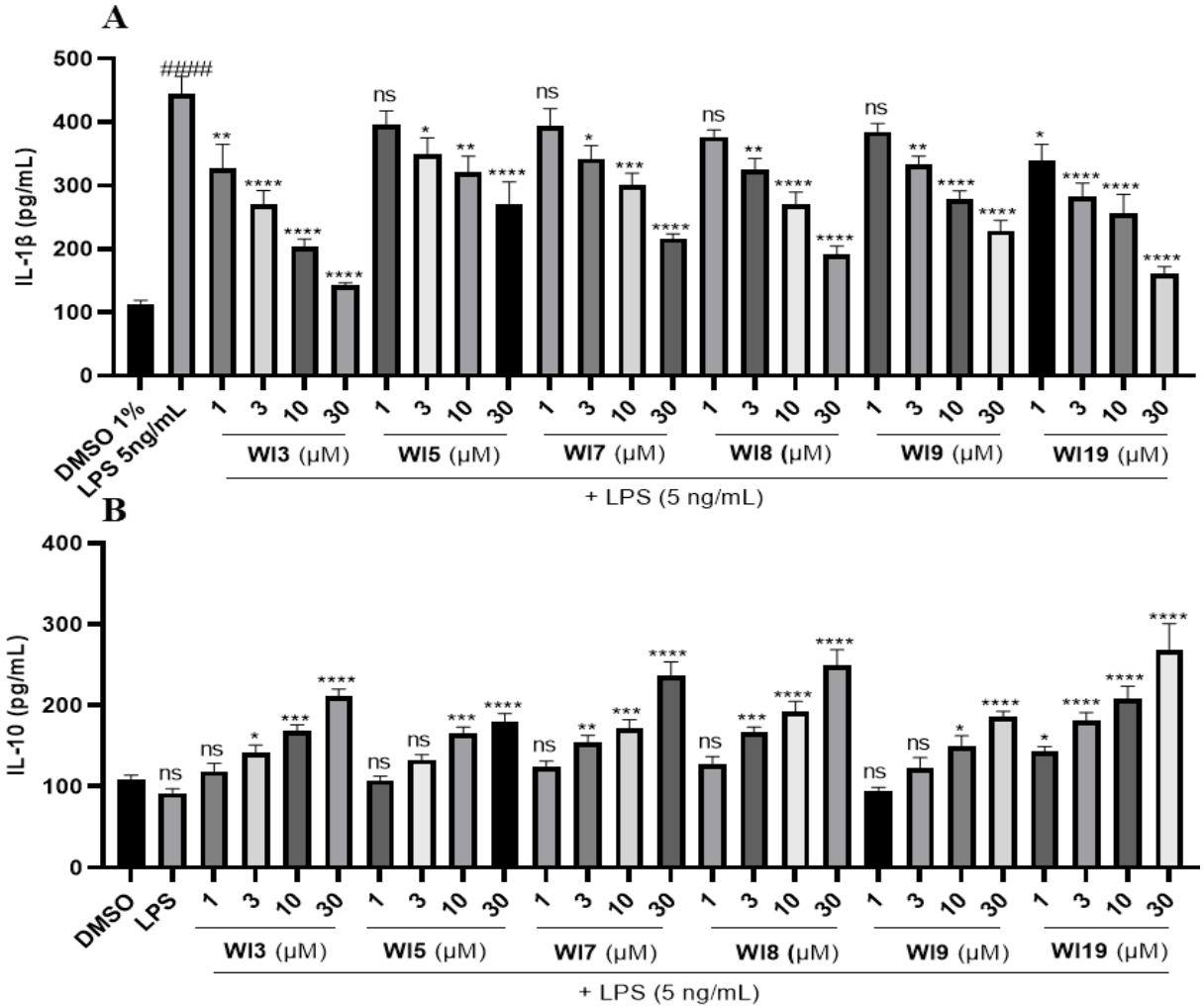
Nhận xét:

Kết quả Hình 3.29 cho thấy, sau 24 giờ xử lý với các hợp chất **WI3**, **WI5**, **WI7**, **WI8**, **WI9** và **WI19** ở nồng độ 30 µM, tỷ lệ sống sót của tế bào RAW 264.7 đạt từ 80,02 % đến 86,32 %. Do đó, nồng độ tối đa 30 µM được lựa chọn làm cơ sở an toàn để tiếp tục đánh giá hoạt tính ức chế IL-1β và kích thích IL-10 sản sinh trên dòng tế bào RAW 264.7.

3.2.3.2. Kết quả đánh giá hoạt tính ức chế IL-1β và kích thích IL-10 của một số hợp chất trên tế bào RAW 264.7

Tế bào RAW 264.7 được đồng ủ trong 24 giờ với sáu hợp chất tiềm năng (**WI3**, **WI5**, **WI7**, **WI8**, **WI9**, **WI19**) ở các nồng độ 1, 3, 10 và 30 µM, kết hợp kích thích bằng LPS (5 ng/mL). Nhóm chứng âm (chỉ chứa DMSO 1%) và nhóm LPS (tế bào chỉ được xử lý bằng LPS 5 ng/mL). Thí nghiệm này nhằm khẳng định quan hệ liều – đáp ứng và định lượng hoạt lực của các hợp chất tiềm năng trên nhánh miễn dịch bẩm sinh. Mục tiêu là nồng độ IL-1β giảm dần và nồng độ IL-10 tăng dần theo dải nồng độ chất thử, cho phép xác định giá trị IC_{50} trên tín hiệu IL-1β.

Sự thay đổi nồng độ cytokin phụ thuộc vào liều lượng chất thử được trình bày trong **Hình 3.30**.



*Tế bào RAW 264.7 được ủ trong 24 giờ với các hợp chất (1, 3, 10 và 30 μM) có hoặc không có LPS (5 ng/mL). Các nhóm đối chứng bao gồm: nhóm chứng âm (chỉ xử lý DMSO 1%) và nhóm đối chứng LPS (chỉ xử lý LPS 5 ng/mL). Định lượng các cytokin bằng phương pháp ELISA. (**A**) Hoạt tính ức chế sản sinh IL-1β, (**B**) Hoạt tính kích khích sản sinh IL-10. Số liệu biểu thị dưới dạng giá trị trung bình ± SEM (n = 5). Phân tích thống kê bằng One-way ANOVA kết hợp kiểm định Dunnett's post-hoc test để so sánh các nhóm thử nghiệm với nhóm LPS; ns: không có ý nghĩa thống kê; *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 so với nhóm LPS.*

Hình 3.30. Hoạt tính ức chế IL-1β và kích thích IL-10 của một số hợp chất phân lập từ Niệt dó

Khả năng ức chế sản sinh cytokin tiền viêm IL-1β của một số hợp chất phân lập từ Niệt dó được thể hiện qua giá trị IC_{50} tại **Bảng 3.20** dưới đây:

Bảng 3.20. Giá trị IC_{50} của một số hợp chất phân lập từ Niệt dó trên ức chế sản sinh IL-1β

Hợp chất	WI3	WI5	WI7	WI8	WI9	WI19
IC_{50} ± SE (μM)	6,4 ± 1,23	31,1 ± 3,07	19,98 ± 1,92	14,88 ± 1,04	18,80 ± 2,46	9,73 ± 1,26

Nhận xét:

- Về hoạt tính ức chế IL-1β: Hình 3.30 (A) và Bảng 3.20 cho thấy ở mẫu trắng, tế bào chỉ được ủ với DMSO 1%, nồng độ cytokin tiền viêm IL-1β duy trì ở mức nền thấp (113,75 ± 5,22 pg/mL). Khi được kích thích bằng LPS 5 ng/mL, nồng độ IL-1β tăng lên mức 443,89 ± 26,27 pg/mL, tương đương gấp bốn lần so chứng âm ($p < 0,0001$). Điều này cho thấy LPS là tác nhân gây viêm hiệu quả. Ở các mẫu thử, tế bào được ủ với các chất tiềm năng cho thấy nồng độ IL-1β giảm khi nồng độ chất thử tăng từ 1 μM đến 30 μM cho thấy khả năng ức chế IL-1β sản sinh trên tế bào RAW 264.7 được kích thích bằng LPS. Tuy nhiên hoạt này có sự khác nhau ở các mẫu thử.

+ **WI3** là hợp chất mạnh nhất với giá trị IC_{50} thấp nhất (6,4 ± 1,23 μM), ngay ở nồng độ 1 μM đã làm giảm đáng kể nồng độ IL-1β so với nhóm chỉ được ủ với LPS 5ng/mL sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,01$ và và đạt hiệu quả ức chế gần với mức nền tại nồng độ 30 μM (khoảng 140 pg/mL)

+ **WI19** thể hiện hoạt tính ức IL-1β với IC_{50} = 9,73 ± 1,26 μM. Hợp chất này thể hiện khả năng ức chế tăng dần theo nồng độ khảo sát và mạnh nhất tại nồng độ 30 μM ($p < 0,0001$).

+ **WI8** và **WI9** có mức hoạt lực ức chế sản sinh IL-1β tương đương nhau với giá trị IC_{50} lần lượt là 14,88 μM và 18,80 μM .

+ **WI7** (IC_{50} = 19,98 μM) có hiệu lực gần tương đương **WI9**, nhưng kém hơn tại các nồng độ trung gian.

+ **WI5** có IC_{50} cao nhất (31,1 ± 3,07 μM), phản ánh khả năng ức chế sản sinh IL-1β thấp nhất trong nhóm các chất tiềm năng.

- Về hoạt tính kích thích IL-10. Hình 3.30 (B) cho thấy ở mẫu tế bào chỉ được ủ với DMSO 1% nồng độ IL-10 là 109,2 pg/mL. Mẫu tế bào được ủ với LPS (5 ng/mL) nồng độ IL-10 trung bình là 92,0 pg/mL, mức chênh lệnh không có ý nghĩa thống kê (*ns*). Ở các mẫu thử, tế bào RAW 264.7 được cùng với các chất tiềm năng và LPS, nồng độ trung bình IL-10 đo được tăng dần theo nồng độ chất thử.

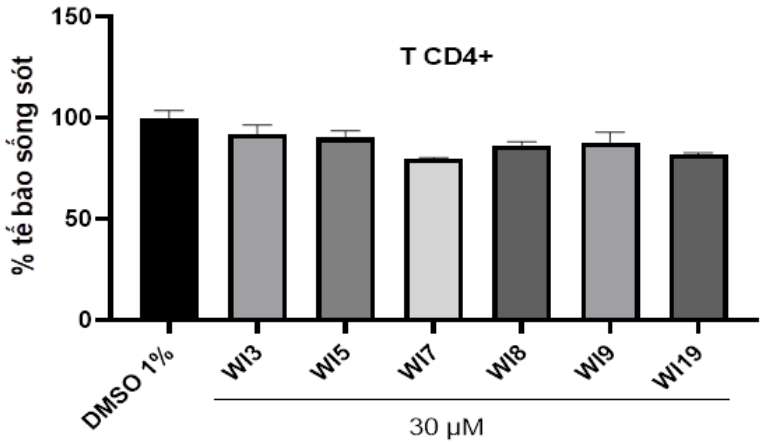
3.2.4. Kết quả đánh giá hoạt tính của một số hợp chất phân lập từ Niệt dó lên sự sản sinh INF-γ, IL-17 và Foxp3 trên dòng tế bào T CD4+

Các thí nghiệm trong mục này nhằm đánh giá tác động của một số hợp chất tiềm năng lên nhánh miễn dịch thích ứng, thông qua ba chỉ dấu đại diện cho ba phân nhóm tế bào T CD4+: IFN-γ (Th1), IL-17 (Th17) và yếu tố phiên mã Foxp3 (Treg). Kết quả kỳ

vọng là các hợp chất làm giảm các cytokin hiệu lực gây viêm (IFN-γ, IL-17), đồng thời mức độ tác động lên Foxp3 yếu hơn so với hai cytokin trên – qua đó dịch chuyển cân bằng giữa các phân nhóm T CD4+ về phía dung nạp miễn dịch, thể hiện tính chất điều hòa miễn dịch thay vì ức chế miễn dịch tổng thể.

3.2.4.1. Đánh giá ảnh hưởng của một số chất phân lập được đến khả năng sống sót của tế bào T CD4+

Trước khi đánh giá hoạt tính của một số hợp chất lên khả năng sản sinh cytokin của dòng tế bào T CD4+, thử nghiệm MTT đã được thực hiện nhằm khảo sát tác động của chất thử ở nồng độ cao nhất (30 µM) lên tỷ lệ sống sót của tế bào. Kết quả đánh giá độc tính tế bào được thể hiện trong **Hình 3.31**.



Tế bào T CD4+ được ủ với các chất thử ở nồng độ 30 µM trong 24 giờ. Khả năng sống sót của tế bào được xác định bằng phương pháp MTT. Mẫu trắng được xử lý bằng DMSO 1%. Dữ liệu được biểu thị dưới dạng giá trị trung bình ± SEM (n = 5).

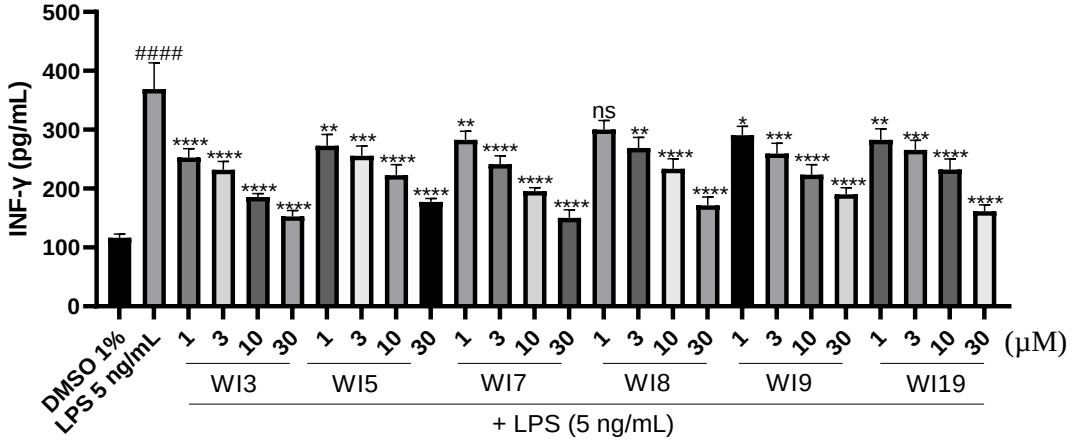
Hình 3.31. Ảnh hưởng của một số hợp chất phân lập từ cành và lá Niệt dó đến khả năng sống sót của tế bào T CD4+

Nhận xét:

Kết quả Hình 3.31 cho thấy khi xử lý với các chất thử ở nồng độ 30 µM, tỷ lệ sống sót của tế bào T CD4+ đạt 80% đến 92,2 %. Do đó nồng độ 30 µM được đánh giá là an toàn để có thể sử dụng cho các thử nghiệm tiếp theo trên dòng tế bào này.

3.2.4.2. Kết quả đánh giá hoạt tính ức chế INF-γ in vitro của một số hợp chất phân lập từ Niệt dó

Tế bào T CD4+ được ủ cùng các hợp chất **WI3**, **WI5**, **WI7**, **WI8**, **WI9** và **WI19** ở dải nồng độ 1, 3, 10 và 30 µM và LPS (5 ng/ml) để đánh giá khả năng ức chế và INF-γ sản sinh trên dòng tế bào T CD4+. Sự thay đổi nồng độ INF-γ phụ thuộc vào liều lượng chất thử được trình bày trong **Hình 3.32** dưới đây:



*Tế bào T CD4+ được ủ trong 24 giờ với các hợp chất (1, 3, 10 và 30 µM) có hoặc không có LPS (5 ng/mL). Các nhóm đối chứng bao gồm: nhóm chứng âm (chỉ xử lý DMSO 1%) và nhóm đối chứng LPS (chỉ xử lý LPS 5 ng/mL). Định lượng INF-γ bằng phương pháp ELISA. Số liệu biểu thị dưới dạng giá trị trung bình ± SEM (n = 5). Phân tích thống kê bằng One-way ANOVA kết hợp kiểm định Dunnett's post-hoc test để so sánh các nhóm thử nghiệm với nhóm LPS; ns: không có ý nghĩa thống kê; *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 so với nhóm đối chứng LPS, ####p < 0,0001 so với nhóm DMSO.*

Hình 3.32. Hoạt tính ức chế sản sinh INF-γ của một số hợp chất phân lập từ Niệt dó

Hoạt tính chế sự cytokin tiền viêm INF-γ trên tế bào T CD4+ của một số hợp chất phân lập từ Niệt dó được thể hiện qua giá trị IC_{50} được tổng hợp trong **Bảng 3.21**.

Bảng 3.21. Giá trị IC_{50} của một số hợp chất phân lập từ Niệt dó trên ức sản sinh INF-γ

Hợp chất	WI3	WI5	WI7	WI8	WI9	WI19
IC_{50} ± SE (µM)	9,28 ± 1,23	16,22 ± 2,14	9,57 ± 1,01	16,83 ± 2,15	18,50 ± 2,57	14,73 ± 1,49

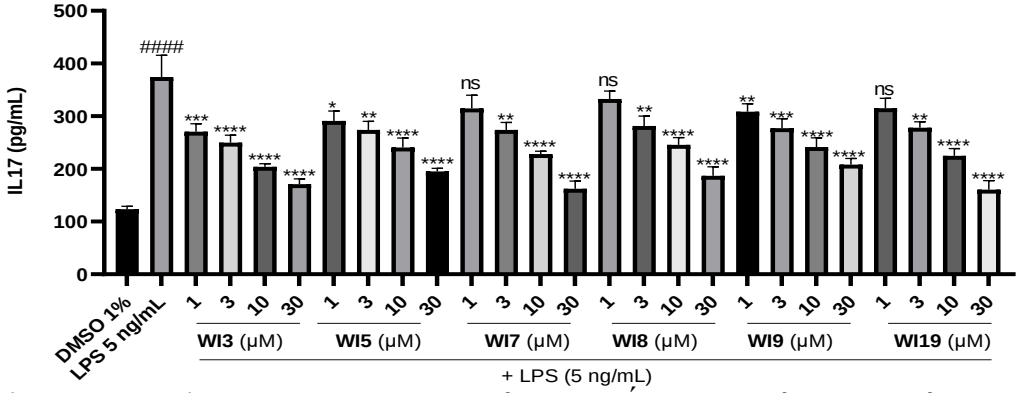
Nhận xét:

Từ Hình 3.32 cho thấy khi tế bào T CD4+ tiếp xúc với LPS (5ng/mL), nồng độ trung bình của INF-γ đo được tăng lên rõ rệt so với nền sinh lý bình thường (khi tế bào chỉ được ủ với DMSO 1%), sự khác biệt có ý nghĩa thống thông kê với $p < 0,0001$. Điều này khẳng định vai trò của LPS là tác nhân hiệu quả trong mô hình gây tăng tiết INF-γ trên tế bào T CD4+. Ở các mẫu được ủ với chất thử, nồng độ INF-γ giảm và phụ thuộc theo nồng độ của chất thử nghiệm. Tuy nhiên, mức độ ức chế thể hiện khác nhau ở các hợp chất (**Bảng 3.21**). Trong đó, **WI3** thể hiện hoạt tính ức chế sản sinh INF-γ mạnh

hơn các chất tiềm năng còn lại với IC_{50} là 9,28 ± 1,23 µM. **WI5** và **WI7** thể hiện hoạt tính ức chế interferon này ở mức trung bình. Trong khi đó các hợp chất **WI8, WI9** và **WI19** cho thấy hoạt tính yếu hơn các hợp chất tiềm năng khác trong thử nghiệm này.

3.2.4.3. Kết quả đánh giá hoạt tính ức chế sản sinh IL-17 in vitro của một số hợp chất phân lập từ Niệt dó

Các hợp chất **WI3**, **WI5**, **WI7**, **WI8**, **WI9** và **WI19** được sử dụng để đánh giá khả năng ức chế sản sinh trên IL-17 dòng tế bào T CD4+ được kích thích bởi LPS (5 ng/ml). Sự thay đổi nồng độ IL-17 phụ thuộc vào liều lượng chất thử được trình bày trong **Hình 3.33.**



*Tế bào T CD4+ được ủ trong 24 giờ với các hợp chất (1, 3, 10 và 30 µM) có hoặc không có LPS (5 ng/mL). Các nhóm đối chứng bao gồm: nhóm chứng âm (chỉ xử lý DMSO 1%) và nhóm đối chứng LPS (chỉ xử lý LPS 5 ng/mL). Định lượng IL-17 bằng phương pháp ELISA. Số liệu biểu thị dưới dạng giá trị trung bình ± SEM (n = 5)). Phân tích thống kê bằng One-way ANOVA kết hợp kiểm định Dunnett's post-hoc test để so sánh các nhóm thử nghiệm với nhóm LPS ns: không có ý nghĩa thống kê; *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 so với nhóm đối chứng LPS, ####p < 0,0001 so với nhóm DMSO.*

Hình 3.33. Hoạt tính ức chế sản sinh IL-17 của một số hợp chất phân lập từ Niệt dó

Hoạt tính chế sản sinh cytokin tiền viêm IL-17 trên tế bào T CD4+ của một số hợp chất phân lập từ Niệt dó được thể hiện qua giá trị IC_{50} tổng hợp trong **Bảng 3.23** dưới đây:

Bảng 3.22. Giá trị IC_{50} của một số hợp chất phân lập từ Niệt dó trên ức chế sản sinh IL-17

Hợp chất	WI3	WI5	WI7	WI8	WI9	WI19
IC_{50} ± SE (µM)	12,62 ± 2,57	22,92 ± 4,41	14,69 ± 2,13	18,41 ± 3,21	26,06 ± 3,83	14,50 ± 1,04

Nhận xét:

Từ Hình 3.33 cho thấy ở mẫu chứng sinh lý (tế bào T CD4+ chỉ được ủ với DMSO 1%) nồng độ IL-17 đo được là 123,48 pg/mL. Ở mẫu tế bào được ủ cùng với LPS (5ng/mL) nồng độ IL-17 đạt 374,23 pg/mL, tăng khoảng 3 lần so với nhóm chỉ

được ủ với DMSO 1%, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,0001$. Đối với nhóm thử, tế bào được ủ với các chất tiềm năng ở dải nồng độ 1-30 µM và LPS (5 ng/mL), nồng độ IL-17 giảm theo xu hướng phụ thuộc vào nồng độ của chất thử. Tuy nhiên, khả năng ức chế khác sản sinh IL-17 của mỗi hợp chất có sự khác nhau dựa trên giá trị IC_{50} (**Bảng 3.22**) và mức ý nghĩa thống kê trên biểu đồ (**Hình 3.33**).

+ **WI3** Là hợp chất có hoạt tính mạnh nhất với giá trị IC_{50} là 12,62 ± 2,57 µM. Ngay tại nồng độ thấp nhất 1µM, **WI3** đã cho thấy khả năng ức chế đáng kể ($p < 0,001$).

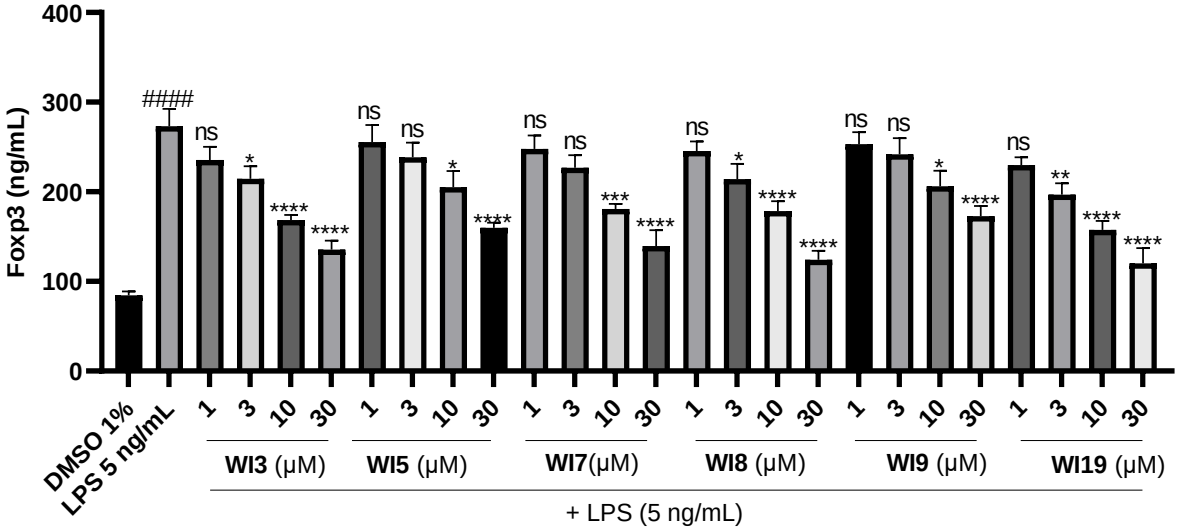
+ **WI19** và **WI7** thể hiện hiệu lực gần với **WI3**, với IC_{50} lần lượt là 14,50 ± 1,04 µM và 14,69 ± 2,13 µM.

+ **WI8** thể hiện hoạt tính ở mức trung bình với giá trị IC_{50} là 18,41 ± 3,21 µM. Tại nồng độ thấp (1 µM), **WI8** chưa thể sự ức chế khác biệt (*ns*). Tuy nhiên, từ nồng độ 3 µM trở đi, hiệu quả ức chế bắt đầu xuất hiện rõ rệt.

+ **WI5** và **WI9** thể hiện hoạt tính ức chế IL-17 yếu hơn các hợp chất khác, với giá trị IC_{50} đều trên 20 µM. Trong đó, **WI9** là chất có hoạt tính thấp nhất trong bảng khảo sát (IC_{50} = 26,06 ± 3,83 µM). ở nồng độ chất thử 1 µM, nồng độ IL-17 đo được gần như tương đương với mẫu LPS, sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê (*ns*).

3.2.4.4. Kết quả đánh giá hoạt tính ức chế Foxp3 in vitro của một số hợp chất phân lập từ Niệt dó

Các hợp chất **WI3**, **WI5**, **WI7**, **WI8**, **WI9** và **WI19** được sử dụng để đánh giá khả năng ức chế biểu hiện của Foxp3 sản sinh trên dòng tế bào T CD4+ được kích thích bởi LPS (5 ng/ml). Các hợp chất thử nghiệm được ủ cùng tề bào T CD4+ và LPS ở các nồng độ là 1, 3, 10 và 30 µM. Sự thay đổi nồng độ Foxp3 phụ thuộc vào liều lượng chất thử được trình bày trong **Hình 3.34**.



*Tế bào T CD4+ được ủ trong 24 giờ với các hợp chất (1, 3, 10 và 30 μM) có hoặc không có LPS (5 ng/mL). Các nhóm đối chứng bao gồm: nhóm chứng âm (chỉ xử lý DMSO 1%) và nhóm đối chứng LPS (chỉ xử lý LPS 5 ng/mL). Định lượng Foxp3 bằng phương pháp ELISA. Số liệu biểu thị dưới dạng giá trị trung bình ± SEM (n = 5). Phân tích thống kê bằng One-way ANOVA kết hợp kiểm định Dunnett's post-hoc test để so sánh các nhóm thử nghiệm với nhóm LPS; ns: không có ý nghĩa thống kê; *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 so với nhóm đối chứng LPS, ####p < 0,0001 so với nhóm DMSO.*

Hình 3.34. Hoạt tính ức chế Foxp3 của một số hợp chất phân lập được từ Niệt dó

Khả năng ức chế biểu hiện của Foxp3 của một số hợp chất phân lập từ Niệt dó trên dòng tế bào T CD4+ được thể hiện qua giá trị IC_{50} tại **Bảng 3.23** dưới đây:

Bảng 3.23. Giá trị IC_{50} của một số hợp chất phân lập từ Niệt dó trên ức chế Foxp3

Hợp chất	WI3	WI5	WI7	WI8	WI9	WI19
IC_{50} ± SE (μM)	23,38 ± 3,47	43,45 ± 5,34	20,47 ± 3,04	18,84 ± 1,16	51,26 ± 6,72	13,67 ± 1,85

Nhận xét:

Từ Hình 3.34 cho thấy ở nhóm chứng âm (tế bào T CD4+ chỉ được ủ với DMSO 1%) nồng độ Foxp3 nội sinh duy trì ở mức thấp, giá trị trung bình khoảng 84,36 ng/mL. khi tế bào được ủ với LPS (5 ng/mL) nồng độ Foxp3 trung bình đo được là 273,15 ng/mL, tương đương mức tăng 3,2 lần so với mức sinh lý ($p < 0,001$). Kết quả này cho thấy LPS đóng vai trò là tác nhân kích thích hiệu quả, gây ra sự tăng biểu hiện Foxp3. Trong mô hình *in vitro* này, các hợp chất được đánh giá có khả năng ức chế sự tăng sinh Foxp3 do LPS gây ra. Tuy nhiên, hoạt tính có sự phân hóa giữa các hợp chất, được thể hiện qua giá trị IC_{50} (**Bảng 3.23**) và mức ý nghĩa thống kê trên biểu đồ (**Hình 3.34**).

+ Hợp chất **WI19** cho thấy hoạt tính ức chế Foxp3 mạnh nhất với IC_{50} = 13,67 ± 1,85 μM. Ở nồng độ 3 μM bắt đầu thể hiện sự ức chế ($p < 0,01$), tại nồng độ cao nhất

trong thử nghiệm (30 µM) **WI19** ức chế mạnh sự biểu hiện của Foxp3, làm giảm nồng độ Foxp3 xuống mức trung bình khoảng 120 ng/mL (gần với mức nền 84 ng/mL của mẫu DMSO), sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,0001$.

+ **WI8** thể hiện mức độ ức chế Foxp3 ở mức trung bình với IC_{50} = 18,84 ± 1,16 µM.

+ **WI7** và **WI3** là hai chất này có hoạt tính tương đương nhau với IC_{50} lần lượt là 20,47 ± 3,04 µM và 23,38 ± 3,47 µM.

+ **WI5** và **WI9** thể hiện khả năng ức Foxp3 thấp nhất với với IC_{50} lần lượt là 43,45 ± 5,34 µM và 51,26 ± 6,72 µM.

CHƯƠNG 4. BÀN LUẬN

4.1. VỀ THÀNH PHẦN HÓA HỌC

4.1.1. Về chiết xuất

Niệt dó là loài được sử dụng trong y học cổ truyền ở nhiều nước trên thế giới trong đó có Việt Nam, bộ phận dùng là rễ và phân trên mặt đất của cây trong đó tập trung chủ yếu là vỏ rễ và vỏ thân. Nhiều nghiên cứu về thành phần hóa học cũng như tác dụng dược lý của loài Niệt dó trên thế giới tập trung vào phần rễ của loài cây này. Theo kinh nghiệm sử dụng trong Y học cổ truyền, phần trên mặt đất của Niệt dó có độc và độc tính chủ yếu tập trung ở hoa và quả của loài cây này. Bện cạnh đó, báo cáo của đề tài nghị định thư (Mã số: 09/2020/HĐ-NĐT) về nghiên cứu độc tính cấp của cao chiết cành và lá Niệt dó cho thấy liều LD_{50} của cao chiết Niệt dó là 18,82 g/kg. Theo hệ thống phân loại độc tính của GSH (Globally harmonized system of classification and cabeling of chemicals) thì cao chiết cành và lá Niệt dó không thuộc một trong năm nhóm cảnh báo về độc tính cấp (LD_{50} > 5000 mg/kg) [116]. Nhằm định hướng tìm ra các nhân tố mới, cung cấp các bằng chứng khoa học cho việc mở rộng bộ phận dùng của cây hướng tới khai thác và sử dụng hiệu quả dược liệu, luận án đã nghiên cứu chiết xuất, phân lập và đánh giá tác dụng sinh học từ bộ phận cành và lá của loài cây này. Bên cạnh đó, các nghiên cứu về loài Niệt dó ở Việt Nam còn hạn chế và mới chỉ ở mức khảo sát sơ bộ thành phần hóa học và phân lập được một vài hợp chất đặc trưng của loài này. Do đó, việc nghiên cứu sâu hơn về thành phần hóa học và tác dụng sinh học sẽ góp phần đóng góp cơ sở dữ liệu khoa học về loài cây này.

Luận án sử dụng các phương pháp chiết xuất thường quy, phù hợp với điều kiện phòng thí nghiệm ở Việt Nam hiện nay là phương pháp chiết hồi lưu với EtOH 70%, cất thu hồi dung môi thu được cao toàn phần (**WIT**). Việc lựa chọn dung môi chiết xuất dựa trên tham khảo các nghiên cứu trước đó, kết hợp với định hướng các nhóm hợp chất cần chiết xuất trong dược liệu, với tiêu chí; ít độc và an toàn với con người và môi trường. Theo đó, EtOH 70% hội tụ các yếu là dung môi có khả năng chiết được hầu hết các nhóm hoạt chất trong dược liệu khi chiết xuất bằng phương pháp chiết nóng hồi lưu, đồng thời là dung môi hầu như không độc nhằm hướng tới sản phẩm chiết xuất có thể dùng được cho người. Chiết các cao phân đoạn bằng phương pháp chiết phân bố lỏng-lỏng với các dung môi có độ phân cực tăng dần: *n*-hexan và EtOAc. Các dịch chiết phân

đoạn được cất thu hồi dung môi, thu được các cao tương ứng: cao chiết **WIH**, **WIE** và **WIW**.

Việc phân lập các hợp chất theo định hướng tác dụng sinh học của các cao phân đoạn có tiềm năng về hoạt tính. Vì vậy, cao chiết toàn phần **WIT** và các cao chiết phân đoạn **WIH**, **WIE** và **WIW** được sàng lọc dựa trên đánh giá mức độ sản sinh IL-1β và IL-10 trên dòng tế bào RAW 264.7 được kích thích bằng LPS. Kết quả sàng lọc cho thấy 2 cao phân đoạn **WIE** và **WIW** có khả năng ức chế sản sinh IL-1β, trong khi lại có tác dụng kích thích sản sinh IL-10 hơn cao **WIT** và cao **WIH**. Qua đó cho thấy 2 phân đoạn này có tiềm năng cho tác dụng chống viêm và điều hòa miễn dịch nên được lựa chọn để nghiên cứu sâu hơn về thành phần hóa học nhằm tìm kiếm các hợp chất tiềm năng cho các tác dụng trên.

4.1.2. Về phân lập các hợp chất

Từ cành và lá cây Niệt dó, luận án đã sử dụng các phương pháp sắc ký cột hở như pha thường silica gel, pha đảo RP-C_{18}, Diaion HP-20, MCI gel; sắc ký lỏng hiệu năng cao bán điều chế với các hệ dung môi rửa giải khác nhau; kết hợp với sắc ký lớp mỏng để theo dõi vết chất và kiểm tra sơ bộ độ tinh khiết, tinh chế các hợp chất bằng phương pháp kết tinh, kết tủa. Kết quả là luận án đã phân lập được 19 hợp chất từ 2 phân đoạn **WIE** và **WIW**. Phân tích các Số liệu phổ: phổ khối (ESI-MS và HR-ESI-MS/MS), phổ cộng hưởng từ hạt nhân 1 chiều và 2 chiều (^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, ^{13}C-APT NMR, DEPT, HMBC, HSQC và COSY), phổ ECD thực nghiệm và tính toán, kết hợp với việc so sánh đối chiếu với Số liệu phổ của các hợp chất đã công bố, luận án đã xác định được cấu trúc hoá học của toàn bộ các hợp chất phân lập được.

Từ cao phân đoạn **WIE,** đã phân lập được 06 hợp chất, trong đó có 01 hợp chất phenolic cấu trúc đơn giản, 03 hợp chất coumarin và 02 hợp chất thuộc nhóm flavonoid. Về cấu trúc hóa học, ngoại trừ daphnorin ở dạng glycosid khi có gắn thêm đường glucose trong công thức cấu tạo, 05 hợp chất còn lại đều ở dạng aglycon. Kết quả này cũng phù hợp với đặc điểm các nhóm chất thường phân bố trong phân đoạn ehyl acetat.

Từ cao phân đoạn **WIW**, đã phân lập được 13 hợp chất thuộc các nhóm hợp chất khác nhau (01 phenolic glycosid, 03 coumarin, 01 flavonoid và 08 lignan), cả 13 hợp chất này đều tồn tại ở dạng glycosid khi gắn thêm một đến hai phân tử đường trong công thức cấu tạo. Những hợp chất ở dạng glycosid này cũng thường được phân lập trong các phân đoạn DCM, *n*-butanol và cắn nước. Do vậy, 13 hợp chất phân lập được từ cắn nước

trong nghiên cứu này phù hợp về tính chất hóa lý. Nhìn chung, các hợp chất phân lập được từ **WIE** và **WIW** cũng khá tương đồng với tổng quan về mặt hóa thực vật của chi *Wikstroemia* trong TLTK, với các nhóm hợp chất lignan, flavonoid và coumarin là các nhóm chất đặc trưng.

Trong số 19 hợp chất phân lập được từ cành và lá cây Niệt dó có:

+ 02 hợp chất lignan mới được đề nghị gọi tên là:

- ✓ *Threo*-Citrusin B (**WI14**).
- ✓ Isonitidanin-4-*O*-*β*-D-glucosid (**WI15**)

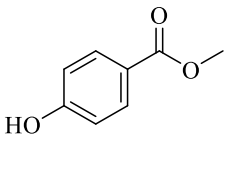
+ 04 hợp chất lần đầu tiên phân lập được từ chi *Wikstroemia* bao gồm:

- ✓ Adicardin (**WI4**)
- ✓ Kaempferol 3-*O*-*α*-L-rhamnopyranosid (**WI10**)
- ✓ *Erythro*-syringylglycerol-*8*-*O*-4′-sinapyl ether 4-*O*-*β*-D-glucopyranosid (**WI12**)
- ✓ *Erythro*-citrusin B (**WI13**)

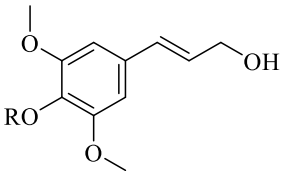
+ 05 hợp chất lần đầu tiên được phân lập từ loài *W. indica*:

- ✓ Wikstronutin (**WI7**)
- ✓ (7*S**,8*R**)-dehydrodiconiferyl alcohol 4-O-*β*-D-glucopyranosid (**WI16**)
- ✓ (7*S**,8*R**)-5-methoxydehydrodiconiferyl alcohol 4-*O*-*β*-D-glucopyranosid (**WI17**)
- ✓ Pinoresinol di-*O*-*β*-D-glucopyranosid (**WI18**)
- ✓ Liriodendrin (**WI19**)

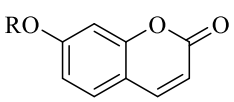
Đây là những đóng góp mới nổi bật của luận án về nghiên cứu thành phần hóa học, bổ sung vào cơ sở dữ liệu về hóa thực vật của loài Niệt dó nói riêng cũng như của chi *Wikstroemia* nói chung. Cấu trúc hóa học của các hợp chất phân lập được từ phân đoạn **WIE** và **WIW** của dịch chiết EtOH 70% cành và lá của loài Niệt dó được trình bày tại **Hình 4.1**.



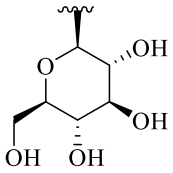
WI1



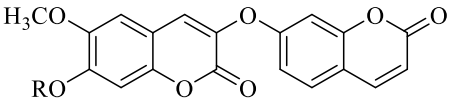
WI2 R = S1



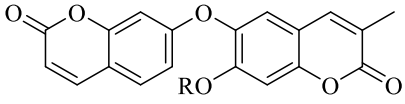
WI3 R = H
WI4 R = S2



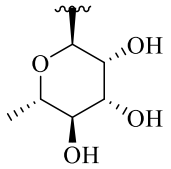
S1



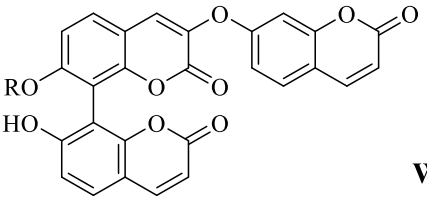
WI5 R = H
WI6 R = S1



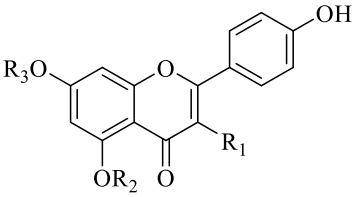
WI7 R = S3



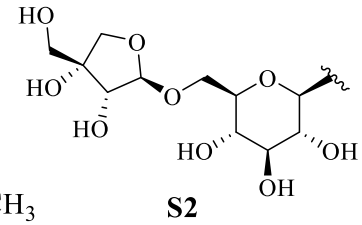
S4



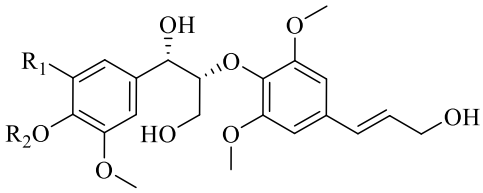
WI8 R = S1



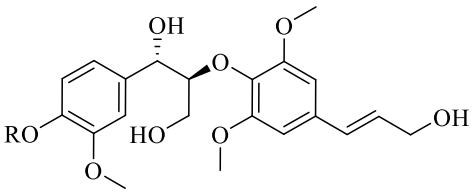
WI9 $R_1 = R_2 = H, R_3 = CH_3$
WI10 $R_1 = S4, R_2 = R_3 = H$
WI11 $R_1 = H, R_2 = S3, R_3 = CH_3$



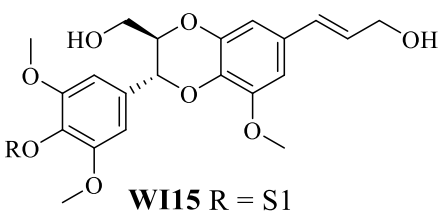
S2



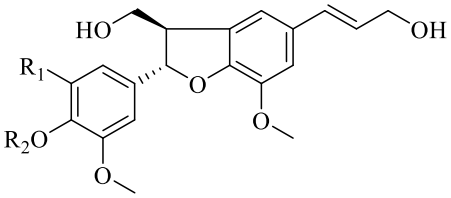
WI12 $R_1 = OCH_3, R_2 = S1$
WI13 $R_1 = H, R_2 = S1$



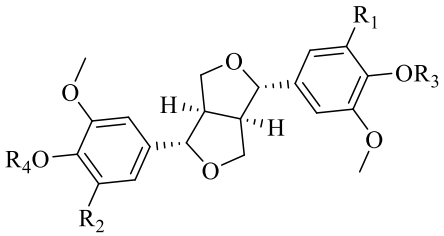
WI14 R = S1



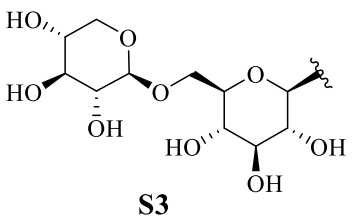
WI15 R = S1



WI16 $R_1 = H, R_2 = S1$
WI17 $R_1 = OCH_3. R_2 = S1$



WI18 $R_1 = H, R_2 = H, R_3 = R_4 = S1$
WI19 $R_1 = R_2 = OCH_3, R_3 = R_4 = S1$



S3

Hình 4.1. Cấu trúc hóa học của các hợp chất phân lập được từ Niệt dó

4.1.2.1. Về các hợp chất phenolic

Trong số 05 phenolic phân lập được có 02 hợp chất có cấu trúc đơn giản là methyl 4-hydroxybenzoat, syringin và ba hợp chất thuộc nhóm flavonoid.

- ***Syringin***

Syringin là một phenylpropanoid monoglycosid, được tìm thấy trong rễ, thân và vỏ rễ của các loài thuộc chi *Wikstroemia* như: *W. sikokiana*, *W. nutans*, và *W. indica*. Hợp chất này được phân lập lập lần đầu tiên trong chi *Wikstroemia* từ phân đoạn nước của loài *W. sikokiana* [117]. Nhóm nghiên cứu của Meifang Wu (2022) đã phân lập được syringin lần đầu tiên từ thân và rễ của loài *W. nutans*. Trong nghiên cứu này, syringin cho thấy hoạt tính chống viêm nhẹ trên mô hình đánh giá khả năng ức chế sản sinh NO do LPS kích thích trên dòng tế bào đại thực bào RAW 264.7 với tỷ lệ ức chế 8,16%, thấp hơn đáng kể so với chất đối chứng dương *L*-NMMA ở nồng độ 50 μM (52,45%). Đồng thời, hợp chất này không cho thấy độc tính đáng kể với dòng tế bào HeLa [95]. Từ vỏ rễ loài *W. indica*, nhóm nghiên cứu của Peixin Shi cũng đã phân lập được syringin và đánh giá khả năng gây độc tế bào đối với dòng tế bào ung thư cổ tử cung HeLa và dòng tế bào gan người bình thường (LO2) bằng phương pháp thử nghiệm MTT. Kết quả cho thấy hợp chất này an toàn với tế bào gan thường nhưng không có hiệu quả ức chế sự phát triển của tế bào ung thư cổ tử cung HeLa [25].

- ***Genkwanin***

Genkwanin là một flavon aglycon không chứa đường trong công thức cấu tạo. Hợp chất này được tìm thấy trong một số loài thuộc chi *Wikstroemia*, trong đó có rễ của loài *W. indica* [4]. Ngoài ra, genkwanin còn được phát hiện trong một số loài như *Daphne genkwa, Rosmarinus officinalis, Salvia officinalis* [118]. Hợp chất này thể hiện tác dụng chống viêm nổi bật thông qua cơ chế ức chế các chất trung gian gây viêm như TNF-α, IL-1β, IL-6, iNOS và COX-2. Nó hoạt động dựa trên việc điều hòa các con đường tín hiệu quan trọng như NF-*κ*B, JAK/STAT và con đường MAPK thông qua điều chỉnh miR-101/MKP-1. Bên cạnh đó, genkwanin còn cho thấy tác dụng chống ung thư và bảo bệ tế bào thần kinh hiệu quả [118].

- ***Kaempferol 3-O-α-L-rhamnopyranosid***

Kaempferol 3-*O*-*α*-L-rhamnopyranosid (còn gọi là kaempferol-3-rhamnosid hoặc afzelin) lần đầu tiên được phân lập từ chi *Wikstroemia* trong nghiên cứu này. Các tổng quan về hóa thực vật trước đây chỉ ra rằng, các đại diện thuộc chi *Wikstroemia*

thường chứa kaempferol ở dạng aglycon tự do hoặc dạng glycoside liên kết với gốc đường glucose (glucosid) hoặc rutinose (rutinosid). Cho đến nay, vẫn chưa có công bố nào về sự hiện diện của dẫn xuất kaempferol chứa gốc rhamnose từ các loài thuộc chi này [4]. Mặc dù vậy, kaempferol 3-*O*-*α*-L-rhamnopyranosid là một hợp chất khá phổ biến có ở nhiều loài khác nhau đồng thời sở hữu một số tác dụng sinh học đáng chú ý như tác dụng kháng viêm và gây độc tế bào. Nghiên cứu của FestusB và cs (2015) cho thấy kaempferol 3-*O*-*α*-L-rhamnopyranosid phân lập được từ loài *Olax mannii* có khả năng gây ức chế con đường NF-κB theo cách phụ thuộc vào nồng độ, với giá trị IC_{50} là 4,1 μM [119]. Hiệu quả ức chế sự sản sinh NO trong các tế bào đại thực bào RAW 264.7 được kích thích bởi LPS của kaempferol 3-*O*-*α*-L-rhamnopyranosid ở mức nhẹ đến trung bình và yếu hơn so với các dẫn xuất kaempferol khác (như kaempferol tự do) [120], [121]. Bên cạnh tác dụng kháng viêm, kaempferol 3-*O*-*α*-L-rhamnopyranosid còn cho thấy hoạt tính độc với một số dòng tế bào ung thư như tế bào ung thư bạch cầu tủy mãn tính ở người (K562), trong khi không gây độc cho tế bào máu bình thường [119].

- ***Yuankanin***

Yuankanin là một dẫn xuất 5-diglycosid của genkwanin, có tên khoa học là (5-[(*β*)-D-xylopyranoside-(1‴→6″)-*β*-D-glucopyranoside]-7-methoxy-apigenin), hợp chất này được phát hiện trong nhiều loại thực vật thuộc họ Trầm (Thymelaeaceae). Nghiên cứu của Yonghwan Son và cs cho thấy yuankanin là một trong những thành phần chính trong lá và đặc trưng cho loài *Wikstroemia genkwa* [122]**.** Một số công bố khác cũng cho thấy yuankanin có mặt trong một số loài khác và thể hiện một số hoạt tính sinh học như: Yuankanin phân lập từ loài *Thymelaea tartonraira* có tác chống oxy hóa ở mức trung bình thông qua thử nghiệm DPPH với IC_{50} = 63,00 ± 0,60 μg/mL (yếu hơn vitamin C là 30,00 μg/mL và hợp chất mới tartonrin là 15,00 μg/mL), năng lực chống oxy hóa tổng số (TAC) đạt 166,45 mg GAE/g. Bên cạnh đó, hợp chất này còn thể hiện hoạt tính ức chế enzym *α*-amylase - một đích phân tử quan trọng trong kiểm soát bệnh đái tháo đường với IC_{50} =1,32 mg/mL, hoạt tính ức chế enzym của yuankanin ở mức trung bình và yếu hơn rõ rệt so với chất đối chứng luteolin (IC_{50} = 0,63 mg/mL) và hợp chất daphnoretin cùng được phân lập từ loài *T. tartonraira* (IC_{50} = 0,71 mg/mL) [98].

4.1.2.2. Về các hợp chất coumarin

Coumarin được xác định là nhóm hợp chất đặc trưng và chiếm hàm lượng lớn trong loài Niệt dó. Theo tổng quan lài liệu, có 12 dẫn xuất coumarin từng được ghi nhận

trong loài này. Trong khuôn khổ nghiên cứu của luận án, dù chỉ phân lập được 6 hợp chất coumarin, kết quả thu được vẫn mang lại ý nghĩa khoa học. Bên cạnh các cấu phần chính mang tính đặc trưng của loài như daphnoretin và umbelliferon (7-hydroxycoumarin), nghiên cứu đã phát hiện wikstronutin – hợp chất lần đầu tiên được tìm thấy trong loài *W. indica,* và adicardin – dẫn xuất coumarin lần đầu tiên được báo cáo trong chi *Wikstroemia*. Sự hiện diện của các đại diện coumarin này một mặt khẳng định tính tương đồng và đặc trưng về mặt hóa thực vật của đối tượng nghiên cứu. Mặt khác, việc xuất hiện các cấu trúc mới chưa từng được ghi nhận trước đây đã phản ánh sự khác biệt của mẫu nghiên cứu tại Việt Nam. Sự khác biệt này có thể liên quan đến các yếu tố sinh thái (vị trí địa lý, điều kiện thổ nhưỡng, khí hậu, mùa vụ thu hái) và bộ phận sử dụng (cành và lá), tạo nên những nét riêng trong phân bố hợp chất thứ cấp của mẫu cây nghiên cứu.

- ***Umbelliferon***

Umbelliferon là coumarin đơn giản có tên khoa học 7-hydroxycoumarin. Hợp chất này được tìm thấy ở nhiều bộ phận khác nhau và trong nhiều loài thuộc chi *Wiktroemia* như vỏ thân của loài *W. coriacea* và *W. elliptica*, phần trên mặt đất của loài *W. ganpi* và *W. hainanensis*, rễ của loài *W. sikokiana*. Trong loài *W. indicca*, umbelliferon được tìm thấy ở các bộ phận vỏ rễ, vỏ thân của cây [4]. Hợp chất này cũng phổ biến trong các loài của họ Hoa tán (Apiaceae hay Umbelliferae) như Cà rốt (*Daucus carota* L.), Rau mùi (*Coriandrum sativum* L.), Cần tây (*Apium graveolens* L.), Thì là (*Anethum graveolens* L.). Ngoài ra, umbelliferon cũng xuất hiện trong các loài họ Đậu (Fabaceae) và họ Cam (Rutaceae) [123], [124], [125]. Các nghiên cứu, đánh giá về tác dụng sinh học cũng cho thấy umbelliferon sở hữu nhiều hoạt tính sinh học như: hoạt tính gây độc tế bào đối với hệ thống thử nghiệm bệnh bạch cầu lympho P-388 (với ED_{50} là 3,1 μg/ml) [126]; bảo vệ tinh hoàn và quá trình sinh tinh chống lại độc tính do chì acetat gây ra thông qua cơ chế giảm stress oxy hóa, giảm viêm (thông qua việc làm giảm TNF-α, IL-6); ngăn ngừa quá trình chết tế bào theo chương trình (thông qua việc làm tăng Bcl-2, giảm Bax) [123]. Bên cạnh đó, umbelliferon bảo vệ sự toàn vẹn của hàng rào biểu bì da trong điều kiện tăng đường huyết (bệnh tiểu đường), giúp phục hồi các protein liên kết tế bào (ZO-1, Occludin) và protein biệt hóa (Filaggrin) bị suy giảm do đường huyết cao [125].

- ***Adicardin***

Đây là lần đầu tiên adicardin được phát hiện trong chi *Wikstroemia*. Adicardin được biết với tên khác là apiosylskimmin là dẫn xuất glycosid của umbelliferon, mạch đường *β*-D-apiofuranosyl-(1→6)-*β*-D-glucopyranosyl gắn vào OH vào vị trí C-7 của umbelliferon. Hợp chất này được tìm thấy trong tự nhiên từ loài *Hydrangea macrophylla* và đã được tổng hợp toàn phần từ năm 2009 bởi Wei Li và cs [92].

- ***Daphnoretin***

Daphnoretin là một biscoumarin có tên khoa học là 7-hydroxy-6-methoxy-3-[(2-oxo-2H-1-benzopyran-7-yl)oxy]-2H-1-benzopyran-2-on. Daphnoretin được coi là hợp chất chính, đặc trưng cho loài *W. indica* và có mặt trong hầu hết các bộ phận của cây từ rễ đến phần trên mặt đất. Hàm lượng hợp chất này chiết xuất được trong vỏ cây khá cao (2,18 %) với điều kiện chiết xuất tối ưu là nồng độ ethanol 67,44%, thời gian chiết xuất 49,44 phút, nhiệt độ 60,19 °C và tỷ lệ lỏng-rắn 23,49:1 [38]. Ngoài loài *W. indica*, daphnoretin còn xuất hiện trong nhiều loài khác thuộc chi *Wiktroemia* như *W. coriacea, W. elliptica, W. ganpi, W. hainanensis, W. lanceolata, W. retusa, W. sikokiana và W. viridiflora* [4]. Daphnoretin là hợp chất thu hút được nhiều quan tâm đánh giá về tác dụng dược lý, qua đó cho thấy biscoumarin này sở hữu nhiều hoạt tính đáng lưu ý. Ngoài những hoạt tính của daphnoretin phân lập được từ Niệt dó đã được nhắc đến trong phần tổng quan, daphnoretin còn sở hữu nhiều hoạt tính sinh học phong phú. Theo đó, hợp chất này đã được chứng minh là sở hữu hoạt tính độc tế bào trên nhiều dòng tế bào ác tính khác nhau thông qua các cơ chế đa dạng; công bố của nhóm nghiên cứu Qi Xie và cs cho thấy daphnoretin có thể ức chế sự phát triển của tế bào ung thư vú MCF-7 và MDA-MB-231 thông qua việc ngăn chặn chu kỳ tế bào và gây ra hiện tượng apoptosis, có liên quan đến con đường PI3K/AKT [127]. Trên dòng tế bào ung thư xương (HOS), daphnoretin gây ức chế tăng sinh rõ rệt thông qua việc gây ngưng tập chu kỳ tế bào tại pha G2/M (giảm biểu hiện cdc2, cyclin A, cyclin B1) và kích hoạt apoptosis qua con đường ty thể (tăng tỷ lệ Bax/Bcl-2, giải phóng cytochrome c, kích hoạt dòng thác caspase-9 và caspase-3) với IC_{50} là 3,89 μM sau 72 giờ xử lý [128]. Trên các dòng tế bào ung thư bạch cầu dòng tủy mạn tính K562 và HEL, daphnoretin thể hiện tác dụng ức chế sự tăng sinh thông qua việc kích hoạt quá trình biệt hóa hướng mẫu tiểu cầu. Cơ chế này được khởi động bởi sự hoạt hóa Protein Kinase C (PKC) và kích thích

phosphoryl hóa STAT3, dẫn đến tăng cường biểu hiện của các dấu ấn bề mặt đặc hiệu CD41 và CD61 [129]. Trên dòng tế bào HeLa gây ung thư cổ tử cung, daphnoretin gây độc tế bào mạnh mẽ thông qua con đường ty thể (tăng nồng độ canxi trong bào tương, tăng biểu hiện protein Bax và giảm Bcl-2, dẫn đến mất phân cực màng ty thể và kích hoạt caspase-3/9) với IC_{50} là 5,82 µg/mL (sau 12 giờ) và 5,52 µg/mL (sau 24 giờ) [130]. Trên dòng tế bào HepG2 và H22 gây ung thư biểu mô tế bào gan, daphnoretin ức chế sự phát triển khối u thông qua việc cảm ứng apoptosis bằng cách điều hòa tăng biểu hiện Bax, p53 và giảm Bcl-2 (IC_{50} 19,13 µg/mL sau 48 giờ xử lý) [131]. Trên dòng tế bào HCT116 gây ung thư đại tràng, daphnoretin đóng vai trò là chất ức chế xâm lấn và thúc đẩy apoptosis thông qua việc điều hòa con đường tín hiệu Akt [129]. Bên cạnh tác dụng độc tế bào và chống khối u, daphnoretin cũng cho thấy tác dụng kháng viêm hiệu quả; Trên mô hình tế bào sụn bị tổn thương do IL-1β, daphnoretin làm giảm đáng kể mức độ của các enzym và cytokin gây viêm như COX-2, iNOS, TNF-α, IL-6 và PGE2. Hoạt chất này cũng làm giảm hàm lượng NO, một tác nhân gây viêm và tổn thương tế bào thông qua cơ chế tác động qua inflammasome và stress nội bào. Qua đó daphnoretin giúp giảm bớt sự tiến triển của bệnh thoái hóa khớp bằng cách giảm viêm và bảo vệ sụn khớp [132]. Một số nghiên cứu cũng cho thấy daphnoretin không chỉ đơn thuần là tăng cường miễn dịch mà đóng vai trò là một chất điều hòa, có khả năng làm giảm các phản ứng miễn dịch quá mức hoặc không mong muốn; Nghiên cứu của Chien-An Chen và cs cho thấy daphnoretin gây tác động lên tế bào gai qua đó điều chỉnh sự biệt hóa và trưởng thành của các tế bào gai ở người, làm giảm biểu hiện của các phân tử kích thích miễn dịch như CD1a, CD40, CD83 và HLA-DR và bằng cách làm suy giảm khả năng của tế bào gai trong việc kích thích sự tăng sinh của tế bào T naive (tế bào T chưa tiếp xúc kháng nguyên), daphnoretin có khả năng ức chế phản ứng thải ghép cấp tính trong các mô hình cấy ghép da ở chuột [133]. Trong hướng tiếp cận điều trị ung thư gan, daphnoretin thể hiện vai trò hỗ trợ hệ miễn dịch kháng u thông qua việc làm tăng nồng độ IL-2 trong huyết thanh. Đây là một cytokin then chốt giúp thúc đẩy sự tăng sinh và hoạt hóa các tế bào T hiệu năng nhằm tiêu diệt tế bào ung thư [131].

- ***Daphnorin***

Daphnorin là dạng glycosid của daphnoretin (daphnoretin-7-*O*-*β* -D-glucosid), với đường glucose gắn vào OH ở vị trí C-7. Ngoài sự có mặt trong loài *W. indica*, hợp chất này còn được phát hiện trong một số loài khác thuộc chi *Wikstroem*i như *W. ganpi*

và *W. retusa*. Về tác hoạt tính sinh học, daphnorin không có nhiều nghiên cứu và công bố như đối với daphnoretin. Trong một nghiên cứu đáng chú ý của Peixin Shi và cs (2021), daphnorin đã được đánh giá về khả năng gây độc đối với dòng tế bào HeLa và LO2 bằng phương pháp thử nghiệm MTT. Kết quả cho thấy daphnorin không thể hiện tác dụng gây độc tế bào đáng kể đối với dòng tế bào HeLa và dòng tế bào gan bình thường LO2. Bên cạnh đó, nhóm nghiên cứu cũng chỉ ra rằng trong mối liên quan giữa cấu trúc và tác dụng là daphnoretin (dạng aglycon) có hoạt tính gây độc tế bào mạnh nhất đối với tế bào HeLa nhưng hoạt tính này lại không thể hiện sau khi hình thành liên kết glycosid (tức là khi trở thành daphnorin) [25].

- ***Wikstronutin***

Wikstronutin là một biscoumarin glucosid được báo cáo lần đầu tiên từ loài *W. indica* trong luận án này. Hợp chất này được Meifang Wu và cs (2022) phân lập lần đầu tiên trong tự nhiên từ loài *W. nutans*. Trong nghiên này nhóm tác giả đã đánh giá wikstronutin về khả năng ức chế sự sản sinh NO trên đại thực bào RAW 264.7 được kích thích bởi LPS. Qua đó cho thấy wikstronutin thể hiện hoạt tính kháng viêm ở mức độ nhẹ, ở nồng độ 50 µM, hợp chất này ức chế sản sinh NO với tỷ lệ là 16,15 ± 1,10% [95]. Theo các nguồn tài liệu tổng hợp được, cho đến nay ngoài công bố của Wu và cs năm 2022, chưa có thêm các nghiên cứu nào khác về phân lập và đánh giá tác dụng của hợp chất wikstronutin.

- ***Triumbelletin-7-O-β-D-glucosid***

Triumbelletin-7-*O*-*β*-D-glucosid là một tricoumarin glycosid được phân lập lần đầu tiên trong tự nhiên từ rễ của loài *W. indica* bởi nhóm tác giả người Trung Quốc, Qirui Wang và cs năm 2018 [28]. Sau đó hợp chất này tiếp tục được phân lập từ loài *W. nutans* năm 2022 bởi Meifang Wu và cs [95]. Các thử nghiệm về hoạt tính của triumbelletin-7-*O*-*β*-D-glucosid đã ghi nhận bao gồm hoạt tính gây độc tế bào và kháng viêm *in vitro*. Triumbelletin-7-*O*-*β*-D-glucosid thể hiện hoạt tính gây độc tế bào rất yếu hoặc không đáng kể trên cả bốn dòng tế bào thử nghiệm HCT116 và SW480 (tế bào ung thư đại trực tràng) và T98G và U87 (tế bào u thần kinh đệm), với giá trị IC_{50} > 100 µM [28]. Triumbelletin-7-*O*-*β*-D-glucosid thể hiện hoạt tính ức chế sản sinh NO trên mô hình tế bào RAW 264.7 được kích thích bằng LPS với tỷ lệ % ức chế là 10,73 ± 1,17% ở nồng độ 50 µM [95].

4.1.2.3. Về các hợp chất lignan

Lignan là nhóm hợp chất phổ biến trong thực vật. Qua tổng quan tài liệu cho đến nay từ các loài thuộc chi *Wiktroemia* đã có 66 hợp chất thuộc nhóm lignan đã được báo cáo, trong đó, loài *W. indica* đóng góp đáng kể với 42 hợp chất lignan. Trong phạm vi nghiên cứu của luận án, dù số lượng lignan phân lập được là 08 hợp chất, nhưng giá trị khoa học và tính mới của công trình tập trung vào việc phân lập và xác định cấu trúc chính xác của lignan này. Trong số 08 lignan phân lập được có 02 hợp chất mới trong tự nhiên, 02 hợp chất mới trong chi *Wikstroemia* và 04 hợp chất mới trong loài *W. indica*, đây là những đóng góp đáng kể của luận án vào cơ sở dữ liệu hóa thực vật của chi *Wikstroemia* nói chung và loài *W. indica* nói riêng. Bên cạnh đó, cấu trúc hóa học của cả 8 hợp chất lignan phân lập đều ở dạng glycosid, trong khi đó, các lignan đã được báo cáo trước đây phân lập từ loài *W. indica* chủ yếu ở dạng aglycon. Sự khác biệt này có thể đến từ sự khác nhau về mẫu nghiên cứu và phương pháp chiết xuất, phân lập mang lại. Cụ thể, luận án tập trung nghiên cứu phân đoạn nước – đối tượng thường gây trở ngại lớn cho các kỹ thuật tách chiết và tinh chế thông thường. Bằng việc ứng dụng phương pháp HPLC bán điều chế kết hợp với phương pháp kết tinh, luận án đã phân lập được một số hợp chất phân cực đặc trưng, trong đó có các lignan glycosid.

- ***Erythro-syringylglycerol-8-O-4′-sinapyl ether 4-O-β-D-glucopyranosid***

Hợp chất này là một neolignan có kiểu cấu trúc 8-*O*-4′ neolignan (thuộc nhóm alkyl aryl ether). Đây là lignan lần đầu tiên phân lập được từ chi *Wiktroemia* trong luận án này. Lignan này gặp trong một số loài thực vật và cũng ghi nhận một số hoạt tính sinh học. Nghiên cứu của tác giả Cao Thanh Hải và cs (2022) đã phân lập được hợp chất này từ thân rễ của loài *Atractylodes macrocephala* thu hái tại Việt Nam [99]. Báo cáo của Jia Sun và cs (2015) cho thấy (*7S,8R*) syringylglycerol-8-*O*-4′-sinapyl ether 4-*O*-*β*-D-glucopyranosid phân lập từ lá của loài *Indocalamus latifolius* có tính kháng khuẩn chọn lọc, hợp chất này tạo ra vòng kháng khuẩn đạt khoảng 0,26 mm [134].

- ***Erythro-citrusin B***

Erythro-citrusin B cũng là một neolignan glycosid được phát hiện lần đầu tiên trong chi *Wiktroemia*. Hợp chất này được phân lập trong nhiều họ thực vật và ghi nhận một số hoạt sinh học tính đáng lưu ý. *Erythro*-citrusin B phân lập được từ thân rễ của loài thực vật *Ligularia veitchiana* thể hiện hoạt tính độc tế bào yếu trong thử nghiệm trên các dòng tế bào ung thư bao gồm HL-60 (bạch cầu cấp), WM451 (ung thư hắc tố),

MDA231 (ung thư vú) và KB (ung thư biểu mô) [100]. *Erythro*-citrusin B phân lập được từ loài *Tinospora sinensis* thể hiện hoạt tính ức chế sản sinh NO (IC_{50} = 69,78 ± 1,75 μM) yếu hơn hoạt tính của syringaresinol (IC_{50} = 38,53 ± 1,90 μM) trên mô hình đại thực bào RAW 264.7 được kích thích bằng LPS [135].

- ***(7S*,8R*)-dehydrodiconiferyl alcohol 4-O-β-D-glucopyranosid***

(*7S*,8R**)-dehydrodiconiferyl alcohol 4-*O*-*β*-D-glucopyranosid là một lignan glycosid mới phát hiện trong loài *W.indica*. Trong chi *Wiktroemia*, hợp chất này phân lập được lần đầu tiên từ loài *W. nutans*. Nghiên cứu tác dụng chống viêm *in vitro* của (7*S*,8*R*)-dehydrodiconiferyl alcohol 4-*O*-*β*-D-glucopyranosid cho thấy hợp chất có tác dụng ức chế nhẹ đối với việc sản xuất nitric NO trên đại thực bào RAW 264.7 gây ra bởi LPS, tại nồng độ 50 μM, tỷ lệ % ức chế sản sinh NO là 19,51 ± 1,11 % [95]. Trong một nghiên cứu khác, dehydrodiconiferyl alcohol 4-*O*-*β*-D-glucopyranosid phân lập được từ rễ của loài *Ligusticopsis wallichiana* năm 2016 và thể hiện tác dụng chống oxy hóa thông qua thử nghiệm dọn gốc tự do DPPH. Tác dụng này không nổi bật so với các hoạt chất khác trong cùng thử nghiệm như acid chlorogenic và acid 3,5-di-*O*-caffeoyl-quinic [136].

- ***(7S*,8R*)-5-methoxydehydrodiconiferyl alcohol 4-O-β-D-glucopyranosid***

Trong nghiên cứu này, hợp chất (7*S**,8*R**)-5-methoxydehydrodiconiferyl alcohol 4-*O*-*β*-D-glucopyranosid là một lignan glycosid phân lập được lần đầu tiên từ loài *W. indica*. Trong chi *Wikstroemia,* hợp chất này được báo cáo lần đầu tiên từ loài *W. nutans* và được đánh giá tác dụng chống viêm *in vitro* cùng với (7*S*,8*R*)-dehydrodiconiferyl alcohol 4-*O*-*β*-D-glucopyranosid trong nghiên cứu của Meifang Wu và cs năm 2022. Hoạt tính ức chế sản sinh NO của (7*S*,8*R*)-5-methoxydehydrodiconiferyl alcohol 4-*O*-*β*-D-glucopyranosid là 20,42 ± 1,06 % ở nồng độ 50 μM [95].

- ***Pinoresinol di-O-β-D-glucopyranosid***

Pinoresinol di-*O*-*β*-D-glucopyranosid cũng là lignan được báo cáo lần đầu tiên từ loài *W. indica* trong luận án này. Trong chi *Wikstroemia* hợp chất này đã được phân lập từ loài *W. nutans* và thể hiện hoạt tính ức chế sản sinh NO với tỷ lệ % ức chế là 15,42 ± 0,38 % ở nồng độ 50 μM [95]. Từ vỏ của loài *Eucommia ulmoides* Oliver, nhóm nghiên cứu của Hejia Hu cũng đã phân lập và xác định được cấu trúc của (+)-pinoresinol di-*O*-*β*-D-glucopyranosid, hàm lượng của hợp chất này mẫu nghiên cứu là 10,39 mg/g. Về các hoạt tính học, hợp chất này thể hiện tác dụng hạ huyết áp, giúp điều trị tình trạng

tăng huyết áp hệ thống trên mô hình chuột cống trắng thực nghiệm [137]. Một nghiên cứu khác cho thấy pinoresinol di-*O*-*β*-D-glucopyranosid chiết xuất được từ vỏ loài *Eucommia ulmoides* thể hiện khả năng ức chế enzym phosphodiesterase (giúp trợ tim, giãn mạch chống huyết khối và tránh tổn thương thận do tăng huyết áp) hiệu quả với giá trị IC_{50} là 63,5 μmol/L [138].

- ***Liriodendrin***

Liriodendrin có tên khác là syringaresinol 4,4′-di-*O*-*β*-D-glucopyranosid là hợp chất mới được phát hiện lần đầu tiên trong loài *W. indica*. Đây là hợp chất phổ biến có trong nhiều họ, loài thực vật khác nhau. Trong chi *Wikstroemia,* hợp chất này phân lập được từ loài *W. nutans* và cho thấy, ở nồng độ 50 μM có khả năng ức chế sản sinh NO với tỷ lệ ức chế 15,73 ± 1,41 % trên mô hình đại thực bào RAW 264.7 được kích thích bằng LPS [95]. Liriodendrin còn được tìm thấy trong một số loài như: *Polygala vulgaris, Sargentodoxae caulis, Linaria vulgaris, Pittosporum brevicalyx* [139], [140]. Các nghiên cứu về tác dụng sinh học đã chỉ ra rằng liriodendrin sở hữu nhiều hoạt tính khác nhau. Trong nghiên cứu của Chan Guo và cs (2025), liriodendrin ức chế phản ứng viêm toàn thân, ngăn chặn "cơn bão cytokin " thường thấy trong nhiễm trùng huyết bằng cách giảm nồng độ các yếu tố gây viêm trong máu thông qua việc giảm đáng để nồng độ TNF-α, IL-1β và IL-6 [141]. Theo nghiên cứu của Bo Li và cs (2025), liriodendrin có tác dụng chống khối u, chống viêm, chống oxy hóa và chống kết tập tiểu cầu. Trong đó cơ chế chống viêm được xác định là thông qua việc ngăn chặn sự kích hoạt của con đường tín hiệu NF−κB, từ đó giảm giải phóng các yếu tố gây viêm như IL-1β, TNF-α và MCP, cơ chế chống khối u thông qua việc hoạt chất này ức chế sự chết theo chương trình của tế bào cơ tim bằng cách giảm biểu hiện của protein Bax (thúc đẩy apoptosis) và tăng biểu hiện của Bcl-2 (chống apoptosis) [140]. Nghiên cứu của Fang Cheng và cs (2024) cũng cho thấy liriodendrin chiết xuất từ loài *Sargentodoxa cuneata* có hoạt tính kháng viêm mạnh mẽ, giúp cải thiện các tổn thương bệnh lý ở tử cung, giảm tình trạng phù nề và sự xâm nhập của các tế bào viêm thông qua việc làm giảm nồng độ các cytokin thúc đẩy viêm như TNF-α, IL-1β, IL-6 và tăng cường cytokin chống viêm IL-10 [142].

4.2. VỀ TÁC DỤNG SINH HỌC

4.2.1. Định hướng lựa chọn nghiên cứu hoạt tính trên một số cytokin liên quan đến viêm và miễn dịch

Niệt dó từ lâu đã được sử dụng trong Y học cổ truyền tại Việt Nam và một số quốc gia châu Á. Theo tri thức sử dụng trong Y học cổ truyền, bộ phận vỏ rễ và vỏ thân của cây thường được dùng để điều trị các chứng bệnh có bản chất là phản ứng viêm như viêm hạch, viêm amidan, viêm tuyến mang tai, viêm vú cấp tính, hen suyễn và ho gà. Ngoài ra, lá tươi còn được dùng ngoài để chữa mụn nhọt, sưng tấy và vết thương hở [2], [9], [55]. Kinh nghiệm sử dụng này là gợi ý quan trọng để định hướng các nghiên cứu khoa học nhằm chứng minh tác dụng sinh học của Niệt dó theo hướng chống viêm.

Về khía cạnh hóa thực vật, Niệt dó chứa đa dạng các nhóm hợp chất, tiêu biểu là biflavonoid, flavonoid, coumarin và lignan [3], [4]. Các báo cáo khoa học đã xác nhận sự tương quan giữa các nhóm chất này với khả năng ức chế các chất trung gian gây viêm và điều hòa các con đường tín hiệu nội bào như NF-κB hay MAPK [4], [24], [118]. Đặc biệt, hợp chất chính daphnoretin cùng các lignan phân lập từ Niệt dó đã cho thấy hoạt tính chống viêm, chống ung thư và giảm thiểu tổn thương mô thông qua việc điều biến các cytokin tiền viêm [39], [132], [133].

Tuy nhiên, viêm không chỉ đơn thuần là một triệu chứng lâm sàng mà còn là một phản ứng thích nghi cơ bản của cơ thể nhằm chống lại các kích thích độc hại như nhiễm trùng và tổn thương mô [56]. Ở điều kiện sinh lý bình thường, phản ứng viêm cấp tính do các thụ thể nhận diện mẫu (PRRs như TLRs, NLRs) khởi phát trên đại thực bào tại chỗ sẽ kích hoạt các dòng thác tín hiệu NF-κB, MAPK, JAK-STAT, dẫn đến giải phóng các cytokin tiền viêm kinh điển (TNF-α, IL-1β, IL-6) nhằm khu trú và loại bỏ tác nhân gây hại [56], [61], [143]. Quá trình này được kiểm soát chủ động bằng chương trình sinh hóa kết thúc viêm và điều hòa miễn dịch ngược, với sự tham gia của các cytokin chống viêm (IL-10, TGF-β) [56], [62]. Trong mối giao thoa giữa miễn dịch bẩm sinh và miễn dịch thích ứng, các tế bào T điều hòa (Treg) biểu hiện yếu tố phiên mã Foxp3 đóng vai trò duy trì sự dung nạp miễn dịch, kiểm soát tế bào dendritic và ngăn chặn các phản ứng tự miễn phá hủy mô [66], [74]. Ngược lại, trong vi môi trường khối u, Foxp3/Treg lại bị tế bào ung thư lợi dụng để tạo ra "hàng rào" ức chế miễn dịch chống u [76], [78]. Do đó, các các chất điều hòa miễn dịch và yếu tố phiên mã Foxp3 là những mắt xích có giá trị cao trong cả nghiên cứu chống viêm và liệu pháp miễn dịch ung thư.

Qua tra cứu tài liệu, các nghiên cứu trước đây về loài *W. indica* dù đã ghi nhận một số hoạt tính sinh học tiềm năng (chống viêm, gây độc tế bào, điều biến một số cytokin như IL-4, IL-6, INF-α), nhưng hầu hết mới chỉ dừng lại ở việc đánh giá các chỉ dấu viêm cơ bản (NO, PGE2) trên mô hình miễn dịch bẩm sinh (đại thực bào RAW 264.7). Cho đến nay, chưa có công bố nào đi sâu vào đánh giá tác động của các phân đoạn cao chiết hoặc các hợp chất phân lập từ Niệt dó lên hệ thống miễn dịch thích ứng, đặc biệt là trên dòng tế bào T CD4+ và các cytokin điều hòa đáp ứng chuyên biệt như INF-γ (đại diện cho phân nhóm Th1) hay IL-17 (đại diện cho phân nhóm Th17), cũng như yếu tố phiên mã Foxp3. Do đó, luận án đã lựa chọn đánh giá hoạt tính theo hướng chống viêm và điều hòa miễn dịch *in vitro* của một số hợp chất tiềm năng thông qua các cytokin IL-1β, IL-10 trên mô hình tế bào RAW 264.7, cùng với yếu tố phiên mã Foxp3 và các cytokin INF-γ, IL-17 trên mô hình tế bào T CD4+ được kích thích bằng LPS.

4.2.2. Về sàng lọc hoạt tính trên IL-1β và IL-10

❖ ***Về lựa chọn mô hình sàng lọc***

Việc thiết lập các hệ thống sàng lọc hoạt tính sinh học chuẩn mực đóng vai trò quan trọng trong nghiên cứu dược lý các hợp chất tự nhiên, giúp tối ưu hóa quá trình xác định những phân đoạn cao chiết và các hợp chất tinh khiết có hoạt tính. Nhằm khai thác tiềm năng kháng viêm và điều hòa miễn dịch của loài Niệt dó (*W. indica*), nghiên cứu này ứng dụng mô hình đánh giá đồng thời khả năng ức chế cytokin tiền viêm IL-1β và thúc đẩy cytokin kháng viêm IL-10 trên dòng đại thực bào RAW 264.7 kích thích bởi LPS. Sự lựa chọn này dựa trên nền tảng khoa học về vai trò ′cảm biến mầm bệnh′ trung tâm của đại thực bào trong hệ thống miễn dịch và cơ chế kích hoạt lộ trình tín hiệu TLR4 kinh điển của tác nhân LPS [60], [61]. Trong hệ thống miễn dịch bẩm sinh, đại thực bào thực hiện các chức năng thiết yếu: nhận diện tác nhân gây hại, thực bào và giải phóng các chất trung gian điều phối phản ứng viêm [56], [61]. LPS là thành phần cấu trúc của vi khuẩn Gram âm, đóng vai trò là một mẫu phân tử liên quan đến mầm bệnh điển hình [61], [144]. Khi tiếp xúc với đại thực bào, LPS liên kết với thụ thể TLR4 và kích hoạt các con đường tín hiệu nội bào quan trọng như NF-κB và MAPK [8], [61]. Sự kích hoạt tính này dẫn đến việc sản xuất các cytokin tiền viêm, mô phỏng trạng thái viêm cấp tính thường gặp trong các bệnh lý nhiễm trùng và tự miễn [144], [145]. Vì vậy, mô hình tế RAW 264.7 được kích thích băng LPS cung cấp một nền tảng thực nghiệm ổn định và có độ lặp lại tốt để thử nghiệm các tác nhân có tiềm năng chống viêm. Đối

với IL-1β, cytokin này được coi là một trong những cytokin tiền viêm quan trọng, hoạt động như một chất gây sốt nội sinh và khuếch đại phản ứng viêm tại chỗ [8], [144]. Quá trình giải phóng IL-1β đòi hỏi sự tham gia của phức hợp viêm để cắt tiền chất pro-IL-1β thành dạng hoạt động [68], [144], [145]. Sự tăng tiết quá mức IL-1β là nguyên nhân chính gây tổn thương mô lành và dẫn đến các bệnh mạn tính như viêm khớp dạng thấp hay đái tháo đường [56], [75]. Việc ức chế được IL-1β chứng minh hợp chất có khả năng can thiệp vào các bước sâu của quá trình gây viêm, từ việc ức chế NF-κB đến việc khóa hoạt động của phức hợp viêm [143], [144]. Ngược lại, IL-10 là một cytokin kháng viêm tiêu biểu, được biết đến như "yếu tố ức chế tổng hợp cytokin" [66], [68]. Vai trò của nó là giới hạn các phản ứng miễn dịch quá mức, bảo vệ cơ thể khỏi sự tự hủy hoại và thúc đẩy quá trình giải quyết viêm [146], [147]. Một hệ thống miễn dịch khỏe mạnh không chỉ cần ngăn chặn các yếu tố gây hại mà còn phải chủ động kích thích các con đường phục hồi thông qua IL-10 [62], [147]. Việc một hợp chất có khả năng kích thích IL-10 trong môi trường đang bị viêm bởi LPS chứng minh tác dụng điều hòa miễn dịch tích cực, giúp đưa mô trở lại trạng thái bình thường thay vì chỉ ức chế miễn dịch thụ động [62], [72]. Như vậy, mô hình sàng lọc các phân đoạn cao chiết, phân lập các hợp chất dựa trên IL-1β và IL-10 sản sinh trên dòng tế bào RAW 264.7 được kích thích bằng LPS, có thể đảm bảo sàng lọc được các hợp chất tiềm năng cho tác dụng chống viêm và điều hòa miễn dịch thông qua cytokin từ Niệt dó.

❖ ***Về kết quả sàng lọc các cao chiết trên IL-1β và IL-10***

Ở cùng nồng độ 20 μg/mL, các cao chiết **WIT**, **WIH**, **WIE** và **WIW** thể hiện khả năng điều biến sản sinh IL-1β và IL-10 khác nhau trên dòng tế bào RAW 264.7 được kích thích bằng LPS. Cụ thể, **WIE** và **WIW** có khả năng ức chế sản sinh IL-1β, đồng thời kích thích sản sinh IL-10 tương đương nhau và mạnh hơn rõ rệt so với hai mẫu **WIT** và **WIH**. Thực tế, quá trình chiết lỏng - lỏng với phân đoạn *n*-hexan thường thu được các hợp chất kém phân cực. Trong khi đó, các nhóm hoạt chất mang lại tác dụng chính của Niệt dó như flavonoid, coumarin và lignan thường ít phân bố vào phân đoạn này [3], [4]. Kết quả này cho thấy quá quá trình chiết cao phân đoạn từ cao toàn phần, hai phân đoạn **WIE** và **WIW** đã được làm giầu các hợp chất hướng đến đích tác dụng trên IL-1β và IL-10. Bên cạnh đó, kết quả này cũng thể hiện sự tương đồng với tri thức sử dụng thuốc trong dân gian, khi nước sắc của loài này được sử dụng để điều trị các bệnh có liên quan đến viêm cấp và mãn tính như viêm amydal, hen suyễn và viêm

tuyến mang tai [2]. Do đó, kết quả sàng lọc hoạt tính của cao toàn phần và cao chiết các phân đoạn dựa trên hai tín hiệu IL-1β và IL-10 phù hợp với cơ sở dữ liệu về hóa thực vật, tác dụng sinh học và tri thức y học dân gian của loài Niệt dó.

❖ ***Về kết quả sàng lọc các hợp chất phân lập được trên IL-1β và IL-10***

Trong định hướng nghiên cứu của luận án, các hợp chất phân lập được từ các phân đoạn tiềm năng đều được sàng lọc, đánh giá về tác dụng sinh học. Tuy nhiên hợp chất **WI15** phân lập được với khối lượng quá nhỏ (1,5 mg) nên không đủ để sử dụng cho các đánh giá về hoạt tính sinh học, 18 hợp chất còn lại được sàng lọc trên sản sinh IL-1β và IL-10 từ tế bào RAW 264.7 được kích thích bằng LPS. Kết quả cho thấy; ở nồng độ 10 µM, 06 hợp chất bao gồm: **WI3**, **WI5**, **WI7**, **WI8**, **WI9** và **WI19** đã thể hiện khả năng ức chế sản sinh IL-1β và kích thích sản sinh IL-10 mạnh hơn các chất còn lại, do đó được lựa chọn cho thử nghiệm tiếp theo. Trong số đó, 04 hợp chất; bao gồm **WI3**, **WI5**, **WI7** và **WI8**; là các dẫn xuất thuộc nhóm coumarin. Kết quả này cho thấy nhóm hợp chất coumarin đóng góp phần lớn vào tác dụng sinh học của 02 phân đoạn cao chiết tiềm năng đã được sàng lọc cũng như của Niệt dó nói chung. Đáng chú ý, sự góp mặt của daphnoretin (**WI5**) trong số 04 coumarin phù hợp với sự quan tâm của các nhà khoa học đối với hợp chất này. Daphnoretin là hoạt chất chính của Niệt dó và đã có nhiều nghiên cứu nhất trong số các hoạt chất phân lập được từ Niệt dó nói chung và từ chi *Wiktroemia* nói riêng. Theo đó, hợp chất này đã được chứng minh là sở hữu nhiều tác dụng sinh học đáng lưu ý như chống viêm, chống ung thư, chống HIV….Việc daphnorerin (**WI5**) được lựa chọn là chất tiềm năng về tác dụng sinh học cho nghiên cứu tiếp theo thể hiện tương đồng về cơ sở dữ liệu dược lý của hợp chất này nói chung cũng như của Niệt dó. Hai hợp chất còn lại là genkwanin (**WI9**) và liriodendrin (**WI19)** lần lượt đại diện cho nhóm flavonoid và lignan. Đây cũng là 2 nhóm hợp chất chính bên cạnh nhóm coumarin có trong Niệt dó.

4.2.3. Về tác dụng của một số chất tiềm năng trên mức độ sản sinh IL-1β và IL-10

Kết quả thực nghiệm đã chỉ ra rằng các hợp chất phân lập từ Niệt dó, bao gồm **WI3**, **WI5**, **WI7**, **WI8**, **WI9** và **WI19**, đều thể hiện khả năng ức chế sản sinh IL-1β trên mô hình tế bào RAW 264.7 kích thích bằng LPS theo xu hướng phụ thuộc vào nồng độ. Trong số các chất được thử nghiệm, hợp chất **WI3** (umbelliferon) nổi lên là hợp chất có tác dụng mạnh nhất với giá trị IC_{50} thấp nhất là 6,4 ± 1,23 µM. Ngay ở nồng độ thấp 1 µM, **WI3** đã làm giảm đáng kể IL-1β và đạt hiệu quả ức chế gần mức nền tại 30 µM,

cho thấy có tiềm năng trong giai đoạn khởi phát của phản ứng viêm. Bên cạnh đó, hợp chất **WI19** (liriodendrin) cũng thể hiện khả năng ức chế sản sinh IL-1β mạnh so với các hợp chất được thử nghiệm với giá trị IC_{50} = 9,73 ± 1,26 µM, kết quả này cũng phù hợp với một số nghiên cứu trước đây về hoạt tính chống viêm hiệu quả của liriodendrin; như chống viêm phổi cấp thông qua việc ức chế trục tín hiệu SRC/STAT3/MAPK, từ đó ngăn chặn sự giải phóng các cytokin gây viêm (IL-1β, IL-6, TNF-α) [148], giảm tình trạng phù nề và sự xâm nhập của các tế bào viêm thông qua việc làm giảm mức độ các cytokin thúc đẩy viêm như TNF-α, IL-1β, IL-6 và tăng cường cytokin chống viêm IL-10 thông qua việc ức chế con đường tín hiệu TLR4/NF-κB [139]. Như vậy, dựa trên khả năng ức chế sản sinh IL-1β và kích thích sản sinh IL-10 trên mô hình tế bào RAW 264.7 kích thích bằng LPS cho thấy **WI3** và **WI19** có hoạt tính chống viêm mạnh hơn so với các hợp chất khác được thử nghiệm.

Trên cơ sở các kết quả thu được, có thể đưa ra giả thuyết về cơ chế tác động như sau: LPS liên kết với phức hợp thụ thể màng TLR4/MD-2 trên tế bào RAW 264.7, hoạt hóa protein tiếp hợp MyD88 và dẫn truyền tín hiệu qua hai trục chính NF-κB và MAPK, thúc đẩy phiên mã các gen tiền viêm làm tăng IL-1β toàn phần, đồng thời kìm hãm biểu hiện IL-10 trong giải đoạn viêm cấp. Việc các hợp chất phân lập được từ Niệt dó làm giảm IL-1β đồng thời làm tăng IL-10 theo quan hệ phụ thuộc nồng độ gợi ý khả năng chúng can thiệp vào một hoặc nhiều mắt xích của trục TLR4/MyD88/NF-κB – có thể ở mức tương tác với thụ thể, ở mức dẫn truyền tín hiệu nội bào, hoặc ở mức hoạt hóa yếu tố phiên mã.

4.2.4. Về tác dụng của một số chất tiềm năng trên INF-γ, IL-17 và Foxp3

❖ ***Hoạt tính ức chế sản sinh INF-γ***

INF-γ là cytokin đặc trưng của dòng tế bào Th1, chịu trách nhiệm thúc đẩy miễn dịch qua trung gian tế bào và kích hoạt đại thực bào. Tuy nhiên, sự tăng sinh quá mức và kéo dài của INF-γ lại là động lực bệnh sinh kích hoạt các tổn thương mô mạn tính và tự miễn [66], [75]. Kết quả đánh giá khả năng ức chế tiết INF-γ trên dòng tế bào T CD4+ được kích thích bằng LPS của các chất tiềm năng cho thấy **WI3** và **WI7** là hai hợp chất có hoạt tính nổi trội với giá trị IC_{50} lần lượt là 9,28 ± 1,23 µM và 9,57 ± 1,01 µM. Hợp chất **WI19** cũng cho thấy hiệu quả đáng kể (IC_{50} = 14,73 ± 1,49 µM), trong khi **WI5**, **WI8** và **WI9** có hoạt tính thấp hơn. Điều này định hướng **WI3** và **WI7** là các ứng viên

tiềm năng cho các mô hình bệnh lý viêm liên quan đến sự quá mẫn của dòng Th1 như bệnh viêm khớp dạng thấp, bệnh Crohn, bệnh vảy nến.

❖ ***Hoạt tính ức chế sản sinh IL-17***

IL-17 là sản phẩm chính của tế bào Th17. Cytokin này là tác nhân gây viêm mạnh, liên quan mật thiết đến sự hủy hoại khớp và mô trong viêm khớp dạng thấp và bệnh vảy nến [149], [66], [68]. Kết quả đánh giá khả năng ức chế sản sinh cytokin này trên tế bào T CD4+ được kích thích bằng LPS cho thấy nồng độ IL-17 giảm rõ rệt khi có mặt các chất thử. **WI3** tiếp tục thể hiện là hợp chất có hoạt tính mạnh nhất với IC_{50} = 12,62 ± 2,57 µM. Theo sau là **WI19** (IC_{50} = 14,50 ± 1,04 µM) và **WI7** (IC_{50} = 14,69 ± 2,13 µM). Khả năng ức chế sản sinh IL-17 của **WI3** và **WI19**, mở ra triển vọng trong việc điều trị các bệnh viêm mạn tính và tự miễn theo trục Th17/IL-17.

❖ ***So sánh tương quan giữa Foxp3 với INF-γ và IL-17***

Tế bào lympho T CD4+ chịu kích thích cấp tính bởi LPS có thể dẫn đến sự bùng phát nồng độ Foxp3. Đây là đáp ứng phản hồi thích ứng mang tính tự vệ thông qua thụ thể TLR4 và các con đường truyền tín hiệu nội bào nhằm hạ nhiệt bùng phát viêm, có thể không đồng nghĩa với việc hàng rào dung nạp miễn dịch bị phá vỡ. Bên cạnh đó, điều hòa miễn dịch không phải là giá trị tuyệt đối của từng tín hiệu mà là tỷ lệ tương quan giữa chúng. Để lượng hóa nhận định này, luận án sử dụng chỉ số chọn lọc tương đối nhằm so sánh tín hiệu cytokin với Foxp3 (RSI), chỉ số này được định nghĩa là tỷ số giữa giá trị IC_{50} trên Foxp3 và giá trị IC_{50} trên cytokin hiệu lực tương ứng (INF-γ, IL-17). Chỉ số RSI >1 có thể dự đoán hợp chất ức chế cytokin hiệu lực gây viêm mạnh hơn so với ức chế Foxp3, tức là cân bằng giữa các phân nhóm T CD4+ dịch chuyển về phía dung nạp. Kết quả tính toán được trình bày tại Bảng 4.1.

Bảng 4.1. Chỉ số chọn lọc tương đối (RSI) của các hợp chất tiềm năng trên tế bào T CD4+

Hợp chất	IC_{50} IFN-γ (μM)	IC_{50} IL-17 (μM)	IC_{50} Foxp3 (μM)	RSI (IFN-γ)	RSI (IL-17)	Tác động
WI3	9,28	12,62	23,38	2,52	1,85	Điều hòa chọn lọc
WI5	16,22	22,92	43,45	2,68	1,90	Điều hòa chọn lọc
WI9	18,50	26,06	51,26	2,77	1,97	Điều hòa chọn lọc
WI7	9,57	14,69	20,47	2,14	1,39	Trung gian
WI8	16,83	18,41	18,84	1,12	1,02	Ức chế không chọn lọc
WI19	14,73	14,50	13,67	0,93	0,94	Ức chế toàn diện

Trong đó số các hợp chất được thử nghiệm, **WI19** (liriodendrin) thể hiện hoạt lực ức chế Foxp3 mạnh nhất với IC_{50} = 13,67 ± 1,85 μM. khả năng làm giảm đồng thời Foxp3 cùng các cytokin tiền viêm (INF-γ, IL-17) chứng minh **WI19** có hiệu lực giải tỏa trạng thái kích hoạt quá mức. Bên cạnh đó, một số nghiên cứu gần đây đã chỉ ra rằng việc can thiệp ức chế Foxp3 giúp phá vỡ hàng rào dung nạp miễn dịch tại khối u, hỗ trợ tái hoạt hóa đáp ứng của các tế bào lympho hiệu lực tiêu diệt tế bào ác tính [76], [79]. Do vậy, bên cạnh tác dụng dập tắt phản ứng viêm cấp, **WI19** còn có thể gợi mở tiềm năng trị ung thư theo hướng tái lập trình miễn dịch.

4.2.5. Về liên quan giữa cấu trúc và tác dụng sinh học

Trong số 19 hợp chất phân lập được từ loài Niệt dó, coumarin và lignan là hai nhóm hợp chất chính. Kết quả sàng lọc và đánh giá hoạt tính sinh học trên một số cytokin liên quan đến viêm và miễn dịch gợi ý về sự liên giữa cấu trúc hóa học và tác dụng sinh học của một số hợp chất thuộc hai nhóm này.

❖ ***Đối với nhóm hợp chất coumarin***

✓ ***Tác dụng của cấu trúc dạng aglycon và dạng glycosid***

Hợp chất **WI3** (umbelliferon - dạng aglycon) thể hiện hoạt tính tốt trên thử nghiệm sàng lọc với 2 tín hiệu IL-1β và IL-10. Hợp chất này thể hiện khả năng ức chế sản sinh IL-1β mạnh (IC_{50} = 6,4 μM) và hoạt tính kích thích sản sinh IL-10 tốt hơn so các hợp chất được thử nghiệm còn lại. Khi có thêm 1 phân tử đường gắn vào cấu trúc của **WI3** để tạo thành **WI4** (adicardin - dạng glycosid), hoạt tính ức chế sản sinh IL-1β

và kích thích sản sinh của IL-10 của **WI4** trở nên rất yếu. Tương tự, **WI5 (**daphnoretin - dạng aglycon**)** là hợp chất có khả năng kích thích sản sinh IL-10 mạnh. Tuy nhiên, khi cấu trúc của **WI5** gắn thêm 1 phân tử đường tạo thành **WI6** (daphnorin - dạng glycosid) thì hoạt tính kích thích sản sinh IL-10 của **WI6** lại trở nên bị yếu đi nhiều. Kết quả trên gợi ý rằng cấu trúc coumarin ở dạng aglycon thể hiện hoạt tính ức chế sản sinh IL-1β và kích thích sản sinh IL-10 *in vitro* mạnh hơn so với dạng glycosid.

✓ ***Tác dụng của cấu trúc mono-coumarin, di-coumarin và tri-coumarin***

Hợp chất **WI3** là một mono-coumarin thể hiện hoạt tính ức chế các cytokin IL-1β, INF-γ, IL-17 mạnh nhất trong số các hợp chất coumarin được thử nghiệm với giá trị IC_{50} lần lượt là 6,4 μM, 9,28 μM và 12,62 μM. Trong khi đó, các di-coumarin (**WI5**, **WI7**) và tri-coumarin (**WI8**) thể hiện hoạt tính ức chế các cytokin cytokin IL-1β, INF-γ, IL-17 yếu hơn so với **WI3**. Điều này có thể do cấu trúc đơn giản, kích thước phân tử nhỏ của mono-coumarin aglycon có thể đã giúp **WI3** xâm nhập qua màng tế bào và tương tác nhanh và mạnh hơn với các đích sinh học phân tử.

❖ ***Đối với nhóm hợp chất lignan***

✓ ***Tác dụng của cấu hình lập thể***

Hợp chất **WI13** (*erythro*-citrusin B) và **WI14** (*threo*-citrusin B), là các đồng phân quang học có cùng công thức phân tử và cấu hình phẳng, được sàng lọc hoạt tính trên 2 tín hiệu IL-1β và IL-10. Kết quả cho thấy, ở cùng nồng độ 10 μM, hợp chất **WI13** có tác dụng ức chế sản sinh IL-1β đồng thời kích thích sản sinh IL-10 mạnh hơn so với hoạt tính này của hợp chất **WI14**.

✓ ***Ảnh hưởng của nhóm thế trên nhân thơm***

Sự thay đổi nhóm thế trong cấu trúc hóa học của **WI18** và **WI19** cũng dẫn đến sự thể hiện khác nhau về hoạt tính sinh học. Cụ thể, hai hợp chất này có cấu trúc hoá học gần giống nhau, trong đó, nguyên tử -H ở vị trí C5 và C5′ trong cấu trúc của **WI18** được thay thế bằng nhóm chức methoxy (-OCH_3) trong cấu trúc của **WI19**. Kết quả sàng lọc trên 2 tín hiệu IL-1β và IL-10 cho thấy **WI19** thể hiện hoạt tính mạnh hơn so với **WI18**. Như vậy, loại nhóm thế ở vị trí C5 và C5′ trong cấu trúc hóa học của **WI19** có thể ảnh hưởng đến hoạt tính của hợp chất.

4.3. ĐÓNG GÓP MỚI CỦA ĐỀ TÀI

Đây là một công trình nghiên cứu đầu tiên và có hệ thống về thành phần hóa học theo định hướng tác dụng sinh học của loài Niệt dó (*Wikstroemia indica* (L.) C.A.Mey.)

thu hái tại Việt Nam. Các kết quả nghiên cứu của đề tài là những đóng góp mới cho cơ sở dữ liệu về hóa thực vật và tác dụng sinh học của loài nghiên cứu.

Thông qua quá trình chiết xuất và phân lập theo định hướng tác dụng sinh học, từ cành và lá cây Niệt dó, luận án đã xác định được cấu trúc của 19 hợp chất tinh khiết. Đóng góp nổi bật về mặt hóa học của công trình bao gồm việc phát hiện 02 hợp chất mới, 04 hợp chất lần đầu tiên được phân lập từ chi *Wikstroemia* và 05 hợp chất lần đầu tiên được tìm thấy từ loài này.

Ngoài ra, kết quả của đề tài đã góp phần cung cấp bằng chứng khoa học để giải thích về công dụng của loài Niệt dó, làm sáng tỏ việc sử dụng cây thuốc này theo tri thức dân gian dưới góc nhìn khoa học hiện đại. Đây là tiền đề cho việc phát triển sản phẩm từ loài này, vừa phục vụ nhu cầu chăm sóc sức khỏe cộng đồng, vừa góp phần vào công tác bảo tồn, khai thác, phát triển loài cây này.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

1. Về thành hóa học

Đã phân lập và xác định được cấu trúc của 19 hợp chất trong phân đoạn ethyl acetat và cắn nước của cành và là Niệt dó bao gồm:

- 05 hợp chất là các dẫn chất pheolic bao gồm: methyl 4-hydroxybenzoat (**WI1**), syringin (**WI2**), genkwanin (**WI9**), kaempferol-3-*O*-rhamnosid (**WI10**) và yuankanin (**WI11**). Trong đó, kaempferol-3-*O*-rhamnosid là hợp chất lần đầu tiên phân lập được từ chi *Wikstroemia.*

- 06 hợp chất thuộc nhóm coumarin bao gồm: umbelliferon (**WI3**), adicardin (**WI4**), daphnoretin (**WI5**), daphnorin (**WI6**), wikstronutin (**WI7**) và triumbelletin-7-*O*-*β*-D-glucosid (**WI8**). Trong đó, adicardin lần đầu tiên phân lập được trong chi *Wiktroemia* và wikstronutin lần đầu tiên phân lập được trong loài Niệt dó (*W. indica*).

- 08 hợp chất có cấu trúc lignan bao gồm: 04 hợp chất lần đầu tiên phân lập được từ loài là (7*S**,8*R**)-dehydrodiconiferyl alcohol 4-*O*-*β*-D-glucopyranosid (**WI16**), (7*S**,8*R**)-5-methoxydehydrodiconiferyl alcohol 4-*O*-*β*-D-glucopyranosid (**WI17**), pinoresinol di-*O*-*β*-D-glucopyranosid (**WI18**) và liriodendrin (**WI19**); 02 hợp chất lần đầu tiên phân lập được trong chi *Wikstroemia* là *erythro*-syringylglycerol-8-*O*-4′-sinapyl ether 4-*O*-*β*-D-glucopyranosid (**WI12**) và *erythro*-citrusin B (**WI13**); 02 hợp chất lignan mới bao gồm: *threo*-citrusin B (**WI14**) và isonitidanin-4-*O*-*β*-D-glucosid (**WI15**).

2. Về tác dụng sinh học

- Các cao phân đoạn có hoạt tính tốt trên trên hai tín hiệu IL-1β và IL-10 là **WIE** và **WIW**.

- Các hợp chất có hoạt tính tốt trên hai tín hiệu IL-1β và IL-10 bao gồm; umbelliferon (**WI3**), daphnoretin (**WI5**), wikstronutin (**WI7**), triumbelletin-7-*O*-*β*-D-glucosid (**WI8**), genkwanin (**WI9**) và liriodendrin (**WI19**).

- Hợp chất ức chế IL-1β sản sinh trên dòng tế bào RAW 264.7 mạnh hơn trong số các hợp chất được thử nghiệm bao gồm: Umbelliferon (**WI3**) với IC_{50} = 6,4 ± 1,23 μM và liriodendrin (**WI19**) với IC_{50} = 9,73 ± 1,26 μM.

- Hợp chất có hoạt tính ức chế INF-γ và IL-17 sản sinh trên dòng tế bào T CD4+ mạnh hơn so với các hợp chất khác là umbelliferon (**WI3**) với giá trị IC_{50} lần lượt là 9,28 ± 1,23 μM và 12,62 ± 2,57 μM.

- Hợp chất có hoạt tính ức chế Foxp3 sản sinh trên dòng tế bào T CD4+ mạnh hơn so với các hợp chất khác là liriodendrin (**WI19**) với giá trị IC_{50} là 13,67 ± 1,85 μM.

KIẾN NGHỊ

- Tiếp tục nghiên cứu sâu hơn về cơ chế chống viêm và điều hòa miễn dịch trên một số con đường tín hiệu cụ thể như MAPKs, TGF-β/Smad, NF-κB và PI3K/AKT của các hợp chất tiềm năng phân lập được từ Niệt dó.

- Nghiên cứu về độc bán trường diễn và độc tính trên sinh sản của cao tổng và các cao chiết tiềm năng từ Niệt dó.

- Nghiên cứu tác dụng chống viêm và điều hòa miễn dịch *in vivo* của cao chiết và các hợp chất tiềm năng phân lập được từ Niệt dó.

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ

1. Nguyen V.L, Cao V.A, Nguyen T.T, Tran T.H, Hoang V.D, Do T.H (2025), Lignans from the aerial parts of *Wikstroemia indica* (L.) C.A.Mey. and their effects on LPS-induced IL-1β and IL-10 cytokin production in RAW 264.7 macrophages, *Natural Product Research, doi.org/10.1080/14786419.2025.2575126*
2. Nguyen V.L, Cao V.A, Nguyen T.T, Tran T.H, Hoang V.D, Do T.H (2025), Anti-inflammatory and immunoregulatory activities *in vitro* of coumarins isolated from the twigs and leaves of *Wikstroemia indica* (L.) C.A.Mey, *Natural Product Sciences*, 31(4), 284-290.
3. Nguyen V.L, Nguyen V.T, Nguyen T.H.A, Vu T.D, Nguyen H.S, Tran T.H, Hoang V.D, Ngo T.D, Do T.H (2025). Phenolic constituents of twigs and leaves of *Wikstroemia indica* (L.) C.A.Mey. and their effects on LPS-induced IL-1β and IL-10 cytokin production in Raw 264.7 Cell, *Journal of Medicinal Materials*, 30(2), 67-73.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Đỗ Huy Bích, Đặng Quang Chung, Bùi Xuân Chương, Nguyễn Thượng Dong, Đỗ Trung Đàm, Phạm Văn Hiển, Vũ Ngọc Lộ, Phạm Duy Mai, Phạm Kim Mãn, Đoàn Thị Nhu, Nguyễn Tập, Trần Toàn (2006), *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam*, tập 2, NXB Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội, 477-479.
2. Võ Văn Chi (1997), *Từ điển cây thuốc Việt Nam*, NXB Y học, Hà Nội, 875.
3. Li Y.M., Zhu L., Jiang J.G., Yang L., Wang D.Y. (2009), Bioactive components and pharmacological action of *Wikstroemia indica* (L.) C. A. Mey. and its clinical application, *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 10(8), 743-752.
4. Huan D.Q., Hop N.Q., Son N.T. (2024), *Wikstroemia*: A review on its phytochemistry and pharmacology, *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 25(5), 563-598.
5. Jegal J., Park N.J., Lee S.Y., Jo B.G., Bong S.K., Kim S.N., Yang M.H. (2020), Quercitrin, the main compound in *Wikstroemia indica*, mitigates skin lesions in a mouse model of 2,4-dinitrochlorobenzene-induced contact hypersensitivity, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2020, 4307161.
6. Lee S.Y., Park N.J., Jegal J., Jo B.G., Choi S., Lee S.W., Uddin M.S., Kim S.N., Yang M.H. (2020), Suppression of DNCB-induced atopic skin lesions in mice by *Wikstroemia indica* extract, *Nutrients*, 12(1), 173.
7. Furman D., Campisi J., Verdin E., Carrera-Bastos P., Targ S., Franceschi C., Ferrucci L., Gilroy D.W., Fasano A., Miller G.W., Miller A.H., Mantovani A., Weyand C.M., Barzilai N., Goronzy J.J., Rando T.A., Effros R.B., Lucia A., Kleinstreuer N., Slavich G.M. (2019), Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span, *Nature Medicine*, 25(12), 1822-1832.
8. Turner M.D., Nedjai B., Hurst T., Pennington D.J. (2014), Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1843(11), 2563-2582.
9. Phạm Hoàng Hộ (2003), *Cây cỏ Việt Nam*, tập 2, NXB Trẻ, TP. Hồ Chí Minh, 39.
10. WFO (2025), *World Flora Online*, Available from: https://www.worldfloraonline.org/taxon/wfo-4000040707, accessed October 25, 2025.
11. Takhtajan A. (2009), *Flowering plants*, Springer Science & Business Media.
12. Geng L.D., Zhang C., Xiao Y.Q. (2006), A new dicoumarin from stem bark of *Wikstroemia indica*, *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 31(1), 43-45.
13. Lee K.H., Tagahara K., Suzuki H., Wu R.Y., Haruna M., Hall I.H., Huang H.C., Ito K., Iida T., Lai J.S. (1981), Antitumor agents. 49. Tricin, kaempferol-3-0-β-D-glucopyranoside and (+)-nortrachelogenin, antileukemic principles from *Wikstroemia indica*, *Journal of Natural Products*, 44(5), 530-535.
14. Chen D.S., Huang Y.D., Wang D.Y. (2008), Studies on chemical constituents of stem bark of *Wikstroemia indica*, *Subtropical Plant Science*, 37(4), 26.

15. Yao H., Yuan Z., Wei G., Chen C., Duan J., Li Y., Wang Y., Zhang C., Liu Y. (2017), Thevetiaflavone from *Wikstroemia indica* ameliorates PC12 cells injury induced by OGD/R via improving ROS-mediated mitochondrial dysfunction, *Molecular Medicine Reports*, 16(6), 9197-9202.
16. Trần Thanh Hà, Ngô Thị Mai Anh, Nguyễn Văn Đậu, Bùi Mộng Hoa, Phạm Thùy Dương, Nguyễn Thị Hà, Nguyễn Thị Hồng, Nguyễn Minh Khởi, Trịnh Thị Điệp (2013), Thành phần hóa học của thân rễ cây niệt gió thu hái ở Việt Nam, *Tạp chí Dược liệu*, 18(3), 179-184.
17. Geng L.D., Zhang C., Xiao Y.Q. (2006), Studies on the chemical constituents in stem rind of *Wikstroemia indica*, *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 31(10), 817-819.
18. Yao H.K., Zhang W.T., Gao Y.S., Zhong Y. (2010), Studies on the chemical constituents of *Wikstroemia indica*, *Zhong Yao Cai*, 33(7), 1093-1095.
19. Sun L.X., Chen Y., Liu L.X., Jia Y.R., Li Y.C., Ma E.L. (2012), Cytotoxic constituents from *Wikstroemia indica*, *Chemistry of Natural Compounds*, 48, 493-497.
20. Fan Q., Jiang Y.P., Xu W., Zhu D.Q., Huang W.Q., Huang X.J., Shao M. (2018), Phenols from the rhizome of *Wikstroemia indica*, *Biochemical Systematics and Ecology*, 78, 59-62.
21. Lu C.L., Zhu L., Piao J.H., Jiang J.G. (2012), Chemical compositions extracted from *Wikstroemia indica* and their multiple activities, *Pharmaceutical Biology*, 50(2), 225-231.
22. Meng S., Huang X.J., Sun X.G., Wang Y., Yang Y., Wang Q.R., Fan Q., Ye W.C. (2014), Phenolic constituents from rhizome of *Wikstroemia indica* and their anti-tumor activity, *Natural Product Research and Development*, 26(6), 851-855.
23. Shao M., Huang X.J., Liu J.S., Han W.L., Cai H.B., Tang Q.F., Fan Q. (2016), A new cytotoxic biflavonoid from the rhizome of *Wikstroemia indica*, *Natural Product Research*, 30(12), 1417-1422.
24. Zhang X.L., Wang G.C., Huang W.H., Ye W.C., Li Y.L. (2011), Biflavonoids from the roots of *Wikstroemia indica*, *Natural Product Communications*, 6(8), 1111-1114.
25. Shi P., Liu Z., Cen R., Mao C., Han N., Yin J. (2022), Three new compounds from the dried root bark of *Wikstroemia indica* and their cytotoxicity against HeLa cells, *Natural Product Research*, 36(21), 5476-5483.
26. Hu K., Kobayashi H., Dong A., Iwasaki S., Yao X. (2000), Antifungal, antimitotic and anti-HIV-1 agents from the roots of *Wikstroemia indica*, *Planta Medica*, 66(6), 564-567.
27. Huang W.H., Zhou G.X., Wang G.C., Chung H.Y., Ye W.C., Li Y.L. (2012), A new biflavonoid with antiviral activity from the roots of *Wikstroemia indica*, *Journal of Asian Natural Products Research*, 14(4), 401-406.

28. Wang Q.R., Jiang Y.P., Luo C.H., Liu S., Wang R.C., Huang X.J., Shao M. (2018), Cytotoxic oligophenols from the rhizome of *Wikstroemia indica*, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 28(4), 626-629.
29. Shao M., Lou D.D., Yang J.B., Lin M.T., Deng X.H., Fan Q. (2020), Curcumin and wikstroflavone B, a new biflavonoid isolated from *Wikstroemia indica*, synergistically suppress the proliferation and metastasis of nasopharyngeal carcinoma cells via blocking FAK/STAT3 signaling pathway, *Phytomedicine*, 79, 153341.
30. Ko Y.C., Feng H.T., Lee R.J., Lee M.R. (2013), The determination of flavonoids in *Wikstroemia indica* C. A. Mey. by liquid chromatography with photo-diode array detection and negative electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 27(1), 59-67.
31. Li J., Lu L.Y., Zeng L.H., Zhang C., Hu J.L., Li X.R. (2012), Sikokianin D, a new C-3/C-3''-biflavanone from the roots of *Wikstroemia indica*, *Molecules*, 17(7), 7792-7797.
32. Yao H., Zhang W., Wu H., Yang M., Wei P., Ma H., Duan J., Zhang C., Li Y. (2019), Sikokianin A from *Wikstroemia indica* protects PC12 cells against OGD/R-induced injury via inhibiting oxidative stress and activating Nrf2, *Natural Product Research*, 33(23), 3450-3453.
33. Wang L.Y., Unehara T., Kitanaka S. (2005), Anti-inflammatory activity of new guaiane type sesquiterpene from *Wikstroemia indica*, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 53(1), 137-139.
34. Nunome S., Ishiyama A., Kobayashi M., Otoguro K., Kiyohara H., Yamada H., Omura S. (2004), In vitro antimalarial activity of biflavonoids from *Wikstroemia indica*, *Planta Medica*, 70(1), 76-78.
35. Kato M., He Y.M., Dibwe D.F., Li F., Awale S., Kadota S., Tezuka Y. (2014), New guaian-type sesquiterpene from *Wikstroemia indica*, *Natural Product Communications*, 9(1), 1-2.
36. Trần Văn Thùy, Dương Anh Tuấn, Nguyễn Văn Tuyến, Bùi Kim Anh, Luc van Puyvelde (2007), Bước đầu nghiên cứu thành phần hóa học cây niệt gió (*Wikstroemia indica* C. A. Mey., Thymelaeaceae), *Tạp chí Hóa học*, 45(3), 310.
37. Ho W.S., Xue J.Y., Sun S.S., Ooi V.E., Li Y.L. (2010), Antiviral activity of daphnoretin isolated from *Wikstroemia indica*, *Phytotherapy Research*, 24(5), 657-661.
38. Lu C.L., Li Y.M., Fu G.Q., Yang L., Jiang J.G., Zhu L., Lin F.L., Chen J., Lin Q.S. (2011), Extraction optimisation of daphnoretin from root bark of *Wikstroemia indica* (L.) C.A. and its anti-tumour activity tests, *Food Chemistry*, 124(4), 1500-1506.
39. Chang H., Wang Y.W., Gao X., Song Z.H., Awale S., Han N., Liu Z.H., Yin J. (2017), Lignans from the root of *Wikstroemia indica* and their cytotoxic activity against PANC-1 human pancreatic cancer cells, *Fitoterapia*, 121, 31-37.

40. Suzuki H., Lee K.H., Haruna M., Iida T., Ito K., Huang H.C. (1982), (+)-Arctigenin, a lignan from *Wikstroemia indica*, *Phytochemistry*, 21(7), 1824-1825.
41. Wang L.Y., Unehara N., Kitanaka S. (2005), Lignans from the roots of *Wikstroemia indica* and their DPPH radical scavenging and nitric oxide inhibitory activities, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 53(10), 1348-1351.
42. Wang G.C., Zhang X.L., Wang Y.F., Li G.Q., Ye W.C., Li Y.L. (2012), Four new dilignans from the roots of *Wikstroemia indica*, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 60(7), 920-923.
43. Kato A., Hashimoto Y., Kidokoro M. (1979), (+)-Nortrachelogenin, a new pharmacologically active lignan from *Wikstroemia indica*, *Journal of Natural Products*, 42(2), 159-162.
44. Liu Z., Dong M., Chang H., Han N., Yin J. (2020), Guaiane type of sesquiterpene with NO inhibitory activity from the root of *Wikstroemia indica*, *Bioorganic Chemistry*, 99, 103785.
45. Liu Z., Dong M., Qiu X., Han N., Yin J. (2021), Diarylpentanones from the root of *Wikstroemia indica* and their cytotoxic activity against human lung A549 cells, *Natural Product Research*, 35(19), 3346-3349.
46. Zhang M., Otsuki K., Kato S., Ikuma Y., Kikuchi T., Li N., Koike K., Li W. (2022), A feruloylated acylglycerol isolated from *Wikstroemia pilosa* and its distribution in ten plants of *Wikstroemia* species, *Journal of Natural Medicines*, 76(3), 680-685.
47. Liang Y., Lin D.Q. (2005), Analysis of chemical constituents of essential oil in officinal plant *Wikstroemia indica* by gas chromatography-mass spectrometry, *Fine Chemicals*, 22, 357-358.
48. Suroowan S., Llorent-Martínez E.J., Zengin G., Khalid A., Abdalla A.N., Khogeer S., Van B., Mahomoodally M.F. (2023), Chemical composition and biological propensities of *Wikstroemia indica* (L.) C. A. Mey (Tie Bush), *Process Biochemistry*, 133, 200-208.
49. Yao H., Zhang X., Zhang N., Li J., Li Y., Wei Q. (2021), Wikstromol from *Wikstroemia indica* induces apoptosis and suppresses migration of MDA-MB-231 cells via inhibiting PI3K/Akt pathway, *Journal of Natural Medicines*, 75(1), 178-185.
50. Yang Z.Y., Du Z.M. (2006), Study on antibacterial activity of *Wikstroemia indica* decoction, *Journal of Harbin Medical University*, 40(5), 362-364.
51. Chen C., Qu F., Wang J., Xia X., Wang J.B., Chen Z., Ma X., Wei S.Z., Zhang Y.M., Li J.Y. (2016), Antibacterial effect of different extracts from *Wikstroemia indica* on *Escherichia coli* based on microcalorimetry coupled with agar dilution method, *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 123, 1583-1590.
52. Rahman M.K. (2015), Antidiarrheal and thrombolytic effects of methanol extract of *Wikstroemia indica* (L.) CA Mey leaves, *International Journal of Green Pharmacy*, 9(1), 8-13.

53. Ko F.N., Chang Y.L., Kuo Y.H., Lin Y.L., Teng C.M. (1993), Daphnoretin, a new protein kinase C activator isolated from *Wikstroemia indica* C.A. Mey, *Biochemical Journal*, 295(1), 321-327.
54. Zhang K., Gao M., Xue B., Kamau P.M., Lai R., Luo L. (2024), *Wikstroemia indica* (L.) C. A. Mey. exerts analgesic activity by inhibiting Na(V)1.7 channel, *Journal of Ethnopharmacology*, 320, 117392.
55. Đỗ Tất Lợi (1999), *Cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, NXB Kỹ thuật, Hà Nội, 875.
56. Medzhitov R. (2008), Origin and physiological roles of inflammation, *Nature*, 454(7203), 428-435.
57. Ferrero-Miliani L., Nielsen O.H., Andersen P.S., Girardin S.E. (2007), Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1beta generation, *Clinical and Experimental Immunology*, 147(2), 227-235.
58. Soehnlein O., Lindbom L. (2010), Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation, *Nature Reviews Immunology*, 10(6), 427-439.
59. Nguyễn Ngọc Lanh, Văn Đình Hoa, Vũ Triệu An, Phạm Thị Phi Phi, Phan Thị Thu Anh, Trần Thị Chính, Vũ Dương Quý, Nguyễn Thanh Bình (2006), *Miễn dịch học*, NXB Y học, 21-28, 111-117, 140-144, 154-157.
60. Medina K.L. (2016), Overview of the immune system, *Handbook of Clinical Neurology*, 61-76.
61. Chen L., Deng H., Cui H., Fang J., Zuo Z., Deng J., Li Y., Wang X., Zhao L. (2018), Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs, *Oncotarget*, 9(6), 7204-7218.
62. Serhan C.N., Chiang N., Van Dyke T.E. (2008), Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators, *Nature Reviews Immunology*, 8(5), 349-361.
63. Lin W.W., Karin M. (2007), A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer, *Journal of Clinical Investigation*, 117(5), 1175-1183.
64. Saadati F., Modarresi Chahardehi A., Jamshidi N., Jamshidi N., Ghasemi D. (2024), Coumarin: A natural solution for alleviating inflammatory disorders, *Current Research in Pharmacology and Drug Discovery*, 7, 100202.
65. Li Y., Wang G.Q., Li Y.B. (2024), Therapeutic potential of natural coumarins in autoimmune diseases with underlying mechanisms, *Frontiers in Immunology*, 15, 1432846.
66. Wan Y.Y., Flavell R.A. (2009), How diverse-CD4 effector T cells and their functions, *Journal of Molecular Cell Biology*, 1(1), 20-36.
67. Weiskopf D., Weinberger B., Grubeck-Loebenstein B. (2009), The aging of the immune system, *Mechanisms of Ageing and Development*, 22(11), 1041-1050.
68. Koyama Y., Brenner D.A. (2017), Liver inflammation and fibrosis, *Journal of Clinical Investigation*, 127(1), 55-64.
69. Dinarello C.A. (2007), Historical insights into cytokines, *European Journal of Immunology*, 37(1), S34-45.

70. Bent R., Moll L., Grabbe S., Bros M. (2018), Interleukin-1 beta-a friend or foe in malignancies?, *International Journal of Molecular Sciences*, 19(8), 2155.
71. McAleer J.P., Vella A.T. (2008), Understanding how lipopolysaccharide impacts CD4 T-cell immunity, *Critical Reviews in Immunology*, 28(4), 281-299.
72. Liu W.C., Yang Y.H., Wang Y.C., Chang W.M., Wang C.W. (2023), Maresin: Macrophage mediator for resolving inflammation and bridging tissue regeneration-a system-based preclinical systematic review, *International Journal of Molecular Sciences*, 24(13), 11012.
73. Zheng M., Tian Z. (2019), Liver-mediated adaptive immune tolerance, *Frontiers in Immunology*, 10, 2525.
74. Rudensky A.Y. (2011), Regulatory T cells and Foxp3, *Immunological Reviews*, 241(1), 260-268.
75. Romagnani S. (2000), T-cell subsets (Th1 versus Th2), *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 85(1), 9-18.
76. Huang C.H., Ku W.T., Lin Y.C., Lin C.Y. (2026), Regulatory T cells from concept to clinic: The 2025 Nobel Prize and its implications for immune-mediated diseases and cancer, *Biomedical Journal*, 49(2), 100959.
77. Sawitzki B., Kingsley C.I., Oliveira V., Karim M., Herber M., Wood K.J. (2005), IFN-gamma production by alloantigen-reactive regulatory T cells is important for their regulatory function in vivo, *Journal of Experimental Medicine*, 201(12), 1925-1935.
78. Li W., Tong J. (2026), Tumor microenvironment-induced epigenetic reprogramming of Tregs and its impact on immunotherapy, *Frontiers in Genetics*, 17, 1787421.
79. Hawley K.M., Eclov R.J., Schnorenberg M.R., Tian Y., Shah R.N., Thomas-Toth A.T., Fefferman M., Bird G.H., Walensky L.D., Tirrell M.V., LaBelle J.L. (2022), Inhibition of FOXP3 by stapled alpha-helical peptides dampens regulatory T cell function, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 119(42), e2209044119.
80. Anh C.V., Kang J.S., Lee H.S., Trinh P.T.H., Heo C.S., Shin H.J. (2022), New glycosylated secondary metabolites from marine-derived bacteria, *Marine Drugs*, 20(7), 464.
81. Fan H., Qi D., Yang M., Fang H., Liu K., Zhao F. (2013), In vitro and in vivo anti-inflammatory effects of 4-methoxy-5-hydroxycanthin-6-one, a natural alkaloid from *Picrasma quassioides*, *Phytomedicine*, 20(3-4), 319-323.
82. Jeong D., Yang W.S., Yang Y., Nam G., Kim J.H., Yoon D.H., Noh H.J., Lee S., Kim T.W., Sung G.H., Cho J.Y. (2013), *In vitro* and *in vivo* anti-inflammatory effect of *Rhodomyrtus tomentosa* methanol extract, *Journal of Ethnopharmacology*, 146(1), 205-213.

83. Yu T., Lee J., Lee Y.G., Byeon S.E., Kim M.H., Sohn E.H., Lee Y.J., Lee S.G., Cho J.Y. (2010), In vitro and in vivo anti-inflammatory effects of ethanol extract from *Acer tegmentosum*, *Journal of Ethnopharmacology*, 128(1), 139-147.
84. Jin Q., Lee C., Lee J.W., Yeon E.T., Lee D., Han S.B., Hong J.T., Kim Y., Lee M.K., Hwang B.Y. (2014), 2-Phenoxychromones and prenylflavonoids from *Epimedium koreanum* and their inhibitory effects on LPS-induced nitric oxide and interleukin-1β production, *Journal of Natural Products*, 77(7), 1724-1728.
85. Nguyen T.M., Do T.H., Nguyen T.T., Vũ T.Đ., Tran T.H., Nguyen H.T., Doan T.P., Oh W.K., Park J.H. (2024), Effects of coumarins from roots of *Paramignya scandens* (Griff.) Craib on LPS-induced IL-1β and IL-10 cytokine production in RAW 264.7 macrophages, *Natural Product Sciences*, 30(1), 30-38.
86. Darwish I.A. (2006), Immunoassay methods and their applications in pharmaceutical analysis: Basic methodology and recent advances, *International Journal of Biomedical Science*, 2(3), 217-235.
87. Vijayalakshmi M., Henry L.J.K., Ramar M.K., Kandasamy R. (2020), *Myxopyrum serratulum* ameliorates airway inflammation in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages and OVA-induced murine model of allergic asthma, *Journal of Ethnopharmacology*, 255, 112369.
88. Bùi Thị Thùy Linh, Đặng Hoàng Phú, Nguyễn Trung Nhân (2015), Khảo sát thành phần hóa học cao chloroform của thân cây xáo tam phân - *Paramignya trimera* (Oliver) Burkill - họ Rutaceae, *Tạp chí Phân tích Hóa, Lý và Sinh học*, 20(4), 297-302.
89. Li W., Wei S., Ji Z. (2024), Extraction of active constituents from *Amaranthus retroflexus* and its effect on wheat thermotolerance, *Chinese Journal of Pesticide Science*, 26(6), 1117-1125.
90. Dong H.B., Wu M., Wang Y.Y., Du W.H., He Y.J., Shi Z. (2021), Total syntheses and anti-inflammatory activities of syringin and its natural analogues, *Journal of Natural Products*, 84(11), 2866-2874.
91. Sun Z.H., Tan N.H., Zeng G.Z., Zhang Y.M. (2016), Two new cinnamyl isovalerate derivatives from *Sabina gaussenii*, *Molecules*, 21(5), 571.
92. Li W., Wu X.F., Tong Y.F., Hao L.H., Yang Q.Y., Qi Y., Wu S. (2009), Total synthesis of adicardin, *Journal of Asian Natural Products Research*, 11(8), 720-727.
93. Li X.N., Tong S.Q., Cheng D.P., Li Q.Y., Yan J.Z. (2014), Coumarins from *Edgeworthia chrysantha*, *Molecules*, 19(2), 2042-2048.
94. Liu J.X., Di D.L., Shi Y.P. (2008), Diversity of chemical constituents from *Saxifraga montana* H, *Journal of the Chinese Chemical Society*, 55(4), 863-870.
95. Wu M., Su X., Wu Y., Luo Y., Guo Y., Xue Y. (2022), Glycosylated coumarins, flavonoids, lignans and phenylpropanoids from *Wikstroemia nutans* and their biological activities, *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 18, 200-207.
96. Gomes R.A., Ramirez R.R.A., Maciel J.K.S., Agra M.F., Souza M.F.V., Falcão-Silva V.S., Siqueira-Junior J.P. (2011), Phenolic compounds from *Sidastrum*

micranthum (A. St.-Hil.) fryxell and evaluation of acacetin and 7, 4′-di-O-methylisoscutellarein as motulator of bacterial drug resistence, *Química Nova*, 34, 1385-1388.

97. Fukunaga T., Nishiya K., Kajikawa I., Watanabe Y., Suzuki N., Takeya K., Itokawa H. (1988), Chemical studies on the constituents of *Hyphear tanakae* Hosokawa from different host trees, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 36(3), 1180-1184.
98. Soltani S., Koubaa I., Dhouib I., Khemakhem B., Marchand P., Allouche N. (2023), New specific α-glucosidase inhibitor flavonoid from *Thymelaea tartonraira* leaves: Structure elucidation, biological and molecular docking studies, *Chemistry & Biodiversity*, 20(3), e202200944.
99. Cao T.H., Nguyen T.L., Pham T.C., Ngo T.T.N., Nguyen T.V., Nguyen T.D., Dang V.H. (2022), Phenolic glycoside constituents from the rhizomes of *Atractylodes macrocephala* Koidz, *Journal of Medicinal Materials*, 27(2), 86-90.
100. Zhu H., Tu P. (2004), A new triterpenoid saponin and two neolignans from *Ligularia veitchiana*, *Zeitschrift für Naturforschung B*, 59(9), 1063-1066.
101. Zhao P., Lou L.L., Xin B.S., Li Z.Y., Guo R., Zhou W.Y., Lv T.M., Huang X.X., Song S.J. (2023), Rapid determination of the relative configuration of diverse 8,4′-oxyneolignans by NMR analysis: Retrospective studies, improvement and structural revision, *Phytochemistry*, 214, 113801.
102. Ma G., Wu H., Yuan J., Wu L., Zheng Q., Sun Z., Fan X., Wei H., Yang J., Xu X. (2013), Phenylpropanoid constituents from the seeds of *Lithocarpus pachylepis*, *Phytochemistry Letters*, 6(1), 152-155.
103. Fukuyama Y., Hasegawa T., Toda M., Kodama M., Okazaki H. (1992), Structures of americanol A and isoamericanol A having a neurotrophic property from the seeds of *Phytolacca americana*, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 40(1), 252-254.
104. Kim H.G., Oh H.J., Ko J.H., Joo S.W., Lee Y.G., Baek Y.S., Lee D.Y., Baek N.I. (2019), A new neolignan glucoside from the stems of “Baekma” cultivar, *Chrysanthemum morifolium*, *Chemistry of Natural Compounds*, 55(4), 610-613.
105. Srinroch C., Sahakitpichan P., Chimnoi N., Ruchirawat S., Kanchanapoom T. (2019), Neolignan and monoterpene glycosides from *Magnolia henryi*, *Phytochemistry Letters*, 29, 94-97.
106. Anh C.V., Kang J.S., Lee H.S., Trinh P.T.H., Heo C.S., Shin H.J. (2022), New glycosylated secondary metabolites from marine-derived bacteria, *Marine Drugs*, 20(7), 464.
107. Sawasdee K., Chaowasku T., Lipipun V., Dufat T.H., Michel S., Likhitwitayawuid K. (2013), New neolignans and a lignan from *Miliusa fragrans*, and their anti-herpetic and cytotoxic activities, *Tetrahedron Letters*, 54(32), 4259-4263.

108. Arnoldi A., Merlini L. (1985), Asymmetric synthesis of 3-methyl-2-phenyl-1,4-benzodioxanes. Absolute configuration of the neolignans eusiderin and eusiderin C and D, *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, 0, 2555-2557.
109. Kamiya K., Tanaka Y., Endang H., Umar M., Satake T. (2004), Chemical constituents of *Morinda citrifolia* fruits inhibit copper-induced low-density lipoprotein oxidation, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(19), 5843-5848.
110. Lynn D.G., Chen R.H., Manning K.S., Wood H.N. (1987), The structural characterization of endogenous factors from *Vinca rosea* crown gall tumors that promote cell division of tobacco cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 84(3), 615-619.
111. Hirai N., Okamoto M., Udagawa H., Yamamuro M., Kato M., Koshimizu K. (1994), Absolute configuration of dehydrodiconiferyl alcohol, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 58(9), 1679-1684.
112. Machida K., Sakamoto S., Kikuchi M. (2009), Two new neolignan glycosides from leaves of *Osmanthus heterophyllus*, *Journal of Natural Medicines*, 63(2), 227-231.
113. Schumacher B., Scholle S., Hölzl J., Khudeir N., Hess S., Müller C.E. (2002), Lignans isolated from valerian: identification and characterization of a new olivil derivative with partial agonistic activity at A1 adenosine receptors, *Journal of Natural Products*, 65(10), 1479-1485.
114. Kil Y.S., Park J.Y., Kim Y., Nam S.J., Kim S.J., Kim Y.S., Seo E.K. (2015), Utilization of circular dichroism experiment to distinguish acanthoside D and eleutheroside E, *Archives of Pharmacal Research*, 38(11), 1921-1925.
115. Kaneko T., Ohtani K., Kasai R., Yamasaki K., Nguyen M.Đ. (1998), n-Alkyl glycosides and p-hydroxybenzoyloxy glucose from fruits of *Crescentia cujete*, *Phytochemistry*, 47(2), 259-263.
116. Nations U. (2025), *Globally Harmonized System of classification and labelling of chemicals (GHS)*, 115.
117. Ma J., Li C.J., Yang J.Z., Sun H., Zhang D.M. (2017), New phenylpropanoid and coumarin glycosides from the stems of *Hydrangea paniculata* Sieb, *Molecules*, 22(1), 133.
118. El Menyiy N., Aboulaghras S., Bakrim S., Moubachir R., Taha D., Khalid A., Abdalla A.N., Algarni A.S., Hermansyah A., Ming L.C., Rusu M.E., Bouyahya A. (2023), Genkwanin: An emerging natural compound with multifaceted pharmacological effects, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 165, 115159.
119. Okoye F.B., Sawadogo W.R., Sendker J., Aly A.H., Quandt B., Vray V., Hensel A., Esimone C.O., Debbab A., Diederich M., Proksch P. (2015), Flavonoid glycosides from *Olax mannii*: Structure elucidation and effect on the nuclear factor kappa B pathway, *Journal of Ethnopharmacology*, 176, 27-34.

120. Wang G.J., Chen Y.M., Wang T.M., Lee C.K., Chen K.J., Lee T.H. (2008), Flavonoids with iNOS inhibitory activity from *Pogonatherum crinitum*, *Journal of Ethnopharmacology*, 118(1), 71-78.
121. Rho H.S., Ghimeray A.K., Yoo D.S., Ahn S.M., Kwon S.S., Lee K.H., Cho D.H., Cho J.Y. (2011), Kaempferol and kaempferol rhamnosides with depigmenting and anti-inflammatory properties, *Molecules*, 16(4), 3338-3344.
122. Son Y., Kim J.A., Son H.J., Kim H.J., Park W.G. (2025), Chemotaxonomic insights into Korean *Daphne* spp. and *Wikstroemia* spp. by integrating flavonoid contents with ecological factors, *Plants*, 14(19), 3059.
123. Hejazi M., Javazmi R.F., Bagheri S.M. (2025), Umbelliferone protects testes and spermatogenesis against lead acetate by effectively mitigating oxidative stress, inflammation, and apoptosis, *Clinical and Experimental Reproductive Medicine*, doi: 10.5653/cerm.2025.08256.
124. Melfi F., Mencarelli N., Carradori S., Gallorini M., Angeli A., Poli G., Cataldi A., D′Agostino I., Di Credico A., Di Baldassarre A., Tuccinardi T., Supuran C.T. (2026), Hybridization approach applied to umbelliferon and vanilloids toward new inhibitors of carbonic anhydrases IX and XII with in vitro antiproliferative and anti-inflammatory activities, *Journal of Medicinal Chemistry*, 69(2), 1454-1472.
125. Kim D.Y., Kang Y.H., Kang M.K. (2025), Umbelliferone preserves skin epidermal barrier integrity in diabetes-induced keratinocytes by regulating actin dynamics and suppressing ROS-mediated apoptosis, *Nutrition & Diabetes*, 15(1), 51.
126. Duh C.Y., Phoebe C.H. Jr., Pezzuto J.M., Kinghorn A.D., Farnsworth N.R. (1986), Plant anticancer agents, XLII. Cytotoxic constituents from *Wikstroemia elliptica*, *Journal of Natural Products*, 49(4), 706-709.
127. Xie Q., Fan X., Han Y., Wu B.X., Zhu B. (2022), Daphnoretin arrests the cell cycle and induces apoptosis in human breast cancer cells, *Journal of Natural Products*, 85(10), 2332-2339.
128. Gu S., He J. (2012), Daphnoretin induces cell cycle arrest and apoptosis in human osteosarcoma (HOS) cells, *Molecules*, 17(1), 598-612.
129. Huang Y.C., Huang C.P., Lin C.P., Yang K.C., Lei Y.J., Wang H.P., Kuo Y.H., Chen Y.J. (2022), Naturally occurring bicoumarin compound daphnoretin inhibits growth and induces megakaryocytic differentiation in human chronic myeloid leukemia cells, *Cells*, 11(20), 3252.
130. Yang Z.Y., Kan J.T., Cheng Z.Y., Wang X.L., Zhu Y.Z., Guo W. (2014), Daphnoretin-induced apoptosis in HeLa cells: a possible mitochondria-dependent pathway, *Cytotechnology*, 66(1), 51-61.
131. Zhu G., Wang B., Feng G., Zhou Z., Li W., Liu W., Su H., Wang W., Wang T., Yu X.A. (2022), A nano-preparation approach to enable the delivery of daphnoretin to potentiate the therapeutical efficacy in hepatocellular cancer, *Frontiers in Pharmacology*, 13, 965131.

132. Zhou J., Wang Q. (2022), Daphnoretin relieves IL-1β-mediated chondrocytes apoptosis via repressing endoplasmic reticulum stress and NLRP3 inflammasome, *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*, 17(1), 487.
133. Chen C.A., Liu C.K., Hsu M.L., Chi C.W., Ko C.C., Chen J.S., Lai C.T., Chang H.H., Lee T.Y., Lai Y.L., Chen Y.J. (2017), Daphnoretin modulates differentiation and maturation of human dendritic cells through down-regulation of c-Jun N-terminal kinase, *International Immunopharmacology*, 51, 25-30.
134. Sun J., Xun H., Yu J., Tang F., Yue Y.D., Guo X.F. (2015), Chemical constituents and antibacterial properties of *Indocalamus latifolius* McClure leaves, the packaging material for "Zongzi", *Molecules*, 20(9), 15686-15700.
135. Anh B.T.M., Trang D.T., Lan H.T.T., Kiem P.V., Tai B.H., Dung N.V., Nam N.K.T., Cuong N.T., Nhiem N.X., Mai N.T. (2023), Constituents of *Tinospora sinensis* and their nitric oxide inhibitory activities, *Journal of Asian Natural Products Research*, 25(6), 603-609.
136. Adhikari B., Devkota H.P., Joshi K.R., Watanabe T., Yahara S. (2016), Two new diacetylene glycosides: bhutkesoside A and B from the roots of *Ligusticopsis wallichiana*, *Natural Product Research*, 30(14), 1577-1584.
137. Hu H., Xiao H., Bao H., Li M., Xue C., Li Y., Wang G., Chen S., Huang Y., Zheng L., Wang A., Li Y., Gong Z. (2020), Tissue distribution comparison of six active ingredients from an *Eucommiae cortex* extract between normal and spontaneously hypertensive rats, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2020, 2049059.
138. Shi S.Y., Peng M.J., Zhang Y.P., Peng S. (2013), Combination of preparative HPLC and HSCCC methods to separate phosphodiesterase inhibitors from *Eucommia ulmoides* bark guided by ultrafiltration-based ligand screening, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405(12), 4213-4223.
139. Çalış İ., Hanoğlu A., Aydın Z.U., Dönmez A.A., Jurt S. (2025), Phytochemical studies on the roots of *Polygala vulgaris*, *Natural Product Research*, 1-10, doi: 10.1080/14786419.2025.2596356.
140. Li B., Yang W.W., Yao B.C., Chen Q.L., Zhao L.L., Song Y.Q., Jiang N., Guo Z.G. (2025), Liriodendrin alleviates myocardial ischemia-reperfusion injury via partially attenuating apoptosis, inflammation and mitochondria damage in rats, *International Journal of Molecular Medicine*, 55(4), 65.
141. Guo C., Cui L., Zhou M., Zhuo Y., Yang L., Li J. (2025), Effect of liriodendrin on intestinal flora and ferroptosis pathway in septic rats with acute kidney injury, *Zhonghua Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue*, 37(8), 728-734.
142. Cheng F., Li D., Ma X., Wang Y., Lu L., Hu B., Cui S. (2024), Liriodendrin exerts protective effects against chronic endometritis in rats by modulating gut microbiota composition and the arginine/nitric oxide metabolic pathway, *International Immunopharmacology*, 126, 111235.

143. de las Heras B., Hortelano S. (2009), Molecular basis of the anti-inflammatory effects of terpenoids, *Inflammation & Allergy - Drug Targets*, 8(1), 28-39.
144. Iddir M., Brito A., Dingeo G., Fernandez Del Campo S.S., Samouda H., La Frano M.R., Bohn T. (2020), Strengthening the immune system and reducing inflammation and oxidative stress through diet and nutrition: Considerations during the COVID-19 crisis, *Nutrients*, 12(6), 1562.
145. Mrityunjaya M., Pavithra V., Neelam R., Janhavi P., Halami P.B., Ravindra P.V. (2020), Immune-boosting, antioxidant and anti-inflammatory food supplements targeting pathogenesis of COVID-19, *Frontiers in Immunology*, 11, 570122.
146. Ahmed O., Robinson M.W., O'Farrelly C. (2021), Inflammatory processes in the liver: divergent roles in homeostasis and pathology, *Cellular & Molecular Immunology*, 18(6), 1375-1386.
147. Childs C.E., Calder P.C., Miles E.A. (2019), Diet and immune function, *Nutrients*, 11(8), 1933.
148. Zhang S., Hu D., Zhuo Y., Cui L., Li D., Zhang L., Yang L., Wang X. (2023), Protective effect of liriodendrin on IgG immune complex-induced acute lung injury via inhibiting SRC/STAT3/MAPK signaling pathway: a network pharmacology research, *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 396(11), 3269-3283.
149. Sojka D.K., Fowell D.J. (2011), Regulatory T cells inhibit acute IFN-γ synthesis without blocking T-helper cell type 1 (Th1) differentiation via a compartmentalized requirement for IL-10, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 108(45), 18336-18341.

PHỤ LỤC

PHỤ LỤC I: KẾT QUẢ GIÁM ĐỊNH TÊN KHOA HỌC i
PHỤ LỤC 2.1. DỮ LIỆU PHỔ CỦA HỢP CHẤT WI1 iv
PHỤ LỤC 2.2. DỮ LIỆU PHỔ CỦA HỢP CHẤT WI2 vii
PHỤ LỤC 2.3. DỮ LIỆU PHỔ CỦA HỢP CHẤT WI3 x
PHỤ LỤC 2.4. DỮ LIỆU PHỔ CỦA HỢP CHẤT WI4 xiii
PHỤ LỤC 2.5. DỮ LIỆU PHỔ CỦA HỢP CHẤT WI5 xvi
PHỤ LỤC 2.6. DỮ LIỆU PHỔ CỦA HỢP CHẤT WI6 xix
PHỤ LỤC 2.7. DỮ LIỆU PHỔ CỦA HỢP CHẤT WI7 xxii
PHỤ LỤC 2.8. DỮ LIỆU PHỔ CỦA HỢP CHẤT WI8 xxvi
PHỤ LỤC 2.9. DỮ LIỆU PHỔ CỦA HỢP CHẤT WI9 xxx
PHỤ LỤC 2.10. DỮ LIỆU PHỔ CỦA HỢP CHẤT WI10 xxxiii
PHỤ LỤC 2.11. DỮ LIỆU PHỔ CỦA HỢP CHẤT WI11 xxxvi
PHỤ LỤC 2.12. DỮ LIỆU PHỔ CỦA HỢP CHẤT WI12 xl
PHỤ LỤC 2.13. DỮ LIỆU PHỔ CỦA HỢP CHẤT WI13 xliii
PHỤ LỤC 2.14. DỮ LIỆU PHỔ CỦA HỢP CHẤT WI14 xlvii
PHỤ LỤC 2.15. DỮ LIỆU PHỔ CỦA HỢP CHẤT WI15 lii
PHỤ LỤC 2.16. DỮ LIỆU PHỔ CỦA HỢP CHẤT WI16 lviii
PHỤ LỤC 2.17. DỮ LIỆU PHỔ CỦA HỢP CHẤT WI17 lxii
PHỤ LỤC 2.18. DỮ LIỆU PHỔ CỦA HỢP CHẤT WI18 lxv
PHỤ LỤC 2.19. DỮ LIỆU PHỔ CỦA HỢP CHẤT WI19 lxviii
PHỤ LỤC III: DỮ LIỆU ĐÁNH GIÁ TÁC DỤNG DƯỢC LÝ lxxii
PHỤ LỤC 3.1. ẢNH HƯỞNG CỦA CAO CHIẾT VÀ CHẤT TINH KHIẾT LÊN KHẢ NĂNG SỐNG SÓT CỦA TẾ BÀO RAW 264.7, TẾ BÀO T CD4+ . lxxii
PHỤ LỤC 3.2. HOẠT TÍNH ỨC CHẾ IL-1β VÀ KÍCH THÍCH IL-10 CỦA CAO CHIẾT TRÊN TẾ BÀO RAW 264.7 lxxiii
PHỤ LỤC 3.3. HOẠT TÍNH ỨC CHẾ IL-1β VÀ KÍCH THÍCH IL-10 CỦA CÁC HỢP CHẤT TRÊN TẾ BÀO RAW 264.7 Ở NỒNG ĐỘ 10 µM lxxv
PHỤ LỤC 3.4. HOẠT TÍNH ỨC CHẾ IL-1β VÀ KÍCH THÍCH IL-10 CỦA CHẤT TIỀM NĂNG TRÊN TẾ BÀO RAW 264.7 Ở NỒNG ĐỘ 1, 3, 10 VÀ 30 µM ..lxxvi
PHỤ LỤC 3.5. HOẠT TÍNH ỨC CHẾ FOXP3, INF-γ VÀ IL-17 CỦA CHẤT TIỀM NĂNG TRÊN TẾ BÀO TCD4+ Ở CÁC NỒNG ĐỘ 1, 3, 10 VÀ 30 µM lxxviii
PHỤ LỤC 3.6. ĐƯỜNG CHUẨN CỦA CÁC CYTOKIN ĐO BẰNG PHƯƠNG PHÁP ELISA lxxxi

PHỤ LỤC I: KẾT QUẢ GIÁM ĐỊNH TÊN KHOA HỌC

BỘ Y TẾ
VIỆN DƯỢC LIỆU

CỘNG HOÀ XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập - Tự do - Hạnh phúc

PHIẾU KẾT QUẢ GIÁM ĐỊNH MẪU

(Kết quả giám định chỉ có giá trị với mẫu gửi phân tích)

Số: 05.D.V23

Mẫu giám định: **Niệt dó** (tên gọi do người gửi mẫu cung cấp)

Số lượng mẫu: 01 mẫu (Ký hiệu mẫu: DV- 080922)

Ngày lấy mẫu: 08/09/2022.

Nơi lấy mẫu: Xã Minh Đức, huyện Việt Yên, tỉnh Bắc Giang.

Người yêu cầu: Nguyễn Văn Liệu.

Đơn vị: Viện Đào tạo Dược – Học viện Quân y.

Địa chỉ: Số 160 đường Phùng Hưng, phường Phúc La, quận Hà Đông, thành phố Hà Nội.

Nội dung yêu cầu: Xác định tên khoa học.

Phương pháp giám định: So sánh hình thái, đối chiếu khóa phân loại.

Cán bộ giám định: ThS. Nguyễn Quỳnh Nga, ThS. Phan Văn Trưởng.

Kết quả:

Yêu cầu	Kết quả
Tên khoa học:	***Wikstroemia indica* (L.) C.A.Mey.**
Tên Việt Nam:	Niệt dó ấn độ, Dó miết ấn, Dó chuột, Dó cánh, Gió móc, Héo, Cam toại nam, Liễu kha vương
Họ thực vật:	Họ Trầm – Thymelaeaceae

(Chi tiết theo Phụ lục 1, 2 đính kèm)

Hà Nội, ngày 16 tháng 01 năm 2023

TT. TÀI NGUYÊN DƯỢC LIỆU
Giám đốc

Phạm Thanh Huyền

KT.VIỆN TRƯỞNG
PHÓ VIỆN TRƯỞNG

VIỆN DƯỢC LIỆU

Phan Thúy Hiền

Phụ lục 1. Kết quả giám định

Mẫu giám định: **Niệt dó** (tên gọi do người gửi mẫu cung cấp).

Số lượng mẫu: 01 mẫu có ký hiệu DV- 080922 (mẫu được lưu trong vòng 6 tháng tại Trung tâm Tài nguyên dược liệu kể từ ngày trả kết quả giám định).

Nội dung yêu cầu: Xác định tên khoa học.

Phương pháp giám định: So sánh hình thái, đối chiếu khóa phân loại và bản mô tả trong các tài liệu chuyên ngành.

Cán bộ giám định: ThS. Nguyễn Quỳnh Nga; ThS. Phan Văn Trưởng.

Kết quả:

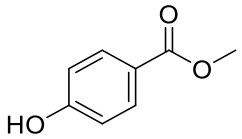
Sau khi phân tích 01 mẫu có ký hiệu DV- 080922 kể trên, tham khảo các tài liệu hiện có kết hợp đối chiếu với các tiêu bản của loài này tại phòng tiêu bản Kew (K000272186) chúng tôi đã xác định được tên khoa học của mẫu, cụ thể như sau:

Yêu cầu	Kết quả
Tên khoa học:	***Wikstroemia indica* (L.) C.A.Mey.**
Synonym:	*Daphne indica* L.
Tên Việt Nam:	Niệt dó ấn độ, Dó miết ấn, Dó chuột, Dó cánh, Gió móc, Héo, Cam toại nam, Liễu kha vương
Họ thực vật:	Họ Trầm – Thymelaeaceae
Tài liệu tham khảo: 1. Phạm Hoàng Hộ (2003). *Cây cỏ Việt Nam*: quyển 2, tr. 37. Nhà xuất bản trẻ, TP HCM. 2. Yinzheng Wang, Michael G. Gilbert, et al (2007). *Convolvulaceae*. In: Wu Zhengyi & Peter H. Raven (eds), *Flora of China:* Vol. 13 (Thymelaeaceae), pp. 213-250. Science Press, Beijing, and Missouri Botanical Garden Press, St. Louis.	

Phụ lục 2. Ảnh mẫu giám định



PHỤ LỤC 2.1. DỮ LIỆU PHỔ CỦA HỢP CHẤT WI1



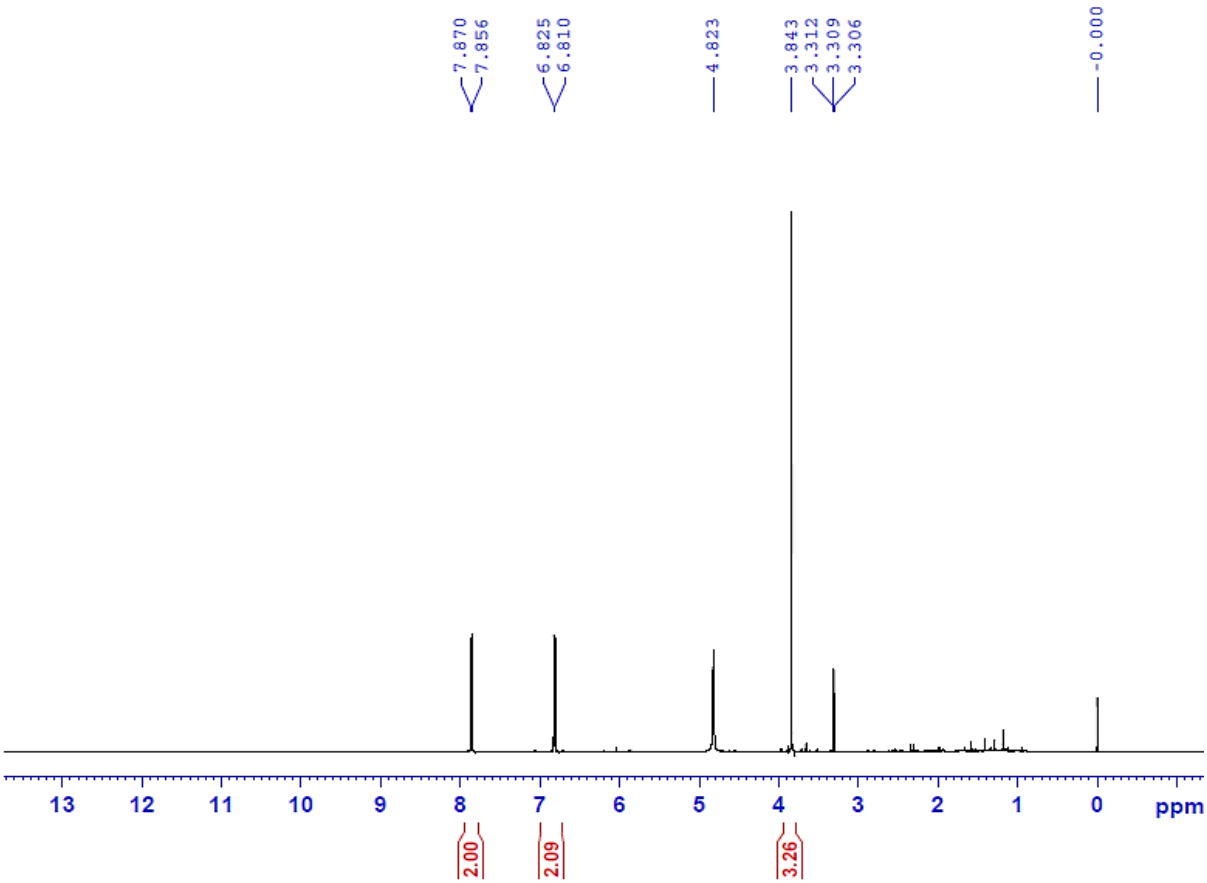
CTHH: $C_8H_8O_3$
M = 152,05

Cấu trúc hóa học của hợp chất **WI1**

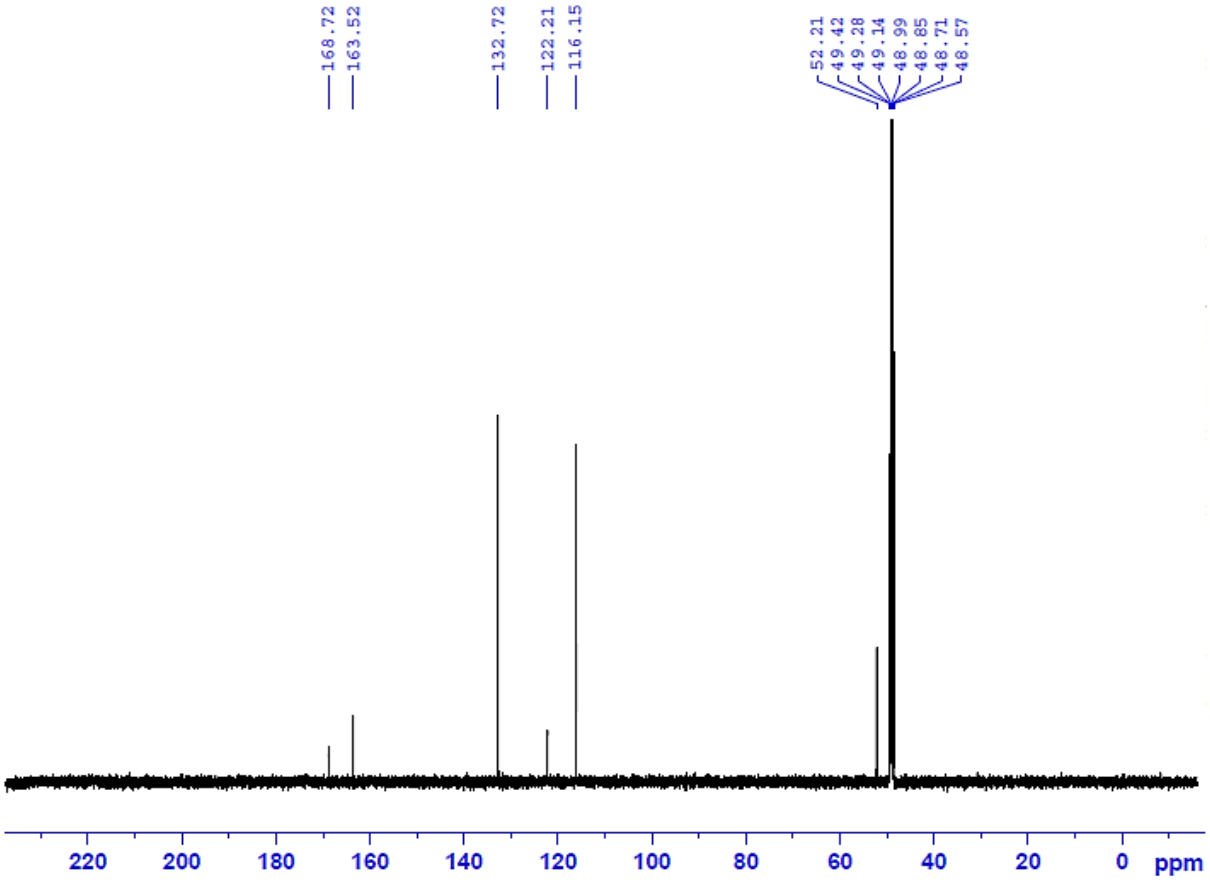
Phụ lục 2.1.1. Phổ ^{1}H-NMR (600 MHz, CD_3OD) của hợp chất **WI1**

Phụ lục 2.1.2. Phổ ^{13}C-NMR (150 MHz, CD_3OD) của hợp chất **WI1**

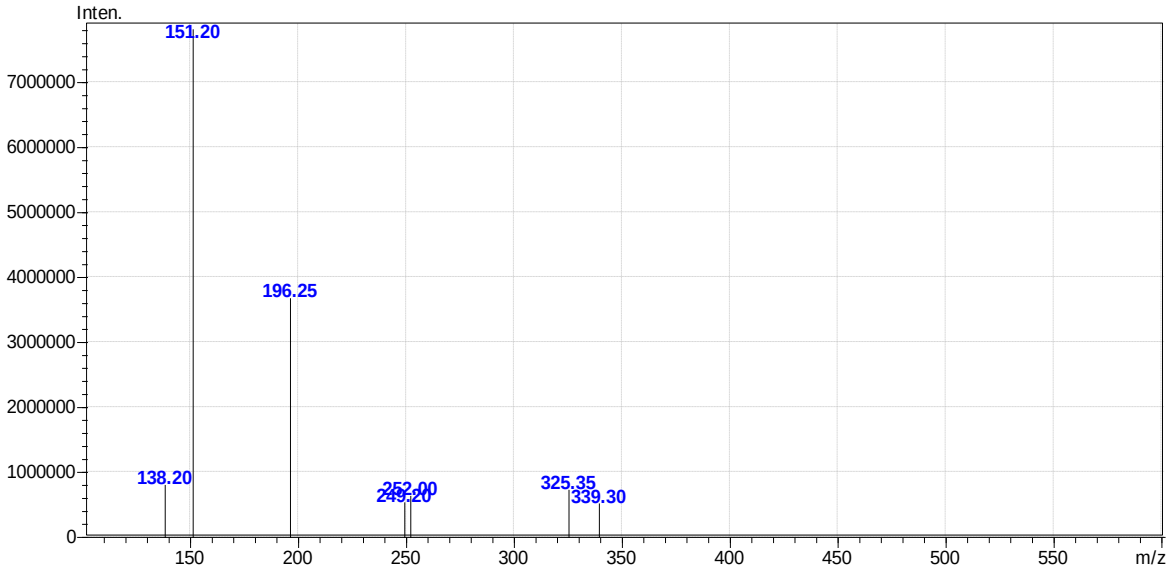
Phụ lục 2.1.3. Phổ ESI-MS của hợp chất **WI1**



Phụ lục 2.1.1. Phổ ^{1}H-NMR (600 MHz, CD_3OD) của hợp chất **WI1**

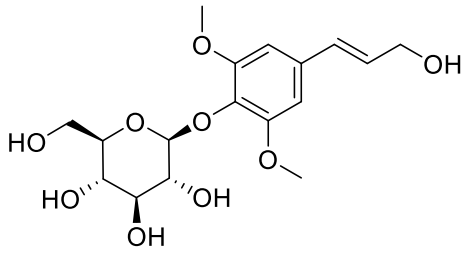


Phụ lục 2.1.2. Phổ ^{13}C-NMR (150 MHz, CD_3OD) của hợp chất **WI1**



Phụ lục 2.1.3. Phổ ESI-MS của hợp chất **WI1**

PHỤ LỤC 2.2. DỮ LIỆU PHỔ CỦA HỢP CHẤT WI2



CTHH: $C_{17}H_{24}O_9$
M = 372,14

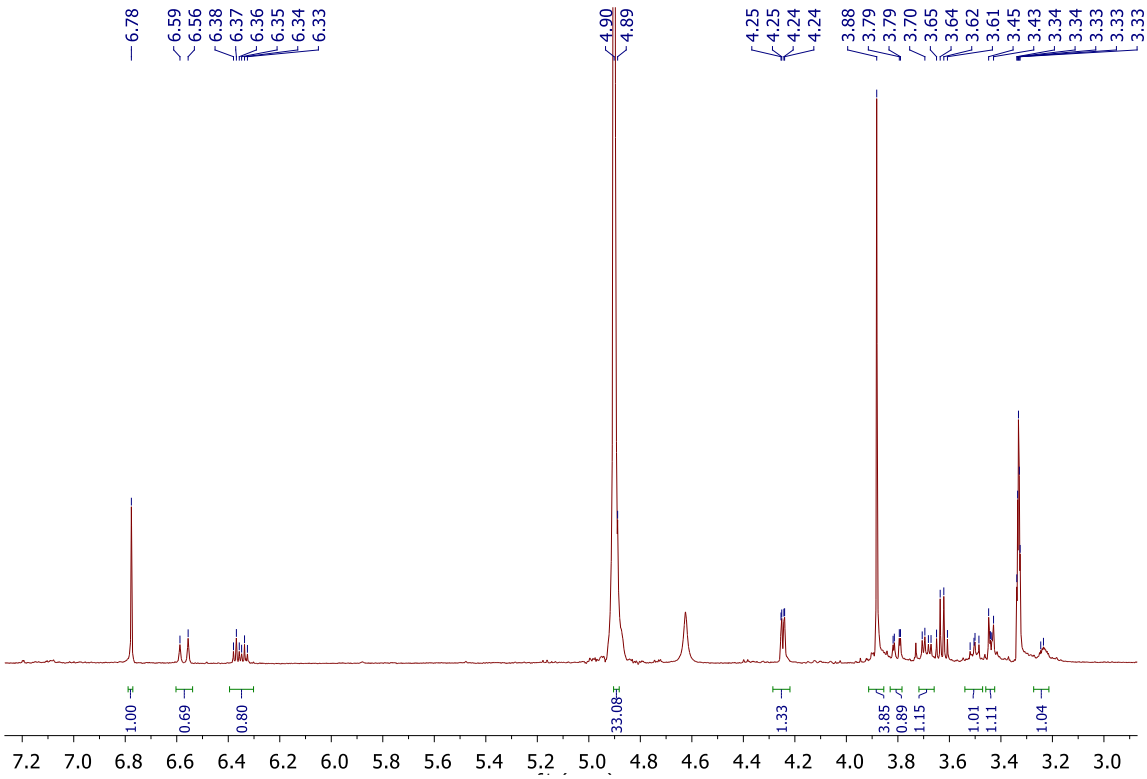
Cấu trúc hóa học của hợp chất **WI2**

Phụ lục 2.2.1. Phổ ^{1}H-NMR (500 MHz, CD_3OD) của hợp chất **WI2**

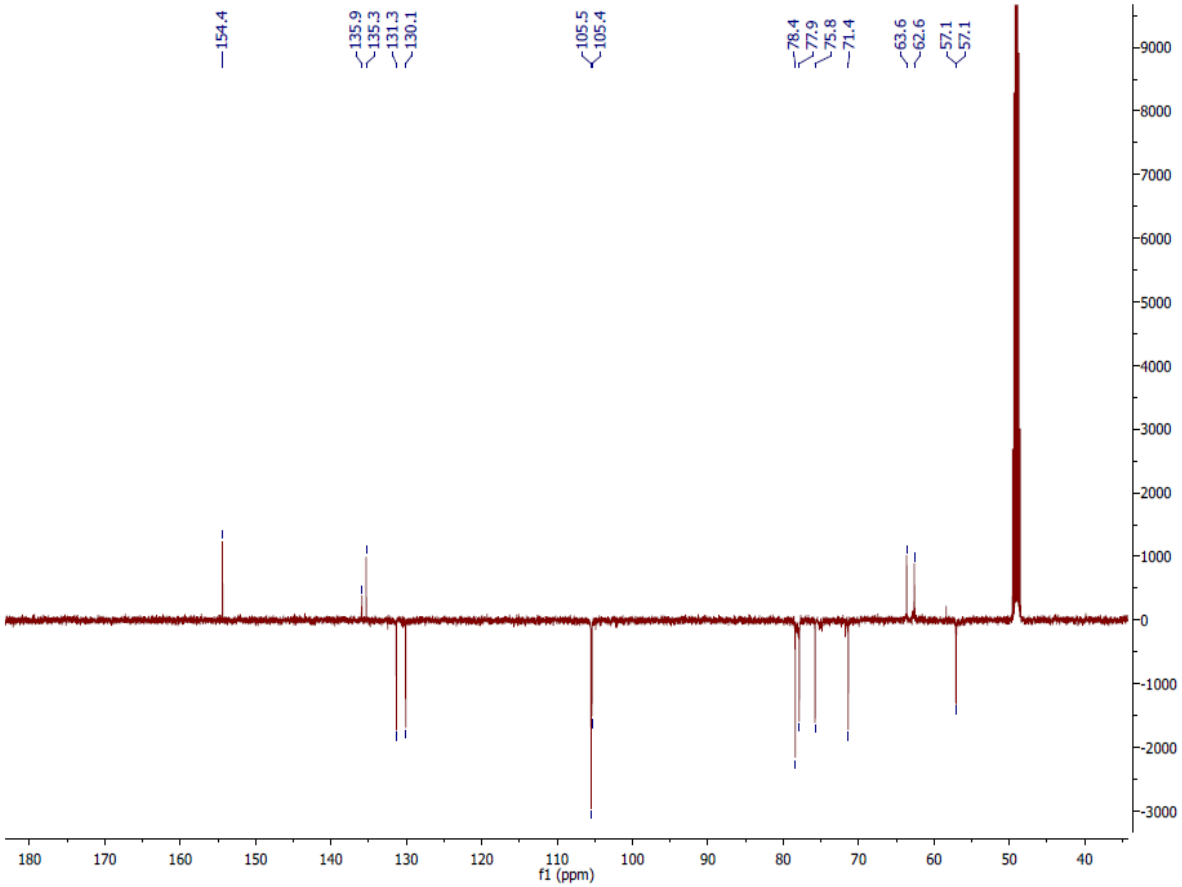
Phụ lục 2.2.2. Phổ ^{13}C-APT NMR (125 MHz, CD_3OD) của hợp chất **WI2**

Phụ lục 2.2.3. Phổ HSQC (500/125 MHz, CD_3OD) của hợp chất **WI2**

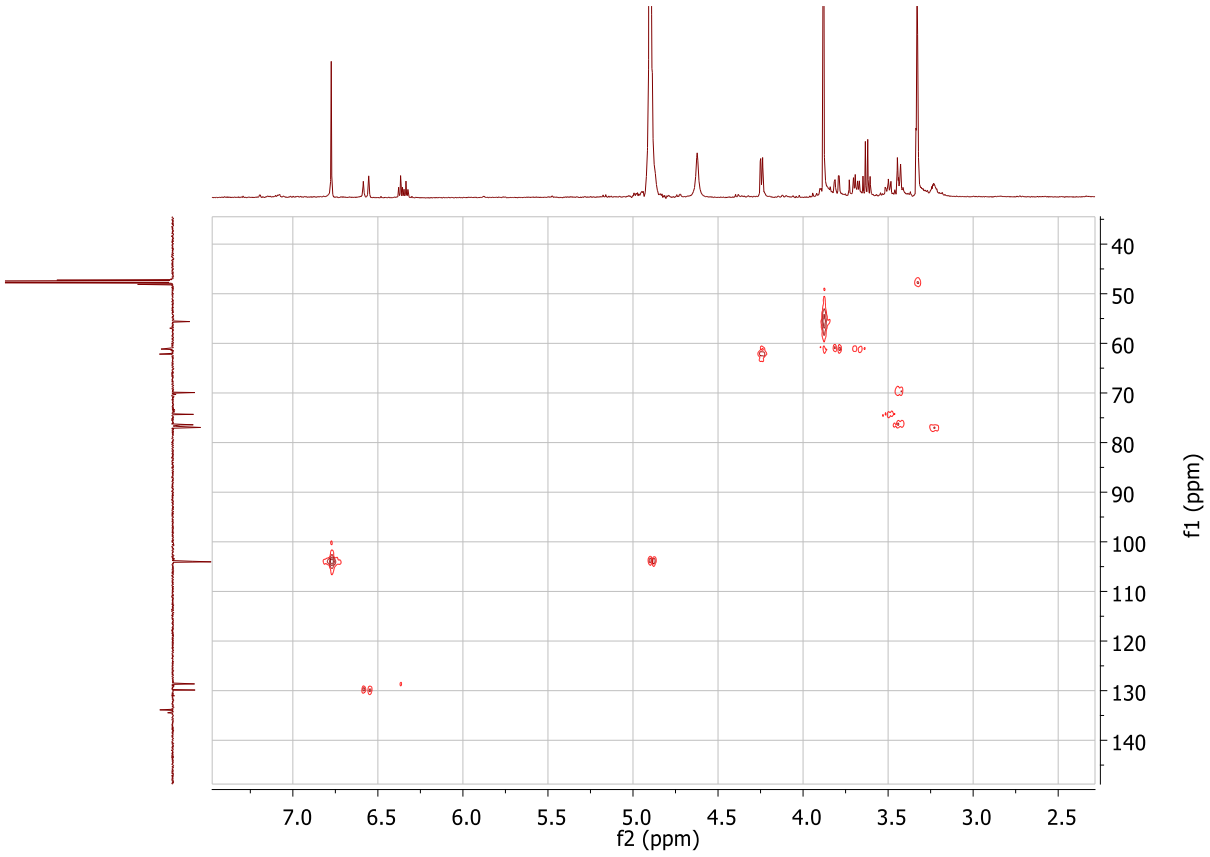
Phụ lục 2.2.4. Phổ HMBC (500/125 MHz, CD_3OD) của hợp chất **WI2**



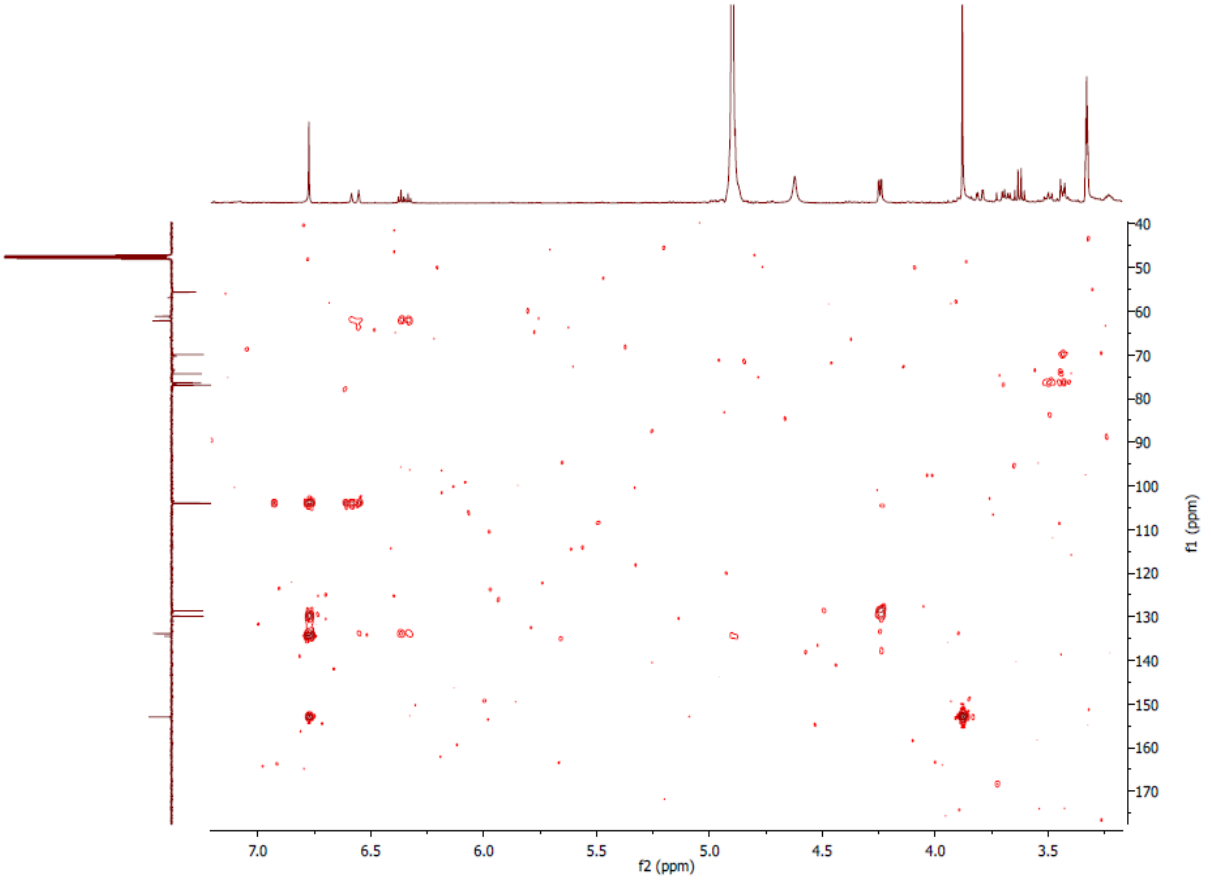
Phụ lục 2.2.1. Phổ ^{1}H-NMR (500 MHz, CD_3OD) của hợp chất **WI2**



Phụ lục 2.2.2. Phổ ^{13}C-APT NMR (125 MHz, CD_3OD) của hợp chất **WI2**

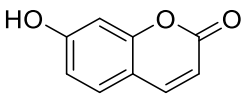


Phụ lục 2.2.3. Phổ HSQC (500/125 MHz, CD_3OD) của hợp chất **WI2**



Phụ lục 2.2.4. Phổ HMBC (500/125 MHz, CD_3OD) của hợp chất **WI2**

PHỤ LỤC 2.3. DỮ LIỆU PHỔ CỦA HỢP CHẤT WI3



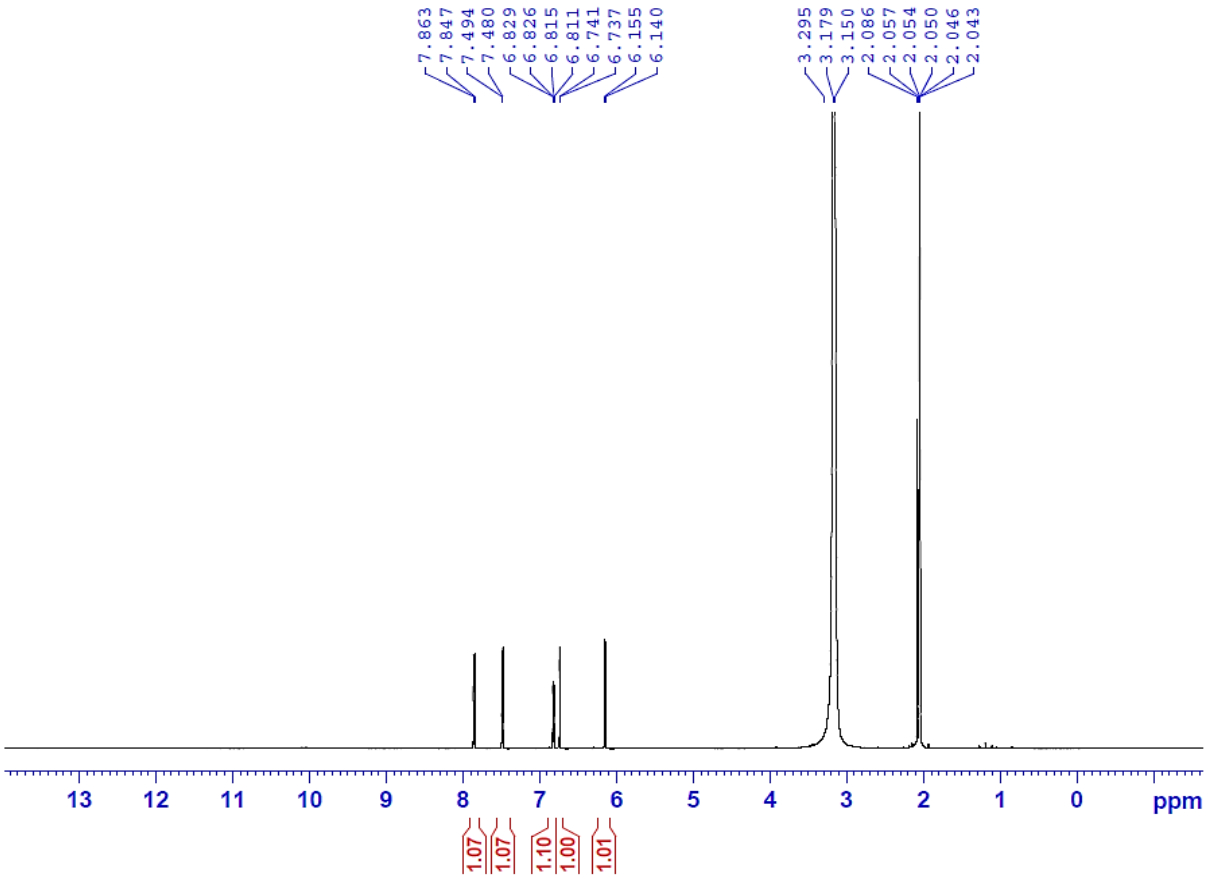
CTPT: $C_9H_6O_3$
M = 162,03

Cấu trúc hóa học của hợp chất **WI3**

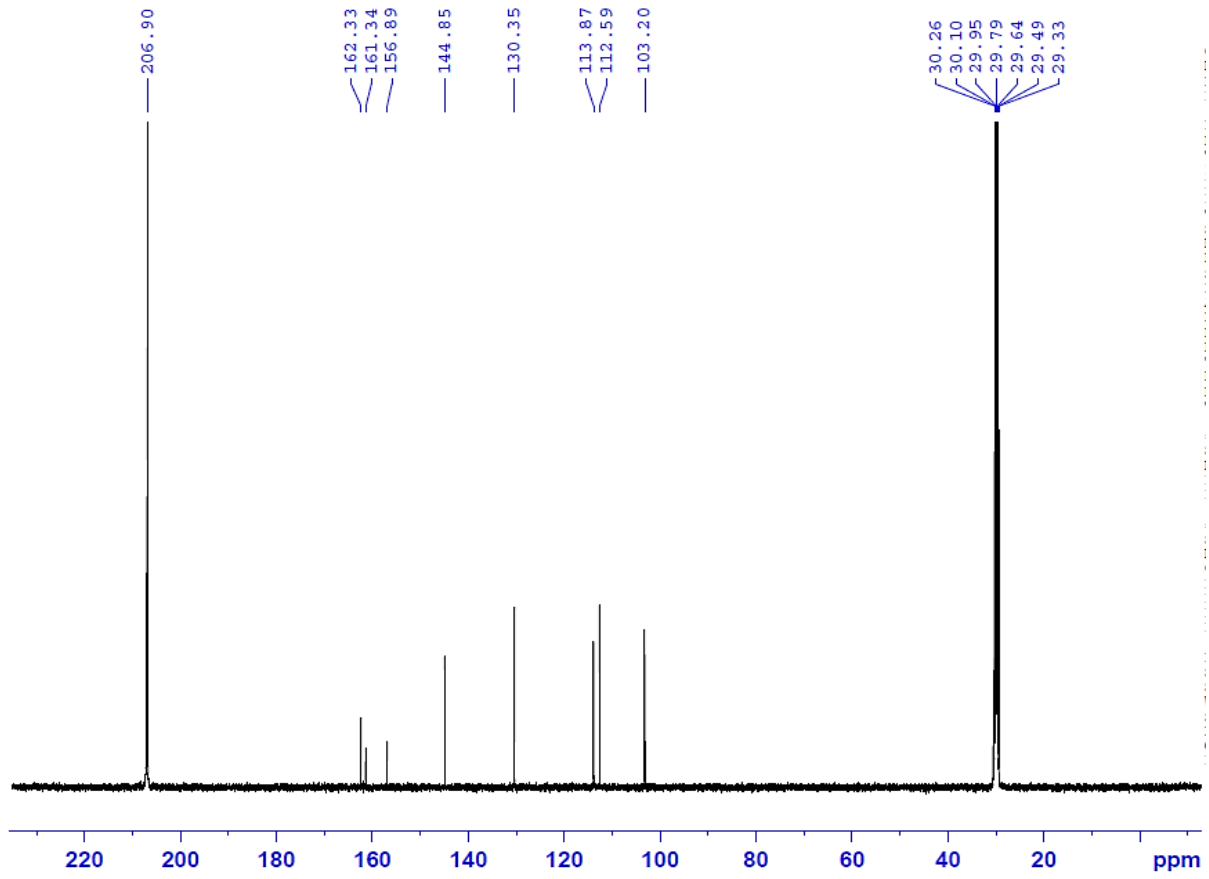
Phụ lục 2.3.1. Phổ ^{1}H-NMR (600 MHz, aceton-d_6) của hợp chất **WI3**

Phụ lục 2.3.2. Phổ ^{13}C-NMR (150 MHz, aceton-d_6) của hợp chất **WI3**

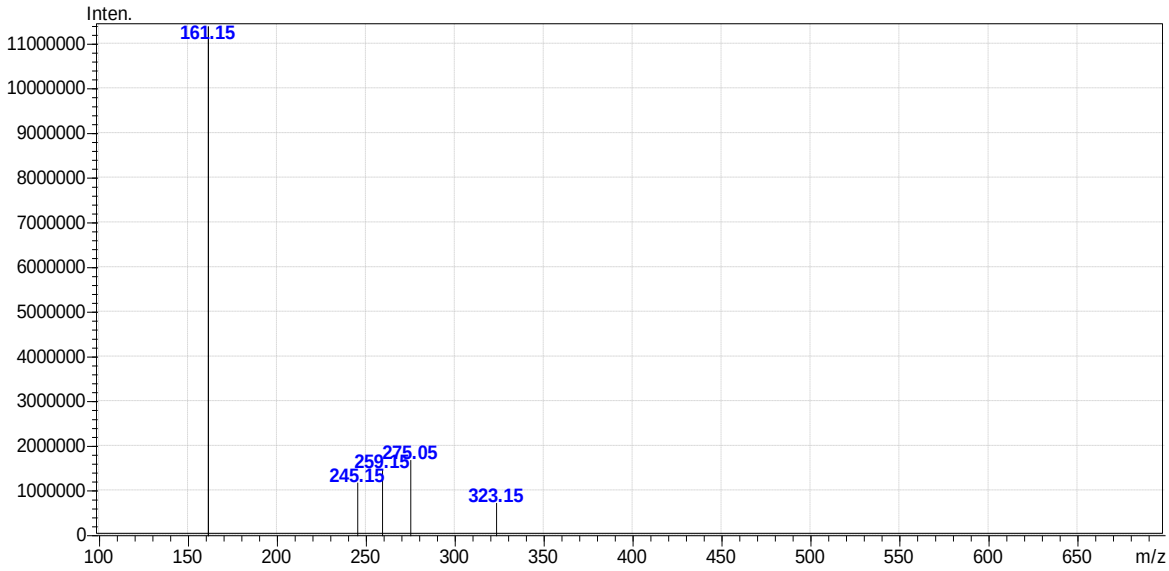
Phụ lục 2.3.3. Phổ ESI-MS của hợp chất **WI3**



Phụ lục 2.3.1. Phổ ^{1}HNM (600 MHz, aceton-d_6) của hợp chất **WI3**

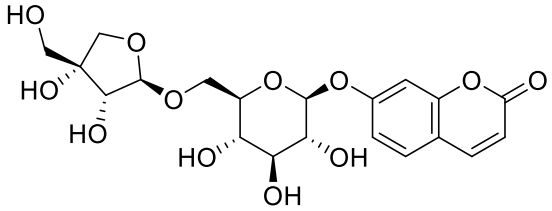


Phụ lục 2.3.2. Phổ ^{13}C-NMR (150 MHz, aceton-d_6) của hợp chất **WI3**



Phụ lục 2.3.3. Phổ ESI-MS của hợp chất **WI3**

PHỤ LỤC 2.4. DỮ LIỆU PHỔ CỦA HỢP CHẤT WI4



CTPT: $C_{20}H_{24}O_{12}$
M = 456,13

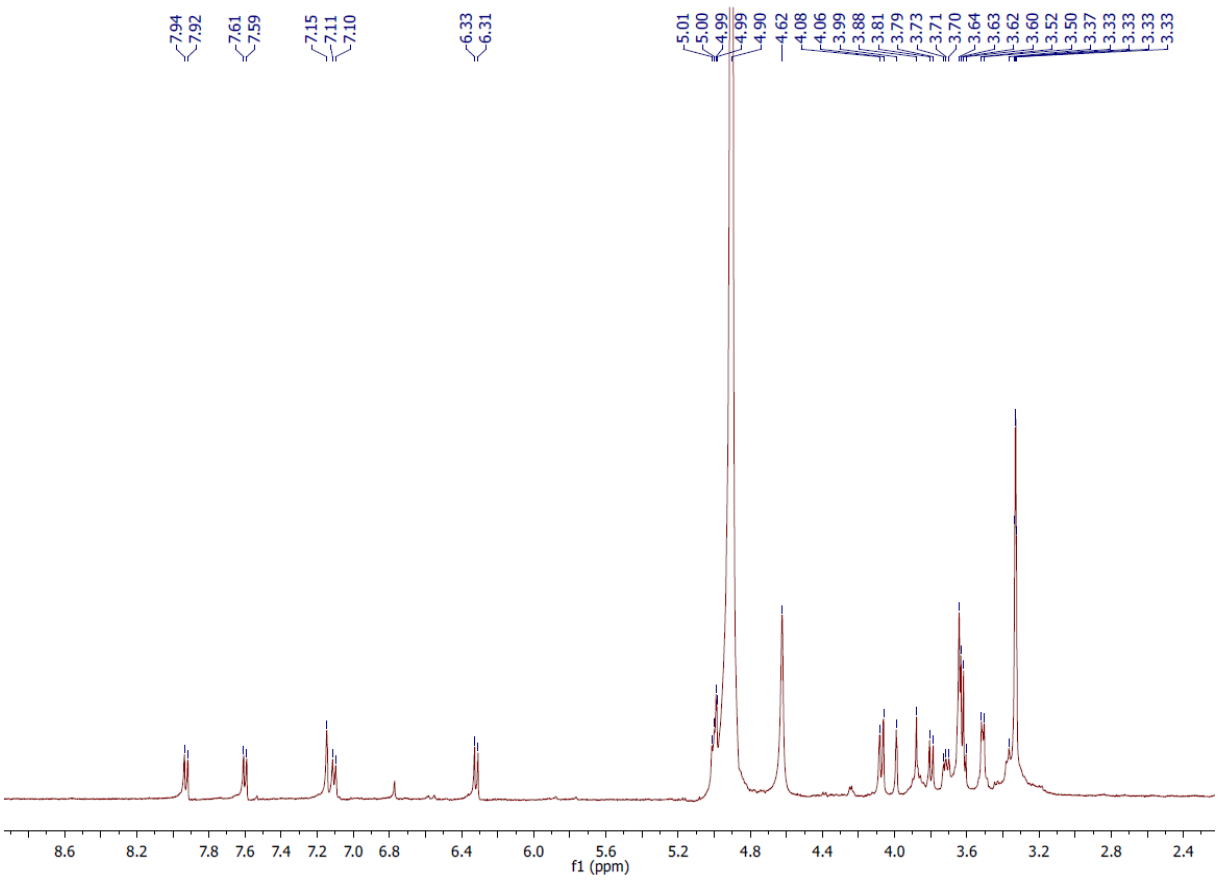
Cấu trúc hóa học của hợp chất **WI4**

Phụ lục 2.4.1. Phổ ^{1}H-NMR (500 MHz, CD_3OD) của hợp chất **WI4**

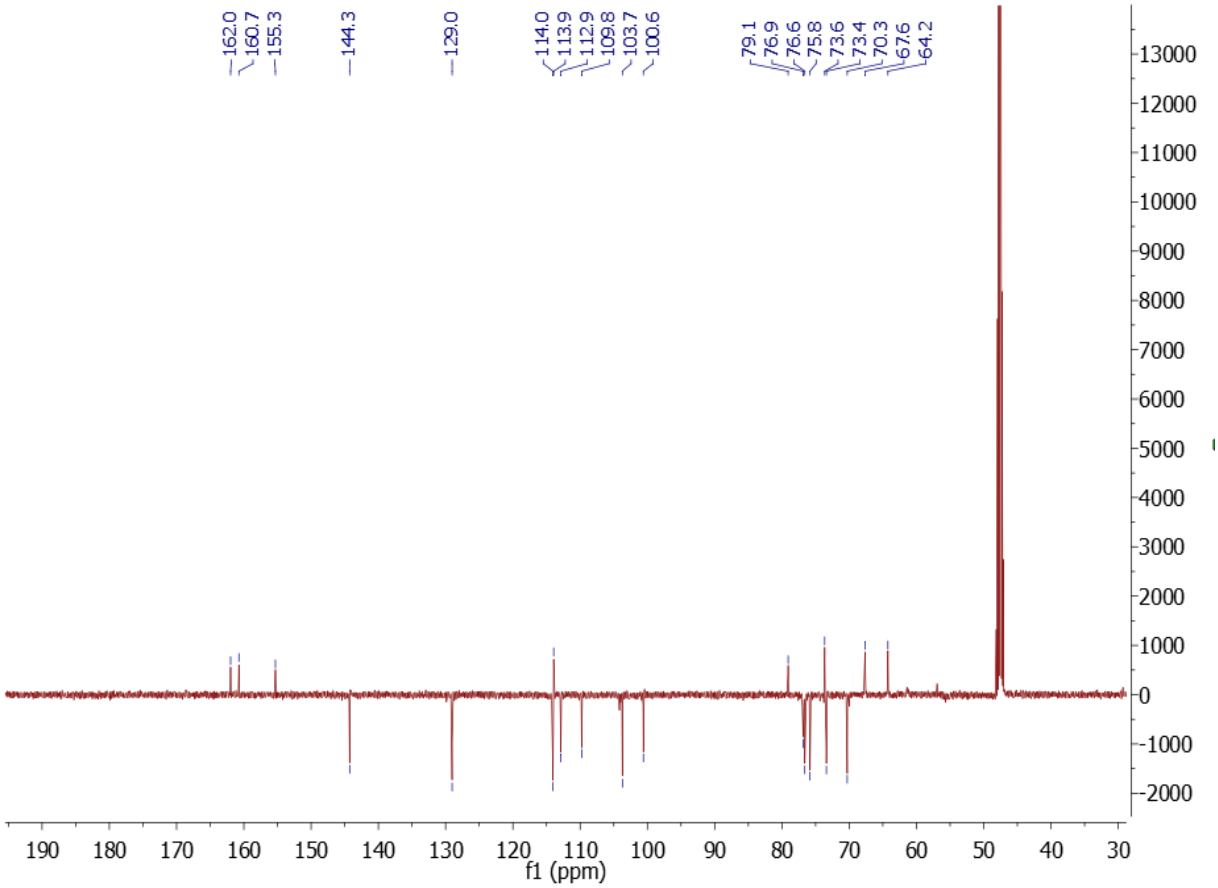
Phụ lục 2.4.2. Phổ ^{13}C-APT NMR (125 MHz, CD_3OD) của hợp chất **WI4**

Phụ lục 2.4.3. Phổ HMQC (500/125 MHz, CD_3OD) của hợp chất **WI4**

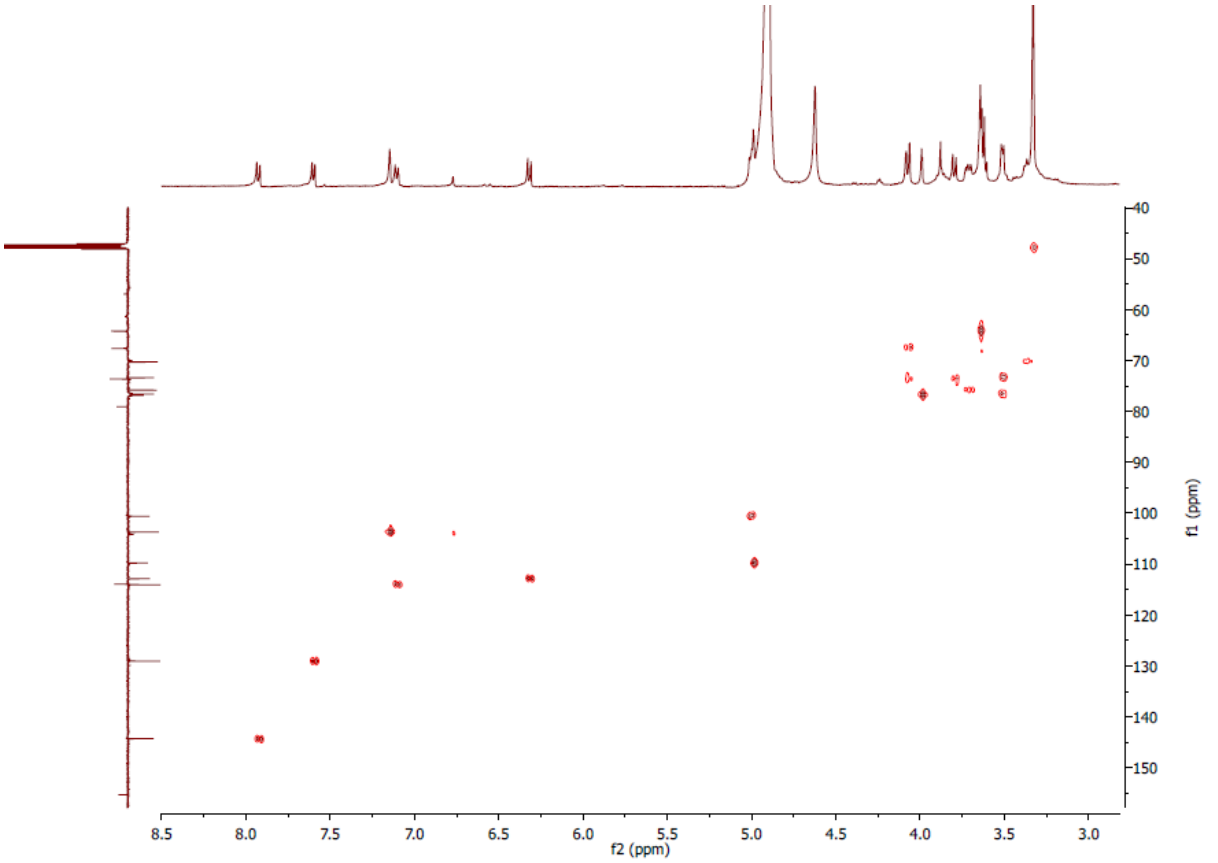
Phụ lục 2.4.4. Phổ HMBC (500/125 MHz, CD_3OD) của hợp chất **WI4**



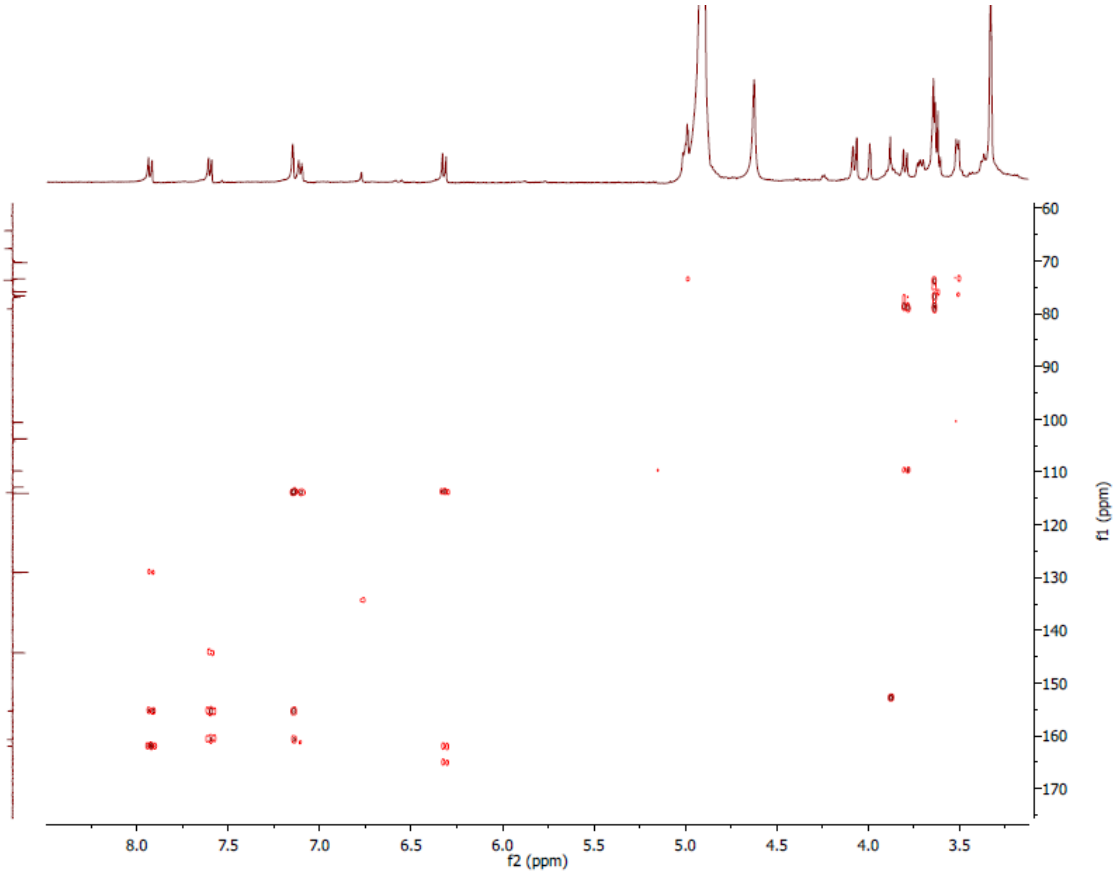
Phụ lục 2.4.1. Phổ ^{1}H-NMR (500 MHz, CD_3OD) của hợp chất **WI4**



Phụ lục 2.4.2. Phổ ^{13}C-APT NMR (125 MHz, CD_3OD) của hợp chất **WI4**

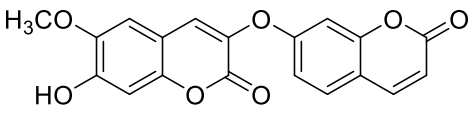


Phụ lục 2.4.3. Phổ HMQC (500/125 MHz, CD_3OD) của hợp chất **WI4**



Phụ lục 2.4.3. Phổ HMBC (500/125 MHz, CD_3OD) của hợp chất **WI4**

PHỤ LỤC 2.5. DỮ LIỆU PHỔ CỦA HỢP CHẤT WI5



CTPT: $C_{19}H_{12}O_7$
M = 352,06

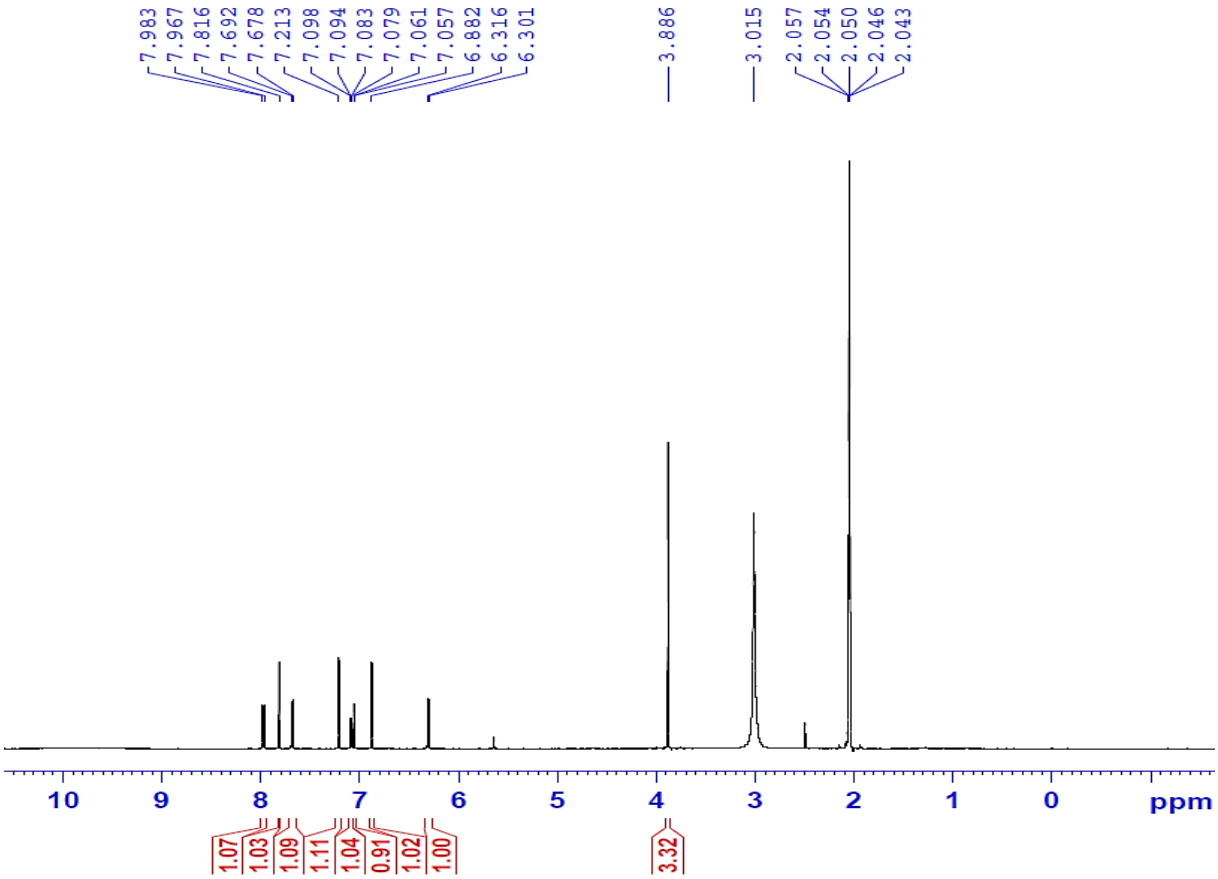
Cấu trúc hóa học của hợp chất **WI5**

Phụ lục 2.5.1. Phổ ^{1}H-NMR (600 MHz, aceton-d_6) của hợp chất **WI5**

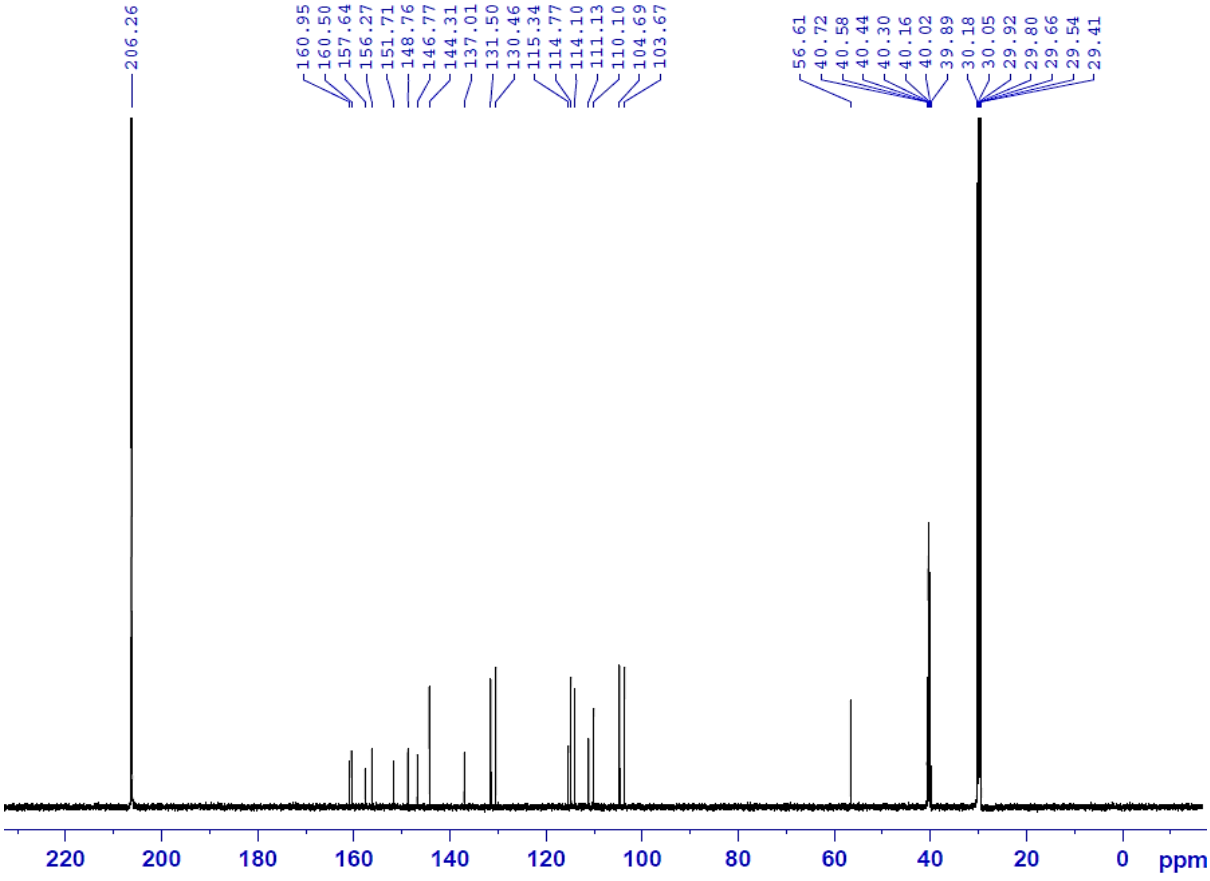
Phụ lục 2.5.2. Phổ ^{13}C-NMR (150 MHz, aceton-d_6) của hợp chất **WI5**

Phụ lục 2.5.3. Phổ HMBC (600/150 MHz, aceton-d_6) của hợp chất **WI5**

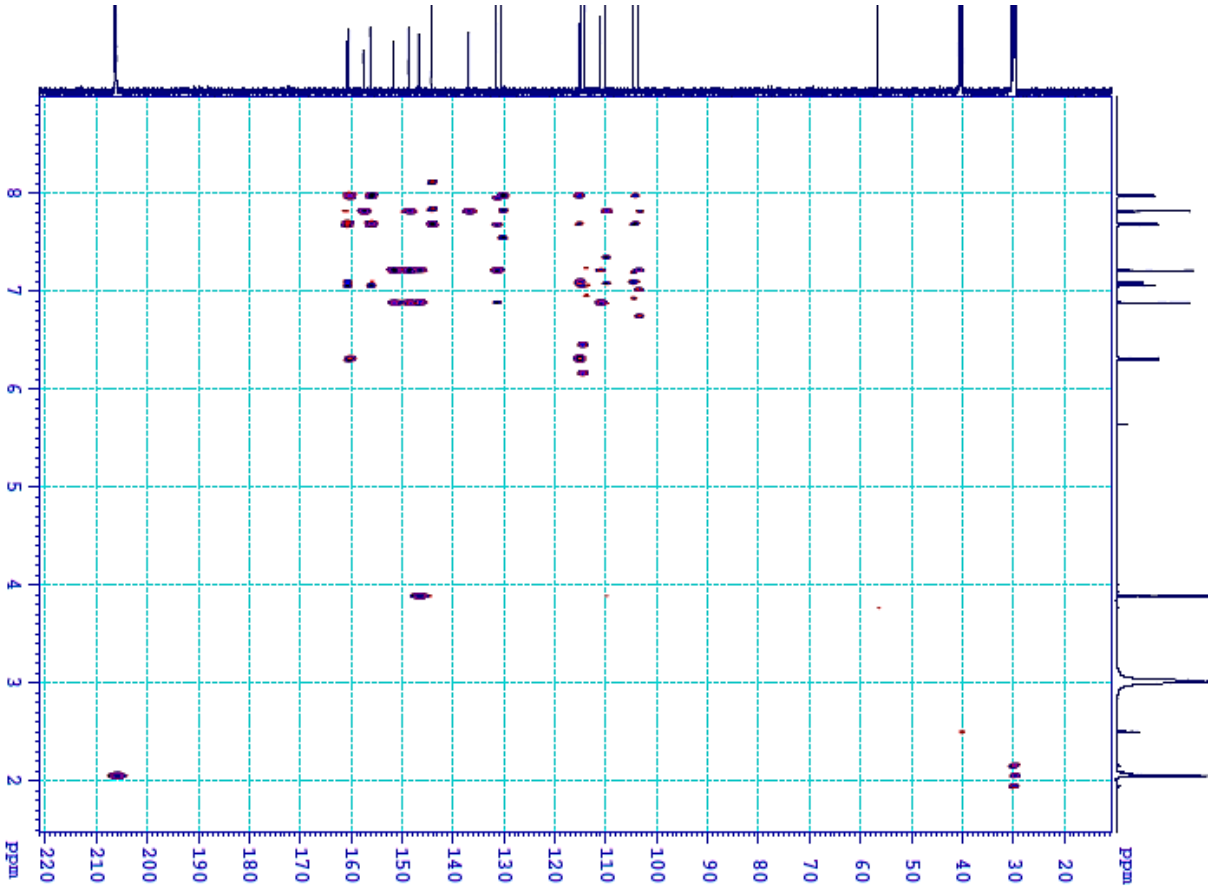
Phụ lục 2.5.4. Phổ ESI-MS của hợp chất **WI5**



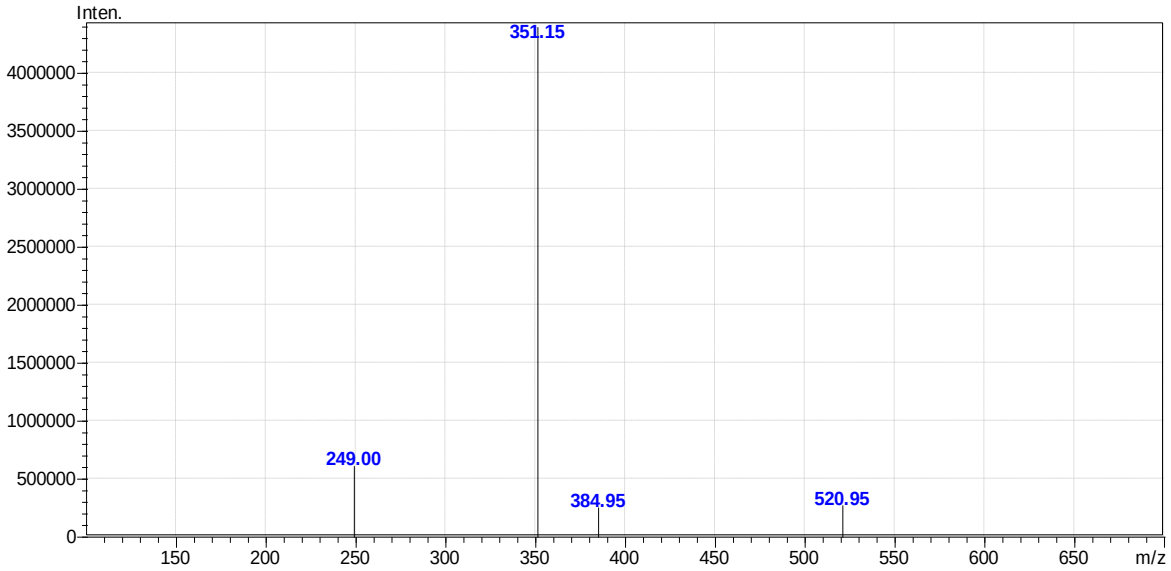
Phụ lục 2.5.1. Phổ ^{1}H-NMR (600 MHz, aceton-d_6) của hợp chất **WI5**



Phụ lục 2.5.2. Phổ ^{13}C-NMR (150 MHz, aceton-d_6) của hợp chất **WI5**

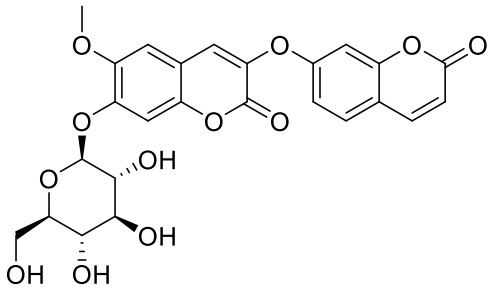


Phụ lục 2.5.3. Phổ HMBC (600/150 MHz, aceton-d_6) của hợp chất **WI5**



Phụ lục 2.5.4. Phổ ESI-MS của hợp chất **WI5**

PHỤ LỤC 2.6. DỮ LIỆU PHỔ CỦA HỢP CHẤT WI6



CTPT: $C_{25}H_{22}O_{12}$
M = 514,11

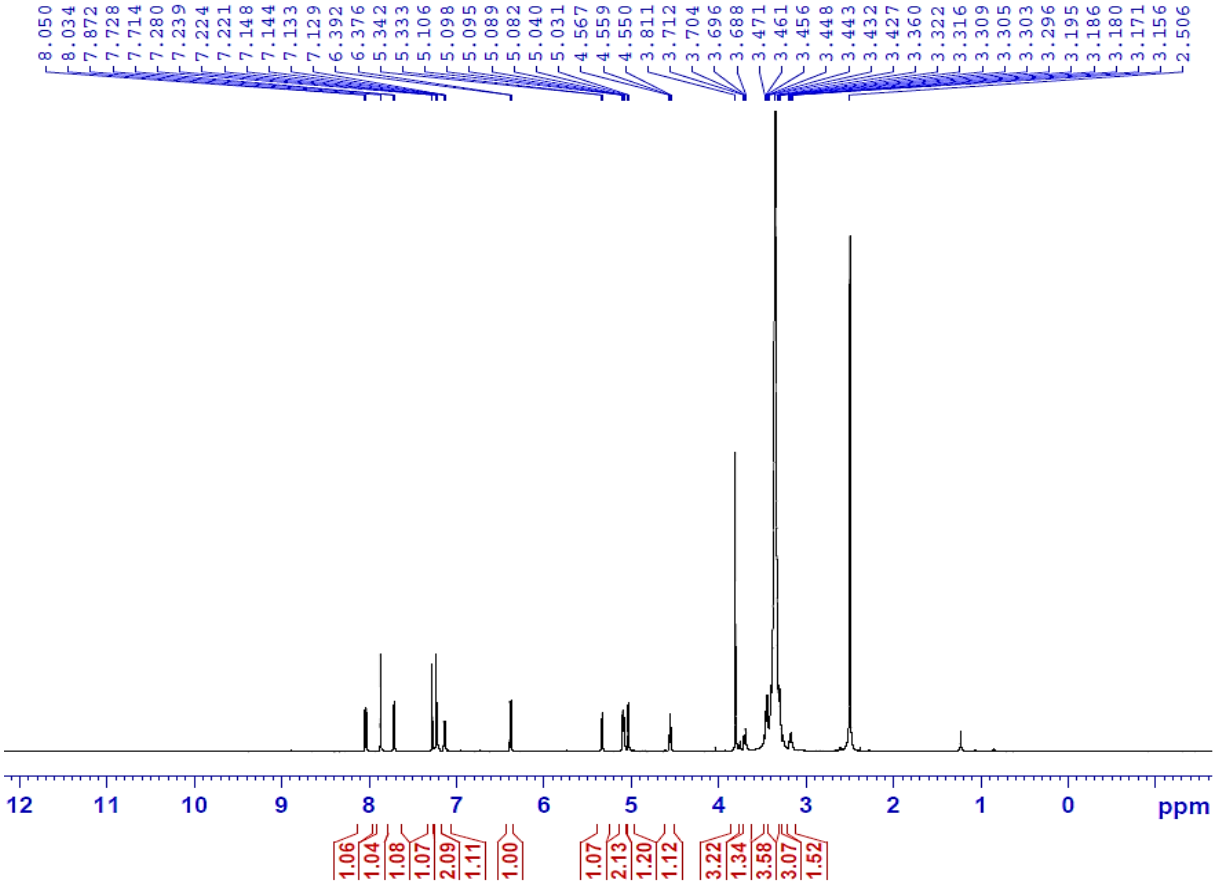
Cấu trúc hóa học của hợp chất **WI6**

Phụ lục 2.6.1. Phổ ^{1}H-NMR (600 MHz, DMSO-d_6) của hợp chất **WI6**

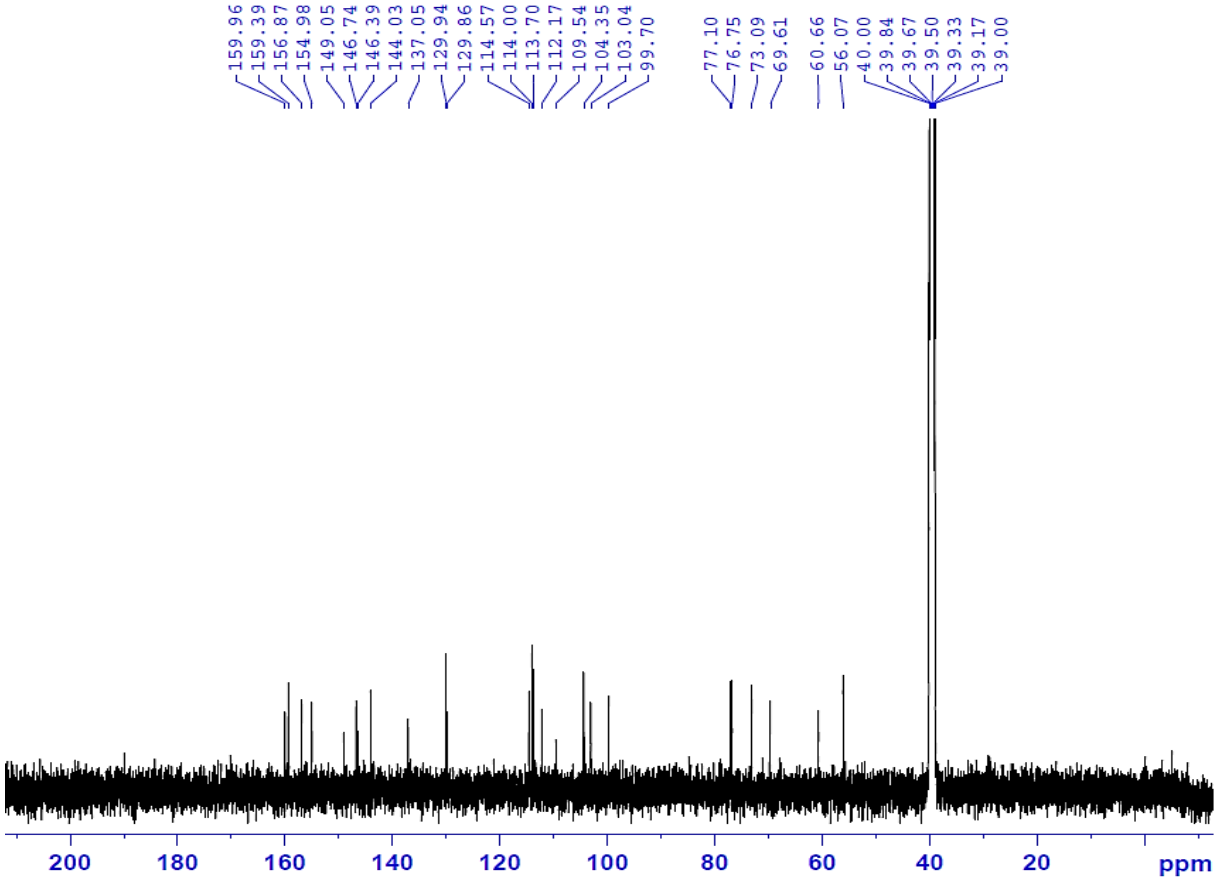
Phụ lục 2.6.2. Phổ ^{13}C-NMR (150 MHz, DMSO-d_6) của hợp chất **WI6**

Phụ lục 2.6.3. Phổ HSQC (600/150 MHz, DMSO-d_6) của hợp chất **WI6**

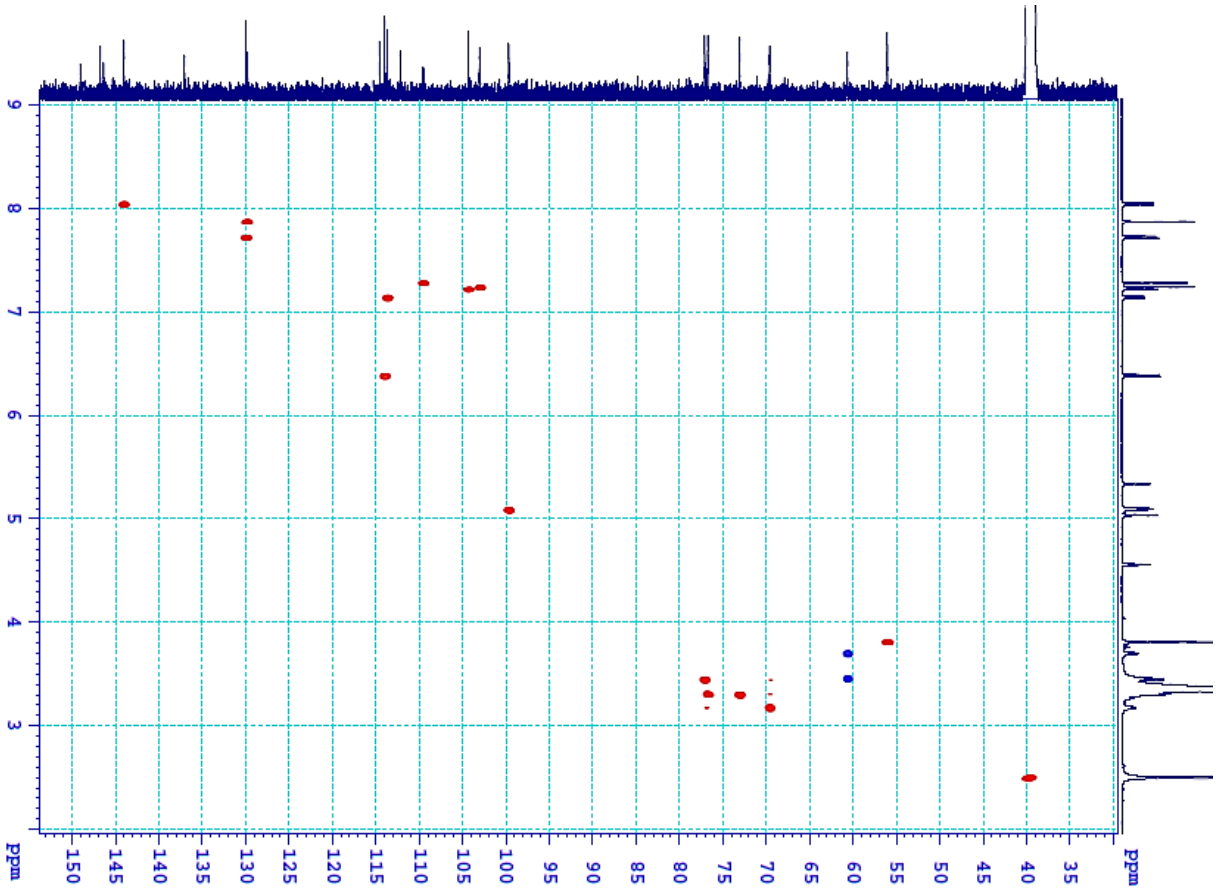
Phụ lục 2.6.4. Phổ HMBC (600/150 MHz, DMSO-d_6) của hợp chất **WI6**



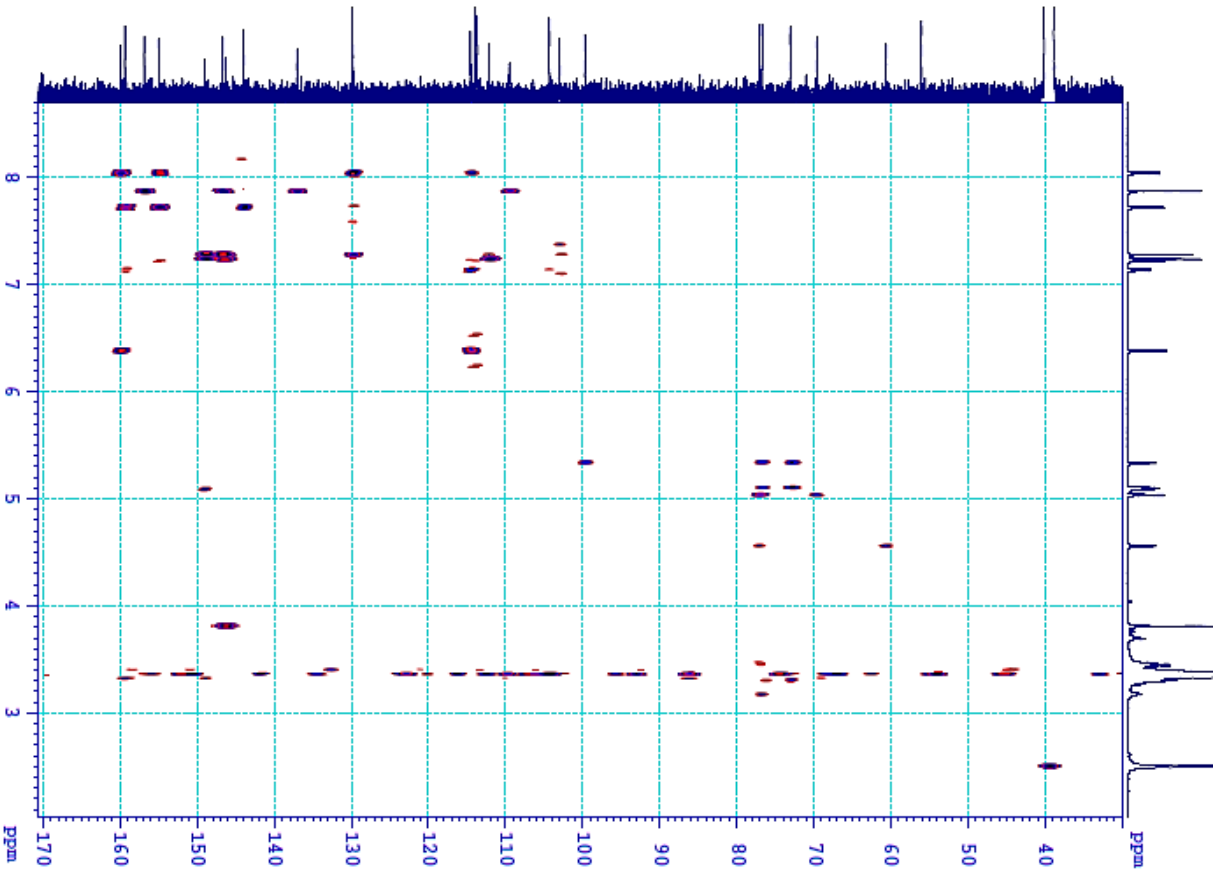
Phụ lục 2.6.1. Phổ ^{1}H-NMR (600 MHz, DMSO-d_6) của hợp chất **WI6**



Phụ lục 2.6.2. Phổ ^{13}C-NMR (150 MHz, DMSO-d_6) của hợp chất **WI6**

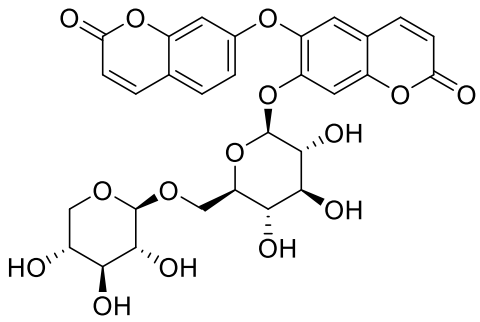


Phụ lục 2.6.3. Phổ HSQC (600/150 MHz, DMSO-d_6) của hợp chất **WI6**



Phụ lục 2.6.4. Phổ HMBC (600/150 MHz, DMSO-d_6) của hợp chất **WI6**

PHỤ LỤC 2.7. DỮ LIỆU PHỔ CỦA HỢP CHẤT WI7



CTPT: $C_{29}H_{28}O_{15}$
M = 616,14

Cấu trúc hóa học của hợp chất **WI7**

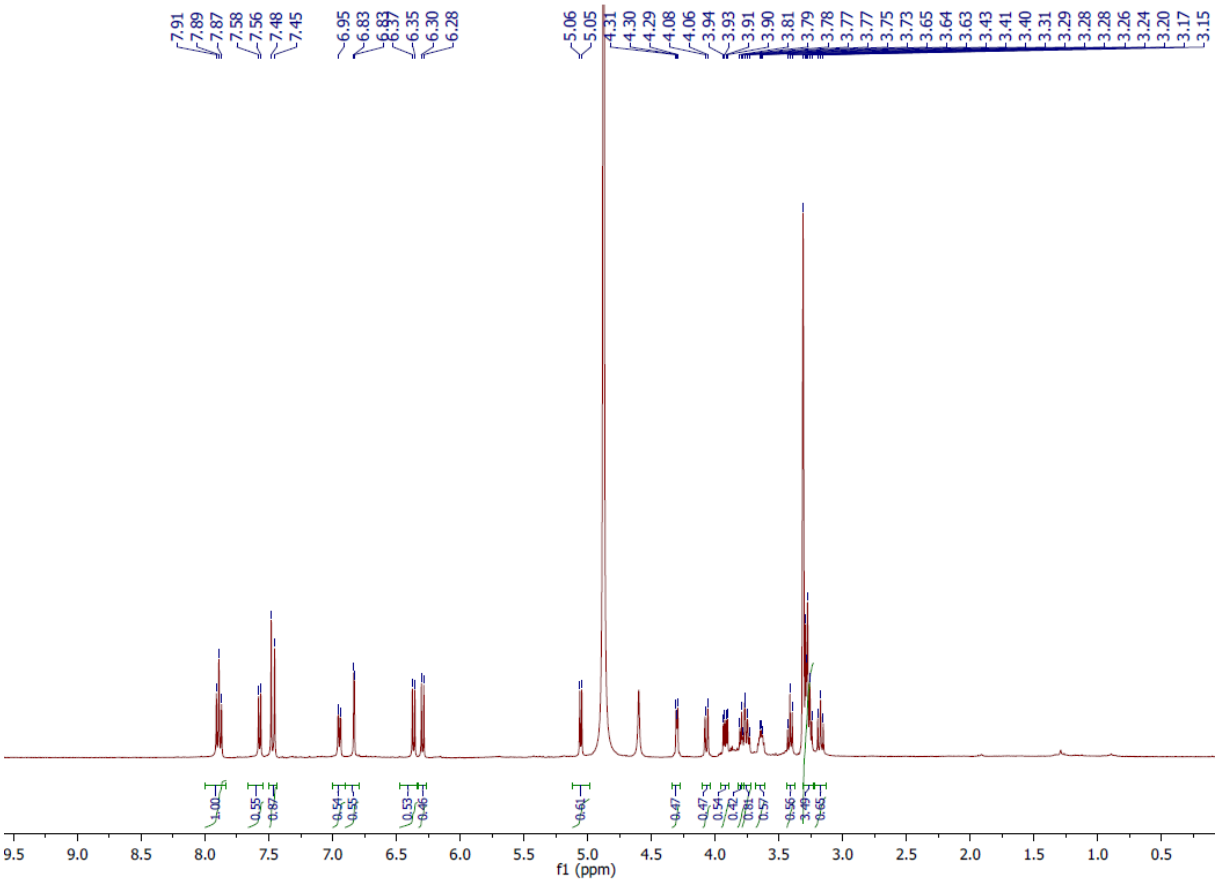
Phụ lục 2.7.1. Phổ ^{1}H-NMR (500 MHz, CD_3OD) của hợp chất **WI7**

Phụ lục 2.7.2. Phổ ^{13}C-APT NMR (125 MHz, CD_3OD) của hợp chất **WI7**

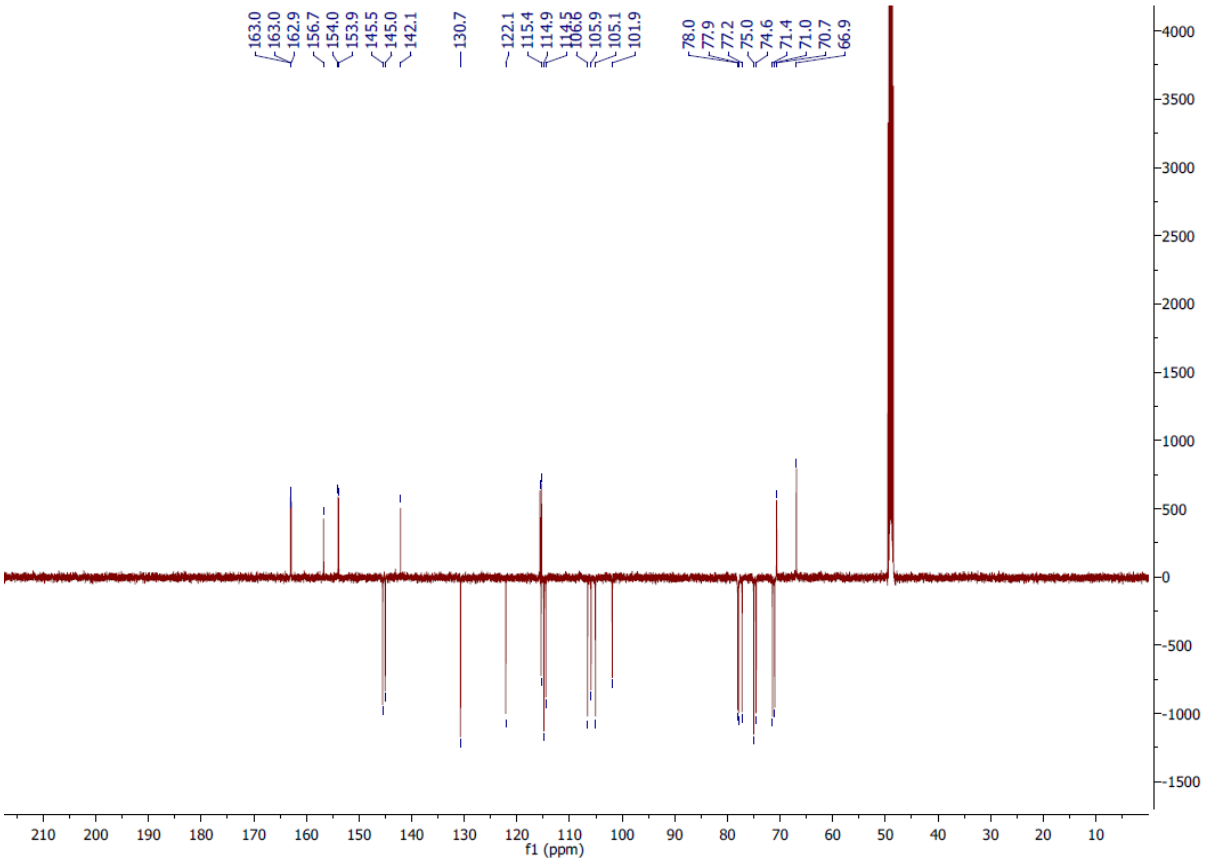
Phụ lục 2.7.3. Phổ HSQC (500/125 MHz, CD_3OD) của hợp chất **WI7**

Phụ lục 2.7.4. Phổ HMBC (500/125 MHz, CD_3OD) của hợp chất **WI7**

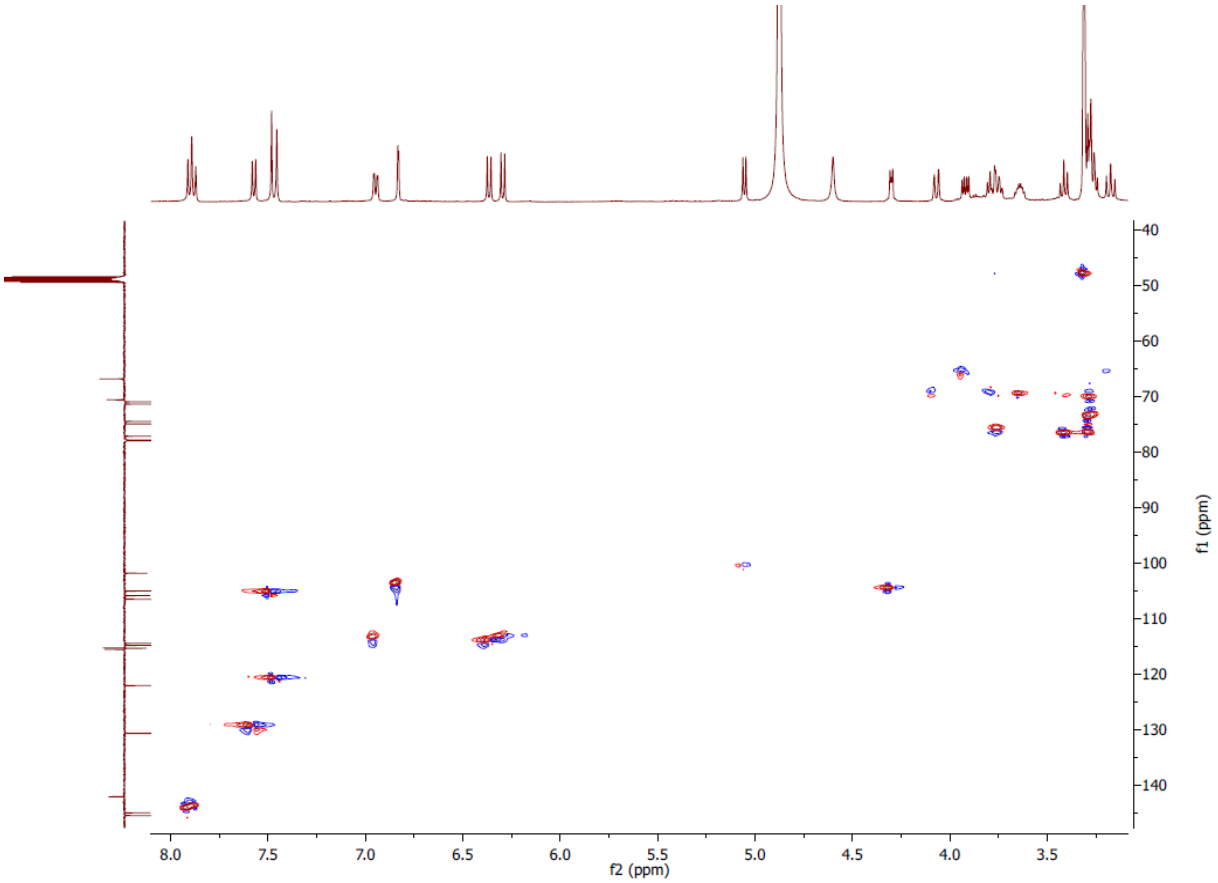
Phụ lục 2.7.5. Phổ ESI-MS của hợp chất **WI7**



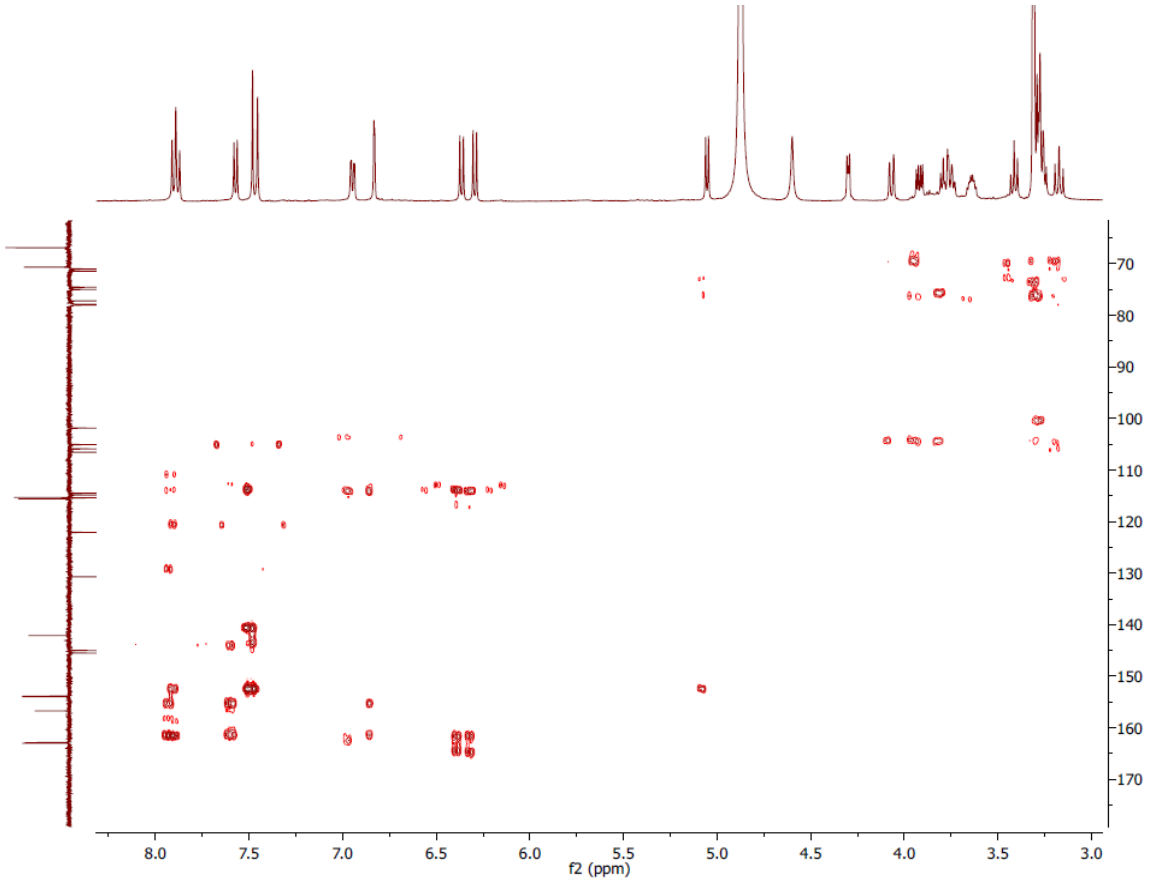
Phụ lục 2.7.1. Phổ ^{1}H-NMR (500 MHz, CD_3OD) của hợp chất **WI7**



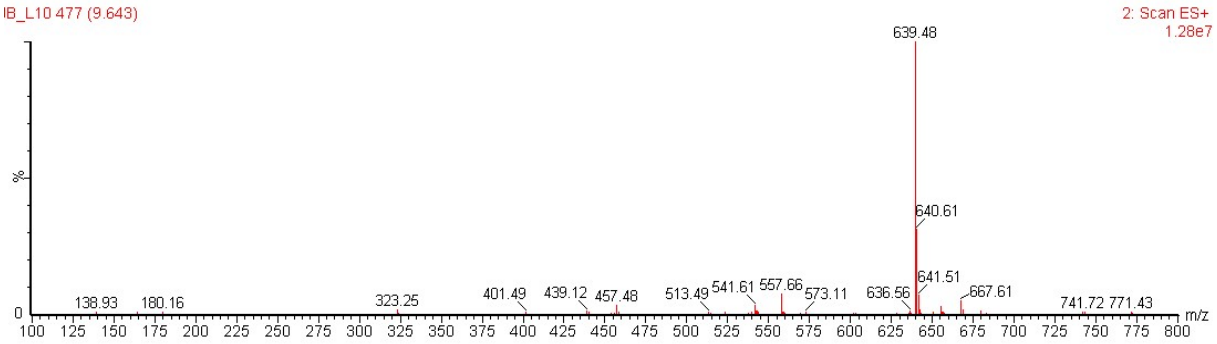
Phụ lục 2.7.2. Phổ ^{13}C-APT NMR (125 MHz, CD_3OD) của hợp chất **WI7**



Phụ lục 2.7.3. Phổ HSQC (500/125 MHz, CD_3OD) của hợp chất **WI7**

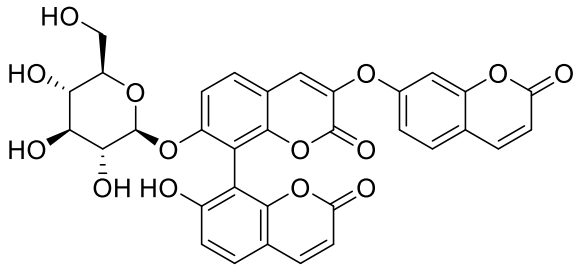


Phụ lục 2.7.4. Phổ HMBC (500/150 MHz, CD_3OD) của hợp chất **WI7**



Phụ lục 2.7.5. Phổ ESI-MS của hợp chất **WI7**

PHỤ LỤC 2.8. DỮ LIỆU PHỔ CỦA HỢP CHẤT WI8



CTPT: $C_{34}H_{26}O_{13}$
M = 644,1166

Cấu trúc hóa học của hợp chất **WI8**

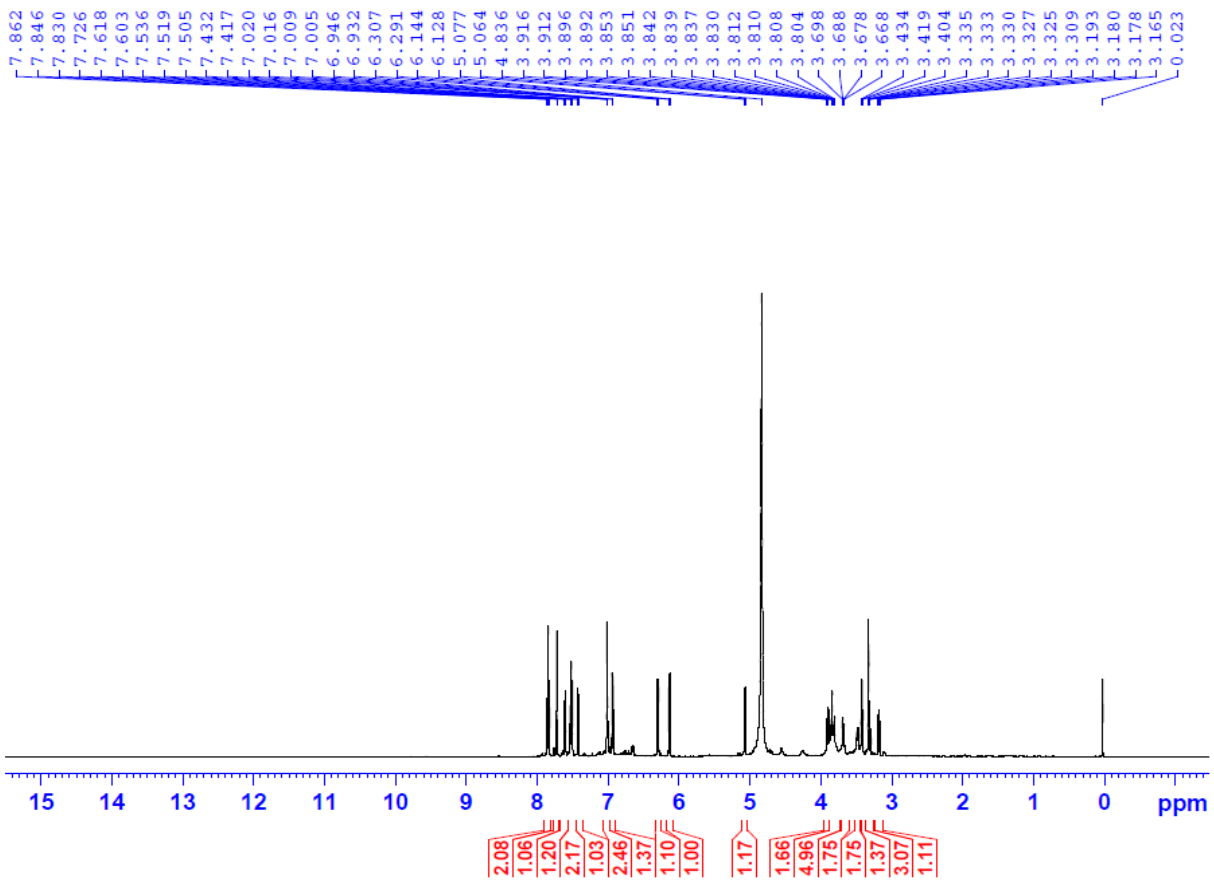
Phụ lục 2.8.1. Phổ ^{1}H-NMR (600 MHz, CD_3OD) của hợp chất **WI8**

Phụ lục 2.8.2. Phổ ^{13}C-NMR (150 MHz, CD_3OD) của hợp chất **WI8**

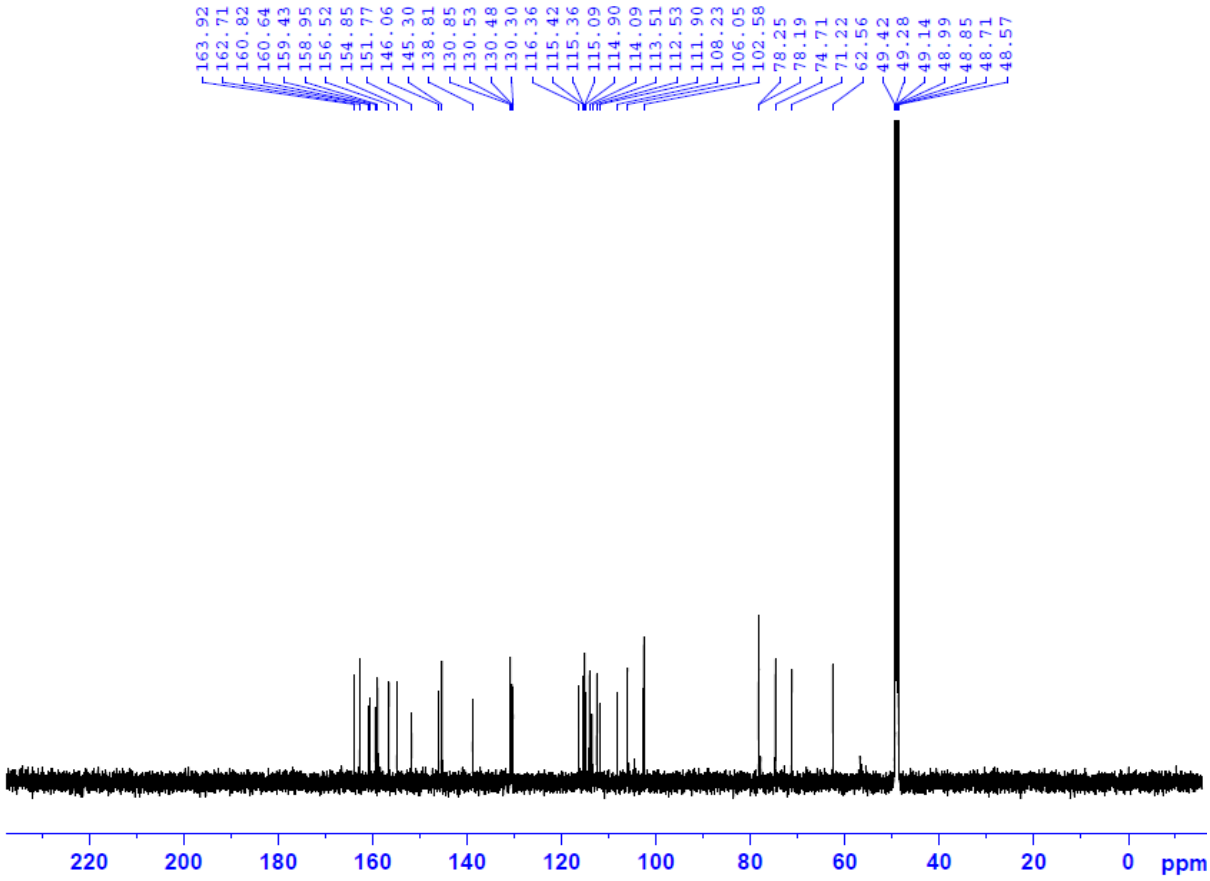
Phụ lục 2.8.3. Phổ HSQC (600/150 MHz, CD_3OD) của hợp chất **WI8**

Phụ lục 2.8.4. Phổ HMBC (600/150 MHz, CD_3OD) của hợp chất **WI8**

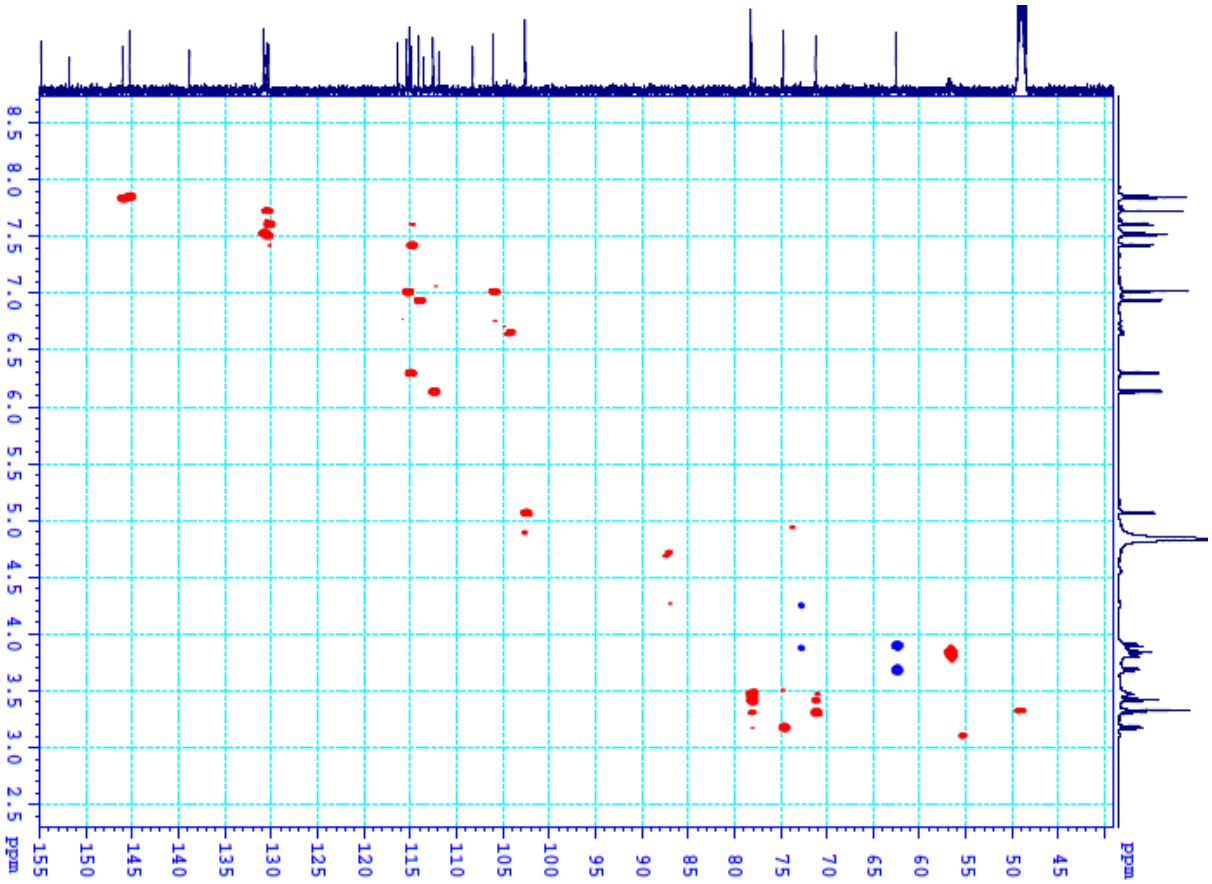
Phụ lục 2.8.5. Phổ HR-ESI-MS của hợp chất **WI8**



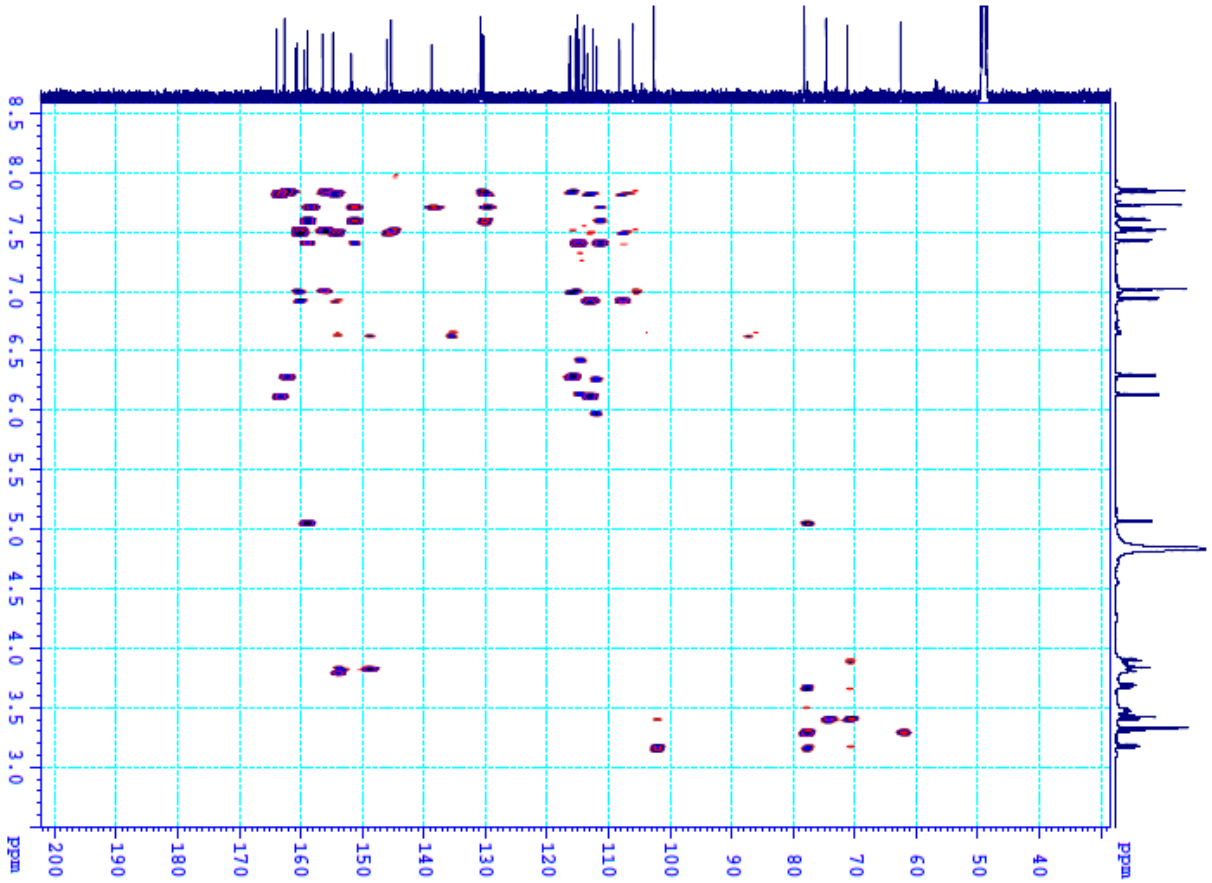
Phụ lục 2.8.1. Phổ ^{1}H-NMR (600 MHz, CD_3OD) của hợp chất **WI8**



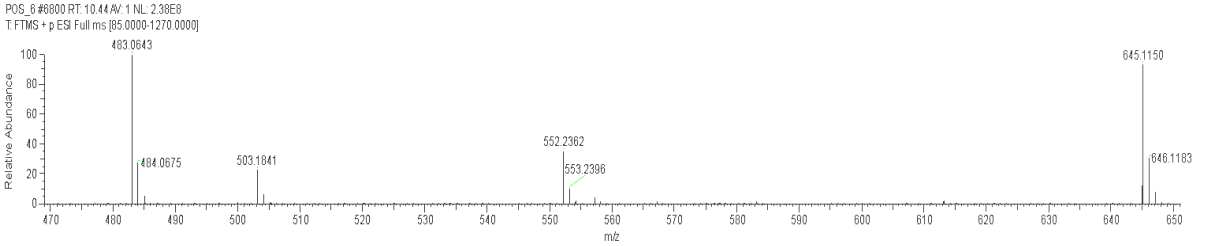
Phụ lục 2.8.2. Phổ ^{13}C-NMR (150 MHz, CD_3OD) của hợp chất **WI8**



Phụ lục 2.8.3. Phổ HSQC (600/150 MHz, CD_3OD) của hợp chất **WI8**

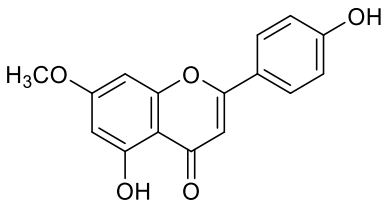


Phụ lục 2.8.4. Phổ HMBC (600/150 MHz, CD_3OD) của hợp chất **WI8**



Phổ HR-ESI-MS của hợp chất **WI8**

PHỤ LỤC 2.9. DỮ LIỆU PHỔ CỦA HỢP CHẤT WI9



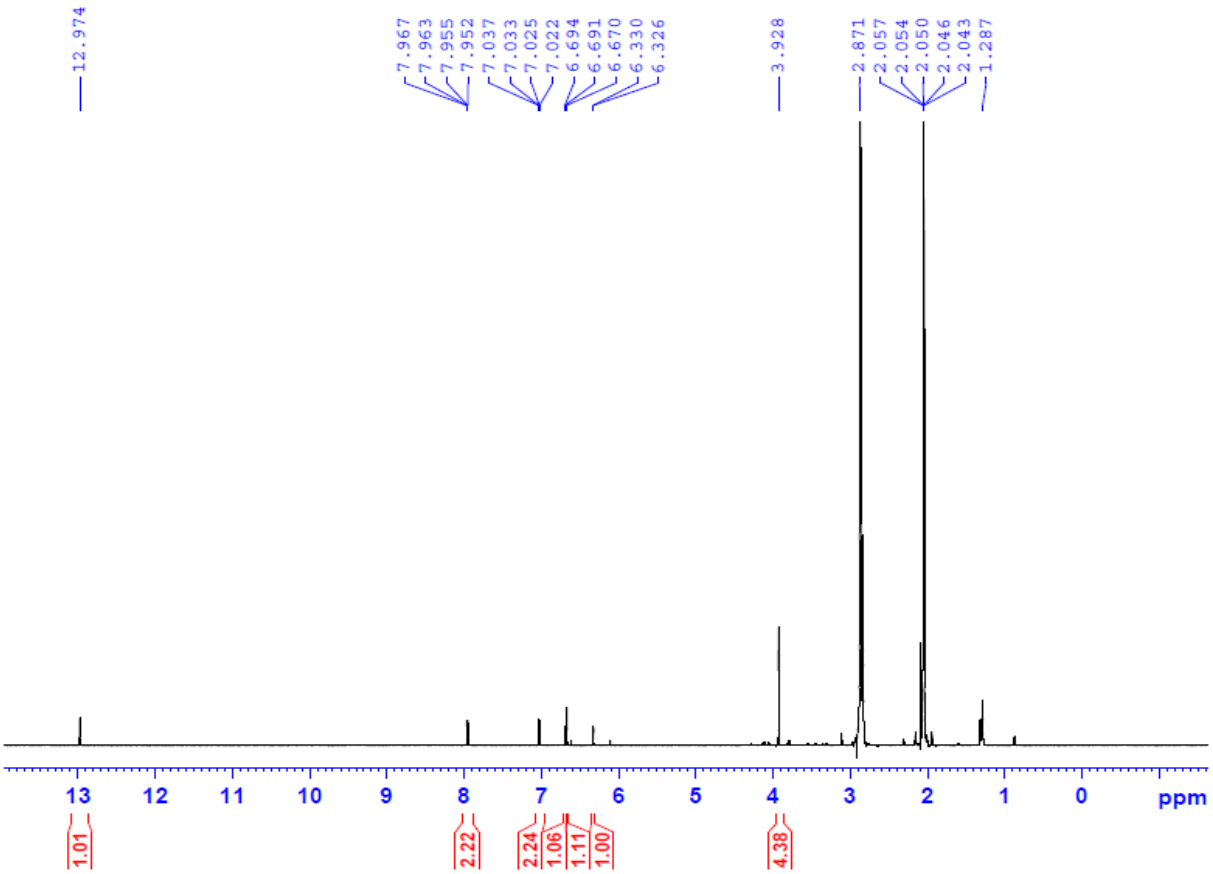
CTPT: $C_{16}H_{12}O_5$
M = 284,07

Cấu trúc hóa học của hợp chất **WI9**

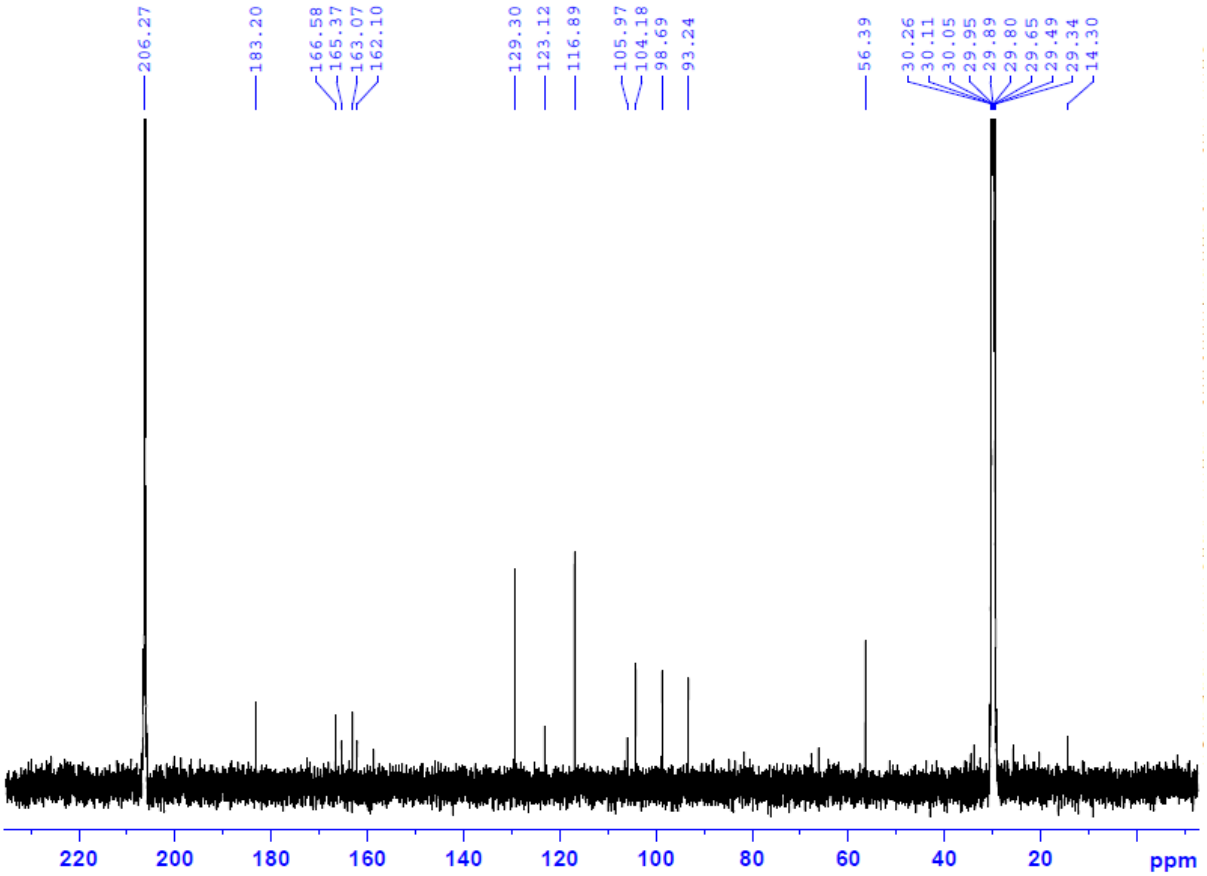
Phụ lục 2.9.1. Phổ ^{1}H-NMR (600 MHz, aceton-d_6) của hợp chất **WI9**

Phụ lục 2.9.2. Phổ ^{13}C-NMR (150 MHz, aceton-d_6) của hợp chất **WI9**

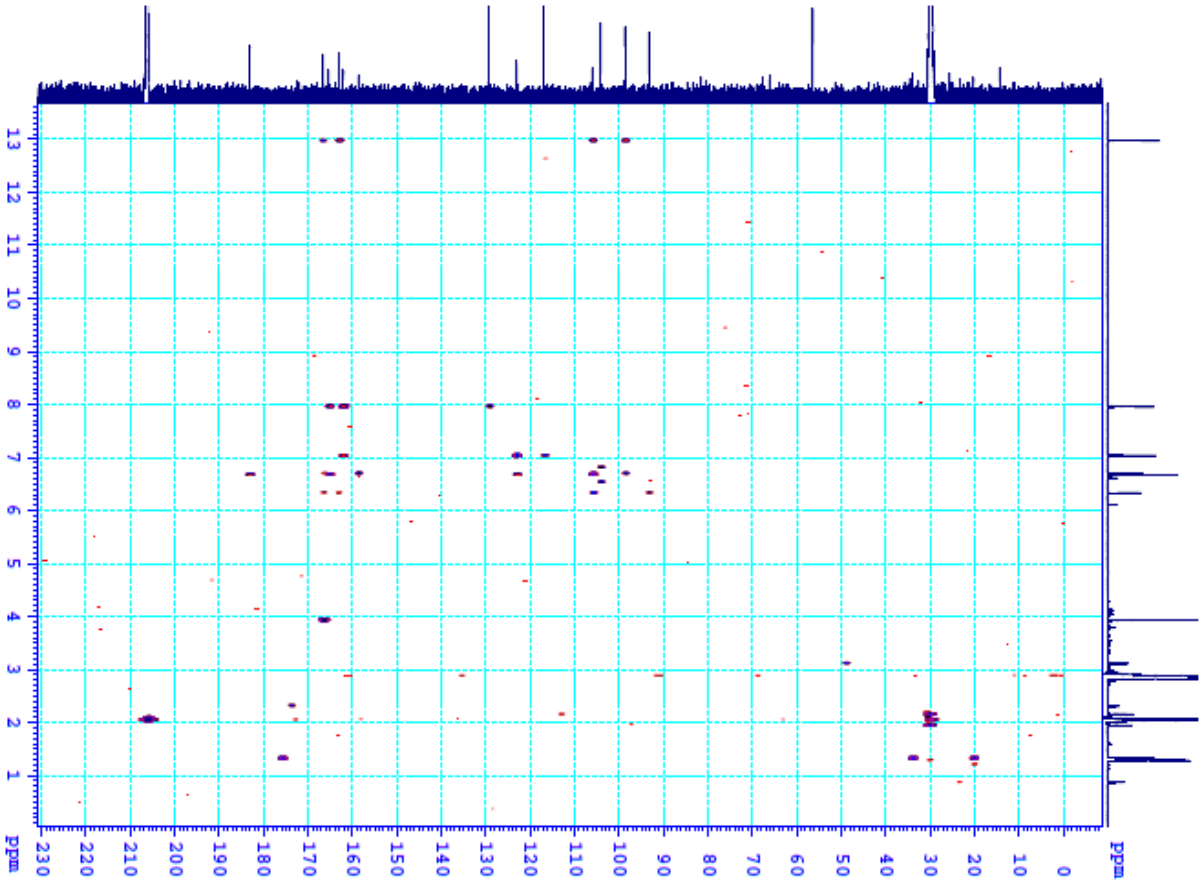
Phụ lục 2.9.3. Phổ HMBC (600/150 MHz, aceton-d_6) của hợp chất **WI9**



Phụ lục 2.9.1. Phổ ^{1}H-NMR (600 MHz, aceton-d_6) của hợp chất **WI9**

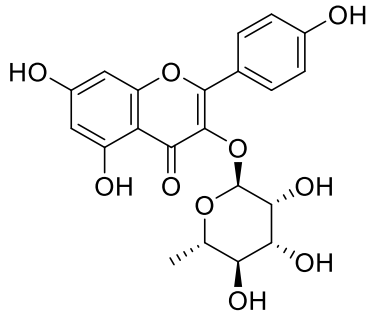


Phụ lục 2.9.2. Phổ ^{13}C-NMR (150 MHz, aceton-d_6) của hợp chất **WI9**



Phụ lục 2.9.3. Phổ HMBC (600/150 MHz, aceton-d_6) của hợp chất **WI9**

PHỤ LỤC 2.10. DỮ LIỆU PHỔ CỦA HỢP CHẤT WI10



CTPT: $C_{21}H_{20}O_{10}$
M = 432,11

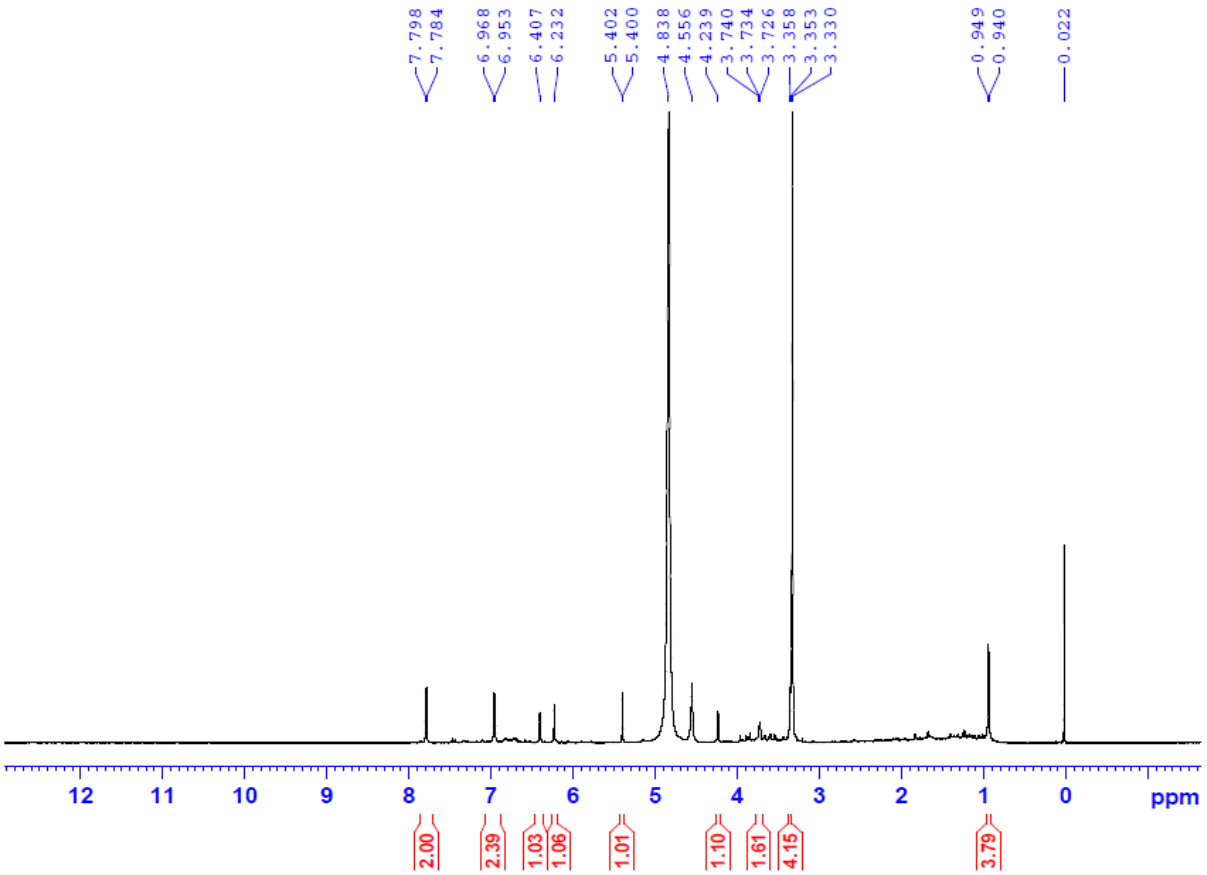
Cấu trúc hóa học của hợp chất **WI10**

Phụ lục 2.10.1. Phổ ^{1}H-NMR (600 MHz, CD_3OD) của hợp chất **WI10**

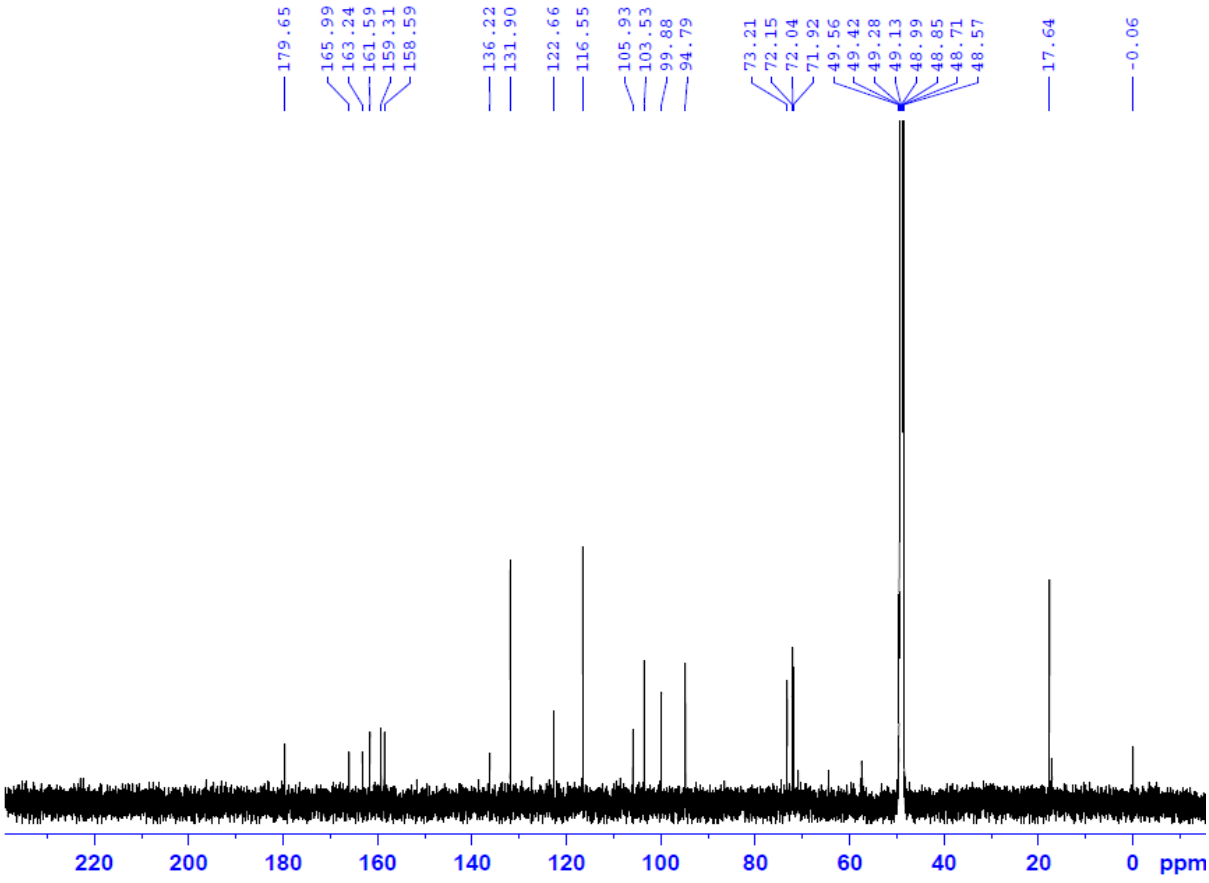
Phụ lục 2.10.2. Phổ ^{13}C-NMR (150 MHz, CD_3OD) của hợp chất **WI10**

Phụ lục 2.10.3. Phổ HSQC (600/150 MHz, CD_3OD) của hợp chất **WI10**

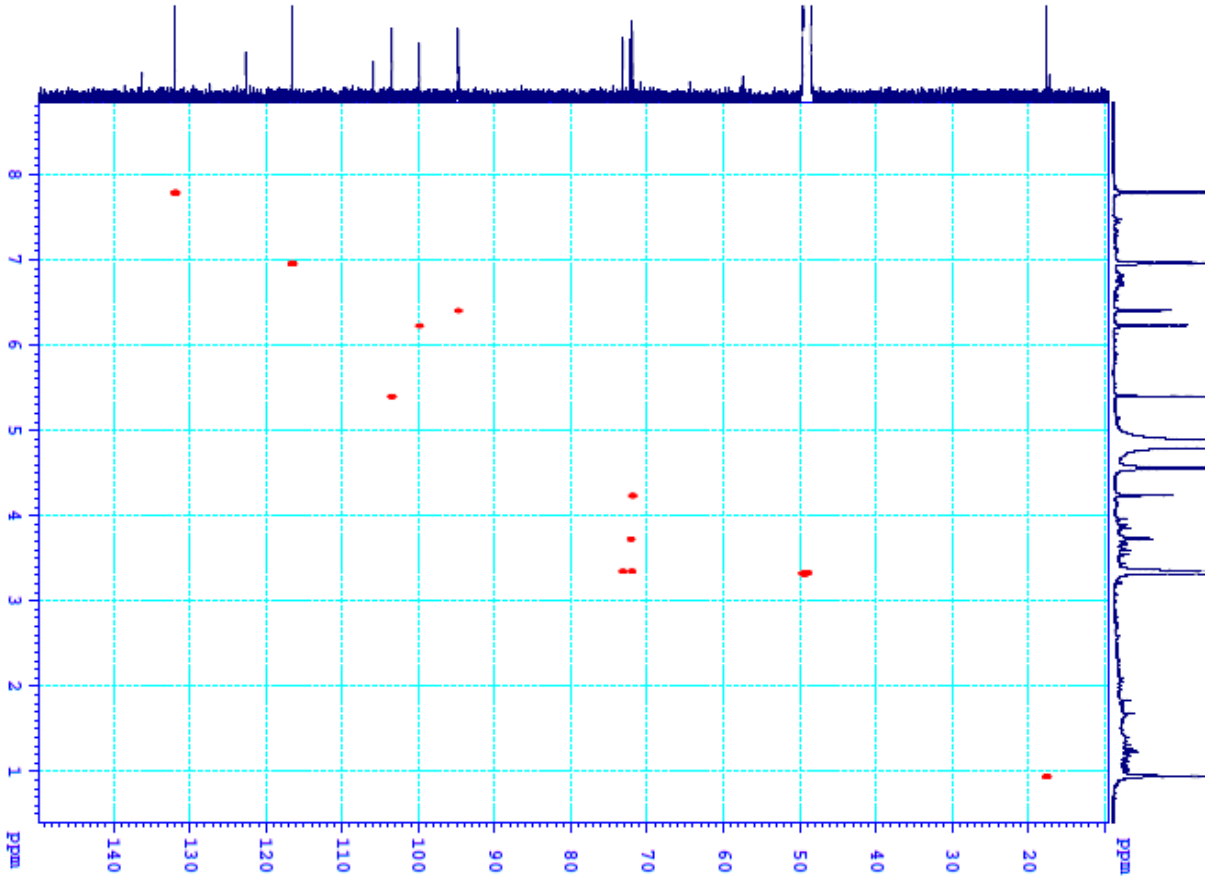
Phụ lục 2.10.4. Phổ HMBC (600/150 MHz, CD_3OD) của hợp chất **WI10**



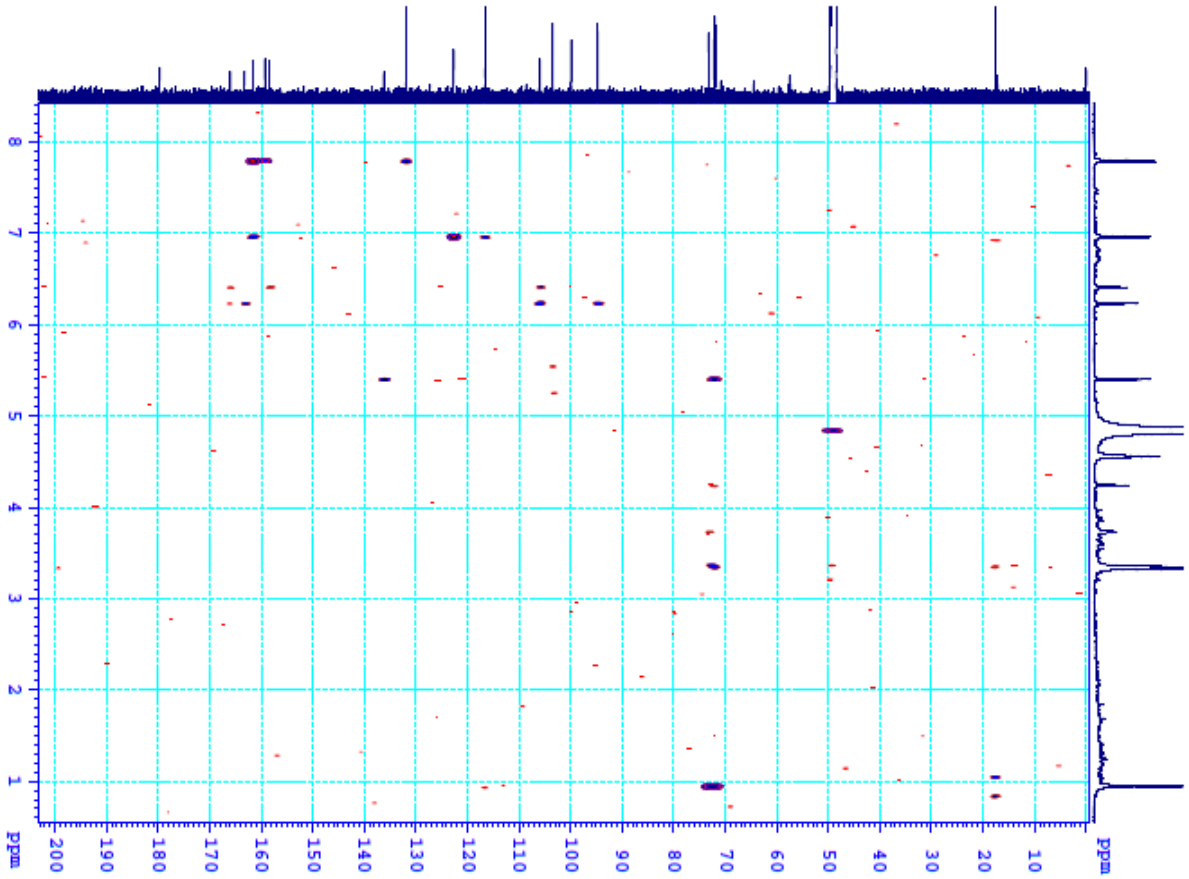
Phụ lục 2.10.1. Phổ ^{1}H-NMR (600 MHz, CD_3OD) của hợp chất **WI10**



Phụ lục 2.10.2. Phổ ^{13}C-NMR (150 MHz, CD_3OD) của hợp chất **WI10**

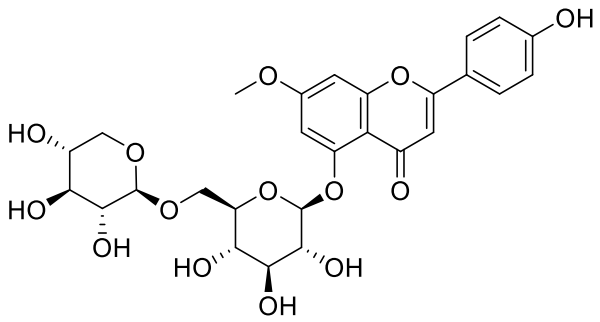


Phụ lục 2.10.3. Phổ HSQC (600/150 MHz, CD_3OD) của hợp chất **WI10**



Phụ lục 2.10.4. Phổ HMBC (600/150 MHz, CD_3OD) của hợp chất **WI10**

PHỤ LỤC 2.11. DỮ LIỆU PHỔ CỦA HỢP CHẤT WI11



CTPT: $C_{27}H_{30}O_{14}$
M = 578,16

Cấu trúc hóa học của hợp chất **WI11**

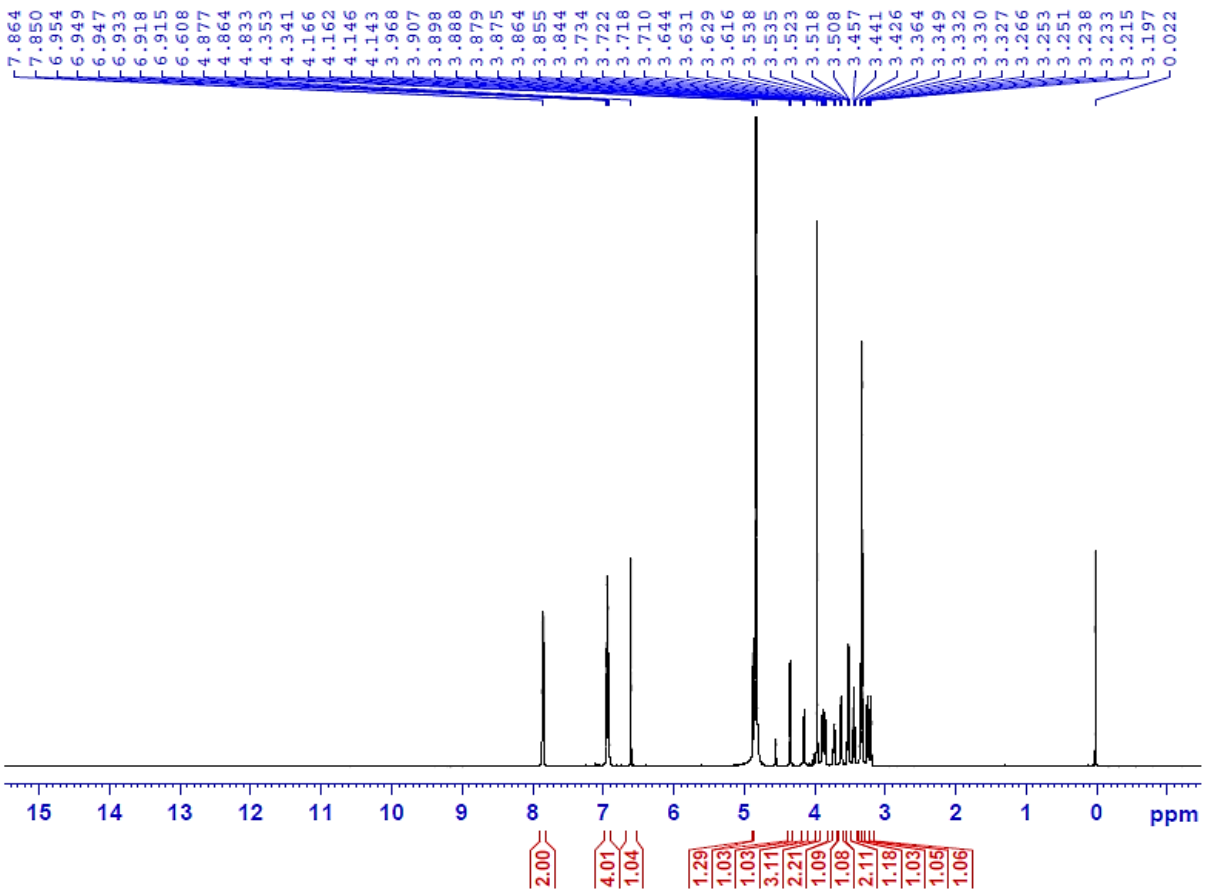
Phụ lục 2.11.1. Phổ ^{1}H-NMR (600 MHz, CD_3OD) của hợp chất **WI11**

Phụ lục 2.11.2. Phổ ^{13}C-NMR (150 MHz, CD_3OD) của hợp chất **WI11**

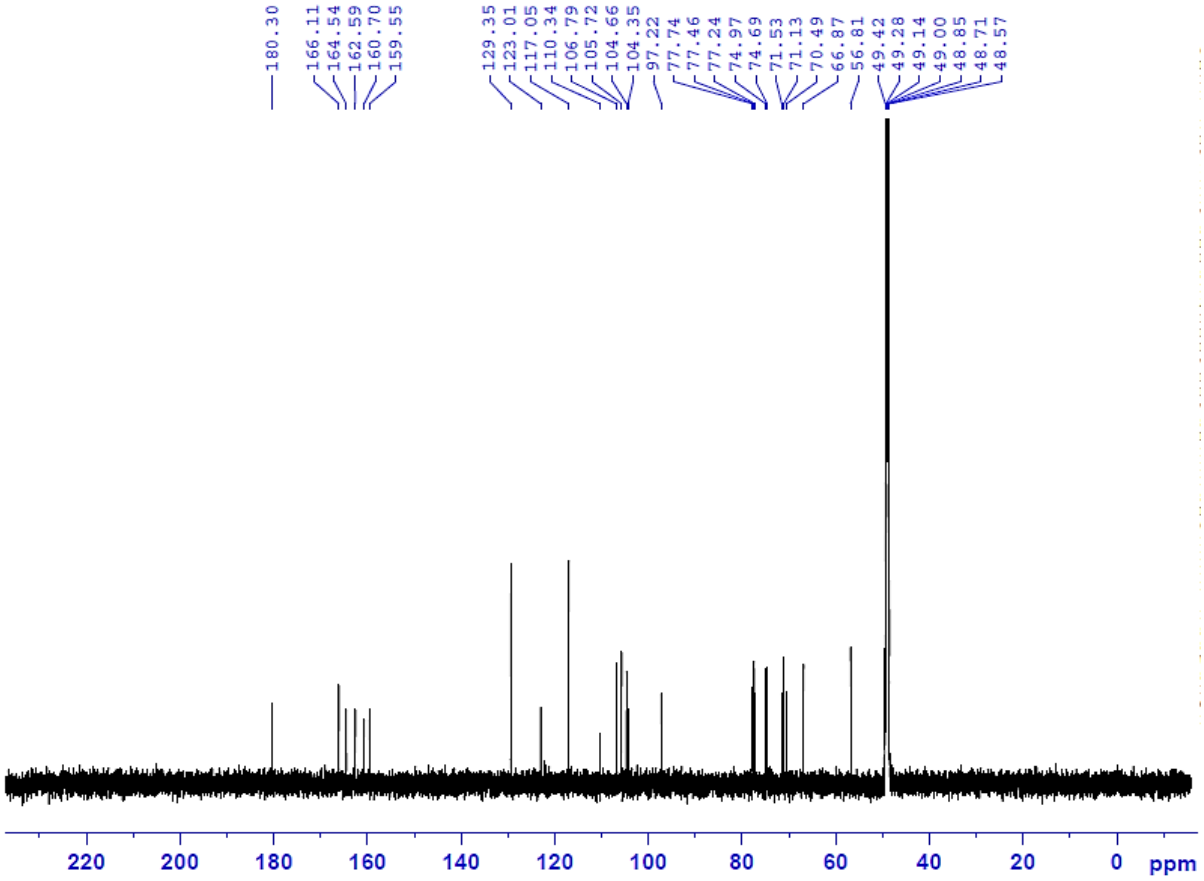
Phụ lục 2.11.3. Phổ HSQC (600/150 MHz, CD_3OD) của hợp chất **WI11**

Phụ lục 2.11.4. Phổ HMBC (600/150 MHz, CD_3OD) của hợp chất **WI11**

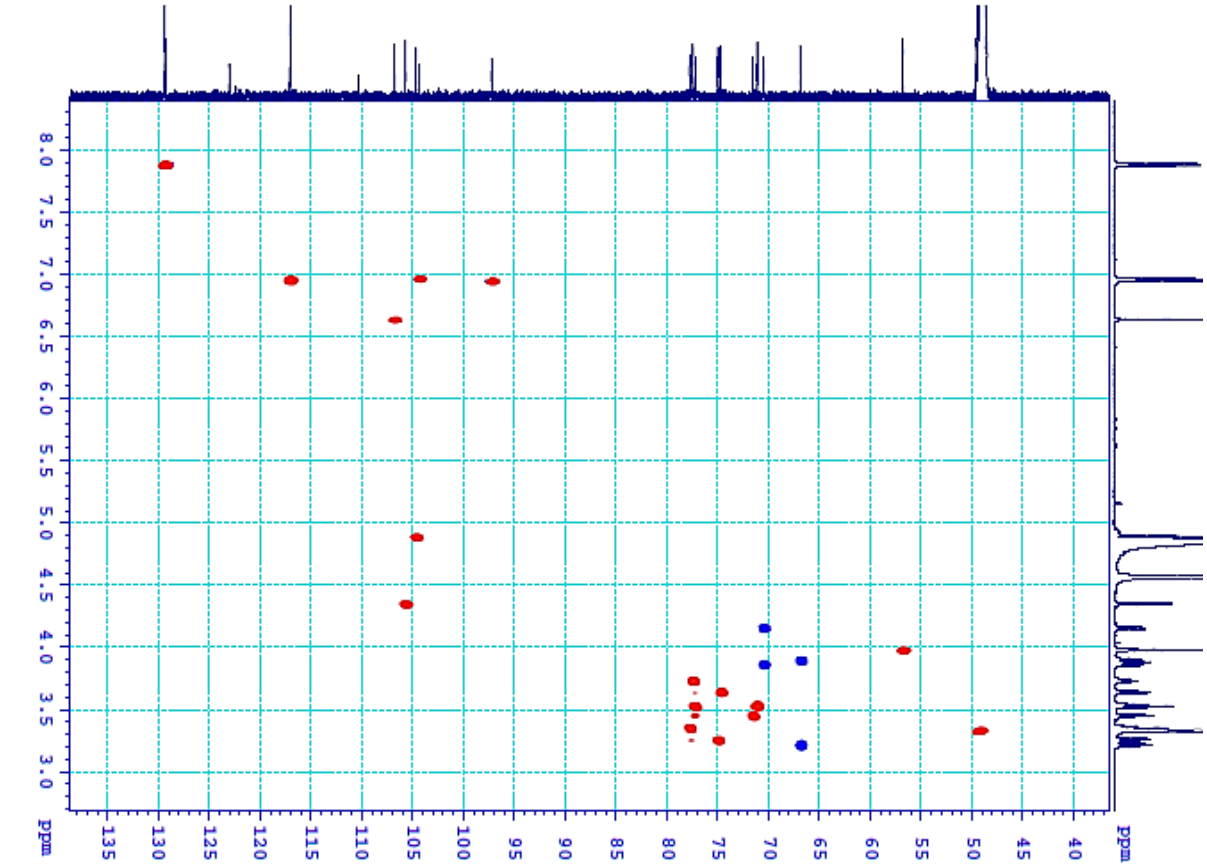
Phụ lục 2.11.5. Phổ ESI-MS của hợp chất **WI11**



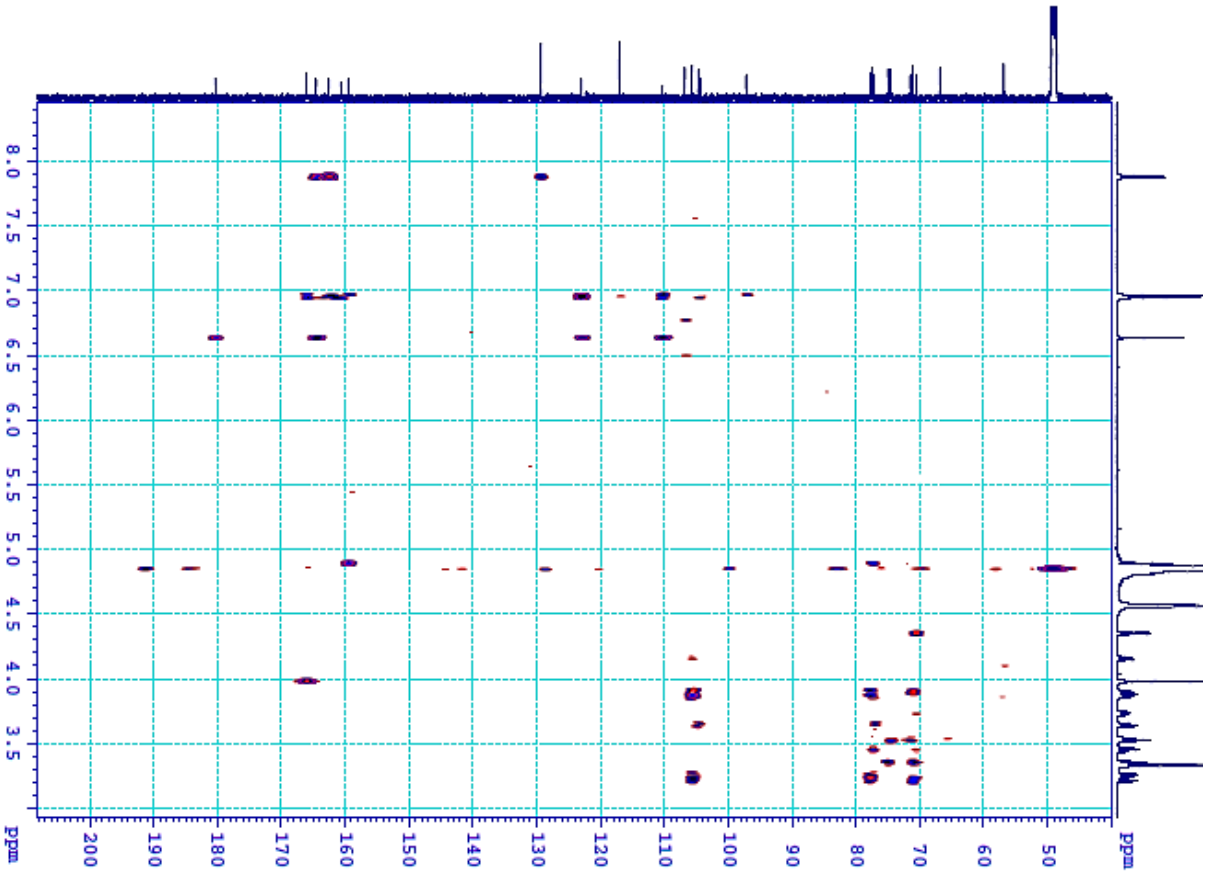
Phụ lục 2.11.1. Phổ ^{1}H-NMR (600 MHz, CD_3OD) của hợp chất **WI11**



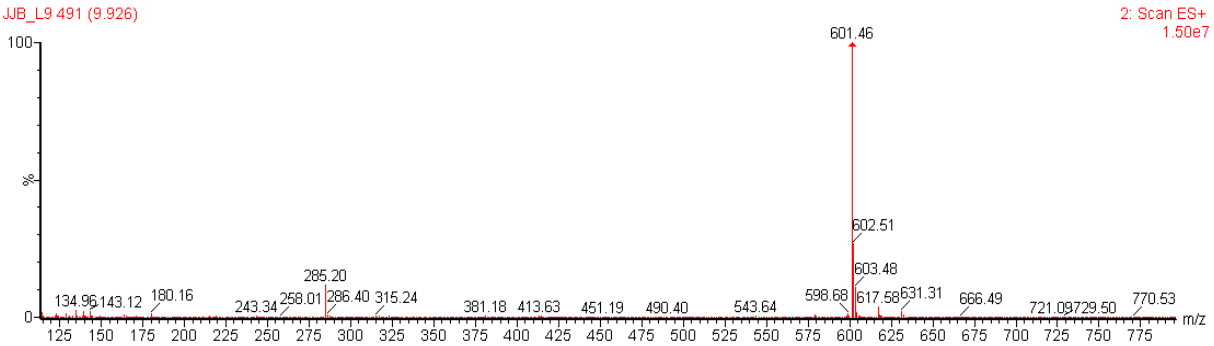
Phụ lục 2.11.2. Phổ ^{13}C-NMR (150 MHz, CD_3OD) của hợp chất **WI11**



Phụ lục 2.11.3. Phổ HSQC (600/150 MHz, CD_3OD) của hợp chất **WI11**

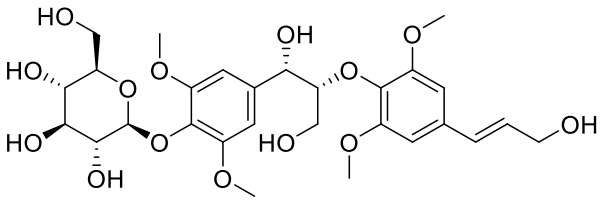


Phụ lục 2.11.4. Phổ HMBC (600/150 MHz, CD_3OD) của hợp chất **WI11**



Phụ lục 2.11.5. Phổ ESI-MS của hợp chất **WI11**

PHỤ LỤC 2.12. DỮ LIỆU PHỔ CỦA HỢP CHẤT WI12



CTPT: $C_{28}H_{38}O_{14}$
M = 598,23

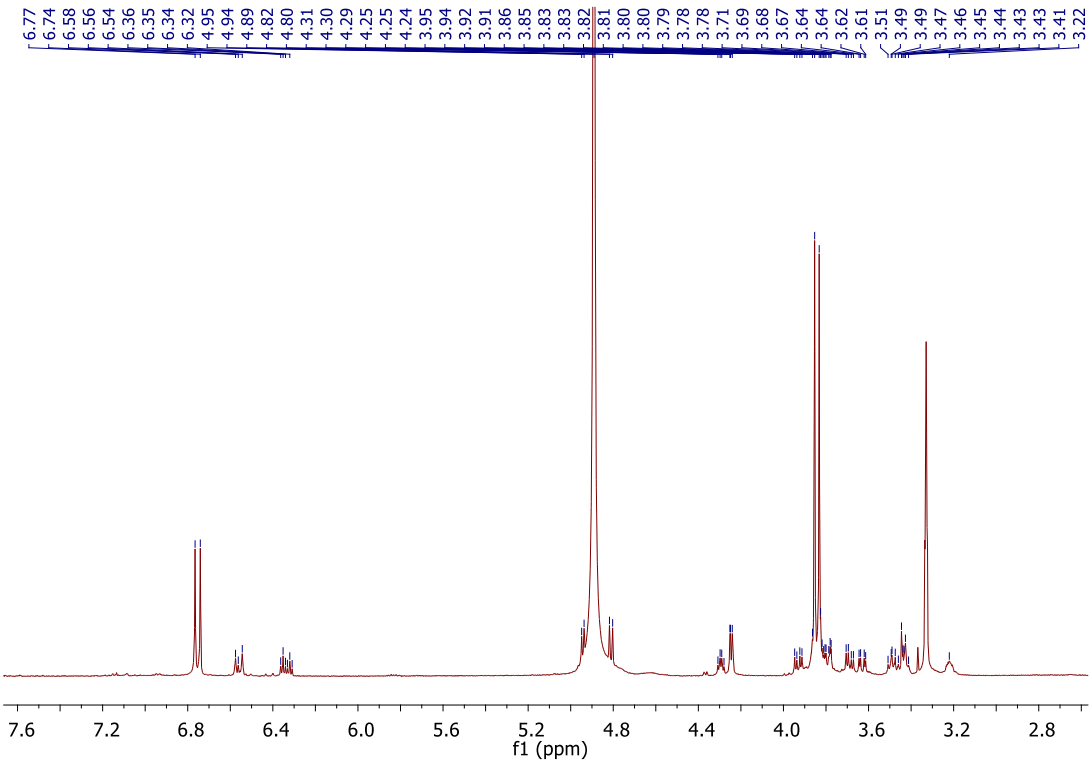
Cấu trúc hóa học của hợp chất **WI12**

Phụ lục 2.12.1. Phổ ^{1}H-NMR (500 MHz, CD_3OD) của hợp chất **WI12**

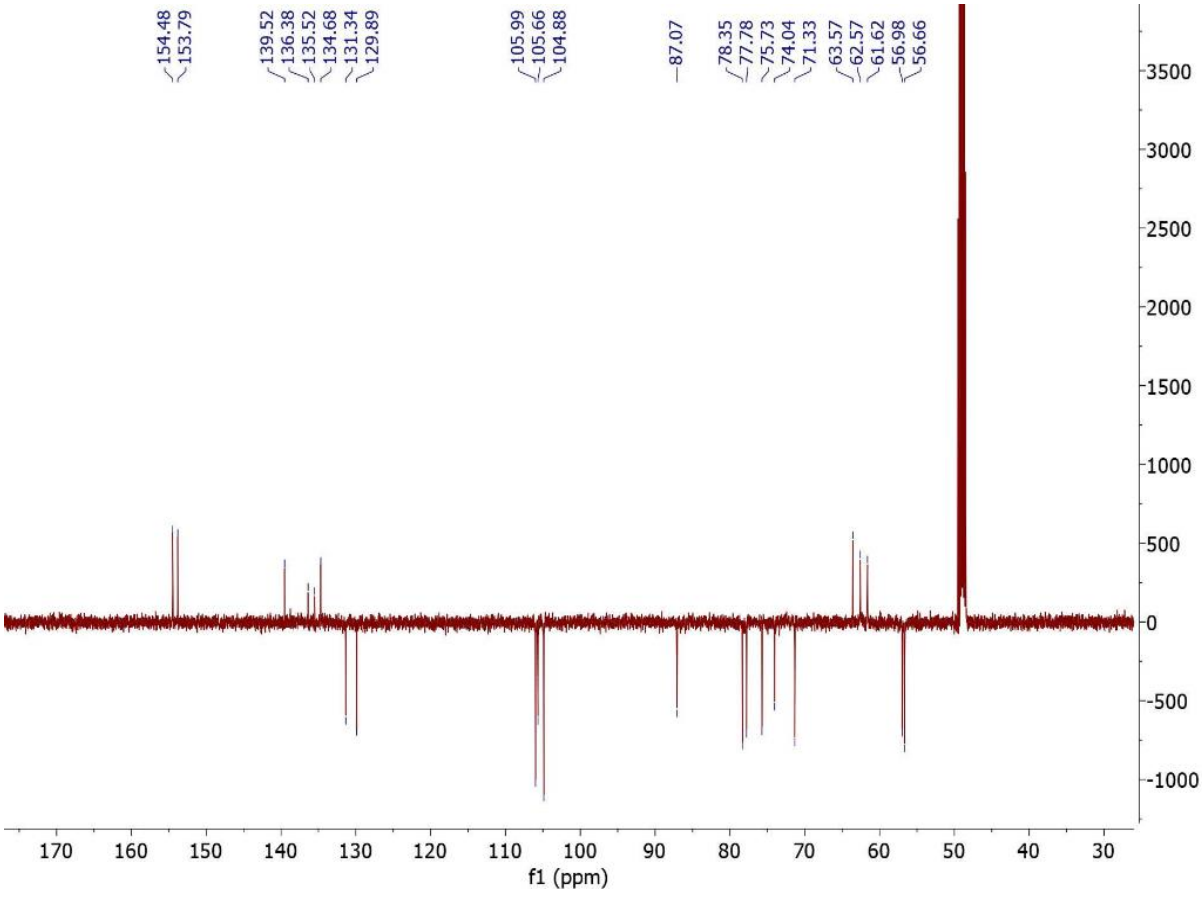
Phụ lục 2.12.2. Phổ ^{13}C-APT NMR (125 MHz, CD_3OD) của hợp chất **WI12**

Phụ lục 2.12.3. Phổ HSQC (500/125 MHz, CD_3OD) của hợp chất **WI12**

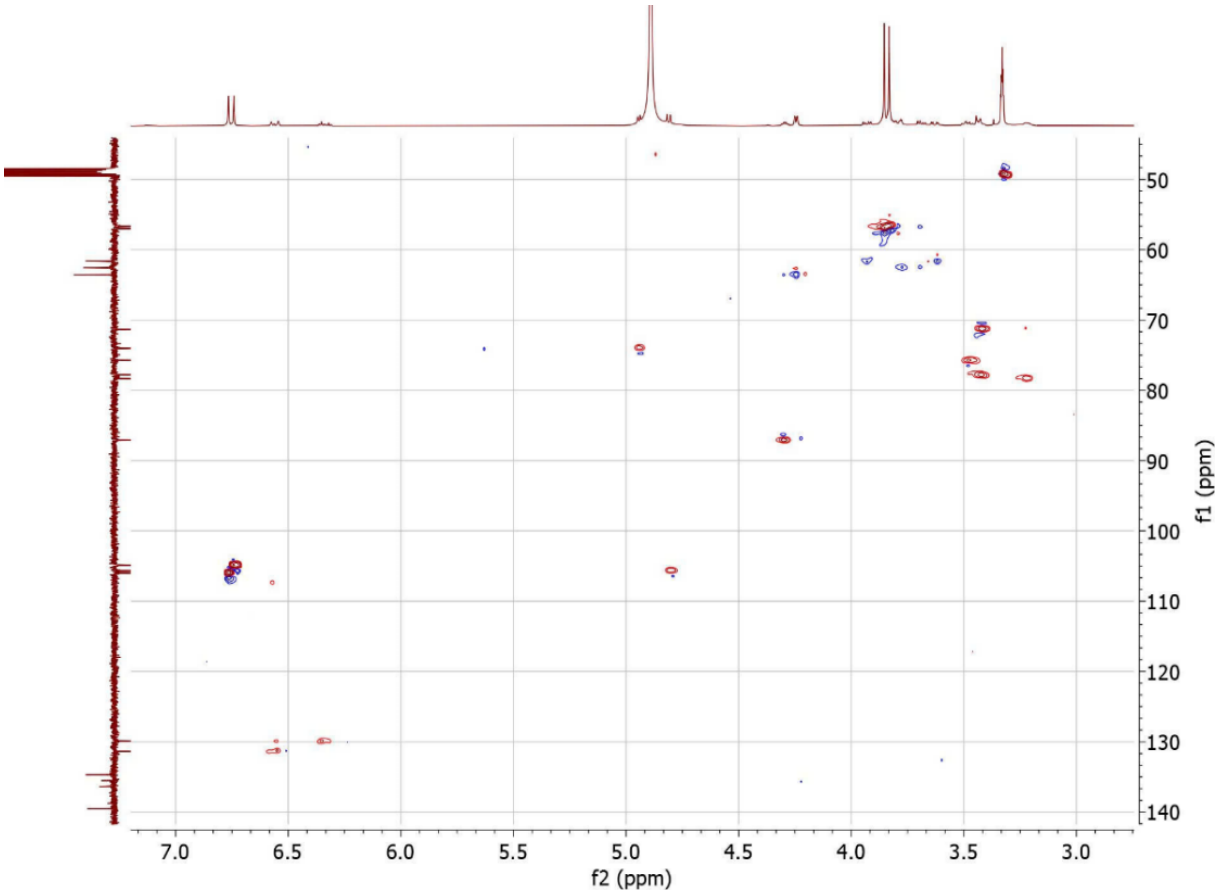
Phụ lục 2.12.4. Phổ HMBC (500/125 MHz, CD_3OD) của hợp chất **WI12**



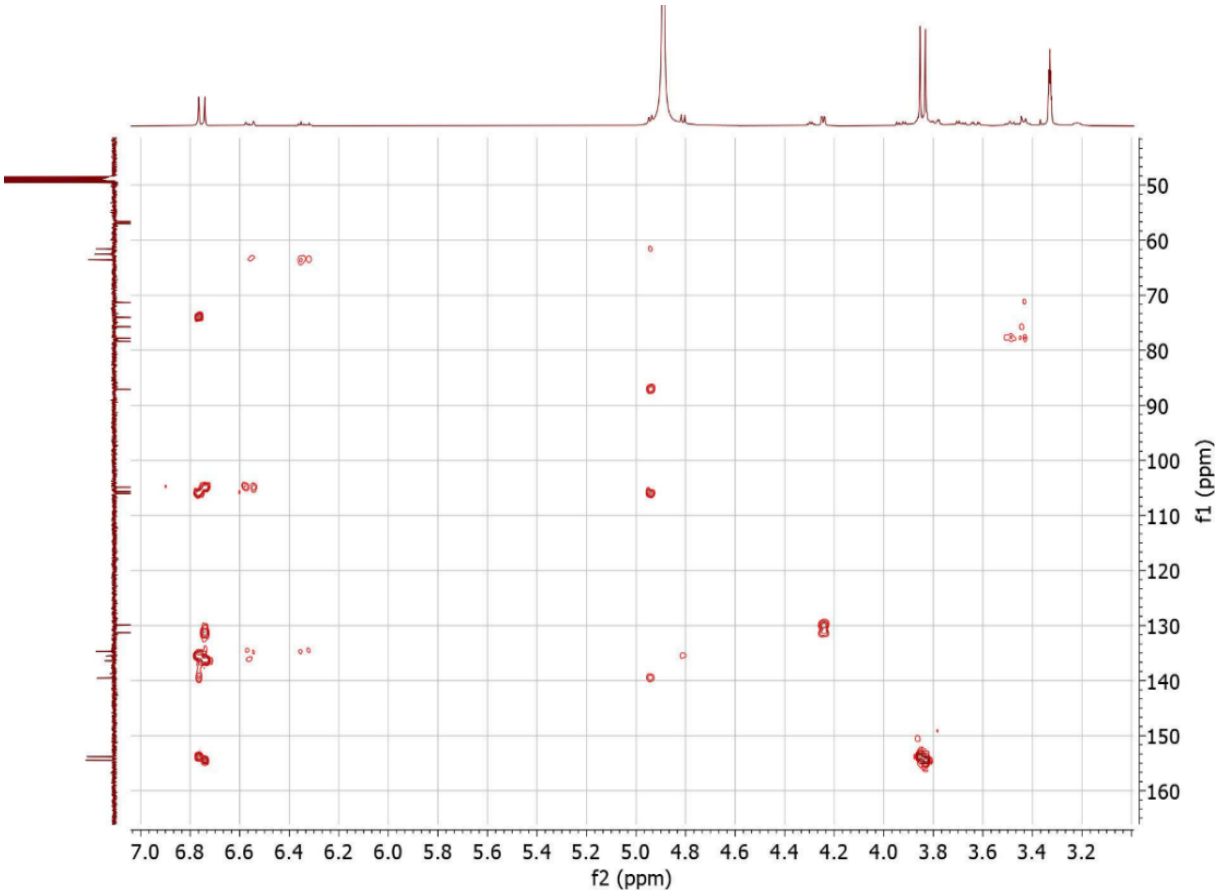
Phụ lục 2.12.1. Phổ ^{1}H-NMR (500 MHz, CD_3OD) của hợp chất **WI12**



Phụ lục 2.12.2. Phổ ^{13}C-APT NMR (125 MHz, CD_3OD) của hợp chất **WI12**

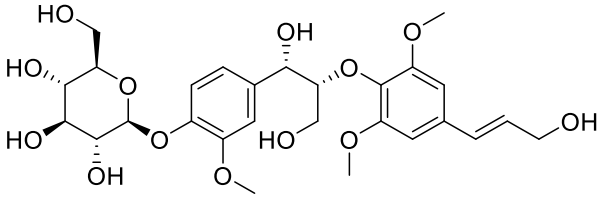


Phụ lục 2.12.3. Phổ HSQC (500/125 MHz, CD_3OD) của hợp chất **WI12**



Phụ lục 2.12.4. Phổ HMBC (500/125 MHz, CD_3OD) của hợp chất **WI12**

PHỤ LỤC 2.13. DỮ LIỆU PHỔ CỦA HỢP CHẤT WI13



CTPT: $C_{27}H_{36}O_{13}$
M = 568,22

Cấu trúc hóa học của hợp chất **WI13**

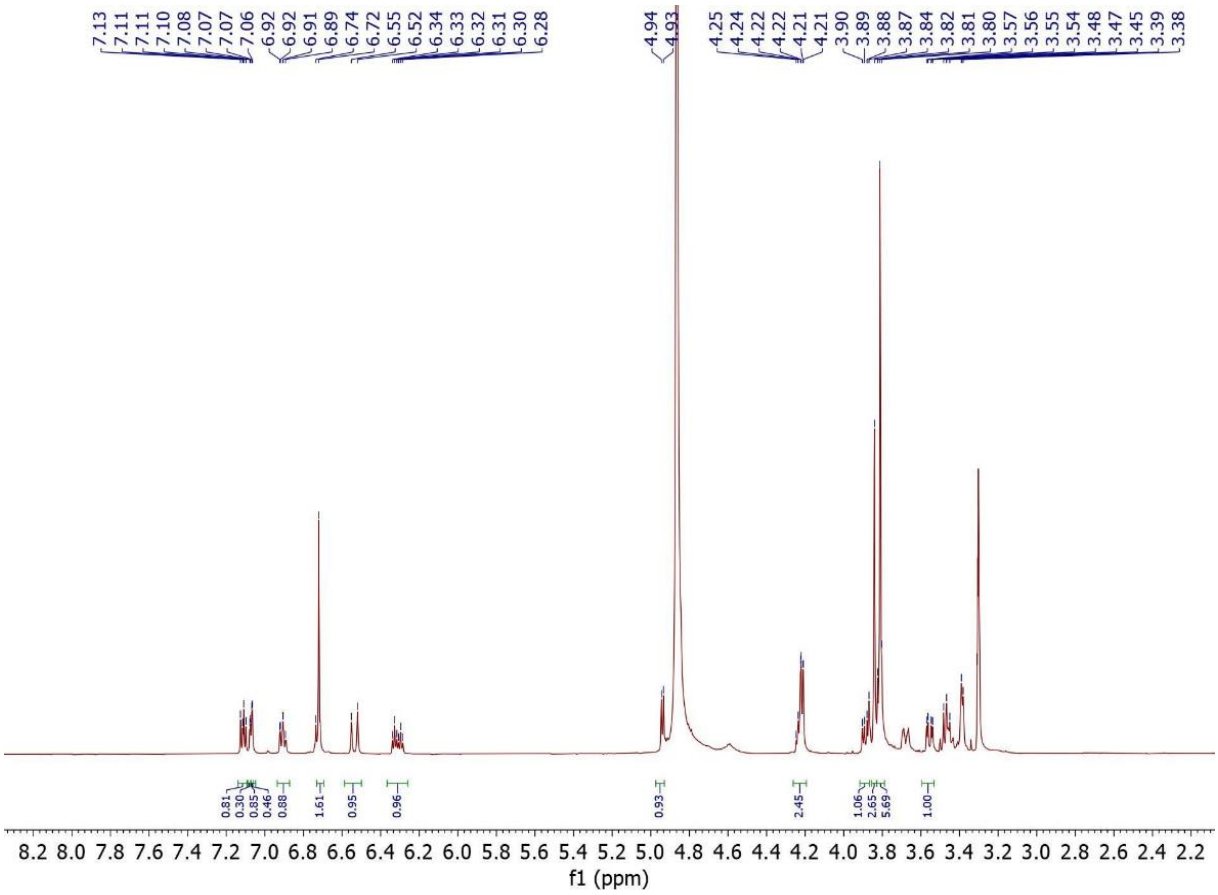
Phụ lục 2.13.1. Phổ ^{1}H-NMR (500 MHz, CD_3OD) của hợp chất **WI13**

Phụ lục 2.13.2. Phổ ^{13}C-APT NMR (125 MHz, CD_3OD) của hợp chất **WI13**

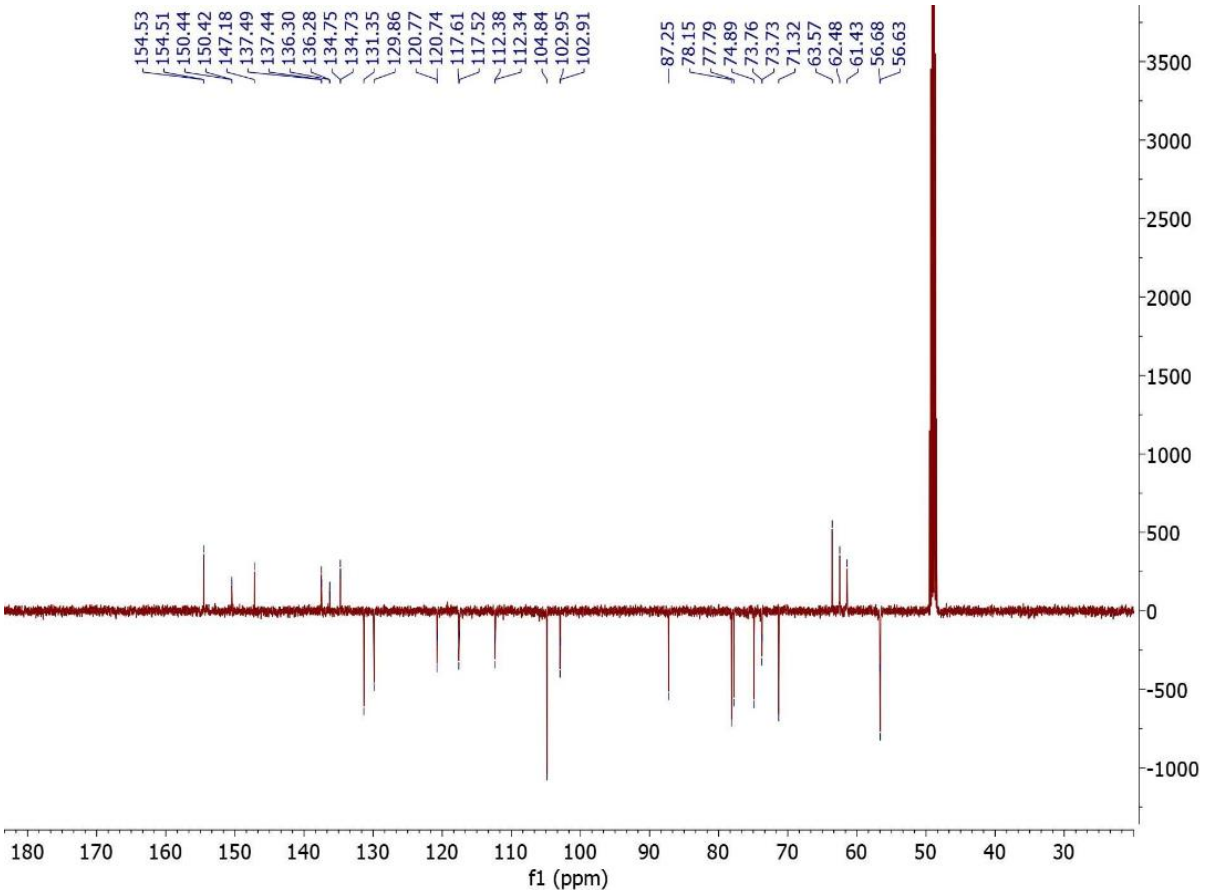
Phụ lục 2.13.3. Phổ HSQC (500/125 MHz, CD_3OD) của hợp chất **WI13**

Phụ lục 2.13.4. Phổ HMBC (500/125 MHz, CD_3OD) của hợp chất **WI13**

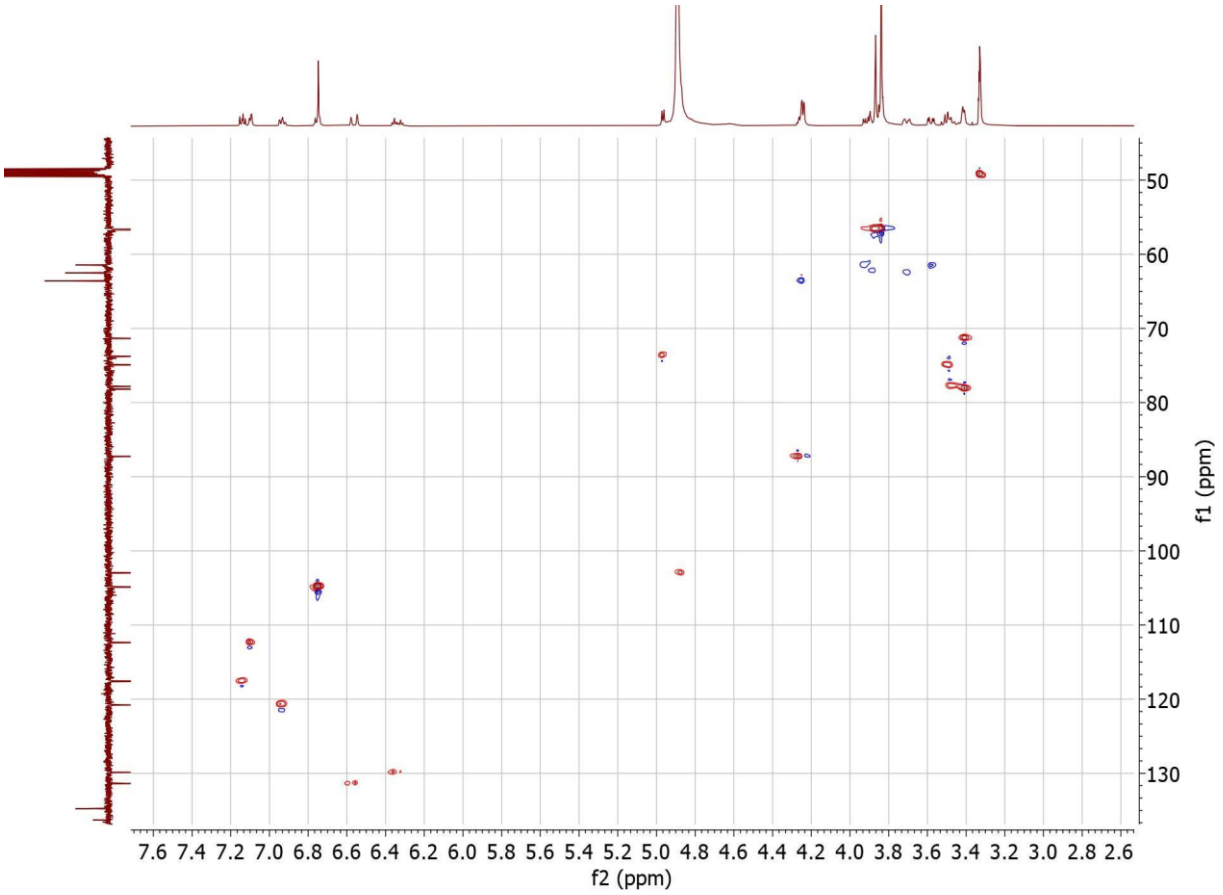
Phụ lục 2.13.5. Phổ ^{1}H-^{1}H COSY (500/500 MHz, CD_3OD) của hợp chất **WI13**



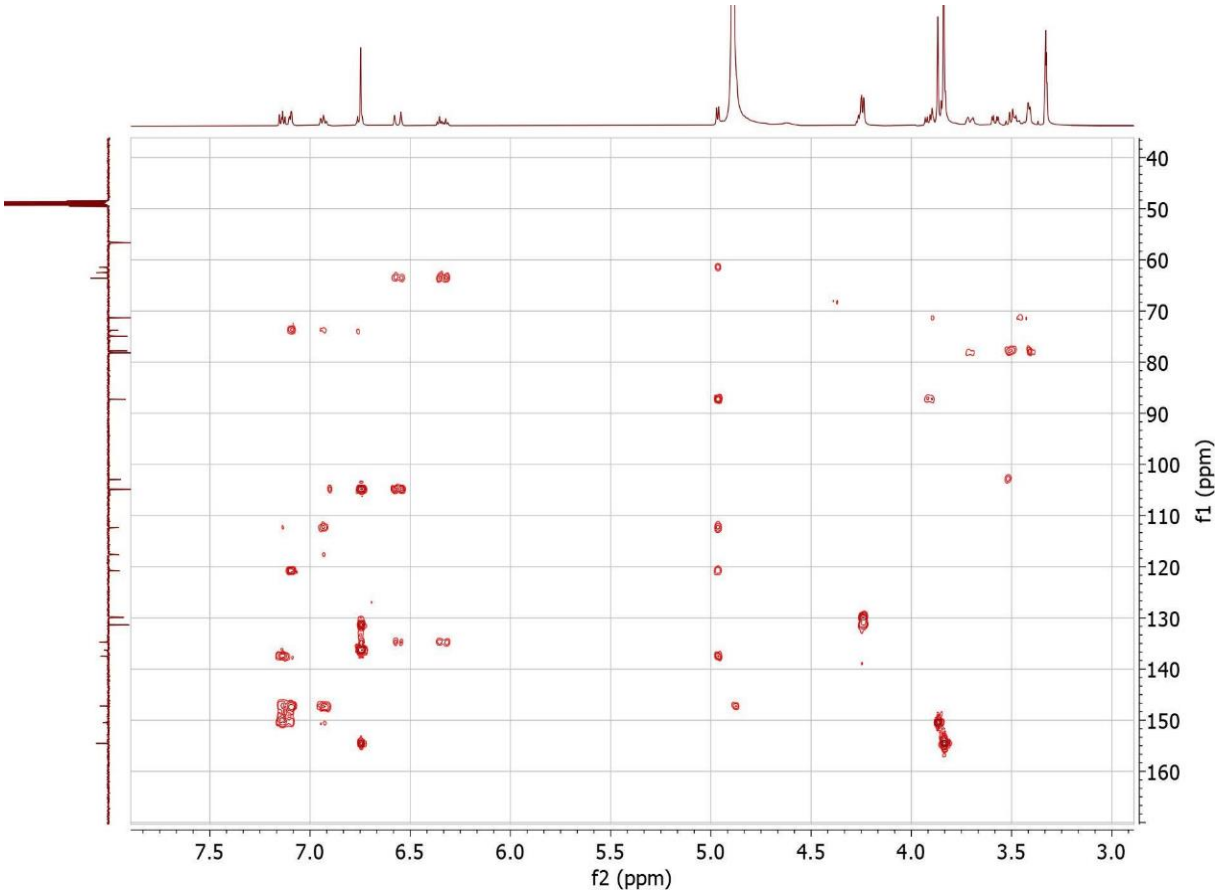
Phụ lục 2.13.1. Phổ ^{1}H-NMR (500 MHz, CD_3OD) của hợp chất **WI13**



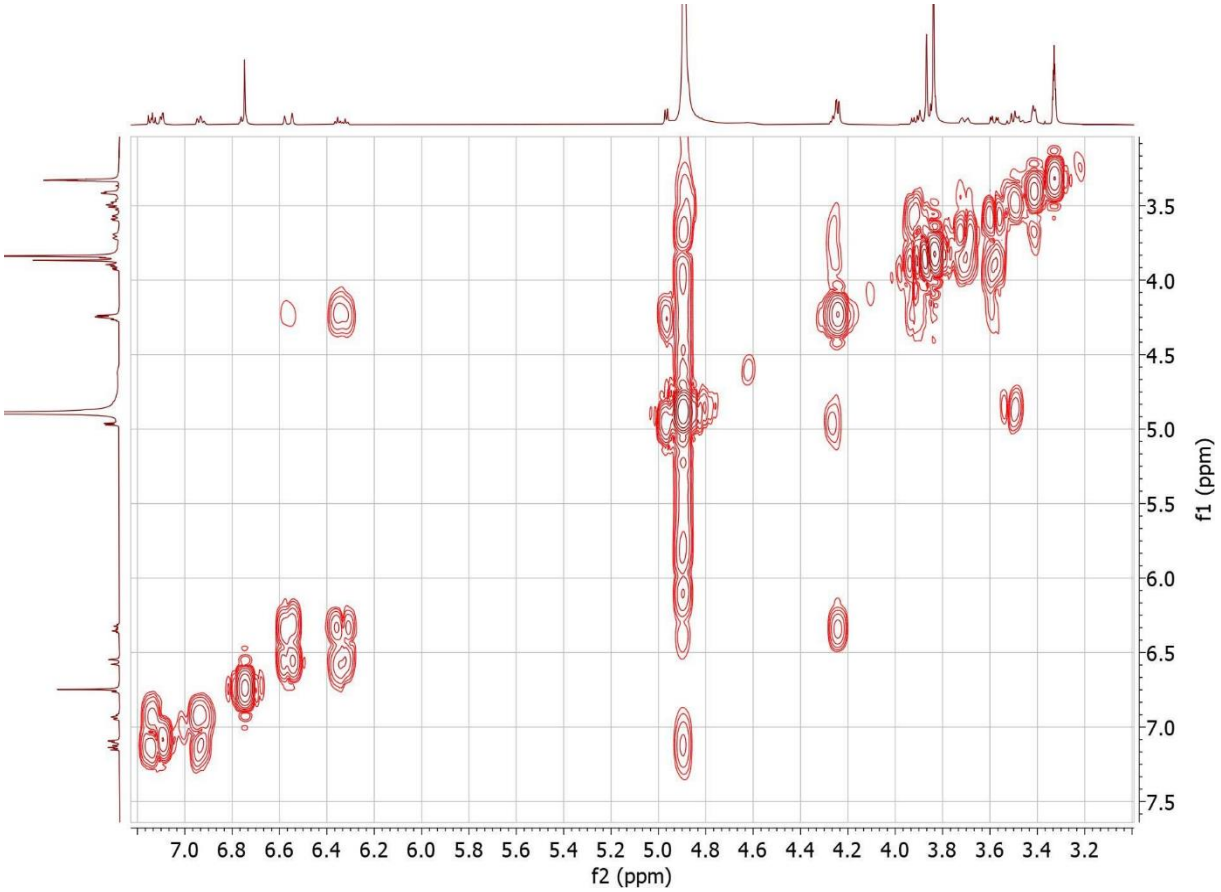
Phụ lục 2.13.2. Phổ ^{13}C-APT NMR (125 MHz, CD_3OD) của hợp chất **WI13**



Phụ lục 2.13.3. Phổ HSQC (500/125 MHz, CD_3OD) của hợp chất **WI13**

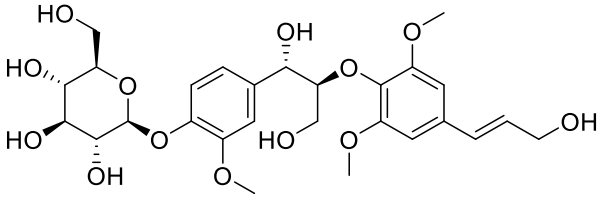


Phụ lục 2.13.4. Phổ HMBC (500/125 MHz, CD_3OD) của hợp chất **WI13**



Phụ lục 2.13.5. Phổ ^{1}H-^{1}H COSY (500/500 MHz, CD_3OD) của hợp chất **WI13**

PHỤ LỤC 2.14. DỮ LIỆU PHỔ CỦA HỢP CHẤT WI14



CTPT: $C_{27}H_{36}O_{13}$
M = 568,2156

Cấu trúc hóa học của hợp chất **WI13**

Phụ lục 2.14.1. Phổ ^{1}H-NMR (500 MHz, CD_3OD) của hợp chất **WI14**

Phụ lục 2.14.2. Phổ ^{13}C-APT NMR (125 MHz, CD_3OD) của hợp chất **WI14**

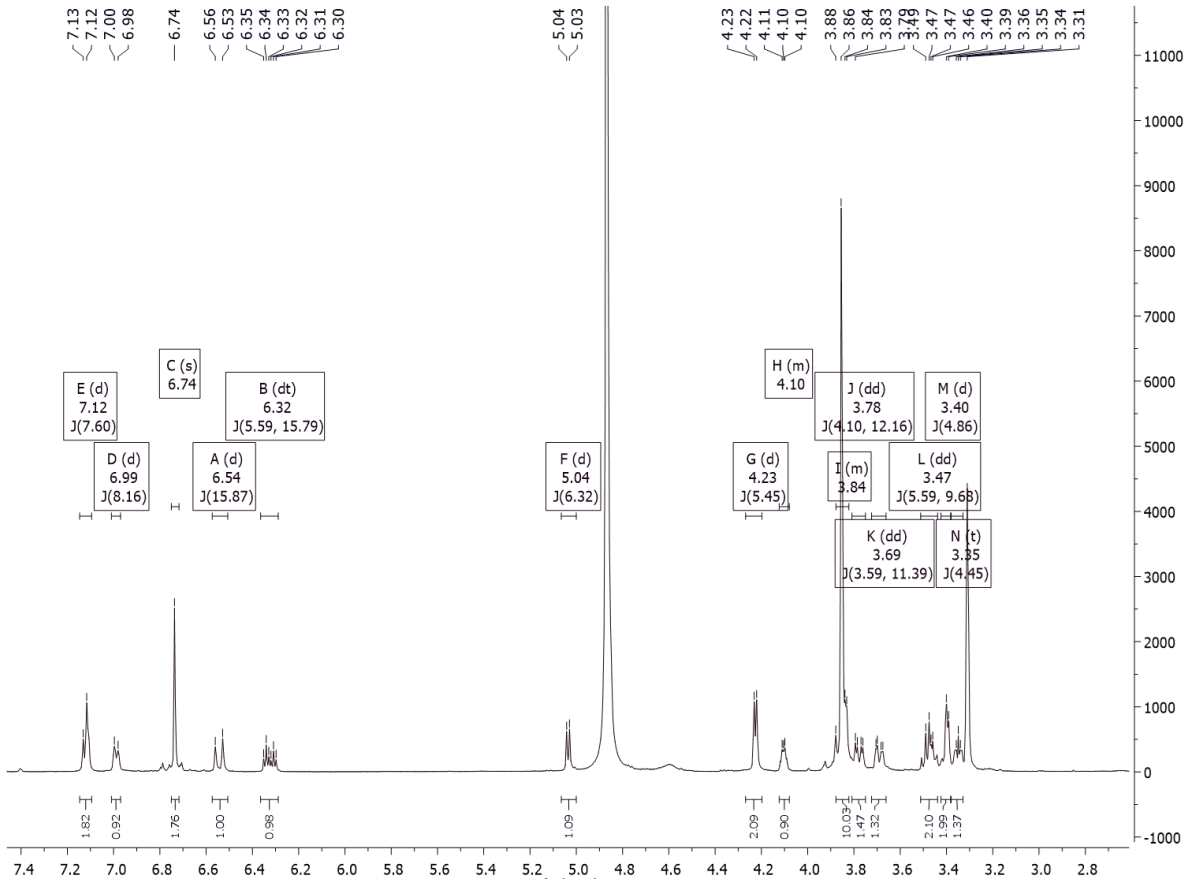
Phụ lục 2.14.3. Phổ HSQC (500/125 MHz, CD_3OD) của hợp chất **WI14**

Phụ lục 2.14.4. Phổ HMBC (500/125 MHz, CD_3OD) của hợp chất **WI14**

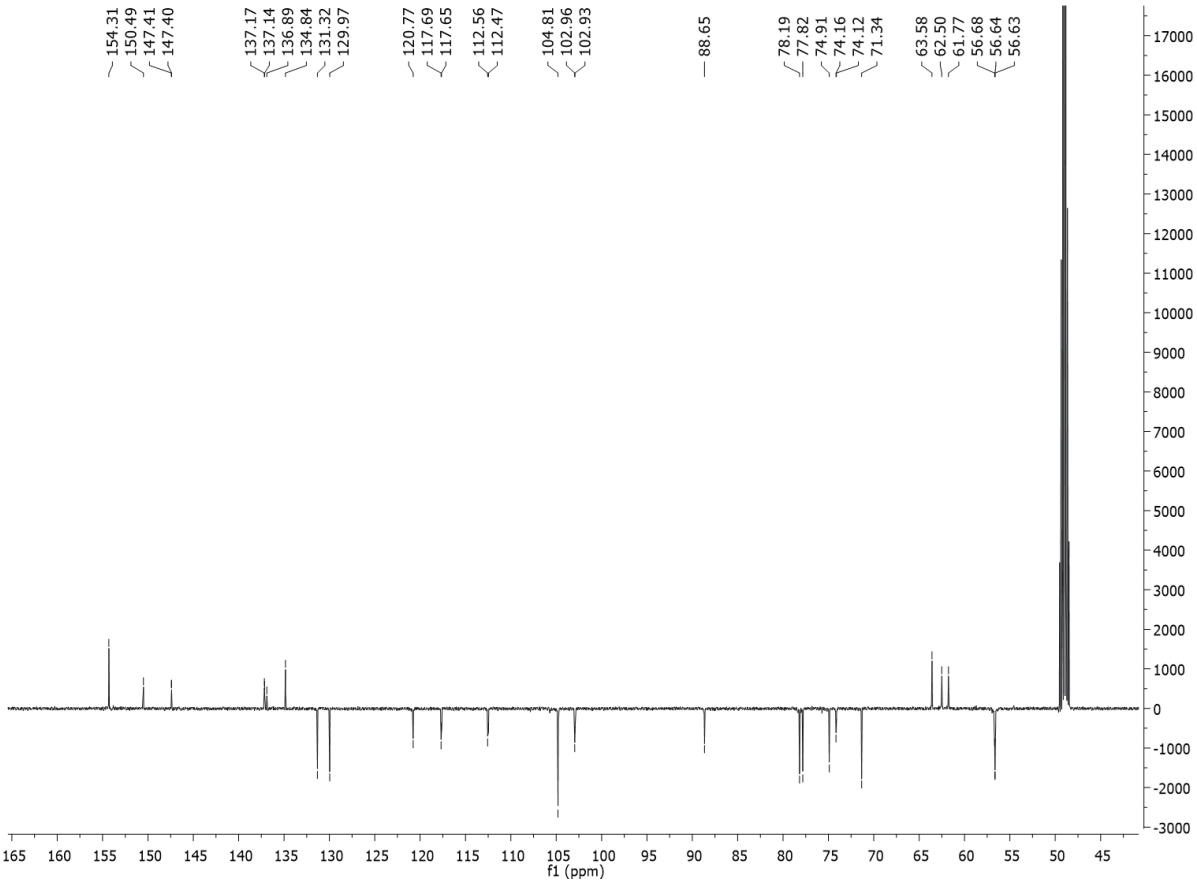
Phụ lục 2.14.5. Phổ ^{1}H-^{1}H COSY (500/500 MHz, CD_3OD) của hợp chất **WI14**

Phụ lục 2.14.6. Phổ NOESY (500/500 MHz, CD_3OD) của hợp chất **WI14**

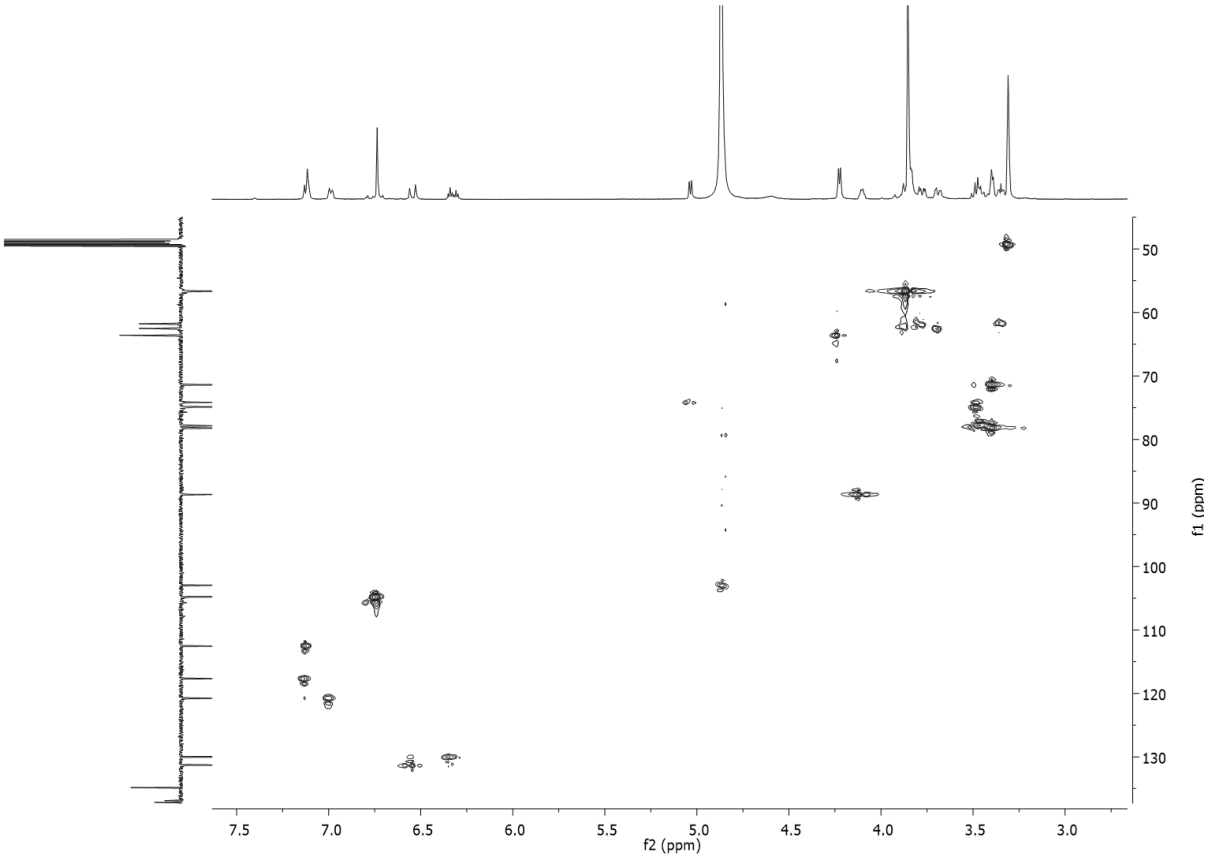
Phụ lục 2.14.7. Phổ HR-ESI-MS/MS của hợp chất **WI14**



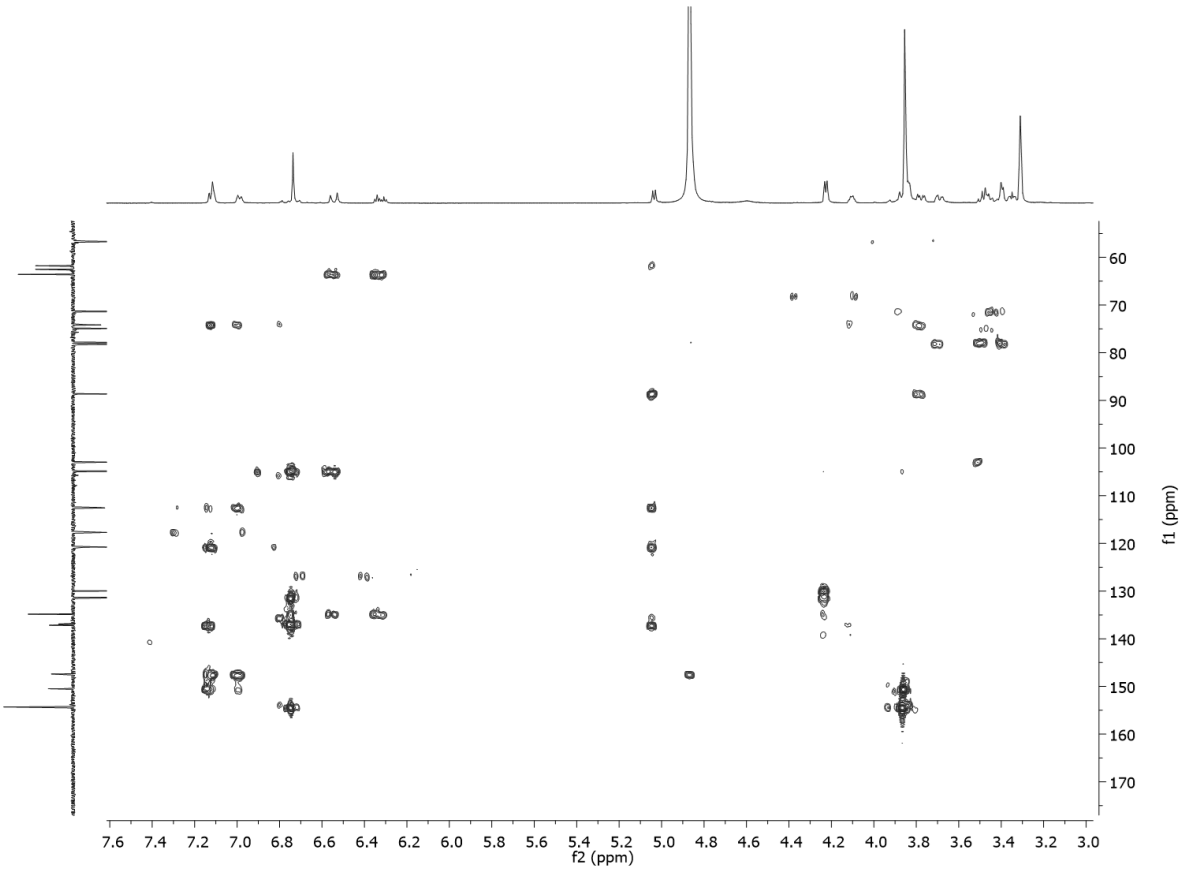
Phụ lục 2.14.1. Phổ ^{1}H-NMR (500 MHz, CD_3OD) của hợp chất **WI14**



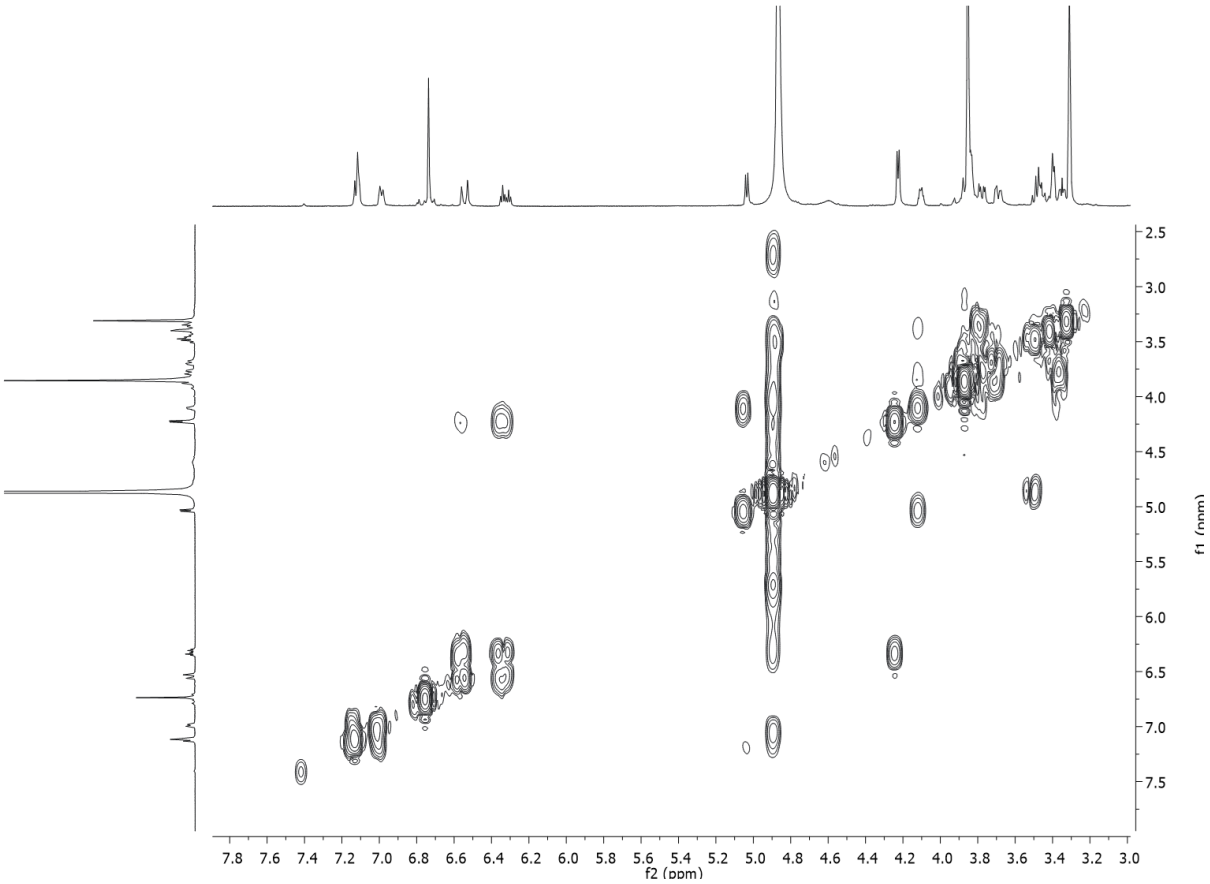
Phụ lục 2.14.2. Phổ ^{13}C-APT NMR (125 MHz, CD_3OD) của hợp chất **WI14**



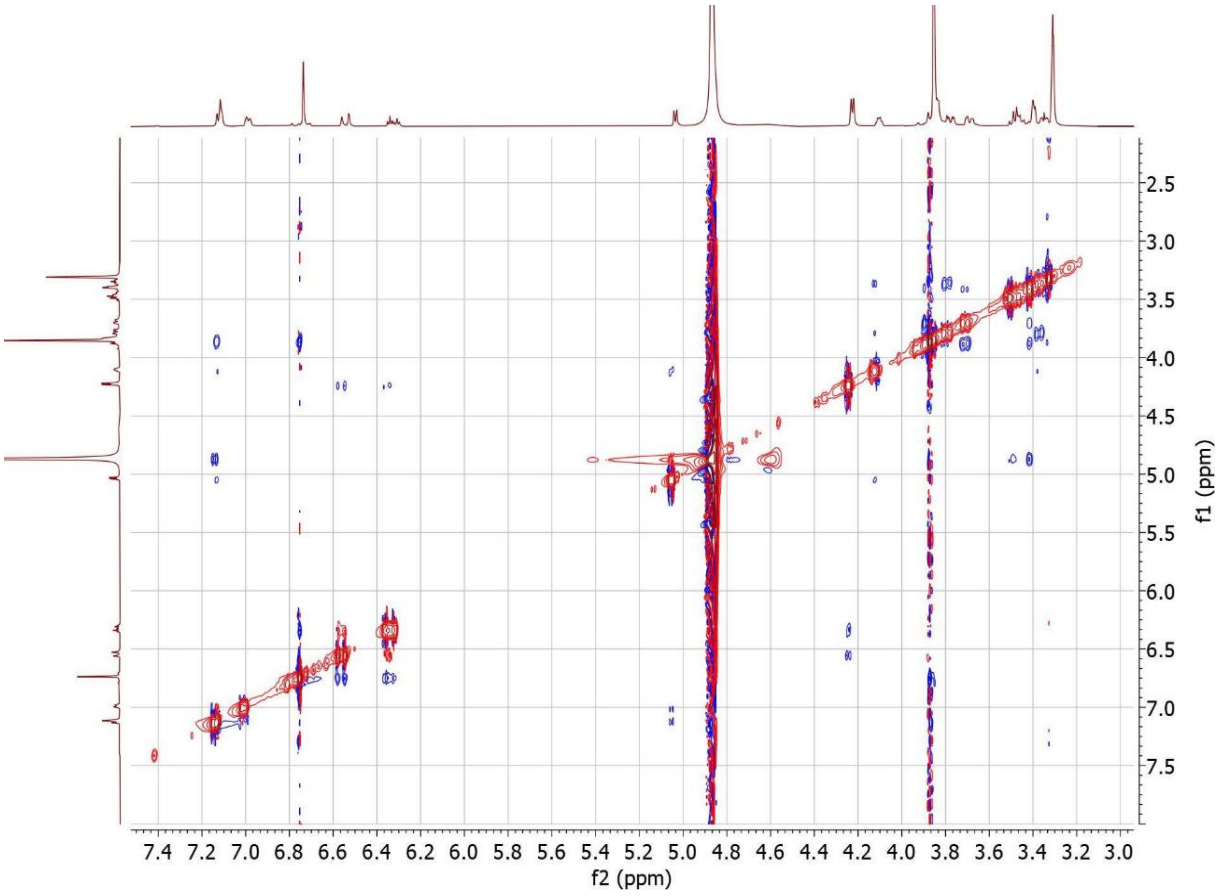
Phụ lục 2.14.3. Phổ HSQC (500/125 MHz, CD_3OD) của hợp chất **WI14**



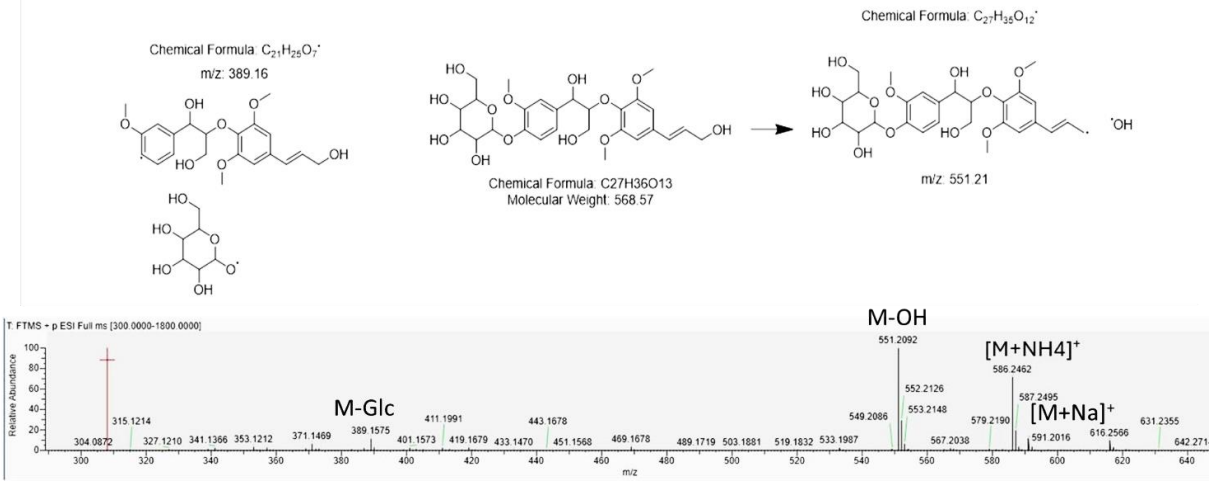
Phụ lục 2.14.4. Phổ HMBC (500/125 MHz, CD_3OD) của hợp chất **WI14**



Phụ lục 2.14.5. Phổ ^{1}H-^{1}H COSY (500/500 MHz, CD_3OD) của hợp chất **WI14**

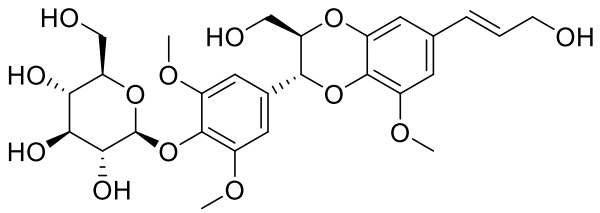


Phụ lục 2.14.6. Phổ NOESY (500/500 MHz, CD_3OD) của hợp chất **WI14**



Phụ lục 2.14.7. Phổ HR-ESI-MS/MS của hợp chất **WI14**

PHỤ LỤC 2.15. DỮ LIỆU PHỔ CỦA HỢP CHẤT WI15



CTHH: $C_{27}H_{34}O_{13}$
M = 566,1999

Cấu trúc hóa học của hợp chất **WI15**

Phụ lục 2.15.1. Phổ ^{1}H-NMR (500 MHz, DMSO-d_6 (A), CD_3OD (B)) của hợp chất **WI15**

Phụ lục 2.15.2. Phổ DEPT-135 (CD_3OD (A), DMSO-d_6 (B)) của hợp chất **WI15**

Phụ lục 2.15.3. Phổ ^{13}C-NMR (125 MHz, DMSO-d_6) của hợp chất **WI15**

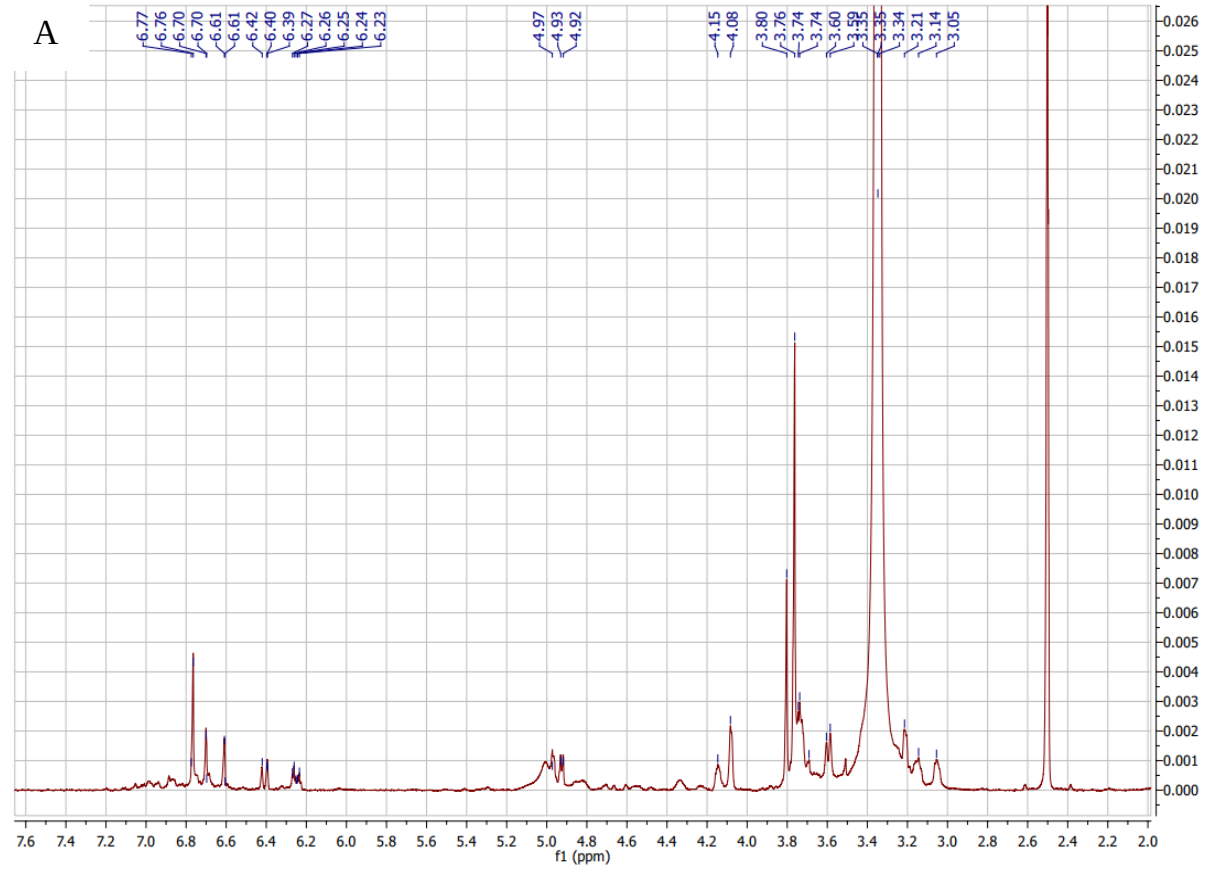
Phụ lục 2.15.4. Phổ HSQC (500/125 MHz, DMSO-d_6) của hợp chất **WI15**

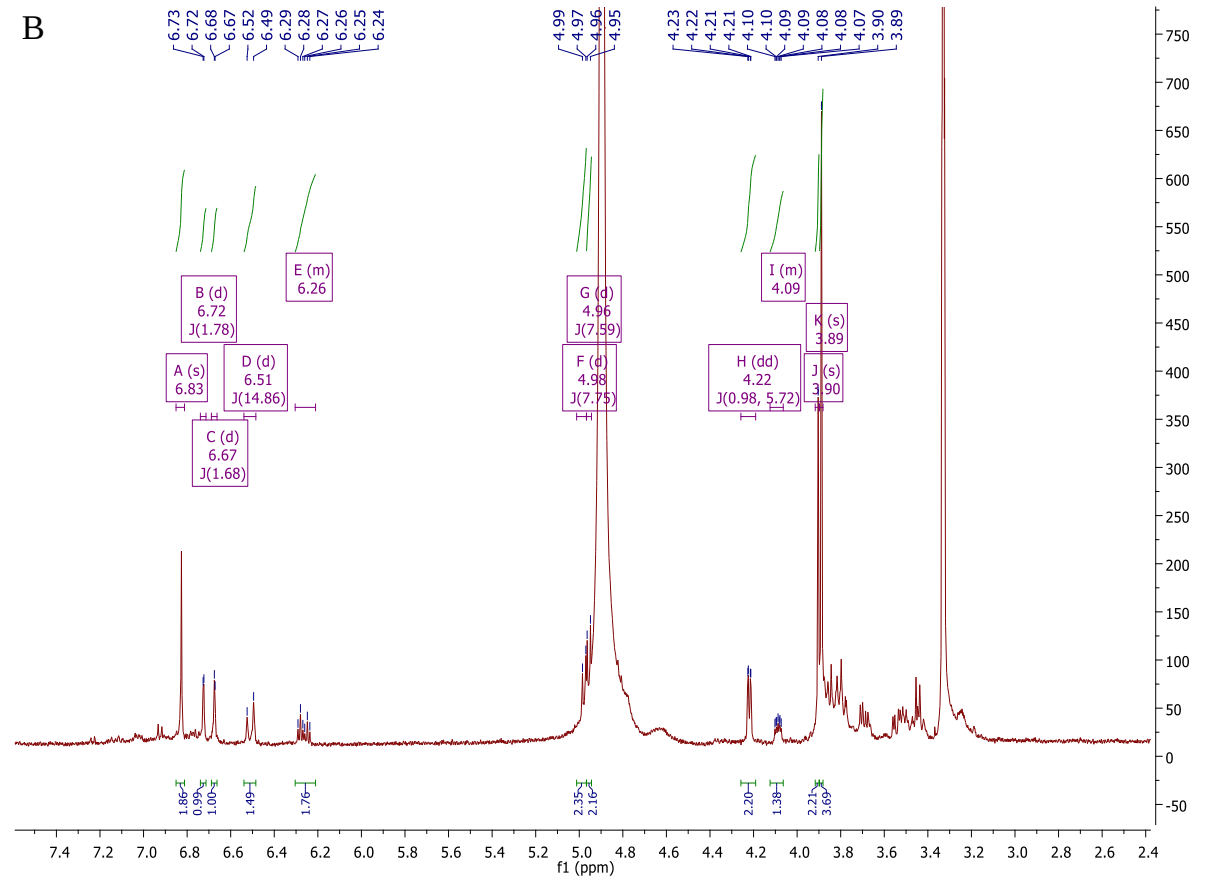
Phụ lục 2.15.5. Phổ HMBC (500/125 MHz, DMSO-d_6) của hợp chất **WI15**

Phụ lục 2.15.6. Phổ ^{1}H-^{1}H COSY (500/500 MHz, DMSO-d_6) của hợp chất **WI15**

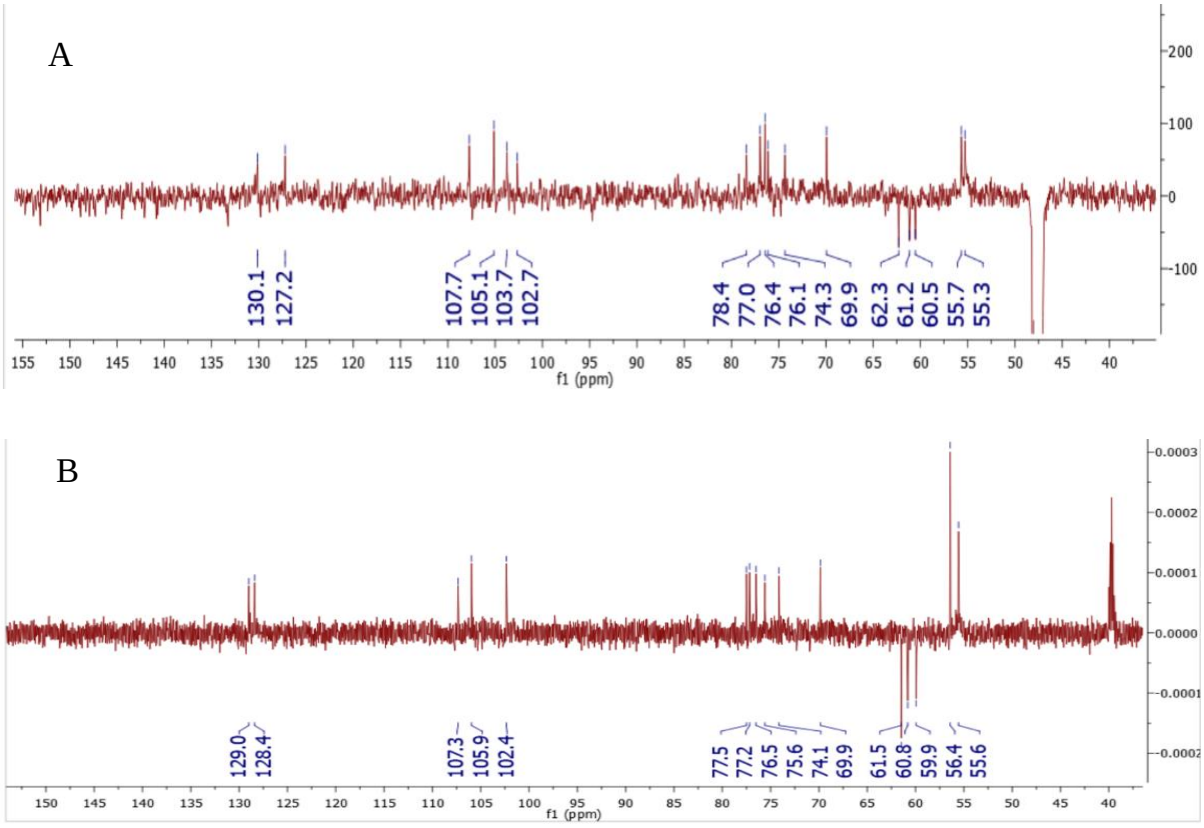
Phụ lục 2.15.7. Phổ HR-ESI-MS/MS của hợp chất **WI15**

Phụ lục 2.15.8. Phổ ECD thực nghiệm của hợp chất **WI15**

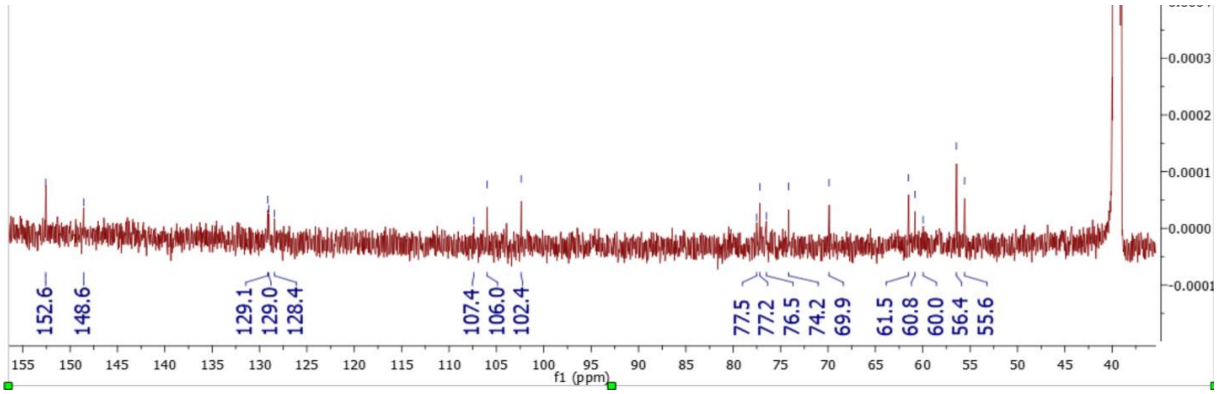

A
6.77
6.76
6.70
6.70
6.61
6.61
6.42
6.40
6.39
6.27
6.26
6.25
6.24
6.23
4.97
4.93
4.92
4.15
4.08
3.80
3.76
3.74
3.74
3.60
3.35
3.34
3.21
3.14
3.05
f1 (ppm)


B
6.73
6.72
6.68
6.67
6.52
6.49
6.29
6.28
6.27
6.26
6.25
6.24
4.99
4.97
4.96
4.95
4.23
4.22
4.21
4.21
4.10
4.10
4.09
4.09
4.08
4.08
4.07
3.90
3.89
B (d)
6.72
J(1.78)
E (m)
6.26
A (s)
6.83
D (d)
6.51
J(14.86)
C (d)
6.67
J(1.68)
G (d)
4.96
J(7.59)
F (d)
4.98
J(7.75)
I (m)
4.09
K (s)
3.89
H (dd)
4.22
J(0.98, 5.72)
J (s)
3.90
1.86
0.99
1.00
1.49
1.76
2.35
2.16
2.20
1.38
2.21
3.69
f1 (ppm)

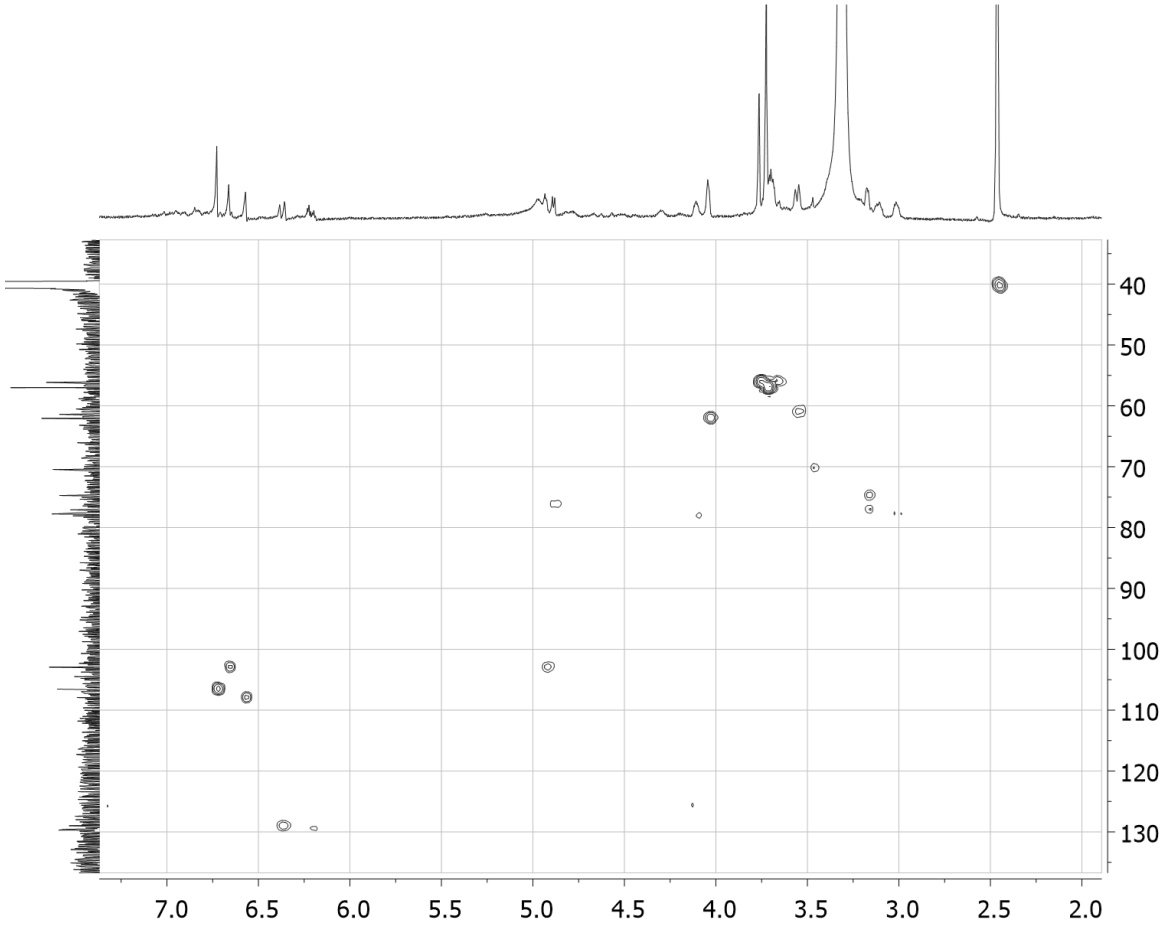
Phụ lục 2.15.1. Phổ ^{1}H-NMR (500 MHz, DMSO-d_6 (A), CD_3OD (B)) của hợp chất **WI15**



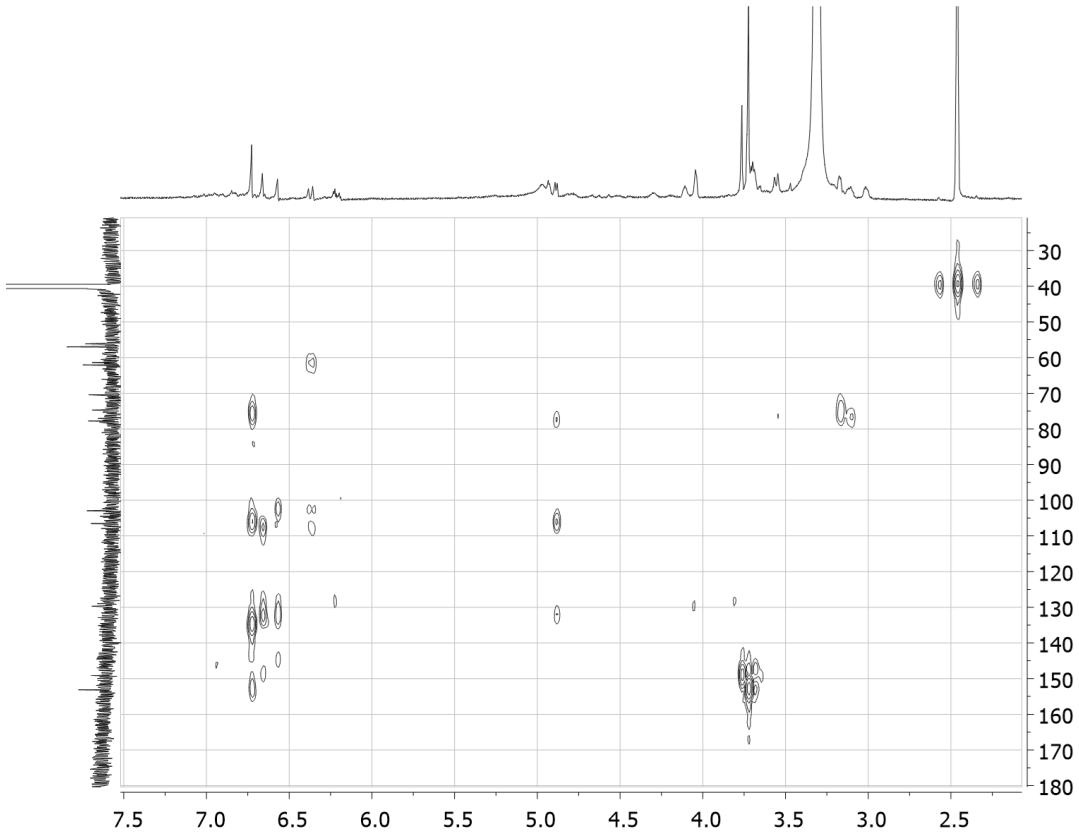
Phụ lục 2.15.2. Phổ DEPT-135 (CD_3OD (A), DMSO-d_6 (B)) của hợp chất **WI15**



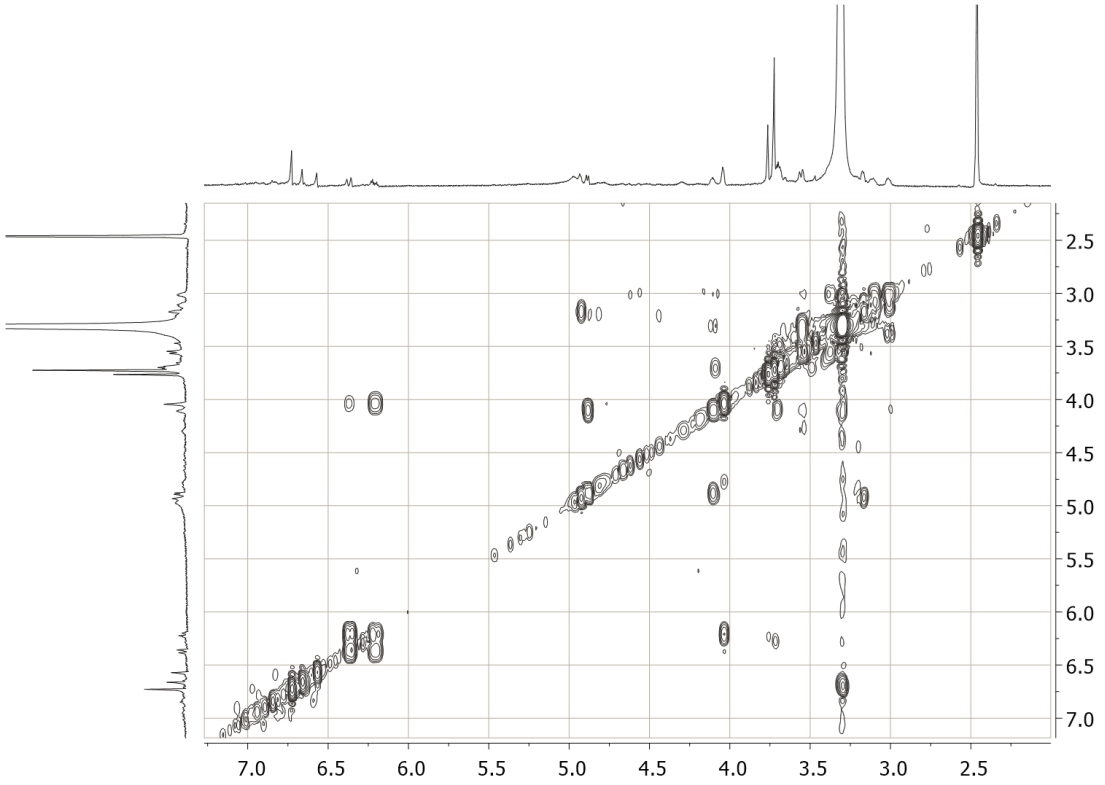
Phụ lục 2.15.3. Phổ ^{13}C-NMR (125 MHz, DMSO-d_6) của hợp chất **WI15**



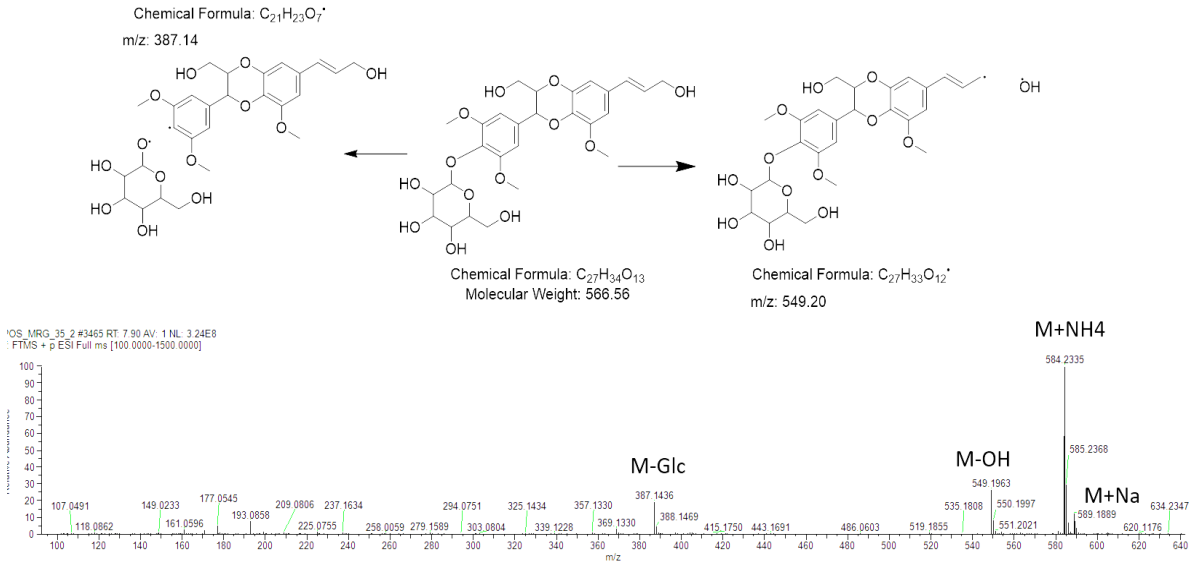
Phụ lục 2.15.4. Phổ HSQC (500/125 MHz, DMSO-d_6) của hợp chất **WI15**



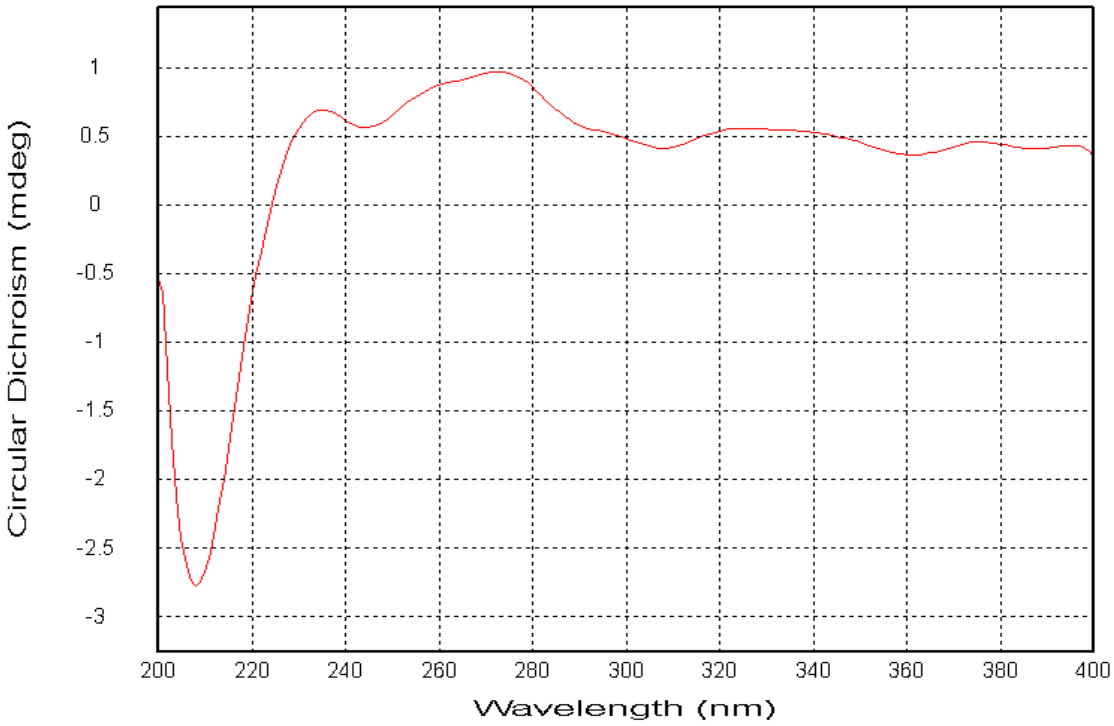
Phụ lục 2.15.5. Phổ HMBC (500/125 MHz, DMSO-d_6) của hợp chất **WI15**



Phụ lục 2.15.6. Phổ ^{1}H-^{1}H COSY (500/500 MHz, DMSO-d_6) của hợp chất **WI15**

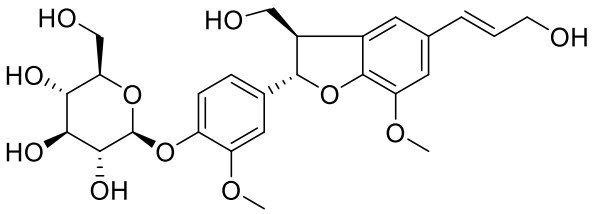


Phụ lục 2.15.7. Phổ HR-ESI-MS/MS của hợp chất **WI15**



Phụ lục 2.15.8. Phổ ECD thực nghiệm của hợp chất **WI15**

PHỤ LỤC 2.16. DỮ LIỆU PHỔ CỦA HỢP CHẤT WI16



CTPT: $C_{26}H_{32}O_{11}$
M = 520,19

Cấu trúc hóa học của hợp chất **WI16**

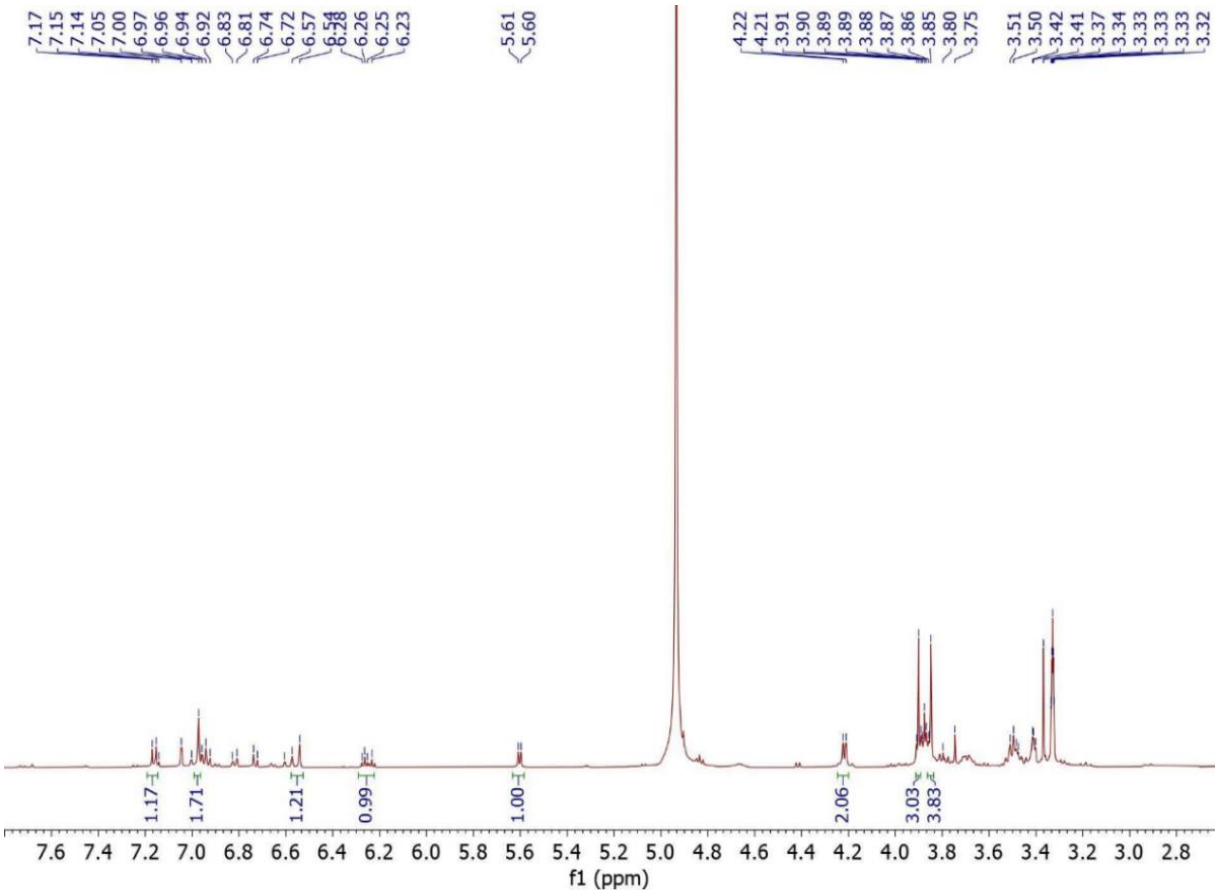
Phụ lục 2.16.1. Phổ ^{1}H-NMR (500 MHz, CD_3OD) của hợp chất **WI16**

Phụ lục 2.16.2. Phổ ^{13}C-NMR (125 MHz, CD_3OD) của hợp chất **WI16**

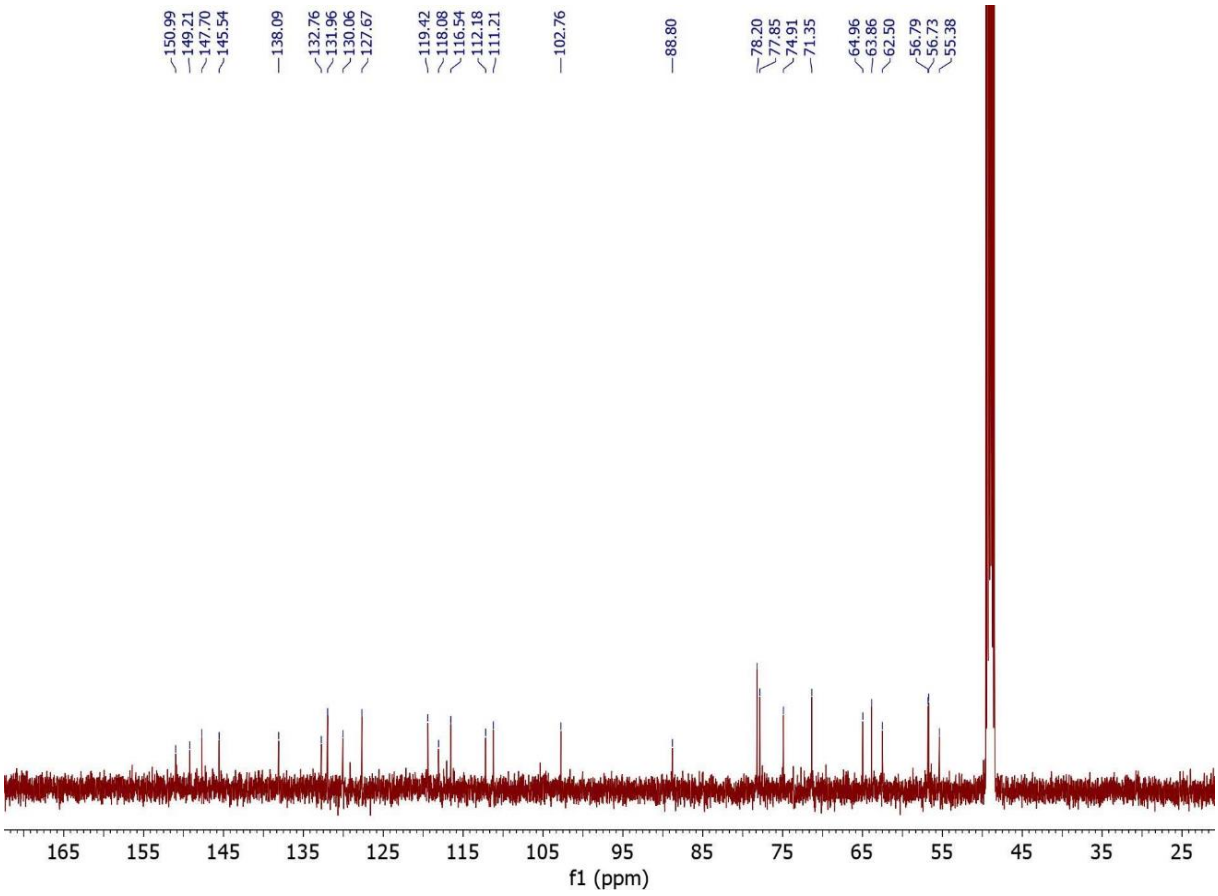
Phụ lục 2.16.3. Phổ HMQC (500/125 MHz, CD_3OD) của hợp chất **WI16**

Phụ lục 2.16.4. Phổ HMBC (500/125 MHz, CD_3OD) của hợp chất **WI16**

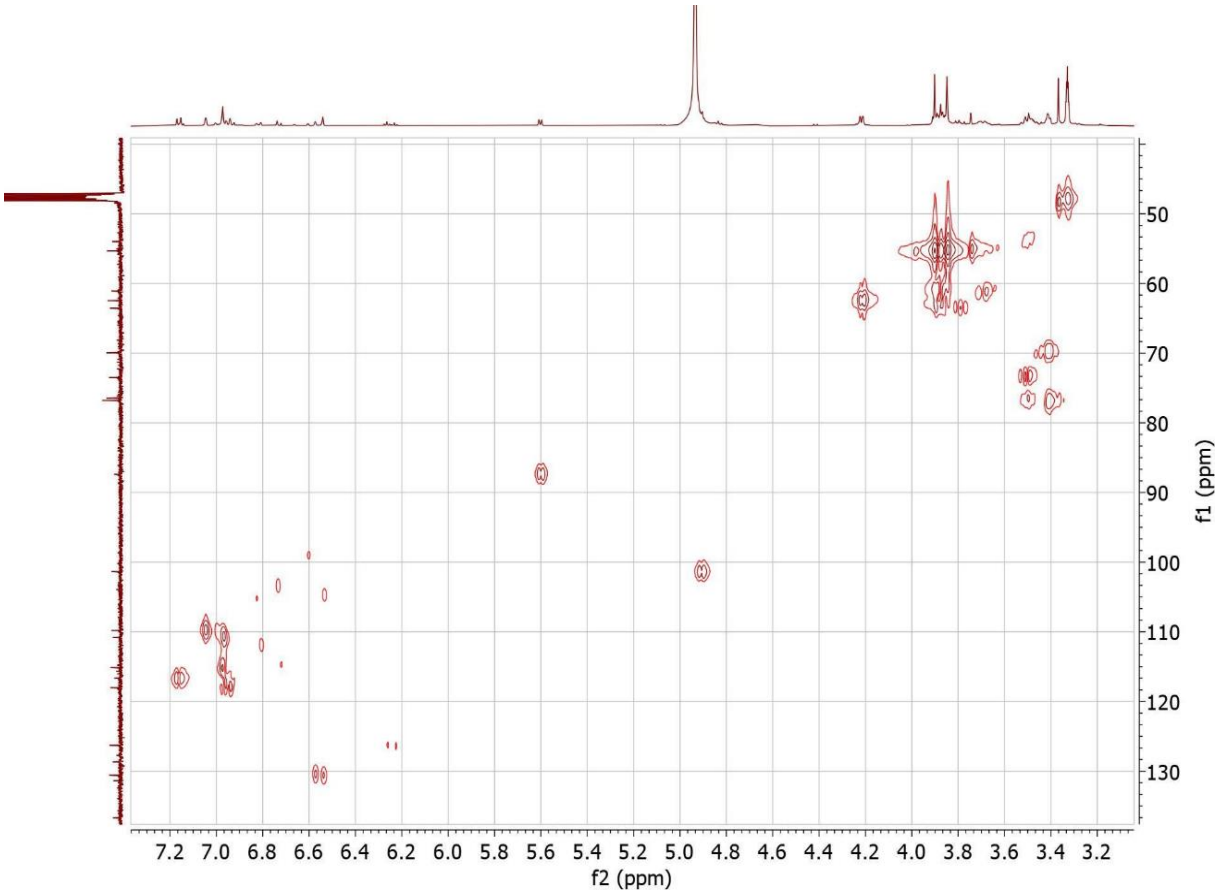
Phụ lục 2.16.5. Phổ ESI-MS của hợp chất **WI16**



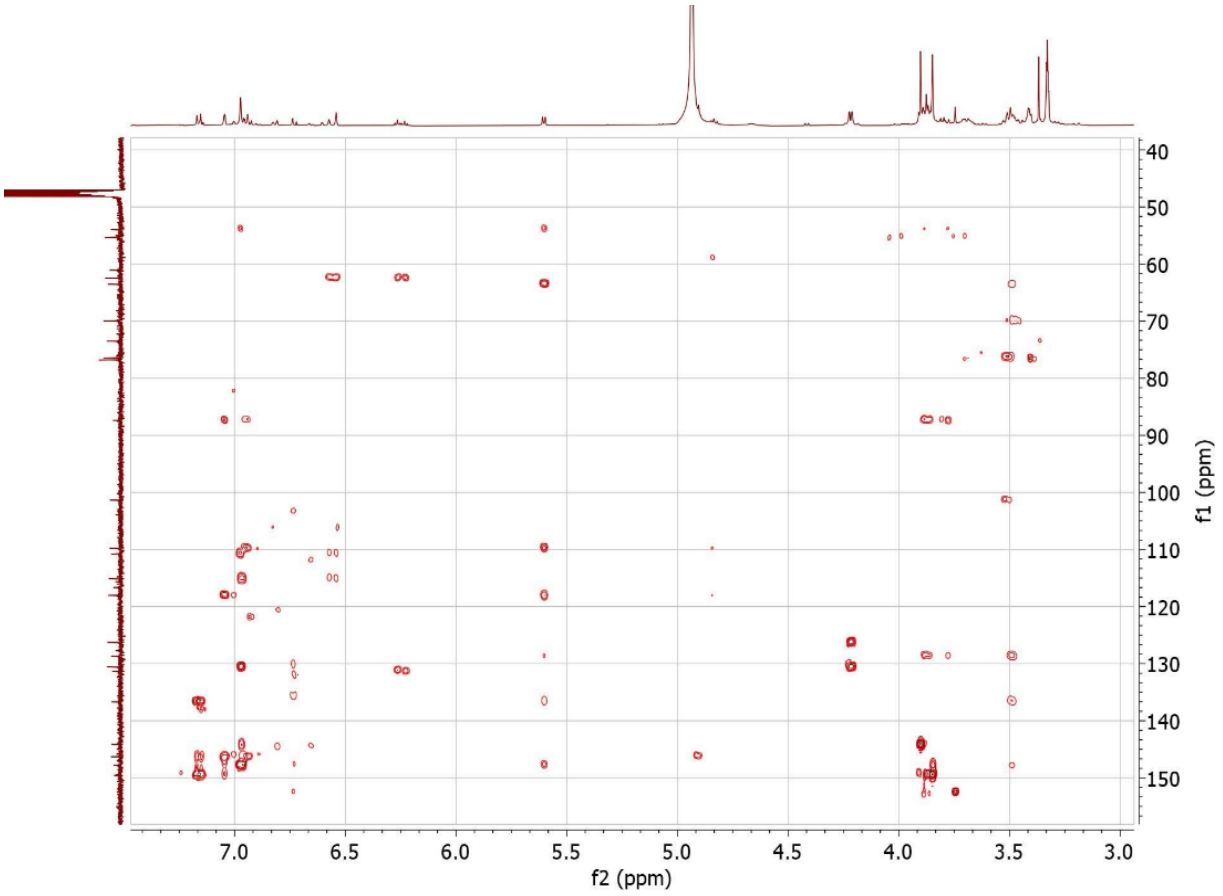
Phụ lục 2.16.1. Phổ ^{1}H-NMR (500 MHz, CD_3OD) của hợp chất **WI16**



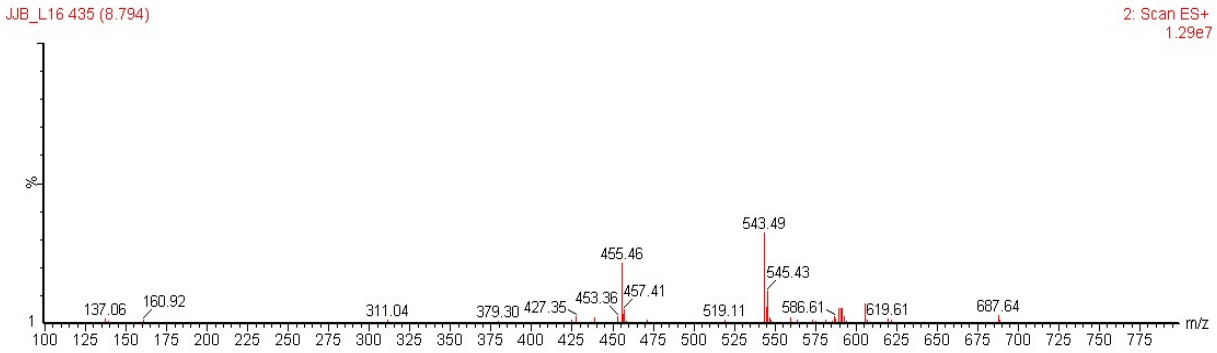
Phụ lục 2.16.2. Phổ ^{13}C-NMR (125 MHz, CD_3OD) của hợp chất **WI16**



Phụ lục 2.16.3. Phổ HMQC (500/125 MHz, CD_3OD) của hợp chất **WI16**

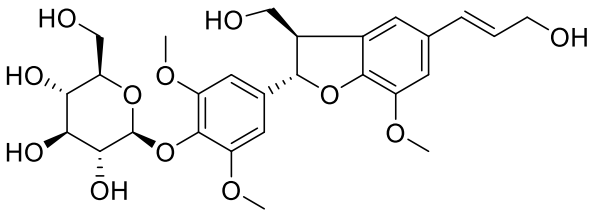


Phụ lục 2.16.4. Phổ HMBC (500/125 MHz, CD_3OD) của hợp chất WI16



Phụ lục 2.16.5. Phổ ESI-MS của hợp chất **WI16**

PHỤ LỤC 2.17. DỮ LIỆU PHỔ CỦA HỢP CHẤT WI17



CTHH: $C_{27}H_{34}O_{12}$
M = 550,21

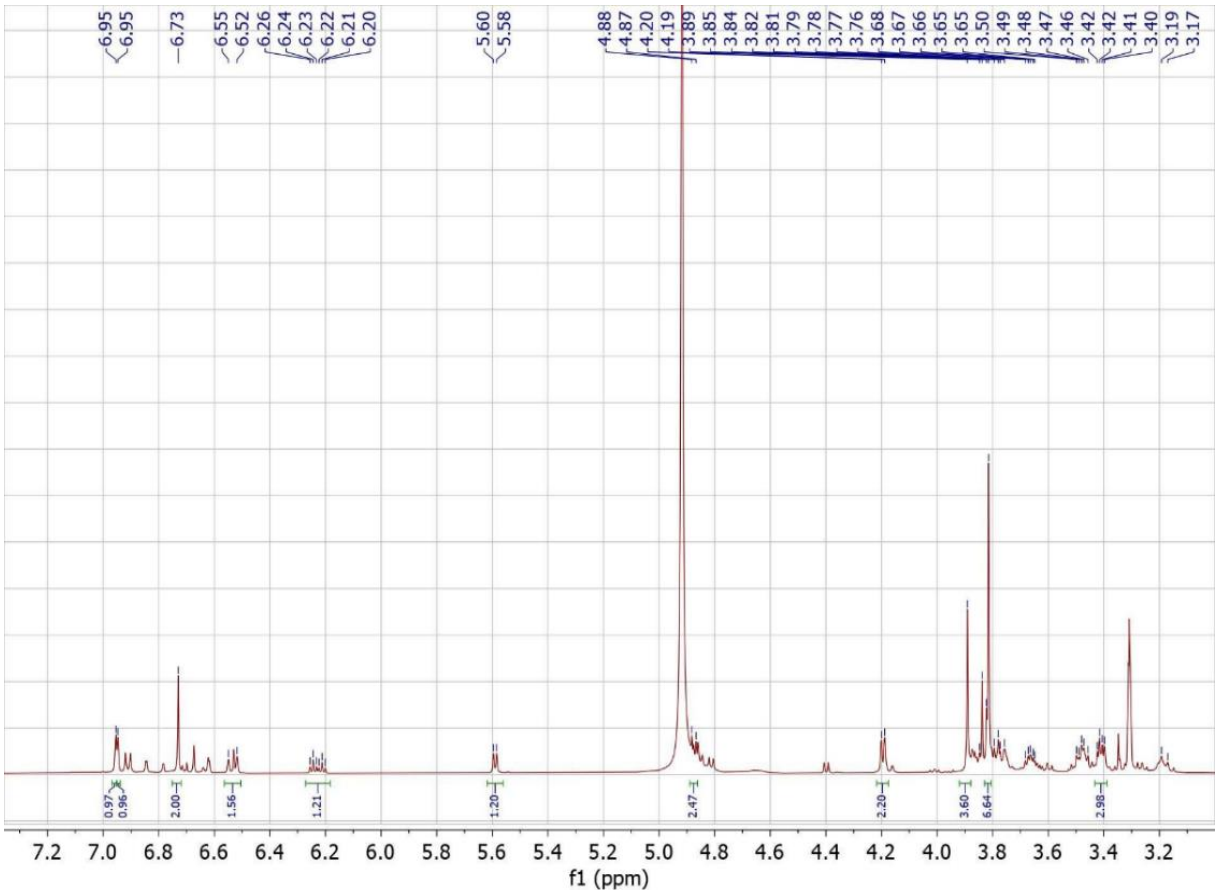
Cấu trúc hóa học của hợp chất **WI17**

Phụ lục 2.17.1. Phổ ^{1}H-NMR (500 MHz, CD_3OD) của hợp chất **WI17**

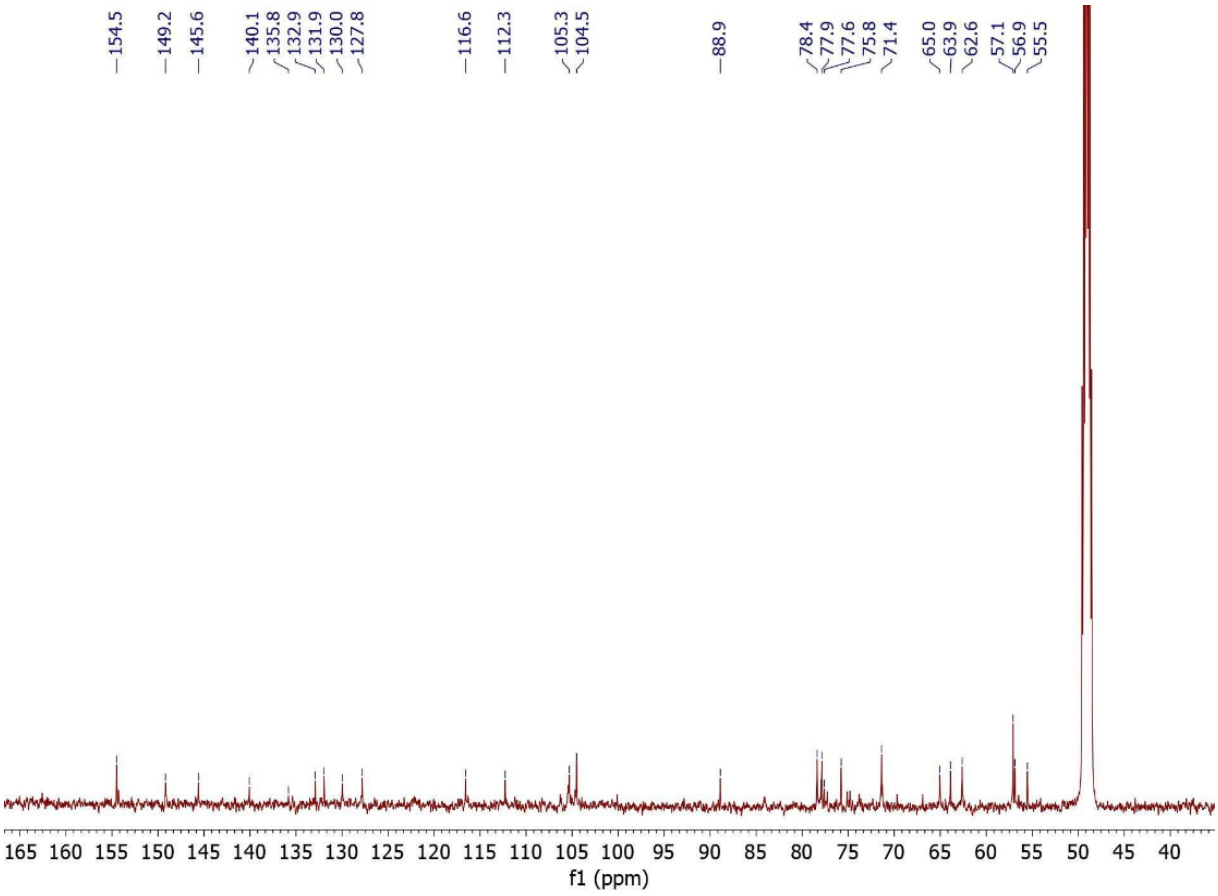
Phụ lục 2.17.2. Phổ ^{13}C-NMR (125 MHz, CD_3OD) của hợp chất **WI17**

Phụ lục 2.17.3. Phổ HMQC (500/125 MHz, CD_3OD) của hợp chất **WI17**

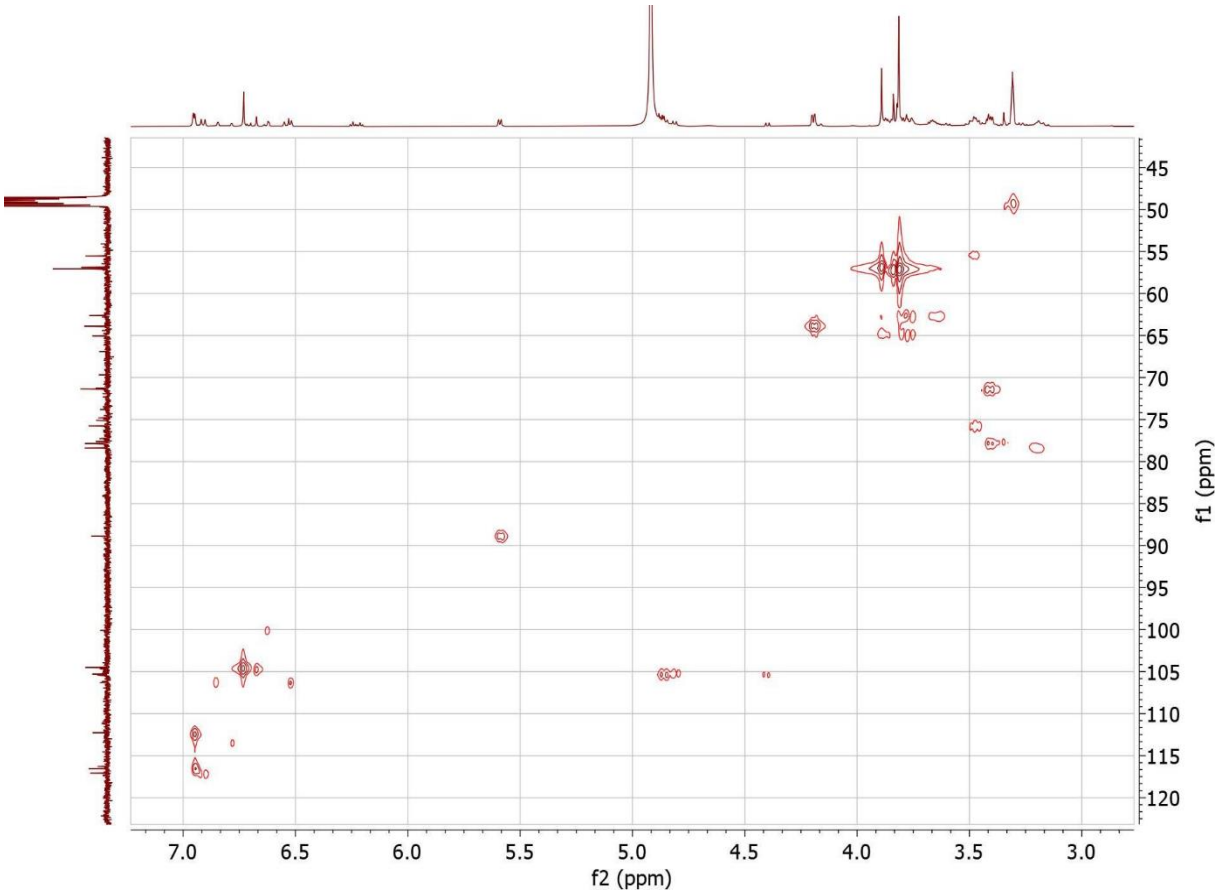
Phụ lục 2.17.4. Phổ HMBC (500/125 MHz, CD_3OD) của hợp chất **WI17**



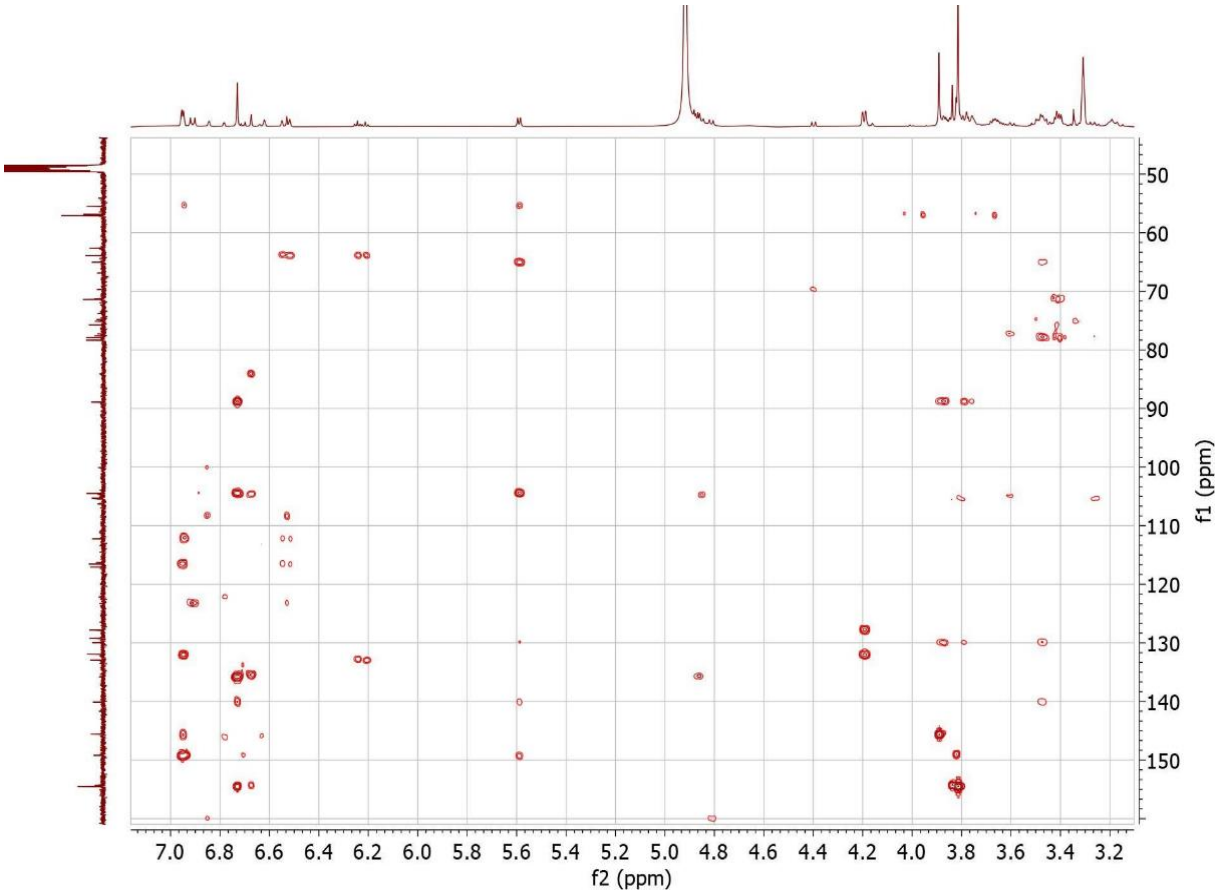
Phụ lục 2.17.1. Phổ ^{1}H-NMR (500 MHz, CD_3OD) của hợp chất **WI17**



Phụ lục 2.17.2. Phổ ^{13}C-NMR (125 MHz, CD_3OD) của hợp chất **WI17**

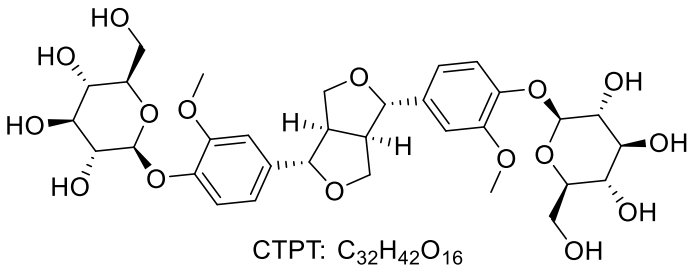


Phụ lục 2.17.3. Phổ HMQC (500/125 MHz, CD_3OD) của hợp chất **WI17**



Phụ lục 2.17.4. Phổ HMBC (500/125 MHz, CD_3OD) của hợp chất **WI17**

PHỤ LỤC 2.18. DỮ LIỆU PHỔ CỦA HỢP CHẤT WI18



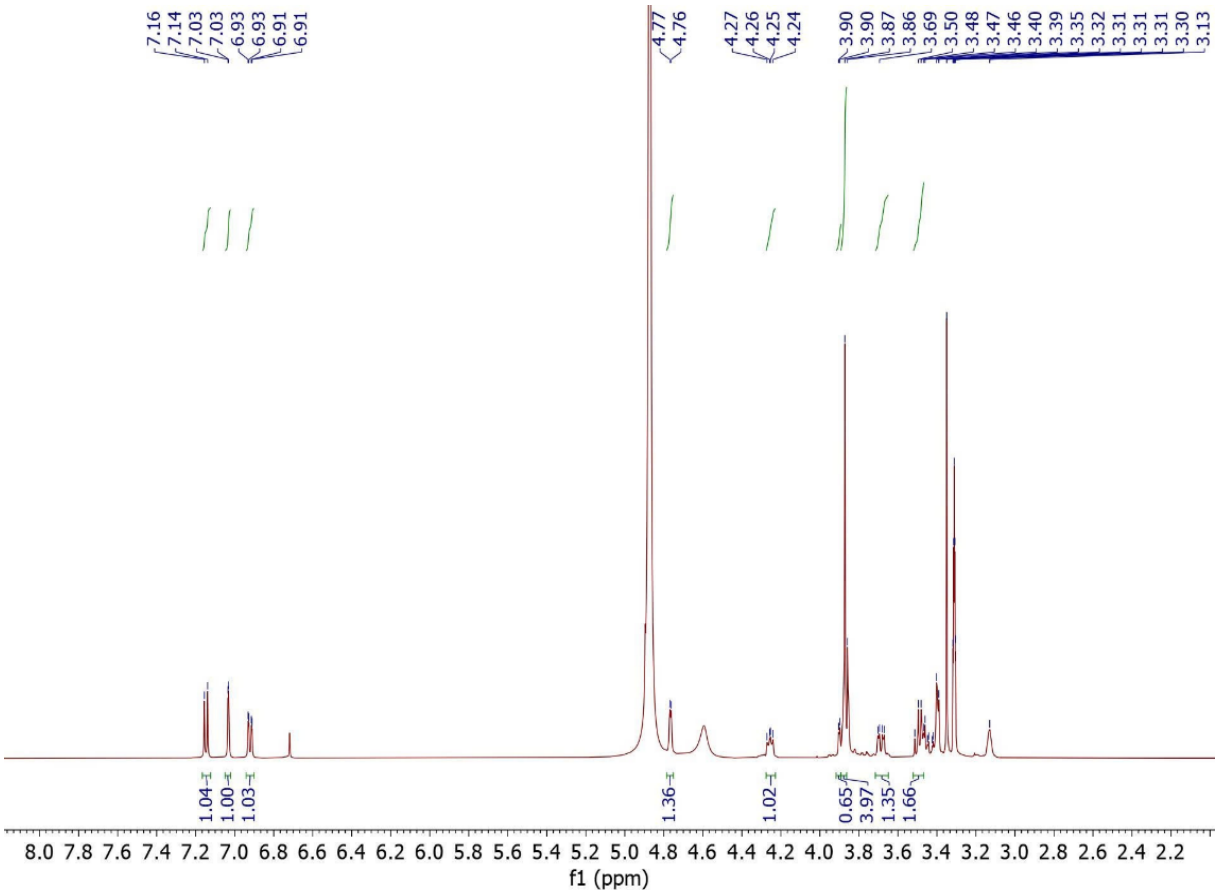
Cấu trúc hóa học của hợp chất **WI18**

Phụ lục 2.18.1. Phổ ^{1}H-NMR (500 MHz, CD_3OD) của hợp chất **WI18**

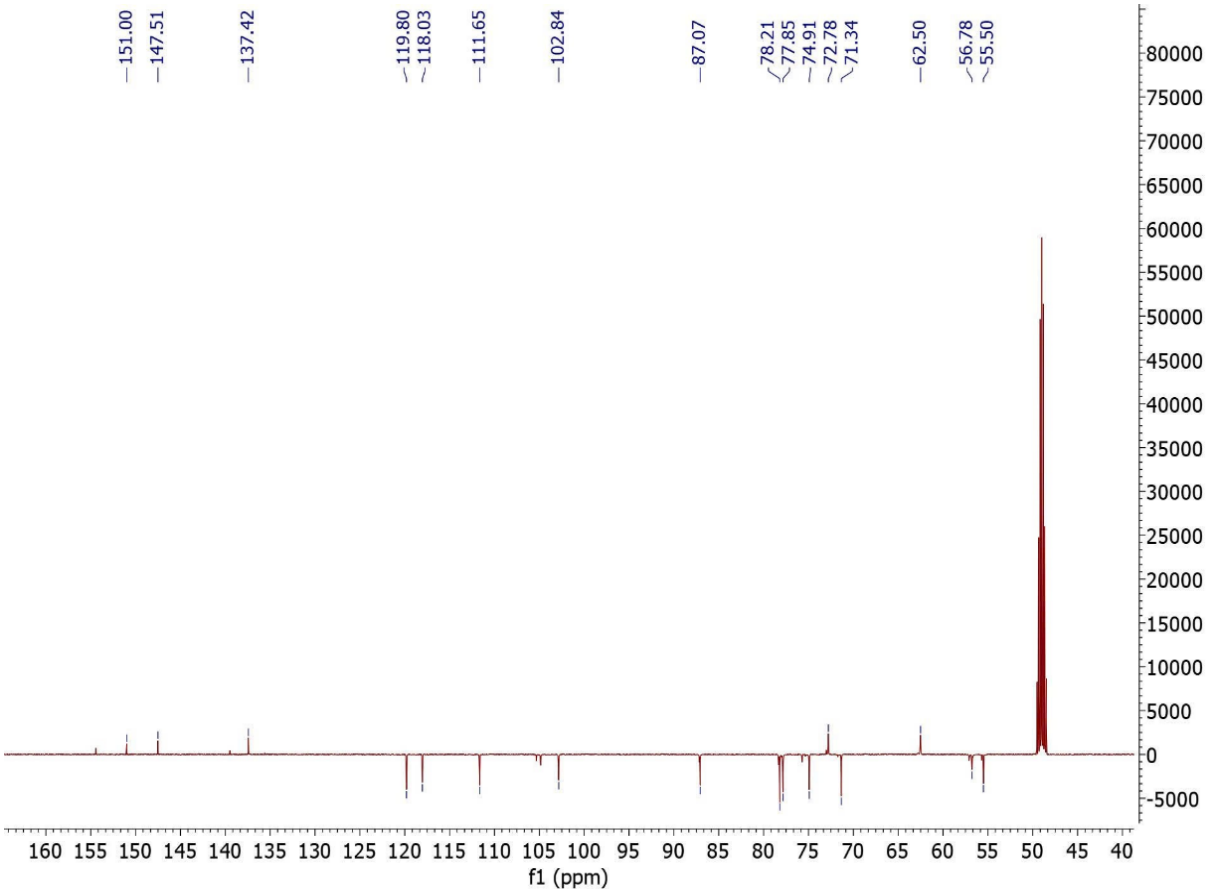
Phụ lục 2.18.2. Phổ ^{13}C-APT NMR (125 MHz, CD_3OD) của hợp chất **WI18**

Phụ lục 2.18.3. Phổ HMQC (500/125 MHz, CD_3OD) của hợp chất **WI18**

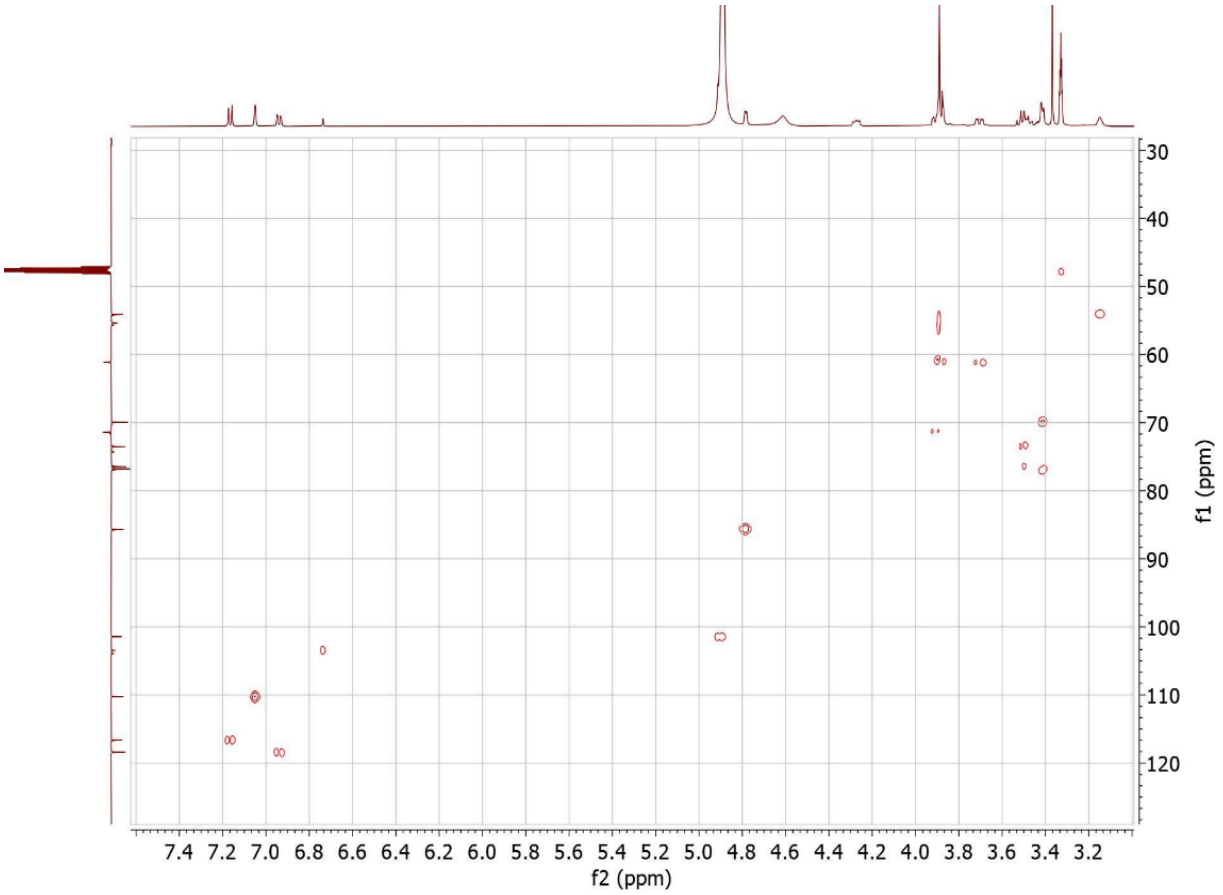
Phụ lục 2.18.4. Phổ HMBC (500/125 MHz, CD_3OD) của hợp chất **WI18**



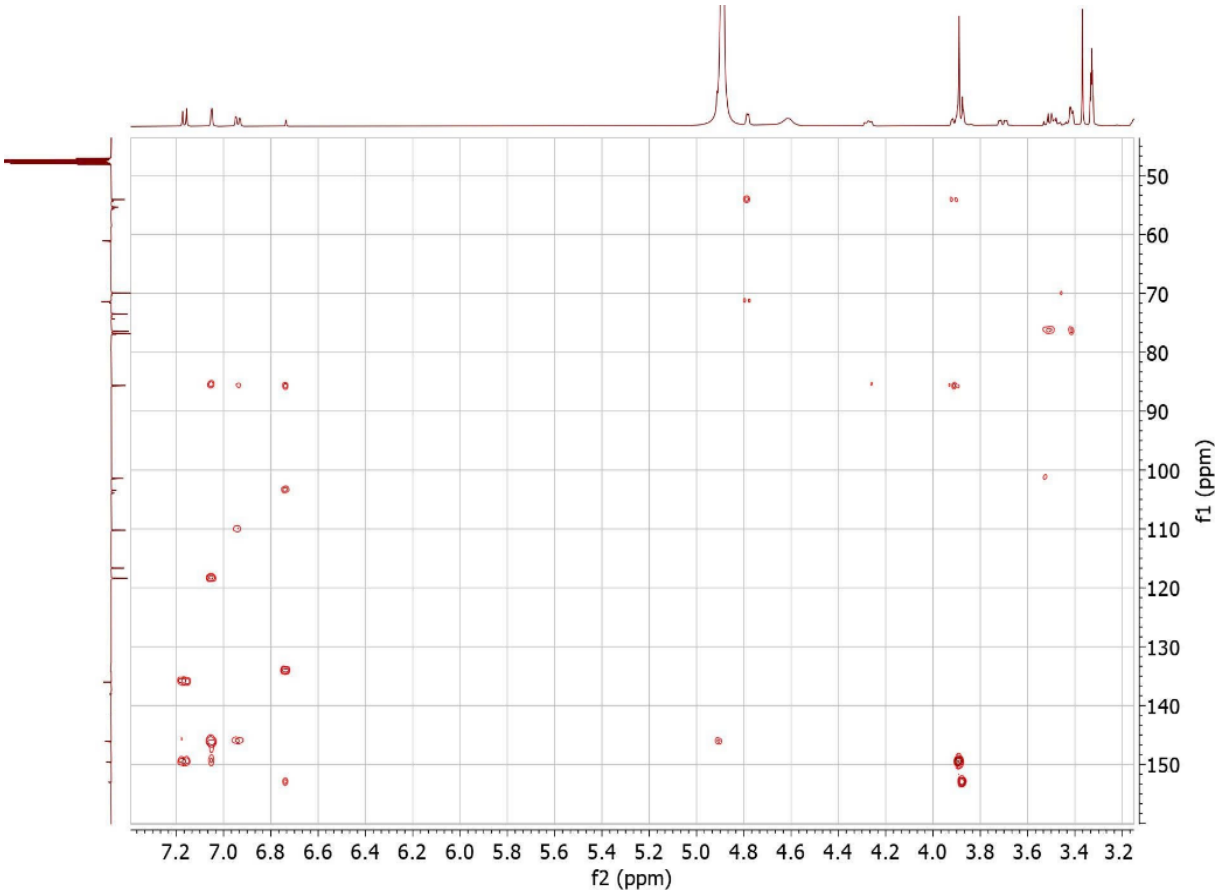
Phụ lục 2.18.1. Phổ ^{1}H-NMR (500 MHz, CD_3OD) của hợp chất **WI18**



Phụ lục 2.18.2. Phổ ^{13}C-APT NMR (125 MHz, CD_3OD) của hợp chất **WI18**

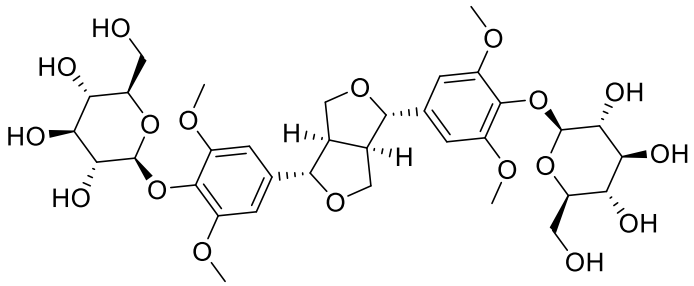


Phụ lục 2.18.3. Phổ HMQC (500/125 MHz, CD_3OD) của hợp chất **WI18**



Phụ lục 2.18.4. Phổ HMBC (500/125 MHz, CD_3OD) của hợp chất **WI18**

PHỤ LỤC 2.19. DỮ LIỆU PHỔ CỦA HỢP CHẤT WI19



CTHH: $C_{34}H_{46}O_{18}$
M = 742,27

Cấu trúc hóa học của hợp chất **WI19**

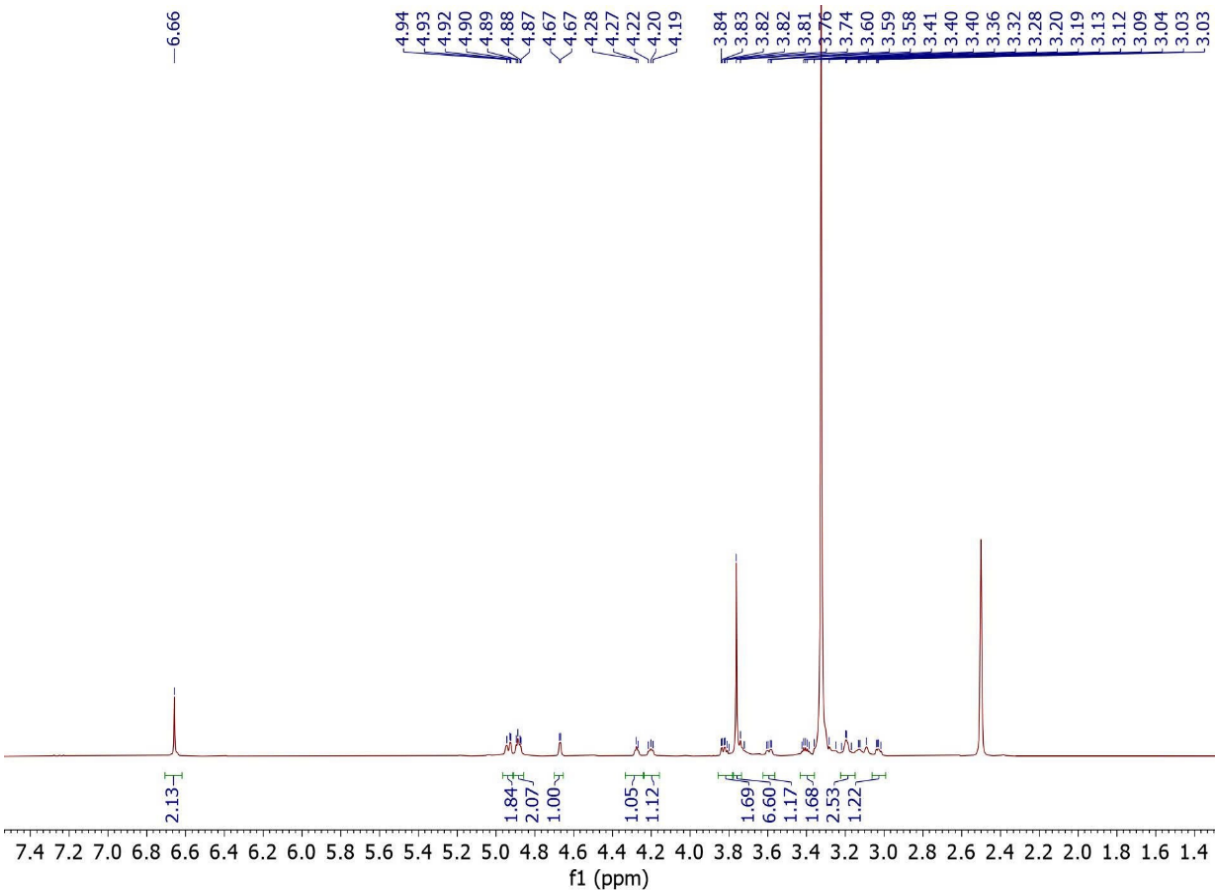
Phụ lục 2.19.1. Phổ ^{1}H-NMR (500 MHz, CD_3OD) của hợp chất **WI19**

Phụ lục 2.19.2. Phổ ^{13}C-NMR (125 MH, CD_3OD) của hợp chất **WI19**

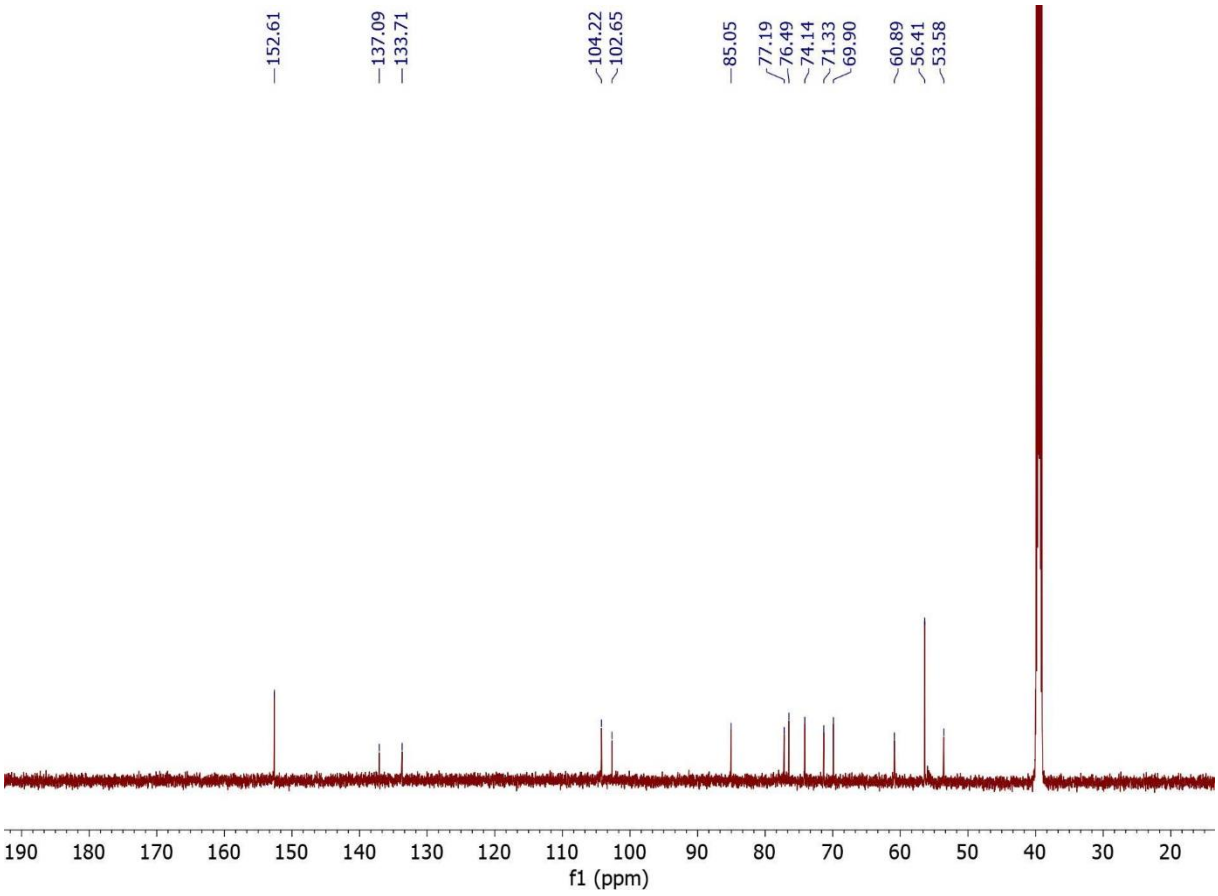
Phụ lục 2.19.3. Phổ HSQC (500/125 MHz, CD_3OD) của hợp chất **WI19**

Phụ lục 2.19.4. Phổ HMBC (500/125 MHz, CD_3OD) của hợp chất **WI19**

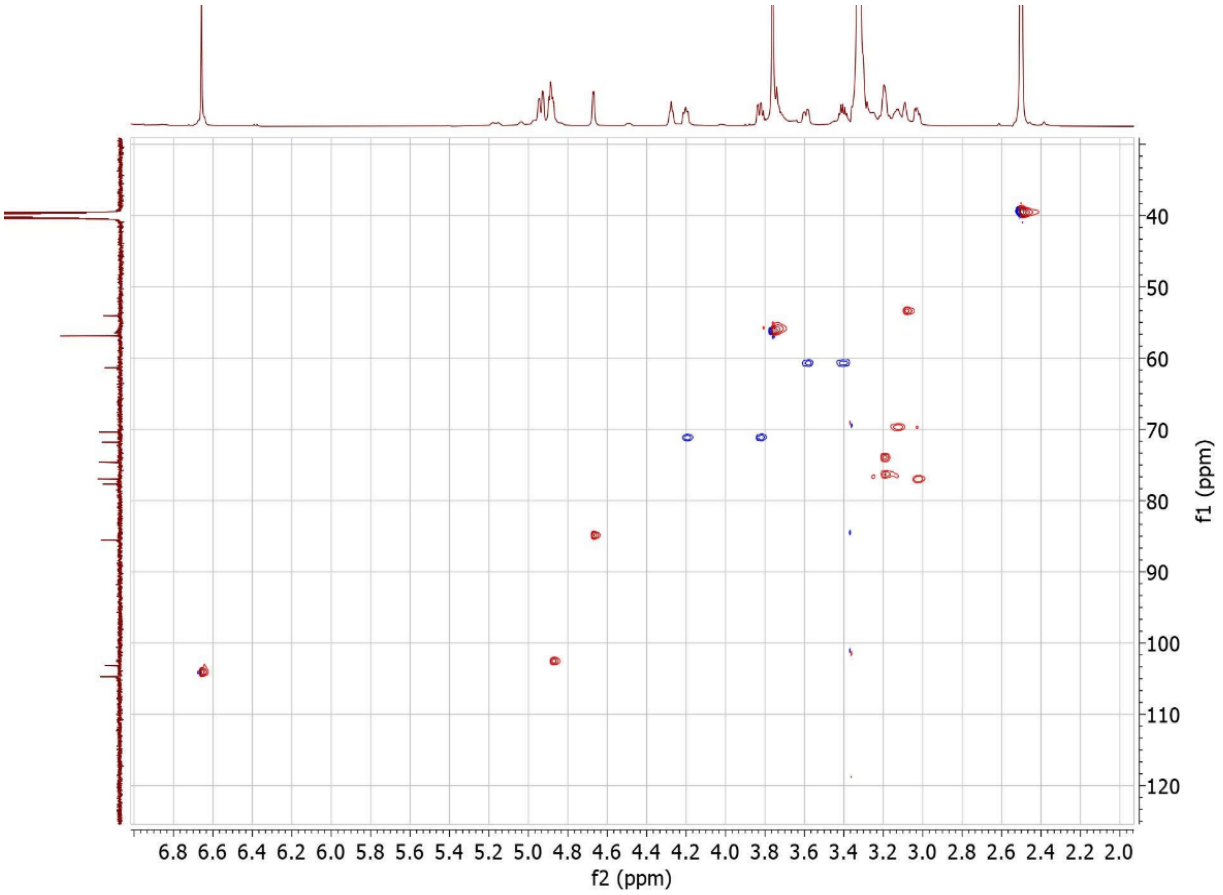
Phụ lục 2.19.5. Phổ ESI-MS của hợp chất **WI19**



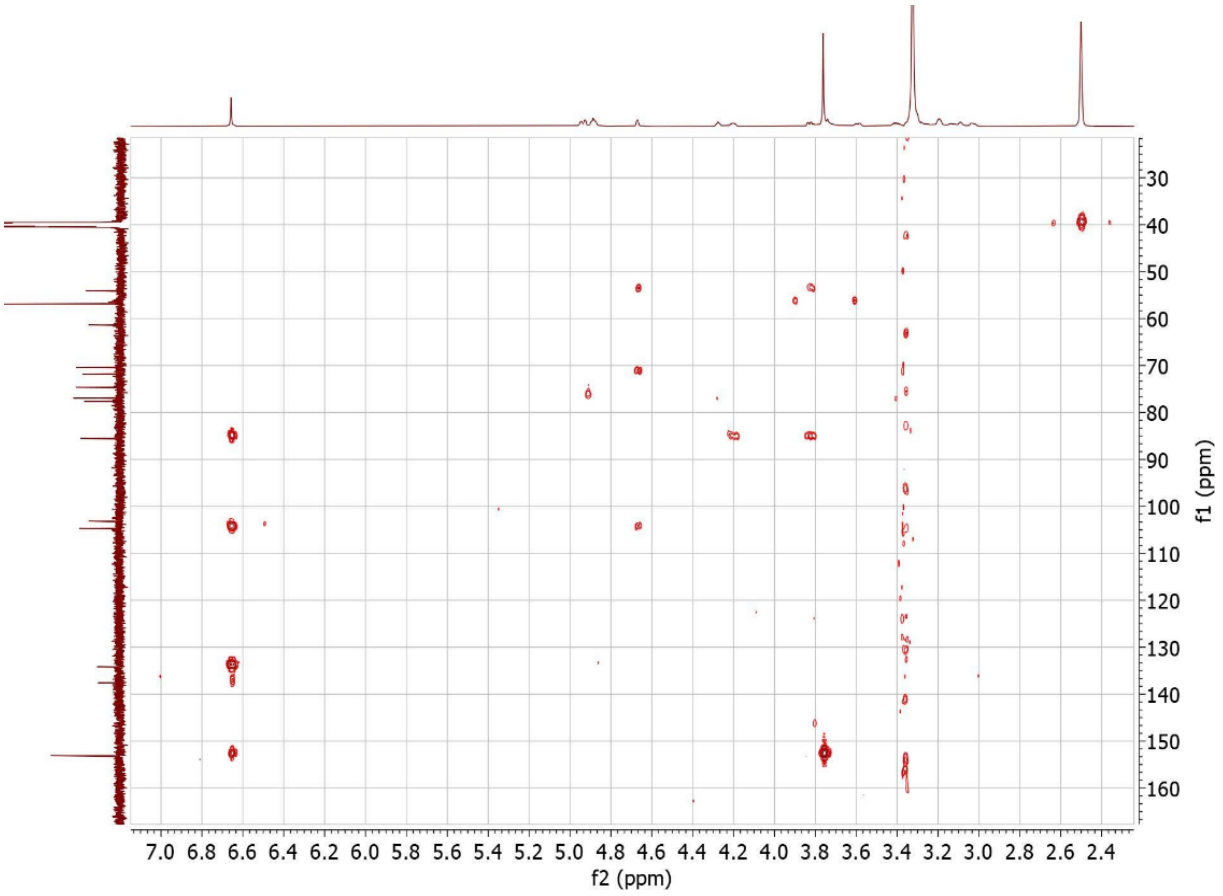
Phụ lục 2.19.1. Phổ ^{1}H-NMR (500 MHz, DMSO-d_6) của hợp chất **WI19**



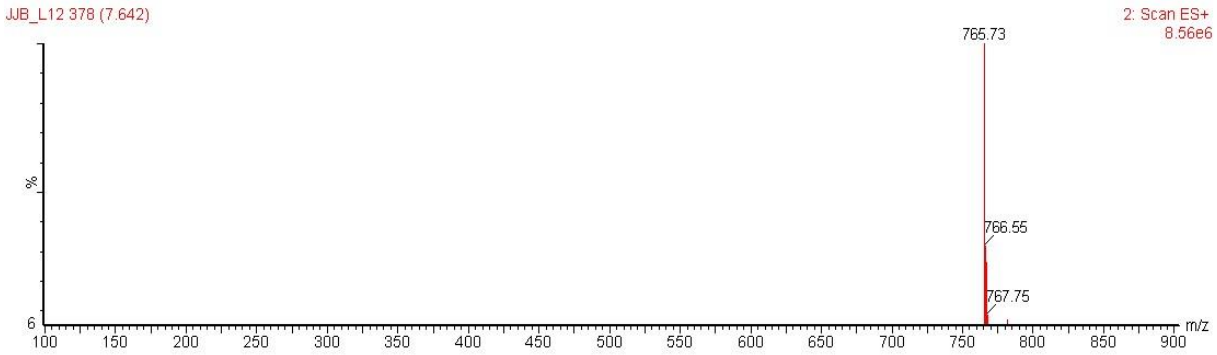
Phụ lục 2.19.3. Phổ ^{13}C-NMR (125 MHz, DMSO-d_6) của hợp chất **WI19**



Phụ lục 2.19.3. Phổ HSQC (500/125 MHz, DMSO-d_6) của hợp chất **WI19**



Phụ lục 2.19.4. Phổ HMBC (500/125 MHz, DMSO-d_6) của hợp chất **WI19**



Phụ lục 2.19.5. Phổ ESI-MS của hợp chất **WI19**

PHỤ LỤC III: DỮ LIỆU ĐÁNH GIÁ TÁC DỤNG DƯỢC LÝ

PHỤ LỤC 3.1. ẢNH HƯỞNG CỦA CAO CHIẾT VÀ CHẤT TINH KHIẾT LÊN KHẢ NĂNG SỐNG SÓT CỦA TẾ BÀO RAW 264.7, TẾ BÀO T CD4+

Phụ lục 3.1.1. Ảnh hưởng của cao chiết (20 µg/mL) lên khả năng sống sót của tế bào RAW 264.7

Lần	**DMSO** 1%	**WIT**	**WIH**	**WIE**	**WIW**
1	90,80	78,86	94,80	93,47	77,99
2	99,49	90,27	89,18	85,18	93,32
3	105,67	84,64	80,27	99,88	85,66
4	114,42	104,50	76,64	76,04	75,19
5	89,62	79,30	73,64	69,33	76,44
TB (%) ± SEM	**100,00 ± 4,64**	**87,51 ± 4,74**	**82,91 ± 3,94**	**84,78 ± 5,56**	**81,72 ± 3,43**

Phụ lục 3.1.2. Ảnh hưởng của các hợp chất (10 µM) lên khả năng sống sót của tế bào RAW 264.7

Lần	**DMSO 1%**	**WI1**	**WI2**	**WI3**	**WI4**	**WI5**	**WI6**	**WI7**	**WI8**	**WI9**
1	97,15	79,68	91,68	88,04	94,99	85,28	72,32	91,68	72,25	85,75
2	106,87	79,92	83,98	87,88	105,79	87,25	84,41	77,47	82,97	101,91
3	96,43	94,50	97,15	75,58	91,61	89,14	78,44	84,48	77,29	85,28
4	102,55	101,91	91,68	86,30	98,88	91,11	78,94	95,21	79,09	72,59
5	97,01	73,77	75,06	94,97	92,11	92,06	89,95	91,83	91,75	95,13
TB (%) ± SEM	**100,0 ± 2,04**	**85,96 ± 5,30**	**87,9 ± 3,85**	**86,55 ± 3,13**	**96,68 ± 2,58**	**88,97 ±1,23**	**80,81 ±3,02**	**88,13 ± 3,19**	**80,67 ± 3,29**	**88,13 ± 4,99**

Lần	**DMSO 1%**	**WI10**	**WI11**	**WI12**	**WI13**	**WI14**	**WI16**	**WI17**	**WI18**	**WI19**
1	97,15	95,35	84,20	104,92	87,44	105,86	77,00	87,08	78,44	86,36
2	106,87	98,01	78,44	90,67	89,88	100,75	81,75	89,74	90,39	87,80
3	96,43	98,81	87,15	105,86	80,24	84,41	87,80	96,07	73,40	90,17
4	102,55	91,83	73,40	96,00	91,39	82,04	83,69	88,01	89,95	94,27
5	97,01	91,90	92,83	98,73	92,11	96,86	90,67	86,18	84,77	105,07
TB(%) ± SEM	**100,0 ± 2,04**	**95,18 ± 1,48**	**83,20 ± 3,39**	**99,24 ± 2,79**	**88,21 ± 2,14**	**93,98 ± 4,66**	**84,18 ± 2,39**	**89,42 ± 1,78**	**83,39 ± 3,29**	**92,73 ± 3,34**

Phụ lục 3.1.3. Ảnh hưởng của một số hợp chất (30 μM) lên khả năng sống sót của tế bào RAW 264.7

Lần	DMSO 1%	WI3	WI5	WI7	WI8	WI9	WI19
1	99,79	82,13	87,23	78,26	73,71	96,10	86,45
2	93,73	77,25	79,98	78,43	83,40	84,05	87,75
3	114,28	82,50	86,86	84,76	78,26	83,46	89,90
4	105,71	94,62	86,27	74,95	79,89	90,11	82,23
5	86,49	80,57	77,62	91,39	84,83	77,91	76,90
TB (%) ± SEM	**100,00 ± 4,8**	**83,41 ± 3,0**	**83,59 ± 2,0**	**81,56 ± 2,9**	**80,02 ± 2,0**	**86,32 ± 3,1**	**84,65 ± 2,3**

Phụ lục 3.1.4. Ảnh hưởng của một số hợp chất (30 μM) lên khả năng sống sót của tế bào T CD4+

Lần	DMSO 1%	WI3	WI5	WI7	WI8	WI9	WI19
1	92,29	102,08	94,60	79,56	85,13	102,34	83,43
2	99,70	85,27	87,59	79,62	87,19	97,58	78,53
3	104,92	87,13	100,03	78,59	93,91	83,42	80,77
4	111,80	103,93	79,85	81,19	82,59	80,05	85,55
5	91,29	82,56	89,24	81,25	83,25	76,87	80,59
TB (%) ± SEM	**100,00 ± 3,87**	**92,19 ± 4,48**	**90,26 ± 3,40**	**80,04 ± 0,52**	**86,41 ± 2,04**	**88,05 ± 5,03**	**81,78 ± 1,22**

PHỤ LỤC 3.2. HOẠT TÍNH ỨC CHẾ IL-1β VÀ KÍCH THÍCH IL-10 CỦA CAO CHIẾT TRÊN TẾ BÀO RAW 264.7

Phụ lục 3.2.1. Hoạt tính ức chế IL-1β của các cao chiết trên tế bào RAW 264.7

Lần	IL-1β (pg/mL)					
	DMSO 1%	**WIT**	**WIH**	**WIE**	**WIW**	**LPS**
1	151,00	98,40	80,94	54,78	45,99	289,99
2	108,05	77,83	68,10	47,61	41,81	321,38
3	135,05	87,50	72,91	44,93	45,75	412,68
4	111,45	81,58	58,95	48,44	59,37	307,31
5	126,22	107,59	80,99	60,40	55,81	396,71
TB	**126,35 ± 7,87**	**90,58 5,45**	**72,38 ± 4,20**	**51,23 ± 2,81**	**49,75 ± 3,35**	**345,61 ± 24,64**

Phụ lục 3.2.2. Hoạt tính kích thích IL-10 của các cao chiết trên tế bào RAW 264.7

Lần	IL-10 (pg/mL)					
	DMSO 1%	**WIT**	**WIH**	**WIE**	**WIW**	**LPS**
1	161,69	115,85	256,37	338,34	367,95	93,24
2	132,55	190,40	263,83	426,97	382,73	107,55
3	140,30	200,40	144,85	415,02	368,36	85,86
4	107,07	173,51	226,53	382,30	325,46	81,59
5	119,06	183,93	324,40	239,44	434,99	86,31
TB	**132,13 ± 9,24**	**172,82 ± 14,90**	**243,20 ± 29,28**	**360,41 ± 33,92**	**375,90 ± 17,61**	**90,91 ± 4,56**

PHỤ LỤC 3.3. HOẠT TÍNH ỨC CHẾ IL-1β VÀ KÍCH THÍCH IL-10 CỦA CÁC HỢP CHẤT TRÊN TẾ BÀO RAW 264.7 Ở NỒNG ĐỘ 10 µM

Phụ lục 3.3.1. Hoạt tính ức chế IL-1β của các hợp chất trên tế bào RAW264.7 ở nồng độ10 µM

Lần	DMSO 1%	WI1	WI2	WI3	WI4	WI5	WI6	WI7	WI8	WI9	WI10	WI11	WI12	WI13	WI14	WI16	WI17	WI18	WI19	LPS
1	116,88	98,25	246,99	89,43	312,75	61,33	314,92	247,78	291,14	95,62	361,31	189,67	192,29	256,24	295,32	331,35	312,76	374,91	191,73	297,05
2	98,11	77,43	215,87	97,83	201,38	76,02	193,71	209,19	293,87	108,13	284,81	252,09	174,24	178,94	309,52	399,46	201,38	433,71	157,84	431,29
3	85,70	108,44	197,09	104,46	237,59	70,22	294,66	175,73	292,69	87,08	366,55	236,26	267,31	255,45	295,73	249,55	237,57	294,66	230,17	460,90
4	130,47	85,34	235,04	87,69	294,63	69,40	255,49	223,80	247,85	91,09	312,76	170,58	166,06	169,11	254,54	295,81	294,66	255,49	180,46	315,95
5	95,42	74,67	207,14	92,32	295,27	82,01	294,22	131,00	240,43	93,01	327,57	161,84	139,78	124,72	251,68	266,71	295,34	294,22	204,76	413,47
TB ± SEM (pg/mL)	**105,32 ± 8,07**	**88,83 ± 6,39**	**220,43 ± 9,11**	**94,35 ± 3,06**	**268,32 ±21,0**	**71,80 ± 3,46**	**270,60 ±21,50**	**197,50 ±20,31**	**273,20 ±11,93**	**94,99 ± 3,57**	**330,60 ±15,26**	**202,09 ±17,94**	**187,94 ±21,57**	**196,89 ±25,74**	**281,36 ±11,82**	**308,58 ±26,63**	**268,34 ±21,01**	**330,60 ±32,29**	**192,99 ±12,07**	**383,73 ±32,56**

Phụ lục 3.3.2. Hoạt tính kích thích IL-10 của của các hợp chất trên tế bào RAW 264.7 ở nồng 10 µM

Lần	DMSO 1%	WI1	WI2	WI3	WI4	WI5	WI6	WI7	WI8	WI9	WI10	WI11	WI12	WI13	WI14	WI16	WI17	WI18	WI19	LPS
1	127,25	193,21	151,14	242,62	132,01	274,27	126,67	171,71	152,01	197,37	153,72	128,63	106,39	165,50	119,81	143,68	139,35	128,49	158,36	106,91
2	120,90	102,92	118,46	186,14	136,39	270,81	135,42	165,40	155,39	284,88	158,07	148,06	146,05	138,20	145,71	138,72	102,29	140,06	157,50	125,44
3	130,33	286,21	154,06	269,63	104,34	308,45	137,31	149,61	166,48	268,67	155,83	167,82	155,14	150,96	123,85	127,54	126,23	130,69	163,75	93,94
4	112,85	206,47	129,54	201,64	116,16	273,53	113,19	160,41	162,52	223,60	149,14	151,82	112,45	143,29	132,20	134,69	127,02	117,23	148,48	112,39
5	129,96	215,52	102,08	186,88	124,28	275,50	148,13	141,78	133,43	195,37	197,74	137,73	148,30	167,27	120,08	111,48	158,46	158,16	145,63	108,45
TB ± SEM (pg/mL)	**124,26 ±3,31**	**200,87 ± 29,31**	**131,06 ± 9,83**	**217,38 ± 16,61**	**122,64 ± 5,73**	**280,51 ± 7,03**	**132,14 ± 5,84**	**157,78 ± 5,39**	**153,97 ± 5,73**	**233,98 ± 18,35**	**162,90 ± 8,83**	**146,81 ± 6,64**	**133,67 ± 10,06**	**153,04 ± 5,82**	**128,33 ± 4,89**	**131,22 ± 5,60**	**130,67 ± 9,18**	**134,93 ± 6,85**	**154,74 ± 3,35**	**109,43 ± 5,06**

PHỤ LỤC 3.4. HOẠT TÍNH ỨC CHẾ IL-1β VÀ KÍCH THÍCH IL-10 CỦA CHẤT TIỀM NĂNG TRÊN TẾ BÀO RAW 264.7 Ở NỒNG ĐỘ 1, 3, 10 VÀ 30 µM

Phụ lục 3.4.1. Hoạt tính ức chế IL-1β của chất tiềm năng trên tế bào RAW 264.7 ở nồng độ 1, 3, 10 và 30 µM

Lần	DMSO 1%	LPS 5 ng/mL	**WI3**			**WI5**				**WI7**			
			1 (µM)	3 (µM)	10 (µM)	1 (µM)	3 (µM)	10 (µM)	1 (µM)	3 (µM)	10 (µM)	1 (µM)	3 (µM)	10 (µM)
1	118,38	433,89	243,72	209,83	205,03	130,72	380,72	410,56	256,37	291,25	322,81	322,65	268,47	188,14
2	103,75	449,14	225,84	304,40	232,79	153,05	378,60	357,86	358,71	280,45	390,70	369,95	370,80	222,38
3	115,83	481,68	406,67	244,17	205,45	144,23	360,84	255,47	353,66	213,48	372,93	267,56	305,75	223,03
4	129,42	347,70	392,70	332,28	162,10	147,96	483,55	363,76	372,69	383,15	495,64	375,85	284,78	214,96
5	101,35	510,16	366,21	259,68	215,21	139,79	372,09	361,81	262,90	189,13	384,19	373,90	275,00	233,73
TB ± SEM (pg/mL)	**113,75 ± 5,12**	**444,51 ± 27,57**	**327,03 ± 38,32**	**270,07 ± 21,74**	**204,12 ± 11,65**	**143,15 ± 3,80**	**395,16 ± 22,37**	**349,89 ± 25,49**	**320,87 ± 25,21**	**271,49 ± 33,98**	**393,25 ± 28,24**	**341,98 ± 21,05**	**300,96 ± 18,56**	**216,45 ± 7,68**

Lần	DMSO 1%	LPS 5 ng/mL	**WI8**			**WI9**				**WI19**			
			1 (µM)	3 (µM)	10 (µM)	1 (µM)	3 (µM)	10 (µM)	1 (µM)	3 (µM)	10 (µM)	1 (µM)	3 (µM)	10 (µM)
1	118,38	433,89	361,98	327,34	276,24	237,03	349,89	315,25	264,15	221,76	255,81	221,93	217,13	194,64
2	103,75	449,14	390,71	361,59	243,55	204,34	378,62	349,50	231,46	199,12	337,93	316,49	244,89	172,00
3	115,83	481,68	343,52	362,24	210,31	171,10	431,43	350,15	298,22	258,81	318,77	256,27	217,54	131,69
4	129,42	347,70	386,50	304,17	318,55	179,34	374,41	292,08	306,46	274,70	404,79	344,37	374,19	147,58
5	101,35	510,16	401,96	272,94	301,29	162,08	389,87	360,85	289,20	187,42	378,30	271,77	227,31	160,30
TB ± SEM (pg/mL)	**113,75 ± 5,12**	**444,51 ± 27,57**	**376,93 ± 10,60**	**325,66 ± 17,14**	**269,99 ± 19,54**	**190,78 ± 13,54**	**384,84 ± 13,35**	**333,57 ± 12,90**	**277,90 ± 13,61**	**228,36 ± 16,81**	**339,12 ± 25,69**	**282,17 ± 21,74**	**256,21 ± 29,92**	**161,24 ± 10,71**

Phụ lục 3.4.2. Hoạt tính kích thích IL-10 của chất tiềm năng trên tế bào RAW 264.7 ở nồng độ 1, 3, 10 và 30 µM

Lần	DMSO 1%	LPS 5 ng/mL	**WI3**				**WI5**				**WI7**			
			1 (µM)	3 (µM)	10 (µM)	1 (µM)	3 (µM)	10 (µM)	1 (µM)	3 (µM)	10 (µM)	1 (µM)	3 (µM)	10 (µM)
1	105,83	91,34	104,33	135,55	174,28	196,78	125,94	130,57	188,76	178,59	116,27	147,49	146,22	240,51
2	101,2	96,587	125,83	165,14	169,94	213,82	112,82	125,66	171,48	166,35	137,77	177,08	181,88	285,75
3	123,28	109,13	123,15	142,90	194,50	185,94	103,71	152,96	153,81	155,56	135,10	154,84	206,45	188,29
4	116,87	85,158	92,89	155,32	149,79	226,31	97,20	116,91	168,01	204,23	104,84	167,26	161,73	254,32
5	98,805	77,609	148,07	112,20	152,38	232,81	98,65	138,86	147,79	198,25	130,01	124,15	164,33	216,78
TB ± SEM (pg/mL)	**109,20 ± 4,69**	**91,96 ± 5,33**	**118,85 ± 9,50**	**142,22 ± 9,06**	**168,18 ± 8,13**	**211,13 ± 8,80**	**107,66 ± 5,32**	**132,99 ± 6,13**	**165,97 ± 7,18**	**180,60 ± 9,23**	**124,80 ± 6,22**	**154,16 ± 9,06**	**172,12 ± 10,28**	**237,13 ± 16,54**

Lần	DMSO 1%	LPS 5 ng/mL	**WI8**				**WI9**				**WI19**			
			1 (µM)	3 (µM)	10 (µM)	1 (µM)	3 (µM)	10 (µM)	1 (µM)	3 (µM)	10 (µM)	1 (µM)	3 (µM)	10 (µM)
1	105,83	91,34	148,48	167,19	235,26	229,43	106,54	105,25	123,32	163,92	137,87	192,52	200,71	229,27
2	101,2	96,587	146,94	182,29	161,20	297,31	84,99	90,35	149,25	176,86	124,77	207,60	183,42	276,57
3	123,28	109,13	125,66	146,55	188,57	279,55	83,72	124,60	176,57	204,22	155,65	164,90	265,75	374,18
4	116,87	85,158	116,92	157,90	186,25	252,26	104,97	125,95	114,30	182,53	149,14	188,86	179,95	282,47
5	98,805	77,609	101,46	179,13	193,51	190,80	89,51	167,19	181,57	199,80	150,59	150,81	209,74	180,52
TB ± SEM (pg/mL)	**109,20 ± 4,69**	**91,96 ± 5,33**	**127,89 ± 8,97**	**166,61 ± 6,64**	**192,96 ± 11,96**	**249,87 ± 18,77**	**93,95 ± 4,92**	**122,67 ± 12,93**	**149,00 ± 13,57**	**185,47 ± 7,43**	**143,60 ± 5,53**	**180,94 ± 10,18**	**207,91 ± 15,46**	**268,60 ± 32,18**

PHỤ LỤC 3.5. HOẠT TÍNH ỨC CHẾ FOXP3, INF-γ VÀ IL-17 CỦA CHẤT TIỀM NĂNG TRÊN TẾ BÀO TCD4+ Ở CÁC NỒNG ĐỘ 1, 3, 10 VÀ 30 µM

Phụ lục 3.5.1. Hoạt tính ức chế Foxp3 của chất tiềm năng trên tế bào TCD4+ ở các nồng độ 1, 3, 10 và 30 µM

Lần	DMSO 1%	LPS 5 ng/mL	**WI3**				**WI5**				**WI7**			
			1 (µM)	3 (µM)	10 (µM)	30 (µM)	1 (µM)	3 (µM)	10 (µM)	30 (µM)	1 (µM)	3 (µM)	10 (µM)	30 (µM)
1	98,052	316,34	261,01	200,61	150,44	166,30	221,89	292,10	232,00	181,82	273,40	213,00	162,82	175,08
2	82,31	317,77	194,18	172,74	161,13	131,39	246,95	257,19	157,05	148,79	206,56	185,12	173,52	137,42
3	84,459	250,32	275,01	212,51	173,79	112,57	329,18	223,81	171,03	151,49	287,40	224,90	186,17	112,37
4	87,018	262,52	212,06	258,17	173,37	149,06	239,06	198,90	214,71	159,58	224,44	270,56	185,76	91,40
5	69,985	218,79	234,49	228,02	183,55	118,13	240,43	220,15	251,25	157,47	246,87	240,41	195,94	181,61
TB ± SEM (ng/mL)	**84,36 ± 4,50**	**273,15 ± 19,29**	**235,35 ± 14,95**	**214,41 ± 14,20**	**168,46 ± 5,74**	**135,49 ± 9,94**	**255,50 ± 18,88**	**238,43 ± 16,34**	**205,21 ± 17,91**	**159,83 ± 5,83**	**247,73 ± 14,95**	**226,80 ± 14,20**	**180,84 ± 5,74**	**139,58 ± 17,45**

Lần	DMSO 1%	LPS 5 ng/mL	**WI8**				**WI9**				**WI19**			
			1 (µM)	3 (µM)	10 (µM)	30 (µM)	1 (µM)	3 (µM)	10 (µM)	30 (µM)	1 (µM)	3 (µM)	10 (µM)	30 (µM)
1	98,052	316,34	255,13	272,80	187,20	109,96	242,75	260,42	174,81	143,04	234,27	204,48	144,38	178,71
2	82,31	317,77	259,34	180,22	212,19	99,16	246,96	267,84	199,80	167,45	209,33	169,58	169,43	86,12
3	84,459	250,32	212,16	230,87	178,94	132,19	299,77	218,49	166,55	207,15	241,56	166,19	183,41	136,77
4	87,018	262,52	230,61	195,97	144,87	121,86	218,23	183,59	232,49	190,10	211,44	211,28	127,10	101,86
5	69,985	218,79	270,59	191,57	169,92	157,84	258,21	279,19	257,54	155,76	252,82	232,53	163,63	97,47
TB ± SEM (ng/mL)	**84,36 ± 4,50**	**273,15 ± 19,29**	**245,57 ± 10,60**	**214,29 ± 16,90**	**178,62 ± 10,99**	**124,20 ± 10,08**	**253,18 ± 13,35**	**241,91 ± 17,82**	**206,24 ± 17,21**	**172,70 ± 11,58**	**229,88 ± 8,50**	**196,81 ± 12,69**	**157,59 ± 9,87**	**120,19 ± 16,90**

Phụ lục 3.5.2. Hoạt tính ức chế INF-γ của chất tiềm năng trên tế bào TCD4+ ở các nồng độ 1, 3, 10 và 30 µM

Lần	DMSO 1%	LPS 5 ng/mL	**WI3**				**WI5**				**WI7**			
			1 (µM)	3 (µM)	10 (µM)	30 (µM)	1 (µM)	3 (µM)	10 (µM)	30 (µM)	1 (µM)	3 (µM)	10 (µM)	30 (µM)
1	124,36	260,18	292,35	229,85	191,13	129,91	346,52	241,15	249,34	199,16	302,20	239,69	200,97	129,15
2	96,89	412,40	229,40	275,51	190,71	166,40	256,40	216,24	232,05	176,93	239,24	285,36	200,56	159,98
3	132,26	327,65	211,52	190,08	178,47	148,73	264,28	274,54	174,39	166,13	321,36	199,92	188,32	197,02
4	119,86	518,63	251,83	245,36	200,89	135,47	257,77	237,49	268,58	174,81	261,67	255,20	210,73	119,46
5	107,93	326,21	278,35	217,95	167,78	183,64	239,23	309,44	188,37	168,83	288,19	227,80	177,62	145,98
TB ± SEM (pg/mL)	**116,26 ± 6,24**	**369,01 ± 44,53**	**252,69 ± 14,95**	**231,75 ± 14,20**	**185,80 ± 5,74**	**152,83 ± 9,94**	**272,84 ± 18,88**	**255,77 ± 16,35**	**222,55 ± 17,91**	**177,17 ± 5,83**	**282,53 ± 14,55**	**241,59 ± 14,20**	**195,64 ± 5,74**	**150,32 ± 13,59**

Lần	DMSO 1%	LPS 5 ng/mL	**WI8**				**WI9**				**WI19**			
			1 (µM)	3 (µM)	10 (µM)	30 (µM)	1 (µM)	3 (µM)	10 (µM)	30 (µM)	1 (µM)	3 (µM)	10 (µM)	30 (µM)
1	124,36	260,18	326,95	245,67	193,74	157,71	317,11	235,83	183,90	224,49	356,36	250,99	259,18	146,11
2	96,89	412,40	345,41	210,77	259,67	197,48	335,57	200,93	249,83	207,44	266,24	226,08	241,89	198,76
3	132,26	327,65	274,14	295,02	226,98	143,15	264,30	285,18	217,14	184,80	274,13	284,38	184,23	157,35
4	119,86	518,63	285,39	306,37	284,72	212,99	275,55	296,53	274,88	173,10	267,62	247,33	278,43	169,52
5	107,93	326,21	269,93	287,60	201,98	145,59	260,09	277,76	192,14	160,38	249,07	319,28	198,21	135,41
TB ± SEM (pg/mL)	**116,26 ± 6,24**	**369,01 ± 44,53**	**300,36 ± 15,12**	**269,09 ± 17,82**	**233,42 ± 17,21**	**171,38 ± 14,25**	**290,52 ± 15,12**	**259,25 ± 17,82**	**223,58 ± 17,21**	**190,04 ± 11,58**	**282,68 ± 18,88**	**265,61 ± 16,35**	**232,39 ± 17,91**	**161,43 ± 10,93**

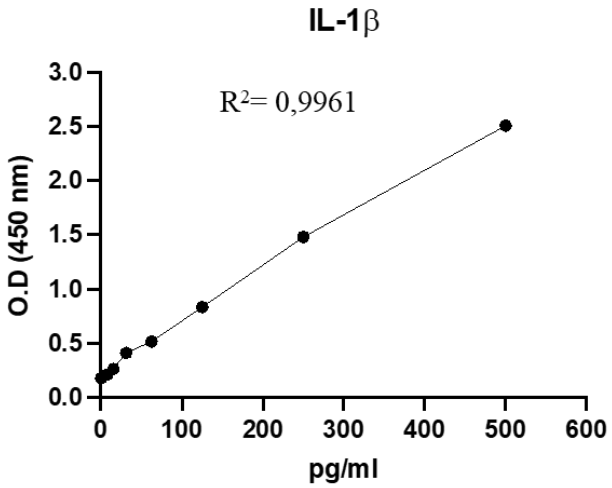
Phụ lục 3.5.3. Hoạt tính ức chế IL-17 của chất tiềm năng trên tế bào TCD4+ ở các nồng độ 1, 3, 10 và 30 µM

Lần	DMSO 1%	LPS 5 ng/mL	**WI3**				**WI5**				**WI7**			
			1 (µM)	3 (µM)	10 (µM)	30 (µM)	1 (µM)	3 (µM)	10 (µM)	30 (µM)	1 (µM)	3 (µM)	10 (µM)	30 (µM)
1	122,13	337,62	247,48	293,60	208,79	184,48	274,47	234,32	250,13	195,01	271,60	317,73	232,92	131,93
2	137,48	352,87	229,60	208,16	196,56	166,81	282,36	292,61	192,47	184,42	253,72	232,28	220,68	184,74
3	109,58	485,41	310,43	247,93	209,21	147,99	364,60	259,23	267,42	217,25	334,56	272,06	233,35	203,20
4	133,15	251,43	296,43	236,04	185,86	201,72	257,31	327,52	206,45	186,91	320,57	260,16	209,98	163,18
5	115,08	443,81	269,91	263,44	218,97	153,55	275,85	255,57	286,66	192,89	394,03	287,57	243,09	127,71
TB ± SEM (pg/mL)	**123,48 ± 5,27**	**374,23 ± 41,28**	**270,77 ± 14,95**	**249,83 ± 14,20**	**203,88 ± 5,74**	**170,91 ± 9,94**	**290,92 ± 18,88**	**273,85 ± 16,34**	**240,63 ± 17,91**	**195,30 ± 5,82**	**314,90 ± 24,80**	**273,96 ± 14,20**	**228,00 ± 5,74**	**162,15 ± 14,66**

Lần	DMSO 1%	LPS 5 ng/mL	**WI8**				**WI9**				**WI19**			
			1 (µM)	3 (µM)	10 (µM)	30 (µM)	1 (µM)	3 (µM)	10 (µM)	30 (µM)	1 (µM)	3 (µM)	10 (µM)	30 (µM)
1	122,13	337,62	377,72	243,13	292,03	152,81	353,65	219,00	267,91	225,52	298,60	258,44	274,26	116,36
2	137,48	352,87	306,50	327,38	259,34	203,45	282,38	303,26	235,22	202,88	306,49	316,74	216,59	197,53
3	109,58	485,41	359,32	278,03	226,10	168,56	335,19	253,91	201,98	242,57	388,72	283,35	191,54	134,03
4	133,15	251,43	302,29	319,96	234,37	164,16	278,16	295,84	210,24	178,46	281,43	251,65	230,57	203,10
5	115,08	443,81	317,75	238,74	217,09	245,39	293,63	314,61	292,96	191,16	299,98	279,69	210,79	151,27
TB ± SEM (pg/mL)	**123,48 ± 5,27**	**374,23 ± 41,28**	**332,72 ± 15,12**	**281,45 ± 18,57**	**245,79 ± 13,53**	**186,87 ± 16,90**	**308,60 ± 15,12**	**277,32 ± 17,83**	**241,66 ± 17,21**	**208,12 ± 11,59**	**315,04 ± 18,88**	**277,97 ± 11,42**	**224,75 ± 13,87**	**160,46 ± 17,20**

PHỤ LỤC 3.6. ĐƯỜNG CHUẨN CỦA CÁC CYTOKIN ĐO BẰNG PHƯƠNG PHÁP ELISA

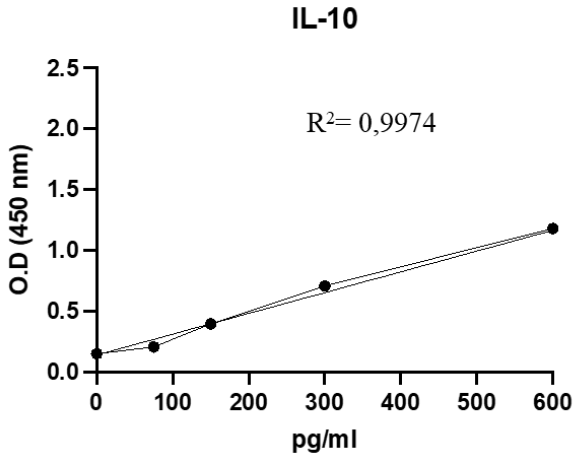
3.6.1. Biểu đồ đường chuẩn của IL-1β được đo bằng phương pháp Elisa



Chất chuẩn (pg/ml)	IL-1β (O.D)
0	0,177
7,8	0,212
15,6	0,263
31,3	0,411
62,5	0,517
125	0,834
250	1,48
500	2,51

Biểu đồ đường chuẩn của IL-1β được đo bằng phương pháp Elisa

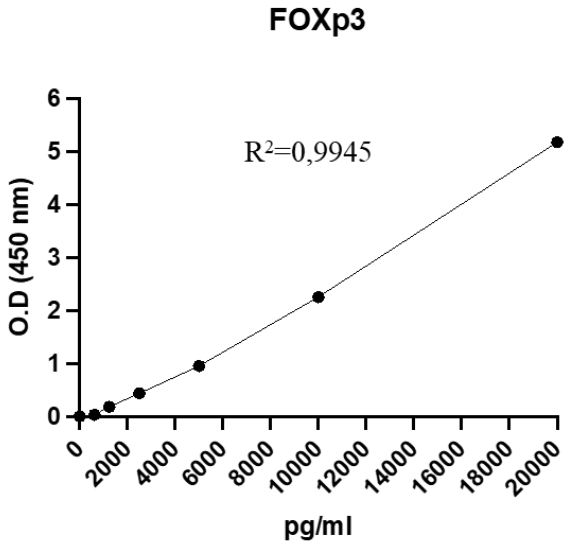
3.6.2. Biểu đồ đường chuẩn của IL-10 được đo bằng phương pháp Elisa



Chất chuẩn (pg/ml)	IL-10 (O.D)
0	0,154
75	0,209
150	0,398
300	0,712
600	1,183
1200	2,176

Biểu đồ đường chuẩn của IL-10 được đo bằng phương pháp Elisa

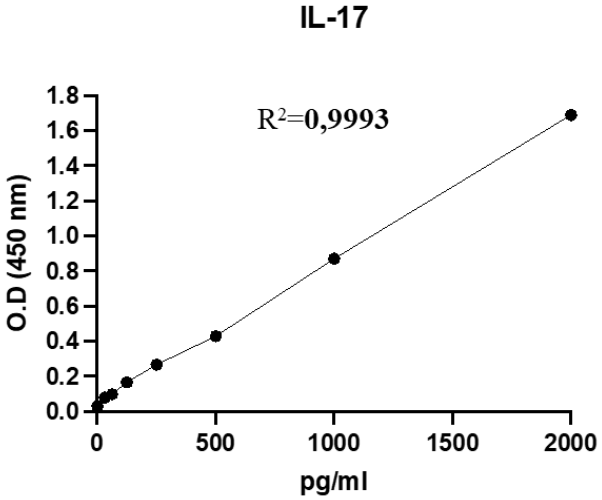
3.6.3. Biểu đồ đường chuẩn của FOXp3 được đo bằng phương pháp Elisa



Chất chuẩn (pg/ml)	FOXp3 (O.D)
0	0
625	0,03
1250	0,184
2500	0,435
5000	0,952
10000	2,25
20000	5,17

Biểu đồ đường chuẩn của FOXp3 được đo bằng phương pháp Elisa

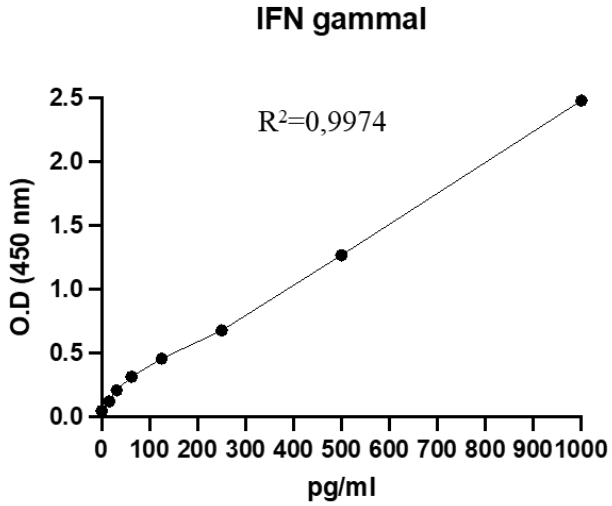
3.6.4. Biểu đồ đường chuẩn của IL-17 được đo bằng phương pháp Elisa



Chất chuẩn (pg/ml)	IL-17 (O.D)
0	0,03
31,25	0,08
62,5	0,1
125	0,167
250	0,267
500	0,43
1000	0,87

Biểu đồ đường chuẩn của IL-17 được đo bằng phương pháp Elisa

3.6.5. Biểu đồ đường chuẩn của IFN- γ được đo bằng phương pháp Elisa



Biểu đồ đường chuẩn của IFN-γ được đo bằng phương pháp Elisa

Chất chuẩn (pg/ml)	IFN- γ (O.D)
0	0,05
15,63	0,123
31,25	0,211
62,5	0,318
125	0,46
250	0,68
500	1,27