

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

VIỆN DƯỢC LIỆU



NGUYỄN THỊ HẰNG

**NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM THỰC VẬT,
THÀNH PHẦN HÓA HỌC VÀ TÁC DỤNG
CHỐNG VIÊM *IN VITRO* CỦA CÂY DÂY ĐÒN
GÁNH (*Gouania leptostachya* DC.), HỌ TÁO TA
(Rhamnaceae)**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ DƯỢC HỌC

HÀ NỘI, 2023

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

VIỆN DƯỢC LIỆU



NGUYỄN THỊ HẰNG

**NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM THỰC VẬT,
THÀNH PHẦN HÓA HỌC VÀ TÁC DỤNG
CHỐNG VIÊM *IN VITRO* CỦA CÂY DÂY ĐÒN
GÁNH (*Gouania leptostachya* DC.), HỌ TÁO TA
(Rhamnaceae)**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ DƯỢC HỌC

CHUYÊN NGÀNH: Dược liệu - Dược học cổ truyền

MÃ SỐ: 9720206

Người hướng dẫn khoa học:

- 1. PGS.TS. Nguyễn Thị Bích Thu**
- 2. PGS.TS. Trần Văn Ôn**

HÀ NỘI, 2023

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của riêng tôi dưới sự hướng dẫn khoa học của **PGS.TS. Nguyễn Thị Bích Thu** và **PGS.TS. Trần Văn Ôn**.

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

Tác giả luận án

NCS. Nguyễn Thị Hằng

LỜI CẢM ƠN

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

Trước hết, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc nhất tới **PGS.TS. Nguyễn Thị Bích Thu** và **PGS.TS. Trần Văn Ôn**, những người thầy đã tận tình hướng dẫn, hết lòng hỗ trợ tôi nghiên cứu và hoàn thành luận án.

Tôi xin trân trọng cảm ơn **PGS.TSKH. Nguyễn Minh Khởi** - Viện trưởng Viện Dược liệu, **PGS.TS. Lê Việt Dũng** - nguyên Phó Viện trưởng Viện Dược liệu và **ThS. Đỗ Thị Phương** đã tạo điều kiện thuận lợi nhất cho tôi trong quá trình học tập. Tôi cũng vô cùng biết ơn **PGS.TS. Phương Thiện Thương**, **PGS.TS. Đỗ Thị Hà**, **TS. Nguyễn Thị Phương**, những lãnh đạo Khoa Hóa Phân tích - Tiêu chuẩn đã tạo điều kiện tối đa cho tôi trong quá trình thực nghiệm và hoàn thiện luận án.

Tôi xin bày tỏ lòng cảm ơn tới các nhà khoa học **TS. Lê Thị Kim Vân**, **PGS.TS. Phạm Thanh Huyền**, cùng các đồng nghiệp tại Khoa Hóa Phân tích - Tiêu chuẩn, Trung tâm Tài Nguyên-Dược liệu, Phòng Khoa học và Đào tạo, Viện Dược liệu, Bộ môn Thực vật - Trường Đại học Dược Hà Nội đã cộng tác giúp đỡ và cho tôi những lời khuyên quý báu để hoàn thành luận án.

Cuối cùng, tôi xin gửi lời cảm ơn sâu sắc tới gia đình và bạn bè đã động viên, chia sẻ, giúp đỡ tôi trong suốt quá trình nghiên cứu, học tập và hoàn thành luận án.

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

NCS. Nguyễn Thị Hằng

MỤC LỤC

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, TỪ VIẾT TẮT	
DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ, SƠ ĐỒ.....	
DANH MỤC CÁC BẢNG.....	
ĐẶT VẤN ĐỀ.....	1
CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN	3
1.1. TỔNG QUAN VỀ CHI <i>Gouania</i> Jacq.	3
1.1.1. Tổng quan về thực vật chi <i>Gouania</i> Jacq.	3
1.1.2. Thành phần hoá học của các loài thuộc chi <i>Gouania</i>	9
1.1.3. Tác dụng sinh học của các loài thuộc chi <i>Gouania</i>	17
1.2. TỔNG QUAN VỀ DÂY ĐÒN GÁNH (<i>Gouania leptostachya</i> DC.)	23
1.2.1. Đặc điểm thực vật và sinh thái cây Dây đòn gánh	23
1.2.2. Thành phần hoá học của cây Dây đòn gánh (<i>Gouania leptostachya</i> DC.)	24
1.2.3. Tác dụng sinh học của Dây đòn gánh.....	25
1.2.4. Công dụng theo y học cổ truyền của cây Dây đòn gánh	26
1.2.5. Một số bài thuốc có Dây đòn gánh.....	26
1.3. TỔNG QUAN VỀ VIÊM	27
1.3.1. Khái niệm	27
1.3.2. Nguyên nhân gây viêm	27
1.3.3. Phân loại viêm	27
1.3.4. Các phản ứng của quá trình viêm	28
1.3.5. Các chất trung gian trong phản ứng viêm	30
1.3.6. Một số mô hình đánh giá tác dụng chống viêm <i>in vitro</i>	31
CHƯƠNG 2: NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	36
2.1. NỘI DUNG VÀ THIẾT KẾ NGHIÊN CỨU	36
2.1.1. Về thực vật học.....	36
2.1.2. Về hóa học	36
2.1.3. Về tác dụng sinh học	36
2.2. NGUYÊN VẬT LIỆU NGHIÊN CỨU	37

2.2.1. Nguyên liệu.....	37
2.2.2. Thuốc thử, hóa chất, dung môi	37
2.2.3. Máy móc, thiết bị.....	39
2.3. ĐỊA ĐIỂM NGHIÊN CỨU	40
2.3.1. Nghiên cứu thực vật học.....	40
2.3.2. Nghiên cứu hóa học	40
2.3.3. Nghiên cứu tác dụng sinh học	40
2.4. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	40
2.4.1. Phương pháp nghiên cứu thực vật học	40
2.4.2. Phương pháp nghiên cứu thành phần hóa học.....	41
2.4.3. Nghiên cứu tác dụng chống viêm <i>in vitro</i>	42
CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU	51
3.1. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU THỰC VẬT HỌC	51
3.1.1. Kết quả giám định tên khoa học của mẫu Dây đòn gánh nghiên cứu	51
3.1.2. Đặc điểm thực vật của mẫu Dây đòn gánh nghiên cứu	51
3.1.3. Đặc điểm vi phẫu dược liệu Dây đòn gánh	53
3.1.4. Đặc điểm bột Dây đòn gánh	56
3.2. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU PHÂN LẬP VÀ XÁC ĐỊNH CẤU TRÚC CÁC HỢP CHẤT THEO ĐỊNH HƯỚNG CHỐNG VIÊM <i>IN VITRO</i>.....	58
3.2.1. Kết quả định tính các nhóm chất hữu cơ bằng phản ứng hóa học.....	58
3.2.2. Chiết xuất cao toàn phần và các cao phân đoạn của cao toàn phần	59
3.2.3. Kết quả sàng lọc tác dụng chống viêm <i>in vitro</i> của cao chiết toàn phần và cao phân đoạn Dây đòn gánh.....	59
3.2.4. Phân lập các hợp chất tinh khiết.....	64
3.2.5. Xác định cấu trúc của các hợp chất	67
3.3. KẾT QUẢ ĐÁNH GIÁ TÁC DỤNG CHỐNG VIÊM <i>IN VITRO</i> CỦA CÁC HỢP CHẤT TINH KHIẾT.....	104
3.3.1. Kết quả sàng lọc tác dụng chống viêm <i>in vitro</i> của các hợp chất tinh khiết	104
3.3.2. Kết quả đánh giá tác dụng chống viêm <i>in vitro</i> của cao chiết và các hợp chất tinh khiết tiềm năng	109

CHƯƠNG 4: BÀN LUẬN.....	114
4.1. VỀ KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU THỰC VẬT DÂY ĐÒN GÁNH.....	114
4.1.1. Về đặc điểm thực vật Dây đòn gánh	114
4.1.2. Về đặc điểm vi học Dây đòn gánh.....	116
4.2. VỀ KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN HÓA HỌC DÂY ĐÒN GÁNH	
.....	117
4.2.1. Về kết quả định tính thành phần hóa học Dây đòn gánh.....	117
4.2.2. Về kết quả chiết xuất, phân lập và xác định cấu trúc các hợp chất	118
4.3. VỀ TÁC DỤNG CHỐNG VIÊM CỦA DÂY ĐÒN GÁNH.....	126
4.3.1. Về lựa chọn đích nghiên cứu tác dụng sinh học và kỹ thuật sử dụng	126
4.3.2. Về lựa chọn mẫu thử tác dụng và quy trình thử nghiệm	127
4.3.3. Về kết quả sàng lọc tác dụng chống viêm <i>in vitro</i> của cao chiết tổng và các cao chiết phân đoạn từ Dây đòn gánh	128
4.3.4. Về kết quả đánh giá tác dụng chống viêm <i>in vitro</i> của các hợp chất tinh khiết từ cây Dây đòn gánh	130
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	139
KẾT LUẬN	139
KIẾN NGHỊ	140
CÁC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN	

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, TỪ VIẾT TẮT

Tên viết tắt	Tên viết đầy đủ
^{13}C -NMR	Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (Phổ cộng hưởng từ hạt nhân carbon 13)
1D-NMR	One-dimensional Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (Phổ cộng hưởng từ hạt nhân một chiều)
^1H -NMR	Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (Phổ cộng hưởng từ hạt nhân proton)
2D-NMR	Two-dimensional Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (Phổ cộng hưởng từ hạt nhân hai chiều)
AA	Acid arachidonic
ABTS	2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonic acid)
ACTH	Adrenocorticotropic Hormone (Hormon vỏ thượng thận)
AGS	Dòng tế bào ung thư biểu mô dạ dày người
AMPK	AMP-activated protein kinase
ATCC	American Type Culture Collection
CD_3OD	Methanol
CDCl_3	Cloroform
CHCl_3	Cloroform
COSY	Correlation Spectroscopy (Phổ tương tác hai chiều ^1H - ^1H)
COX	Cyclooxygenase
COX-2	Cyclooxygenase-2
DCM	Dichloromethan
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DEXA	Dexamethason
DMSO	Dimethyl sulfoxid
DPPH	1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl
EC_{50}	Effective Concentration 50% (Nồng độ có hiệu quả 50%)

ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay (Thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết với enzym)
eNOS	Endothelial Nitric Oxide Synthase
ESI-MS	Electrospray Ionization-Mass Spectrometry (Phổ khối ion hóa phun mù điện tử)
EtOAc	Ethyl acetat
EtOH	Ethanol
FBS	Fetal bovine serum (Huyết thanh thai bò)
Glc	Glucose
HCV	Hepatitis C Virus (Virus viêm gan C)
HIV	Human Immunodeficiency Virus (Virus gây suy giảm miễn dịch)
HL60	Hela-60 (Dòng tế bào ung thư cổ tử cung)
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation (Phổ tương quan dị nhân đa liên kết)
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Sắc ký lỏng hiệu năng cao)
HR-ESI-MS	High Resolution-Electron Spray Ionization-Mass Spectrometry (Phổ khối ion hóa phun mù điện tử phân giải cao)
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence (Phổ tương tác dị nhân lượng tử đơn)
IC ₅₀	Inhibition concentration 50 % (Nồng độ ức chế 50 %)
IKK	I κ B kinase
IL	Interleukin
IL-10	Interleukin-10
IL-1 β	Interleukin-1 β
IL-4	Interleukin-4
IL-6	Interleukin-6
iNOS	Inducible Nitric Oxide Synthase
K562	Tế bào bệnh bạch cầu nguyên bào tủy

KB	Tế bào ung thư biểu mô
LC-MS/MS	Liquid Chromatography–Mass Spectrometry (Sắc ký lỏng kết nối phổ khối)
LDL	Low density lipoprotein (Lipoprotein tỉ trọng thấp)
LNCap	Tế bào ung thư tuyến tiền liệt
LOX	Lipoxygenase
LPS	Lipopolysaccharid
mARN	Messenger RNA (ARN thông tin)
MCF-7	Human breast adenocarcinoma cell line (Dòng tế bào ung thư vú)
MeOH	Methanol
MGC803	Dòng tế bào ung thư biểu mô dạ dày người
MIC	Minimal Inhibitory Concentration (Nồng độ ức chế tối thiểu)
MPC-1	Mitochondrial Pyruvate Carrier 1
MS	Mass Spectrometry
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromid
MyD88	Myeloid differentiation primary response 88
<i>m/z</i>	Mass to charge ratio (tỉ lệ khối lượng/điện tích)
<i>n</i> -BuOH	<i>n</i> -Butanol
NF-κB	Nuclear Factor-kappa B (Yếu tố nhân kappa B)
<i>n</i> -Hx	<i>n</i> -Hexan
NMR	Nuclear Magnetic Resonance (Cộng hưởng từ hạt nhân)
nNOS	Nitric Oxide Synthase
NO	Nitric oxyd
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
NXB	Nhà xuất bản
OSCC	Oral squamous cell carcinoma (Dòng tế bào ung thư miệng)
P/ư	Phản ứng
PC3	Dòng tế bào ung thư tuyến tiền liệt
PG	Prostaglandin

PGE ₂	Prostaglandin E ₂
ppm	Part per million (Phần triệu)
Rha	Rhamnose
ROS	Reactive Oxygen Species (Các gốc tự do có oxy)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT-PCR	Real-Time Polymerase Chain Reaction
SCC2095	Dòng tế bào ung thư tế bào vảy
SCC4	Dòng tế bào ung thư tế bào vảy
SIRT1	Sirtuin 1
STT	Số thứ tự
TLC	Thin Layer Chromatography
TLR4	Toll-like Receptor 4
TLTK	Tài liệu tham khảo
TPA	12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetat
TNF- α	Tumor Necrosis Factor –alpha (Yếu tố hoại tử khối u alpha)
UV	Ultra violet (Tử ngoại)
Xyl	Xylose

DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ, SƠ ĐỒ

Hình 1.1. Cấu trúc các hợp chất steroid phân lập từ chi <i>Gouania</i>	17
Hình 1.2. Cấu trúc một số hợp chất khác phân lập từ các loài thuộc chi <i>Gouania</i>	17
Hình 1.3. Hình ảnh cây Dây đòn gánh lúc ra hoa	24
Hình 1.4. Diễn biến phản ứng viêm	29
Hình 1.5. Đích tác dụng chống viêm của các hợp chất	34
Hình 2.1. Sơ đồ thiết kế nghiên cứu	36
Hình 3.1. Các bộ phận của Dây đòn gánh	52
Hình 3.2. Cành mang hoa (A) và cành mang quả (B) Dây đòn gánh	53
Hình 3.3. Vi phẫu thân Dây đòn gánh	53
Hình 3.4. Vi phẫu lá Dây đòn gánh	56
Hình 3.5. Đặc điểm bột thân Dây đòn gánh	57
Hình 3.6. Đặc điểm bột lá Dây đòn gánh	57
Hình 3.23. Ảnh hưởng của cao chiết toàn phần và cao chiết phân đoạn của Dây đòn gánh đến khả năng sống sót của tế bào RAW264.7	60
Hình 3.24. Ảnh hưởng của cao chiết toàn phần và cao chiết phân đoạn Dây đòn gánh đến mức độ sản sinh PGE ₂	60
Hình 3.25. Ảnh hưởng của cao chiết toàn phần và cao chiết phân đoạn Dây đòn gánh đến sự sản xuất <i>IL-1β</i>	61
Hình 3.26. Ảnh hưởng của cao chiết toàn phần và cao chiết phân đoạn Dây đòn gánh đến sự sản xuất <i>IL-6</i>	62
Hình 3.27. Ảnh hưởng của cao chiết toàn phần và cao chiết phân đoạn Dây đòn gánh đến sự sản sinh NO trong tế bào RAW264.7	63
Hình 3.7. Sơ đồ chiết xuất và phân lập các hợp chất từ Dây đòn gánh	66
Hình 3.8. Cấu trúc hóa học (A) và tương tác COSY (—), HMBC (→) (B), và NOESY (↔) (C) của GL1	71
Hình 3.9. Cấu trúc hóa học (A) và tương tác COSY (—), HMBC (→) (B) của GL2 ..	75
Hình 3.10. Cấu trúc hóa học (A) và tương tác COSY (—), HMBC (→) (B) của GL3	78
Hình 3.11. Cấu trúc hóa học (A) và tương tác COSY (—), HMBC (→) (B) của GL4	82

Hình 3.12. Cấu trúc hóa học và tương tác COSY (—), HMBC (→) và NOESY của GL5	86
Hình 3.13. Cấu trúc hóa học của hợp chất GL6	88
Hình 3.14. Cấu trúc hóa học của hợp chất GL7	90
Hình 3.15. Cấu trúc hóa học của hợp chất GL8	92
Hình 3.16. Cấu trúc hóa học (A) và tương tác HMBC (→), NOESY (↔) (B) của GL9	94
Hình 3.17. Cấu trúc hóa học của hợp chất GL10	95
Hình 3.18. Cấu trúc hóa học (A) và tương tác HMBC (→) (B) của GL11	97
Hình 3.19. Cấu trúc hóa học của GL12	98
Hình 3.20. Cấu trúc hóa học (A) và tương tác HMBC (→) (B) của GL13	101
Hình 3.21. Cấu trúc hóa học của hợp chất GL14	102
Hình 3.22. Cấu trúc hóa học của hợp chất GL15	104
Hình 3.28. Ảnh hưởng của các hợp chất tinh khiết đến khả năng sống sót của tế bào RAW264.7	105
Hình 3.29. Ảnh hưởng của các hợp chất tinh khiết đến mức độ sản sinh PGE ₂	106
Hình 3.30. Ảnh hưởng của các hợp chất tinh khiết lên sự sản sinh IL-1 β và IL-6	108
Hình 3.31. Ảnh hưởng của các hợp chất tinh khiết đến sự sản sinh NO	109
Hình 3.32. Ảnh hưởng của cao GLE và các hợp chất GL5, GL7, GL9 lên mức độ biểu hiện mRNA COX-2 (A), COX-2 luciferase (B) và protein COX-2 (C, D)	110
Hình 3.33. Ảnh hưởng của hợp chất GL7 theo nồng độ lên sự sản sinh PGE ₂	112
Hình 3.34. Ảnh hưởng của hợp chất GL7 lên mức độ biểu hiện mRNA COX-2 (A) và protein COX-2 (B)	113
Hình 4.1. Hình ảnh cành mang quả loài <i>G. javanica</i> (A)	116
Hình 4.2. Hình ảnh cành lá loài <i>G. leptostachya</i> DC.	116
Hình 4.3. Các hợp chất phân lập từ Dây đòn gánh <i>G. leptostachya</i> DC	120
Hình 4.4. Hình ảnh sắc ký lớp mỏng các hợp chất phân lập từ Dây đòn gánh	121
Hình 4.6. Sơ đồ cơ chế chống viêm của các hợp chất phân lập từ Dây đòn gánh	137

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 1.1. Danh sách các loài thuộc chi <i>Gouania</i> trên thế giới	6
Bảng 1.2. Các hợp chất triterpenoid phân lập từ các loài thuộc chi <i>Gouania</i>	10
Bảng 1.3. Các hợp chất flavonoid phân lập từ các loài thuộc chi <i>Gouania</i>	12
Bảng 1.4. Các hợp chất saponin triterpenoid phân lập từ các loài thuộc chi <i>Gouania</i> .	14
Bảng 3.1. Kết quả định tính các nhóm chất có trong cây Dây đòn gánh	58
Bảng 3.2. Dữ liệu phổ ^1H và ^{13}C NMR của hợp chất GL1	67
Bảng 3.3. Dữ liệu phổ ^1H và ^{13}C NMR của hợp chất GL2	71
Bảng 3.4. Dữ liệu phổ ^1H và ^{13}C NMR của hợp chất GL3	75
Bảng 3.5. Dữ liệu phổ ^1H và ^{13}C NMR của hợp chất GL4	78
Bảng 3.6. Dữ liệu phổ ^1H và ^{13}C NMR của hợp chất GL5	82
Bảng 3.7. Dữ liệu phổ ^1H và ^{13}C NMR của hợp chất GL6	87
Bảng 3.8. Dữ liệu phổ ^1H và ^{13}C NMR của hợp chất GL7	88
Bảng 3.9. Dữ liệu phổ ^1H và ^{13}C NMR của hợp chất GL8	90
Bảng 3.10. Dữ liệu phổ ^1H và ^{13}C NMR của hợp chất GL9	92
Bảng 3.11. Số liệu phổ ^1H và ^{13}C -NMR của hợp chất GL10.....	94
Bảng 3.12. Số liệu phổ ^1H và ^{13}C -NMR của hợp chất GL11	95
Bảng 3.13. Số liệu phổ ^1H và ^{13}C -NMR của hợp chất GL12	97
Bảng 3.14. Số liệu phổ ^1H và ^{13}C -NMR của hợp chất GL13	98
Bảng 3.15. Số liệu phổ ^1H và ^{13}C -NMR của hợp chất GL14.....	101
Bảng 3.16. Số liệu phổ ^1H của hợp chất GL15.....	102
Bảng 4.1. So sánh kết quả nghiên cứu vi phẫu với kết quả của tác giả Nguyễn Văn An	117
Bảng 4.2. Tóm tắt kết quả thử tác dụng chống viêm <i>in vitro</i> của các hợp chất tinh khiết phân lập từ Dây đòn gánh.....	132

ĐẶT VẤN ĐỀ

Nằm trong khu vực khí hậu nhiệt đới gió mùa nên Việt Nam có thảm thực vật phong phú và đa dạng với nhiều dược liệu quý. Với thế mạnh về nguồn tài nguyên dược liệu, cộng đồng dân tộc Việt Nam đã tích lũy được kinh nghiệm và truyền thống lâu đời trong việc sử dụng các loại cây và con làm thuốc, hình thành nên một kho tàng tri thức không lồ mang bản sắc riêng của từng dân tộc. Đây là kho tàng vô cùng quý giá, là chỉ dẫn đầu tay cho con đường tìm kiếm phát triển thuốc mới, phục vụ chăm sóc sức khỏe. Để khai thác, sử dụng hiệu quả nguồn tài nguyên ấy trước tiên cần có hiểu biết khoa học về chúng, trong đó có việc mô tả và xác định tên khoa học, nghiên cứu về hóa học và tác dụng sinh học.

Dây đòn gánh (*Gouania leptostachya* DC.), thuộc họ Táo ta - Rhamnaceae là cây thuốc sử dụng phổ biến trong y học dân gian. Cây thường mọc ở ven rừng, bãi hoang ở nhiều nơi thuộc các tỉnh Lạng Sơn, Bắc Ninh, Bắc Giang, Bắc Cạn, Hoà Bình, Yên Bái, Thái Nguyên vào tới tận Đồng Nai, Bà Rịa [1]. Dân gian thường dùng cây này giã nhỏ thêm rượu xoa bóp vào những nơi sưng tấy, đau nhức do đòn đánh, chỗ bị thương do ngã, dùng sắc uống hoặc ngâm rượu uống có tác dụng đối với gân xương và bổ dưỡng. Lá được dùng giã đắp vào trán, gan bàn tay để giảm sốt, chữa ngộ độc, sài giật, cảm gió [2].

Dây đòn gánh đã được một số nhà khoa học trong và ngoài nước quan tâm nghiên cứu. Các công trình đã công bố về dược liệu này cho biết sự có mặt của 6 hợp chất flavonoid, 3 hợp chất triterpenoid, 1 hợp chất saponin, 2 hợp chất benzopyran trong cây [3], [4], [5]. Nghiên cứu của Tô Thị Mai Dung cũng cho thấy khả năng chống viêm *in vitro* của cao chiết methanol thông qua ức chế hoạt động của Src và NF- κ B [6]. Tuy vậy, cơ sở dữ liệu về hóa học loài *Gouania leptostachya* DC. vẫn còn hạn chế và đây là thành phần mang lại hoạt tính chống viêm cho dược liệu này vẫn là một dấu hỏi.

Nhằm tìm kiếm bằng chứng khoa học cho kinh nghiệm sử dụng cây thuốc trong dân gian để chữa các triệu chứng điển hình của viêm, đề tài đã tiến hành nghiên cứu về thành phần hóa học và tác dụng sinh học của phần trên mặt đất cây Dây đòn gánh theo định hướng tác dụng chống viêm với tiêu đề: "**Nghiên cứu đặc điểm thực vật, thành phần hóa học và tác dụng chống viêm *in vitro* của Dây đòn gánh (*Gouania***

***leptostachya DC.*), họ Táo ta (Rhamnaceae)",** gồm 3 mục tiêu chính:

1. Xác định được đặc điểm thực vật và đặc điểm vi học của Dây đòn gánh
2. Phân lập và xác định được cấu trúc hóa học một số hợp chất từ Dây đòn gánh theo định hướng tác dụng chống viêm *in vitro*.
3. Đánh giá tác dụng chống viêm *in vitro* của cao chiết và các hợp chất phân lập từ Dây đòn gánh trên mô hình tế bào RAW264.7 bị kích thích gây viêm bởi LPS.

CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN

1.1. TỔNG QUAN VỀ CHI *Gouania* Jacq.

1.1.1. Tổng quan về thực vật chi *Gouania* Jacq.

1.1.1.1. Vị trí phân loại

Theo hệ thống phân loại của Takhtajan, chi *Gouania* Jacq. thuộc: [7], [8]

Ngành Ngọc lan (Magnoliophyta)

Lớp Ngọc lan (Magnoliopsida)

Phân lớp Hoa hồng (Rosidase)

Liên bộ Táo ta (Rhamnanae)

Bộ Táo ta (Rhamnales)

Họ Táo ta (Rhamnaceae)

Chi *Gouania* Jacq.

1.1.1.2. Đặc điểm thực vật chi *Gouania* Jacq.

Chi *Gouania* tách biệt rõ ràng với các chi khác trong họ Táo ta bởi các điểm đặc trưng: dạng thân leo có tua cuốn và quả có ba cánh mở ra theo ba đường của ba lá noãn. [9]. Đặc điểm thực vật cụ thể của chi như sau:

Cây bụi leo, thường có tua cuốn. Lá mọc so le, lá kèm rất dễ rụng, cuống lá có khía rãnh, mép khía răng cưa. Hoa lưỡng tính, mọc thành chùy ở đầu cành hoặc kẽ lá; đài hình ống, ngắn, có 5 lá đài hình trứng hoặc hình tam giác. Cánh hoa 5, hình thìa. Nhị 5, bao phấn dính lưng. Đĩa mật dày, hình ngũ giác, nhẵn hoặc có lông. Bầu hạ, nằm sâu trong đĩa mật, 3 ô, mỗi ô có 1 noãn. Quả có 3 cánh, khuyết ở hai đầu. Hạt 3, màu nâu đỏ, bóng, hình trứng ngược, có nội nhũ mỏng [10].

1.1.1.3. Các khóa phân loại chi *Gouania* Jacq.

Chi *Gouania* lần đầu tiên được phát hiện và phân loại bởi Jacquin vào năm 1763 với 2 loài ở Haiti là *G. tomentosa* và *G. glabra*. Cho đến nay có 6 khóa phân loại chi *Gouania* trên thế giới đã được báo cáo [11], [12], [13], [14], [15].

❖ Khóa phân loại chi *Gouania* ở Philippin

Năm 2020, dựa vào các đặc điểm hình thái học, Daniel Cahen đã phân loại chi *Gouania* ở Philippin có 5 loài. Đặc điểm của các bộ phận chủ yếu được tác giả sử dụng để phân loại bao gồm: lá, lá kèm, đĩa mật và quả. Theo tác giả quan sát, lá loài *G.*

leptostachya chỉ có 4-5 cặp gân phụ, trong khi các loài còn lại thường có 5-6-7 cặp gân phụ. Đồng thời, các tuyến dọc theo mép lá lõm chứ không lồi như ở các loài khác. Loài *G. leptostachya* cũng là loài duy nhất hai mặt lá nhẵn, chỉ có lông thưa ở trên gân lá. Lá kèm ở hầu hết các loài đều rụng sớm, duy chỉ có loài *G. leptostachya* là lá kèm tồn tại. Đĩa mật loài *G. leptostachya* cũng khác với các loài còn lại ở điểm có hình đa giác với các cạnh song song. Quả loài *G. leptostachya* cũng to hơn các loài còn lại và thân quả nhẵn, lúc khô cùng màu với ba cánh [15].

❖ *Khóa phân loại chi Gouania ở Trung Quốc*

Thực vật chí Trung Quốc xác nhận có hai loài thuộc chi *Gouania* là loài *G. javanica* và loài *G. leptostachya*. Hai loài này được phân loại nhờ đặc điểm của lá. Lá *G. javanica* có lông màu vàng nâu dày đặc hoặc nhiều lông trên gân lá. Lá *G. leptostachya* nhẵn không có lông hoặc có lông thưa trên gân lá [14].

Loài *G. leptostachya* lại được chia thành 3 thứ phân biệt với nhau bởi khác biệt về đặc điểm của quả và lá kèm. Thứ *G. leptostachya* var. *macrocarpa* có quả to hơn, kích thước 12-13 × 13-18 mm. Thứ *G. leptostachya* var. *leptostachya* và *G. leptostachya* var. *tonkinensis* có cùng kích thước quả 9-10 × 10-12 mm, nhưng thứ *G. leptostachya* var. *leptostachya* lá kèm sớm rụng trong khi thứ *G. leptostachya* var. *tonkinensis* lá kèm tồn tại, bao quanh thân và mép khía răng cưa [14].

❖ *Khóa phân loại chi Gouania ở Bắc Mỹ*

Amy Pool là người đưa ra khóa phân loại chi *Gouania* ở Bắc Mỹ vào năm 2011. Tác giả báo cáo 15 loài thuộc chi này và phân loại chúng dựa trên các đặc điểm hình thái của cành, lá, lá kèm, hoa và quả cũng như đặc điểm sinh sản của cây [13].

❖ *Khóa phân loại chi Gouania ở Hawaii và Tây Ấn Độ Dương*

Chi *Gouania* sớm đã được ghi nhận là một phần của hệ thực vật Hawaii bởi tác giả F. J. F. Meyen (1835). Harold St. John năm 1969 đã mô tả chi tiết các đặc điểm thực vật của 14 loài thuộc chi *Gouania* và ông đã xây dựng khóa phân loại chi này dựa trên các đặc điểm chính của cành, lá, hoa, đĩa mật và quả [12].

❖ *Khóa phân loại chi Gouania ở Madagascar và Tây Ấn Độ Dương*

Sven Buerki (2011) công bố khóa phân loại chi *Gouania* ở Madagascar và Tây Ấn Độ Dương gồm 17 loài dựa trên các đặc điểm khác nhau về hình thái như hình dạng,

màu sắc, đặc điểm mép lá, lông trên bề mặt lá, gân lá, lá kèm, đặc điểm của hoa và của quả [11].

❖ *Khóa phân loại chi Gouania ở Cuba*

Dasmiliá Cruz Arozarena báo cáo 3 loài thuộc chi *Gouania* ở Cuba và xây dựng khóa phân loại dựa trên các đặc điểm của lá và quả [16].

❖ *Nghiên cứu phân loại chi Gouania ở Việt Nam*

Người nghiên cứu phân loại họ Táo ta (Rhamnaceae) nói chung và chi *Gouania* nói riêng đầu tiên ở Việt Nam là nhà thực vật học, đồng thời cũng là dược sĩ người Pháp, Charcles – Joseph Marie Pitard (thường được viết tắt là “J. Pit.”). Trong bộ “Flore Générale de L’indochine”, Tom 1 (Faseicule 8) xuất bản năm 1912, ông đã đưa ra khóa phân loại và mô tả khá đầy đủ hai loài thuộc chi *Gouania* là *G. javanica* Miq. và *G. leptostachya* DC. Tuy nhiên, khi nghiên cứu kỹ về đặc điểm hình thái loài *G. leptostachya* ở Việt Nam và Lào, J. Pitard đã căn cứ vào hình dạng và kích thước của quả để chia loài này thành hai thứ (var.). Thứ *G. leptostachya* DC. var. *macrocarpa* Pit. quả có kích thước trên $10 - 12 \times 13 - 15$ mm. Thứ *G. leptostachya* DC. var. *tonkinensis* Pit. quả có kích thước nhỏ hơn, thường ở trong khoảng $9 - 10 \times 10 - 12$ mm [17].

Từ kết quả nghiên cứu phân loại của J. Pitard, các nhà thực vật Việt Nam là Phạm Hoàng Hộ (2003) và Nguyễn Tiến Bản (2003) đều khẳng định trong hệ thực vật của Việt Nam, chi *Gouania* có hai loài và hai thứ kể trên [18], [19].

1.1.1.4. Phân bố của chi Gouania Jacq.

Trên thế giới: Theo Medan & Schirarend (2004), chi *Gouania* có khoảng 50 loài phân bố ở khu cận nhiệt đới. Weberbauer ước lượng chi *Gouania* có khoảng 66 loài ở các khu vực nhiệt đới trên thế giới [12]. Theo Mabberley (2008), chi *Gouania* có 50-70 loài [20]. Kết quả tổng hợp các tài liệu đã công bố về thực vật chi *Gouania* cho danh sách 67 loài thuộc chi *Gouania* trên thế giới, tên loài và phân bố loài được thể hiện tại bảng 1.1.

Ở Việt Nam: Chi *Gouania* có 2 loài: *G. leptostachya* DC. và *G. javanica* Miq. [1]. Loài *G. leptostachya* DC. phân bố ở các tỉnh Lạng Sơn, Hòa Bình, Khánh Hòa, Ninh Thuận, Đồng Nai, Bà Rịa-Vũng Tàu. Loài *G. javanica* Miq. phân bố ở các tỉnh Lạng Sơn, Quảng Trị, Kon Tum, An Giang [1].

Bảng 1.1. Danh sách các loài thuộc chi *Gouania* trên thế giới

STT	Tên khoa học	Phân bố	TLTK
1.	<i>G. adriatica</i>	Địa Trung Hải	[21]
2.	<i>G. ambrensis</i> Buerki, Phillipson & Callm.	Montagne d'Ambre (Madagascar)	[11]
3.	<i>G. aphrodes</i> Tul.	Phía bắc Madagascar và quần đảo Comoro	[11]
4.	<i>G. axilliflora</i>	Peru	[22]
5.	<i>G. bishopii</i> Hbd.,	Hawaii	[12]
6.	<i>G. callmanderi</i> Buerki	Tây và Tây Nam Madagascar	[11]
7.	<i>G. colombiana</i> Suess.	Costa Rica đến Nam Mỹ	[13]
8.	<i>G. conzattii</i> Greenm.	Thái Bình Dương đến miền trung Mexico, phía nam Oaxaca	[13]
9.	<i>G. croatii</i> A. Pool.	Khu Kênh đào Panama	[12]
10.	<i>G. cupreifolia</i> Buerki, Phillipson & Callm.	Rải rác trong rừng từ trung bình đến cao (800 đến 1400 m) ở Đông Madagascar	[11]
11.	<i>G. cupuliflora</i> Buerki, Phillipson & Callm.	Madagascar, quần đảo Comoro và đảo Re'union	[11]
12.	<i>G. ekmanii</i> Alain.	Loài đặc hữu ở những ngọn đồi thuộc tỉnh Pinar del Río, Cuba, độ cao 290-500 m	[13]
13.	<i>G. exilis</i>	Úc	[23]
14.	<i>G. etctillata</i>	Hawaii	[12]
15.	<i>G. eurycarpa</i> Standl.	Yucatan Peninsula, Mexico (trong rừng có độ cao 0-520 m)	[13]

16.	<i>G. fauriei</i> (levl.) comb. nov.	Hawaii	[12]
17.	<i>G. ferruginea</i> A. Pool.	Guatemala, Honduras (trong rừng thông có độ cao 1500-2200 m)	[13]
18.	<i>G. fimbriata</i>	Philippin	[15]
19.	<i>G. gautieri</i> Buerki, Phillipson & Callm.	Trong rừng thứ sinh gần Manongarivo, Tây Bắc Madagascar	[11]
20.	<i>G.</i> <i>guiengolensis</i> A. Pool	Khu vực Thái Bình Dương của eo Tehuacan, Mexico	[13]
21.	<i>G. hawaiiensis</i>	Hawaii	[12]
22.	<i>G. hillebrandi</i> Oliver.	Hawaii	[12]
23.	<i>G. hillii</i>	Úc	[23]
24.	<i>G. hofrichteri</i>	Địa Trung Hải	[21]
25.	<i>G. humbertii</i> H. Perrier	Chỉ có ở Analamerana và Daraina (Tây Bắc Madagascar)	[11]
26.	<i>G. hypoglauca</i> Standl.	Đông Nam Nicaragua, Costa Rica và Panama (trong các khu rừng ẩm có độ cao 0-1000m)	[9]
27.	<i>G. laxiflora</i> Tul.	Phổ biến ở Tây và Tây Nam Madagascar, Mayotte, Aldabra và Coleues	[11]
28.	<i>G.</i> <i>leptostachya</i> DC.	Ấn Độ, Philippin, Trung Quốc	[24], [15]
29.	<i>G. lineata</i> Tul.	Phổ biến ở Tây Madagascar	[11]
30.	<i>G. longipetala</i> (Hemsl)	Châu Phi (Cameroon)	[25]
31.	<i>G.</i> <i>longipedunculata</i> sp. nov.	Philippin	[15]
32.	<i>G.</i> <i>longispicata</i>	Châu Phi	[25]
33.	<i>G. lupuloides</i> (L.) Urb.	Đông Nam Hoa Kỳ (Florida), Bắc Mexico đến Bắc Panama, Caribe	[13]
34.	<i>G. lydgatei</i>	Hawaii	[12]

35.	<i>G. maderaspatana</i>	Ấn Độ	[24]
36.	<i>G. mannii</i> sp. nov.	Hawaii	[12]
37.	<i>G. mauritiana</i> Lam.	Chỉ phát hiện ở đảo Re'union	[11]
38.	<i>G. meyeri</i> Steud (<i>G. integrifolia</i>)	Hawaii	[12]
39.	<i>G. microcarpa</i>	Ấn Độ	[24]
40.	<i>G. miocenica</i>	Mexico	[26]
41.	<i>G. mozambicensis</i>	Châu Phi	[25]
42.	<i>G. myriocarpa</i> Tul.	Phổ biến ở Đông Madagascar	[11]
43.	<i>G. nematostachya</i>	Philippin	[15]
44.	<i>G. obamana</i> A. Pool	Đại Tây Dương Mexico, miền đông Puebla	[13]
45.	<i>G. obtusifolia</i>	Philippin	[15]
46.	<i>G. oliveri</i>	Hawaii	[12]
47.	<i>G. orientalis</i>	Địa Trung Hải	[21]
48.	<i>G. pannigera</i> Tul.	Trung tâm Madagascar, châu Phi	[11], [25]
49.	<i>G. perrieri</i> Buerki, Phillipson & Callm.	Tây Bắc Madagascar (vùng Sambirano và Ankarana)	[11]
50.	<i>G. phillipsonii</i> Buerki	Phổ biến trong rừng ẩm ở độ cao trung bình, phía đông Madagascar	[11]
51.	<i>G. pigra</i>	Địa Trung Hải	[21]
52.	<i>G. pilata</i>	Hawaii	[12]
53.	<i>G. polygama</i> (Jacq.) Urb.	Mexico, Guatemala, Honduras, Nicaragua, Costa Rica, Panama, Cuba, Tobago, Trinidad, Colombia, Venezuela, Guyana, Brazil, Ecuador, Peru, Bolivia, Paraguay, Đông Bắc Argentina, Bắc Mỹ	[13]

54.	<i>G. pubidisca</i> A. Pool.	Đại Tây Dương (Mexico, Nicaragua)	[13]
55.	<i>G. remyi</i>	Hawaii	[12]
56.	<i>G. rosei</i> Wiggins	Đại Tây Dương (Mexico)	[13]
57.	<i>G.</i> <i>sandwichiana</i>	Hawaii	[12]
58.	<i>G. scandens</i> (Gaertn.) R. B. Drumm	Phổ biến ở rừng độ cao từ thấp đến trung bình (0-1100 m) ở phía đông Madagascar và ở Mauritius	[11]
59.	<i>G. stipularis</i> DC.	Đại Tây Dương (Mexico)	[13]
60.	<i>G.</i> <i>taolagnarensis</i> Buerki, Phillipson & Callm.	Đông Nam Madagascar (gần Taolagnaro)	[11]
61.	<i>G. thinophila</i>	Hawaii	[12]
62.	<i>G. tiliaefolia</i>	Banglades, Philippin	[27]
63.	<i>G. ulmifolia</i> Hook. & Arn.	Nam Brazil, Uruguay, Argentina	[28]
64.	<i>G. velutina</i> Reissek in Mart.	Mexico, Tây Bắc Costa Rica, Bắc Panama, Bắc Venezuela, Bắc Brazil	[13]
65.	<i>G. vitifolia</i> Gray	Hawaii	[12]
66.	<i>G. willdenowi</i>	Địa Trung Hải	[21]
67.	<i>G. zebriifolia</i> Buerki, Phillipson & Callm.	Chỉ được ghi nhận ở Daraina và Sahafary (Tây Bắc Madagascar)	[11]

1.1.2. Thành phần hoá học của các loài thuộc chi *Gouania*

Tổng hợp các công trình đã công bố cho thấy có 43 hợp chất được phân lập từ các loài thuộc chi *Gouania*. Trong đó, ba nhóm chất chính là triterpenoid (9 hợp chất), flavonoid (15 hợp chất) và saponin (12 hợp chất). Ngoài ra còn có 7 hợp chất khác.

1.1.2.1. Triterpenoid

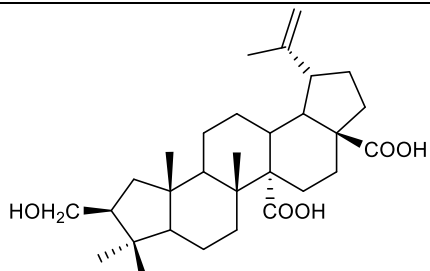
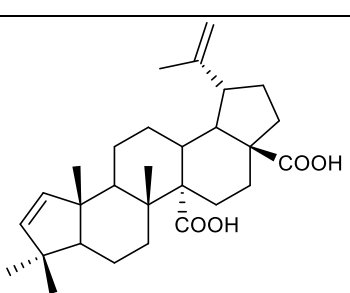
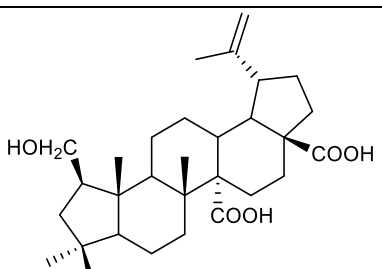
Từ các loài thuộc chi *Gouania*, các nhà khoa học đã phân lập được 9 hợp chất triterpenoid. Trong đó, 4 hợp chất có khung ceanothan (1-4), 4 hợp chất khung lupan (5-8) và một hợp chất có khung olean (9).

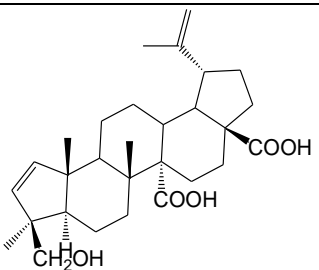
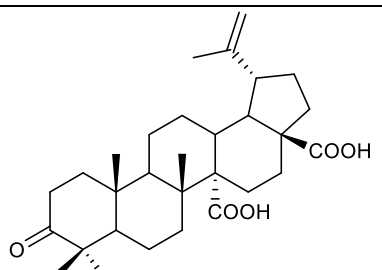
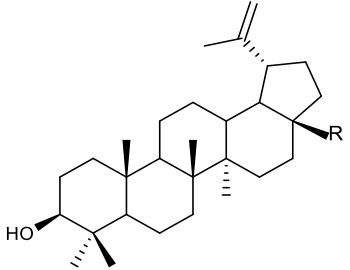
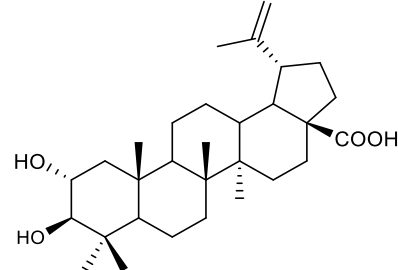
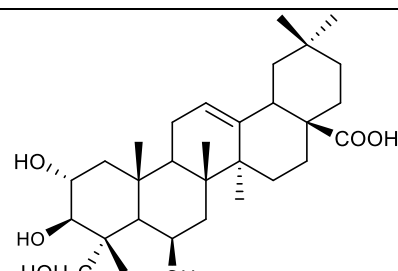
Lupan triterpenoid rất phổ biến trong họ Táo ta (Rhamnaceae) tuy nhiên cho đến nay mới có 4 hợp chất khung này được báo cáo phân lập từ các loài thuộc chi *Gouania* (hợp chất 5-8). Các hợp chất này là lupeol, acid betulinic và dẫn xuất của chúng.

Ceanothan triterpenoid là dẫn xuất của lupan triterpenoid với sự sắp xếp lại vòng A năm cạnh. Các hợp chất khung ceanothan phân lập từ chi *Gouania* (hợp chất 1-4) đều có cấu trúc tương tự nhau, chỉ khác nhau về nhóm thế và vị trí nhóm thế trên vòng A.

Cấu trúc các hợp chất triterpenoid đã phân lập từ chi *Gouania* được thể hiện tại bảng 1.2.

Bảng 1.2. Các hợp chất triterpenoid phân lập từ các loài thuộc chi *Gouania*

TT	Tên hợp chất	Cấu trúc hóa học	Loài/TLTK
1.	Acid gouanic C (1)		<i>G. leptostycha</i> [5]
2.	Acid ceanothenic (2)		
3.	Acid gouanic A (3)		<i>G. ulmifolia</i> [28] <i>G. leptostachya</i> [5]

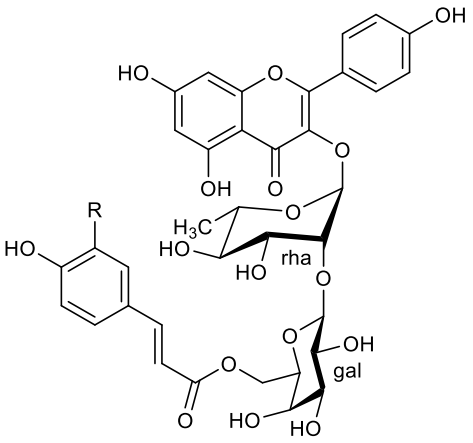
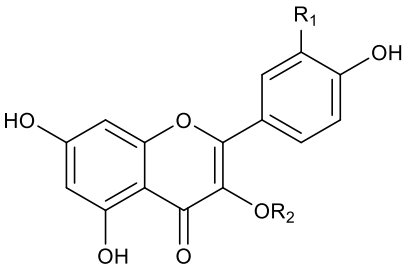
4.	Acid gouanic B (4)		<i>G. ulmifolia</i> [28] <i>G. longipetala</i> [29], [30]
5.	Acid gouanic (5)		<i>G. microcarpa</i> [24]
6.	Lupeol (6)	 6: R = CH₃ 7: R = COOH	<i>G. ulmifolia</i> [28] <i>G. longipetala</i> [30]
7.	Acid betulinic (7)		<i>G. ulmifolia</i> [28] <i>G. longipetala</i> [30]
8.	Acid alphitolic (8)		<i>G. ulmifolia</i> [28] <i>G. longipetala</i> [31], [30]
9.	Acid terminolic (9)		<i>G. longipetala</i> [32]

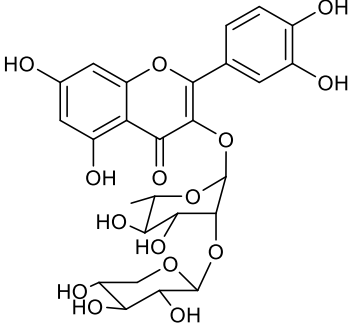
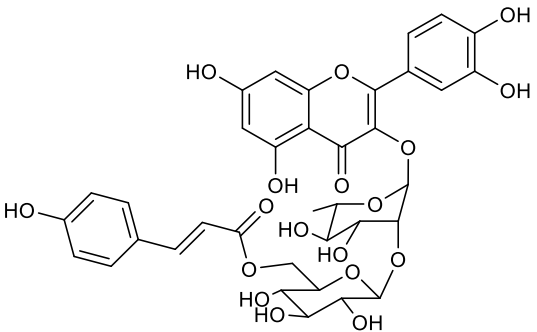
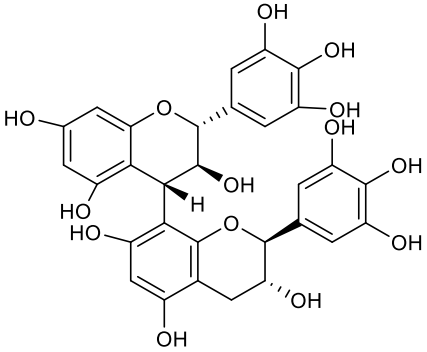
1.1.2.2. Flavonoid

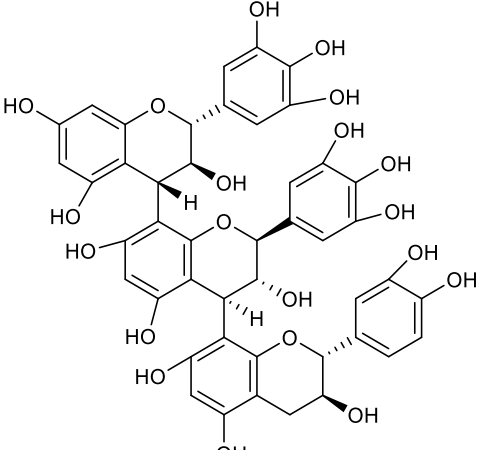
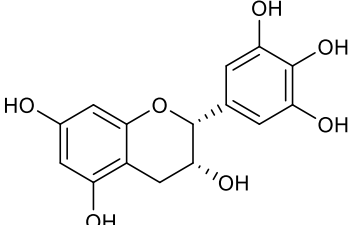
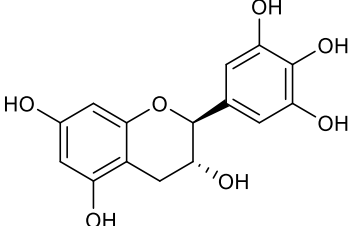
Flavonoid là nhóm chất rất phổ biến trong thực vật và đem lại nhiều tác dụng đáng quý. Trong số các hợp chất đã phân lập từ chi *Gouania*, flavonoid chiếm số lượng

nhieu nhất với 15 hợp chất. 11 hợp chất (**10-20**) thuộc nhóm flavonol, là các dẫn xuất của kaempferol và quercetin. 2 hợp chất nhóm flavan-3-ol (**23-24**), 1 hợp chất biflavonoid (**21**) và 1 hợp chất triflavonoid (**22**). Cấu trúc các hợp chất flavonoid phân lập từ chi *Gouania* được thể hiện tại bảng 1.3.

Bảng 1.3. Các hợp chất flavonoid phân lập từ các loài thuộc chi *Gouania*

TT	Tên hợp chất	Cấu trúc hóa học	Loài/TLTK
1.	Kaempferol-3- <i>O</i> -(6- <i>O</i> - <i>E</i> -coumaroyl)- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-rhamnopyranosid (10)	 <p>10: R = H 11: R = CH₃</p>	<i>G. longipetala</i> [31]
2.	Kaempferol-3- <i>O</i> -(6- <i>O</i> - <i>E</i> -feruloyl)- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-rhamnopyranosid (11)		
3.	Kaempferol-3- <i>O</i> - α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-galactopyranosid (12)	 <p>R₁ R₂ 12: H Rha-(1\rightarrow6)-Gal- 13: H Rha-(1\rightarrow6)-Glc- 14: H Rha- 15: H Xyl-(1\rightarrow2)-Rha- 16: H Gal-(1\rightarrow2)-Rha- 17: OH Gal-(1\rightarrow2)-Rha- 18: OH Rha-(1\rightarrow6)-Gal-</p>	<i>G. longipetala</i> [31]
4.	Kaempferol-3- <i>O</i> - α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosid (13)		
5.	Kaempferol-3- <i>O</i> - α -L-rhamnopyranosid (14)		
6.	Kaempferol-3- <i>O</i> - β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-rhamnopyranosid (15)		
7.	Kaempferol-3- <i>O</i> - β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-rhamnopyranosid (16)		

8.	Quercetin-3- <i>O</i> - β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-rhamnopyranosid (17)		
9.	Quercetin-3- <i>O</i> - α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-galactopyranosid (18)		
10.	Quercetin 3- <i>O</i> - β -D-dxylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-rhamnopyranosid (19)		
11.	Quercetin 3- <i>O</i> -6- <i>E</i> -p-coumaroyl- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-rhamnopyranosid (20)		<p style="text-align: center;"><i>G. leptostachya</i> [4]</p>
12.	Prodelphinidin B3 (21)		<p style="text-align: center;"><i>G. leptostachya</i> [3]</p>

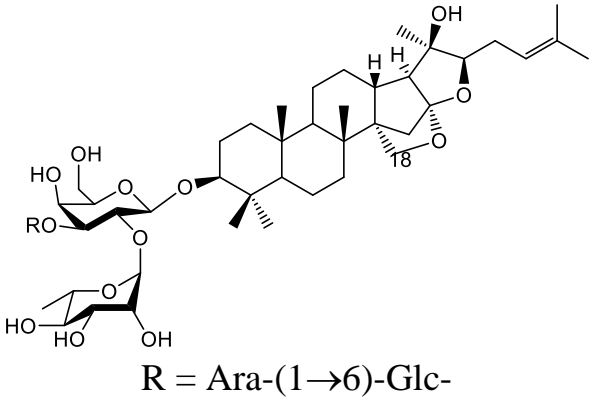
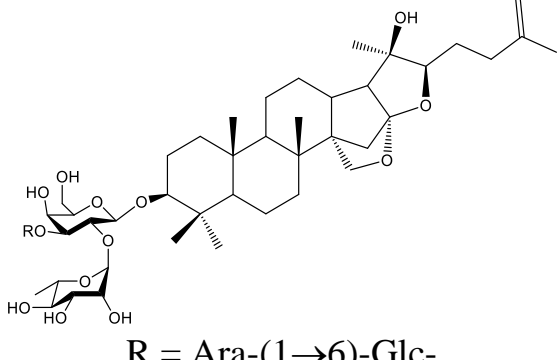
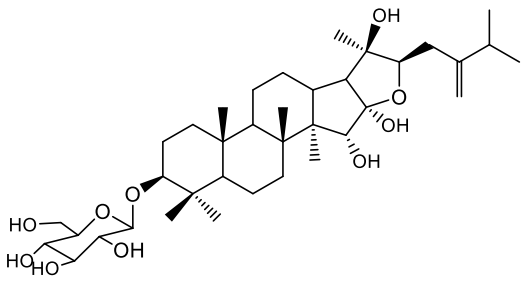
13.	Prodelphinidin C (22)		
14.	(-)-Epigallocatechin (23)		
15.	(+)–Galocatechin (24)		

1.1.2.3. Saponin

Tổng hợp các công bố cho thấy có 11 hợp chất saponin triterpenoid đã được phân lập từ các loài thuộc chi *Gouania*. Ba hợp chất có aglycon khung tricyclic triterpenoid (25-27), 8 hợp chất còn lại có aglycon là tetracyclic triterpenoid khung dammaran. Cấu trúc các hợp chất saponin phân lập từ chi *Gouania* được trình bày tại bảng 1.4.

Bảng 1.4. Các hợp chất saponin triterpenoid phân lập từ các loài thuộc chi *Gouania*

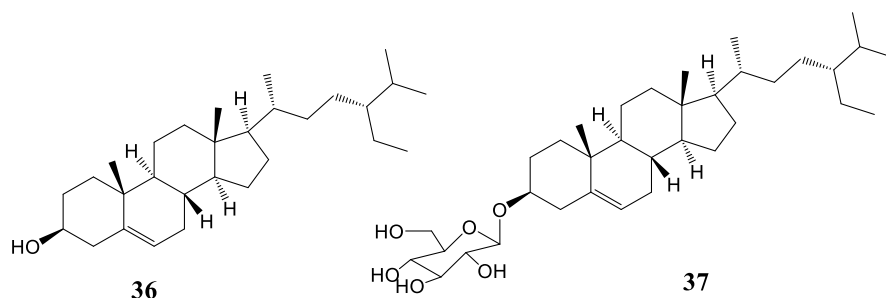
TT	Tên hợp chất	Cấu trúc hóa học	Loài/TLTK
1.	Gouanosid A (25)		<i>G.</i> <i>lupuloides</i>
2.	Gouanosid B (26)		[33]

9.	Gouaniasid V (33)	 <p style="text-align: center;">R = Ara-(1→6)-Glc-</p>	<i>G. longipetala</i> [29]
10.	Gouaniasid VI (34)	 <p style="text-align: center;">R = Ara-(1→6)-Glc-</p>	<i>G. longipetala</i> [29]
11.	Joazeirosid A (35)		<i>G. leptostachya</i> [4] <i>G. longipetala</i> [30]

1.1.2.5. Một số hợp chất khác

Ngoài các nhóm chất chính trên, một số hợp chất khác cũng được phân lập từ các loài thuộc chi *Gouania*.

Từ loài *G. ulmifolia*, các nhà khoa học đã phân lập được 2 hợp chất steroid là β -sitosterol (36) và β -sitosterol glucosid (37) [28]. Hợp chất (37) cũng được xác nhận có ở loài *G. longipetala* [30]. Cấu trúc các hợp chất thể hiện tại hình 1.1.

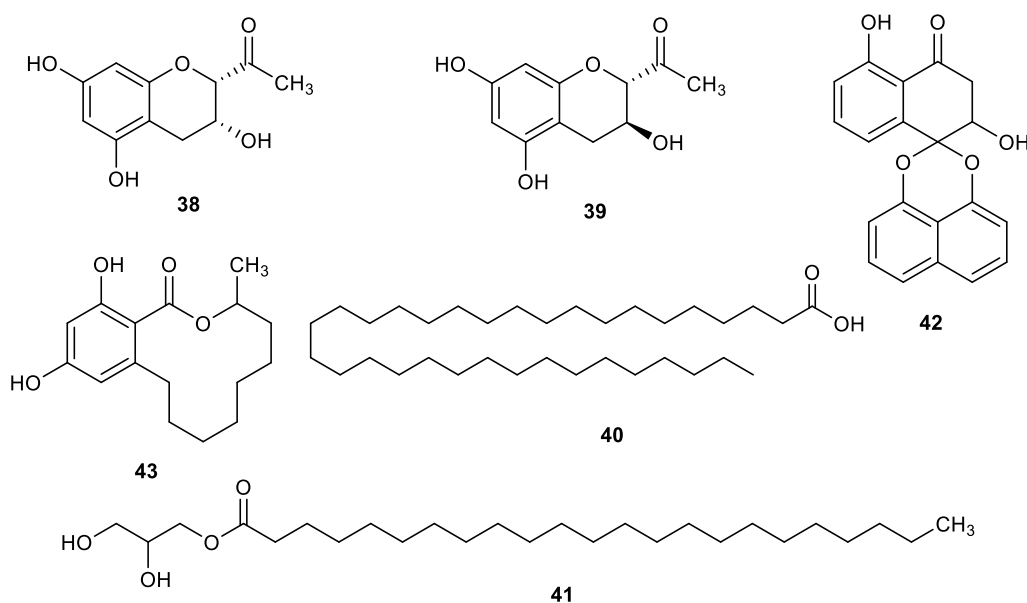


Hình 1.1. Cấu trúc các hợp chất steroid phân lập từ chi *Gouania*

Hai dẫn xuất của benzopyran được phân lập từ thân của *G. leptostycha* DC. var. *tonkinensis* Pitard: 1-[(*rel2S,3R*)-3,5,7-trihydroxy-3,4-dihydro-2H-chromen-2-yl] ethanon (**38**) và 1-[(*rel2S,3S*)-3,5,7-trihydroxy-3,4-dihydro-2H-chromen-2-yl] ethanon (**39**) [3]. Acid tetratriacontanoic (**40**) được phân lập từ lá loài *G. microcarpa* [24].

Năm 2014, Ekuadzi phân lập được 3 hợp chất từ loài *G. longipetala* là: glycerol monotricosanoat (**41**), palmarumycin BG1 (**42**) và de-*O*-methyllasioldiplodin (**43**) [34].

Cấu trúc các hợp chất như hình 1.2.



Hình 1.2. Cấu trúc một số hợp chất khác phân lập từ các loài thuộc chi *Gouania*

1.1.3. Tác dụng sinh học của các loài thuộc chi *Gouania*

1.1.3.1. Tác dụng giảm đau, chống viêm, loét

❖ *Tác dụng chống viêm*

Cao chiết ethanol 70 % loài *G. longipetala* được báo cáo có tác dụng chống viêm tốt trên mô hình gầy phù bàn chân chuột bằng carrageenan. Liều 300 mg/kg, cao chiết ức chế phù 93,78 % [32].

Theo Tô Thị Mai Dung và cộng sự (2015), cao chiết methanol *G. leptostachya* có tác dụng ức chế sản sinh NO và PGE₂ ở tế bào RAW264.7 và đại thực bào phúc mạc bị kích thích gây viêm bởi LPS, đồng thời giảm tổn thương dạ dày ở chuột bị gây viêm dạ dày bằng dung dịch HCl/EtOH. Cao chiết ở nồng độ 50 và 300 µg/mL làm giảm rõ rệt biểu hiện mRNA của gen cảm ứng tổng hợp NO (iNOS) và COX-2, ức chế chuyển p65-một đơn vị chính của NF-κB vào nhân tế bào, ức chế sự phosphoryl hóa các enzym ngược dòng kích hoạt p65, như protein kinase B (AKT), κBα kinase (IKK), IκBα, và hoạt động enzym của Src. Kết quả phân tích HPLC cho biết, một trong những thành phần chính của cao chiết là resveratrol. Hợp chất này cũng ức chế NO và Src, đồng thời làm giảm các triệu chứng dạ dày do dung dịch HCl/EtOH gây ra. Nhóm nghiên cứu cho rằng, cao chiết methanol của *G. leptostachya* có thể là đối tượng tiềm năng có tác dụng chống viêm thông qua con đường ức chế Src và NF-κB [6].

Cao chiết giàu polyphenol từ loài *G. mauritiana* được chứng minh có tác dụng làm giảm sản xuất IL-6, MPC1 và ức chế ROS trên đại thực bào bị kích thích viêm bởi TNF-α và LPS. Trên mô hình kích thích gây viêm bằng TNF-α, ở nồng độ 25 µM GAE, cao chiết *G. mauritiana* làm giảm IL-6 từ 0,91 ± 0,07 xuống còn 0,35 ± 0,04 ng/mg protein. Trên mô hình kích thích gây viêm bằng LPS, cao chiết *G. mauritiana* (25 µM GAE) làm giảm IL-6 từ 0,23 ± 0,05 xuống còn 0,12 ± 0,07 ng/mg protein và giảm MPC1 từ 2,68 ± 0,50 xuống còn 0,81 ± 0,34 ng/mg protein [35].

❖ Tác dụng chống loét

Các hợp chất lupeol (**6**), 3-O-β-D-glucopyranosyl gouanogenin A (**27**), acid alphitolic (**8**) phân lập từ loài *G. tiliaefolia* có tác dụng ức chế enzym urease- enzym tham gia vào tiến triển loét với giá trị IC₅₀ lần lượt là 12,5 ± 0,21; 26,7 ± 0,26 và 29,2 ± 0,14 µM (chứng dương thiourea có IC₅₀ = 21,6 ± 0,12 µM) [27].

❖ Tác dụng giảm đau

Tác dụng giảm đau trung ương và ngoại vi của cao chiết *G. tiliaefolia* được đánh giá bằng thử nghiệm kẹp đuôi chuột và mô hình chuột bị gây đau quặn bằng acid acetic.

Ở cả 2 mô hình, cao chiết methanol có tác dụng giảm đau phụ thuộc liều. Trong thử nghiệm kẹp đuôi chuột, khả năng kéo dài thời gian phản ứng quan sát được sau 30 phút và 60 phút lần lượt là 105,95 % ($p < 0,01$) và 165,07 % ($p < 0,001$) ở liều 200 mg/kg cân nặng; 129,73 % ($p < 0,01$) và 190,83 % ($p < 0,001$) ở liều 400 mg/kg cân nặng. Trên mô hình gây đau quặn bởi acid acetic, cao chiết methanol *G. tiliaefolia* ức chế số cơn đau quặn 54,17 % ($p < 0,01$) và 64,58 % ($p < 0,001$) ở mức liều 200 và 400 mg/kg cân nặng, tuy thấp hơn nhưng vẫn đạt ý nghĩa thống kê khi so sánh với chứng dương natri diclofenac (77,08 %) [27].

1.1.3.2. Tác dụng chống đái tháo đường

Chong Yao và cộng sự (2011) đã thử tác dụng ức chế α -glucosidase của cao tổng, cao phân đoạn *n*-BuOH, phân đoạn H₂O và các hợp chất phân lập từ loài *G. leptostycha* DC. var. *tonkinensis* Pitard: 1-[(*rel2S,3R*)-3,5,7-trihydroxy-3,4-dihydro-2H-chromen-2-yl] ethanon (**38**) và 1-[(*rel2S,3S*)-3,5,7-trihydroxy-3,4-dihydro-2H-chromen-2-yl] ethanon (**39**), cùng với 4 flavonoid đã biết là prodelphinidin B3 (**21**), prodelphinidin C (**22**), (-)-epigallocatechin (**23**) và (+)-galocatechin (**24**). Kết quả cho thấy hợp chất (**21**) và (**24**) có tác dụng ức chế α -glucosidase yếu. Hợp chất prodelphinidin C (**22**) cùng với cao tổng, cao phân đoạn BuOH và phân đoạn H₂O thể hiện tác dụng tốt. Đặc biệt, prodelphinidin C ở nồng độ 10 $\mu\text{mol/L}$ làm giảm đáng kể hoạt tính của α -glucosidase với tỷ lệ ức chế 66,26 % ($\text{IC}_{50} = 5,52 \pm 0,24 \mu\text{M/L}$), acarbose là đối chứng dương, $\text{IC}_{50} = 73,6 \pm 4,1 \mu\text{M/L}$ [3].

Tăng đường huyết có thể dẫn đến thiếu máu do tăng glycosyl hóa protein màng hồng cầu. Maxwell I. Ezeja và cộng sự năm 2014 đã nghiên cứu tác dụng của cao chiết methanol lá loài *G. longipetala* (Hemsl.) trên chuột Wistar bị gây tăng đường huyết bằng cách tiêm màng bụng alloxan monohydrat (160 mg/kg). Chuột được điều trị bằng cao chiết *G. longipetala* liều 50, 100 và 150 mg/kg trong 21 ngày, chứng dương là glibenclamid (2 mg/kg). Kết quả cho thấy, cả cao chiết *G. longipetala* và glibenclamid đều làm giảm đáng kể ure và creatinin huyết thanh ($p < 0,01$) so với chứng âm, tác dụng này phụ thuộc liều. Đồng thời, cao chiết *G. longipetala* cũng làm tăng số lượng hồng cầu và giảm số lượng bạch cầu ($p < 0,05$) phụ thuộc liều. Giải phẫu mô bệnh học thận ở chuột điều trị bằng thuốc và lô chứng âm không có sự thay đổi. Như vậy, *G.*

longipetala có thể là đối tượng tiềm năng điều trị cho bệnh nhân đái tháo đường có liên quan đến thiếu máu và bệnh thận [36].

Ở nghiên cứu tiếp theo, năm 2015 Maxwell I. Ezeja và cộng sự tiếp tục công bố cao chiết *G. longipetala* liều 150 mg/kg cân nặng đã làm giảm có ý nghĩa thống kê mức đường huyết trên chuột được điều trị từ $16,2 \pm 2,03$ xuống còn $6,5 \pm 1,52$ mM/L trong 24 h. Ở ngày 21, cao chiết *G. longipetala* ở các mức liều 50, 100 và 150 mg/kg đã làm giảm lượng đường huyết lần lượt là 62,0 %, 74,8 % và 75,0 %. Đồng thời, điều trị bằng cao chiết *G. longipetala* cũng phục hồi sự thay đổi mô bệnh học tuyến tụy [36].

Thử nghiệm dung nạp glucose đường uống cho thấy cao chiết methanol của loài *G. tiliaefolia* ở liều 200 và 400 mg/kg cân nặng làm giảm đường huyết lần lượt là 71,42 % và 75,39 %, trong khi chứng dương glibenclamid chỉ làm giảm 66,17 % [30].

1.1.3.3. Tác dụng chống oxy hóa

Nghiên cứu tác dụng chống oxy hóa của cao chiết ethanol 70 % từ loài *G. longipetala* cho thấy khả năng chống oxy hóa tổng số tương đương với acid ascorbic 0,80 mg/g, khả năng dọn gốc tự do tốt trên mô hình DPPH với giá trị IC_{50} là 0,004 mg/mL. Kết quả này hoàn toàn phù hợp với thành phần hóa học vì hàm lượng phenol tổng số tính theo acid tannic của loài *G. longipetala* khá cao, 52,02 mg/g [32].

Cao chiết ethanol của *G. leptostachya* thể hiện tác dụng dọn tác nhân oxy hóa NO mạnh với $IC_{50} = 2,34$ μ g/mL [37].

Cao chiết *G. longipetala* liều 150 mg/kg làm giảm nồng độ malondiadehyd từ $23,0 \pm 1,34$ xuống còn $10,3 \pm 0,43$ mg/dL, tăng nồng độ superoxid dismutase hoạt động từ $2,97 \pm 0,34$ lên $5,80 \pm 0,53$ IU/L [36].

Trong số các hợp chất Diane Patricia Apie Gossan công bố năm 2015, 4 hợp chất kaempferol-3-*O*-(6-*O*-*E*-feruloyl)- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-rhamnopyranosid (**11**), kaempferol-3-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-galactopyranosid (**12**), quercetin-3-*O*- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-rhamnopyranosid (**17**), quercetin-3-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-galactopyranosid (**18**) có tác dụng chống oxy hóa với giá trị EC_{50} từ 13,8 đến 47,4 μ M, chứng dương là acid ascorbic có EC_{50} 60 μ M [31].

Cao chiết giàu polyphenol của loài *G. mauritiana* nồng độ 25 µg/ml có khả năng dọn DPPH ($50,7 \pm 4,6$ %) [35].

Các hợp chất 3-*O*-β-D-glucopyranosyl gouanogenin A (27), joazeirosid A (35), acid aliphitic (8), lupeol (6), acid betulinic (7) và acid gouanic B (4) phân lập từ loài *G. longipetala* có tác dụng chống oxy hóa trung bình trên mô hình ức chế hoạt động của lipoxygenase với giá trị IC₅₀ từ $52,5 \pm 0,12$ đến $69,5 \pm 0,87$ µM, chứng dương là butylated hydroxyanisol (BHA) có IC₅₀ = $44,2 \pm 0,06$ µM [30].

Tufael Ahmed (2019) nghiên cứu tác dụng chống oxy hóa của *G. tiliaefolia* cho thấy cao chiết ether dầu hòa có khả năng dọn gốc tự do DPPH tốt nhất với IC₅₀ = $2,88 \pm 0,02$ µg/ml, tiếp theo là cao chiết methanol có IC₅₀ = $4,79 \pm 0,17$ µg/mL và cao chiết cloroform (IC₅₀ = $37,51 \pm 0,96$ µg/mL) [27].

1.1.3.4. Tác dụng kháng vi sinh vật

❖ Tác dụng kháng khuẩn

Gossan (2017) thử tác dụng kháng khuẩn của các hợp chất phân lập từ loài *G. longipetala* trên 3 chủng vi khuẩn *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* và *Escherichia coli*. Kết quả, trong các hợp chất thử có acid aliphitic (8) thể hiện tác dụng trung bình trên 3 chủng vi khuẩn với giá trị MIC lần lượt là 32, 64 và 128 mg/mL [29].

Cao chiết ethanol 70 % của loài *G. longipetala* có tác dụng kháng khuẩn trên chủng *Bacillus subtilis* NCTC 10073 với giá trị MIC 125 µg/mL [32].

Cao chiết lá loài *G. javanica* cho thấy hoạt tính kháng nấm mạnh trên chủng *Aspergillus niger* với đường kính trung bình của vòng vô khuẩn là 21,16 mm; hoạt tính kháng nấm vừa phải trên chủng *Candida albicans* với đường kính trung bình của vòng vô khuẩn là 12,08 mm; và hoạt tính kháng nấm yếu trên chủng *Trichophyton mentagrophytes* với đường kính trung bình của vòng vô khuẩn là 8,55 mm [38].

Theo Nguyễn Văn An năm 2010, tác dụng kháng vi sinh vật của cấn *n*-BuOH là không đáng kể đối với vi khuẩn và không có tác dụng đối với vi nấm [5].

❖ Tác dụng kháng virus

Trong một nghiên cứu tác dụng ức chế hoạt động của chymotrypsin, 2 hợp chất joazeirosid A (35) và acid gouanic B (4) thể hiện tác dụng ức chế protease tốt với giá trị IC₅₀ lần lượt là $19,6 \pm 0,55$ µM và $17,5 \pm 0,65$ µM, chứng dương chymostatin có

IC₅₀ là 5,7 ± 0,14 μM. Điều đó cho thấy, các hợp chất này có thể là chất ức chế serin tiềm năng. NS3 serease protease của HCV và protease HIV là các enzym chính xúc tác sự nhân lên của virus, là mục tiêu của thuốc chống HCV và HIV. Do đó, các hợp chất này có thể có hiệu quả chống virus [39].

1.1.3.5. Tác dụng chống ung thư

Gossan (2015) đã thử tác dụng gây độc tế bào của các hợp chất triterpenoid glycosid phân lập được từ loài *G. longipetala* trên hai dòng tế bào ung thư bạch cầu người K562 và HL60. Trong số các hợp chất này, chỉ có jujubosid I (**28**) thể hiện tác dụng trung bình trên cả 2 dòng tế bào với giá trị IC₅₀ lần lượt là 21,0 và 13,5 μM [31].

1.1.3.6. Tác dụng chống Alzheimer's

Enzym butyl cholinesterase có thể là mục tiêu thiết yếu trong điều trị bệnh Alzheimer's. Bên cạnh acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase cũng tích lũy nồng độ cao hơn trong não bệnh nhân Alzheimer's, đặc biệt là trong tế bào thần kinh, tế bào thần kinh đệm. Các hợp chất joazeirosid A (**35**) và acid gouanic B (**4**) thể hiện tác dụng ức chế enzym butyl cholinesterase yếu với giá trị IC₅₀ lần lượt là 49,5 ± 0,47 μM và 58,5 ± 0,28 μM. Chúng dương eserine có IC₅₀ là 7,8 ± 0,27 μM [39].

1.1.3.7. Một số tác dụng khác

❖ Tác dụng kiểu estrogen

Dzeufiet Djomeni Paul Désiré và cộng sự nghiên cứu tác dụng kiểu estrogen của cao chiết nước (liều 45 và 180 mg/kg) và cao chiết ethanol (liều 40 và 160 mg/kg) vỏ thân loài *G. longipetala* Hemsl trên mô hình chuột Wistar bị gây hội chứng mãn kinh, chứng dương là estradiol valerat (1 mg/kg). Kết quả chỉ ra rằng, cả 2 cao chiết đều thể hiện tác dụng kiểu estrogen trên âm đạo, không ảnh hưởng đến khối lượng tử cung và độ dày niêm mạc so với các nhóm chứng. Đồng thời, 2 loại cao chiết này đều có tác dụng chống xơ vữa do làm giảm nồng độ AI, AIP and LDL-cholesterol trong máu. Cao chiết nước và cao chiết ethanol *G. longipetala* cũng ngăn chặn sự tăng MDA do cắt bỏ buồng trứng ở chuột so với nhóm chứng đạt ý nghĩa thống kê. Như vậy, cao chiết nước và cao chiết ethanol *G. longipetala* có tác dụng kiểu estrogen thông qua việc tạo độ ẩm âm đạo, điều hòa huyết áp, cải thiện tình trạng mỡ máu và chức năng nội mô mà không

gây ảnh hưởng không mong muốn đến nội mạc tử cung ở chuột bị cắt bỏ buồng trứng [39].

❖ *Tác dụng chống tan máu*

Cao chiết *G. tiliaefolia* thể hiện tác dụng chống tan máu nhưng yếu hơn chất đối chứng dương là acid acetyl salicylic. Tỷ lệ phần trăm ức chế tan máu của acid acetyl salicylic là $85,37 \pm 3,00$ % trong khi của cao chiết ether dầu hỏa và cao chiết methanol *G. tiliaefolia* lần lượt là $69,18 \pm 0,54$ % và $58,05 \pm 1,32$ % [27].

❖ *Tác dụng chống tiêu chảy*

Trên mô hình chuột bị gây tiêu chảy bằng dầu thầu dầu, cao chiết methanol *G. tiliaefolia* liều 400 mg/kg cân nặng làm giảm tiêu chảy 71,43 % trong khi chứng dương loperamid giảm tỷ lệ tiêu chảy 64,29 % [27].

1.2. TỔNG QUAN VỀ DÂY ĐÒN GÁNH (*Gouania leptostachya* DC.)

1.2.1. Đặc điểm thực vật và sinh thái cây Dây đòn gánh

❖ *Đặc điểm thực vật*

Dây đòn gánh còn có tên gọi khác như: Dây gân, Dây đòn kẻ trộm, Dây đôi kiến, Dây xà phòng, Dây râu rồng, Đơn tai mèo, Seng thanh (Mường), Poát pào, Khau căn (Tày), Chừa than hồ (Thái) [1], [2].

Cây bụi leo, dài hàng mét. Thân cành nhẵn, màu nâu sau đỏ xám nhạt. Lá mọc so le, hình bầu dục dài 4-10cm, rộng 2-6cm, góc tròn hoặc hình tim, đầu thuôn nhọn, mép khía răng cưa; lá non ở ngọn cành biến thành tua cuốn, hai mặt nhẵn, mặt dưới rất nhạt, có gân nổi rõ; lá kèm to bèn, bao thân, khía răng; cuống lá dài 1-2cm [10], [40].

Cụm hoa mọc thành chùy ở kẽ lá hoặc đầu cành, dài 10-20cm; hoa nhỏ, đơn tính, màu trắng lục; lá bắc hình tam giác nhọn; hoa đực có 5 lá đài có lông ở mặt ngoài, 5 cánh hoa có móng hẹp, nhị 5, dài bằng tràng, bao phấn nhỏ; hoa cái có bầu hạ, 3 ô [40].

Quả khô có 3 cánh dày, khuyết ở hai đầu, màu nâu vàng sáng. Mùa hoa: tháng 7-8; mùa quả tháng 9-12 [40].

Loài *Gouania leptostachya* DC. có ba thứ [10], [40]:

- Thứ *leptostachya* DC.: có quả to, dài 10-12mm, rộng 13-15mm, đen nhạt có cánh dày. Mùa quả tháng 12.

- Thứ *tonkinensis* Pitard: lá có răng cưa nhỏ, lá kèm hình lá rất rộng, ôm lấy thân ở phía dưới, tồn tại. Hoa dưới của hoa tự dính trên những trục khá dài và kèm theo lá bắc. Quả nâu vàng nhạt.

- Thứ *macrocarpa* Pitard: quả kích thước 12–13 × 13–18 mm, có cánh dày.



Hình 1.3. Hình ảnh cây Dây đòn gánh lúc ra hoa

Nguồn: PGS.TS. Trần Văn Ôn

❖ *Đặc điểm sinh thái*

Dây đòn gánh thuộc loại dây leo ưa sáng, thường mọc lẫn trong các quần thể rừng thứ sinh, đồi cây bụi, đôi khi gặp cả ở vùng núi đá vôi, thuộc các tỉnh vùng núi thấp và trung du. Cây mọc ở nơi nhiều ánh sáng, ra hoa quả hàng năm. Sau khi bị chặt, phần gốc và thân còn lại đều có khả năng tái sinh. Chưa quan sát được cây con tái sinh từ hạt [7].

1.2.2. Thành phần hoá học của cây Dây đòn gánh (*Gouania leptostachya* DC.)

Khảo sát ban đầu cho thấy, phần trên mặt đất Dây đòn gánh có chứa saponin, flavonoid, đường khử, caroten và sterol [2], [5]. Theo tổng hợp các công trình công bố trong và ngoài nước, các tác giả đã phân lập được 6 flavonoid, 3 hợp chất triterpenoid, 1 hợp chất saponin và 2 hợp chất benzopyran từ loài *G. leptostachya* DC.

❖ *Flavonoid*

Năm 2019, nhóm nghiên cứu Nguyễn Thị Kim Thúy đã công bố 2 hợp chất flavonoid trong Dây đòn gánh là quercetin 3-*O*- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-rhamnopyranosid (**19**), quercetin 3-*O*-6-*E*-*p*-coumaroyl- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -

L-rhamnopyranosid (**20**) [4]. Trước đó, 4 flavonoid prodelphinidin B3 (**21**), prodelphinidin C (**22**), (-)-epigallocatechin (**23**) và (+)-galocatechin (**24**) cũng được phân lập từ thân của *G. leptostycha* DC. var. *tonkinensis* Pitard bởi nhóm tác giả Yao C. và cộng sự [3].

❖ *Triterpenoid*

Nguyễn Văn An đã phân lập được ba hợp chất triterpenoid khung ceanothan từ cao phân đoạn *n*-BuOH của Dây đòn gánh: acid gouanic C (**1**), acid ceanothenic (**2**) và acid gouanic A (**3**) [5].

❖ *Saponin*

Nguyễn Thị Kim Thúy (2019) công bố phân lập được 1 hợp chất saponin triterpenoid là joazeirosid A (**35**) [4].

❖ *Các hợp chất khác*

Hai dẫn xuất của benzopyran, 1-[(*rel2S,3R*)-3,5,7-trihydroxy-3,4-dihydro-2H-chromen-2-yl] ethanon (**38**) và 1-[(*rel2S,3S*)-3,5,7-trihydroxy-3,4-dihydro-2H-chromen-2-yl] ethanon (**39**) được phân lập từ thân của *G. leptostycha* DC. var. *tonkinensis* Pitard [3].

1.2.3. Tác dụng sinh học của Dây đòn gánh

Dây đòn gánh *G. leptostycha* DC. đã được chứng minh có một số tác dụng sinh học như: tác dụng chống viêm, tác dụng trên đường huyết, tác dụng chống oxy hóa, tác dụng kháng khuẩn.

❖ *Tác dụng chống viêm*

Theo Tô Thị Mai Dung và cộng sự (2015), cao chiết methanol của *G. leptostachya* có tác dụng chống viêm thông qua sự ức chế hoạt động của Src và NF- κ B là các chất trung gian của phản ứng viêm [6].

❖ *Tác dụng trên đường huyết*

Các hợp chất benzopyran: 1-[(*rel2S,3R*)-3,5,7-trihydroxy-3,4-dihydro-2H-chromen-2-yl] ethanon (**38**) và 1-[(*rel2S,3S*)-3,5,7-trihydroxy-3,4-dihydro-2H-chromen-2-yl] ethanon (**39**) và 4 flavonoid là prodelphinidin B3 (**21**), prodelphinidin C (**22**), (-) - epigallocatechin (**23**) và (+) - galocatechin (**24**) có tác dụng ức chế α -glucosidase. Trong đó, hợp chất (**22**) thể hiện tác dụng tốt nhất [3].

❖ *Tác dụng chống oxy hóa*

Cao chiết ethanol *G. leptostachya* thể hiện tác dụng chống oxy hóa mạnh do tác nhân oxy hóa NO với $IC_{50} = 2,34 \mu\text{g/mL}$ [37].

❖ *Tác dụng kháng khuẩn*

Theo Nguyễn Văn An năm 2010, tác dụng kháng vi sinh vật của cấn *n*-BuOH là không đáng kể đối với vi khuẩn và không có tác dụng đối với vi nấm [5].

1.2.4. Công dụng theo y học cổ truyền của cây Dây đòn gánh

❖ *Tính vị và công năng*

Thân và lá Dây đòn gánh có vị chua chát, se, hơi đắng, tính mát, có tác dụng lương huyết, giải độc, thư cân, hoạt lạc, thanh nhiệt, tiêu viêm [2], [40].

❖ *Công dụng* [1], [2], [40]

Dùng ngoài, giã nhỏ cây và lá, thêm rượu hoặc giấm xoa bóp vào những nơi sưng tấy, mụn nhọt, đinh độc, hoặc đắp vào vết bỏng, vết thương, lở ngứa.

Lá giã nát đắp vào trán, gan bàn tay để giảm sốt, sài giật, cảm gió.

Các thầy lang người Dao Tiền ở xã Yên Ninh, huyện Phú Lương, Thái Nguyên đã biết sử dụng khá nhiều cây thuốc để chữa bệnh ngoài da, trong đó có cây Dây đòn gánh (*G. leptostachya* DC.). Cách sử dụng chủ yếu là đun nước tắm gội; dùng giã nát đắp, bôi; ngâm rượu bôi, sắc nước bôi, sắc nước ngâm.

Ở Ấn Độ, người ta cũng dùng lá giã đắp các vết thương. Ở Trung Quốc, dây lá được dùng trị cơ thể đau mỏi, dùng ngoài trị bỏng lửa và lở ngứa.

Dây đòn gánh thông mạch, làm tan máu ứ, tiêu sưng, giảm đau, chữa sưng tấy, đau nhức do đòn đánh, chỗ bị thương do ngã, đau người, đau ngang lưng, gánh vác nặng đau sụn xương sống, cơ lưng. Ngày 8-16g sắc uống hoặc ngâm rượu uống.

1.2.5. Một số bài thuốc có Dây đòn gánh

- *Chữa sưng tấy, tụ máu, đau nhức do chấn thương*: lá Dây đòn gánh 10g, lá Náng hoa trắng 10g, lá Bạc thau 8g, tất cả dùng tươi, giã nát, thêm ít rượu, đắp, bó. Ngày làm một lần [40].
- *Chữa bỏng nhất là bỏng vôi*: Lá Dây đòn gánh tươi giã nát, quả Bò kết phơi khô tán bột, trộn hai thứ lại, bôi ngày vài lần. Thân lá và lá giã nát, ngâm bằng một ít nước sôi để nguội. Lấy dịch bôi vào vết bỏng [7].

- *Chữa sốt cao gây co giật ở trẻ em:* lá Dây đòn gánh 10g, vỏ Núc nác hay quả khế 10g, lá Ngải cứu 8g, lá Nhọ nồi 8g, rễ Táo rừng 8g. Tất cả phơi khô sao vàng, sắc với 400ml nước, còn 100ml chia 2 lần, uống trong ngày [7].
- *Chữa rắn cắn:* Lá Dây đòn gánh tươi giã nát, thêm ít nước gạo uống, bã đắp.
- *Diệt chấy:* Rễ Dây đòn gánh nấu với nước, gội đầu.

1.3. TỔNG QUAN VỀ VIÊM

1.3.1. Khái niệm

Viêm là phản ứng tại chỗ của cơ thể do các mô bị kích thích hoặc tổn thương. Đó là một phản ứng phức tạp của các mô liên kết và của tuần hoàn mao mạch ở nơi bị tác động, được biểu hiện bằng các triệu chứng sưng, nóng, đỏ, đau và rối loạn chức năng của cơ quan bị viêm [41].

1.3.2. Nguyên nhân gây viêm

Phản ứng viêm hình thành do nhiều nguyên nhân khác nhau, có thể chia thành hai nhóm là nguyên nhân bên ngoài và nguyên nhân bên trong. Tuy nhiên, rất khó phân biệt rõ ràng hai loại nguyên nhân này vì thực tế, nguyên nhân bên ngoài thường dẫn đến những biến đổi thành nguyên nhân bên trong [42].

❖ Nguyên nhân bên ngoài

Nhiễm khuẩn là nguyên nhân phổ biến nhất. Vi khuẩn, virus, nấm mốc và các kí sinh trùng tác động thông qua các độc tố, các sản phẩm chuyển hóa.

Tác nhân vật lí như cơ học (chấn thương do va đập, vết thương kể cả vết thương vô khuẩn), nhiệt học (bỏng nóng hoặc bỏng lạnh), tia xạ, dị vật.

Tác nhân hóa học là chất hòa tan gây hoại tử tế bào và tổn thương chất gian bào (dung dịch acid, kiềm, muối...), chất gây thực bào của bạch cầu đa nhân.

❖ Nguyên nhân bên trong

Các nguyên nhân bên trong có thể gặp như hoại tử tổ chức, nghẽn mạch, xuất huyết, rối loạn thần kinh dinh dưỡng (như viêm tắc động mạch), thay đổi nội sinh của các chất gian bào như hình thành các phức hợp miễn dịch kháng nguyên-kháng thể, phản ứng miễn dịch (quá mẫn, tự miễn).

1.3.3. Phân loại viêm

Viêm có thể chia làm 2 dạng chính là viêm cấp tính và viêm mạn tính. Viêm cấp tính là đáp ứng tức thì của hệ miễn dịch chống lại mầm bệnh và tổn thương mô. Đây là

một quá trình tự giới hạn nhanh, được trung gian bởi các eicosanoid và các amin hoạt mạch, làm tăng chuyển động của huyết tương và bạch cầu tới vị trí bị nhiễm bệnh [43]. Các triệu chứng của viêm cấp tính là sưng, nóng, đỏ, đau và mất chức năng hoạt động [44], [45]. Viêm cấp tính diễn ra trong thời gian ngắn, và thường được coi như một biện pháp tự điều trị của cơ thể [46]. Trong giai đoạn đầu của đáp ứng viêm, các chất trung gian tiền viêm như prostaglandin và leukotrien đóng vai trò quan trọng [47]. Tuy nhiên, sự tiến triển từ viêm cấp tính sang viêm mạn tính trong nhiều căn bệnh phổ biến lại liên quan đến sự gia tăng các chất trung gian gây viêm này [48]. Trong viêm mạn tính, nhiều loại cytokin và yếu tố kích thích tăng trưởng được giải phóng, dẫn đến việc tăng sinh các tế bào miễn dịch như bạch cầu lympho và nguyên bào sợi. Viêm mạn tính có thể dẫn đến tổn thương mô liên tục bởi các tế bào này [49], [46].

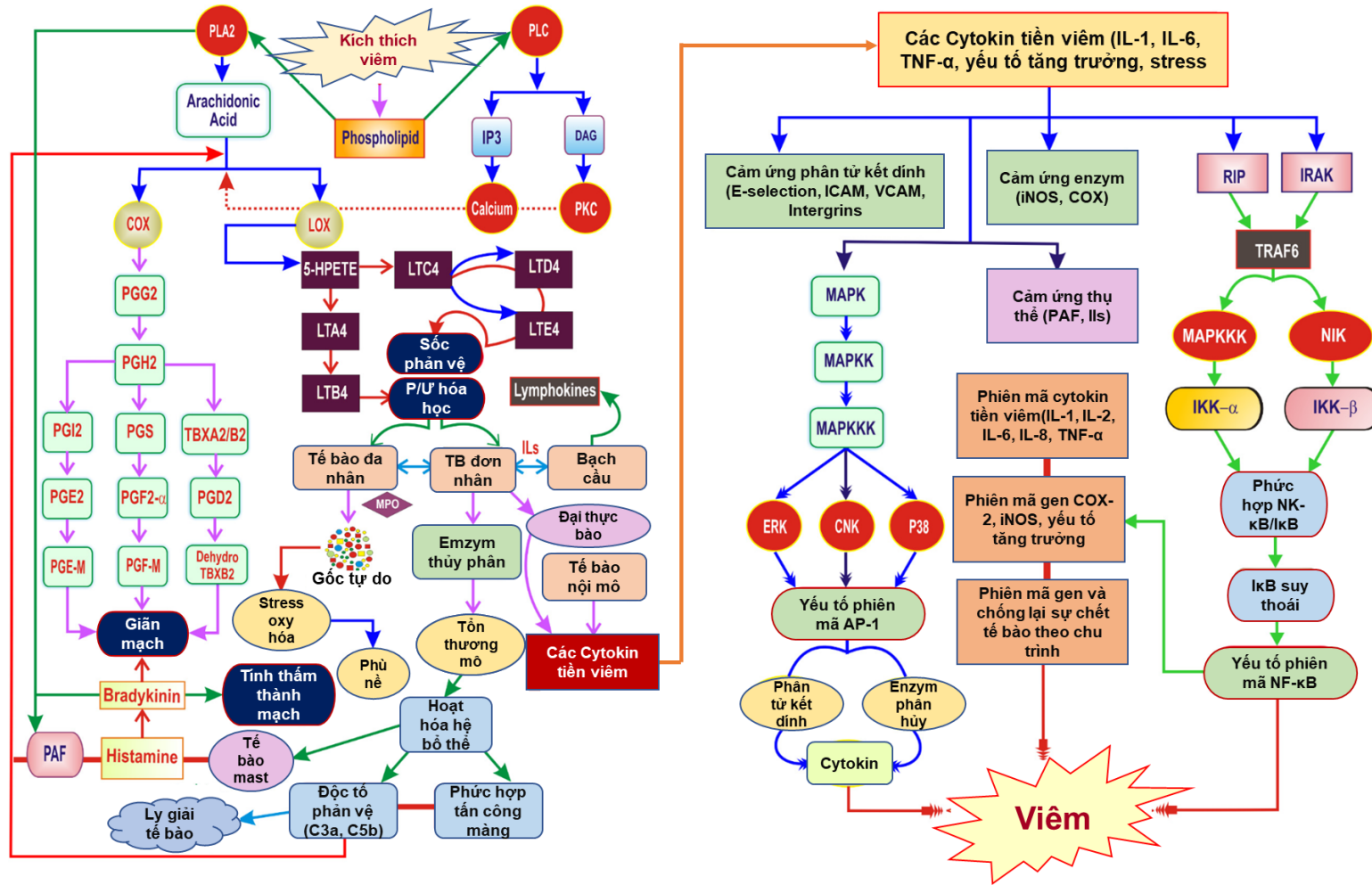
1.3.4. Các phản ứng của quá trình viêm

Khi yếu tố gây viêm xâm nhập, cơ thể đáp ứng thông qua một loạt các phản ứng tại chỗ của mạch máu, tổ chức mô và phản ứng hệ thống của toàn cơ thể [50], [51], [52]. Diễn biến phản ứng viêm được thể hiện tại hình 1.4 [53].

Tại ổ viêm có ba biến đổi chủ yếu: rối loạn tuần hoàn, rối loạn chuyển hóa, tổn thương mô và tăng sinh tế bào. Các biến đổi này đan xen và liên quan chặt chẽ với nhau. Trong viêm cấp tính, khi có yếu tố viêm tác động, tại ổ viêm xảy ra hiện tượng co mạch sớm và rất ngắn. Ngay sau đó là dẫn tiểu động mạch tạo ra sưng huyết động mạch, sung huyết tĩnh mạch và ứ máu, làm thay đổi cấu trúc vi tuần hoàn, cho phép protein huyết tương thoát khỏi mạch, bạch cầu xuyên mạch xuất hiện ở nơi viêm, tạo ra dịch rỉ viêm, do đó gây ra sưng, nóng, đỏ trong viêm cấp. Còn đau xuất hiện muộn hơn do các chất trung gian và bạch cầu thực bào.

Giai đoạn phản ứng mô có sự huy động các tế bào của mô gồm hệ thống thực bào đơn nhân - lympho bào, các tế bào của mô liên kết và biểu mô. Trong một số viêm cấp có thể có sự tham gia của các đại thực bào và lympho bào nhưng phản ứng mô xảy ra chủ yếu trong viêm mạn tính [50], [51].

Phản ứng hệ thống của toàn cơ thể: sốt là biểu hiện nổi trội nhất của viêm, nhất là viêm do nhiễm trùng. Những biểu hiện khác của viêm cũng xảy ra rõ nhất trong giai đoạn cấp như mất ngủ, đau, ăn không ngon cùng các rối loạn chuyển hoá đường, mỡ, hạ huyết áp và các rối loạn huyết động khác.



Hình 1.4. Diễn biến phản ứng viêm [53]

PLA2, Phospholipase A2; PLC, Phospholipase C; PKC, Protein kinase C; PAF, yếu tố hoạt hóa tiểu cầu; DAG, Diacylglycerol; IP3, Inositol triphosphate; COX, Cyclooxygenase; LOX, Lipoxygenase; PGs, Prostaglandins; LTs, Leukotrienes; MMP, Matrix metalloproteinase; HLE, Human leukocyte elastase; ILs, các Interleukin, TNF- α , Tumor necrosis factor-alpha; NF- κ B, Nuclear factor kappa beta; AP-1, Activator protein-1; MAPK, Mitogen-activated protein kinase; P38, P38 kinase; c-JUN, c-Jun N-terminal kinase; ERK, Extracellular signal-regulated kinase

1.3.5. Các chất trung gian trong phản ứng viêm

Các chất trung gian trong phản ứng viêm được gọi là chất khơi mào phản ứng. Hệ thống chất trung gian trong phản ứng viêm rất nhiều và phức tạp, có thể chia chúng ra thành hai nhóm chính: chất có nguồn gốc tế bào và chất có nguồn gốc huyết tương.

➤ *Các chất có nguồn gốc tế bào*

❖ *Các chất chuyển hóa của acid arachidonic*

Các chất trung gian mạnh của phản ứng viêm đều là các chất dẫn xuất của acid arachidonic (AA), một acid béo không bão hòa có nguồn gốc từ lớp phospholipid màng tế bào. Quá trình chuyển hóa AA diễn ra theo một trong bốn con đường chính sau đây: Một là con đường cyclooxygenase (COX), tạo thành prostaglandin (PG), thromboxan (Tx), và prostacyclin. Hai là con đường lipoxygenase (LOX), tạo ra leukotrien (LT) và lipoxin. Ba là con đường cytochrom P450 monooxygenase, trong đó có sự hình thành acid epoxyeicosatrienoic và hydroxyeicosatetraenoic. Và bốn là con đường peroxy hóa lipid, trong đó tạo ra isoprostan [44]. Cyclooxygenase (COX) còn được biết đến với tên gọi là prostaglandin endoperoxid H synthase (PGHS) và tồn tại dưới 2 dạng: PGHS-1 (COX-1) và PGHS-2 (COX-2) [54]. COX-1 tồn tại trong hầu hết các mô động vật có vú, chịu trách nhiệm sản xuất PG kiểm soát các quá trình sinh lý bình thường. COX-2 là một enzym cảm ứng chịu trách nhiệm sản xuất các PG gây viêm và đau [55]. Bình thường nồng độ COX-2 trong tế bào rất thấp. Trong các mô viêm, nồng độ COX-2 có thể tăng cao gấp 80 lần [56]. Các PG làm tăng tính thấm thành mạch, gây sốt, kích thích thần kinh cảm giác làm tăng cảm giác đau, PGE₂ gây phù nề, đỏ [53].

❖ *Các cytokin*

Các cytokin có bản chất là glycoprotein, do nhiều loại tế bào sản xuất nhưng chủ yếu từ lympho bào và đại thực bào đã bị hoạt hóa. Cytokin do tế bào lympho tạo ra gọi là lymphokin, do tế bào đơn nhân tạo ra gọi là monokin và đều được gọi dưới một tên chung là interleukin (IL). Chúng điều hòa hoạt động mọi hệ thống cơ quan và tham gia điều khiển mọi giai đoạn của đáp ứng viêm [57]. Tại vị trí tổn thương, IL-1, IL-6, TNF- α tác động lên nguyên bào xơ, tế bào nội mô, gây tổn thương tế bào, giải phóng nhiều chất có hoạt tính sinh lý gây giãn mạch, tăng tính thấm thành mạch, tập trung bạch cầu

tại ổ viêm. Toàn thân, IL-1, IL-6, TNF- α tác động lên vùng dưới đồi làm tăng thân nhiệt (gây sốt), tăng tổng hợp ACTH và hydrocortison [58].

❖ *Oxyd nitơ (NO)*

Enzym nitric oxid synthase (NOS) xúc tác biến đổi L-arginin thành L-citrullin, đồng thời tạo ra NO, một gốc tự do thể khí [59]. Hợp chất này hoạt động như một phân tử truyền tải gen đặc biệt trong nhiều quá trình sinh lý và bệnh lý quan trọng [60], [61], [62]. Quá trình tạo ra nitric oxid được xúc tác bởi 3 isozym NOS tương đồng. eNOS và nNOS có nhiệm vụ sản xuất ra NO với nồng độ thấp (cỡ nanomol) để điều chỉnh huyết áp và các chức năng thần kinh. iNOS kích thích bởi cytokin sẽ sản sinh ra một lượng lớn NO trong các tế bào viêm đã được kích hoạt (cỡ micromol) [63], làm giãn mạch và gây độc tế bào. Sự biểu hiện của iNOS có thể được điều chỉnh bởi các tác nhân như interferon- γ (IFN- γ), IL-1 β , TNF- α , LPS và stress oxy hoá [64].

❖ *Các chất trung gian khác*: các thành phần của lysosom (protease), các yếu tố sinh trưởng, các gốc dẫn xuất oxy tự do.

➤ *Các chất có nguồn gốc huyết tương*

Các chất trung gian có nguồn gốc huyết tương bao gồm hệ thống kinin, hệ thống bổ thể, hệ thống đông máu, hệ thống tiêu sợi huyết và các globulin miễn dịch [86, 89].

Các chất trung gian của phản ứng viêm chính là đích tác dụng của thuốc chống viêm, chúng cũng là chìa khóa để phát triển mô hình sàng lọc tác dụng và tìm hiểu cơ chế chống viêm của các hợp chất (hình 1.5) [53].

1.3.6. Một số mô hình đánh giá tác dụng chống viêm *in vitro*

Các mô hình *in vitro* thường được sử dụng để sàng lọc hoặc tìm hiểu sâu về cơ chế tác dụng. Hiện nay, có một số thực nghiệm đánh giá tác dụng chống viêm *in vitro* như sau:

➤ *Khảo sát hoạt tính ức chế biến tính protein* [65]

Protein biến tính có tương quan với sự hình thành các rối loạn viêm như viêm khớp dạng thấp, ung thư, tiểu đường. Do đó, khả năng ngăn chặn biến tính protein cũng có thể giúp ngăn ngừa các rối loạn viêm nhiễm. Mô hình sử dụng một trong hai loại protein là albumin trứng hoặc albumin huyết thanh bò (BSA). Hỗn hợp phản ứng gồm

mẫu nghiên cứu, albumin và đệm phosphat được giữ ở 70 °C trong bể nước khoảng 5 phút, sau đó đem đo quang ở bước sóng 660nm.

➤ **Mô hình khảo sát sự ổn định màng** [65]

Ổn định màng lysosom rất quan trọng để kiểm soát phản ứng viêm. Màng tế bào hồng cầu cũng tương tự màng lysosomal. Do vậy, có thể đánh giá khả năng chống viêm *in vitro* của mẫu thử thông qua đánh giá hoạt tính ổn định màng bằng mô hình gây phân hủy hồng cầu (haemolysis) bởi dung dịch ưu trương hoặc nhiệt độ cao.

➤ **Mô hình thử nghiệm ức chế cyclooxygenase hoặc ức chế 5-lipoxygenase** [65]

- Ức chế enzyme COX : Mô hình sử dụng bộ kit sàng lọc ức chế COX bằng phương pháp so màu. Xét nghiệm tạo màu dựa trên quá trình oxy hóa TMPD trong quá trình giảm chuyển PG-G2 (prostaglandin-G2) thành PG-H2 và sự thay đổi màu sắc được đo bằng máy đo quang phổ.

- Hoạt tính kháng lipoxygenase: Mô hình sử dụng cơ chất là acid linoleic và enzyme là lipoxidase. Các loại enzyme thường dùng là lipoxygenase đậu nành hoặc lipoxygenase tái tổ hợp của con người.

➤ **Mô hình thử nghiệm ức chế proteinase** [65]

Proteinase tồn tại nhiều trong các hạt lysosom của bạch cầu trung tính. Proteinase đã được chứng minh liên quan đến tổn thương mô trong quá trình phản ứng viêm. Vì vậy có thể đánh giá khả năng chống viêm thông qua đánh giá tác dụng ức chế proteinase. Mô hình sử dụng các loại enzym như proteinase hoặc trypsin và các protein như casein hoặc albumin huyết thanh bò.

➤ **Mô hình ức chế hyaluronidase** [65]

Hyaluronidase là một trong những enzyme liên quan đến việc tái tạo mô trong quá trình viêm nhiễm. Hyaluronidase có liên quan đến phản ứng dị ứng, viêm và tăng tính thấm của mạch máu bằng cách làm giảm độ nhớt của acid hyaluronic - thành phần quan trọng của ma trận ngoại bào của các mô liên kết ở người và động vật.

Hỗn hợp phản ứng gồm mẫu thử và hyaluronidase được ủ ở 37 °C trong 10 phút, có thể bổ sung calci clorid để kích hoạt enzyme. Tiếp theo, bổ sung cơ chất là acid hyaluronic. Acid hyaluronic thừa sau phản ứng được kết tủa bằng dung dịch acid

albumin (albumin huyết thanh bò 0,1 % trong natri acetat) và phát hiện bằng phương pháp đo quang ở bước sóng 600 nm.

➤ **Mô hình thử nghiệm sử dụng dòng tế bào đại thực bào chuột** [65]

- *Tế bào sử dụng:*

Tế bào đại thực bào chuột thường được sử dụng trong các nghiên cứu đánh giá tác dụng chống viêm *in vitro*. Bởi đây là những tế bào thiết yếu được hình thành và chuyên biệt từ các monocyte để đáp ứng với các kích thích gây bệnh. Các đáp ứng này liên quan đến các receptor đặc biệt, điển hình là toll-like receptor (TLR), giúp cung cấp hàng rào bảo vệ đầu tiên cho vật chủ [130]. Nhiều dòng tế bào đại thực bào đã được sử dụng, phổ biến nhất là dòng RAW264.7, dòng J774, dòng NR8383 [131], [127], [132].

- *Tác nhân kích thích:*

Lipopolysaccharid (LPS) thường được sử dụng làm tác nhân kích thích tế bào. LPS có cấu trúc gồm lipid A (phosphoglycolipid) liên kết cộng hóa trị với một heteropolysaccharid thân nước [133], là thành phần chủ yếu của màng ngoài vi khuẩn gram âm, có khả năng kích thích mạnh các tín hiệu tế bào liên quan đến phản ứng miễn dịch tự nhiên [134].

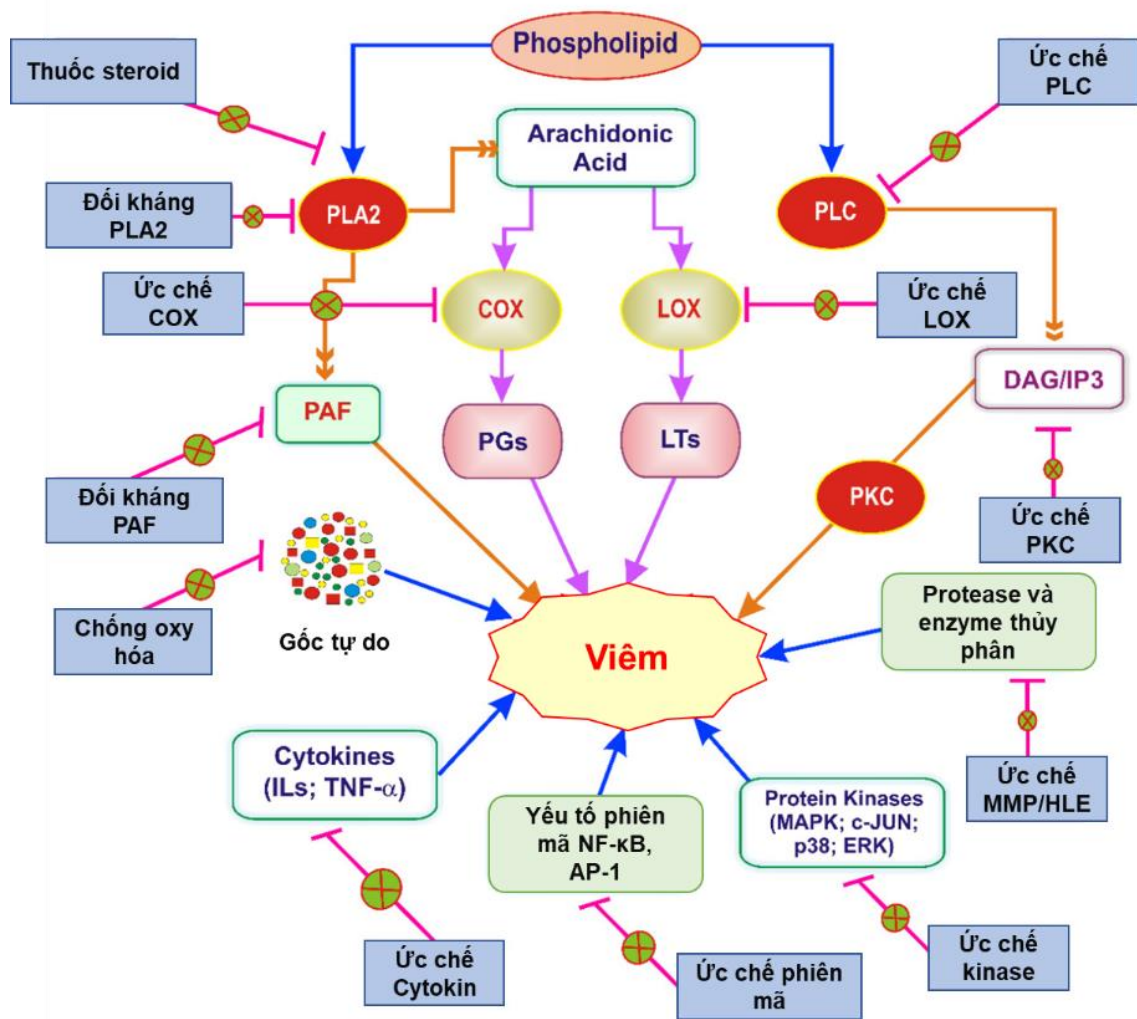
- *Đích nghiên cứu:*

Sau khi bị kích thích, các tế bào đại thực bào sản xuất ra một loạt các cytokin viêm, bao gồm yếu tố hoại tử khối u (TNF- α), interleukin (các IL), và các chất trung gian gây viêm như oxid nitric (NO) và các prostaglandin (PGs) [90]. Các chất này đóng vai trò quan trọng trong đáp ứng viêm, có liên quan đến nhiều bệnh lý nguy hiểm. Do vậy, người ta đánh giá tác dụng chống viêm của mẫu thử thông qua khả năng ức chế tế bào sản xuất ra các sản phẩm trung gian này (hình 1.5).

- *Kỹ thuật sử dụng:*

Các kỹ thuật chính thường sử dụng để định lượng các chất trung gian viêm gồm kỹ thuật Western Blot, RT-PCR, ELISA...

Phương pháp miễn dịch gắn kết enzym liên kết (ELISA): Hiện nay, để định lượng các chất trung gian gây viêm như PGE₂ và các cytokin, người ta sử dụng bộ kit ELISA theo hướng dẫn của nhà sản xuất [66], [67], [68], [69]. Các bộ kit này dựa trên nguyên tắc ELISA cạnh tranh.



Hình 1.5. Đích tác dụng chống viêm của các hợp chất [53]

PLA2, Phospholipase A2; PLC, Phospholipase C; PKC, Protein kinase C; PAF, yếu tố hoạt hóa tiểu cầu; DAG, Diacylglycerol; IP3, Inositol triphosphate; COX, Cyclooxygenase; LOX, Lipoxygenase; PGs, Prostaglandins; LTs, Leukotrienes; MMP, Matrix metalloproteinase; HLE, Human leukocyte elastase; ILs, các Interleukin, TNF- α , Tumor necrosis factor-alpha; NF- κ B, Nuclear factor kappa beta; AP-1, Activator protein-1; MAPK, Mitogen-activated protein kinase; P38, P38 kinase; c-JUN, c-Jun N-terminal kinase; ERK, Extracellular signal-regulated kinase. Mũi tên đại diện cho quá trình, mũi chạc ba đại diện cho sự ức chế mục tiêu

Kỹ thuật Western Blot: Western Blot còn được biết đến với tên gọi là Western Blotting, protein blotting, hoặc immunoblotting, được phát triển từ phương pháp ADN (Southern) blotting [70] và ARN (Northern) blotting [71]. Phương pháp này cho phép

phát hiện một protein xác định trong một hỗn hợp phức tạp nhiều protein khác nhau [72], [73], [74], [75].

Phương pháp phản ứng chuỗi trùng hợp RT-PCR: Kỹ thuật định lượng RT-PCR được nhiều tác giả sử dụng để định lượng mRNA của TNF- α , COX-2, iNOS, qua đó đánh giá mức độ ức chế biểu hiện gen của mẫu thử [66], [67], [68].

Tóm lại, kết quả tổng quan tài liệu về Dây đòn gánh cho thấy những hiểu biết về dược liệu này cho đến thời điểm hiện tại còn rất ít. Trên thế giới chỉ có hai công trình công bố về một số thành phần hóa học và tác dụng chống viêm *in vitro* của Dây đòn gánh [6], [3]. Ở Việt Nam, cũng chỉ có một công bố của nhóm tác giả Nguyễn Thị Kim Thúy [4] và một luận văn thạc sĩ của tác giả Nguyễn Văn An [5]. Các kết quả nghiên cứu ghi nhận sự có mặt của 6 hợp chất flavonoid, 3 hợp chất triterpenoid, 1 hợp chất saponin, 2 hợp chất benzopyran trong dược liệu Dây đòn gánh, đồng thời cho biết tác dụng chống viêm *in vitro* của cao chiết methanol thông qua ức chế hoạt động của Src và NF- κ B, và tác dụng ức chế α -glucosidase của một số hợp chất. Xuất phát từ kinh nghiệm sử dụng dược liệu trong dân gian để chữa sưng tấy, giảm đau nhức do bị ngã, bị đòn đánh, và tổng quan về tác dụng chống viêm của Dây đòn gánh đã được chứng minh trên mô hình dược lý hiện đại, đề tài luận án đặt mục tiêu phân lập các hợp chất theo định hướng tác dụng chống viêm và chứng minh tác dụng của các hợp chất này trên mô hình chống viêm *in vitro*. Luận án định hướng lựa chọn mô hình tế bào RAW264.7 bị kích thích bởi LPS do mô hình đã được sử dụng phổ biến, dễ áp dụng, có thể đánh giá được nhiều chỉ tiêu. Các chỉ tiêu dự kiến đánh giá bao gồm các chất trung gian NO, PGE₂, COX-2 và các interleukin (IL-1 β , IL-6).

CHƯƠNG 2: NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. NỘI DUNG VÀ THIẾT KẾ NGHIÊN CỨU

2.1.1. Về thực vật học

- Giám định tên khoa học của mẫu nghiên cứu.
- Mô tả đặc điểm thực vật và xác định đặc điểm vi học của mẫu nghiên cứu.

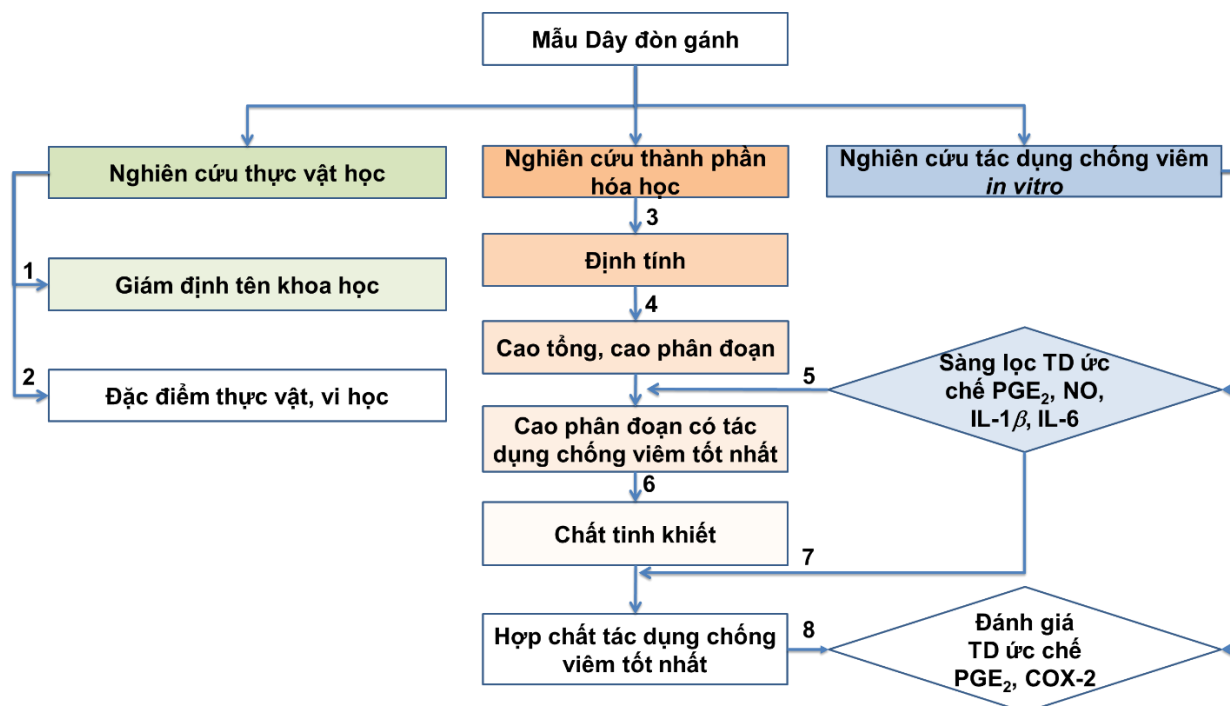
2.1.2. Về hóa học

- Định tính các nhóm chất hữu cơ có trong mẫu Dây đòn gánh nghiên cứu.
- Chiết xuất, phân lập và xác định cấu trúc một số hợp chất từ mẫu Dây đòn gánh.

2.1.3. Về tác dụng sinh học

- Sàng lọc hoạt tính chống viêm *in vitro* của các cao chiết Dây đòn gánh trên mô hình tế bào RAW264.7 bị kích thích gây viêm bởi LPS. Các chỉ tiêu đánh giá gồm: PGE₂, NO, IL-1 β và IL-6.
- Đánh giá tác dụng chống viêm *in vitro* của các chất tinh khiết phân lập từ Dây đòn gánh trên mô hình tế bào RAW264.7 bị kích thích gây viêm bởi LPS. Các chỉ tiêu đánh giá gồm: PGE₂, NO, IL-1 β , IL-6 và COX-2.

Luận án được thực hiện nhằm mục tiêu phân lập các chất tinh khiết theo định hướng chống viêm *in vitro*, bởi vậy, các nội dung nghiên cứu được thiết kế theo sơ đồ sau:



Hình 2.1. Sơ đồ thiết kế nghiên cứu

2.2. NGUYÊN VẬT LIỆU NGHIÊN CỨU

2.2.1. Nguyên liệu

➤ *Thẩm định tên khoa học*

Mẫu nghiên cứu là phần trên mặt đất cây Dây đòn gánh có hoa và quả, được thu hái tại xã Yên Ninh, huyện Phú Lương, tỉnh Thái Nguyên vào tháng 11/2016 (mẫu có quả) và tháng 11/2017 (mẫu có hoa). Ba tiêu bản mẫu năm 2016 (số hiệu NIMM TB-10663A, 10663B và 10663C) cùng với một tiêu bản mẫu năm 2017 (số hiệu DL-181117) được lưu tại Phòng Tiêu bản - Khoa Tài nguyên Dược liệu, Viện Dược liệu.

➤ *Nghiên cứu hóa học*

Định tính và chiết xuất phân lập: Phần trên mặt đất cây Dây đòn gánh thu hái tại xã Yên Ninh, huyện Phú Lương, tỉnh Thái Nguyên vào tháng 11/2016, được thái nhỏ và sấy khô trong tủ sấy ở nhiệt độ khoảng 50 °C. Mẫu sau khi sấy được bảo quản trong túi nilon kín để phục vụ thí nghiệm.

➤ *Nghiên cứu tác dụng sinh học*

Tác dụng chống viêm *in vitro*: Cao ethanol 96 %, các cao phân đoạn (*n*-hexan, ethyl acetat, *n*-butanol và nước) của cao ethanol 96 % phần trên mặt đất cây Dây đòn gánh được điều chế theo phương pháp mô tả tại mục 2.3.2.2 và các hợp chất tinh khiết phân lập từ phần trên mặt đất Dây đòn gánh.

2.2.2. Thuốc thử, hóa chất, dung môi

➤ *Nghiên cứu về thực vật*: Ethanol, xanh methylen, đỏ carmin, nước cất đạt tiêu chuẩn phân tích.

➤ *Nghiên cứu hóa học*

+ *Định tính*: Ethanol, nước cất, chì acetat 30 %, chì acetat 10 %, thuốc thử ninhydrin 3 %, thuốc thử Fehling A và Fehling B, thuốc thử Lugol, thuốc thử natri nitroprussinat 0,5 %, Na₂SO₄ khan, tinh thể Na₂CO₃, bột magie kim loại, anhydrid acetic, dung dịch gelatin 1 %, cloroform, HCl đặc, amoniac đặc, dung dịch FeCl₃ 5 %, dung dịch NaOH 5 % đạt tiêu chuẩn phân tích.

+ *Chiết xuất, phân lập và xác định cấu trúc*:

- Dung môi hóa chất dùng trong chiết xuất phân lập: Ethanol (EtOH), *n*-hexan (*n*-Hx), ethyl acetat (EtOAc), *n*-butanol (BuOH), methanol (MeOH), dichloromethan

- (DCM), acetone (Ace) đạt tiêu chuẩn công nghiệp.
- Dung môi đo phổ: DMSO-*d*₆, CD₃OD, CDCl₃.
 - Silica gel (cỡ hạt 0,04 - 0,063 mm) (Merck, Đức), silica gel pha đảo, sephadex LH-20, diaion HP₂₀.
 - Sắc ký lớp mỏng được thực hiện trên bản mỏng trắng sẵn silica gel GF₂₅₄ (Merck, Đức), RP₁₈ F₂₅₄ (Merck, Đức).
 - Dung dịch H₂SO₄ 10 % trong EtOH 96 %.
 - Đường chuẩn D-glucose, L-rhamnose, D-xylose được cung cấp bởi công ty Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Mỹ).
- **Thử tác dụng sinh học**
- Chất gây viêm lipopolysaccharid (LPS, cat: L4391), và MTT (cat: M2128) của hãng Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Mỹ).
 - Tế bào RAW264.7 từ trung tâm lưu trữ tế bào ở Mỹ (ATCC, Rockville, MD).
 - Kháng thể β -actin của hãng Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, cat: A5316, Mỹ).
 - Huyết thanh bò, RPMI, trypsin từ Gibco BRL (Grand Island, NY, Mỹ).
 - COX-2 (1:1000, cat: 610204) từ BD Biosciences (Mỹ).
 - Kháng sinh penicillin, streptomycin (100 μ g/ml), NaCl, Tris-HCl, NP40 của hãng Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Mỹ).
 - Kháng thể chuột thứ cấp thứ cấp liên hợp HRP của hãng Cell Signaling (Mỹ).
 - ELISA kit: PGE₂ (cat: MBS266212, MyBioSource, Mỹ), IL-1 β kit (cat: MBS175967, MyBioSource, Mỹ), IL-6 Elisa kit (RAB0309, Merck, Đức).
 - MicroRNeasy kit mini (Qiagen, 217.004) và Quantifast SYBR green RT-PCR (Qiagen, 204.156, Đức).
 - BCA protein assay kit (Pierce, Rockford, IL, Mỹ).
 - Ultra-sensitive enhanced chemiluminescent (ECL) kit (cat. 34095, Pierce West Femto, Thermo Fisher Scientific, Mỹ).
 - Thuốc thử chuyển gen Oligofectamine (Life Technologies, Mỹ).
 - NO detection kit (21023, LiliF Diagnostic, Seoul, Hàn Quốc).
 - Các nguyên vật liệu và hoá chất khác được cung cấp bởi công ty Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Mỹ).

2.2.3. Máy móc, thiết bị

➤ Nghiên cứu thực vật

- Kính hiển vi Leica Wetzlar GmbH (Leica, Đức) của Bộ môn Thực vật, trường Đại học Dược Hà Nội.
- Kính soi nổi Kruss Optroni (Kruss, Đức) của Khoa Tài nguyên Dược liệu, Viện Dược liệu.
- Máy ảnh kỹ thuật số Canon PowerShot S400 (Canon, Nhật Bản) của Khoa Tài nguyên Dược liệu, Viện Dược liệu.
- Máy ảnh Canon 70D 50 mm f1.8 (Canon, Nhật Bản) của Bộ môn Thực vật, trường Đại học Dược Hà Nội.
- Kính lúp Triplet 30X-21mm (Trung Quốc) của Khoa Tài nguyên Dược liệu, Viện Dược liệu Khoa Tài nguyên Dược liệu, Viện Dược liệu.
- Một số vật dụng khác như kim chỉ, báo, nẹp...

➤ Nghiên cứu hóa học

- Máy đo phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR): máy Bruker AM500 FT-NMR Spectrometer (Bruker, Thụy Sĩ), chất nội chuẩn là tetramethyl silan, của Viện Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.
- Máy đo phổ khối lượng (ESI-MS): AGILENT 1100 LC-MSD Trap (Agilent Technologies, Mỹ) của Viện Hoá học các Hợp chất Thiên nhiên, Viện Hàn lâm Khoa Học và Công Nghệ Việt Nam và hệ thống sắc ký lỏng siêu hiệu năng ghép nối với detector khối phổ hai lần LC-MS/MS và detector DAD (Shimadzu, Nhật Bản) của Viện Dược liệu.
- Máy đo phổ khối phân giải cao HR-ESI-MS: Mass Spectrometer - Thermo Scientific LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific, Mỹ) của Đại học Khoa học & Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội, và HPLC Agilent Technologies 1290 Infinity Series/6530 Q-TOF (Agilent Technologies, Mỹ) của Viện Hóa sinh biển, Viện Hàn lâm Khoa Học và Công Nghệ Việt Nam.
- Máy đo góc quay cực $[\alpha]_D$: JASCO P-2000 Polarimeter (Tokyo, Nhật Bản) của Khoa Dược, trường Đại học Quốc gia Chungnam, Hàn Quốc, thể tích cuvet là 1 ml.
- Máy đo điểm chảy: GALLENKAMP (Sanyo, Nhật Bản) của Viện Dược liệu.

- Đèn tử ngoại VL-6.LC hai bước sóng 254 nm và 366 nm (Vilber, Pháp)
- Cân phân tích Precisa (Precisa, Thụy Sĩ) có độ chính xác 0,1 mg của Viện Dược liệu.
- Máy cắt quay Buchi các loại (Buchi, Đức) của Viện Dược liệu.
- Tủ sấy Memmert, Binder-FD115 (Đức) của Viện Dược liệu.
- Cột thủy tinh các loại.
- Các dụng cụ cần thiết trong phòng thí nghiệm.

➤ **Nghiên cứu tác dụng sinh học**

- Máy đo quang microplate reader (Varioskan, Thermo Electron Co., Mỹ) của Khoa Y, Đại học Lund, Thụy Điển và của Khoa Dược, trường Đại học Quốc gia Chungnam, Hàn Quốc.
- Máy chụp Western Blot và PCR (LAS 4000, Nhật Bản) của Khoa Y, Đại học Lund, Thụy Điển
- StepOnePlus RT-PCR cycler, Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific, Mỹ) của Khoa Y, Đại học Lund, Thụy Điển.

2.3. ĐỊA ĐIỂM NGHIÊN CỨU

2.3.1. Nghiên cứu thực vật học

- Khoa Tài nguyên Dược liệu - Viện Dược liệu.
- Bộ môn Thực vật - Trường Đại học Dược Hà Nội

2.3.2. Nghiên cứu hóa học

- Khoa Hóa Phân tích-Tiêu chuẩn, Viện Dược liệu.
- Trung tâm các phương pháp phổ ứng dụng, Viện Hóa học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

2.3.3. Nghiên cứu tác dụng sinh học

- Phòng Miễn dịch học, Khoa Dược, trường Đại học Quốc gia Chungnam, Hàn Quốc
- Khoa học Y khoa Thực nghiệm, Khoa Y, Đại học Lund, Thụy Điển.

2.4. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.4.1. Phương pháp nghiên cứu thực vật học

- Quan sát và mô tả đặc điểm hình thái thực vật tại địa phương và Phòng Tiêu bản.
- Quan sát đặc điểm cấu tạo hoa và lá dưới kính lúp và chụp ảnh.

- Thu hái mẫu có hoa, quả làm tiêu bản mẫu cây khô
- Xác định tên khoa học của mẫu nghiên cứu dựa trên cơ sở phân tích đặc điểm hình thái thực vật và so sánh đối chiếu với các khóa phân loại chi *Gouania* [10], [17].
- Áp dụng phương pháp hiển vi để nghiên cứu cấu tạo giải phẫu và đặc điểm bột dược liệu các bộ phận lá, thân [76].

2.4.2. Phương pháp nghiên cứu thành phần hóa học

2.4.2.1. Định tính

Khảo sát sơ bộ các nhóm chất chính trong dược liệu bằng các phản ứng hóa học theo tài liệu [77], [78].

2.4.2.2. Chiết xuất, phân lập và xác định cấu trúc các hợp chất

❖ Chiết xuất cao toàn phần và cao phân đoạn

- Dược liệu được chiết bằng phương pháp ngâm ở nhiệt độ phòng với dung môi EtOH 96 %.
- Phân đoạn cao chiết toàn phần bằng dung môi có độ phân cực tăng dần: *n*-Hex, EtOAc và *n*-BuOH.

❖ Phân lập và tinh chế

Phân lập các hợp chất bằng sắc ký cột (*silica* gel, C-18, sephadex LH-20, diaion HP-20), theo dõi phân đoạn bằng sắc ký lớp mỏng (TLC) kết hợp UV 254 và 366 nm hoặc dùng dung dịch H₂SO₄ 10 % trong EtOH 96 %; kiểm tra độ tinh khiết bằng TLC hoặc HPLC.

❖ Xác định cấu trúc

- Cấu trúc của các hợp chất được xác định dựa trên các đặc tính lý hóa (màu sắc, nhiệt độ nóng chảy), dữ liệu phổ (NMR, MS) và kết hợp so sánh với dữ liệu phổ trong tài liệu tham khảo. Cấu trúc của các chất mới được kiểm tra trên hệ thống SciFinder.

- Xác định cấu hình của đường: thủy phân các hợp chất saponin, sau đó xác định sự có mặt của các đường trong sản phẩm thủy phân bằng sắc ký lớp mỏng và so sánh giá trị góc quay cực của các đường với góc quay cực của đường chuẩn [79]. Cách tiến hành cụ thể như sau: hòa tan 6 mg hợp chất saponin trong 1 mL dung dịch HCl 1,0 N (H₂O/dioxan, 1:1, v/v), đun hồi lưu cách thủy ở 80 °C trong 8 giờ. Hỗn hợp phản ứng được làm nguội ở nhiệt độ phòng, trung hòa bằng Ag₂CO₃ và lọc bỏ kết tủa. Phần dịch

lọc sau đó làm bay hơi dung môi dưới N₂. Đem hỗn hợp chiết bằng dichloromethan và nước (0,5 ml CH₂Cl₂ + 0,5 H₂O, chiết lặp lại 2 lần). Loại bỏ lớp dichloromethan, thu lớp nước. Monosaccharid trong sản phẩm thủy phân trước tiên được xác định bằng phân tích TLC cùng với các đường chuẩn (hệ dung môi CH₂Cl₂/MeOH/H₂O, 2/1/0,2, v/v/v). Tiếp theo, phân tách các monosaccharid bằng TLC điều chế. Sau khi triển khai sắc ký với hệ dung môi CH₂Cl₂/MeOH/H₂O, 2:1:0,2, v/v/v), một phần bản mỏng được tách rời, phun dung dịch thuốc thử 95% EtOH-H₂SO₄-anisaldehyd (9/0,5/0,5, v/v) và đốt bản mỏng ở 105 °C trong 3 phút để phát hiện các vết đường. Cạo riêng từng vết đường trên bản mỏng điều chế, lọc và rửa sản phẩm thu được bằng hỗn hợp dung môi MeOH - H₂O (1:1, v/v). Sau khi cất quay thu hồi dung môi, hòa tan sản phẩm trong H₂O và đo góc quay cực, so sánh giá trị và chiều hướng của góc quay cực nhận được với mẫu đường chuẩn tương ứng được đo trong cùng điều kiện.

Góc quay cực riêng được tính theo công thức:

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{\alpha}{l \times c} \times 1000$$

Trong đó: α là góc quay cực đo được.

l là chiều dài ống đo của phân cực kế (tính bằng dm).

c là nồng độ của chất thử trong dung dịch (tính bằng g/L).

2.4.3. Nghiên cứu tác dụng chống viêm *in vitro*

a) Nuôi cấy tế bào

Tế bào RAW264.7 (tế bào đại thực bào chuột) mua từ ATCC (Rockville, MD, Mỹ) được nuôi cấy trong phôi 96 giếng (mật độ tế bào 2×10^4 tế bào/giếng) ở 37°C trong 5% CO₂/95% không khí trong môi trường RPMI có bổ sung huyết thanh bò FBS 10%, 100 đơn vị /ml penicillin và streptomycin 100 µg/ml. Trong quá trình thực hiện thí nghiệm, các tế bào được nuôi đến mật độ phát triển tới 80 - 90%.

b) Đánh giá ảnh hưởng của mẫu thử đến khả năng sống sót của tế bào RAW264.7 bằng phương pháp MTT

➤ Nguyên tắc

Đánh giá độ ảnh hưởng của các mẫu nghiên cứu đến khả năng sống sót của tế bào dựa trên mức độ hoạt động của enzym dehydrogenase trong ty thể của tế bào sống

sót còn lại sau khi được xử lý với các mẫu thử. Enzym này biến đổi tetrazolium có màu vàng nhạt thành formazan có màu tím và được phát hiện bằng đo quang ở bước sóng cực đại hấp thụ $\lambda = 570 \text{ nm}$ [80], [81], [82].

➤ Chuẩn bị mẫu

- Pha mẫu: các mẫu thử (cao chiết và chất tinh khiết) được pha bằng DMSO và lắc vortex ở tốc độ 300 - 500 (vòng/phút) trong 1 - 2 phút cho đến khi dịch đồng đều. Các mẫu thử tiếp tục được pha loãng đến nồng độ thử thích hợp bằng DMSO.

- Sử dụng 1 μL dung dịch mẫu thử cho mỗi giếng 100 μL . Nồng độ cuối cùng của chất thử trong giếng là 1, 5 và 25 $\mu\text{g/mL}$ (đối với cao chiết), 30 μM (đối với chất tinh khiết).

➤ Tiến hành

Tế bào được nuôi cấy ở đĩa 96 giếng với nồng độ với mật độ 10^4 tế bào/giếng với 10% FBS qua đêm 12 tiếng trong tủ ủ ấm ở điều kiện 37°C và 5% CO_2 . Tế bào sau đó được thay môi trường RPMI không có chứa FBS. Các mẫu thử được ủ với tế bào trong 24 h. Môi trường tế bào sau đó được thay bằng dung dịch MTT (0,5 mg/mL pha trong nước muối đệm phosphat), ủ 2-4h ở 37°C và 5% CO_2 . Sau đó hút bỏ hết môi trường trên bề mặt, kết tủa formazan được hòa tan trong DMSO. Đo mật độ quang ở 570 nm bằng máy ELISA. Mỗi mẫu thử được lặp 5 lần.

➤ Tính kết quả

Khả năng sống sót của tế bào được tính toán theo công thức:

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

Trong đó: OD: mật độ quang

Thí nghiệm được lặp lại 5 lần.

c) Đo nồng độ sản phẩm PGE_2 , IL-6 và IL-1 β bằng phương pháp ELISA [83], [84]

➤ Nguyên tắc

Phương pháp miễn dịch gắn kết enzym (ELISA) được dùng để định lượng các chất trung gian gây viêm như PGE_2 , IL-6, IL-1 β . Nguyên tắc ELISA cạnh tranh là phản ứng cạnh tranh xảy ra giữa kháng nguyên (trong mẫu thử) cạnh tranh với kháng nguyên (được đánh dấu) để liên kết với một lượng kháng thể giới hạn, mà trước đó kháng thể

này đã được đưa lên một pha rắn. Sau khi phản ứng cân bằng, rửa sạch các kháng nguyên không liên kết và đo tín hiệu từ phần đánh dấu. Các bước thử được thực hiện theo hướng dẫn của kit thử. Tín hiệu đo được tỷ lệ nghịch với nồng độ chất phân tích trong mẫu.

➤ Chuẩn bị mẫu

- Pha mẫu: Các mẫu thử (cao chiết và chất tinh khiết) được pha bằng DMSO và lắc vortex ở tốc độ 300 - 500 (vòng/phút) trong 1 - 2 phút cho đến khi dịch đồng đều. Các mẫu thử tiếp tục được pha loãng đến nồng độ thử thích hợp bằng DMSO.

- Mẫu thử: Tế bào RAW264.7 được kích thích viêm bằng LPS và bổ sung mẫu thử. Sử dụng 2 μ L dung dịch mẫu thử cho mỗi giếng (200 μ L). Nồng độ cuối cùng của chất thử trong giếng là 20 μ g/mL (đối với cao chiết) hoặc 10 μ M (đối với chất tinh khiết).

- Mẫu chứng trắng: Tế bào RAW264.7 không được kích thích viêm bằng LPS và sử dụng 2 μ L DMSO thay cho mẫu thử.

- Mẫu chứng viêm (chứng bệnh lý): Tế bào RAW264.7 được kích thích viêm bằng LPS và không có mẫu thử.

- Mẫu đối chứng dương: Tế bào RAW264.7 được kích thích viêm bằng LPS và được thêm dexamethason (nồng độ dexamethason trong giếng là 100 nM).

- Sử dụng 2 μ L dung dịch LPS cho mỗi giếng, nồng độ LPS cuối cùng trong mỗi giếng với thử nghiệm đánh giá PGE₂ là 1 ng/mL và thử nghiệm đánh giá IL-1 β , IL-6 là 100 ng/mL.

➤ Tiến hành

Bước 1: Sàng lọc độc tính của mẫu thử trên dòng tế bào RAW264.7 bằng phương pháp MTT đã mô tả ở trên để lựa chọn nồng độ tối đa mà không thể hiện độc tính trên tế bào cho các thử nghiệm sau.

Bước 2: Các tế bào RAW264.7 được nuôi trong 6 ngày trong môi trường RPMI có bổ sung 10 % huyết thanh phôi bò, 100 đơn vị /ml penicillin và streptomycin 100 μ g/ml.

Bước 3: Tế bào được tách ra, rửa và pha lại trong môi trường mới rồi chuyển vào đĩa 48 giếng với mật độ 10⁴ tế bào/giếng qua đêm.

Bước 4: Thêm vào các giếng mẫu cần thử với nồng độ thích hợp trong 24 h. LPS và dexamethason được sử dụng là chất đối chứng. Sau 24 giờ ủ với các chất thử, hàm lượng PGE₂, IL-6, IL-1 β trong môi trường được định lượng bằng phương pháp ELISA.

Đánh giá hoạt tính ức chế PGE₂, IL-6, IL-1 β dựa vào kết quả đo mật độ quang ở bước sóng 450 nm của chất thử với mẫu trắng được xử lý bằng dung dịch DMSO thay cho chất thử.

➤ **Tính kết quả**

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

Thí nghiệm được lặp lại 5 lần.

d) Phương pháp đánh giá tác dụng ức chế biểu hiện COX-2 trên tế bào RAW264.7 bằng kỹ thuật RT-PCR [85]

➤ **Nguyên tắc**

Tác dụng ức chế enzyme COX-2 của mẫu thử được thể hiện thông qua mức độ biểu hiện của các gen COX-2 khi có yếu tố kích thích viêm và được đánh giá bằng phương pháp định lượng mARN COX-2 trong tế bào RAW264.7 bình thường và tế bào RAW264.7 được kích thích viêm (bằng LPS) có hoặc không có mẫu thử. Sử dụng kỹ thuật Real time - PCR (phản ứng khuếch đại gen) để định lượng mARN trong các mẫu qua giá trị chu kỳ ngưỡng:

Ct (đại lượng thể hiện số chu kỳ nhiệt mà tại đó tín hiệu huỳnh quang từ các tube mẫu phản ứng bắt đầu vượt qua giá trị ngưỡng)

Gen đích (Tg): mARN COX-2 (ARN mang mã thông tin cho quá trình sinh tổng hợp enzyme COX - 2 cảm ứng quá trình viêm)

Gen tham chiếu (Ref): ARN GAPDH (là một mARN cấu trúc điển hình, được phiên mã ở một mức độ tương đối liên tục và sự biểu hiện của chúng không bị ảnh hưởng bởi những điều kiện thí nghiệm).

➤ **Chuẩn bị mẫu**

- Pha mẫu: Các mẫu thử (cao chiết và chất tinh khiết) được pha bằng DMSO và lắc vortex ở tốc độ 300 - 500 (vòng/phút) trong 1 - 2 phút cho đến khi dịch đồng đều. Các mẫu thử tiếp tục được pha loãng đến nồng độ thử thích hợp bằng DMSO.

- Mẫu thử: Tế bào RAW264.7 được kích thích viêm bằng LPS và bổ sung mẫu thử. Sử dụng 2 μ L dung dịch mẫu thử cho mỗi giếng (2 mL). Nồng độ cuối cùng của chất thử trong giếng là 20 μ g/mL (đối với cao chiết) hoặc 10 μ M (đối với chất tinh khiết).

- Mẫu chứng trắng: Tế bào RAW264.7 không được kích thích viêm bằng LPS và sử dụng 2 μ L DMSO thay cho mẫu thử.

- Mẫu chứng viêm (chứng bệnh lý): Tế bào RAW264.7 được kích thích viêm bằng LPS và không có mẫu thử.

- Sử dụng 2 μ L dung dịch LPS cho mỗi giếng, nồng độ LPS cuối cùng trong mỗi giếng là 1 ng/mL.

➤ **Tiến hành**

Tách mARN tổng số và định lượng Real time – PCR: thí nghiệm được tiến hành trên đĩa 6 giếng.

- Tế bào nuôi cấy được thu gom, rửa và ly giải trong 700 μ L Qiazol, sau đó thực hiện kỹ thuật cô lập mARN bằng microRNeasy kit mini (Qiagen, 217.004) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
- Phản ứng RT-PCR được thực hiện bằng cách sử dụng bộ Quantifast SYBR Green RT-PCR (Qiagen, 204054). Các điều kiện phản ứng được sử dụng theo đúng hướng dẫn của nhà sản xuất. Các xét nghiệm sau Quantitect Primer (Qiagen) được sử dụng để phát hiện mARN: COX-2 (Mm-Ptgs2) (QT00165347), Mm- GADPH (QT-01658692).

Trình tự đoạn mồi:

COX-2: F, CCACTTCAAGGGAGTCTGGA;

R, AGTCATCTGCTACGGGAGGA.

GADPH: F, CATCACTGCCACCCAGAAGACTG;

R, ATGCCAGTGAGCTTCCCGTTCAG

➤ **Tính kết quả**

Tính kết quả theo công thức $R = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ của Livak

Trong đó: R là tỉ lệ biểu hiện của gen đích trên mẫu thử so với mẫu chứng

$$\Delta\Delta Ct = [Ct(T/Tg) - Ct(T/Ref)] - [Ct(C/Tg) - Ct(C/Ref)]$$

với:

Ct(T/Tg): chu kỳ ngưỡng của gen đích COX-2 trong mẫu thử

Ct(T/Ref): chu kỳ ngưỡng của gen tham chiếu GAPDH trong mẫu thử

Ct(C/Tg): chu kỳ ngưỡng của gen đích COX-2 trong mẫu chứng

Ct(C/Ref): chu kỳ ngưỡng của gen tham chiếu GAPDH trong mẫu chứng

Thí nghiệm được lặp lại 5 lần.

e) Đo hoạt động của COX-2-Luciferase

➤ Nguyên tắc

Các tế bào được chia vào 12 giếng và được chuyển nạp với các đoạn gen và các plasmid phRL-SV bằng cách sử dụng giãn màng tế bào Hilymax (Promega, Madison, WI). Các tế bào sau đó được ủ trong môi trường nuôi cấy không có huyết thanh trong 18 giờ. Mức độ hoạt động của gen thông qua các Firefly và luciferase hRenilla trong dịch tế bào được đo bằng máy Luminometer (LB941, Berthold Technologies). Mức hoạt động tương đối luciferase được tính toán bằng cách hiệu chỉnh hoạt tính luciferase của promoter với mức hoạt động luciferase hRenilla.

Đánh giá hoạt tính ức chế COX-2 luciferase dựa vào kết quả đo phản ứng phát quang của chất thử với mẫu trắng được xử lý bằng dung dịch DMSO 1% thay cho chất thử.

➤ Chuẩn bị mẫu

- Pha mẫu: Các mẫu thử (cao chiết và chất tinh khiết) được pha bằng DMSO và lắc vortex ở tốc độ 300 - 500 (vòng/phút) trong 1 - 2 phút cho đến khi dịch đồng đều. Các mẫu thử tiếp tục được pha loãng đến nồng độ thử thích hợp bằng DMSO.

- Mẫu thử: Tế bào RAW264.7 được kích thích viêm bằng LPS và bổ sung mẫu thử. Sử dụng 1 μ L dung dịch mẫu thử cho mỗi giếng (1 mL). Nồng độ cuối cùng của chất thử trong giếng là 20 μ g/mL (đối với cao chiết) hoặc 10 μ M (đối với chất tinh khiết).

- Mẫu chứng trắng: Tế bào RAW264.7 không được kích thích viêm bằng LPS và sử dụng 1 μL DMSO thay cho mẫu thử.

- Mẫu chứng viêm (chứng bệnh lý): Tế bào RAW264.7 được kích thích viêm bằng LPS và không có mẫu thử.

- Sử dụng 1 μL dung dịch LPS cho mỗi giếng, nồng độ LPS cuối cùng trong mỗi giếng là 1 ng/mL.

➤ **Tiến hành**

Bước 1: Các tế bào RAW264.7 được nuôi trong 6 ngày trong môi trường RPMI có bổ sung 10 % huyết thanh phôi bò, 100 đơn vị /mL penicillin và streptomycin 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Bước 2: Tế bào được tách ra, rửa và pha lại trong môi trường mới có chứa FCS rồi chuyển vào đĩa 12 giếng với mật độ 5×10^5 tế bào/giếng qua đêm.

Bước 3: Chuẩn bị COX-2 plasmid 2 μg + Hilymax 8 μL được trộn đều trong 70 μL môi trường RPMI không chứa FCS, kháng sinh và được ủ ở nhiệt độ phòng 15 phút trong ống nghiệm nhựa nhỏ. Hỗn hợp này được sử dụng cho 1 giếng thí nghiệm và trộn đều cẩn thận từng giếng với hỗn hợp.

Bước 4: Thêm vào các giếng mẫu cần thử và LPS, ủ trong 24 h. Sau 24 giờ ủ với các chất thử, COX-2 luciferase được phát hiện bằng phản ứng phát quang (flourescent).

➤ **Tính kết quả**

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

Thí nghiệm được lặp lại 5 lần.

f) *Kỹ thuật Western Blot* [6]

➤ **Chuẩn bị mẫu**

Tương tự thử nghiệm đánh giá tác dụng ức chế biểu hiện COX-2 trên tế bào RAW264.7 bằng kỹ thuật RT-PCR.

➤ **Tiến hành**

Tế bào đại thực bào RAW264.7 được bổ sung 1 ng/mL LPS ủ trong 18 giờ có hoặc không có mẫu thử. Các tế bào được thu và rửa sạch với nước muối đệm phosphat lạnh

(PBS). Các tế bào được ly giải trên băng trong 30 phút trong 100 μ L dung dịch ly giải (60 mM Tris-HCl, pH 6,8, 2 % SDS, 10 % glycerol). Dịch chiết tế bào sau đó được đun sôi trong 5 phút (100 °C) và ly tâm với tốc độ 12000 vòng/phút trong 30 phút. Nồng độ dịch chiết tế bào được xác định bằng phương pháp BCA (Pierce, Rockford, IL) và điện di trên gel SDS – polyacrylamid 10 %. Sau khi điện di kết thúc, protein trong gel được chuyển sang màng nitrocellulose, sau đó được ủ với kháng thể nguyên cấp (COX-2 1:1000, và β -actin 1:5000). Màng sau đó được ủ thêm với kháng thể thứ cấp peroxidase liên hợp (chuột 1:4000). Mật độ các băng protein được phát hiện bằng dung dịch west femto (Thermo Scientific) và hình ảnh được phát hiện và phân tích bằng máy LICOR.

Thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

g) *Đo sản phẩm NO*

➤ **Nguyên tắc**

Hoạt động ức chế sản sinh oxit nitric của mẫu thử được đánh giá theo phương pháp Griess đã báo cáo trước đây với một vài sửa đổi [86]. NO sẽ được chuyển thành nitrit (NO_2^-) sau đó chuyển thành hợp chất azo màu tím đậm nhờ thuốc thử Griess gồm 1% sulganilamid, 0,1% N-1-naphthylenediamin dihydrochlorid và 2,5% acid phosphoric và được định lượng bằng phương pháp đo quang.

➤ **Chuẩn bị mẫu**

- Pha mẫu: Các mẫu thử (cao chiết và chất tinh khiết) được pha bằng DMSO và lắc vortex ở tốc độ 300 - 500 (vòng/phút) trong 1 - 2 phút cho đến khi dịch đồng đều. Các mẫu thử tiếp tục được pha loãng đến nồng độ thử thích hợp bằng DMSO.

- Mẫu thử: Tế bào RAW264.7 được kích thích viêm bằng LPS và bổ sung mẫu thử. Sử dụng 1 μ L dung dịch mẫu thử cho mỗi giếng (100 μ L). Nồng độ cuối cùng của chất thử trong giếng là 1, 5 và 25 μ g/mL (đối với cao chiết) hoặc 1, 5, 25 μ M hoặc 2, 10 và 50 μ M (đối với chất tinh khiết).

- Mẫu chứng viêm (chứng bệnh lý): Tế bào RAW264.7 được kích thích viêm bằng LPS và không có mẫu thử.

- Mẫu chứng dương: Tế bào RAW264.7 được kích thích viêm bằng LPS và bổ sung dexamethason (nồng độ trong mỗi giếng là 2, 10 và 50 μ M).

- Sử dụng 1 μL dung dịch LPS cho mỗi giếng, nồng độ LPS cuối cùng trong mỗi giếng là 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

➤ **Tiến hành**

Bước 2: Nuôi cấy tế bào RAW264.7 theo phương pháp mô tả ở trên. Tiếp theo, loại bỏ môi trường nuôi cấy, thay bằng môi trường RPMI không có huyết thanh thai bò và ủ với chất thử trong 2h (giếng chứng dương không thêm mẫu thử). Thêm LPS và tiếp tục ủ trong 24 giờ.

Bước 3: Lấy 100 μL môi trường tế bào ủ mẫu chuyển sang đĩa 96 giếng mới, thêm 100 μL thuốc thử Griess gồm 1% sulganilamid, 0,1% N-1-naphthylenediamin dihydrochlorid và 2,5% acid phosphoric). Ủ hỗn hợp ở nhiệt độ phòng trong 10 phút.

Bước 4: môi trường tế bào được đem đo mật độ quang ở bước sóng 550 nm. Mẫu trắng là môi trường RPMI không có huyết thanh thai bò.

➤ **Tính kết quả**

Hàm lượng nitrit của mẫu thử được xác định dựa vào đường cong hàm lượng chuẩn NaNO_2 và được so sánh với mẫu chứng viêm LPS.

$$\% \text{Ức chế của mẫu thử} = \left(100 - \frac{\text{Hàm lượng NO của mẫu thử}}{\text{Hàm lượng NO của đối chứng LPS}} \times 100\right) (\%)$$

Thí nghiệm được lặp lại 5 lần.

2.4.4. Xử lý số liệu

➤ **Phần mềm phân tích:** Sử dụng phần mềm MestReNova và Topsis 3.2.

➤ **Tác dụng sinh học:**

Với các số liệu thuộc phân phối chuẩn, biến liên tục, kết quả được biểu diễn dưới dạng $M \pm SE$. So sánh giá trị trung bình giữa các lô bằng one-way ANOVA, dùng hậu kiểm Dunnett's test để so sánh giá trị trung bình của các lô thử so với lô chứng. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê khi $p < 0,05$.

CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU THỰC VẬT HỌC

3.1.1. Kết quả giám định tên khoa học của mẫu Dây đòn gánh nghiên cứu

Căn cứ vào các khóa phân loại chi *Gouania* (họ Rhamnaceae) của J. Pitard trong “Flore Générale de L’indochine”, T.1 và của Yi Chen & Carsten Schirarend (2007), trong “Flora of China”, vol.12 [10], [17]; căn cứ vào đặc điểm hình thái của thân, lá, cụm hoa, cấu tạo của cụm hoa, đặc điểm hình thái và kích thước của quả trong các mẫu thu thập; cùng với sự tư vấn của các chuyên gia thực vật PGS.TS. Phạm Thanh Huyền, ThS. Nguyễn Quỳnh Nga, ThS. Phan Văn Trường (Khoa Tài nguyên Dược liệu, Viện Dược liệu) và ThS. Nghiêm Đức Trọng (Bộ môn Thực vật, Trường Đại học Dược Hà Nội, chúng tôi khẳng định đối tượng nghiên cứu của luận án, đại diện là các mẫu tiêu bản số NIMM TB-10663A, 10663B, 10663C và DL-181117 có tên khoa học chính xác là *Gouania leptostachya* DC. var. *tonkinensis*, họ Táo ta (Rhamnaceae).

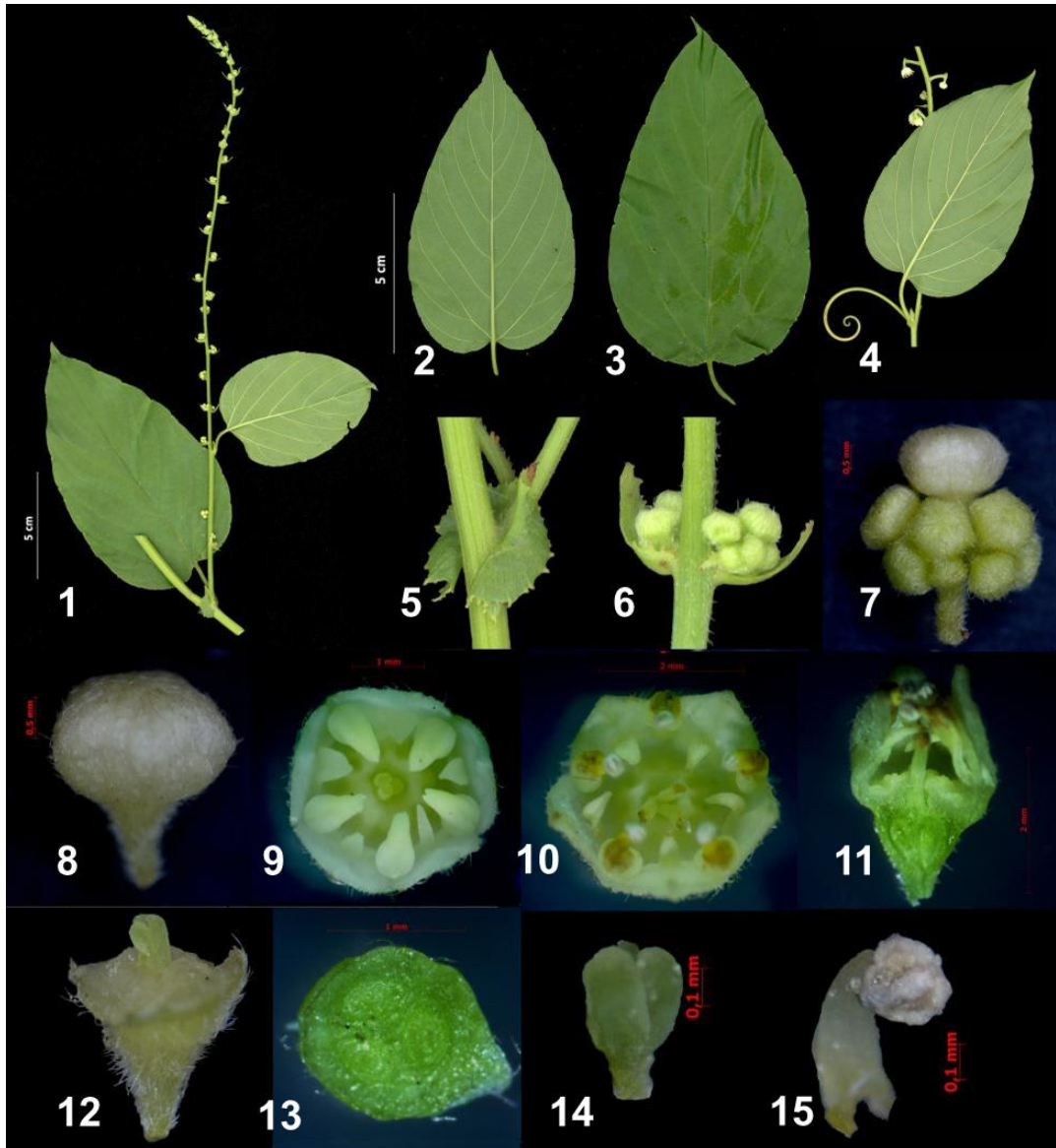
3.1.2. Đặc điểm thực vật của mẫu Dây đòn gánh nghiên cứu

Dây leo quấn. Thân có lông tơ mảnh. Lá kèm tồn tại, dạng hình thận bao thân, mép có khía răng cưa nhọn. Lá mọc so le, cuống lá 1,2-2 cm, có lông. Tua cuốn ở nách lá đầu cành. Phiến lá hình trứng hoặc trứng thuôn, màu xanh, mặt dưới nhạt hơn, kích thước 6-12 x 2,5-6 cm, chất lá mỏng - mềm, mặt dưới nhẵn hoặc có lông ở gân lá, 5-6 cặp gân phụ, lồi rõ ở mặt dưới; góc lá hình tim, mép lá hơi có khía (tai bèo), mũi lá nhọn.

Cụm hoa dạng xim, mọc ở đỉnh cành hoặc nách lá, dài 15 - 30 cm, nhiều lông. Hoa nhỏ, tạp tính, màu trắng lục. Lá bắc hình giùi, nhỏ, có răng cưa, kích thước 1,2 x 1,5-2 mm; mỗi lá bắc bao quanh 1 cụm gồm 5-10 hoa. Cuống hoa ngắn 1mm. Đài hoa hợp sinh với bầu; lá đài 5, hình trứng-tam giác, mặt ngoài nhiều lông, mũi nhọn. Cánh hoa 5, hình thìa, màu trắng hơi xanh, ôm trọn lấy nhị; nhị dính vào gốc cánh hoa, khi chín vươn ra ngoài cánh hoa. Đĩa hoa 5 cạnh, bầu dưới, 3 ô, 1 noãn/ô; vòi nhụy ngắn, xẻ 3 thùy. (Hình 3.4 và 3.5)

Quả nang, có ba cánh, dài 9-10 mm, đường kính 10-12 mm, trên đỉnh còn vết tích của đài tồn tại. Cuống quả 1-3 mm. Hạt màu nâu bóng.

Hình ảnh các bộ phận của Dây đòn gánh được thể hiện tại hình 3.1 và 3.2.



Hình 3.1. Các bộ phận của Dây đon gánh

- 1 – Cành mang cụm hoa
- 2 – Lá mặt dưới
- 3 – Lá mặt trên
- 4 – Tua cuốn
- 5 – Lá kèm bao quanh thân
- 6 – Cụm hoa trên lá bắc
- 7 – Cụm hoa

- 8 – Nụ hoa
- 9,10 – Hoa
- 11 – Hoa bổ dọc
- 12 – Bầu
- 13 – Bầu cắt ngang
- 14 – Vòi nhụy
- 15 – Nhị



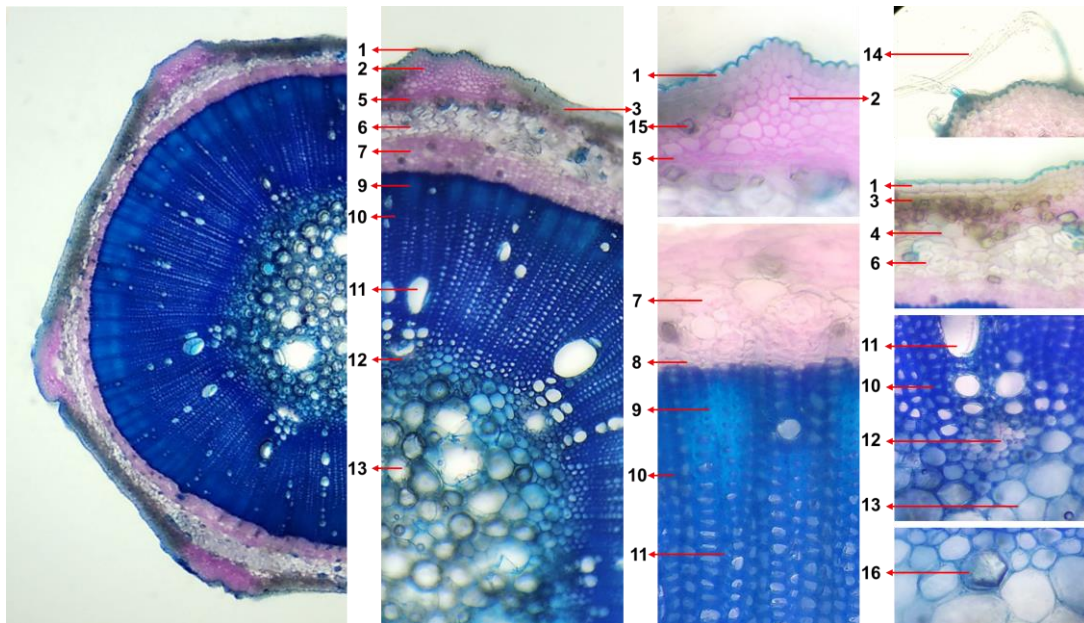
A

B

Hình 3.2. Cành mang hoa (A) và cành mang quả (B) Dây đòn gánh

3.1.3. Đặc điểm vi phẫu dược liệu Dây đòn gánh

3.1.3.1. Đặc điểm vi phẫu thân



Hình 3.3. Vi phẫu thân Dây đòn gánh.

1. Biểu bì; 2. Mô dày góc; 3. Mô dày phiến; 4. Mô mềm vỏ;
 5. Libe cấp 1; 6. Sợi libe; 7. Libe cấp 2; 8. Tầng phát sinh libe gỗ; 9. Sợi gỗ;
 10. Tia ruột; 11. Gỗ cấp 2; 12. Gỗ cấp 1; 13. Mô mềm ruột; 14. Lông che chở;
 15. Tinh thể calci oxalat ngoài vỏ; 16. Tinh thể calci oxalat trong ruột

Vi phẫu thân có tiết diện đa giác (6 cạnh), cấu tạo cấp 2 (Hình 3.3). Từ ngoài vào trong có: Biểu bì (1) là một hàng tế bào mỏng, xếp sát nhau, bên ngoài phủ lớp cutin mỏng. Trên biểu bì mang lông che chở đa bào chân đơn bào (14). Dưới biểu bì là mô dày, gồm hai loại: mô dày góc (2) và mô dày phiến (3). Mô dày góc (2) là các tế bào hơi tròn có thành dày, bắt màu đỏ đậm, xếp sát nhau, kích thước nhỏ, bố trí tại vị trí lồi lên của vi phẫu thân (góc đa giác của tiết diện), nơi dày nhất có thể đến 10 hàng tế bào. Mô dày phiến (3) bố trí tại các cạnh đa giác của tiết diện thân, hình chữ nhật, xếp 2-3 hàng, xếp so le nhau. Trong mô dày góc có nhiều tinh thể calci oxalat (15) dạng khối, đa dạng về kích thước và hình thù. Mô mềm vỏ (4) là lớp rất mỏng, chỉ từ 1-2 hàng tế bào, kích thước lớn hơn nhiều so với mô dày góc, vỏ tế bào mỏng, bắt màu đỏ thuốc nhuộm. Lớp tiếp theo là libe cấp 1 (5) gồm nhiều hàng tế bào bị ép dẹp, khó quan sát hình thù, tạo thành dải mỏng và bắt màu đỏ của thuốc nhuộm khá đậm. Bên trong libe cấp 1 là vòng mô cứng có bản chất là sợi libe (6), lớp này có từ 3-4 hàng tế bào, khó bắt màu thuốc nhuộm (đôi khi bắt màu xanh). Libe cấp 2 (7) là lớp tế bào sắp xếp thành các dãy xuyên tâm, khoảng 4-7 hàng tế bào, kích thước nhỏ, bị ép dẹp, liên tục thành một vòng bao quanh gỗ cấp 2. Bên trong libe cấp 2 và sợi libe đôi khi cũng quan sát được các tinh thể calci oxalat tương tự bên trong mô dày góc. Bề dày của lớp vỏ tính từ biểu bì đến hết libe cấp 2 chỉ khoảng 1/6-1/8 so với bề dày vi phẫu. Tầng phát sinh libe gỗ (8) là một hàng tế bào liên tục, bị ép dẹp giữa libe cấp 2 và gỗ cấp 2, không bắt màu thuốc nhuộm. Gỗ cấp 2 (11) xếp thành vòng, nhưng không liên tục, thường xuyên bị chia cắt bởi các tia ruột (10) từ 1-2 hàng tế bào. Bề dày của lớp gỗ cấp 2 gấp 6-8 lần libe cấp 2 và gần 4/5 bề dày vi phẫu. Sợi gỗ (9) xuất hiện phía bên ngoài gỗ cấp 2 (gần với tầng phát sinh libe gỗ) thành từng đám từ 5-8 hàng tế bào, cũng bị chia cắt bởi các tia ruột. Màu sắc của sợi gỗ nhạt hơn và sáng lên khi giảm tụ quang so với các tế bào gỗ xung quanh. Tia ruột (10) là các tế bào hình chữ nhật xếp thành các dãy xuyên tâm xen giữa mô gỗ cấp 2, càng ra phía ngoài càng loe rộng. Gỗ cấp 1 (12) quan sát khá rõ, là các tế bào nhỏ, nằm tiếp nối các bó gỗ cấp 2, có xu hướng li tâm (bó gỗ cấp 1 hình tam giác, đỉnh quay về tâm vi phẫu, đáy mở rộng ra phía ngoài phần vỏ). Mô mềm ruột (13) là các tế bào đa giác kích thước không đều, chiếm chỉ khoảng 1/5-1/6 bề dày vi phẫu, thành tế bào có xu

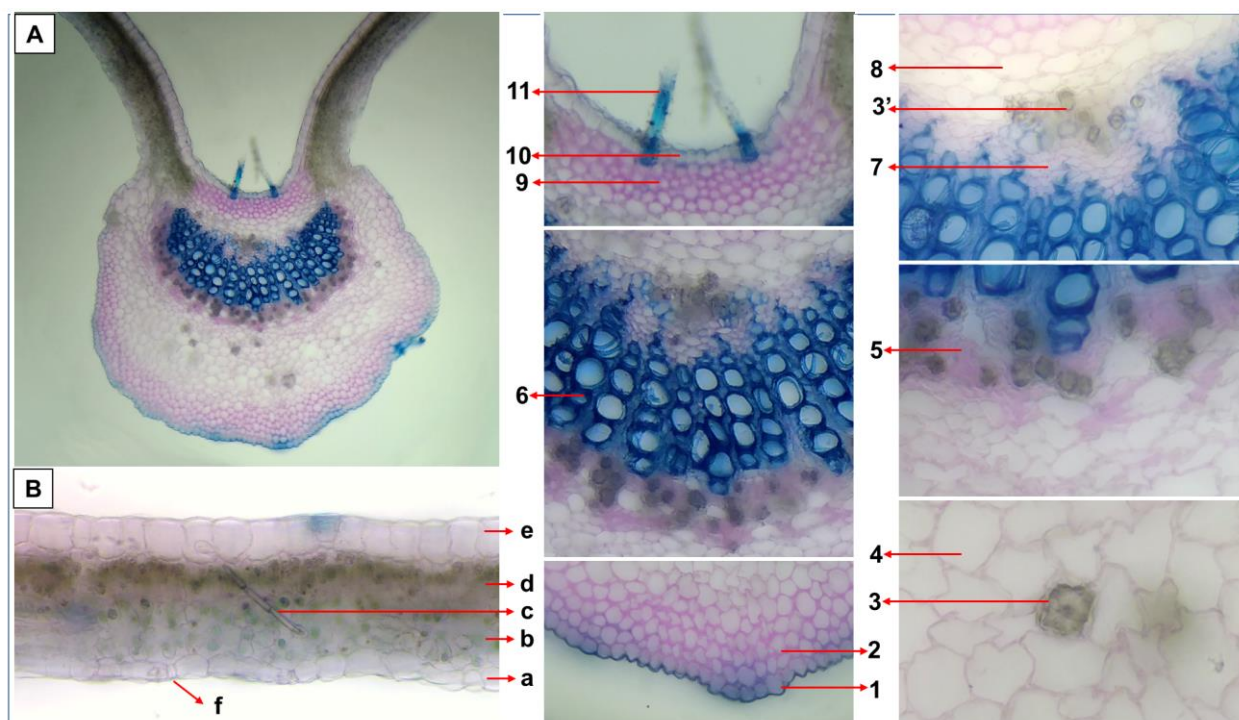
hướng hóa gỗ, bắt màu xanh thuốc nhuộm. Rải rác bên trong tế bào mô mềm ruột có thể quan sát thấy các tinh thể calci oxalat dạng khối, hình đa giác (16).

3.1.3.2. Đặc điểm vi phẫu lá

Phần gân lá (Hình 3.4A): Gân lá có tiết diện gần tròn, đa số là phần gân dưới (chiếm đến 90%), gân trên ít, lõm xuống. Biểu bì dưới (1) là một lớp tế bào thành mỏng, kích thước nhỏ, xếp xít nhau, bề mặt ngoài phủ một lớp cutin mỏng. Biểu bì trên (10) có đặc điểm tương đối giống biểu bì dưới. Biểu bì trên và biểu bì dưới đều mang nhiều lông che chở (11) đa bào, không phân nhánh, gốc đơn bào. Phần gốc của lông che chở có thể hóa cứng. Mô dày góc dưới (2) từ 3-5 hàng tế bào thành dày, xếp thành đám sát biểu bì dưới; mô dày góc trên (9) là 3-4 hàng tế bào sát biểu bì trên gân lá, bắt màu đỏ thuốc nhuộm đậm hơn mô dày góc dưới. Mô mềm dưới (4) là các tế bào mỏng, kích thước khá lớn, chiếm đa số diện tích (1/3) bề dày tiết diện gân lá. Mô mềm trên (8) chỉ gồm 2-3 hàng tế bào, kích thước nhỏ hơn mô mềm dưới. Rải rác trong mô mềm có các tinh thể calci oxalat hình cầu gai (3). Bó libe-gỗ hình cung, bề dày khoảng 1/3 so với bề dày gân lá, nằm ở phần nửa trên của gân lá, có mô gỗ (6) nằm giữa, bắt màu xanh đậm, chiếm phần lớn bó libe gỗ (>80%), libe dưới (5) và trên (7) chỉ là các đám nhỏ nằm sát mô gỗ, có kích thước nhỏ, bắt màu đỏ rõ ràng. Trong phần libe xuất hiện nhiều tinh thể calci oxalat hình cầu gai và đa giác (3').

Phần phiến lá (Hình 3.4B): Phiến lá hướng lên trên, bề dày của phiến lá khoảng 1/5-1/6 bề dày tiết diện phần gân lá, gồm: Biểu bì dưới (a) là một lớp tế bào thành mỏng, kích thước không đều, xếp sát nhau, có thể quan sát thấy lỗ khí (f) đôi khi xuất hiện ở biểu bì dưới. Phần mô khuyết (b) sát với biểu bì dưới, là các tế bào mỏng xếp lỏng lẻo, để hở nhiều khoảng không chứa khí, lớp mô này chiếm khoảng 1/2 bề dày của phiến lá. Mô dậu (d) ngay dưới biểu bì trên (e), là 1 hàng tế bào dài hình chữ nhật, chứa nhiều lục lạp, bề dày bằng bề dày của lớp biểu bì trên, thành tế bào rất mỏng, khó bắt màu thuốc nhuộm. Biểu bì trên (e) là một hàng tế bào xếp xít nhau, kích thước lớn hơn hẳn so với biểu bì dưới (a) của phiến lá và cũng lớn hơn các tế bào biểu bì của phần gân lá (1, 10). Phía ngoài biểu bì trên (e) phủ một lớp sáp mỏng. Không quan sát thấy hạ bì và (hiếm có) lông che chở trên bề mặt trên hoặc dưới của phiến lá. Giữa phần phiến lá đôi khi

quan sát thấy các tinh thể calci oxalat hình kim (c), thường nằm chéo hoặc vuông góc với mặt phẳng phiến lá.



Hình 3.4. Vi phẫu lá Dây đòn gánh

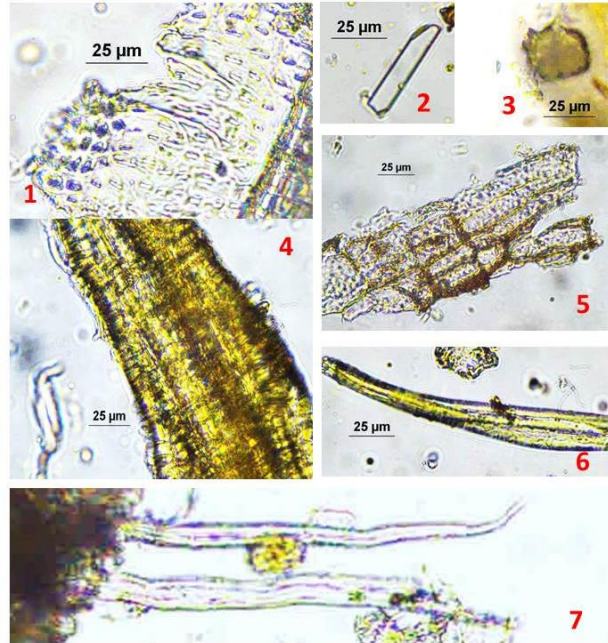
Ghi chú: A. Vi phẫu lá Dây đòn gánh. 1-11: đặc điểm phân gân lá; a-f: đặc điểm phiến lá: 1. Biểu bì dưới; 2. Mô dày dưới; 3 (3'). Tinh thể calci oxalat hình cầu gai; 4. Mô mềm (dưới); 5. Libe (dưới); 6. Gỗ; 7. Libe (trên); 8. Mô mềm (trên); 9. Mô dày trên; 10. Biểu bì trên; 11. Lông che chở. B. Phiến lá: a. Biểu bì dưới; b. Mô khuyết; c. Tinh thể calci oxalat hình kim; d. Mô giậu; e. Biểu bì trên; f. Lỗ khí.

3.1.4. Đặc điểm bột Dây đòn gánh

Đặc điểm bột thân Dây đòn gánh: Bột dược liệu có màu vàng nâu, khi quan sát dưới kính hiển vi thấy: Mạch mạng (1); Tinh thể calci oxalat hình khối (2) đường cứng (4) và sợi mô cứng (6) có vách dày. Lông che chở (7) đơn bào, dài tầm 400-500 μm (Hình 3.5).

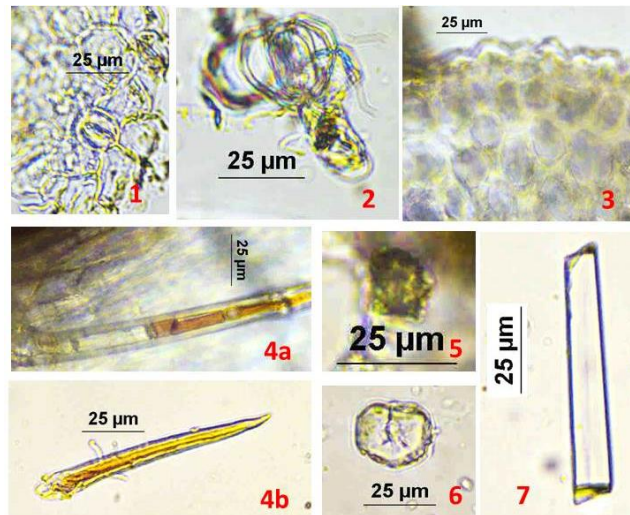
Đặc điểm bột lá Dây đòn gánh: Bột dược liệu có màu vàng nâu, khi quan sát dưới kính hiển vi thấy: Mảnh biểu bì gồm những tế bào vách ngoằn ngoèo có lỗ khí kích thước 15 – 20 μm . Mảnh mạch xoắn (2) có đường kính khoảng 25 μm . Mảnh mô dày (3) gồm các tế bào cách vách dày. Lông che chở đa bào (4a, 4b) đường kính 10 μm

gồm nhiều tế bào dài nối tiếp nhau. Tinh thể calci oxalat hình cầu gai (5) đường kính 15 μm và tinh thể calci oxalat hình khối (7) dài đường kính 10-12 μm . Quan sát thấy hạt tinh bột (6) có rôn rỗ, đường kính 25-30 μm (Hình 3.6).



Hình 3.5. Đặc điểm bột thân Dây đon gán

Chú thích: 1. Mảnh mạch mạng; 2. Tinh thể calci oxalat hình khối; 3. Tinh thể Calci oxalat hình cầu gai; 4, 6. Sợi mô cứng; 5. Mảnh mô mềm; 7. Lông che chở.



Hình 3.6. Đặc điểm bột lá Dây đon gán

Chú thích: 1. Mảnh biểu bì mang lỗ khí; 2. Mảnh mạch xoắn; 3. Mảnh mô dày; 4a,4b Lông che chở đa bào; 5, 7. Tinh thể Calci oxalat; 6. Hạt tinh bột

3.2. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU PHÂN LẬP VÀ XÁC ĐỊNH CẤU TRÚC CÁC HỢP CHẤT THEO ĐỊNH HƯỚNG CHỐNG VIÊM *IN VITRO*

3.2.1. Kết quả định tính các nhóm chất hữu cơ bằng phản ứng hóa học

Định tính các nhóm chất hữu cơ trong phần trên mặt đất Dây đòn gánh bằng các phản ứng hóa học với các thuốc thử đặc hiệu. Kết quả cho thấy Dây đòn gánh có chứa các nhóm chất flavonoid, saponin, caroten, sterol và đường khử (bảng 3.1).

Bảng 3.1. Kết quả định tính các nhóm chất có trong cây Dây đòn gánh

TT	Nhóm chất	Phản ứng định tính	Kết quả	Kết luận sơ bộ
1	Flavonoid	P/tr Cyanidin	+++	Có
		P/tr với NaOH 10%	+++	
		P/tr với FeCl ₃ 5%	++	
2	Saponin	P/tr tạo bọt	+++	Có
3	Saponin triterpenoid	P/tr Salkowski	++	Có
4	Alcaloid	P/tr thuốc thử Mayer	-	Không có
		P/tr thuốc thử Bourchardart	-	
		P/tr thuốc thử Dragendorff	-	
5	Coumarin	P/tr mở vòng lacton	-	Không có
6	Tanin	P/tr với dd Gelatin 1%	-	Không có
		P/tr với FeCl ₃ 5%	+++	
7	Glycosid tim	P/tr Liebermann Bouchardart	++	Không có
		P/tr thuốc thử Baljet	-	
8	Đường khử	P/tr thuốc thử Felling	++	Có
9	Acid hữu cơ	P/tr với Na ₂ CO ₃	-	Không có
10	Acid béo	Bay hơi trên giấy lọc	-	Không có
11	Caroten	P/tr với H ₂ SO ₄ đặc	++	Có
12	Sterol	P/tr Liberman	++	Có
13	Polysacharid	P/tr với thuốc thử Lugol 1%	-	Không có

Ghi chú:

(-): Phản ứng âm tính

(+): Phản ứng dương tính

(++): Phản ứng dương tính rõ

(+++): Phản ứng dương tính rất rõ

3.2.2. Chiết xuất cao toàn phần và các cao phân đoạn của cao toàn phần

Phần trên mặt đất của cây Dây đòn gánh (1,5 kg, độ ẩm 10,0 %) được cắt nhỏ, chiết với ethanol 96% bằng phương pháp ngâm ở nhiệt độ phòng (chiết 3 lần, mỗi lần 4 ngày). Gộp dịch chiết và cất loại dung môi dưới áp suất giảm ở 70°C thu được cao đặc (GLT, 148 g). Phân tán 140 g cao đặc trong nước cất (1 lít) thành hỗn dịch rồi chiết phân đoạn lần lượt với các dung môi có độ phân cực tăng dần: *n*-hexan, EtOAc và *n*-BuOH. Gộp các dịch chiết và cất thu hồi dung môi dưới áp suất giảm thu được các cao chiết tương ứng: cao *n*-hexan (GLH, 17 g), cao EtOAc (GLE, 38 g), cao BuOH (GLB, 21 g) và cặn nước (GLW, 45 g).

3.2.3. Kết quả sàng lọc tác dụng chống viêm *in vitro* của cao chiết toàn phần và cao phân đoạn Dây đòn gánh

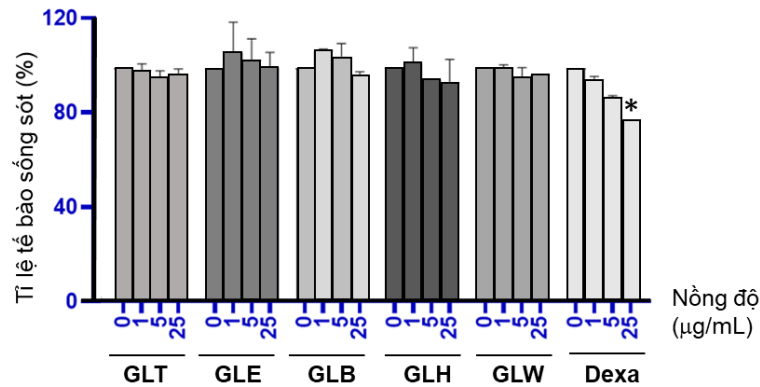
Sàng lọc tác dụng chống viêm *in vitro* của cao chiết là bước nghiên cứu tiền đề, tạo cơ sở cho bước nghiên cứu tiếp theo là phân lập các hợp chất từ cây Dây đòn gánh có tiềm năng chống viêm. Cao chiết ethanol 96% (GLT) và 4 cao chiết phân đoạn của cao tổng (*n*-hexan - GLH, ethyl acetat - GLE, *n*-butanol - GLB và nước - GLW) được đánh giá khả năng ảnh hưởng đến sự sản sinh các chất trung gian gây viêm như PGE₂, NO và các cytokin (IL-1 β , IL-6) trên mô hình đại thực bào RAW264.7 bị gây kích thích viêm bằng LPS, sử dụng phương pháp xét nghiệm ELISA.

3.2.3.1. Ảnh hưởng của cao chiết Dây đòn gánh đến khả năng sống sót của tế bào RAW264.7

Để lựa chọn được mức nồng độ thử nghiệm phù hợp trong nghiên cứu tác dụng chống viêm *in vitro*, trước tiên cao GLT và các cao phân đoạn của cao tổng phần trên mặt đất cây Dây đòn gánh (GLH, GLE, GLB, GLW) được đánh giá mức độ gây độc tế bào *in vitro* trên dòng RAW264.7 theo phương pháp MTT với các nồng độ thử nghiệm là 1, 5, 25 μ g/mL. Kết quả thể hiện ở hình 3.7.

Kết quả ở hình 3.7 cho thấy, ở nồng độ nhỏ hơn hoặc bằng 25 μ g/mL, cao chiết toàn phần và các cao chiết phân đoạn từ phần trên mặt đất Dây đòn gánh gần như không ảnh hưởng đến tỷ lệ sống sót của các tế bào (tỷ lệ tế bào sống sót trên 90 %).

Như vậy, nồng độ cao chiết nhỏ hơn hoặc bằng 25 μ g/mL là an toàn để thực hiện các thí nghiệm đánh giá tác dụng chống viêm *in vitro* trên tế bào RAW264.7.

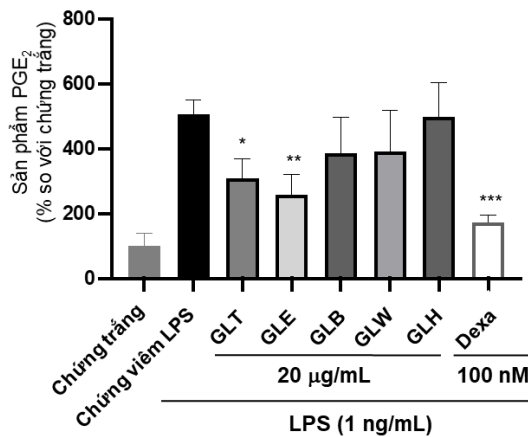


Hình 3.7. Ảnh hưởng của cao chiết toàn phần và cao chiết phân đoạn của Dây đòn gánh đến khả năng sống sót của tế bào RAW264.7

*GLT: cao toàn phần, GLE: Cao phân đoạn EtOAc, GLB: Cao phân đoạn butanol, GLH: Cao phân đoạn n-hexan, GLW: Cao phân đoạn nước, Dexa: Dexamethason, * $p < 0,001$ khi so sánh với chứng trắng.*

3.2.3.2. Ảnh hưởng của cao toàn phần và cao phân đoạn Dây đòn gánh lên mức độ sản sinh PGE₂

Kết quả đánh giá ảnh hưởng của các cao chiết **GLT, GLH, GLE, GLB** và **GLW** nồng độ 20 µg/mL lên sự sản sinh PGE₂ ở tế bào RAW264.7 bị kích thích viêm bằng LPS (1 ng/mL) được thể hiện tại hình 3.8.



Hình 3.8. Ảnh hưởng của cao chiết toàn phần và cao chiết phân đoạn Dây đòn gánh đến mức độ sản sinh PGE₂

*GLT: cao toàn phần, GLE: Cao phân đoạn EtOAc, GLB: Cao phân đoạn butanol, GLH: Cao phân đoạn n-hexan, GLW: Cao phân đoạn nước; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ khi so sánh với chứng viêm LPS (n=5)*

Kết quả ở hình 3.8 cho thấy:

- Khi tế bào bị kích thích viêm bởi LPS (1ng/mL), tỉ lệ PGE₂ trong dịch tế bào so với mẫu chứng trắng là $505,8 \pm 19,2$ %. Với mẫu chứng dương dexamethason (100 nM), tỉ lệ PGE₂ so với mẫu chứng trắng là $173,3 \pm 10,2$ %. Như vậy, dexamethason (100 nM) đã làm giảm sản sinh PGE₂ $65,7 \pm 2,0$ % so với nhóm chứng LPS ($p < 0,001$).

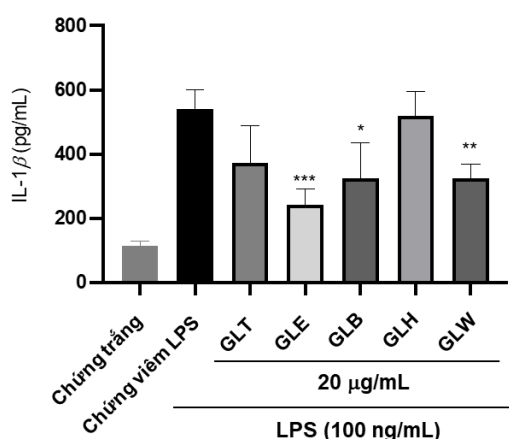
- Cao **GLE** thể hiện hoạt tính tốt nhất trong số các mẫu cao thử nghiệm. Tỉ lệ PGE₂ so với mẫu chứng trắng là $256,9 \pm 28,2$ %. Như vậy, cao **GLE** (20 µg/mL) đã làm giảm sản sinh PGE₂ $49,2 \pm 5,6$ % so với nhóm chứng LPS ($p < 0,01$). Đồng thời tác dụng này khác biệt không có ý nghĩa thống kê với tác dụng của dexamethason (100 nM).

- Cao **GLT** (20 µg/mL) làm giảm sản sinh PGE₂ đạt ý nghĩa thống kê. Tỉ lệ PGE₂ trong tế bào so với mẫu chứng trắng $309,8 \pm 26,7$ %. Như vậy, cao **GLT** (20 µg/mL) đã làm giảm sản sinh PGE₂ $38,8 \pm 5,3$ % so với nhóm chứng LPS ($p < 0,01$).

- Cao **GLB** và **GLW** làm giảm PGE₂ so với nhóm chứng LPS nhưng không đạt ý nghĩa thống kê. Cao chiết **GLH** không có tác dụng ức chế sản sinh PGE₂.

3.2.3.3. Ảnh hưởng của cao chiết toàn phần và cao phân đoạn Dây đòn gánh đến sự sản xuất IL-1 β

Kết quả sàng lọc ảnh hưởng của các cao chiết lên sự sản sinh IL-1 β trên bào RAW264.7 bị kích thích gây viêm bằng LPS ở nồng độ 20 µg/mL được thể hiện ở hình 3.9.



Hình 3.9. Ảnh hưởng của cao chiết toàn phần và cao chiết phân đoạn Dây đòn gánh đến sự sản xuất IL-1 β

*GLT: cao toàn phần, GLE: Cao phân đoạn EtOAc, GLB: Cao phân đoạn butanol, GLH: Cao phân đoạn n-hexan, GLW: Cao phân đoạn nước; *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 khi so sánh với chứng viêm LPS (n=5)*

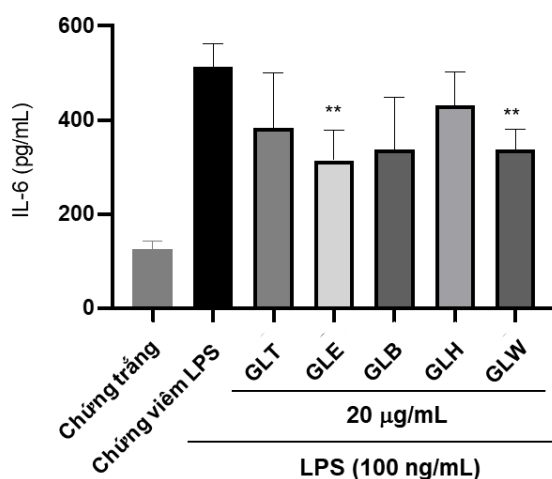
Kết quả ở hình 3.9 cho thấy:

- Trong số các cao thử nghiệm, cao phân đoạn ethyl acetat (**GLE**) có hoạt tính ức chế sự sản sinh IL-1 β mạnh nhất, tiếp đến là cao phân đoạn **GLB** và **GLW**. Cụ thể, hàm lượng IL-1 β ở mẫu chứng viêm LPS là 542,0 \pm 25,5 pg/mL, hàm lượng IL-1 β ở mẫu cao chiết **GLE**, **GLW** và **GLB** lần lượt là 242,6 \pm 21,7; 326,2 \pm 19,0 và 326,1 \pm 48,9 pg/mL. Như vậy, cao chiết **GLE**, **GLW** và **GLB** (20 μ g/mL) làm giảm IL-1 β so với nhóm chứng viêm LPS lần lượt là 55,2 \pm 4,0 % (p < 0,001), 39,8 \pm 3,5 % (p < 0,05) và 39,8 \pm 9,0 % (p < 0,01).

- Cao chiết **GLT** có xu hướng làm giảm sản sinh IL-1 β so với nhóm chứng viêm LPS (giảm 31,2 \pm 9,5 %) nhưng không đạt ý nghĩa thống kê. Cao chiết **GLH** không thể hiện tác dụng ảnh hưởng lên sự sản sinh IL-1 β .

3.2.3.4. Ảnh hưởng của cao chiết toàn phần và cao phân đoạn Dây đòn gánh lên sự sản sinh IL-6

Đánh giá ảnh hưởng của cao chiết toàn phần và các cao chiết phân đoạn Dây đòn gánh lên sự sản sinh IL-6 trên mô hình tế bào RAW264.7 bị kích thích gây viêm bởi LPS, kết quả thể hiện ở hình 3.10.



Hình 3.10. Ảnh hưởng của cao chiết toàn phần và cao chiết phân đoạn Dây đòn gánh đến sự sản xuất IL-6

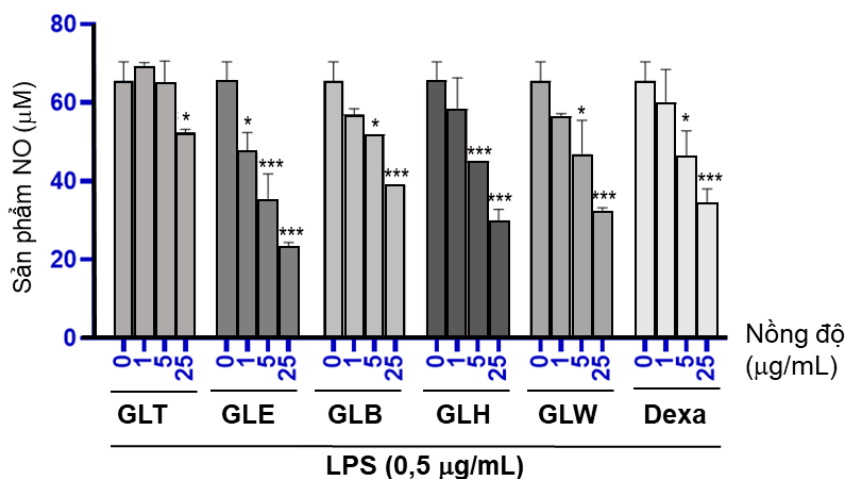
*GLT: cao toàn phần, GLE: Cao phân đoạn EtOAc, GLB: Cao phân đoạn butanol, GLH: Cao phân đoạn n-hexan, GLW: Cao phân đoạn nước; *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 khi so sánh với chứng viêm LPS (n=5)*

Kết quả ở hình trên cho thấy:

- Hàm lượng IL-6 ở mẫu chứng viêm LPS là $514,0 \pm 27,8$ pg/mL, hàm lượng IL-6 ở mẫu cao chiết **GLE**, **GLW** và **GLB** lần lượt là $314,5 \pm 28,5$, $338,2 \pm 19,0$ và $338,2 \pm 48,9$ pg/mL. Như vậy, trong số các cao chiết thử nghiệm, cao phân đoạn ethyl acetat (**GLE**) có hoạt tính ức chế sự sản sinh IL-6 mạnh nhất, giảm $38,8 \pm 5,5$ % so với nhóm chứng LPS ($p < 0,01$); tiếp đến là cao phân đoạn nước (**GLW**), $34,2 \pm 3,7$ % ($p < 0,01$). Cao phân đoạn **GLB** cũng làm giảm sản sinh IL-6 với tỉ lệ tương đương **GLW**, $34,2 \pm 9,5$ %, tuy nhiên không đạt ý nghĩa thống kê.

3.2.3.5. Ảnh hưởng của cao chiết toàn phần và cao phân đoạn Dây đòn gánh lên mức độ sản sinh NO

Tiến hành đánh giá ảnh hưởng của cao chiết toàn phần và cao phân đoạn Dây đòn gánh lên sự sản xuất NO ở đại thực bào RAW264.7 bị gây kích thích sản xuất NO bằng LPS ở các nồng độ 1, 5 và 25 $\mu\text{g/mL}$. Kết quả được thể hiện tại hình 3.11.



Hình 3.11. Ảnh hưởng của cao chiết toàn phần và cao chiết phân đoạn Dây đòn gánh đến sự sản sinh NO trong tế bào RAW264.7

*GLT: cao toàn phần, GLE: Cao phân đoạn EtOAc, GLB: Cao phân đoạn butanol, GLH: Cao phân đoạn n-hexan, GLW: Cao phân đoạn nước; *p<0,05, ***p<0,001 khi so sánh với chứng viêm LPS (n=5)*

Kết quả được chỉ ra hình 3.11 cho thấy, ở nồng độ 5 và 25 µg/mL, các cao chiết phân đoạn **GLE**, **GLB**, **GLH** và **GLW** có tác dụng ức chế sự sản sinh NO đạt ý nghĩa thống kê và phụ thuộc nồng độ. Trong số các mẫu thử nghiệm, cao phân đoạn ethyl acetat (**GLE**) thể hiện tác dụng tốt nhất. Đặc biệt, ở mức nồng độ 25 µg/mL, cao phân đoạn **GLE** làm giảm hàm lượng NO 3 lần so với nhóm chứng LPS và tác dụng có xu hướng mạnh hơn chứng dương dexamethason nồng độ 25 µg/mL. Cao chiết **GLT** chỉ thể hiện tác dụng ức chế sản sinh NO ở mức nồng độ 25 µg/mL.

3.2.4. Phân lập các hợp chất tinh khiết

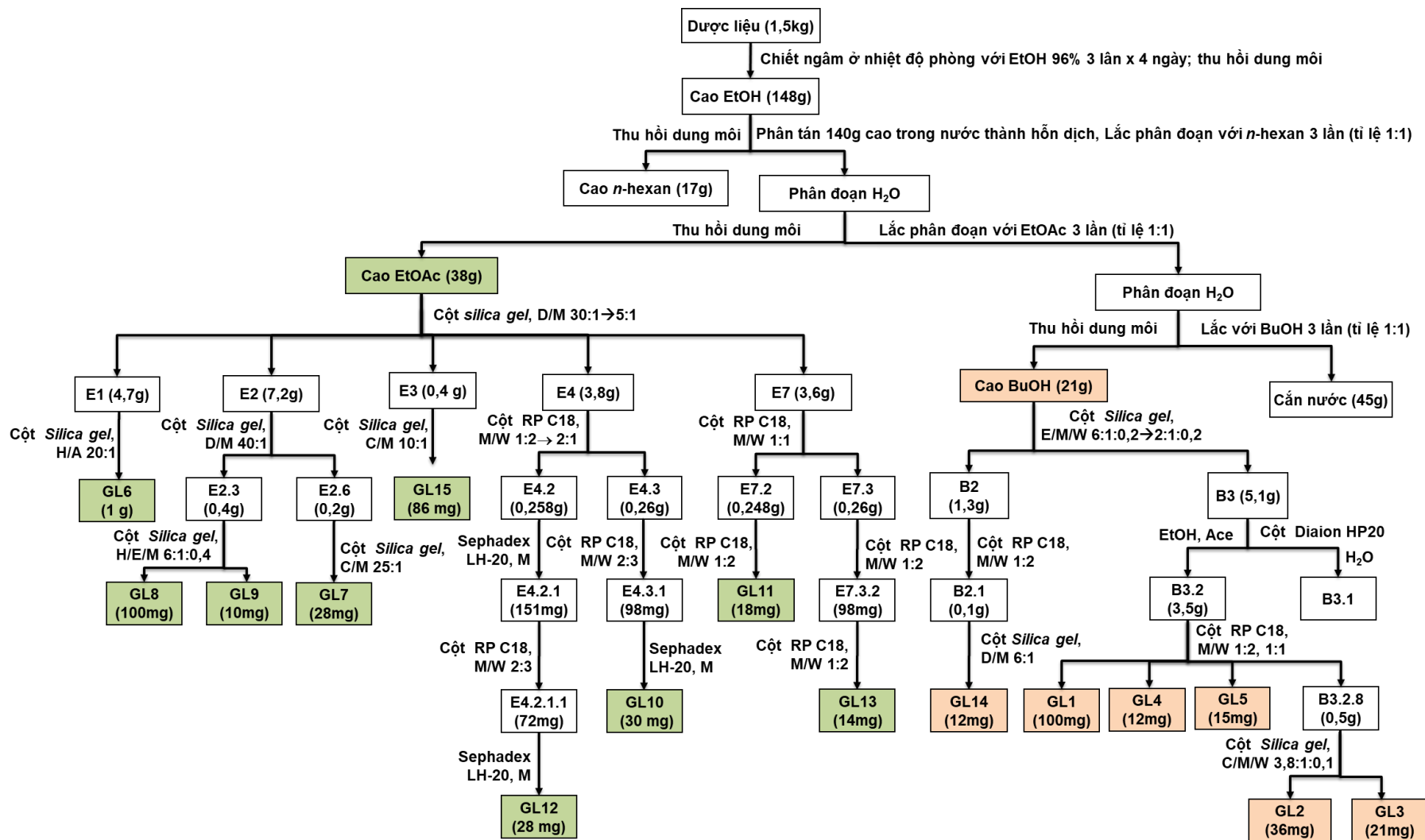
Kết quả sàng lọc tác dụng chống viêm *in vitro* của cao tổng và các cao phân đoạn cho thấy, cao phân đoạn ethyl acetat (**GLE**) thể hiện tác dụng tốt nhất trên các mô hình thử nghiệm. Tiếp đến là cao phân đoạn *n*-butanol (**GLB**) và cao phân đoạn nước (**GLW**). Do đó, để tìm ra các hợp chất có khả năng chống viêm, luận án đã lựa chọn tập trung nghiên cứu chiết tách và phân lập các hợp chất từ phân đoạn ethyl acetat và phân đoạn *n*-butanol của cao tổng phần trên mặt đất Dây đòn gánh.

Cao EtOAc (35 g) được phân tách bằng sắc ký cột silica gel, rửa giải bằng hệ dung môi gradient DCM-MeOH (30:1 đến 5:1, v/v) thu được 08 phân đoạn chính (E1→E8). Phân đoạn E1 (4,7 g) được phân lập bằng sắc ký cột silica gel sử dụng hệ dung môi *n*-hexan-aceton (20:1, v/v) thu được hợp chất **GL6** (1,0 g). Phân đoạn E2 (7,2 g) được phân tách thành 6 phân đoạn (E2.1-E2.6) bằng sắc ký cột silica gel, rửa giải với hệ dung môi DCM-MeOH (40:1, v/v). Tinh chế phân đoạn E2.6 (0,2 g) bằng sắc ký cột silica gel, sử dụng hệ dung môi cloroform-MeOH (25:1, v/v) làm pha động thu được hợp chất **GL7** (28 mg). Phân đoạn E2.3 (0,4 g) được tinh chế bằng sắc ký cột silica gel, rửa giải bằng dung môi *n*-hexan-EtOAc-MeOH (6:1:0,4, v/v) thu được hợp chất **GL9** (10 mg) và **GL8** (100 mg). Phân đoạn E3 (0,4 g) được tinh chế bằng cột silica gel sử dụng hệ dung môi cloroform-MeOH (10:1, v/v) làm pha động thu được hợp chất **GL15** (86 mg). Phân đoạn E4 (3,8 g) được phân tách bằng sắc ký cột silica gel pha đảo RP-C₁₈, sử dụng hệ dung môi MeOH-H₂O (1:2, 1:1, 2:1, v/v) thu được 3 phân đoạn (E4.1→

E4.3). Phân đoạn E4.2 (0,258 g) tiếp tục được phân tách bằng sắc ký cột sephadex với dung môi MeOH, thu được E4.2.1. E4.2.1 (0,151g) tiếp tục được phân tách bằng sắc ký cột pha đảo, sử dụng hệ dung môi MeOH-H₂O (2:3, v/v), thu được 2 phân đoạn E4.2.1.1 và E4.2.1.2. E4.2.1.1 (72 mg) được tinh chế bằng sắc ký cột sephadex với pha động là MeOH thu được hợp chất **GL12** (28 mg). Phân đoạn E4.3 (0,26 g) được phân tách bằng sắc ký cột pha đảo với hệ dung môi rửa giải MeOH-H₂O (2:3, v/v) thu được 2 phân đoạn E4.3.1 và E4.3.2. Phân đoạn E4.3.1 (98 mg) được tinh chế bằng sắc ký cột sephadex, sử dụng dung môi MeOH làm pha động thu được hợp chất **GL10** (30 mg). Phân tách phân đoạn E7 (3,6 g) bằng sắc ký cột pha đảo, rửa giải bằng hệ dung môi MeOH-H₂O (1:1, v/v) thu được 3 phân đoạn (E7.1 → E7.3). E7.2 (0,248 g) được tinh chế bằng sắc ký cột pha đảo với hệ dung môi MeOH-H₂O (1:2, v/v) thu được hợp chất **GL11** (18 mg). Phân đoạn E7.3 (0,26 g) được phân tách bằng sắc ký cột pha đảo, sử dụng hệ dung môi MeOH-H₂O (1:2, v/v) làm pha động thu được 3 phân đoạn (E7.3.1 → E7.3.3). Phân đoạn E7.3.2 (0,98 g) được tinh chế bằng sắc ký cột pha đảo với hệ dung môi MeOH-H₂O (1:2, v/v) thu được hợp chất **GL13** (14 mg).

Cao BuOH (20,0 g) được phân đoạn bằng sắc ký cột pha thường, rửa giải bằng hệ dung môi EtOAc-MeOH-H₂O (6:1:0,2 - 2:1:0,2, v/v/v) thu được 5 phân đoạn chính (B1 → B5). Phân đoạn B2 (1,3 g) được phân tách bằng sắc ký cột pha đảo, rửa giải bằng hệ dung môi MeOH-H₂O (1:1, v/v) thu được 5 phân đoạn (B2.1 → B2.5). Phân đoạn B2.1 (0,1 g) được tinh chế bằng sắc ký cột silica gel với hệ dung môi DCM-MeOH (6:1, v/v) thu được hợp chất **GL14** (12 mg). Phân đoạn B3 (5,1 g) được phân tách bằng sắc ký cột diaion HP20, rửa giải lần lượt với nước, ethanol 96% và aceton thu được phân đoạn B3.1 và B3.2. Phân đoạn B3.2 (3,5 g) được đưa lên cột pha đảo, rửa giải bằng hệ dung môi MeOH-H₂O (1:2 → 1:1, v/v) thu được 3 hợp chất **GL1** (100 mg), **GL5** (15 mg) và **GL4** (12 mg) và 8 phân đoạn khác B3.2.1 → B3.2.8. Tiếp tục phân tách phân đoạn B3.2.8 (0,5 g) bằng sắc ký cột silica gel với hệ dung môi cloroform-MeOH-H₂O (3,8:1:0,1, v/v/v) thu được hợp chất **GL2** (36 mg) và **GL3** (21 mg).

Sơ đồ chiết xuất và phân lập các chất được tóm tắt trong hình 3.7



Hình 3.12. Sơ đồ chiết xuất và phân lập các hợp chất từ Dây đòn gánh

Chú thích: A (acetone), C (chloroform), E (ethyl acetat), D (dichloromethan), H (n-hexan), M (methanol), W, H₂O (nước)

3.2.5. Xác định cấu trúc của các hợp chất

3.2.5.1. Hợp chất GL1

Hợp chất **GL1** thu được dưới dạng bột màu trắng, nhiệt độ nóng chảy 248-251°C, $[\alpha]_D^{20}$ -5,00 (*c* 0,3, MeOH). Phổ IR ν_{\max} (KBr): 3391,97 (OH), 2942,53 (CH), 1453,43 (C=C), 1386,88 và 1369,52 (CH₃), 1285,21 và 1227,74 (C-O-C) và 1042,57 cm⁻¹. Công thức phân tử của **GL1** được xác định là C₄₉H₈₀O₁₈, dựa trên pic ion giả phân tử *m/z* 957,5411 [M+H]⁺ (tính toán lý thuyết cho cation [C₄₉H₈₁O₁₈]⁺, 957,5417) quan sát được trên phổ khối lượng phân giải cao và 49 tín hiệu carbon trên phổ ¹³C-NMR. Phổ ¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) và phổ ¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD): xem bảng 3.2.

Bảng 3.2. Dữ liệu phổ ¹H và ¹³C NMR của hợp chất GL1

Vị trí	GL1		$\delta_c^\#$	$\delta_c^\$$
	$\delta_H^{a,b}$ (độ bội, <i>J</i> = Hz)	$\delta_c^{a,c}$		
1	1,00 (m); 1,73 (m)	40,1	40,1	
2	1,67 (m); 1,96 (m)	27,3	27,4	
3	3,22 (dd, 11,5; 4,0)	89,8	89,9	
4	-	40,4	40,5	
5	0,75 (m)	57,7	57,7	
6	1,54 (m); 1,59 (m)	19,1	19,1	
7	1,49 (m); 1,55 (m)	36,9	37,0	
8	-	38,7	38,7	
9	0,78 (m)	53,8	53,8	
10	-	38,2	38,2	
11	1,49 (m); 1,63 (m)	22,2	22,2	
12	1,66 (m); 1,90 (m)	28,2	28,3	
13	2,43 (m)	38,2	38,2	
14	-	57,5	57,6	
15	1,43 (brd, 8,5); 1,68 (m)	38,9	38,9	
16	-	119,2	119,2	
17	1,83 (d, 7,0)	62,7	62,9	
18	1,15 (s)	19,2	19,2	
19	0,89 (s)	17,0	16,9	
20	-	76,9	76,6	
21	1,21 (s)	23,4	23,4	
22	4,34 (dd, 9,0; 3,0)	94,0	94,0	
23	1,59 (brd, 3,5); 2,33 (brd, 8,0)	34,7	34,7	
24	-	154,1	39,6	
25	2,33 (m)	35,0	150,0	

26	1,08 (d, 7,0)	22,1	111,2	
27	1,07 (d, 7,0)	22,1	18,8	
28	1,06 (s)	28,4	28,4	
29	0,88 (s)	17,1	17,0	
30	3,96 (d, 9,5); 3,99 (overlap)	66,8	66,7	
31	4,84 (s); 4,87 (s)	108,8	22,1	
3-O-Glc				
1'	4,46 (d, 7,5)	105,5		100,7
2'	3,60 (t, 8,0)	77,9		82,5
3'	3,72 (m)	88,6		88,8
4'	3,50 (t, 9,5)	70,2		70,3
5'	3,30 (m)	77,4		78,5
6'	3,70 (dd, 12,0; 5,0); 3,87 (dd, 12,0; 2,5)	62,7		62,9
2'-Rha				
1''	5,46 (d, 1,5)	101,8		102,3
2''	3,98 (dd, 3,5; 2,0)	72,1		72,2
3''	3,75 (dd, 7,0; 3,5)	72,1		72,5
4''	3,42 (t, 9,5)	73,8		74,1
5''	4,03 (dq, 13,0; 6,5)	70,1		69,9
6''	1,23 (d, 6,5)	18,0		18,0
3'-Glc				
1'''	4,54 (d, 7,5)	104,0		104,5
2'''	3,29 (m)	75,3		75,2
3'''	3,40 (t, 9,0)	78,3		77,3
4'''	3,29 (m)*	71,5		71,9
5'''	3,40 (m)*	78,1		78,3
6'''	3,65 (dd, 11,5; 6,5); 3,94 (dd, 11,5; 2,0)	62,6		63,0

Ghi chú: [#]δ_C của aglycon của gouaniasid VI đo trong CD₃OD [29], ^{\$}δ_C của phần đường của methylprotogracillin đo trong CD₃OD [87], ^ađo trong CD₃OD, ^b500 MHz, ^c125 MHz, * tín hiệu bị chồng lấp.

Phổ ¹H-NMR của **GL1** (bảng 3.2) xuất hiện tín hiệu proton của tám nhóm methyl trong đó có năm tín hiệu singlet tại δ_H 0,88, 0,89, 1,06, 1,15 và 1,21 và ba tín hiệu doublet tại δ_H 1,08 (3H, *J* = 7,0 Hz, H-26), 1,07 (3H, *J* = 6,5 Hz, H-27) và 1,23 (3H, *J* = 6,5 Hz, H-6''); hai tín hiệu proton của carbon liên kết với oxy tại δ_H 3,22 (dd, 11,5, 4,0 Hz, H-3) và 4,34 (dd, 9,0, 3,0 Hz, H-22); hai tín hiệu của proton oxymethylen tại δ_H 3,96 (d, 9,5 Hz) và 3,99 (tín hiệu bị chồng lấp). Tín hiệu singlet tại δ_H 4,84 và 4,87

thuộc về hai proton exomethylen gợi ý **GL1** có một nhóm methylen. Ba tín hiệu proton anomeric tại δ_H 4,46 (d, 7,5 Hz), 4,54 (d, 7,5 Hz) và 5,46 (d, 1,5 Hz) cho biết hợp chất này có 3 đơn vị đường. Các tín hiệu proton của phân đường, hình dạng tín hiệu proton của 7 nhóm methyl thuộc phần aglycon và sự xuất hiện một số lượng lớn các tín hiệu proton ở vùng trường cao (δ_H 0,75 ~ 2,43) cho phép dự đoán đây là một hợp chất saponin có cấu trúc khung aglycon dạng dammaran.

Phổ ^{13}C -NMR, DEPT và HSQC chỉ ra 49 tín hiệu carbon bao gồm: 7 carbon không liên kết với hydro (C), 22 nhóm methin (CH), 12 nhóm methylen (CH_2), và 8 nhóm methyl (CH_3). Trong đó, khung aglycon có chứa 31 carbon, tín hiệu của 18 carbon còn lại cho thấy **GL1** có hợp phân đường gồm 3 đơn vị đường hexose. Điều này cũng phù hợp với sự có mặt của 3 proton anome quan sát được trên phổ proton như phân tích ở trên. Các giá trị phổ của carbon thuộc vòng A–E của **GL1** hoàn toàn trùng khớp với aglycon của gouaniasid VI [29] và chỉ quan sát thấy một số điểm khác biệt ở phần mạch nhánh carbon (bảng 3.2). Tín hiệu của H-C (24) được thay thế bởi tín hiệu carbon bậc 4 tại δ_C 154,1. Sự xuất hiện của tín hiệu carbon tại δ_C 108,8 trên phổ ^{13}C -NMR phù hợp với tín hiệu proton exomethylen quan sát được trên phổ ^1H -NMR và khẳng định sự có mặt của 1 nhóm methylen. Tương tác HMBC giữa H-31 (δ_H 4,84) với C-23 (δ_C 34,7) và C-25 (δ_C 35,0) cho nhận định nhóm CH_2 liên kết trực tiếp với C-24. Các tín hiệu của nhóm methyl H-26 (δ_H 1,08) và H-27 (δ_H 1,07) cộng hưởng doublet cùng với tương tác HMBC giữa H-26 và H-27 với C-24 (δ_C 154,1) và C-25 (δ_C 35,0), giữa H-26 với C-27 (δ_C 22,1) chứng minh sự có mặt của nhóm iso-propyl phía cuối mạch nhánh.

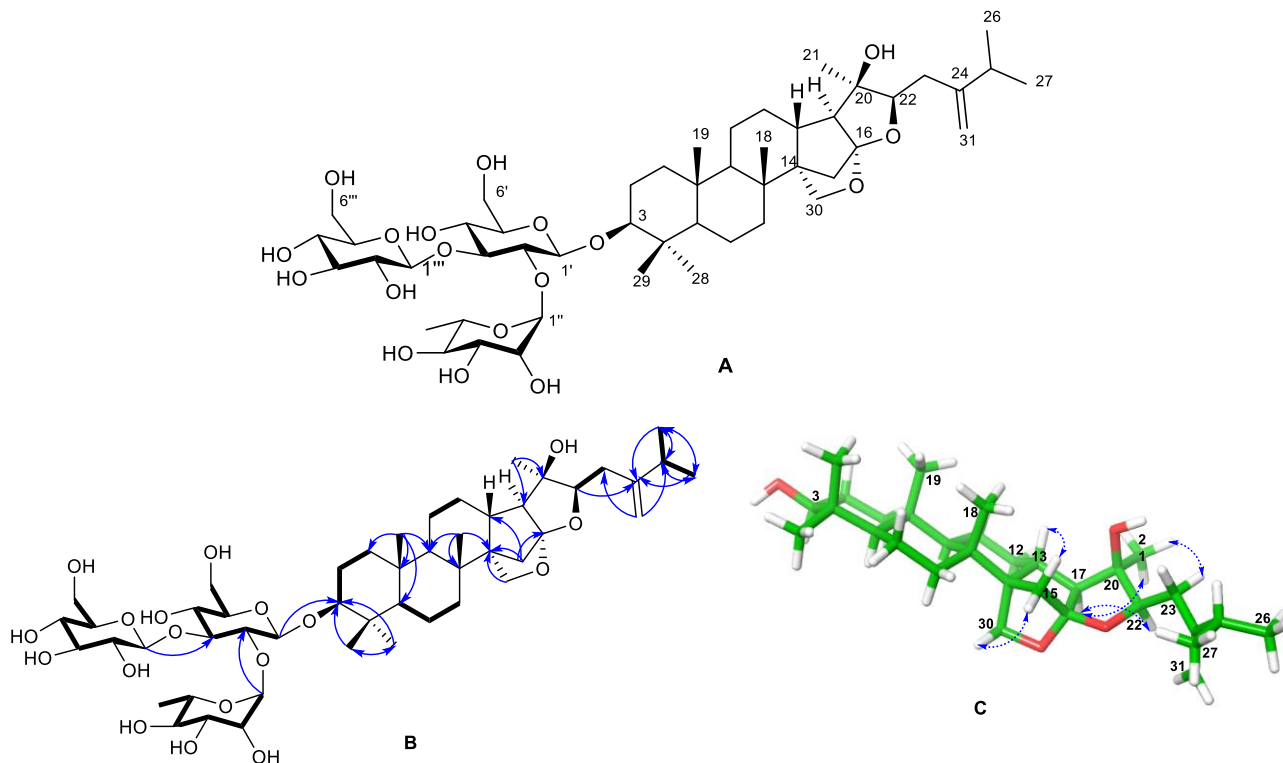
Hóa lập thể của khung aglycon của hợp chất **GL1** được minh chứng dựa trên phân tích phổ tương tác không gian NOESY và so sánh với dữ liệu phổ NMR của hợp chất đã công bố. Tín hiệu proton của H-3 có hằng số tương tác lớn ($J = 11,5$ Hz) chứng tỏ nhóm oxygen thế ở vị trí C-3 định hướng β . Bên cạnh đó, tương tác NOESY giữa H-3 (δ_H 3,22) và H-28 (δ_H 1,06) cho biết nhóm methyl C-28 có hướng α giống H-3, đồng nghĩa với nhóm methyl C-29 có hướng β . Tương tự, các tương tác giữa H-29/H-19 và H-19/H-18 cho phép xác định các nhóm methyl này có hướng β như sinh tổng hợp của các hợp chất thứ cấp khung dammaran. Tương tác giữa H-22 (δ_H 4,34) và H-21 (δ_H 1,21) cho thấy các proton này gần nhau trong không gian và cùng định hướng α . Ngoài

ra, sự trùng khớp dữ liệu phổ phần aglycon của **GL1** và gouaniasid VI trong cùng dung môi đo CD₃OD đã hỗ trợ và cho phép khẳng định hóa lập thể khung aglycon của hợp chất **GL1** tương tự với aglycon của gouaniasid VI [29, 88].

Số liệu phổ của các đơn vị đường trong hợp chất **GL1** được qui kết bằng phân tích phổ hai chiều COSY, HSQC và HMBC. Chuỗi tương tác quan sát được trên phổ COSY gồm H-1'/ H-2'/ H-3'/ H-4'/ H-5' cùng với các tương tác trực tiếp trên phổ HSQC của các proton này cho phép qui kết các giá trị phổ của đơn vị đường glucose (Glc'), đồng thời tương tác HMBC giữa H-1' (δ_H 4,46) với aglycon C-3 (δ_C 89,8) khẳng định liên kết *O*-glycosid của đường này với aglycon tại C-3. Tương tác HMBC giữa H-1" (δ_H 5,46) và C-2' (δ_C 77,9), cùng với chuỗi các tương tác COSY H-1"/ H-2"/ H-3"/ H-4"/ H-5"/ H-6" cho phép qui kết các giá trị phổ của đơn vị đường rhamnose (Rha") và liên kết (1→2) giữa đơn vị đường rhamnose với đơn vị đường glucose (Glc'). Các số liệu phổ carbon còn lại của hợp phần đường tại δ_C 104,0, 75,3, 78,3, 71,5, 78,1, 62,6 và tương tác HMBC giữa H-1"' (δ_H 4,54) với C-3' (δ_C 88,6) cho thấy sự có mặt của một đơn vị đường glucose tự do ở cuối chuỗi mạch trisaccharid và liên kết với đơn vị glucose (Glc') bởi liên kết (1→3) *O*-glycosid. Do hằng số tương tác của các proton anomeric lớn ($J = 7,5$ Hz) nên hai phân tử đường Glc' và Glc"' có cấu hình β , phân tử đường Rha" được xác định có cấu hình α do proton anomeric có hằng số tương tác nhỏ ($J = 1,5$ Hz). Số liệu phổ của chuỗi đường được so sánh với số liệu phổ chuỗi đường của hợp chất methylprotogracillin [87] và cho thấy sự phù hợp. Cấu hình tuyệt đối của các đường này được xác định sau khi thủy phân **GL1** và sử dụng phương pháp TLC kết hợp so sánh với góc quay cực riêng của các đường chuẩn: D-glucose [R_f 0,30, $[\alpha]_D^{20} = +45,8$ (c 0,05, H₂O)] và L-rhamnose [R_f 0,75, $[\alpha]_D^{20} = -15,7$ (c 0,05, H₂O)]. Như vậy, chuỗi đường được xác định là β -D-glucopyranosyl-(1→3)-[α -L-rhamnopyranosyl-(1→2)]- β -D-glucopyranosid và gắn với khung aglycon tại C-3.

Trên cơ sở phân tích dữ liệu phổ trên, hợp chất **GL1** được xác định là 16 β ,22 β :16 α ,18-diepoxy-24-methylidendammaran-3 β ,20-diol-3-*O*- β -D-glucopyranosyl-(1→3)-[α -L-rhamnopyranosyl-(1→2)]- β -D-glucopyranosid. Tra cứu

trên hệ thống SciFinder cho thấy **GL1** là hợp chất mới, được đề nghị đặt tên là gouaniasid VII.



Hình 3.13. Cấu trúc hóa học (A) và tương tác COSY (—), HMBC (→) (B), và NOESY (↔) (C) của **GL1**

3.2.5.2. Hợp chất **GL2**

Hợp chất **GL2** thu được dưới dạng bột màu trắng, nhiệt độ nóng chảy 259-262 °C. Phổ IR ν_{\max} (KBr): 3353,39 (OH), 2936,75 (CH), 1454,39 (C=C), 1386,88 và 1369,52 (CH₃), 1285,61 và 1211,35 (C-O-C) và 1041,61 cm⁻¹. Phổ khối phân giải cao của **GL2** cho pic ion giả phân tử tại m/z 1111,5663 [M+Na]⁺ (tính toán lý thuyết cho cation [C₅₄H₈₈O₂₂Na]⁺, 1111,5659), phù hợp với công thức phân tử C₅₄H₈₈O₂₂. Phổ ¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) và phổ ¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD): xem bảng 3.3.

Bảng 3.3. Dữ liệu phổ ¹H và ¹³C NMR của hợp chất **GL2**

Vị trí	GL2		$\delta_c^{\#}$	δ_c^*
	$\delta_H^{a,b}$ (độ bội, $J = \text{Hz}$)	$\delta_c^{a,c}$		
1	1,00 (m); 1,73 (m)	40,1	40,1	
2	1,67 (m); 1,96 (m)	27,3	27,3	

3	3,22 (dd, 11,5; 4,0)	89,8	89,8	
4	-	40,4	40,4	
5	0,75 (m)	57,7	57,7	
6	1,54 (m); 1,59 (m)	19,1	19,1	
7	1,49 (m); 1,55 (m)	36,9	36,9	
8	-	38,7	38,7	
9	0,78 (m)	53,8	53,8	
10	-	38,2	38,2	
11	1,49 (m); 1,63 (m)	22,2	22,2	
12	1,66 (m); 1,90 (m)	28,2	28,2	
13	2,43 (m)	38,2	38,2	
14	-	57,5	57,5	
15	1,43 (brd, 8,5); 1,68 (m)	38,9	38,9	
16	-	119,2	119,2	
17	1,83 (d, 7,0)	62,7	62,7	
18	1,15 (s)	19,2	19,2	
19	0,89 (s)	17,0	17,0	
20	-	76,9	76,9	
21	1,21 (s)	23,4	23,4	
22	4,34 (dd, 9,0; 3,0)	94,0	94,0	
23	1,59 (brd, 3,5); 2,33 (brd, 8,0)	34,7	34,7	
24	-	154,1	154,1	
25	2,33 (m)	35,0	35,0	
26	1,08 (d, 7,0)	22,1	22,1	
27	1,07 (d, 7,0)	22,1	22,1	
28	1,06 (s)	28,4	28,4	
29	0,88 (s)	17,1	17,1	
30	3,96 (d, 9,5); 3,99 (overlap)	66,8	66,8	
31	4,84 (s); 4,87 (s)	108,8	108,8	
3-O-Glc				
1'	4,48 (d, 7,5)	105,1	105,5	105,6
2'	3,60 (m)	77,4	77,9	74,9
3'	3,73 (m)	90,7	88,6	85,5
4'	3,50 (t, 9,0)	70,5	70,2	70,1
5'	3,29 (m)	77,2	77,4	76,0
6'	3,70 (dd, 12,0; 5,5); 3,86 (brd, 9,5)	62,6	62,7	62,4
2'-Rha				

1''	5,49 (d, 1,5)	101,8	101,8	101,7
2''	3,99 (m)	72,1	72,1	72,3
3''	3,75 (dd, 6,5; 3,0)	72,1	72,1	72,3
4''	3,41 (t, 9,5)	73,8	73,8	73,8
5''	4,05 (dq, 9,5; 6,5)	70,0	70,1	69,6
6''	1,23 (d, 6,0)	18,0	18,0	18,0
3'-Glc				
1'''	4,52 (d, 8,0)	104,8	104,0	105,2
2'''	3,31 (m)	75,1	75,3	75,0
3'''	3,41 (t, 9,0)	78,2	78,3	78,4
4'''	3,30 (m)	72,1	71,5	72,0
5'''	3,58 (m)	76,7	78,1	76,9
6'''	3,63 (m); 4,30 (brd, 8,5)	70,5	62,6	70,4
6''-Xyl				
1''''	4,28 (d, 7,5)	105,2		105,8
2''''	3,23 (d, 4,0)	75,1		74,8
3''''	3,38 (m)	77,5		77,9
4''''	3,53(m)	71,1		71,0
5''''	3,25 (m); 3,89 (dd,11,5; 5,5)	67,0		66,9

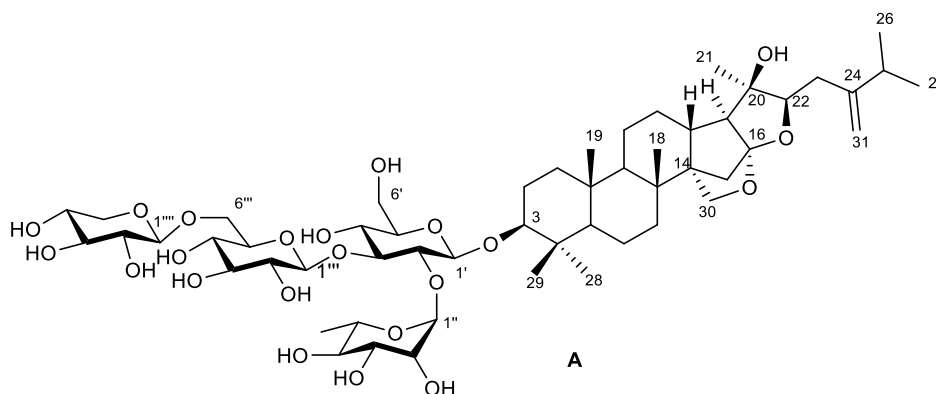
Ghi chú: # δ_C của **GL1** đo trong CD_3OD , * δ_C của phân đường của zizyphosid A đo trong CD_3OD [89], ^ađo trong CD_3OD , ^b500 MHz, ^c125 MHz.

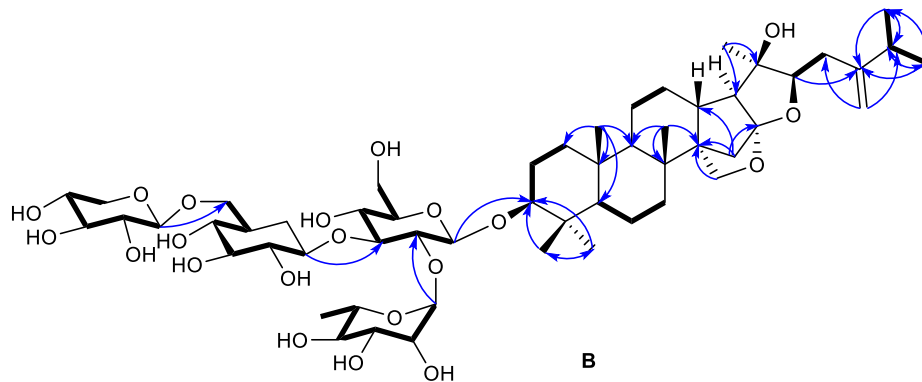
Dữ liệu phổ ¹H và ¹³C-NMR (bảng 3.3) của **GL2** hoàn toàn tương đồng với số liệu phổ của **GL1**, ngoại trừ sự xuất hiện thêm các tín hiệu đặc trưng của một đơn vị đường xylose [89], bao gồm tín hiệu proton anomeric tại δ_H 4,28 (d, $J = 7,5$ Hz) và 5 tín hiệu carbon tại δ_C 105,2, 75,1, 77,5, 71,1, 67,0. Mặt khác, sự dịch chuyển về phía trường thấp của tín hiệu C-6''' (δ_C 70,5) ở **GL2** so với **GL1** (δ_C 62,6) gợi ý cho một liên kết O-(1→6)-glycosid của đơn vị đường xylose (Xyl''') cuối mạch với đơn vị đường glucose (Glc'''). Liên kết glycosid này cũng được khẳng định lại bởi tương tác HMBC hai chiều giữa H-1'''' (δ_H 4,28) và C-6''' (δ_C 70,5). Đồng thời, số liệu ¹³C-NMR của hợp chất **GL2** ở phân đường cũng được so sánh với số liệu phổ của hợp chất zizyphosid A đã được công bố [89] và cho thấy sự phù hợp của ba đơn vị đường Rha'', Glc''' và Xyl'''' ở cùng vị trí liên kết tương ứng. Cấu hình tuyệt đối của các đường này được xác định sau khi thủy phân **GL2** và sử dụng phương pháp TLC kết hợp so sánh với góc quay cực

riêng của các đường chuẩn: D-glucose [R_f 0,30, $[\alpha]_D^{20} = +45,7$ (c 0,05, H_2O)], D-xylose [R_f 0,50, $[\alpha]_D^{20} = +18,6$ (c 0,05, H_2O)] và L-rhamnose [R_f 0,75, $[\alpha]_D^{20} = -15,6$ (c 0,05, H_2O)].

Hóa lập thể của khung aglycon của hợp chất **GL2** được minh chứng dựa trên phân tích phổ tương tác không gian NOESY và so sánh với dữ liệu phổ NMR của hợp chất đã được công bố. Tín hiệu proton của H-3 có hằng số tương tác lớn ($J = 11,5$ Hz) chứng tỏ nhóm oxygen thế ở vị trí C-3 định hướng β . Điều này được khẳng định khi quan sát thấy tương tác NOESY giữa H-3 (δ_H 3,22) và H-5 (δ_H 0,75). Tương tác NOESY giữa H-3 và H-28 (δ_H 1,06) cho biết nhóm methyl C-28 có hướng α giống H-3, đồng nghĩa với nhóm methyl C-29 có hướng β . Tương tác giữa H-19 (δ_H 0,89) và H-18 (δ_H 1,15) cho thấy các proton này gần nhau trong không gian và cùng định hướng β như sinh tổng hợp của các hợp chất thứ cấp khung dammaran. Tương tự, các tương tác NOESY giữa H-9 (δ_H 0,78) và H-30 (δ_H 3,99), H-22 (δ_H 4,34) và H-17 (δ_H 1,83), H-17 và H-30 cũng chứng minh cho định hướng α của các proton này. Bên cạnh đó, sự trùng khớp dữ liệu phổ phần aglycon của **GL2** và gouaniasid VI trong cùng dung môi đo CD_3OD đã hỗ trợ và cho phép khẳng định hóa lập thể khung aglycon của hợp chất **GL2** tương tự với aglycon của gouaniasid VI [29, 88].

Từ các phân tích trên, **GL2** được xác định là $16\beta,22\beta:16\alpha,18$ -diepoxy-24-methylidendammaran- $3\beta,20$ -diol-3- O - β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)]- β -D-glucopyranosid. Tra cứu trên hệ thống SciFinder cho thấy **GL2** cũng là hợp chất mới lần đầu tiên được biết đến và được đặt tên là gouaniasid VIII.





Hình 3.14. Cấu trúc hóa học (A) và tương tác COSY (—), HMBC (---) (B) của GL2

3.2.5.3. Hợp chất GL3

Hợp chất **GL3** thu được dưới dạng bột màu trắng, nhiệt độ nóng chảy 265-268 °C. Phổ IR ν_{\max} (KBr): 3330,24 (OH), 2919,39 (CH), 1455,35 (C=C), 1388,81 và 1372,41 (CH₃), 1285,61 (C-O-C) và 1043,53 cm⁻¹. Công thức phân tử của **GL3** được xác định là C₅₅H₉₀O₂₃ thông qua sự xuất hiện của pic ion giả phân tử m/z 1153,5464 [M+Cl]⁻ (tính toán cho anion [C₅₅H₉₀O₂₃Cl]⁻, 1153,5567) trên phổ khối phân giải cao, cùng với tín hiệu của 55 carbon trên phổ ¹³C-NMR. Phổ ¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) và phổ ¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD): xem bảng 3.4.

Bảng 3.4. Dữ liệu phổ ¹H và ¹³C NMR của hợp chất GL3

Vị trí	GL3		$\delta_{\text{C}}^{\#}$
	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,b}}$ (độ bội, $J = \text{Hz}$)	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,c}}$	
1	1,00 (m); 1,72 (m)	40,1	40,1
2	1,70 (m); 1,98 (m)	27,3	27,3
3	3,22 (m)	89,8	89,8
4	-	40,4	40,4
5	0,77 (m)	57,7	57,7
6	1,54 (m); 1,60 (m)	19,1	19,1
7	1,50 (m); 1,53 (m)	36,9	36,9
8	-	38,7	38,7
9	0,79 (m)	53,8	53,8
10	-	38,2	38,2
11	1,48 (m); 1,63 (m)	22,2	22,2
12	1,66 (m); 1,90 (m)	28,2	28,2
13	2,43 (m)	38,2	38,2
14	-	57,5	57,5
15	1,43 (brd, 8,5); 1,68 (m)	38,9	38,9

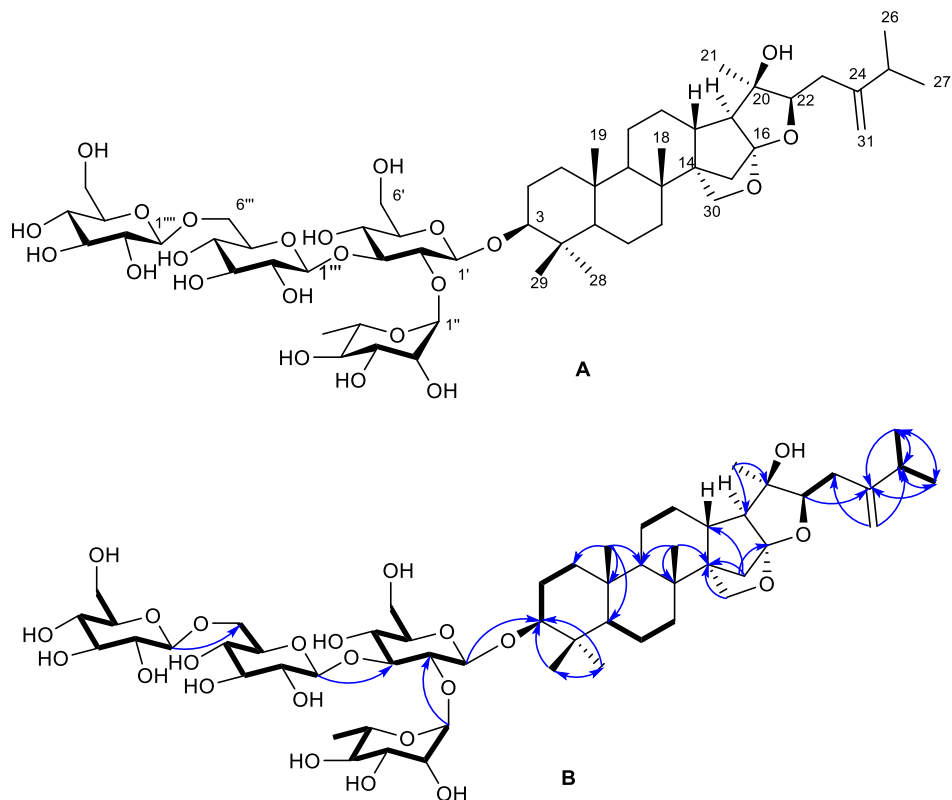
16	-	119,2	119,2
17	1,83 (d, 7,0)	62,7	62,7
18	1,15 (s)	19,2	19,2
19	0,89 (s)	17,0	17,0
20	-	76,9	76,9
21	1,21 (s)	23,4	23,4
22	4,34 (dd, 9,0; 3,0)	94,0	94,0
23	1,59 (m); 2,33 (m)	34,7	34,7
24	-	154,1	154,1
25	2,32 (m)	35,0	35,0
26	1,08 (d, 7,0)	22,1	22,1
27	1,07 (d, 7,0)	22,1	22,1
28	1,06 (s)	28,4	28,4
29	0,88 (s)	17,1	17,1
30	3,97 (d, 7,5); 3,99 (overlap)	66,8	66,8
31	4,84 (s); 4,87 (s)	108,8	108,8
3'-O-Glc			
1'	4,48 (d, 7,5)	105,2	105,1
2'	3,60 (m)	77,4	77,4
3'	3,73 (m)	90,7	90,7
4'	3,50 (t, 10,0)	70,5	70,5
5'	3,29 (m)	77,2	77,2
6'	3,70 (brd, 5,0); 3,87 (13,0, 2,0)	62,6	62,6
2'-Rha			
1''	5,49 (d, 1,5)	101,7	101,8
2''	3,99 (m)	72,1	72,1
3''	3,75 (dd, 6,0, 3,5)	72,1	72,1
4''	3,41 (t, 9,0)	73,8	73,8
5''	4,05 (dq, 9,5; 6,0)	70,0	70,0
6''	1,23 (d, 6,0)	18,0	18,0
3'-Glc			
1'''	4,52 (d, 8,0)	104,7	104,8
2'''	3,31 (m)	75,1	75,1
3'''	3,41 (t, 9,5)	78,1	78,2
4'''	3,30 (m)	71,9	72,1
5'''	3,58 (m)	76,7	76,7
6'''	3,65 (m); 4,30 (brd, 8,5)	70,2	70,5
6'''-Glc			
1''''	4,34 (d, 6,0)	104,3	105,2
2''''	3,23 (m)	75,2	75,1
3''''	3,41 (t, 9,5)	77,9	77,5
4''''	3,30 (m)	71,5	71,1
5''''	3,29 (m)	77,6	67,0

6'''	3,70 (m); 3,86 (dd, 12,0, 1,5)	62,7
------	--------------------------------	------

Ghi chú: [#]δ_C của **GL2** đo trong CD₃OD, ^ađo trong CD₃OD, ^b500 MHz, ^c125 MHz.

Dữ liệu phổ ¹H và ¹³C-NMR (bảng 3.4) của **GL3** khá tương đồng với dữ liệu phổ của **GL2**, ngoại trừ sự thay thế phân tử đường glucose gắn vào C-6''' thay vì đường xylose như ở **GL2**. Tín hiệu proton anomer H-1''' tại δ_H 4,36 (1H, d, *J* = 6,0 Hz) và tín hiệu proton của H-6''' tại δ_H 3,70 (m); 3,86 (dd, *J* = 12,0, 1,5 Hz) trên phổ ¹H-NMR cùng với tín hiệu của 6 carbon tại δ_C 104,3, 75,2, 77,9, 71,5, 77,6, 62,7 trên phổ ¹³C-NMR và tương tác HMBC giữa H-1'''_{Glc} (δ_H 4,34) và C-6'''_{Glc} (δ_C 70,2) đã chứng minh sự có mặt của một đơn vị đường glucose tự do ở cuối chuỗi mạch tetrasaccharid và liên kết với đơn vị glucose (Glc''') bởi liên kết (1→6) *O*-glycosid. Cấu hình tuyệt đối của các gốc đường được xác định là *D*-glucose và *L*-rhamnose sau khi thủy phân, kết hợp so sánh TLC và góc quay cực riêng của đường chuẩn, tương tự như hợp chất **GL1**.

Hóa lập thể khung aglycon của **GL3** được xác định là tương tự hai hợp chất **GL1** và **GL2** trên cơ sở sự trùng lặp dữ liệu phổ 1D-NMR kết hợp với phân tích tương tác không gian trên phổ NOESY. Tín hiệu proton của H-3 có hằng số tương tác lớn (*J* = 11,5 Hz) chứng tỏ nhóm oxygen thế ở vị trí C-3 định hướng β. Điều này được khẳng định khi quan sát thấy tương tác NOESY giữa H-3 (δ_H 3,22) và H-5 (δ_H 0,77). Tương tác NOESY giữa H-3 và H-28 (δ_H 1,06) cho biết nhóm methyl C-28 có hướng α giống H-3, đồng nghĩa với nhóm methyl C-29 có hướng β. Tương tác giữa H-19 (δ_H 0,89) và H-18 (δ_H 1,15) cho thấy các proton này gần nhau trong không gian và cùng định hướng β như sinh tổng hợp của các hợp chất thứ cấp khung dammaran. Tương tự, các tương tác NOESY giữa H-22 (δ_H 4,34) và H-17 (δ_H 1,83), H-17 và H-30 cũng chứng minh cho định hướng α của các proton này. Do đó, cấu trúc **GL3** xác định được là 16β,22β:16α,18-diepoxy-24-methylidendammaran-3β,20-diol-3-*O*-β-*D*-glucopyranosyl-(1→6)-β-*D*-glucopyranosyl-(1→3)-[α-*L*-rhamnopyranosyl-(1→2)]-β-*D*-glucopyranosid. Tra cứu trên hệ thống SciFinder cho thấy, **GL3** là hợp chất mới và được đặt tên là gouaniasid IX.



Hình 3.15. Cấu trúc hóa học (A) và tương tác COSY (—), HMBC (---) (B) của GL3

3.2.5.4. Hợp chất GL4

Hợp chất **GL4** thu được dưới dạng bột màu trắng, nhiệt độ nóng chảy 243-247°C. Công thức phân tử của **GL4** được xác định là $C_{49}H_{82}O_{19}$ do sự xuất hiện của pic ion giả phân tử tại m/z 1009,5068 $[M+Cl]^-$ trên phổ khối phân giải cao (tính toán lý thuyết cho anion $[C_{49}H_{82}O_{19}Cl]^-$, 1009,5144), cùng với tín hiệu của 49 carbon quan sát được trên phổ ^{13}C -NMR. Phổ 1H -NMR (500 MHz, CD_3OD) và phổ ^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD): xem bảng 3.5.

Bảng 3.5. Dữ liệu phổ 1H và ^{13}C NMR của hợp chất GL4

Vị trí	GL4		$\delta_C^{\#}$	δ_C^*
	$\delta_H^{a,b}$ (độ bội, $J = \text{Hz}$)	$\delta_C^{a,c}$		
1	1,04 (m); 1,72 (m)	40,8	40,4	
2	1,70 (m); 1,98 (m)	27,4	27,2	
3	3,22 (dd, 12,0; 5,0)	90,0	90,7	
4	-	40,5	40,3	
5	0,80 (brd, 11,0)	57,9	57,5	
6	1,56 (m)	19,1	19,1	

7	1,56 (m)	37,1	37,0	
8	-	42,3	42,2	
9	1,36 (m)	52,4	52,3	
10	-	38,2	38,1	
11	1,35 (m); 1,54 (m)	22,2	22,4	
12	1,29 (m); 1,70 (m)	27,0	27,0	
13	1,98 (m)	36,9	36,8	
14	-	54,0	54,0	
15	3,96 (s)	77,6	77,6	
16	-	111,1	111,0	
17	1,92 (d, 11,5)	63,1	63,1	
18	1,17 (s)	16,6	16,6	
19	0,93 (s)	17,2	17,1	
20	-	79,2	79,1	
21	1,28 (s)	26,5	26,4	
22	4,05 (dd, 8,5; 3,5)	87,8	87,7	
23	2,30 (m)	34,1	34,0	
24	-	154,6	154,4	
25	2,33 (m)	34,9	34,8	
26	1,08 (d, 7,0)	22,2	22,2	
27	1,07 (d, 7,0)	22,2	22,2	
28	1,05 (s)	28,3	28,3	
29	0,88 (s)	17,0	16,8	
30	0,99 (s)	10,0	9,9	
31	4,82 (s); 4,86 (s)	108,6	108,6	
3'-Glc				
1'	4,48 (d, 8,0)	105,4		105,5
2'	3,60 (m)	78,0		77,9
3'	3,72 (m)	88,6		88,6
4'	3,50 (t, 9,5)	70,2		70,2
5'	3,30 (m)	77,4		77,4
6'	3,70 (dd, 12,0; 5,5); 3,87 (dd, 11,5; 2,5)	62,8		62,7
2'-Rha				
1''	5,47 (d, 1,5)	101,8		101,8
2''	3,99 (dd, 3,5; 2,0)	72,1		72,1
3''	3,75 (dd, 7,5; 3,5)	72,1		72,1
4''	3,41 (t, 9,0)	73,8		73,8
5''	4,03 (m)	70,1		70,1
6''	1,25 (d, 6,5)	18,0		18,0
3'-Glc				
1'''	4,55 (d, 7,5)	104,0		104,0
2'''	3,29 (m)	75,3		75,3
3'''	3,40 (t, 9,5)	78,3		78,3

4 ^{'''}	3,29 (m)	71,6		71,5
5 ^{'''}	3,39 (m)	78,2		78,1
6 ^{'''}	3,65 (dd, 11,5; 6,5); 3,92 (dd, 11,5; 2,0)	62,6		62,6

Ghi chú: [#] δ_C của aglycon của joazeirosid B đo trong CD₃OD [90], [#] δ_C của phần đường của **GL1** đo trong CD₃OD, ^ađo trong CD₃OD, ^b500 MHz, ^c125 MHz.

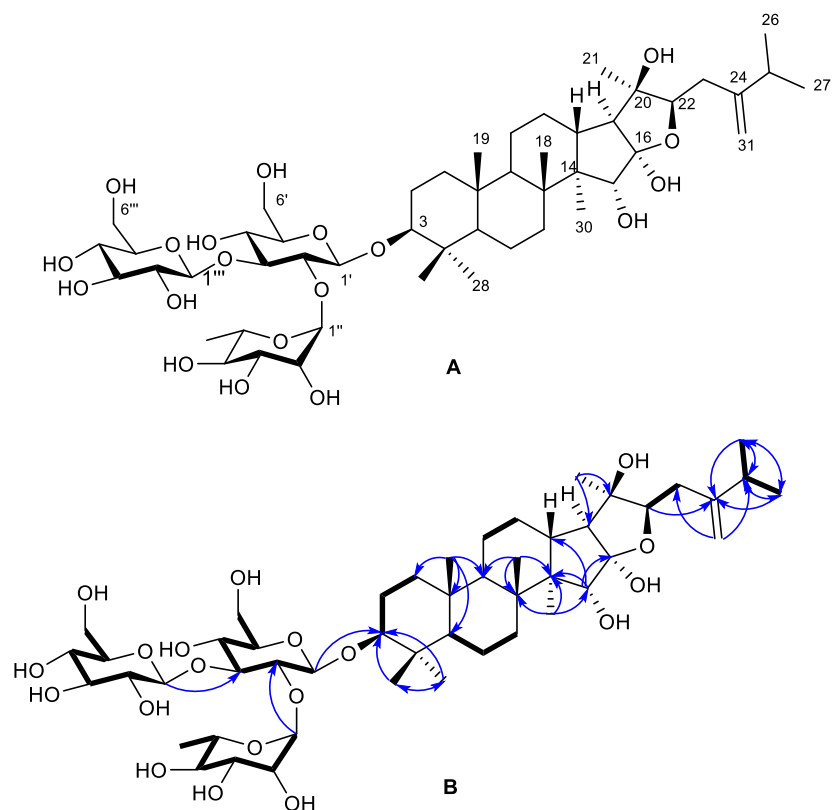
Phổ ¹H-NMR của **GL4** (bảng 3.5) xuất hiện tín hiệu proton của 8 nhóm methyl trong đó có 5 tín hiệu singlet tại δ_H 0,88, 0,93, 1,05, 1,17 và 1,28 và ba tín hiệu doublet tại δ_H 1,08 (3H, $J = 7,0$ Hz, H-26), 1,07 (3H, $J = 7,0$ Hz, H-27) và 1,25 (3H, $J = 7,0$ Hz, H-6^{''}); 3 tín hiệu proton của carbon liên kết với oxy tại δ_H 3,22 (dd, 12,0, 5,0 Hz, H-3), δ_H 3,96 (s, H-15) và 4,05 (dd, 8,5, 3,5 Hz, H-22); tín hiệu singlet tại δ_H 4,84 và 4,87 thuộc về hai proton exomethylen gợi ý **GL4** có một nhóm methylen. Ba tín hiệu proton anomeric tại δ_H 4,48 (d, 8,0 Hz), 4,55 (d, 7,5 Hz) và 5,47 (d, 1,5 Hz) cho biết hợp chất này có 3 đơn vị đường. Các tín hiệu proton của phần đường, hình dạng tín hiệu proton của 7 nhóm methyl thuộc phần aglycon và sự xuất hiện một số lượng lớn các tín hiệu proton ở vùng trường cao (δ_H 0,75 ~ 2,43) cho phép dự đoán đây là một hợp chất saponin có cấu trúc khung aglycon dạng dammaran.

Phổ ¹³C-NMR, DEPT và HSQC chỉ ra 49 tín hiệu carbon bao gồm: 7 carbon không liên kết với hydro (C), 24 nhóm methin (CH), 10 nhóm methylen (CH₂), và 8 nhóm methyl (CH₃). Trong đó, khung aglycon có chứa 31 carbon. 18 tín hiệu carbon còn lại cho thấy **GL4** có hợp phần đường gồm 3 đơn vị đường hexose, phù hợp với sự có mặt của 3 proton anome quan sát được trên phổ proton như phân tích ở trên. Vị trí các nhóm thế và qui kết các giá trị phổ ¹H- và ¹³C-NMR của hợp chất **GL4** được thực hiện bằng phân tích phổ cộng hưởng từ hạt nhân hai chiều HSQC, HMBC và COSY. Có thể nhận thấy, phổ 1D-NMR (bảng 3.5) của **GL4** cũng tương tự **GL1**, trừ một số tín hiệu khác biệt thuộc vòng D. Tín hiệu của nhóm oxymethylen tại δ_C 66,8 (C-30) ở **GL1** đã được thay thế bởi tín hiệu của một nhóm methyl tại δ_H 0,99 và δ_C 10,0, cho thấy có sự mở vòng tại vị trí C-16 và C-30 ở hợp chất **GL4**. Đồng thời, sự thay đổi độ dịch chuyển hóa học của C-15 từ δ_C 38,9 ở hợp chất **GL1** lên δ_C 77,6 ở **GL4** cho biết đã xuất hiện thêm một nhóm thế hydroxyl tại đây. Điều này cũng phù hợp với tín hiệu proton của nhóm oxymethin quan sát thêm được tại δ_H 3,96 (s) trên phổ ¹H-NMR. Số liệu phổ thuộc phần aglycon của **GL4** trùng khớp với dữ liệu phổ phần aglycon của hợp chất

joazeirosid B [90] giúp đi đến khẳng định aglycon của **GL4** là joazeirogenin. Điều đó cũng chứng tỏ hóa lập thể khung aglycon của **GL4** tương tự joazeirogenin.

Số liệu phổ của các đơn vị đường trong hợp chất **GL4** được qui kết bằng phân tích phổ hai chiều COSY, HSQC và HMBC cho thấy chuỗi đường của **GL4** hoàn toàn tương tự chuỗi đường của **GL1**. Ba đơn vị đường xác định được gồm hai gốc đường β -glucose (Glc' và Glc'') và 1 gốc đường α -rhamnose (Rha'''). Tương tác HMBC giữa H-1' (δ_H 4,48) với aglycon C-3 (δ_C 90,0) khẳng định liên kết *O*-glycosid của đường Glc' với aglycon tại C-3. Tương tác HMBC giữa H-1'' (δ_H 5,47) và C-2' (δ_C 78,0) cho biết đơn vị đường Rha''' liên kết với đơn vị đường Glc' qua liên kết (1 \rightarrow 2) *O*-glycosid và tương tác HMBC giữa H-1''' (δ_H 4,55) với C-3' (δ_C 88,6) cho thấy đơn vị đường Glc''' tự do ở cuối chuỗi mạch trisaccharid liên kết với đơn vị đường Glc' bởi liên kết (1 \rightarrow 3) *O*-glycosid. Cấu hình tuyệt đối của các gốc đường được xác định D-glucose và L-rhamnose sau khi thủy phân, kết hợp so sánh TLC và góc quay cực riêng của đường chuẩn, tương tự như hợp chất **GL1**.

Từ các phân tích trên, hợp chất **GL4** được xác định là 16,22-epoxy-24-methylidendammaran-3 β ,15 α ,16 α ,20 β -tetrol-3-*O*- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)]- β -D-glucopyranosid. Tra cứu trên hệ thống SciFinder cho thấy **GL4** là hợp chất mới, được đề nghị đặt tên là joazeirosid C.



Hình 3.16. Cấu trúc hóa học (A) và tương tác COSY (---), HMBC (→) (B) của GL4

3.2.5.5. Hợp chất GL5

Hợp chất GL5 thu được dưới dạng bột màu trắng. Công thức phân tử của **GL5** được xác định là $C_{54}H_{86}O_{25}$ thông qua tín hiệu trên phổ khối phân giải cao tại m/z 1133,5393 $[M-H]^-$ (tính toán lý thuyết cho anion $[C_{54}H_{85}O_{25}]^-$, 1133,5385) cùng với tín hiệu của 54 carbon trên phổ ^{13}C -NMR. Phổ 1H -NMR (500 MHz, CD_3OD) và phổ ^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD): xem bảng 3.6.

Bảng 3.6. Dữ liệu phổ 1H và ^{13}C NMR của hợp chất GL5

Vị trí	GL5		$\delta_C^\#$	$\delta_C^\$$
	$\delta_H^{a,b}$ (độ bội, $J = \text{Hz}$)	$\delta_C^{a,c}$		
1	2,37 (d, 7,5)	62,6	62,7	
2	-	177,0	178,8	
3	4,10 (d, 7,0)	83,6	83,1	
4	-	43,7	42,9	
5	0,90 (s)	63,6	63,1	
6	1,37 (m), 1,61 (m)	19,0	18,4	

7	1,35 (m), 1,45 (m)	35,7	34,8	
8	-	43,0	42,0	
9	1,52 (m)	51,9	51,1	
10	-	49,5	49,8	
11	1,11 (m), 1,68 (m)	26,4	25,9	
12	1,41 (m), 1,52 *	24,9	24,6	
13	2,28 (m)	39,1	38,5	
14	-	43,8	43,1	
15	1,10 (m), 1,60 (m)	32,1	31,2	
16	1,40 (m), 2,58 (m)	32,5	33,0	
17	-	57,9	56,5	
18	1,62 (t, 11,0)	50,7	49,8	
19	3,01 (m)	48,4	48,1	
20	-	151,8	151,1	
21	1,39 (m); 1,90 (m)	31,4	30,5	
22	1,50 (m); 2,01 (m)	37,5	37,6	
23	1,04 (s)	32,2	32,1	
24	0,92 (s)	19,7	19,9	
25	1,19 (s)	14,5	14,6	
26	0,99 (s)	17,6	16,9	
27	1,02 (s)	15,2	15,0	
28	-	176,1	175,7	
29	1,71 (s)	19,5	19,5	
30	4,62 (d, 1,5); 4,74 (s)	110,3	110,0	
28-O-Glc				
1'	5,62 (d, 8,0)	93,4		95,7
2'	3,87 (m)	77,8		74,1
3'	3,42 (m)	78,8		78,8
4'	3,45 (m)	70,8		71,1
5'	3,80 (m)	78,3		79,3
6'	3,72 (m), 3,84 (m)	62,3		62,5
2'-Glc				
1''	5,05 (d, 7,5)	102,6		104,9
2''	3,64 (m)	82,6		79,2
3''	3,69 (m)	87,6		88,6
4''	3,29 (m)	71,1		69,9
5''	3,40 (m)	78,2		77,8

6''	3,60 (m), 3,93 (m)	63,5		63,3
2''-Glc				
1'''	4,74 (d, 8,0)	104,8		103,8
2'''	3,24 (m)	75,9		76,4
3'''	3,39 (m)	78,4		78,7
4'''	3,34 (m)	71,4		71,5
5'''	3,40 (m)	77,5		77,7
6'''	3,65 (m), 3,90 (m)	62,6		62,1
3''-Glc'				
1''''	4,59 (d, 7,5)	104,8		104,6
2''''	3,33 (m)	75,4		75,4
3''''	3,39 (m)*	78,4		78,6
4''''	3,35 (m)	71,6		72,5
5''''	3,30 (m)	77,5		78,6
6''''	3,76 (m), 3,99 (m)	62,6		62,2

Ghi chú: [#] δ_C của aglycon của acid epiceanothic đo trong C₅H₅N [91], ^{\$} δ_C của phần đường của aralia-saponin V đo trong C₅H₅N [92]; ^a đo trong CD₃OD, ^b 500 MHz, ^c 125 MHz, * tín hiệu bị chồng lấp.

Phổ proton ¹H-NMR của **GL5** xuất hiện tín hiệu của 6 nhóm methyl tại δ_H 0,92 (3H, s, H-24), 0,99 (3H, s, H-26), 1,02 (3H, s, H-27), 1,04 (3H, s, H-23), 1,19 (3H, s, H-25) và 1,71 (3H, s, H-29); 1 tín hiệu proton của carbon liên kết với oxy tại δ_H 3,19 (dd, 11,0, 5,0 Hz, H-3). Bốn tín hiệu proton anomeric tại δ_H 4,59 (d, $J = 7,5$ Hz, H-1'''), 4,74 (d, 8,0 d, $J = 8,0$ Hz, H-1'''), 5,05 (d, $J = 7,5$ Hz, H-1'') và 5,62 (d, $J = 8,0$ Hz, H-1') cho biết sự có mặt của 4 phân tử đường trong công thức phân tử.

Phổ ¹³C-NMR, DEPT và HSQC chỉ ra 54 tín hiệu carbon bao gồm: 2 nhóm carboxyl và 6 carbon khác không liên kết với hydro (C), 27 nhóm methin (CH), 13 nhóm methylen (CH₂), và 6 nhóm methyl (CH₃). Trong đó, khung aglycon có chứa 30 carbon, tín hiệu của 24 carbon còn lại cho thấy **GL5** có hợp phần đường gồm 4 đơn vị đường hexose. Điều này cũng phù hợp với sự có mặt của 4 proton anomer quan sát được trên phổ proton như phân tích ở trên. Các đặc điểm phổ trên gợi ý **GL5** là một saponin có khung aglycon dạng ceanothan. Vị trí các nhóm thế và qui kết các giá trị phổ ¹H- và ¹³C-NMR của hợp chất **GL5** được thực hiện bằng phân tích phổ cộng hưởng từ hạt nhân hai chiều HSQC, HMBC và COSY. Hai nhóm carboxyl được xác nhận gắn tại vị trí C-

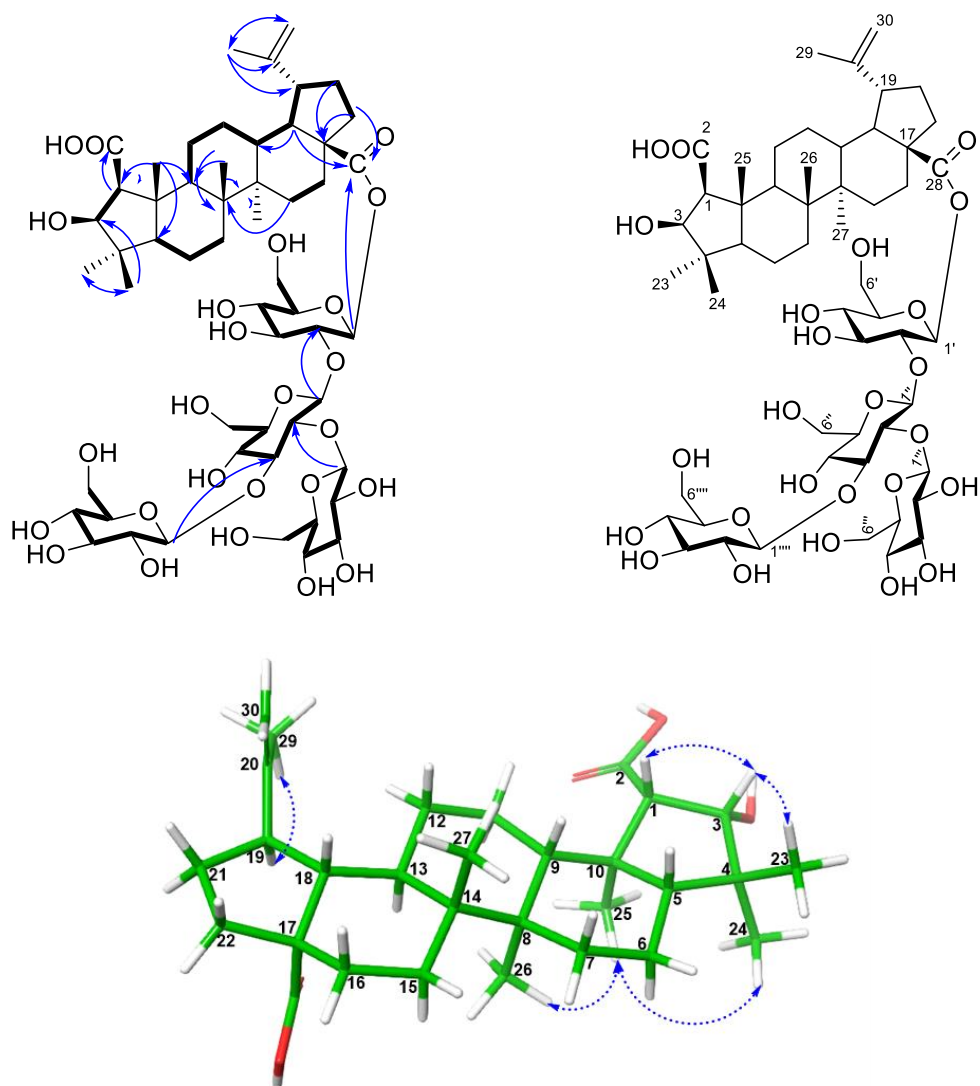
1 và C-17 do quan sát thấy các tín hiệu carbon tại δ_C 177,0 và 176,1 trên phổ ^{13}C -NMR cùng với tương tác HMBC giữa H-1 (δ_H 2,37) với C-2 (δ_C 177,0), giữa H-18 (δ_H 1,62) với C-28 (δ_C 176,1) và giữa H-22 (δ_H 2,01) với C-28 (δ_C 176,1). Số liệu phổ thuộc phần aglycon của **GL5** trùng khớp với dữ liệu phổ của acid epiceanothic giúp đi đến khẳng định aglycon của **GL5** là acid epiceanothic [91].

Hóa lập thể của aglycon của **GL5** được xác định là tương tự acid epiceanothic [91] trên cơ sở sự tương đồng dữ liệu phổ ^1H - và ^{13}C -NMR của chúng và các tương tác không gian quan sát được trên phổ NOESY (hình 3.15B). Tương tác NOESY giữa H-3 (δ_H 4,10) với H-23 (δ_H 1,04) và giữa H-3 với H-1 (δ_H 2,37) cho biết các proton này gần nhau trong không gian và cùng định hướng α , điều đó có nghĩa nhóm carboxyl thế ở vị trí C-1 có hướng β . Tương tự, tương tác NOESY giữa H-24 (δ_H 0,92) và H-25 (δ_H 1,19) và giữa H-25 với H-26 (δ_H 0,99) xác nhận các nhóm methyl này cùng hướng β .

Số liệu phổ của các đơn vị đường trong hợp chất **GL5** được qui kết bằng phân tích phổ hai chiều COSY, HSQC và HMBC. Chuỗi tương tác quan sát được trên phổ COSY gồm H-1'/H-2'/H-3'/H-4'/H-5' cùng với các tương tác trực tiếp trên phổ HSQC của các proton này cho phép qui kết các giá trị phổ của đơn vị đường glucose (Glc'), đồng thời tương tác HMBC giữa H-1' (δ_H 5,62) với aglycon C-28 (δ_C 176,1) khẳng định liên kết của đường này với aglycon tại C-28. Tương tác HMBC giữa H-1'' (δ_H 5,05) và C-2' (δ_C 77,8), cùng với chuỗi các tương tác COSY H-1''/H-2''/H-3''/H-4''/H-5''/H-6'' cho phép qui kết các giá trị phổ của đơn vị đường glucose tiếp theo (Glc'') và liên kết (1 \rightarrow 2) giữa đơn vị đường này với đơn vị đường glucose (Glc'). Các số liệu phổ carbon còn lại của hợp phần đường thuộc về hai đơn vị đường glucose tự do và tương tác HMBC giữa H-1''' (δ_H 4,74) với C-2'' (δ_C 82,6) và giữa H-1'''' (δ_H 4,59) với C-3'' (δ_C 87,6) cho thấy chúng lần lượt gắn với đơn vị glucose (Glc'') bởi liên kết (1 \rightarrow 2) *O*-glycosid và (1 \rightarrow 3) *O*-glycosid. Số liệu phổ của chuỗi đường được so sánh với số liệu phổ các đơn vị đường ở vị trí tương ứng của hợp chất aralia-saponin V [92] và cho thấy sự phù hợp. Hằng số ghép của các proton anomer lớn ($J = 7,5$ Hz và $J = 8,0$ Hz) cho biết cấu hình tương đối của các gốc đường là β . Cấu hình tuyệt đối của đường được xác định là D-glucose sau khi thủy phân **GL5** và sử dụng phương pháp TLC kết hợp so sánh

với góc quay cực riêng của đường chuẩn: D-glucose [R_f 0,31, hệ dung môi CH_2Cl_2 / $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$, 2/1/0,2, v/v/v), $[\alpha]_D^{20} = +45,8$ (c 0,05, H_2O)].

Với những phân tích đặc điểm phổ trên, hợp chất **GL5** được xác định là acid epiceanothic 28- O -[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)]- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)]- β -D-glucopyranosyl. Tra cứu trên hệ thống SciFinder cho thấy **GL5** là hợp chất mới lần đầu được biết đến và được đặt tên là gouanosid A.



Hình 3.17. Cấu trúc hóa học và tương tác COSY (—), HMBC (---) và NOESY (····) của **GL5**

3.2.5.6. Hợp chất GL6

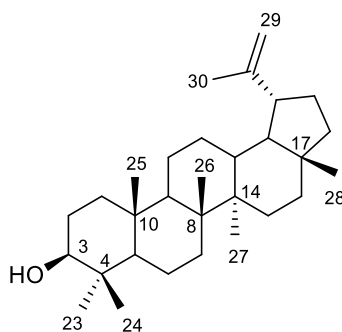
Hợp chất **GL6** thu được dưới dạng bột màu trắng. Công thức phân tử của **GL6** được xác định là $C_{30}H_{50}O$ dựa trên pic ion giả phân tử tại m/z 409,4 $[M-H_2O+H]^+$ trên phổ khối ESI-MS. Phổ 1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$) và phổ ^{13}C -NMR (125 MHz, $CDCl_3$): xem bảng 3.7.

Bảng 3.7. Dữ liệu phổ 1H và ^{13}C NMR của hợp chất GL6

Vị trí	GL6		$\delta_C^{\#}$
	$\delta_H^{a,b}$ (độ bội, $J = \text{Hz}$)	$\delta_C^{a,c}$	
1		38,7	38,7
2		27,4	27,4
3	3,19 (dd, 11,0; 5,0)	79,0	79,2
4		38,9	38,9
5		55,3	55,3
6		18,3	18,3
7		34,3	34,3
8		40,9	40,8
9		50,5	50,4
10		37,2	37,2
11		21,0	20,9
12		25,2	25,2
13		38,1	38,1
14		42,9	42,9
15		27,5	27,5
16		35,6	35,6
17		43,0	42,8
18		48,3	48,3
19	2,37 (m), 1,92 (m)	48,0	48,0
20		151,0	151,0
21		29,9	29,9
22		40,0	40,0
23	0,97 (s)	28,0	28,0
24	0,76 (s)	15,4	15,4
25	0,83 (s)	16,1	16,1
26	1,03 (s)	16,0	16,0
27	0,94 (s)	14,4	14,6
28	0,79 (s)	18,0	18,0
29	4,69 (s), 4,57 (s)	109,3	109,3
30	1,68 (s)	19,3	19,3

Ghi chú: [#] δ_C của lupeol đo trong $CDCl_3$ [93]; ^a đo trong $CDCl_3$, ^b 500 MHz, ^c 125 MHz.

Phổ ¹H-NMR của **GL6** cho thấy các tín hiệu đặc trưng của một triterpenoid khung lupan với 7 nhóm methyl tại δ_H 0,76 (3H, s, H-24), 0,79 (3H, s, H-28), 0,83 (3H, s, H-25), 0,94 (3H, s, H-27), 0,97 (3H, s, H-23), 1,03 (3H, s, H-26), 1,68 (3H, s, H-30); hai proton olefinic tại δ_H 4,69 (1H, s, H-29b), 4,57 (1H, s, H-29a) và một nhóm hydroxymethin tại δ_H 3,19 (1H, dd, $J = 11,0; 5,0$ Hz, H-3). Phổ ¹³C-NMR và phổ DEPT xuất hiện tín hiệu của 30 carbon bao gồm 6 carbon không liên kết với hydro, 6 nhóm methin (CH), 11 nhóm methylen (CH₂) và 7 nhóm methyl (CH₃). Tín hiệu của nhóm hydroxymethin quan sát được tại δ_C 79,0 (C-3). Tín hiệu tại δ_C 109,3 (C-29) và 151,0 (C-20) cho thấy sự hiện diện của một nối đôi. Cấu hình β -OH tại C-3 được xác định dựa trên hằng số tương tác lớn của H-3 ($J = 11,0$ Hz). Trên cơ sở dữ liệu phổ thu được và so sánh với tài liệu tham khảo, hợp chất **GL6** được xác định là lupeol [93]. Đây là lần đầu tiên hợp chất này được phân lập từ loài *G. leptostachya*



Hình 3.18. Cấu trúc hóa học của hợp chất GL6

3.2.5.7. Hợp chất GL7

Hợp chất **GL7** thu được dưới dạng bột màu trắng. Phổ khối ESI-MS cho pic ion giả phân tử tại m/z 471 $[M-H]^-$, phù hợp công thức phân tử $C_{30}H_{48}O_4$. Phổ ¹H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$) và phổ ¹³C-NMR (125 MHz, $CDCl_3$): xem bảng 3.8.

Bảng 3.8. Dữ liệu phổ ¹H và ¹³C NMR của hợp chất GL7

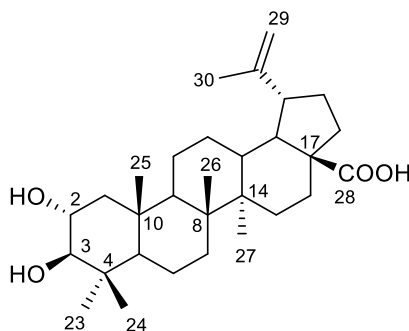
Vị trí	GL7		$\delta_C^{\#}$
	$\delta_H^{a,b}$ (độ bội, $J =$ Hz)	$\delta_C^{a,c}$	
1		48,4	48,6
2	3,63 (td, 8,0; 4,0)	69,7	69,9
3	2,91 (d, 8,0)	84,4	84,5
4	-	39,5	39,6

5		56,8	56,9
6		19,4	19,6
7		35,5	35,6
8	-	42,0	42,1
9		51,9	52,1
10	-	40,5	39,8
11		22,2	22,3
12		26,8	27,0
13	3,05 (td, 9,0; 4,0)	39,6	39,6
14	-	43,6	43,8
15		30,8	31,9
16		33,3	33,5
17	-	57,5	57,6
18		50,4	50,7
19	2,31 (td, 10,5; 3,0)	48,5	48,5
20	-	152,0	152,1
21		31,7	30,9
22		38,1	38,2
23	1,01 (s)	29,1	29,2
24	0,80 (s)	17,9	17,3
25	0,99 (s)	17,2	18,0
26	0,94 (s)	16,6	16,7
27	1,03 (s)	15,1	15,2
28	-	180,0	180,2
29	4,73 (s), 4,62 (s)	110,2	110,3
30	1,72 (s)	19,5	19,6

Ghi chú: [#] δ_C của acid aliphatic đo trong DMSO-d₆ [94]; ^a đo trong CDCl₃, ^b 500 MHz, ^c 125 MHz.

Phổ ¹H-NMR của **GL7** cho thấy các tín hiệu đặc trưng của một triterpenoid khung lupan với 6 nhóm methyl tại δ_H 0,80 (3H, s, H-24), 0,94 (3H, s, H-26), 0,99 (3H, s, H-25), 1,01 (3H, s, H-23), 1,03 (3H, s, H-27), 1,72 (3H, s, H-30); hai proton olefinic tại δ_H 4,73 (1H, s, H-29b), 4,62 (1H, s, H-29a); hai nhóm hydroxymethin tại δ_H 2,91 (1H, d, $J = 8,0$ Hz, H-3) và δ_H 3,63 (1H, td, $J = 8,0, 4,0$ Hz, H-2). Phổ ¹³C-NMR và phổ DEPT của **GL7** xuất hiện tín hiệu của 30 carbon bao gồm 7 carbon không liên kết với hydro, 7 nhóm methin (CH), 10 nhóm methylen (CH₂) và 6 nhóm methyl (CH₃). Số liệu phổ NMR của **GL7** khá tương đồng với dữ liệu phổ của **GL6** (bảng 3.8) ngoại trừ sự khác biệt một số nhóm thế. Phổ ¹³C-NMR cho thấy nhóm methyl tại C-28 ở **GL6** đã

được thay bằng nhóm carboxylic ở **GL7** do xuất hiện tín hiệu carbon tại δ_C 180,0. Ngoài ra, độ dịch chuyển hóa học của C-2 (δ_C 69,7) cùng với tín hiệu proton H-2 (δ_H 3,63) cho thấy có thêm nhóm thế oxygen tại đây. Trên cơ sở phân tích phổ trên và sự trùng khớp số liệu phổ của **GL7** với dữ liệu phổ đã công bố của acid alphitolic [94], hợp chất **GL7** được xác định là acid alphitolic. Đây là lần đầu tiên hợp chất này được công bố có mặt ở loài *G. leptostachya*.



Hình 3.19. Cấu trúc hóa học của hợp chất GL7

3.2.5.8. Hợp chất GL8

Hợp chất **GL8** thu được dưới dạng bột màu trắng. Công thức phân tử của **GL8** được xác định là $C_{29}H_{42}O_4$ dựa trên pic ion giả phân tử tại m/z 453,4 $[M-H]^-$ trên phổ khối ESI-MS cùng với 29 tín hiệu carbon quan sát được trên phổ ^{13}C -NMR. Phổ 1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$ & CD_3OD) và phổ ^{13}C -NMR (125 MHz, $CDCl_3$ & CD_3OD): xem bảng 3.9.

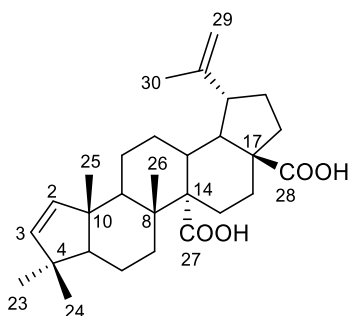
Bảng 3.9. Dữ liệu phổ 1H và ^{13}C NMR của hợp chất GL8

Vị trí	GL8		$\delta_C^{\#}$
	$\delta_H^{a,b}$ (độ bội, $J = \text{Hz}$)	$\delta_C^{a,c}$	
2	5,92 (d, 5,0)	140,9	141,2
3	5,40 (d, 5,0)	139,1	139,2
4	-	44,8	44,8
5		62,7	63,1
6		17,7	17,9
7		37,7	38,2
8	-	41,5	41,8
9		48,2	48,6
10	-	50,8	51,0
11		23,2	23,6
12		26,0	26,5

13		39,8	40,2
14	-	60,2	60,4
15		28,3	28,9
16		34,6	35,4
17	-	56,4	56,6
18		51,8	52,2
19		47,4	47,0
20	-	150,8	151,3
21		30,7	31,1
22		37,4	37,7
23	0,90 (s)	29,6	29,6
24	0,97 (s)	21,5	21,6
25	0,97 (s)	20,3	20,4
26	1,05 (s)	18,2	18,6
27	-	179,0	178,6
28	-	180,0	179,3
29	4,74 (s), 4,61 (s)	109,9	110,3
30	1,70 s	19,0	19,3

Ghi chú: [#] δ_C của acid ceanothenic đo trong C_5D_5N [95]; ^a đo trong $CDCl_3$ & CD_3OD , ^b 500 MHz, ^c 125 MHz.

Phổ 1H -NMR của **GL8** xuất hiện tín hiệu của 5 nhóm methyl tại δ_H 0,90 (3H, s, H-23), 0,97 (6H, s, H-24, H-25), 1,05 (3H, s, H-26) và 1,70 (3H, s, H-30), bốn proton olefin tại δ_H 4,61 (1H, s, H-29a), 4,74 (1H, s, H-29b), 5,40 (1H, d, $J = 5,0$ Hz, H-3) và 5,92 (1H, d, $J = 5,0$ Hz, H-2). Phổ ^{13}C -NMR và phổ DEPT cho thấy **GL8** là một nortriterpen với 29 tín hiệu carbon, trong đó có 2 nhóm carboxyl và 6 carbon khác không liên kết với hydro, 7 nhóm methin (CH), 9 nhóm methylen (CH_2) và 5 nhóm methyl (CH_3). Ngoài tín hiệu nối đôi tại δ_C 109,9 (C-29) và 150,8 (C-20), **GL8** còn có một nối đôi nữa do xuất hiện tín hiệu của hai carbon olefin tại δ_C 140,9 (C-2) và 139,1 (C-3). Bên cạnh đó, **GL8** còn có 2 nhóm carboxyl quan sát được tại δ_C 180,0 (C-28) và 179,0 (C-27). Số liệu phổ NMR thu được của hợp chất **GL8** trùng khớp với dữ liệu phổ của hợp chất acid ceanothenic [95]. Do vậy, **GL8** được xác định là acid ceanothenic. Đây lần đầu tiên hợp chất này được phân lập từ loài *G. leptostachya*.



Hình 3.20. Cấu trúc hóa học của hợp chất GL8

3.2.5.9. Hợp chất GL9

Hợp chất **GL9** thu được dưới dạng bột màu trắng. Phổ $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz) và $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz): xem bảng 3.10.

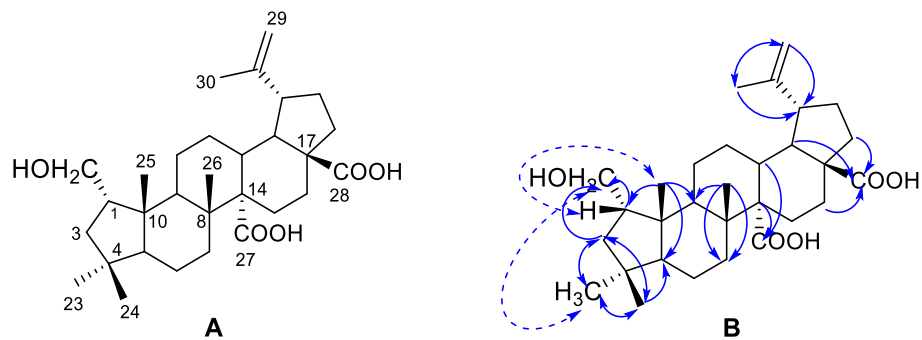
Bảng 3.10. Dữ liệu phổ ^1H và ^{13}C NMR của hợp chất GL9

Vị trí	GL9		Acid epigouanic	
	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,c}}$ (độ bội, $J = \text{Hz}$)	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}}$	$\delta_{\text{C}}^{\#}$	δ_{C}^*
1	1,95 (m)	47,3	44,9	52,6
2	4,05 (dd, 9,0; 5,5), 3,79 (dd, 9,5; 6,0)	65,7	63,4	63,0
3	1,85 (m), 1,35 (m)	42,5	42,5	42,5
4	-	37,4	38,8	38,8
5	1,18 (m)	56,7	58,9	58,8
6		18,5	19,2	20,0
7	2,0 (m), 1,4 (m)	37,0	35,5	38,3
8	-	41,1	41,8	41,5
9	1,72 (m)	43,9	52,6	45,0
10	-	48,0	48,7	48,5
11		23,2	24,2	25,9
12		25,6	27,2	27,3
13	2,36 (m)	39,8	41,3	41,0
14	-	60,0	61,1	61,2
15	1,4 (overlap)	28,1	29,2	24,0
16	2,4 (m), 1,4 (m)	34,0	38,2	35,0
17		56,0	57,3	51,0
18	1,64 (t, 9,5)	51,8	53,0	53,5
19	3,08 (m)	46,9	48,7	48,0
20	-	149,9	151,5	151,0
21		30,4	31,6	29,5
22	1,62 (m), 1,42 (m)	37,1	38,6	31,8
23	0,95 (s)	33,5	34,2	34,3
24	0,86 (s)	26,4	27,1	27,0

25	0,90 (s)	19,5	19,7	20,8
26	1,02 (s)	17,8	18,3	19,0
27	-	178,0	179,3	178,4
28	-	180,0	180,1	178,0
29	4,74 (s), 4,61 (s)	110,4	110,6	110,0
30	1,68 (s)	19,0	20,4	19,5

Ghi chú: [#] δ_C của acid epigouanic đo trong CD₃OD [94]; * δ_C của acid epigouanic đo trong CD₃OD [96]; ^a đo trong CDCl₃, ^b 125 MHz, ^c 500 MHz.

Phổ ¹H-NMR của **GL9** xuất hiện tín hiệu của 5 nhóm methyl tại δ_H 0,86 (3H, s, H-24), 0,90 (3H, s, H-25), 0,95 (3H, s, H-23), 1,02 (3H, s, H-26) và 1,68 (3H, s, H-30), hai proton olefin tại δ_H 4,61 (1H, s, H-29a), 4,74 (1H, s, H-29b) và một nhóm hydroxymethylen tại δ_H 4,05 (1H, dd, $J = 9,0; 5,5$ Hz, H-2b), 3,79 (1H, dd, $J = 9,5; 6,0$ Hz, H-2a). Phổ ¹³C-NMR và phổ DEPT cho biết **GL9** là một nortriterpen với 29 tín hiệu carbon, trong đó có 2 nhóm carboxyl và 5 carbon khác không liên kết với hydro, 6 nhóm methin (CH), 11 nhóm methylen (CH₂) và 5 nhóm methyl (CH₃). Dữ liệu phổ ¹H- và ¹³C-NMR của hợp chất **GL9** tương đồng với dữ liệu phổ của hợp chất **GL8**, ngoại trừ một số tín hiệu khác biệt thuộc vòng A. Khác với **GL8**, không quan sát thấy tín hiệu của nối đôi C=C tại vị trí C-1/C-3 ở **GL9**, thay vào đó là tín hiệu của một nhóm methin và một nhóm methylen. Điều đó được khẳng định qua các tương tác trên phổ HMBC giữa H-1 (δ_H 1,95) và H-3 (δ_H 1,85) với C-4 (δ_C 37,4), tương tác giữa H-23 (δ_H 0,95) và H-24 (δ_H 0,86) với C-3 (δ_C 42,5) và tương tác giữa H-25 (δ_H 0,90) với C-1 (δ_C 47,3). Đồng thời tại vị trí C-1 cũng quan sát thấy tín hiệu của nhóm thế hydroxymethylen thông qua tương tác HMBC giữa H-2 (δ_H 4,05; 3,79) và H-3 với C-1 (δ_C 47,3). Nhóm thế này được xác định là có hướng α thông qua tương tác giữa H-1 (δ_H 1,95) với H-25 (δ_H 0,90) và H-23 (δ_H 0,95) với H-2 (δ_H 4,05; 3,79) trên phổ NOESY. So sánh dữ liệu phổ của hợp chất **GL9** với dữ liệu phổ đã công bố của hợp chất acid epigouanic [94] đi đến kết luận, hợp chất **GL9** là acid epigouanic.



Hình 3.21. Cấu trúc hóa học (A) và tương tác HMBC (→), NOESY (↔) (B) của GL9

3.2.5.10. Hợp chất GL10

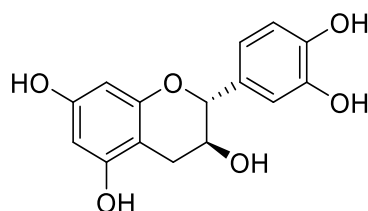
Hợp chất **GL10** thu được dưới dạng bột màu vàng, phổ $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD ; 500MHz), phổ $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD ; 125 MHz): xem bảng 3.11.

Bảng 3.11. Số liệu phổ ^1H và $^{13}\text{C-NMR}$ của hợp chất GL10

Vị trí	Hợp chất GL10		$\delta_{\text{C}}^{\#}$
	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,b}}$ (độ bội, $J = \text{Hz}$)	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,c}}$	
2	4,59 (d; 7,5)	82,9	82,6
3	4,00 (ddd; 8,0; 7,5; 5,5)	68,8	68,6
4	2,87 (dd; 16; 5,5); 2,53 (dd; 16,0; 8,0)	28,5	28,3
5	-	157,6	157,3
6	5,88 (d; 2,0)	96,3	96,2
7	-	156,9	156,7
8	5,95 (d; 2,0)	95,5	95,4
9	-	157,8	157,5
10	-	100,9	100,9
1'	-	132,2	131,9
2'	6,86 (d; 2,0)	115,3	115,1
3'	-	146,2	146,0
4'	-	146,2	146,0
5'	6,78 (d; 8,0)	116,1	116,0
6'	6,74 (dd; 8,0; 2,0)	120,0	119,9

Ghi chú: [#] δ_C của catechin đo trong CD₃OD [97]; ^a đo trong CD₃OD, ^b 500 MHz, ^c 125 MHz.

Phổ ¹H-NMR của **GL10** cho tín hiệu của 1 nhóm CH₂ ở δ_H 2,53 (H-4 β); 2,87 (H-4 α); 2 nhóm methin gắn với oxy ở δ_H 4,59 (1H; d; $J = 7,5$ Hz; H-2); 4,00 (1H; ddd; $J = 8,0; 7,5; 5,5$ Hz; H-3); 3 proton vòng thơm tương tác kiểu ABX ở δ_H 6,74 (1H; dd; 8,0; 2,0; H-6'); 6,78 (1H; d; $J = 8,0$ Hz; H-5'); 6,86 (1H; d; $J = 2,0$ Hz; H-2') và 2 proton ở vị trí *meta* trong vòng benzen ở δ_H 5,88 (1H; d; 2,0; H-6) và 5,95 (1H; d; 2,0; H-8). Dựa vào các dữ liệu phổ trên cho phép dự đoán chất **GL10** là 1 flavan có vòng A và B bị thế ở 2 vị trí. Hằng số tương tác $J = 7,5$ Hz của H-2 và H-3 cho biết chúng ở vị trí *trans*-diaxial. Sự có mặt của 15 nguyên tử carbon trên phổ ¹³C-NMR tương ứng với 1 nhóm methylen, 2 nhóm methin có gắn với oxy, 5 nhóm methin của vòng thơm và 7 cacbon bậc 4 là hoàn toàn phù hợp với dự đoán trên. Sau khi so sánh các số liệu phổ của **GL10** với tài liệu tham khảo [97] đi đến kết luận chất **GL10** là catechin có công thức phân tử C₁₅H₁₄O₆. Hợp chất này có mặt trong nhiều cây, tuy nhiên đây là lần đầu tiên công bố trong cây Dây đòn gánh.



Hình 3.22. Cấu trúc hóa học của hợp chất **GL10**

3.2.5.11. Hợp chất **GL11**

Hợp chất **GL11** thu được dưới dạng bột màu vàng. Phổ ESI-MS có pic ion m/z 463 [M-H]⁻ kết hợp với phổ ¹H-NMR và ¹³C-NMR cho biết công thức phân tử của **GL11** là C₂₁H₂₀O₁₂ (M=464). Phổ ¹H-NMR (CD₃OD, 500 MHz) và ¹³C-NMR (CD₃OD, 125 MHz): xem bảng 3.12.

Bảng 3.12. Số liệu phổ ¹H và ¹³C-NMR của hợp chất **GL11**

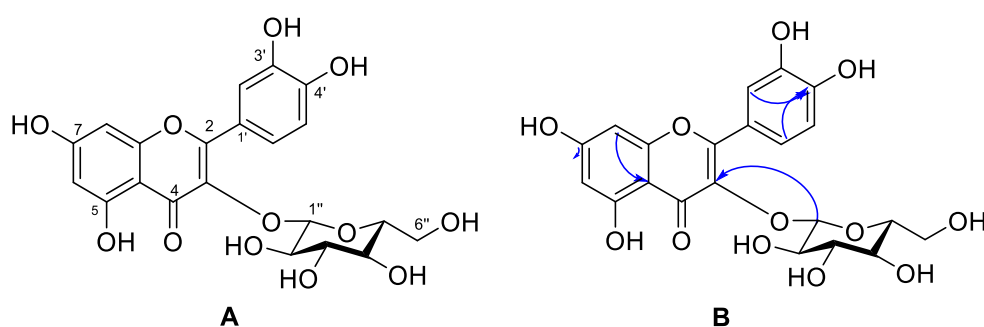
Vị trí	GL11		$\delta_C^{\#}$
	$\delta_H^{a,b}$ (độ bội, $J = \text{Hz}$)	$\delta_C^{a,c}$	
2	-	159,0	159,2
3	-	135,6	135,8

4	-	179,5	179,6
5	-	163,0	163,2
6	6,22 (d, 2,0)	99,9	100,1
7	-	166,1	166,3
8	6,40 (d, 2,0)	94,7	94,9
9	-	158,5	158,6
10	-	105,7	105,8
1'	-	123,2	123,2
2'	7,73 (d, 2,0)	117,6	117,7
3'	-	145,9	146,1
4'	-	149,8	150,0
5'	6,89 (d, 8,5)	116,0	116,1
6'	7,61 (dd, 2,0; 8,5)	123,1	123,3
1''	5,26 (d, 7,5)	104,3	104,4
2''	3,51 (t, 9,0)	75,7	75,9
3''	3,46 (t, 9,0)	78,1	78,3
4''	3,37(t, 9,5)	71,2	71,4
5''	3,25 (m)	78,4	78,5
6''	3,73 (dd, 2,0; 12,0); 3,61 (dd, 5,5; 12,0)	62,6	62,7

Ghi chú: [#] δ_C của isoquercitrin đo trong CD₃OD [98]; ^a đo trong CD₃OD, ^b 500 MHz, ^c 125 MHz.

Phổ ¹H-NMR của **GL11** xuất hiện tín hiệu của 05 proton thơm bao gồm hai proton ghép cặp *meta* ở δ_H 6,22 (d, $J = 2,0$ Hz), 6,40 (d, $J = 2,5$ Hz), 03 proton ghép cặp dưới dạng ABX ở δ_H 7,73 (d, $J = 2,0$ Hz), 6,89 (d, $J = 8,5$ Hz), 7,61 (dd, $J = 2,0$; 8,5 Hz). Ngoài các tín hiệu proton kể trên, phổ ¹H-NMR của **GL11** còn xuất hiện tín hiệu của phần đường bao gồm: một pic doublet của proton anomeric ở δ_H 5,26 (d, $J = 7,5$ Hz), 4 tín hiệu proton oxymethin khác tại δ_H 3,25 - 3,51 và một tín hiệu của nhóm oxymethylen tại δ_H 3,61 và 3,73. Phổ ¹³C-NMR xuất hiện tín hiệu của 21 carbon, trong đó tín hiệu tại δ_C 179,5 là của nhóm C=O (C-4). Tất cả các dữ liệu trên cho biết hợp chất **GL11** là một flavonoid-*O*-glycosid [99] với aglycon được xác định là quercetin [100]. Phần đường trong hợp chất **GL11** được xác định là β -glucopyranose dựa trên tín

hiệu của proton anomeric ở vị trí H-1'' tại δ_H 5,26 (d, $J = 7,5$ Hz) và các tín hiệu carbon tại δ_C 75,7; 78,1; 71,2; 78,4; 62,6. Vị trí của gốc đường được xác định tại C-3 do tín hiệu của C-2 xuất hiện ở độ chuyển dịch (δ_C 159,0) cao hơn (ở vùng trường thấp hơn) so với tín hiệu của C-2 trong hợp chất quercetin khoảng 10 ppm [100] cũng như xuất hiện tương tác của H-1'' (δ_H 5,26) và C-3 (δ_H 135,6) trên phổ HMBC. Như vậy, hợp chất **GL11** được xác định là quercetin-3-*O*- β -glucopyranosid, có tên thường gọi là isoquercitrin [98], [99]. Đây là lần đầu tiên hợp chất này được phân lập từ một loài thuộc chi *Gouania*.



Hình 3.23. Cấu trúc hóa học (A) và tương tác HMBC (\rightarrow) (B) của GL11

3.2.5.12. Hợp chất GL12

Hợp chất **GL12** thu được dưới dạng bột màu vàng, phổ $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD ; 500MHz), phổ $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD ; 125 MHz): xem bảng 3.13.

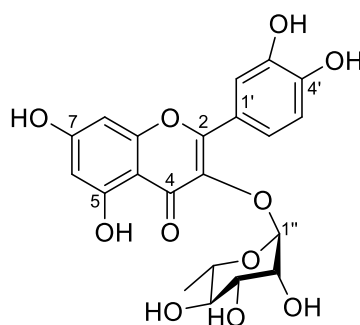
Bảng 3.13. Số liệu phổ ^1H và $^{13}\text{C-NMR}$ của hợp chất GL12

Vị trí	Hợp chất GL12		
	$\delta_H^{a,b}$ (độ bội, $J = \text{Hz}$)	$\delta_C^{a,c}$	$\delta_C^\#$
2	-	158,5	158,6
3	-	136,3	136,3
4	-	179,9	179,7
5	-	163,2	163,3
6	6,23 (d; 1,5)	99,8	99,9
7	-	165,9	165,9
8	6,39 (d; 1,5)	94,7	94,8
9	-	159,3	159,4
10	-	105,9	106,0
1'	-	123,0	123,1
2'	7,36 (d; 2,0)	117,0	117,1
3'	-	146,4	149,9
4'	-	149,8	146,5

5'	6,93 (d; 8,5)	116,4	116,5
6'	7,33 (dd; 2,0; 8,0)	122,9	122,0
1''	5,37 (d; 1,5)	103,6	103,6
2''	4,23 (dd; 3,3; 1,7)	71,9	72,0
3''	3,77 (dd; 9,5; 3,5)	72,1	72,3
4''	3,36 (t; 9,5)	73,3	73,4
5''	3,44 (dd; 6,5; 10)	72,0	72,1
6''	0,96 (d; 6,0)	17,7	17,7

Ghi chú: # δ_C của quercitrin đo trong CD₃OD [101]; ^a đo trong CD₃OD, ^b 500 MHz, ^c 125 MHz.

Phổ NMR (Bảng 3.13) của **GL12** có phần aglycon tương tự như **GL11**, điều đó cho thấy **GL12** cũng là dẫn xuất glycosid của quercetin. Gốc đường của **GL12** được xác định là α -rhamnopyranose dựa trên tín hiệu của proton anomeric với hằng số ghép cặp nhỏ tại δ_H 5,37 (d, $J = 1,5$ Hz) và nhóm methyl tại δ_H 0,96 (d, $J = 6,0$ Hz) cùng các proton oxymethin khác nằm trong vùng trường 3,36 - 4,23 ppm cũng như 6 tín hiệu carbon tại δ_C 103,6; 72,0; 72,1; 73,3; 71,9 và 17,7. Dựa vào phân tích dữ liệu phổ nêu trên kết hợp so sánh với dữ liệu phổ đã công bố [101], cho phép khẳng định hợp chất **GL12** là quercetin-3- O - α -rhamnopyranosid, còn gọi là quercitrin. Hợp chất này có mặt trong nhiều cây, tuy nhiên đây là lần đầu tiên công bố có trong Dây đòn gánh.



Hình 3.24. Cấu trúc hóa học của **GL12**

3.2.5.13. Hợp chất **GL13**

Hợp chất **GL13** thu được dưới dạng bột màu vàng. Phổ ESI-MS: m/z 755 [M-H]; phổ ¹H-NMR (CD₃OD, 500 MHz) và ¹³C-NMR (CD₃OD, 125 MHz): xem bảng 3.14.

Bảng 3.14. Số liệu phổ ¹H và ¹³C-NMR của hợp chất **GL13**

Vị trí	Hợp chất GL13		$\delta_C^{\#}$
	$\delta_H^{a,b}$ (độ bội, $J = \text{Hz}$)	$\delta_C^{a,c}$	
2	-	158,3	158,1
3	-	136,7	136,7

4	-	179,6	179,6
5	-	163,1	163,1
6	6,17 (d, 2,0)	99,8	99,7
7	-	165,6	165,5
8	6,18 (d, 2,0)	94,8	94,8
9	-	158,4	158,2
10	-	106,0	106,0
1'	-	122,8	122,6
2'	7,26 (d, 8,5)	131,0	131,9
3'	6,72 (d, 8,5)	116,7	116,4
4'	-	161,1	161,5
5'	6,72 (d, 8,5)	116,7	116,4
6'	7,26 (d, 8,5)	131,0	131,9
	3-O-rha		
1''	5,78 (br s)	102,4	102,3
2''	4,40 (m)	83,6	83,7
3''	3,90 (dd, 3,5; 9,5)	71,8	71,8
4''	3,40 (t, 9,5)	73,6	73,5
5''	3,68 (m)	72,0	72,0
6''	1,09 (d, 6,0)	17,8	17,9
	2''-O-gal		
1'''	4,40 (d, 7,5)	107,6	107,5
2'''	3,62 (dd, 8,0; 8,5)	72,5	72,5
3'''	3,56 (dd, 3,0; 9,5)	74,6	74,6
4'''	3,85 (d, 3,5)	70,1	70,2
5'''	3,70 (m)	74,1	74,3
6'''	4,18 (dd, 7,5; 11,0); 4,40 (m)	64,0	64,1
	6'''-O-caffeoyl		
1''''	-	127,0	127,4
2''''	7,35 (d, 1,5)	117,0	111,2
3''''	-	146,4	149,1
4''''	-	149,7	150,5
5''''	6,91 (d, 8,5)	116,4	116,2
6''''	7,26 (dd, 1,5; 8,5)	123,1	124,0
7''''	7,48 (d, 16,0)	146,7	146,6
8''''	6,10 (d, 16,0)	114,7	115,0
9''''	-	168,9	168,7
OCH ₃	-		56,2

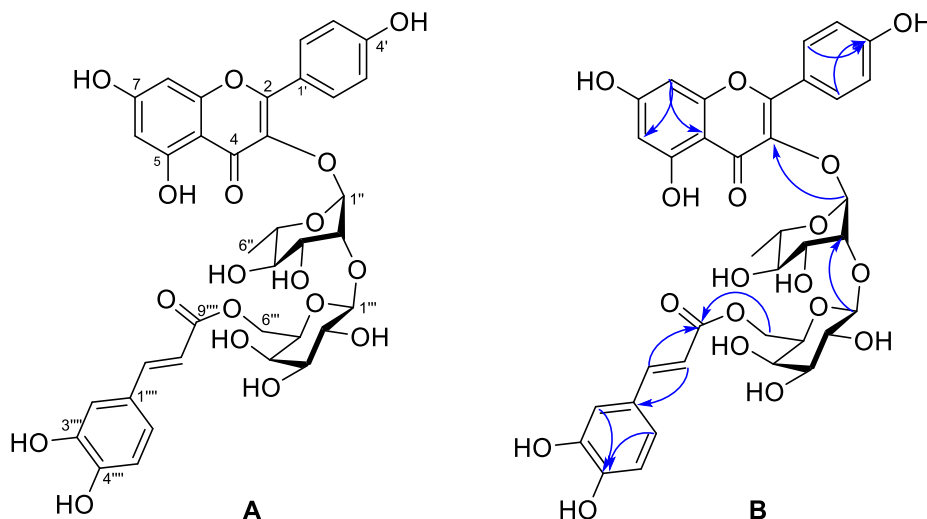
Ghi chú: [#] δ_C của hợp chất kaempferol-3-*O*-(6-*O-E*-feruloyl)- β -*D*-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -*L*-rhamnopyranosid đo trong CD₃OD [31]; ^a đo trong CD₃OD, ^b 500 MHz, ^c 125 MHz.

Các dữ kiện phổ NMR cho biết, hợp chất **GL13** cũng là một flavonoid-*O*-glycosid. Hai tín hiệu proton thơm ghép cặp *meta* ở δ_H 6,17 (d, $J = 2,0$ Hz) và 6,18 (d, $J = 2,5$ Hz) được xác định lần lượt là các proton H-6 và H-8 của vòng A. Phổ ¹H-NMR và COSY xuất hiện 02 nhóm tín hiệu (mỗi nhóm gồm 02 proton) ghép cặp *ortho* ở δ_H 6,72 (d, $J = 8,5$ Hz) và 7,26 (d, $J = 8,5$ Hz) là các proton H-3'/5' và H-2'/6' vòng B. Như vậy, hợp chất **GL13** được xác định có phần aglycon là kaempferol. Ngoài các tín hiệu kể trên, phổ ¹H-NMR của **GL13** còn xuất hiện thêm tín hiệu của nhóm các proton thơm khác ghép cặp dưới dạng ABX ở δ_H 7,35 (d, $J = 1,5$ Hz), 6,91 (d, $J = 8,5$ Hz), 7,26 (dd, $J = 1,5; 8,5$ Hz) và hai tín hiệu proton xuất hiện dưới dạng doublet với hằng số ghép cặp $J = 16,0$ Hz. Hai tín hiệu này được xác định là các proton olefin với cấu hình *trans*. Phổ ¹³C-NMR xuất hiện tín hiệu của một carbonyl ester ở δ_C 168,9. Trên phổ HMBC, xuất hiện tương tác của tín hiệu carbon carbonyl ester này với hai proton *trans* olefin. Các dữ kiện phổ trên cho thấy rằng trong cấu trúc của **GL13** có khung *E*-caffeoyl [102].

Các tín hiệu còn lại trên phổ ¹H-NMR và ¹³C-NMR xác định hợp chất **GL13** có 02 phân tử đường. Hai tín hiệu của các proton anomeric ở δ_H 5,78 (br s) và 4,40 (d, $J = 7,5$ Hz) cho biết trong 02 phân tử đường của **GL13** có 01 đường cấu hình β và 01 đường cấu hình α . Góc đường có cấu hình α là đường α -rhamnopyranose do trên phổ ¹H-NMR xuất hiện tín hiệu của nhóm methyl ở δ_H 1,09 (d, $J = 6,0$ Hz, H-6''). Đường này được đính vào phần aglycon ở vị trí C-3 do xuất hiện tương tác của C-3 (δ_C 136,7) và H-1'' (δ_H 5,78) trên phổ HMBC. Góc đường còn lại được đính vào vị trí số 2 của đường α -rhamnopyranose. Điều này được thể hiện qua các tương tác H-1''' (δ_H 4,40) với C-2'' (δ_C 83,6) trên phổ HMBC; tương tác H-2'' (δ_H 4,40) với C-2'' (δ_C 83,6) trên phổ HSQC và tương tác H-1'' (δ_H 5,78) với H-2'' (trên phổ COSY). Tra cứu tài liệu thấy rằng, các tín hiệu phổ NMR của hợp chất **GL13** gần tương tự như hợp chất kaempferol-3-*O*-(6-*O-E*-feruloyl)- β -*D*-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -*L*-rhamnopyranosid [31]. Sự khác biệt là trong cấu trúc của **GL13** xuất hiện khung *E*-caffeoyl thay vì khung *E*-feruloyl như trong hợp chất

kaempferol-3-*O*-(6-*O-E*-feruloyl)- β -*D*-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -*L*-

rhamnopyranosid. Như vậy, hợp chất **GL13** được xác định là kaempferol-3-*O*-[(6-*O*-*E*-caffeoyl)- β -D-galactopyranosyl]-(1 \rightarrow 2)- α -L-rhamnopyranosid. Điều này được khẳng định thông qua việc quan sát các tương tác trên phổ 2D-NMR (HSQC, HMBC, COSY) của **GL13**. Phổ khối ESI-MS có pic ion m/z 755 $[M-H]^-$ kết hợp với phổ NMR cho biết công thức phân tử của **GL13** là $C_{36}H_{36}O_{18}$, phù hợp với cấu trúc dự đoán. Đây là lần đầu tiên hợp chất này được công bố có mặt trong chi *Gouania*.



Hình 3.25. Cấu trúc hóa học (A) và tương tác HMBC (\rightarrow) (B) của GL13

3.2.5.14. Hợp chất GL14

Hợp chất **GL14** thu được dưới dạng bột màu trắng. Phổ khối xuất hiện pic in giả phân tử tại m/z 259 $[M+Na]^+$ phù hợp với công thức phân tử $C_{10}H_{20}O_6$. Phổ 1H -NMR (CD_3OD , 500 MHz) và ^{13}C -NMR (CD_3OD , 125 MHz): xem bảng 3.15.

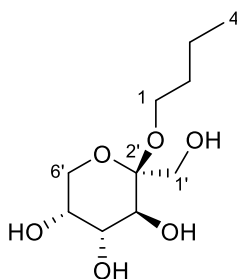
Bảng 3.15. Số liệu phổ 1H và ^{13}C -NMR của hợp chất GL14

Vị trí	GL14		<i>n</i> -butyl- β -D-fructopyranosid	
	$\delta_H^{a,c}$ (Độ bội, $J=Hz$)	$\delta_C^{a,d}$	δ_C^a [103]	δ_C^b [104]
1	3,53 (m)	59,3	61,6	59,5
2	1,59 (m)	31,3	33,3	31,9
3	1,43 (m)	18,5	20,5	19,0
4	0,98 (t, 7,5)	13,0	14,3	13,8
1'	3,73 (m); 3,76 (m)	62,2	63,5	62,4
2'	-	100,1	101,6	100,0

3'	3,94 (d, 9,5)	68,9	70,6	69,1
4'	3,81 (m)	69,4	71,5	69,7
5'	3,86 (m)	69,3	71,1	69,3
6'	3,68 (dd, 12,5; 1,5); 3,76 (m)	63,5	65,2	63,8

Ghi chú: a: Đo trong CD₃OD; b: Đo trong DMSO-d₆; c: 500 MHz; d: 125 MHz

Phổ ¹H-NMR của **GL14** xuất hiện tín hiệu của 1 nhóm methyl tại δ_H 0,98 (3H, s, H-4) và các tín hiệu proton khác tập trung trong vùng δ_H 3,67 đến δ_H 3,94 cho dự đoán **GL14** chứa một phân tử đường. Trên phổ ¹³C-NMR và DEPT xuất hiện tín hiệu của 10 nguyên tử carbon, bao gồm 6 tín hiệu đặc trưng cho phân tử đường fructose tại các giá trị δ_C 100,4 (C-2'), 62,2 (C-1'), 68,9 (C-3'), 69,4 (C-4'), 69,3 (C-5') và 63,5 (C-6'); 1 nhóm methyl và 3 nhóm methylen (một nhóm gắn trực tiếp với nguyên tử oxy nên có giá trị δ_C cao tại 59,3 ppm. Với dữ liệu phân tích trên phổ ¹H-NMR, ¹³C-NMR, phổ khối và so sánh với các tài liệu tham khảo đã công bố, cho phép xác định hợp chất **GL14** là *n*-butyl-β-D-fructopyranosid [103], [104]. Đây là lần đầu tiên hợp chất này được công bố có mặt trong chi *Gouania*.



Hình 3.26. Cấu trúc hóa học của hợp chất GL14

3.2.5.15. Hợp chất GL15

Hợp chất **GL15** thu được dưới dạng bột màu trắng. Phổ ¹H-NMR (DMSO-d₆, 500 MHz): xem bảng 3.16.

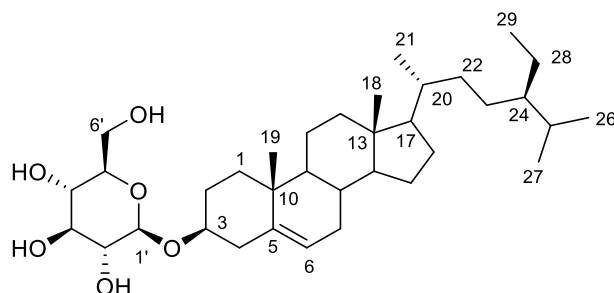
Bảng 3.16. Số liệu phổ ¹H của hợp chất GL15

Vị trí	GL15	Daucosterol [105]
	δ _H ^{a,b} (Độ bội, J = Hz)	δ _H [#] (Độ bội, J = Hz)
1		
2		
3	3,14 (m)	

4		
5	-	
6	5,32 (t, 2,0)	5,36–5,39 (m)
7-17		
18	0,65 (s)	0,70 (s)
19	0,96 (s,)	1,03 (s)
20		
21	0,79 (d, 6,0)	0,94 (d, 6,4)
22-25		
26	0,90 (d, 5,5)	0,83 (d, 6,5)
27	0,81 (d, 5,5)	0,85 (d, 6,5)
28		
29	0,83 (t, 6,5)	0,86 (t, 8,3)
1'	4,22 (d, 6,5)	4,41 (d, 7,8)
2'	3,01 (m)	3,22 (t, 8,3)
3'		
4'	3,06-3,47 (m)	3,27-2,44 (m)
5'		
6'		
	3,64 (m), 3,40 (m)	3,73 (dd, 12,0; 5,1), 3,86 (dd, 12,0; 2,6)

Ghi chú: a: DMSO- d_6 b: 500 MHz #: Đo trong $CDCl_3$

Phổ 1H -NMR của **GL15** xuất hiện 6 tín hiệu của nhóm methyl: 3 tín hiệu doublet tại δ_H 0,90 (3H, d, $J = 5,5$ Hz, H-26), 0,81 (3H, d, $J = 5,5$ Hz, H-27), 0,79 (3H, d, $J = 6,0$ Hz, H-21), hai tín hiệu singlet tại δ_H 0,96 (3H, s, H-19), 0,65 (3H, s, H-18) và một tín hiệu triplet tại δ_H 0,83 (3H, t, $J = 6,5$ Hz, H-29). Tín hiệu của proton olefinic được quan sát tại δ_H 5,32 (1H, t, $J = 2,0$ Hz, H-6) và một tín hiệu nhóm hydroxymethin tại δ_H 3,14 (1H, m, H-3). Ngoài ra, **GL15** còn xuất hiện một phân tử đường do sự có mặt của proton anomeric tại δ_H 4,22 (1H, d, $J = 6,5$ Hz, H-1') cùng với các proton khác trong khoảng δ_H 3,01 - 3,64. Kết hợp so sánh với dữ liệu phổ 1H -NMR đã công bố [105], hợp chất **GL15** được xác định là daucosterol.



Hình 3.27. Cấu trúc hóa học của hợp chất GL15

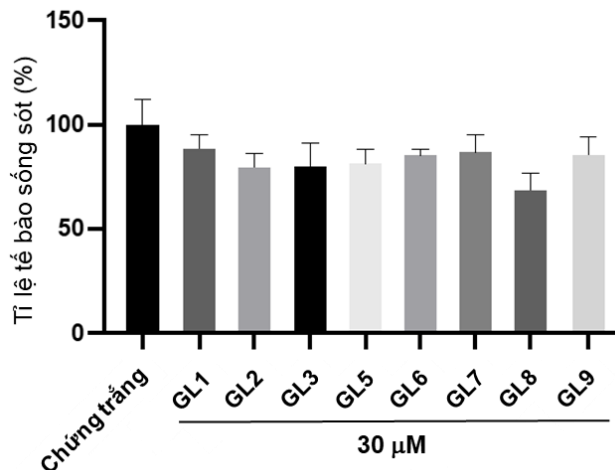
3.3. KẾT QUẢ ĐÁNH GIÁ TÁC DỤNG CHỐNG VIÊM *IN VITRO* CỦA CÁC HỢP CHẤT TINH KHIẾT

3.3.1. Kết quả sàng lọc tác dụng chống viêm *in vitro* của các hợp chất tinh khiết

Tương tự như phần sàng lọc tác dụng chống viêm của các cao chiết, đầu tiên, các hợp chất tinh khiết được đánh giá ảnh hưởng đến khả năng sống sót của tế bào RAW264.7 để từ đó chọn ra mức nồng độ an toàn cho các thử nghiệm đánh giá tác dụng chống viêm *in vitro*. Sau đó, các hợp chất tinh khiết được đánh giá khả năng ảnh hưởng đến sự sản sinh các chất trung gian gây viêm PGE₂, NO và các cytokin (IL-1 β và IL-6) trên đại thực bào RAW264.7 bị gây kích thích viêm bằng LPS sử dụng phương pháp xét nghiệm ELISA. Mẫu nghiên cứu là 4 hợp chất saponin (**GL1**, **GL2**, **GL3** và **GL5**) phân lập từ cao *n*-butanol (**GLB**) và 4 hợp chất triterpenoid (**GL6**, **GL7**, **GL8** và **GL9**) được phân lập từ cao ethyl acetat (**GLE**).

3.3.1.1. Ảnh hưởng của các hợp chất tinh khiết đến khả năng sống sót của tế bào RAW264.7

Các hợp chất tinh khiết **GL1**, **GL2**, **GL3**, **GL5**, **GL6**, **GL7**, **GL8** và **GL9** được đánh giá mức độ gây độc tế bào *in vitro* trên dòng RAW264.7 theo phương pháp MTT với các nồng độ thử nghiệm là 30 μ M. Kết quả được thể hiện ở hình 3.28.



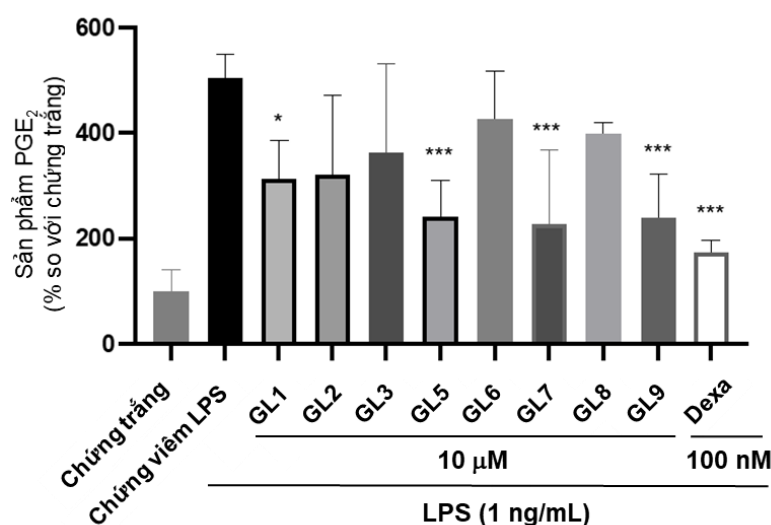
Hình 3.28. Ảnh hưởng của các hợp chất tinh khiết đến khả năng sống sót của tế bào RAW264.7

GL1: Gouaniasid VII, GL2: Gouaniasid VIII, GL3: Gouaniasid IX, GL5: Gouaniosid A, GL6: Lupeol, GL7: Acid alphaltolic, GL8: Acid ceanothenic, GL9: Acid epigouanic

Kết quả ở hình trên cho thấy, ở nồng độ 30 μM , các hợp chất tinh khiết phân lập từ phần trên mặt đất Dây đòn gánh hầu như không ảnh hưởng đến tỷ lệ sống sót của các tế bào (tỷ lệ tế bào sống sót trên 80 %). Như vậy, nồng độ chất tinh khiết nhỏ hơn hoặc bằng 30 μM là an toàn để thực hiện các thí nghiệm đánh giá tác dụng chống viêm *in vitro* trên tế bào RAW264.7

3.3.1.2. Ảnh hưởng của các hợp chất tinh khiết lên mức độ sản sinh PGE_2

4 hợp chất phân lập từ phân đoạn **GLE (GL6, GL7, GL9, GL8)** và 4 hợp chất phân lập từ phân đoạn **GLB (GL1, GL2, GL3, GL5)** ở nồng độ 10 μM được đánh giá khả năng ảnh hưởng đến sự sản xuất PGE_2 trên đại thực bào RAW264.7 bị gây kích thích viêm bằng LPS sử dụng phương pháp xét nghiệm ELISA. Chất đối chứng dương sử dụng thuốc chống viêm corticoid (dexamethason nồng độ 100 nM).



Hình 3.29. Ảnh hưởng của các hợp chất tinh khiết đến mức độ sản sinh PGE₂
*GL1: Gouaniasid VII, GL2: Gouaniasid VIII, GL3: Gouaniasid IX, GL5: Gouaniosid A, GL6: Lupeol, GL7: Acid alphitolic, GL8: Acid ceanothenic, GL9: Acid epigouanic, Dexa: dexamethason, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 khi so sánh với chứng viêm LPS (n=5)*

Các kết quả trong hình 3.29 cho thấy

- Mẫu chứng viêm LPS có tỉ lệ nồng độ PGE₂ trong dịch tế bào so với mẫu chứng trắng là 506,0 ± 18,8 %. Mẫu chứng dương dexamethason (100 nM) có tỉ lệ nồng độ PGE₂ so với mẫu chứng trắng là 175,7 ± 10,5 %. Như vậy, dexamethason (100 nM) đã làm giảm sản sinh PGE₂ 65,2 ± 2,1 % so với nhóm chứng LPS (p < 0,001).

- Trong số các chất được thử nghiệm, các hợp chất **GL5, GL7** và **GL9** có tác dụng ức chế sản sinh PGE₂ so với nhóm chứng LPS mạnh nhất và đạt ý nghĩa thống kê. Tỉ lệ sản phẩm PGE₂ so với nhóm chứng trắng lần lượt là 241,4 ± 30,6 %, 228,2 ± 62,1 % và 239,0 ± 36,8 %. Như vậy các hợp chất trên ở nồng độ 10 μM đã làm giảm PGE₂ so với nhóm chứng viêm LPS lần lượt là 52,3 ± 6,0 %, 54,9 ± 12,3 % và 52,7 ± 7,3 % (p < 0,001). Đồng thời tác dụng của các hợp chất này khác biệt không có ý nghĩa thống kê với tác dụng của dexamethason (100 nM).

- Hợp chất **GL1** (10 μM) thể hiện tác dụng yếu hơn nhưng vẫn đạt ý nghĩa thống kê, giảm PGE₂ 38,0 ± 6,4 % (p < 0,05) so với nhóm chứng LPS.

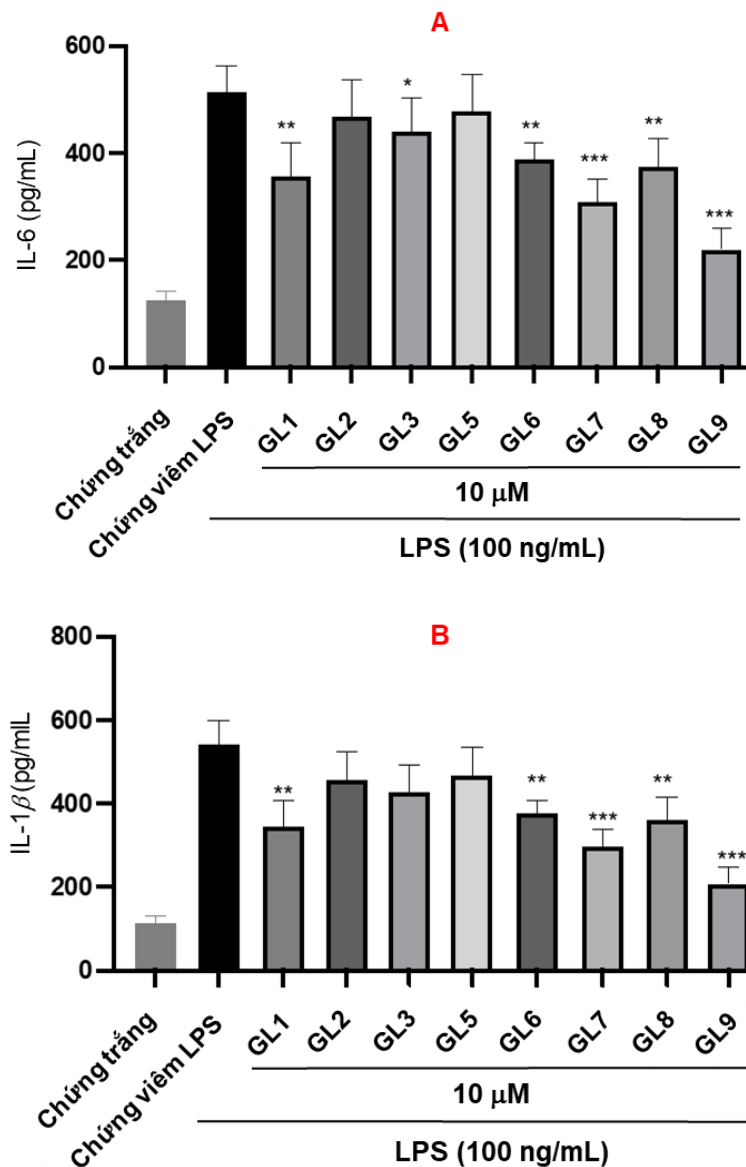
- Các hợp chất **GL2**, **GL3**, **GL6** và **GL8** đều có xu hướng giảm sản sinh PGE₂ nhưng không đạt ý nghĩa thống kê.

3.2.1.3. Ảnh hưởng của các hợp chất tinh khiết lên sự sản sinh IL-1 β và IL-6

Tiếp tục đánh giá ảnh hưởng của 8 hợp chất tinh khiết lên sự sản xuất các cytokin tiền viêm IL-1 β và IL-6 ở nồng độ 10 μ M. Kết quả được thể hiện tại hình 3.30.

- Kết quả ở hình 3.30A cho thấy: Trong số các chất tinh khiết thử nghiệm, **GL7** và **GL9** thể hiện tác dụng ức chế sản sinh IL-6 tốt nhất. Cụ thể, hàm lượng IL-6 ở mẫu chứng viêm LPS là $518,3 \pm 19,2$ pg/mL, hàm lượng IL-6 ở mẫu điều trị bằng **GL7** và **GL9** lần lượt là $309,5 \pm 18,6$ và $220,5 \pm 17,1$ pg/mL. Như vậy, **GL7** và **GL9** nồng độ 10 μ M làm giảm sản sinh IL-6 so với nhóm chứng LPS lần lượt là $39,8 \pm 3,6$ và $57,1 \pm 3,3$ % ($p < 0,001$). Các hợp chất **GL1**, **GL3**, **GL6** và **GL8** cũng thể hiện tác dụng ức chế sản sinh IL-6 đạt ý nghĩa thống kê ($p < 0,01$ so sánh với nhóm chứng viêm LPS).

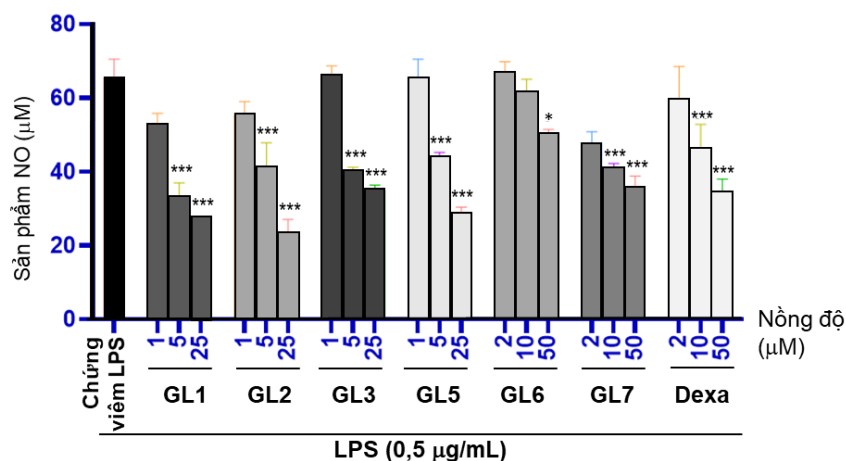
- Kết quả ở hình 3.30B cho thấy: Trong số các chất tinh khiết thử nghiệm, **GL7** và **GL9** thể hiện tác dụng ức chế sản sinh IL-1 β tốt nhất. Cụ thể, hàm lượng IL-1 β ở mẫu chứng viêm LPS là $546,9 \pm 21,0$ pg/mL, hàm lượng IL-1 β ở mẫu điều trị bằng **GL7** và **GL9** lần lượt là $297,4 \pm 18,6$, $208,5 \pm 17,2$ pg/mL. Như vậy, **GL7** và **GL9** nồng độ 10 μ M làm giảm sản sinh IL-1 β so với nhóm chứng LPS lần lượt là $45,1 \pm 3,4$ và $61,5 \pm 3,2$ % ($p < 0,001$). Các hợp chất **GL1**, **GL6** và **GL8** cũng thể hiện tác dụng ức chế sản sinh IL-1 β đạt ý nghĩa thống kê ($p < 0,01$ so sánh với nhóm chứng viêm LPS).



Hình 3.30. Ảnh hưởng của các hợp chất tinh khiết lên sự sản sinh IL-1 β và IL-6
GL1: Gouaniasid VII, GL2: Gouaniasid VIII, GL3: Gouaniasid IX, GL5: Gouaniosid A, GL6: Lupeol, GL7: Acid alphitolic, GL8: Acid ceanothenic, GL9: Acid epigouanic,
** $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ khi so sánh với chứng viêm LPS (n=5)*

3.2.1.4. Ảnh hưởng của các hợp chất tinh khiết lên mức độ sản sinh NO

Kết quả đánh giá tác dụng của các hợp chất **GL1, GL2, GL3, GL5, GL6, GL7** ở nồng độ 1, 5 và 25 μM đến sự sản sinh NO của tế bào RAW264.7 bị kích thích gây viêm bởi LPS (0,5 $\mu\text{g/mL}$) được thể hiện tại hình 3.31.



Hình 3.31. Ảnh hưởng của các hợp chất tinh khiết đến sự sản sinh NO

*GL1: Gouaniasid VII, GL2: Gouaniasid VIII, GL3: Gouaniasid IX, GL5: Gouaniosid A, GL6: Lupeol, GL7: Acid alphitolic, GL8: Acid ceanothenic, GL9: Acid epigouanic, Dexa: Dexamethason, * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ khi so sánh với chứng viêm LPS ($n=5$)*

Kết quả được chỉ ra hình 3.31, ở nồng độ 5 và 25 µM, các hợp chất **GL1**, **GL2**, **GL3** và **GL5** có tác dụng ức chế đáng kể sự sản sinh NO trên đại thực bào RAW264.7 gây kích thích sản xuất NO bằng LPS và phụ thuộc nồng độ. Đặc biệt, ở mức nồng độ cao nhất 25 µM, các hợp chất này làm giảm hàm lượng NO hơn 2 lần so với nhóm không được bổ sung các chất này và tác dụng tương đương chứng dương dexamethason 50 µM (khác biệt không có ý nghĩa thống kê). Trong số các hợp chất thử nghiệm, **GL2** thể hiện tác dụng tốt nhất.

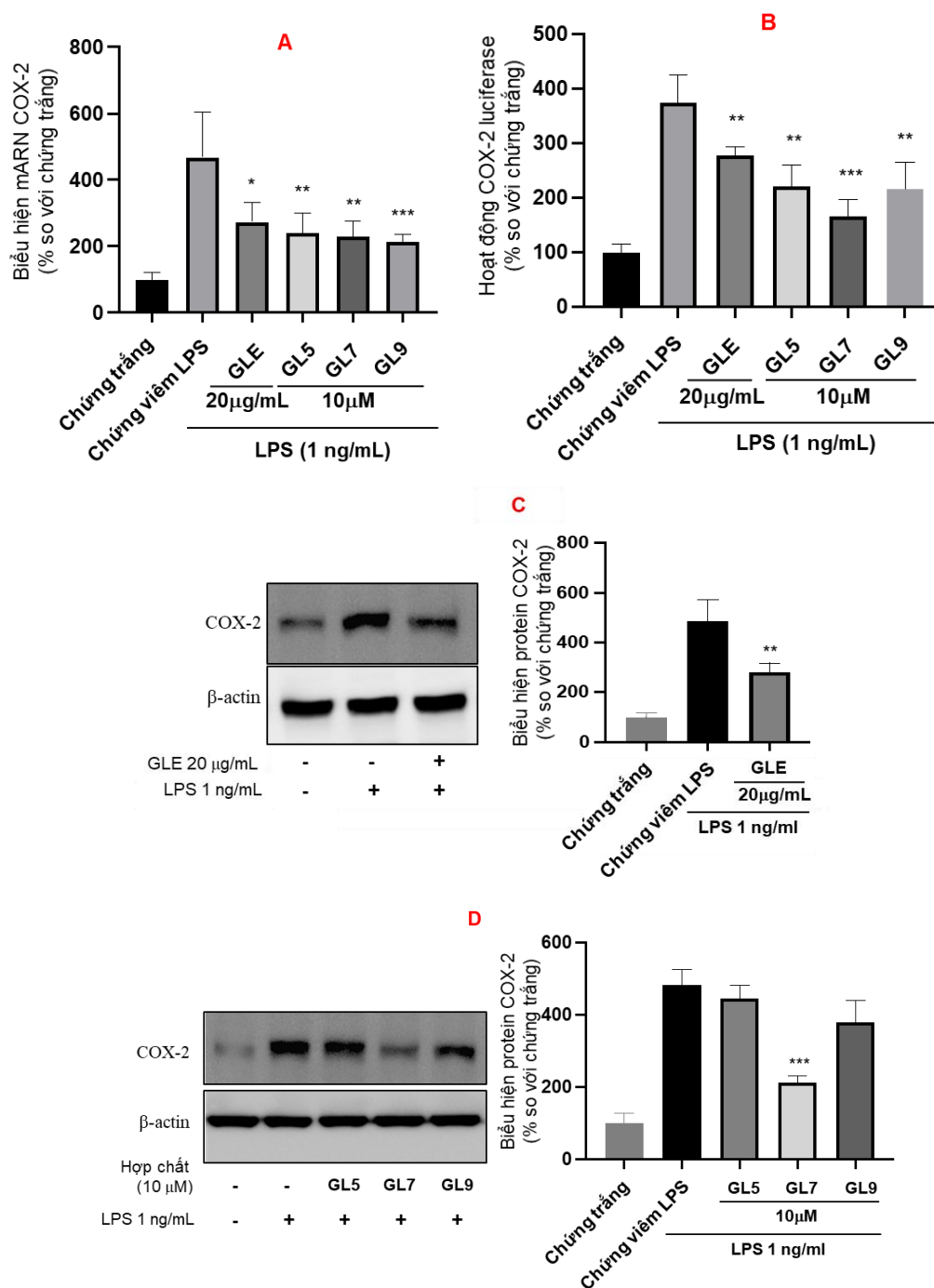
Hợp chất **GL7** cũng làm giảm rõ rệt sự sản sinh NO ở khoảng nồng độ 2-50 µM và phụ thuộc nồng độ. Hợp chất **GL6** thể hiện tác dụng yếu trên mô hình này, chỉ nồng độ cao nhất 50 µM có tác dụng đạt ý nghĩa thống kê.

3.3.2. Kết quả đánh giá tác dụng chống viêm *in vitro* của cao chiết và các hợp chất tinh khiết tiềm năng

3.3.2.1. Ảnh hưởng của cao GLE và các hợp chất GL7, GL9, GL5 lên hoạt động của COX-2 và mức độ biểu hiện mRNA của COX-2

Kết quả nghiên cứu sàng lọc ở trên đã xác định được cao chiết tiềm năng (GLE) và ba hợp chất **GL5**, **GL7** và **GL9** có hoạt tính tốt nhất. Do vậy, cao GLE và ba hợp chất này tiếp tục được nghiên cứu về khả năng ảnh hưởng đến sự biểu hiện mRNA của COX-2 bằng kỹ thuật RT-PCR, biểu hiện protein của COX-2 bằng kỹ thuật Western

Blot và hoạt động gen COX-2 bằng phương pháp đo hoạt động gen luciferase. Nồng độ thử nghiệm đối với cao chiết là 20 $\mu\text{g/mL}$ và các chất tinh khiết là 10 μM .



Hình 3.32. Ảnh hưởng của cao GLE và các hợp chất GL5, GL7, GL9 lên mức độ biểu hiện mRNA COX-2 (A), COX-2 luciferase (B) và protein COX-2 (C, D)
 GL5: *Gouaniosid A*, GL7: *Acid alphitolic*, GL9: *Acid epigouanic*, GLE: cao phân đoạn ethyl acetat, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ khi so sánh với chứng viêm LPS (A, B: $n=5$, C, D: $n=3$)

- Kết quả được chỉ ra ở hình 3.32A cho thấy, cao phân đoạn **GLE** và 3 hợp chất **GL5**, **GL7**, **GL9** đều thể hiện tác dụng làm giảm biểu hiện mRNA COX-2. Tỷ lệ biểu hiện mRNA COX-2 của các nhóm chứng viêm LPS, **GLE**, **GL5**, **GL7** và **GL9** so với nhóm chứng trắng lần lượt là $468,7 \pm 60,8$; $274,0 \pm 26,0$; $240,2 \pm 26,7$; $231,3 \pm 20,4$ và $213,8 \pm 9,9$ %. Như vậy cao **GLE** (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) và các hợp chất **GL5**, **GL7**, **GL9** (10 μM) làm giảm biểu hiện mRNA COX-2 so với nhóm chứng LPS lần lượt là $41,5 \pm 5,6$ ($p < 0,05$); $48,8 \pm 5,7$; $50,6 \pm 4,3$ ($p < 0,01$) và $54,4 \pm 2,1$ % ($p < 0,001$).

- Kết quả được chỉ ra ở hình 3.32B cho thấy, cao phân đoạn **GLE** và 3 hợp chất **GL5**, **GL7**, **GL9** đều có hoạt tính ức chế hoạt động COX-2 luciferase. Tỷ lệ hoạt động COX-2 luciferase ở các nhóm chứng viêm LPS, **GLE**, **GL5**, **GL7** và **GL9** so với nhóm chứng trắng lần lượt là $375,4 \pm 22,8$; $278,2 \pm 6,9$; $221,4 \pm 17,3$; $167,3 \pm 13,2$ và $217,5 \pm 21,5$ %. Như vậy, cao **GLE** (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) và các hợp chất **GL5**, **GL7**, **GL9** (10 μM) làm giảm biểu hiện mRNA COX-2 so với nhóm chứng LPS lần lượt là $25,9 \pm 1,7$; $41,0 \pm 4,6$ ($p < 0,01$); $55,4 \pm 3,5$ ($p < 0,001$) và $42,0 \pm 5,7$ % ($p < 0,01$).

- Kết quả phân tích Western Blot cũng cho thấy cao phân đoạn **GLE** (hình 3.32C) và hợp chất **GL7** (hình 3.32D) làm giảm biểu hiện protein của COX-2 so với nhóm chứng viêm LPS lần lượt là $42,3 \pm 4,4$ % ($p < 0,01$) và $55,9 \pm 2,1$ % ($p < 0,001$).

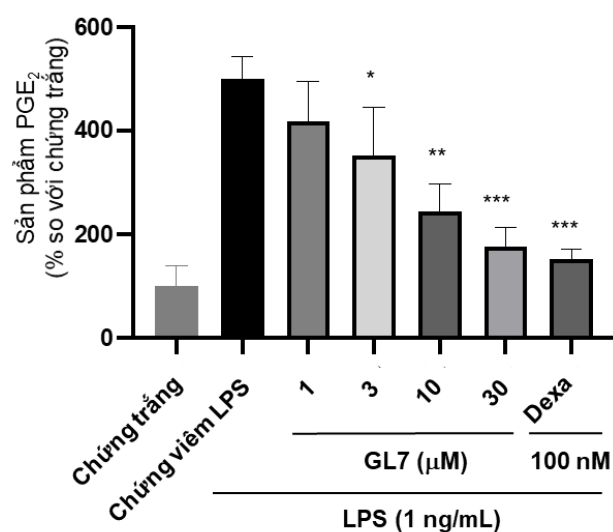
Như vậy, hợp chất **GL7** thể hiện tác dụng nội bật hơn hai hợp chất **GL5** và **GL9**. Do đó, hợp chất **GL7** được lựa chọn để tiếp tục nghiên cứu về khả năng chống viêm *in vitro* ở các mức nồng độ khác nhau.

3.3.2.2. Ảnh hưởng của hợp chất **GL7** theo nồng độ lên sự sản sinh PGE_2

Hợp chất **GL7** được đánh giá ảnh hưởng lên sự sản sinh PGE_2 trên đại thực bào RAW264.7 bị kích thích gây viêm bởi LPS bằng phương pháp ELISA ở các nồng độ 1, 3, 10 và 30 μM .

Kết quả chỉ ra hình 3.33 cho thấy:

- Khi tế bào bị kích thích viêm bởi LPS (1ng/mL), tỷ lệ nồng độ PGE_2 trong dịch tế bào so với mẫu chứng trắng là $499,9 \pm 18,9$ %. Với mẫu chứng dương dexamethason (100 nM), tỷ lệ PGE_2 so với mẫu chứng trắng là $152,3 \pm 7,9$ %. Như vậy, dexamethason (100 nM) đã làm giảm sản sinh PGE_2 $69,5 \pm 1,6$ % so với nhóm chứng LPS ($p < 0,001$).



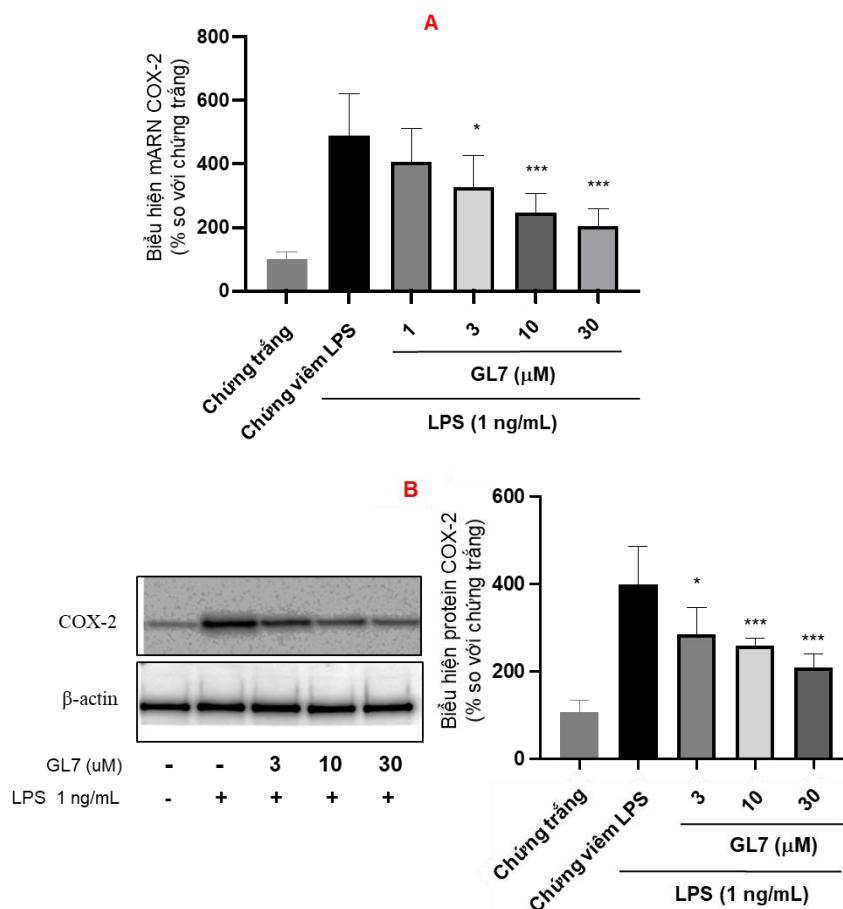
Hình 3.33. Ảnh hưởng của hợp chất GL7 theo nồng độ lên sự sản sinh PGE₂

*GL7: Acid aliphatic, Dexa: Dexamethason, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 khi so sánh với chứng viêm LPS (n=5)*

- Hợp chất **GL7** ở nồng độ 3, 10 và 30 μM đã làm giảm sản sinh PGE₂ đáng kể và phụ thuộc theo nồng độ. Cụ thể, tỉ lệ PGE₂ so với nhóm chứng trắng lần lượt là 353,1 ± 41,2 %, 243,7 ± 23,9 % và 177,2 ± 16,3 %. Như vậy hợp chất **GL7** nồng độ 3, 10 và 30 μM đã làm giảm sản sinh PGE₂ so với nhóm chứng viêm LPS lần lượt là 29,4 ± 8,2 % (p < 0,05), 51,2 ± 7,8 % (p < 0,01) và 64,5 ± 3,3 % (p < 0,001). Tác dụng của hợp chất **GL7** ở các nồng độ 10 và 30 μM tương đương dexamethason (100 nM) (khác biệt không có ý nghĩa thống kê).

3.3.2.3. Ảnh hưởng của hợp chất GL7 lên mức độ biểu hiện mRNA và protein COX-2

Hợp chất **GL7** tiếp tục được đánh giá hoạt tính ức chế enzym COX-2 ở cùng khoảng nồng độ trên (1, 3, 10 và 30 μM) thông qua các thử nghiệm xác định khả năng ảnh hưởng lên biểu hiện mRNA COX-2 bằng phương pháp phân tích định lượng thời gian thực PCR, biểu hiện protein COX-2 bằng kỹ thuật Western Blot. Kết quả được chỉ ra ở hình 3.34.



Hình 3.34. Ảnh hưởng của hợp chất GL7 lên mức độ biểu hiện mRNA COX-2 (A) và protein COX-2 (B)

*GL7: Acid aliphatic, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ khi so sánh với chứng viêm LPS (A: $n=5$, B: $n=3$)*

- Kết quả ở hình 3.34A cho thấy, hợp chất **GL7** ở các nồng độ 3, 10 và 30 μM làm giảm rõ rệt mức biểu hiện mRNA COX-2, tác dụng này phụ thuộc nồng độ và đạt ý nghĩa thống kê. Cụ thể, hợp chất **GL7** nồng độ 3, 10 và 30 μM làm giảm mức biểu hiện mRNA COX-2 so với nhóm chứng LPS lần lượt là $33,3 \pm 9,2 \%$ ($p < 0,05$); $49,5 \pm 5,3 \%$; $58,3 \pm 4,9 \%$ ($p < 0,001$).

- Kết quả ở hình 3.34B cho thấy, hợp chất **GL7** ở các nồng độ 3, 10 và 30 μM làm giảm rõ rệt mức biểu hiện protein COX-2, tác dụng này phụ thuộc nồng độ và đạt ý nghĩa thống kê. Cụ thể, hợp chất **GL7** nồng độ 3, 10 và 30 μM làm giảm mức biểu hiện protein COX-2 so với nhóm chứng LPS lần lượt là $28,5 \pm 8,8 \%$ ($p < 0,05$), $34,9 \pm 2,5 \%$ và $47,5 \pm 4,4 \%$ ($p < 0,001$).

CHƯƠNG 4: BÀN LUẬN

4.1. VỀ KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU THỰC VẬT DÂY ĐÒN GÁNH

4.1.1. Về đặc điểm thực vật Dây đòn gánh

Chi *Gouania* có khoảng 67 loài, phân bố ở khu vực nhiệt đới và cận nhiệt đới trên thế giới. 7 loài trong số đó đã được các nhà khoa học quan tâm nghiên cứu, gồm: *G. ulmifolia* Hook. & Arn., *G. longipetala* (Hemsl), *G. macrocarpa*, *G. leptostachya* DC., *G. tiliaefolia* và *G. mauritiana* Lam. Loài Dây đòn gánh *G. leptostachya* DC. phân bố ở một số nước Châu Á như Ấn Độ, Philipin, Trung Quốc, Lào, Malaysia, Singapo, Thái Lan, Myanmar và Việt Nam.

Thực vật chí Trung Quốc mô tả đặc điểm thực vật loài *G. leptostachya* như sau: Cây bụi leo, cành non không có lông hoặc có lông thưa. Lá kèm rụng sớm hoặc tồn tại, bao thân, mép có khía răng cưa nhọn. Lá mọc so le, cuống lá 1-2,5 cm, có lông thưa hoặc dày. Phiến lá hình trứng hơi thuôn, màu xanh, mặt dưới nhạt hơn, kích thước 5-9 x 2,5-5 cm, lá mỏng, mặt dưới nhẵn hoặc có lông thưa ở gân lá, 5-6 cặp gân phụ, lồi rõ ở mặt dưới, mép lá khía răng cưa, mũi nhọn. Hoa mọc riêng lẻ hoặc thành chùy, mọc ở đỉnh cành hoặc nách lá, dài tới 30 cm, nhiều lông. Cuống hoa ngắn 1mm, không có lông hoặc có lông thưa. Lá đài 5, hình trứng-tam giác, mặt ngoài nhiều lông, mũi nhọn. Cánh hoa 5, hình trứng ngược, màu trắng; nhị dài. Đĩa hoa 5 cạnh, bầu dưới, 3 ô. Đồng thời, tài liệu trên cũng xác nhận loài *G. leptostachya* có 3 thứ: thứ *leptostachya* DC., thứ *tonkinensis* Pitard và thứ *macrocarpa* Pitard. Thứ *tonkinensis* Pitard có đặc điểm đặc trưng là lá kèm tồn tại, bao quanh thân và mép khía răng cưa [14]. Trong công trình luận văn thạc sỹ, Nguyễn Văn An (2010) cũng mô tả loài *G. leptostachya* DC. var. *tonkinensis* Pitard với đặc điểm tương tự mô tả về loài này trong Thực vật chí Trung Quốc [5].

Tài liệu Từ điển cây thuốc Việt Nam của Võ Văn Chi (2012) có mô tả hai loài thuộc chi *Gouania* ở Việt Nam: loài *Gouania javanica* Miq. và *Gouania leptostachya* DC. var. *tonkinensis*. Loài *G. javanica* mang đặc điểm: dây leo hay cây bụi mọc trườn; nhánh có cạnh và có lông hoe. Lá mỏng, gốc tròn, mép có răng cưa, đầu có đuôi, mặt dưới đầy lông hoe; gân bên 5-6 đôi. Chùy hoa hẹp, dài 20-25 cm. Hoa tạp tính, cánh hoa 1 mm; nhị 5; bầu 3 ô. Quả có 3 cánh, mỗi cánh có 1 hạt, kích thước 3 × 10 mm,

màu nâu bóng. Loài *G. leptostachya* var. *tonkinensis* được mô tả với các đặc điểm chính tương tự Thực vật chí Trung Quốc. Tuy nhiên, có một số khác biệt nhỏ là cành non nhẵn, lá nhẵn, lá kèm rất dễ rụng, cuống lá hơi có khía rãnh ở mặt trên và hoa đơn tính. [1]

Tài liệu Những cây thuốc, vị thuốc Việt Nam của Đỗ Tất Lợi (2005) và tài liệu Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam của tác giả Đỗ Huy Bích và cộng sự (2006) có mô tả loài *G. leptostachya* var. *tonkinensis* Pitard thống nhất với tác giả Võ Văn Chi về đặc điểm thân cành và hai mặt lá đều nhẵn không có lông. Nhưng theo các tác giả này, gốc lá có thể tròn hoặc hình tim, lá kèm to bền, bao thân, khía răng và hoa có lông ở mặt ngoài [2], [40].

Mô tả về thực vật cho thấy hầu hết đặc điểm hình thái của mẫu nghiên cứu tương đồng với mô tả loài *G. leptostachya* DC. trong Thực vật chí Trung Quốc và Luận văn thạc sĩ của tác giả Nguyễn Văn An [5], [14]. Mẫu nghiên cứu mang đặc điểm nổi bật giúp nhận biết để phân biệt với loài còn lại là *G. javanica* cũng có ở Việt Nam như: thân có ít lông tơ mảnh, lá mỏng mềm, màu xanh, mặt dưới nhạt hơn, mặt dưới có lông hoặc không có lông, gốc lá hình tim. Đồng thời, mẫu có lá kèm tồn tại, bao quanh thân và mép khía răng cưa là nét hình thái đặc trưng của thứ *G. leptostachya* DC. var. *tonkinensis* Pitard. Bởi vậy, mẫu nghiên cứu đã được giám định tên khoa học chính xác là *Gouania leptostachya* DC. var. *tonkinensis* Pitard dưới sự giúp đỡ của các chuyên gia về thực vật và đối chiếu với các khóa phân loại chi *Gouania* [10],[17]. Việc định danh tên khoa học và mô tả đặc điểm hình thái loài *Gouania leptostachya* DC. var. *tonkinensis* Pitard khẳng định các công bố về hóa học và tác dụng sinh học trên đối tượng nghiên cứu có nguồn gốc rõ ràng.



**Hình 4.1. Hình ảnh cành mang quả
loài *G. javanica* (A)**

(Nguồn: ThS. Nghiêm Đức Trọng, Đại
học Dược Hà Nội)



**Hình 4.2. Hình ảnh cành lá loài *G.
leptostachya* DC.**

(Nguồn: PGS. TS. Trần Văn Ôn, Đại học
Dược Hà Nội)

4.1.2. Về đặc điểm vi học Dây đòn gánh

Luận án đã tiến hành nghiên cứu đặc điểm vi học của các mẫu dược liệu Dây đòn gánh thu hái năm 2016 và 2017. Kết quả nghiên cứu đặc điểm vi phẫu lá và thân Dây đòn gánh của luận án cũng tương đồng với nghiên cứu của tác giả Nguyễn Văn An [5]. Ngoài ra, nghiên cứu còn đóng góp trong việc phát hiện thêm một số đặc điểm vi phẫu của lá và thân, đồng thời mô tả các đặc điểm chi tiết hơn (bảng 4.1).

Luận án cũng là công trình đầu tiên mô tả chi tiết đặc điểm bột dược liệu Dây đòn gánh. Bột thân và bột lá Dây đòn gánh mang các đặc điểm thống nhất với đặc điểm vi phẫu thân và lá của dược liệu này. Trong Dược điển Việt Nam hiện nay vẫn chưa có chuyên luận Dây đòn gánh. Do vậy, kết quả nghiên cứu về đặc điểm vi học sẽ góp phần cung cấp cơ sở dữ liệu phục vụ công tác tiêu chuẩn hóa dược liệu này.

Bảng 4.1. So sánh kết quả nghiên cứu vi phẫu với kết quả của tác giả Nguyễn Văn An

Điểm so sánh	Kết quả tương tự của tác giả Nguyễn Văn An [5]	Đặc điểm phát hiện bổ sung
Vi phẫu gân lá	Biểu bì mang lông che chở đa bào, mô dày, mô mềm chứa tinh thể calci oxalat hình khối, 3-4 bó libe	Biểu bì dưới bề ngoài phủ lớp cutin mỏng, tinh thể calci oxalat hình cầu gai và đa giác, bó libe-gỗ, mô gỗ
Vi phẫu phiến lá	Biểu bì trên, biểu bì dưới mang lông trên gân phụ, mô giậu, mô khuyết, bó libe gỗ	Lỗ khí, mô giậu chứa nhiều lục lạp, tinh thể calci oxalat hình kim
Vi phẫu thân	Biểu bì mang lông che chở đa bào, mô dày, mô mềm vỏ, libe, tế bào mô cứng, mô gỗ, mô mềm ruột	Biểu bì phủ lớp cutin mỏng, mô dày gồm 2 loại mô dày góc và mô dày phiến, tinh thể calci oxalat hình khối, libe cấp 1 và cấp 2, tầng phát sinh libe gỗ, gỗ cấp 1 và cấp 2, tia ruột

4.2. VỀ KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN HÓA HỌC DÂY ĐÒN GÁNH

4.2.1. Về kết quả định tính thành phần hóa học Dây đòn gánh

Kết quả định tính sơ bộ các chất trong phần trên mặt đất của cây Dây đòn gánh bằng phản ứng hóa học cho thấy flavonoid, saponin triterpenoid là hai nhóm chất chính, ngoài ra còn có sự hiện diện của các nhóm caroten, sterol và đường khử.

Kết quả này tương tự kết quả định tính thành phần hóa học loài *G. leptostachya* của tác giả Nguyễn Văn An [5], ngoài ra còn xác nhận thêm sự có mặt nhóm chất saponin triterpenoid trong Dây đòn gánh. Kết quả định tính cũng phù hợp với các nghiên cứu về thành phần hóa học của chi *Gouania* với nhóm chất chính là flavonoid và saponin triterpenoid.

4.2.2. Về kết quả chiết xuất, phân lập và xác định cấu trúc các hợp chất

4.2.2.1. Về lựa chọn phân đoạn để tiến hành phân lập chất

Để nghiên cứu thành phần hóa học của đối tượng Dây đòn gánh, luận án áp dụng phương pháp phổ biến hiện nay là phân lập các hợp chất theo định hướng tác dụng sinh học. Như đã luận giải trong phần Đặt vấn đề, luận án hướng tới mục tiêu tìm kiếm bằng chứng khoa học cho kinh nghiệm sử dụng Dây đòn gánh trong y học dân tộc để chữa sung, đau, phù nề - những triệu chứng điển hình của viêm. Do vậy, luận án được thiết kế nghiên cứu gồm các bước: chiết xuất cao tổng và cao phân đoạn, sau đó sàng lọc tác dụng chống viêm *in vitro* trên một số mô hình đơn giản, từ đó lựa chọn phân đoạn cao chiết có tác dụng nổi trội để tiến hành phân lập và xác định cấu trúc các hợp chất, cuối cùng là kiểm chứng lại tác dụng chống viêm *in vitro* của các hợp chất phân lập được.

Luận án sử dụng phương pháp chiết xuất thường quy hiện nay là phương pháp ngâm lạnh với ethanol 96% để thu được cao tổng (GLT) và phân đoạn cao chiết bằng phương pháp chiết lỏng-lỏng với các hệ dung môi có độ phân cực tăng dần để thu được 4 cao chiết phân đoạn *n*-hexan (GLH), ethyl acetat (GLE), *n*-butanol (GLB) và cao phân đoạn nước (GLW) Trên cơ sở kết quả sàng lọc tác dụng chống viêm *in vitro* trên mô hình tế bào RAW264.7 của cao chiết tổng và 4 cao chiết phân đoạn, luận án đã lựa chọn cao phân đoạn ethyl acetat (GLE), phân đoạn thể hiện hoạt tính tốt nhất trong tất cả các thử nghiệm để tiếp tục nghiên cứu tìm kiếm hợp chất có tiềm năng chống viêm.

Trong quá trình nghiên cứu thành phần hóa học cao phân đoạn ethyl acetat, luận án chỉ thu được các hợp chất flavonoid đơn giản và một số hợp chất triterpenoid (các hợp chất triterpenoid rất kém tan và khó phân tách). Thành phần hóa học cao phân đoạn ethyl acetat không đủ dung lượng và tính mới cho luận án. Do đó, luận án đã mở rộng nghiên cứu về thành phần hóa học của các cao phân đoạn khác cũng thể hiện tác dụng trên một số tín hiệu viêm (cao phân đoạn *n*-BuOH và cao phân đoạn nước). Qua khảo sát, cao phân đoạn nước rất phân cực, chứa nhiều đường tự do và muối nên khó phân tách. Bởi vậy, trong khuôn khổ thời gian và kinh phí, luận án tập trung phân lập chất từ cao phân đoạn *n*-BuOH (GLB) nhằm làm giàu kết quả về hóa học và tìm kiếm tính mới, cũng như tìm hiểu tiềm năng chống viêm của các hợp chất này.

Phương pháp sử dụng để phân lập các hợp chất là sắc ký cột với các pha tĩnh để nhồi cột bao gồm: *silica gel* pha thường, pha đảo, sephadex LH-20 và diaion HP-20, kết hợp phương pháp sắc ký lớp mỏng để theo dõi vết chất và kiểm tra độ tinh khiết các hợp chất. Kết quả, luận án đã phân lập được 15 hợp chất từ Dây đòn gánh, bao gồm 6 hợp chất từ phân đoạn **GLB** và 9 hợp chất từ phân đoạn **GLE**.

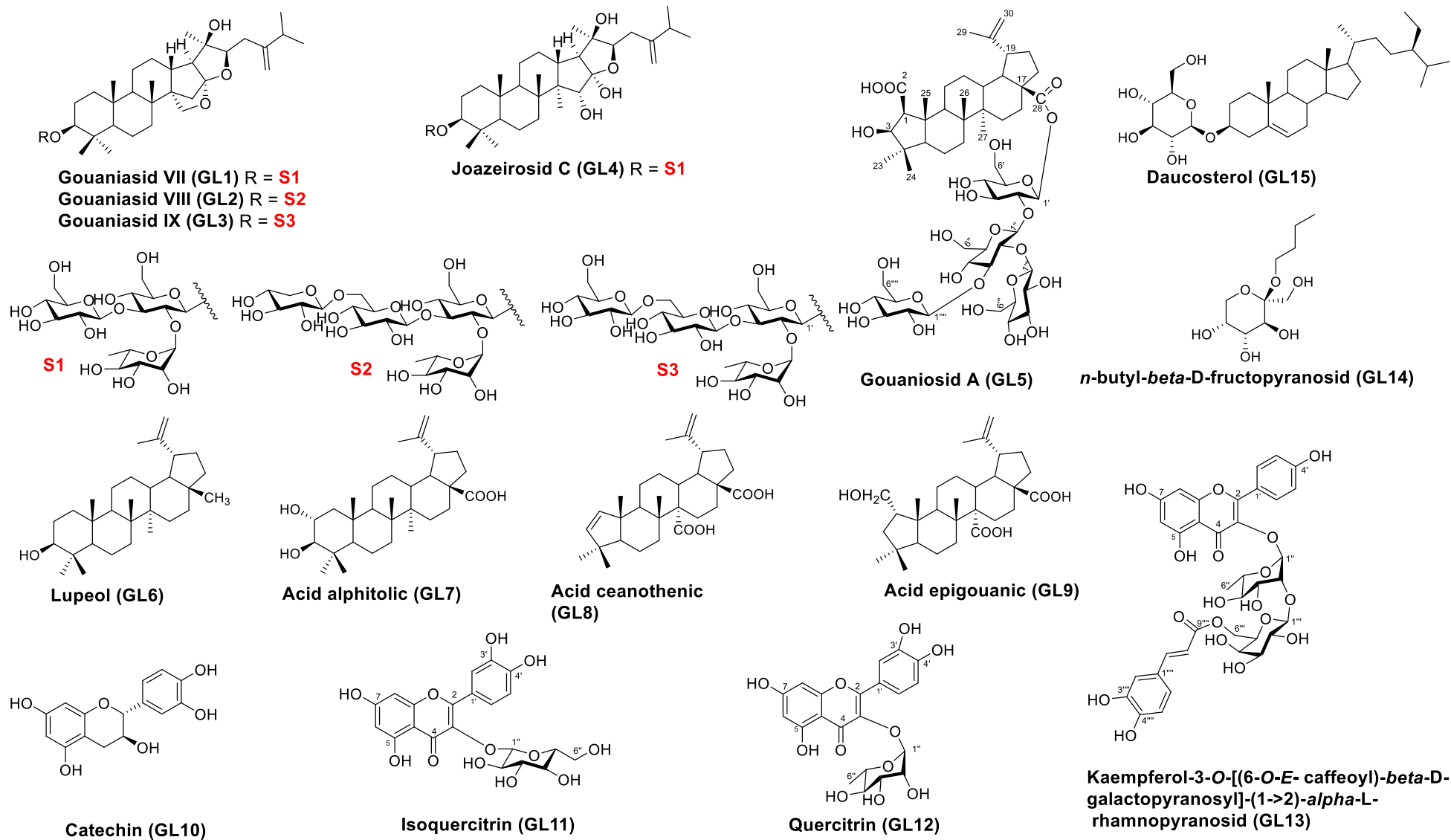
4.2.2.2. Về xác định cấu trúc các hợp chất

Cấu trúc của các hợp chất cũ được xác định bằng cách phân tích phổ cộng hưởng từ hạt nhân 1 chiều (^{13}C -NMR, ^1H -NMR, DEPT), 2 chiều (HSQC, HMBC, NOESY), phổ khối (ESI-MS) và so sánh với dữ liệu phổ của các hợp chất đã được công bố.

Cấu trúc của các hợp chất mới được xác định bằng phương pháp phân tích phổ cộng hưởng từ hạt nhân 1 chiều (^{13}C -NMR, ^1H -NMR, DEPT), 2 chiều (HSQC, HMBC, COSY, NOESY), phổ khối phân giải cao (HR-ESI-MS) và so sánh với dữ liệu phổ của các hợp chất đã được công bố.

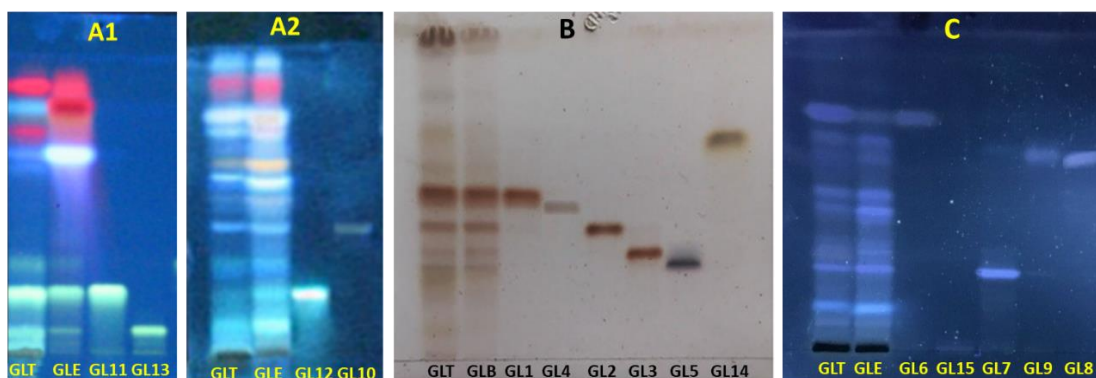
Luận án đã xác định được cấu trúc của 15 hợp chất phân lập từ Dây đòn gánh, bao gồm 5 hợp chất saponin triterpenoid, 4 hợp chất flavonoid, 4 hợp chất triterpenoid và 2 hợp chất khác (Hình 4.59). Kết quả này hoàn toàn logic với kết quả định tính sơ bộ các nhóm chất trong dược liệu Dây đòn gánh, đồng thời phù hợp với tổng quan về các lớp chất chính của các loài thuộc chi *Gouania*.

Đặc biệt, 5 hợp chất saponin là những chất mới, gồm **gouaniasid VII (GL1)**, **gouaniasid VIII (GL2)**, **gouaniasid IX (GL3)**, **joazeirosid C (GL4)** và **gouaniosid A (GL5)**. 5 hợp chất lần đầu được phân lập từ chi *Gouania* gồm 4 flavonoid: **catechin (GL10)**, **quercitrin (GL12)**, **isoquercitrin (GL11)**, **kaempferol-3-O-[(6-O-E-caffeoyl)- β -D-galactopyranosyl]-(1 \rightarrow 2)- α -L-rhamnopyranosid (GL13)** cùng với 1 hợp chất fructosid, ***n*-butyl- β -D-fructopyranosid (GL14)**. 3 hợp chất triterpenoid: **lupeol (GL6)**, **alphitolic acid (GL7)**, **epigouanic acid (GL9)** lần đầu tiên được phân lập từ loài *G. leptostachya*. Đây là những đóng góp mới của luận án, giúp bổ sung cơ sở dữ liệu cho ngành hóa học các hợp chất thiên nhiên nói chung, cũng như chi *Gouania* và loài *G. leptostachya* DC. nói riêng. Cấu trúc các hợp chất phân lập được thể hiện tại hình 4.3.



Hình 4.3. Các hợp chất phân lập từ Dây đòn gánh *G. leptostachya* DC

Hình ảnh dấu vân tay sắc ký TLC các chất phân lập được từ Dây đòn gánh (hình 4.4) một lần nữa khẳng định saponin, flavonoid và triterpenoid là các nhóm chất chính của dược liệu này. Phân đoạn cao chiết *n*-butanol giàu hợp chất nhóm saponin trong khi phân đoạn cao chiết ethyl acetat giàu hợp chất nhóm flavonoid và triterpenoid. Đồng thời, từ hình ảnh sắc ký đồ sắc ký lớp mỏng có thể dễ dàng nhận thấy hợp chất **GL6 (lupeol)**, **GL7 (acid alphitolic)**, **GL9 (acid epigouanic)**, **GL11 (isoquercitrin)** là thành phần chính của phân đoạn cao ethyl acetat còn các hợp chất saponin **GL1 (gouaniasid VII)**, **GL2 (gouaniasid VIII)** và **GL5 (gouaniosid A)** là thành phần chính của phân đoạn *n*-butanol. Đây cũng là các vết chất chính của cao toàn phần ethanol 96 %. Các kết quả này là một trong những cơ sở gợi ý việc lựa chọn hợp chất đánh dấu cho dược liệu Dây đòn gánh khi tiêu chuẩn hóa dược liệu này.



Hình 4.4. Hình ảnh sắc ký lớp mỏng các hợp chất phân lập từ Dây đòn gánh
A1, A2: Sắc ký đồ TLC nhóm flavonoid quan sát dưới UV 366 nm sau khi phun thuốc thử hỗn hợp acid boric: acid oxalic (tỷ lệ 2/1) 10 %/ nước; B: sắc ký đồ TLC nhóm saponin quan sát dưới ánh sáng thường sau khi phun thuốc thử dung dịch acid sulfuric 10 % trong ethanol; C: sắc ký đồ TLC nhóm triterpenoid quan sát dưới UV 366 nm sau khi phun thuốc thử dung dịch acid sulfuric 10% trong ethanol

4.2.2.3. Về nhóm hợp chất saponin và triterpenoid phân lập được

➤ Về các hợp chất saponin đã phân lập

Bốn trong năm hợp chất saponin phân lập từ Dây đòn gánh có khung agylcon dạng dammaran tương tự các hợp chất saponin đã được báo cáo có mặt ở chi *Gouania* [4], [29]. Các hợp chất đều là những hợp chất mới, được đề xuất gọi tên là gouaniasid VII (**GL1**), gouaniasid VIII (**GL2**), gouaniasid IX (**GL3**) và joazeirosid C (**GL4**).

Ba hợp chất gouaniasid VII (**GL1**), gouaniasid VIII (**GL2**) và gouaniasid IX (**GL3**) có cùng một khung aglycon là đồng phân nối đôi của aglycon của hợp chất gouaniasid VI được phân lập từ loài *G. longipetala* [29]. Khác biệt giữa hai aglycon này nằm ở phần mạch nhánh. Nối đôi tại vị trí $\Delta^{25,26}$ ở hợp chất gouaniasid VI đã chuyển dịch sang vị trí $\Delta^{24,31}$ ở các hợp chất gouaniasid VII-IX tạo nên khung $16\beta,22\beta:16\alpha,18$ -diepoxy-24-methyliden-dammaran- $3\beta,20$ -diol. Khung cấu trúc này cũng được tìm thấy ở một số loài khác trong họ Táo ta (Rhamnaceae). Từ loài *Ziziphus glaziovii* thuộc chi *Ziziphus*, các nhà khoa học đã phát hiện hai hợp chất saponin có khung aglycon tương tự là $16\beta,22:16\alpha,30$ -diepoxydammar-24-en- $3\beta,20$ -diol-3-*O*- α -L-arabinopyranosyl-(1-2)-[(4-sodium-sulfat)- β -D-glucopyranosyl-(1-3)]- α -L-arabinopyranosid và $16,22:16,30$ -diepoxy-20-hydroxydammar-24-methyliden 3-*O*- β -D-apiofuranosyl-(1-3)-*O*-[6-(3-methoxy-4-hydroxybenzoat)- β -D-glucopyranosyl-(1-2)]- β -D-glucopyranosyl-(1-2)-glucopyranosid [106].

Hợp chất joazeirosid C (**GL4**) có cùng khung aglycon joazeirogenin với hợp chất joazeirosid A được nhóm tác giả Nguyễn Thị Kim Thúy công bố có mặt ở loài *G. leptostachya* [4]. Một số loài khác thuộc họ Táo ta cũng được báo cáo chứa saponin cùng khung aglycon này như hợp chất joazeirosid A và joazeirosid B ở loài *Ziziphus joazeiro* [107] và $16,22$ -epoxy- $15,16,20$ -trihydroxydammar-24-methyliden 3-*O*- β -D-apiofuranosyl-(1 \rightarrow 3)-*O*-[6-(3-methoxy-4-hydroxybenzoat)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)]- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-glucopyranosid ở loài *Ziziphus glaziovii* [106]. Điểm khác biệt giữa khung joazeirogenin và aglycon của các hợp chất gouaniasid VII-IX là có sự mở vòng epoxy ở vị trí 18, do vậy xuất hiện thêm một nhóm methyl và mất đi một nhóm methylen, đồng thời có thêm một nhóm OH tại vị trí C-15.

Hợp chất saponin thứ 5 là gouaniosid A (**GL5**) có khung aglycon là acid epiceanothic. Phần genin của hợp chất này có cấu trúc C_{29} norlupan triterpenoid tương tự hai hợp chất triterpenoid đã phân lập được là acid ceanothenic (**GL8**) và acid epigouanic (**GL9**). Acid epiceanothic đã được phát hiện có mặt ở nhiều loài thuộc chi *Ziziphus* trong họ Táo ta (Rhamnaceae) như *Ziziphus jujuba* [108], *Ziziphus glaziovii* [106], *Ziziphus mauritiana* [109] nhưng đây là lần đầu tiên dạng glycosid của hợp chất

này được biết đến.

Như vậy, có mối tương đồng rõ nét về thành phần hóa học của loài *G. leptostachya* với các loài thuộc chi *Gouania* cũng như họ Táo ta (Rhamnaceae) khi các hợp chất saponin phân lập được đều mang cấu trúc đặc trưng cho chi *Gouania* và họ Táo ta. Cho đến nay, các nhà khoa học vẫn chưa khám phá được tác dụng đáng chú ý nào của các hợp chất saponin có cấu trúc tương tự các hợp chất luận án đã phân lập được. Bởi các hợp chất này đều là hợp chất mới tại thời điểm công bố và chưa được nghiên cứu nhiều về tác dụng sinh học.

➤ *Về các hợp chất triterpenoid đã phân lập*

Bốn hợp chất triterpenoid mà luận án đã phân lập được gồm 2 hợp chất khung lupan (**GL6**, **GL7**) và 2 hợp chất khung ceanothan với vòng A nằm cạnh (**GL8**, **GL9**). Cả bốn hợp chất triterpenoid này đều đã được tìm thấy ở các loài khác thuộc chi *Gouania* như *G. longipetala* và *G. ulmifolia* [29] cũng như có mặt ở các chi khác trong họ Táo ta (Rhamnaceae) như chi *Ziziphus* [96], [110].

- *Lupeol (GL6) và acid alphaltolic (GL7)*

Lupeol (**GL6**) và acid alphaltolic (**GL7**) là hai hợp chất triterpenoid khung lupan, do vậy cấu trúc của chúng khá tương đồng. Sự khác biệt về cấu trúc của hai hợp chất nằm ở nhóm thế tại vị trí C-2 và C-28. Khác với lupeol, acid alphaltolic có thêm một nhóm thế hydroxyl tại vị trí C-2, đồng thời nhóm methyl tại C-28 được thay bằng nhóm carboxyl.

Lupeol đã được biết đến từ lâu với nhiều tác dụng đáng quý như: chống viêm, chống ung thư, chống oxy hóa, kháng khuẩn và bảo vệ da [111]. Lupeol được chứng minh có tác dụng chống viêm theo một loạt cơ chế như làm giảm sản xuất các cytokin tiền viêm (TNF- α , IL-2, IL-1 β , IL-6, iNOS, NO), làm giảm biểu hiện các gen và protein liên quan đến viêm (TLR4/MyD88/NF- κ B P65) [111]. Điều thú vị ở đây là lupeol lại là hợp chất phân lập được với khối lượng nhiều nhất và cũng thể hiện là hợp chất chính trên sắc ký đồ sắc ký lớp mỏng (hình 4.4). Như vậy, lupeol có thể là hợp chất có nhiều đóng góp trong việc tạo nên tác dụng của cao chiết phân đoạn ethyl acetat cũng như tác dụng của cao chiết toàn phần trên các mô hình sàng lọc tác dụng chống viêm *in vitro*.

Một số nghiên cứu trước đây cho biết acid alphitolic là một hợp chất chống viêm tiềm năng. Acid alphitolic được chứng minh có tác dụng chống viêm tại chỗ trên mô hình chuột bị gây viêm tai bằng 12-*O*-tetradecanoylphorbol 13 acetat (TPA) [112]. Trên các thử nghiệm *in vitro*, acid alphitolic thể hiện tác dụng ức chế sản sinh NO và TNF- α với giá trị IC₅₀ lần lượt là 17,6 và 22,7 μ M. Acid alphitolic cũng được chứng minh có tác dụng kháng khối u, ức chế sự tăng sinh tế bào SCC4 và SCC2095 OSCC với giá trị IC₅₀ lần lượt là 12 và 15 μ M [113]. Ngoài ra, hợp chất này còn có tác dụng kháng khuẩn trên các chủng vi khuẩn *S. aureus*, *S. epidermidis* với giá trị MIC là 32 μ g/ml [96] và trên chủng vi khuẩn *B. subtilis* với giá trị MIC 22 μ M [106].

- Acid ceanothenic (**GL8**) và acid epigouanic (**GL9**)

Đại diện đầu tiên của triterpenoid vòng A năm cạnh được biết đến trong tự nhiên là acid ceanothic, do Julian phân lập từ vỏ thân loài *Ceanothus americanus* (họ Táo ta) vào năm 1938 [114]. Sau đó, acid ceanothic cùng với các dẫn xuất của nó đã được tìm thấy ở nhiều loài thuộc các họ thực vật khác nhau. Phần lớn trong số đó được phân lập từ họ táo ta (Rhamnaceae) và nhiều hợp chất đã được sử dụng làm chất đánh dấu cho các loài thuộc họ này [115]. Luận án đã phân lập được hai hợp chất nhóm ceanothan triterpenoid là acid ceanothenic (**GL8**) và acid epigouanic (**GL9**). Hai hợp chất này chỉ có một số khác biệt nhỏ về cấu trúc thuộc vòng A. So với acid ceanothenic (**GL8**), acid epigouanic (**GL9**) không còn nối đôi tại $\Delta^{2,3}$ và xuất hiện thêm nhóm thế hydroxylmetylen tại vị trí C-1.

Hợp chất acid ceanothenic lần đầu tiên được phân lập từ loài *Cenaothus americanus* vào năm 1962 [116]. Nghiên cứu của L. Yu và cộng sự (2012) chỉ ra acid ceanothenic có tác dụng ức chế sản sinh NO và TNF- α [108]. Ngoài ra, acid ceanothenic còn có tác dụng gây độc tế bào trên một số dòng tế bào ung thư như: tế bào Hela với giá trị IC₅₀ 7,55 μ g/ml [117], tế bào KB với IC₅₀ 2,6 μ M [118]. Hợp chất này cũng được chứng minh có tác dụng kháng khuẩn trên các chủng vi khuẩn *Staphylococcus aureus* và *Enterococcus faecalis* với giá trị MIC lần lượt là 8 và 16 μ g/mL [118].

Các nghiên cứu đã công bố về tác dụng sinh học của acid epigouanic chủ yếu xoay quanh tác dụng kháng khuẩn. Acid epigouanic được báo cáo có tác dụng kháng chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* với giá trị MIC 12 μ M [106].

4.2.2.4. Về nhóm hợp chất flavonoid phân lập được

Từ cao phân đoạn ethyl acetat (GLE), luận án đã phân lập được 4 hợp chất flavonoid bao gồm 1 hợp chất flavan-3-ol là catechin (GL10) và 3 hợp chất flavonol là quercitrin (GL12), isoquercitrin (GL11) và kaempferol-3-*O*-[(6-*O*-*E*-caffeoyl)- β -D-galactopyranosyl]-(1 \rightarrow 2)- α -L-rhamnopyranosid (GL13). Đây là công trình đầu tiên công bố sự có mặt của các hợp chất này trong loài *G. leptostachya* DC. var. *tonkinensis* Pitard.

Nhóm chất flavonoid từ lâu đã thu hút các nhà khoa học quan tâm nghiên cứu và được chỉ ra có nhiều tác dụng sinh học, trong đó nổi trội nhất là tác dụng chống viêm và tác dụng chống oxy hóa. Nghiên cứu của So-Jin Choi và cộng sự cho thấy isoquercitrin và quercitrin thể hiện khả năng ức chế phản ứng viêm trên đại thực bào RAW264.7 bị kích thích viêm bởi LPS. Quercitrin và isoquercitrin ngăn chặn sự phosphoryl hóa I κ B và ức chế giải phóng NF- κ B từ phức hợp NF- κ B/ I κ B, từ đó làm giảm vận chuyển p-NF- κ B từ bào tương vào trong nhân tế bào dẫn đến giảm biểu hiện gen iNOS và COX-2. Nghiên cứu cũng tiết lộ rằng isoquercitrin và quercitrin có khả năng dọn gốc tự do peroxy, hydroxyl [119].

Catechin cũng là một hoạt chất chống viêm tiềm năng theo nhiều con đường khác nhau. Catechin ức chế sự biểu hiện của các cytokin tiền viêm như IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-12p35 và làm giảm biểu hiện mRNA của các enzyme iNOS, COX-2 phụ thuộc vào nồng độ ở khoảng 10-100 μ g/ml. Catechin nồng độ 100 μ g/ml làm giảm biểu hiện mRNA của các enzyme iNOS và COX-2 lần lượt là hơn 60% và 80%. Catechin cũng ức chế hoạt động của NF- κ B, AMPK, FOXO3a và SIRT1 nhưng lại làm tăng phosphoryl hóa các nhân tố trên, tăng biểu hiện của các cytokin IL-4 và IL-10 [120]. Ngoài tác dụng chống viêm, catechin còn được chứng minh có khả năng chống tiểu đường, chống ung thư, kháng khuẩn, chống viêm khớp, bảo vệ gan và tăng cường trí nhớ [121].

4.2.2.5. Về các hợp chất khác phân lập được

Daucosterol (GL15) là một saponin steroid có mặt rộng rãi trong giới thực vật đã được các nhà khoa học chứng minh có nhiều tác dụng sinh học. Daucosterol thể hiện tác dụng chống viêm *in vitro* thông qua các con đường ức chế sản sinh NO và các cytokin

tiền viêm TNF- α , IL-6 trên đại thực bào RAW264.7 bị kích thích gây viêm bởi LPS. Hợp chất này có khả năng chống oxy hóa với các tác nhân oxy hóa DPPH, H₂O₂, ABTS và FRAP. Daucosterol cũng được biết đến với khả năng gây độc tế bào trên các dòng tế bào ung thư vú (MCF-7), ung thư dạ dày (MGC803, BGC823 và AGS), ung thư tuyến tiền liệt (PC3 và LNCap). Ngoài ra, một số tác dụng khác của daucosterol đã được báo cáo như tăng cường miễn dịch, chống đái tháo đường [122].

n-Butyl- β -D-fructopyranosid (**5**) là một hợp chất fructosid có tác dụng kháng khuẩn trên các chủng vi khuẩn *Xanthomonas axonopodis*, *Pectobacterium carotovorum*, *P. crhysanthemi* và *Erwinia amylovora* (MIC = 0,625 mg/ml) [123].

Như vậy, những hiểu biết khoa học đạt được cho đến nay về tác dụng sinh học của các hợp chất triterpenoid và flavonoid đã phân lập cho thấy tiềm năng chống viêm của các hợp chất này. Cao chiết phân đoạn ethyl acetat (**GLE**) lại giàu các nhóm chất này, đồng thời sắc ký đồ TLC cũng chỉ ra các hợp chất triterpenoid và flavonoid phân lập được là các vết chính trên sắc ký đồ (hình 4.4). Điều đó bước đầu lý giải cho việc cao phân đoạn **GLE** thể hiện tác dụng tốt nhất trên các mô hình sàng lọc tác dụng chống viêm *in vitro*.

4.3. VỀ TÁC DỤNG CHỐNG VIÊM CỦA DÂY ĐÒN GÁNH

4.3.1. Về lựa chọn đích nghiên cứu tác dụng sinh học và kỹ thuật sử dụng

Kho tri thức y học dân tộc là một trong những gợi ý đầu tiên để định hướng nghiên cứu tác dụng sinh học của một cây thuốc. Trong dân gian, Dây đòn gánh thường được dùng để chữa sưng tấy, đau nhức, phù nề, sốt [1], [2], [40], [124], đây là những triệu chứng điển hình của viêm. Bên cạnh đó, nghiên cứu dược lý hiện đại cũng bước đầu cho thấy tác dụng chống viêm *in vitro* của cao chiết methanol Dây đòn gánh trên một loạt tín hiệu viêm [6]. Ngoài ra, tổng quan tài liệu (mục 1.1.2 và 1.1.3) cho thấy, flavonoid, saponin và triterpenoid là các thành phần chính và mang lại nhiều tác dụng dược lý cho các loài thuộc chi *Gouania*. Trong đó, tiềm năng chống viêm của nhiều hợp chất đã được công bố. Đó chính là các cơ sở khoa học cho việc luận án tiến hành đánh giá tác dụng chống viêm của dược liệu Dây đòn gánh.

Sau khi bị kích thích, các tế bào đại thực bào sản xuất ra một loạt các prostaglandin (PG), các chất trung gian gây viêm như oxid nitric (NO), các cytokin viêm

bao gồm yếu tố hoại tử khối u (TNF- α) và các interleukin (IL) [125]. NO liên quan đến cả viêm cấp tính và viêm mạn tính [126]. NO làm giãn mạch máu và tăng huyết áp – biểu hiện của sốc nhiễm khuẩn trong diễn biến viêm cũng như tác động vào quá trình sinh bệnh viêm khớp, viêm ruột, viêm phổi [34]. IL-1, IL-6, TNF- α tham gia vào quá trình giãn mạch, gây phù nề, tăng tính thấm thành mạch và gián tiếp gây sốt. TNF- α cũng đóng vai trò thúc đẩy phản ứng viêm do đó gây ra nhiều vấn đề lâm sàng liên quan đến rối loạn tự miễn như viêm khớp dạng thấp, viêm ruột, vẩy nến... PGE₂ làm tăng tính thấm thành mạch, gây sốt, phù nề, đỏ và làm tăng cảm giác đau.

Chính bởi các chất trung gian đóng vai trò quan trọng trong đáp ứng viêm nên chúng trở thành các đích nghiên cứu khi thiết kế mô hình đánh giá khả năng chống viêm *in vitro*. Về bản chất, phần lớn các chất trung gian này là các protein (COX-2, PGE₂, iNOS, các IL và TNF- α) nên có thể được định tính và định lượng dựa trên nguyên tắc phản ứng kháng nguyên – kháng thể. Nồng độ các protein trên trong dịch tế bào được phân tích bằng phương pháp Western Blot [127], [66], [128] hoặc bộ kit ELISA [129], [128]. Một kỹ thuật khác cũng thường được sử dụng là định lượng mRNA của TNF- α , COX-2, iNOS bằng RT-PCR qua đó đánh giá mức độ ức chế biểu hiện gen của mẫu thử [67], [68], [66].

Để sàng lọc và nghiên cứu tác dụng chống viêm của Dây đon gánh, luận án lựa chọn sử dụng mô hình *in vitro* đánh giá ảnh hưởng của cao chiết và các chất tinh khiết lên sự sản sinh PGE₂, NO và các cytokin tiền viêm IL-1 β , IL-6 và mức độ biểu hiện của COX-2 trên dòng tế bào đại thực bào RAW264.7 được kích thích viêm bởi LPS, với kỹ thuật đo lường là Western Blot, ELISA và định lượng RT-PCR [128], [125], [69].

4.3.2. Về lựa chọn mẫu thử tác dụng và quy trình thử nghiệm

Luận án được thực hiện theo hướng nghiên cứu phân lập chất theo định hướng tác dụng sinh học, một cách tiếp cận phổ biến hiện nay khi nghiên cứu hóa hợp chất thiên nhiên, giúp tiết kiệm đáng kể thời gian và chi phí. Bởi vậy, nghiên cứu tác dụng sinh học cũng được thiết kế qua hai bước. Ở bước đầu tiên, cao chiết tổng (GLT) cùng các cao chiết phân đoạn (GLH, GLE, GLB, GLW) được sàng lọc tác dụng chống viêm trên một số mô hình *in vitro* để tìm ra cao phân đoạn có tiềm năng chống viêm, phục vụ nghiên cứu thành phần hóa học cũng như các nghiên cứu tiếp theo về tác dụng sinh học.

Ở bước nghiên cứu tiếp theo, các hợp chất tinh khiết đã phân lập lại được sàng lọc tác dụng chống viêm trên các mô hình *in vitro* tương tự bước sàng lọc cao chiết, nhằm tìm hiểu tác dụng của các hợp chất này và lựa chọn hợp chất tiềm năng cho nghiên cứu rộng hơn trên các đích chống viêm khác. Luận án đã phân lập được 15 hợp chất, trong đó có 3 nhóm chất chính: nhóm saponin (hợp chất **GL1-5**) phân lập từ phân đoạn **GLB**, nhóm triterpenoid (hợp chất **GL6-9**) và flavonoid (hợp chất **GL10-13**) phân lập từ phân đoạn **GLE**. Như đã đề cập trong phần bàn luận về thành phần hóa học của loài Dây đòn gánh, các hợp chất flavonoid là quercitrin, isoquercitrin, catechin đã được chứng minh tác dụng chống viêm, chống oxy hóa tốt trong rất nhiều nghiên cứu trước đó. Một số hợp chất thu được với khối lượng ít và bị hao hụt khối lượng bởi các thí nghiệm trước đó. Bởi vậy, luận án chỉ tập trung nghiên cứu tác dụng chống viêm của hai nhóm hợp chất: saponin (chất mới) (**GL1-3, GL5**) và triterpenoid (**GL6-9**).

4.3.3. Về kết quả sàng lọc tác dụng chống viêm *in vitro* của cao chiết tổng và các cao chiết phân đoạn từ Dây đòn gánh

Công trình công bố năm 2015 của Tô Thị Mai Dung đã tiết lộ tiềm năng chống viêm của cây Dây đòn gánh. Tác giả nghiên cứu khả năng chống viêm *in vitro* của cao chiết methanol từ cành và lá loài *G. leptostachya* thông qua khả năng ức chế sản sinh một số chất trung gian của phản ứng viêm như NO, PGE₂, iNOS, COX-2 trên đại thực bào RAW264.7 và đại thực bào phức tạp bị kích thích gây viêm bởi LPS, đồng thời đánh giá sâu hơn trên một số đích phân tử. Kết quả cho thấy, cao chiết methanol ở nồng độ 200 và 300 µg/ml có tác dụng ức chế sản sinh NO và PGE₂, nồng độ 50 và 300 µg/ml làm giảm rõ rệt biểu hiện mRNA của iNOS và COX-2, ức chế chuyển p65 vào nhân tế bào, ức chế các enzym ngược dòng hoạt hóa quá trình phosphoryl hóa p65 như protein kinase B (AKT), κBα kinase (IKK), chất ức chế κB (IκBα) và hoạt động enzym của Src [6]. Bằng phương pháp HPLC, nghiên cứu đã chỉ ra resveratrol là một trong số các thành phần chính của cao chiết methanol Dây đòn gánh, với hàm lượng khoảng 0,017 %. Nghiên cứu còn cho biết hợp chất này thể hiện tác dụng ức chế sản sinh NO ở nồng độ 25, 50 và 100 µM, cũng như ức chế hoạt động của Src kinase ở nồng độ 50, 100 µM và làm giảm các triệu chứng viêm dạ dày gây ra bởi dung dịch HCl/EtOH ở chuột tại mức liều 50 mg/kg. Theo tác giả, resveratrol có thể là thành phần chống viêm chính của cao

methanol Dây đòn gánh. Tuy nhiên, với mức hàm lượng như trên, khi sử dụng cao chiết ở nồng độ thử cao nhất là 300 µg/ml, nồng độ resveratrol trong mẫu cũng chỉ đạt khoảng 0,05 µg/ml (tương đương khoảng 0,22 µM), thấp hơn rất nhiều so với nồng độ có tác dụng của resveratrol. Do đó, resveratrol khó có thể mang lại nhiều lợi ích chống viêm cho cao chiết như tác giả nhận định. Như vậy, thành phần mang lại hoạt tính chống viêm cho loài Dây đòn gánh vẫn chưa thực sự sáng tỏ.

Trong nghiên cứu này, luận án tiếp cận theo hướng khác với mong muốn từ kết quả sàng lọc tác dụng chống viêm *in vitro* có thể định hướng phân lập được hợp chất có tác dụng chống viêm. Luận án lựa chọn dung môi ethanol 96%, có độ phân cực tương đương methanol nhưng ít độc để chuẩn bị mẫu thử. Kết quả sàng lọc tác dụng chống viêm *in vitro* cũng ghi nhận kết quả tương tự khi cao chiết ethanol 96% (**GLT**) ức chế sản sinh PGE₂ và NO đạt ý nghĩa thống kê lần lượt ở các nồng độ 20 µg/mL và 25 µg/mL. Đặc biệt, tác dụng thể hiện ở mức nồng độ thấp hơn so với nghiên cứu của Tô Thị Mai Dung.

Luận án đã phân đoạn cao chiết tổng thành 4 cao phân đoạn có độ phân cực tăng dần (**GLH**, **GLE**, **GLB** và **GLW**) và tìm hiểu tác dụng chống viêm *in vitro* của các cao phân đoạn này. Kết quả cho thấy, cao phân đoạn ethyl acetat (**GLE**) thể hiện tác dụng tốt nhất trên tất cả các mô hình thử nghiệm. Cụ thể, cao **GLE** có tác dụng ức chế sản sinh PGE₂, IL-1 β , IL-6, làm giảm biểu hiện mRNA và protein COX-2, ức chế hoạt động COX-2 luciferase ở nồng độ 20 µg/mL; ức chế sản sinh NO (nồng độ 1, 5, 25 µg/mL). Điều này có thể được lý giải bởi cao **GLE** chứa nhiều thành phần mang hoạt tính chống viêm. Kết quả nghiên cứu chiết xuất phân lập ghi nhận 4 hợp chất triterpenoid (**GL6-9**) và 4 hợp chất flavonoid (**GL10-13**) từ cao **GLE**. Trong khi các hợp chất flavonoid như catechin (**GL10**), isoquercitrin (**GL11**), quercitrin (**GL12**) đã được nghiên cứu khá đầy đủ và cho thấy có tác dụng chống viêm đáng chú ý [119], [120], các hợp chất triterpenoid còn lại gồm lupeol (**GL6**), acid ceanothenic (**GL7**), acid aliphitic (**GL8**) và acid epigouanic (**GL9**) cũng được luận án chứng minh có tác dụng chống viêm *in vitro* thông qua ức chế PGE₂, NO, IL-1 β , IL-6 và COX-2. Đồng thời, khi kiểm tra dấu vân tay sắc ký TLC, các hợp chất này đều là những vết chính trên sắc ký đồ của cao phân đoạn **GLE**

(hình 4.4). Như vậy có thể nhận định, các hợp chất này đã mang lại tác dụng chống viêm cho cao phân đoạn **GLE**.

Hai cao phân đoạn có tác dụng đáng chú ý tiếp theo là cao *n*-butanol (**GLB**) và cao phân đoạn nước (**GLW**), cùng thể hiện tác dụng ức chế sản xuất NO (nồng độ 5 và 25 $\mu\text{g/mL}$) và IL-1 β (nồng độ 20 $\mu\text{g/mL}$). Cao **GLB** cũng làm giảm sự sản sinh IL-6 và PGE₂, tuy nhiên chưa đủ đạt ý nghĩa thống kê. Theo gợi ý từ tổng quan, cao **GLB** có thể giàu nhóm chất phân cực là saponin, nhóm chất đặc trưng của chi *Gouania* với nhiều tiềm năng nghiên cứu còn bỏ ngỏ. Bởi vậy, cao phân đoạn **GLB** được lựa chọn cho nghiên cứu phân lập chất. Bốn trong số năm hợp chất saponin đã phân lập (**GL1-3, GL5**) được khảo sát khả năng chống viêm *in vitro* và thể hiện tác dụng ở mức độ khác nhau, trên các tín hiệu viêm NO, PGE₂, IL-1 β , IL-6 và COX-2. Mặt khác, kết quả định tính bằng sắc ký lớp mỏng (hình 4.4) cũng cho biết các hợp chất này là các vết chính trên sắc ký đồ TLC của cao **GLB**. Do đó, các hợp chất này có thể là thành phần đóng góp vai trò quan trọng cho hoạt tính chống viêm *in vitro* của cao phân đoạn **GLB**.

Những kết quả tác dụng chống viêm *in vitro* của các cao chiết phân đoạn và cao chiết tổng đã đóng góp hiểu biết mới về tác dụng chống viêm *in vitro* của dược liệu Dây đòn gánh.

4.3.4. Về kết quả đánh giá tác dụng chống viêm *in vitro* của các hợp chất tinh khiết từ cây Dây đòn gánh

Sàng lọc tác dụng chống viêm *in vitro* của các hợp chất tinh khiết trên các chỉ tiêu đánh giá PGE₂, IL-1 β , IL-6 và NO cho thấy, hợp chất **GL7** và **GL9** là 2 hợp chất thể hiện tác dụng tốt nhất trên 3 trong số 4 chỉ tiêu đánh giá (PGE₂, IL-1 β , và IL-6). Hợp chất **GL5** ở nồng độ 10 μM là một trong ba hợp chất thể hiện tác dụng ức chế PGE₂ tốt nhất (ức chế sản sinh PGE₂ trên 50 %). Ở nồng độ 25 μM , **GL5** cũng là một trong ba hợp chất thể hiện tác dụng ức chế sản sinh NO tốt nhất (ức chế sản sinh NO trên 50 %). Hợp chất **GL1** và **GL2** thể hiện tác dụng ức chế sản sinh NO tốt ở nồng độ 25 μM (ức chế sản sinh NO trên 50 %), tuy nhiên tác dụng trên các chỉ tiêu còn lại không nổi bật (**GL1**, tỉ lệ ức chế dưới 50 %) hoặc không thể hiện tác dụng (**GL2**). Các hợp chất còn lại (**GL3, GL6, GL8**) thể hiện tác dụng không mạnh trên một số chỉ tiêu đánh giá. Do

vậy, sau bước sàng lọc tác dụng của các hợp chất, luận án đã lựa chọn 3 hợp chất tiềm năng nhất là **GL5**, **GL7** và **GL9** để tiếp tục đánh giá khả năng chống viêm *in vitro* trên các chỉ tiêu khác.

Kết quả đánh giá tác dụng của các hợp chất **GL5**, **GL7**, **GL9** về khả năng ức chế biểu hiện mRNA COX-2, biểu hiện protein COX-2 và ức chế hoạt động COX-2 luciferase cho thấy, hợp chất **GL7** là hợp chất có tác dụng nổi trội nhất (ức chế trên 50 % ở cả 3 thí nghiệm). Do vậy, **GL7** đã được lựa chọn tiếp tục nghiên cứu tác dụng theo nồng độ trên các đích chống viêm trên.

Tác dụng chống viêm *in vitro* của các hợp chất tinh khiết phân lập từ Dây đon gánh trên mô hình tế bào RAW264.7 được tóm tắt trong bảng 4.2.

Bảng 4.2. Tóm tắt kết quả thử tác dụng chống viêm *in vitro* của các hợp chất tinh khiết phân lập từ Dây đòn gánh

Bước	1. Sàng lọc					2. Thử tác dụng của các hợp chất tiềm năng trên chỉ tiêu khác			3. Đánh giá tác dụng của hợp chất tiềm năng nhất theo nồng độ					
	Ức chế PGE ₂	IL-1 β	IL-6	NO		mARN COX-2	COX-2 luciferase	Protein COX-2	PGE ₂		mARN COX-2		Protein COX-2	
Nồng độ Hợp chất	10 μ M	10 μ M	10 μ M	5 μ M	25 μ M	10 μ M	10 μ M	10 μ M	3 μ M	10; 30 μ M	3 μ M	10; 30 μ M	3; 10 μ M	30 μ M
GL1	+	+	+	+	++									
GL2	-	-	-	+	++									
GL3	-	-	+	+	+									
GL5	++	-	-	+	++	++	+	-						
GL6	-	+	+	-	+									
GL7	++	+	+	+	+	++	++	++	+	++	+	++	+	++
GL8	-	+	+											
GL9	++	++	++			++	+	-						

Ghi chú: -: Không có tác dụng/tác dụng không đạt ý nghĩa thống kê; ++: ức chế trên 50%, đạt ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng LPS; +: ức chế dưới 50%, đạt ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng LPS; ô trống: mẫu không thử. GL1: Gouaniasid VII, GL2: Gouaniasid VIII, GL3: Gouaniasid IX, GL5: Gouaniosid A, GL6: Lupeol, GL7: Acid alphitolic, GL8: Acid ceanothenic, GL9: Acid epigouanic.

4.3.4.1. Về kết quả tác dụng chống viêm *in vitro* của các hợp chất triterpenoid (GL6-9)

➤ Về tác dụng chống viêm *in vitro* của lupeol (GL6)

Trong số các hợp chất triterpenoid đã phân lập và được thử tác dụng chống viêm, lupeol (**GL6**) là hợp chất rất đáng quan tâm do hợp chất này thu được khối lượng nhiều nhất (1 g). Lupeol từ lâu đã thu hút sự chú ý của các nhà khoa học bởi tiềm năng tác dụng sinh học của nó. Các công trình đã công bố cho thấy lupeol thể hiện tác dụng chống viêm trên cả mô hình *in vitro* và *in vivo*. Lupeol được chứng minh có tác dụng chống viêm *in vitro* thông qua ức chế một loạt chất trung gian của phản ứng viêm như TNF- α , IL-2, IL-1 β , IL-6, iNOS, NO, làm giảm biểu hiện các gen và protein liên quan đến viêm (TLR4/MyD88/NF- κ B P65) [111]. Nghiên cứu của Maria Angeles Fernández cho biết, trên đại thực bào phúc mạc bị kích thích gây viêm bởi LPS, lupeol làm giảm sản sinh PGE₂ so với nhóm chứng LPS 32 % ở nồng độ 10 μ M và 64 % ở nồng độ 100 μ M; giảm sản sinh TNF- α 33 % ở nồng độ 10 μ M và 67 % ở nồng độ 100 μ M; ức chế sản xuất IL-1 β 25 % ở nồng độ 10 μ M và 55 % ở nồng độ 100 μ M; ức chế sản sinh NO yếu, ở nồng độ 100 μ M ức chế sản sinh NO 60 % so với nhóm chứng LPS [135]. Theo công bố của J.A. Sánchez-Burgos (2015), lupeol có tác dụng ức chế chọn lọc COX-2 ở nồng độ 6 mg/mL (ức chế 45 %)[136]. Ngoài ra, lupeol cũng ức chế enzym 5-LOX với giá trị IC₅₀ là 69,26 \pm 1,39 μ g/mL [137].

Luận án đã khảo sát ảnh hưởng của lupeol (**GL6**) đến sự sản sinh PGE₂, IL-1 β , IL-6 và NO. Kết quả cho thấy, hợp chất này ức chế sản sinh IL-1 β (30,4 \pm 2,4 %), IL-6 (24,3 \pm 2,5 %) ở nồng độ 10 μ M, ức chế sản sinh NO (23,6 %) ở nồng độ 50 μ M và đều đạt ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$), nhưng chỉ làm giảm sản sinh PGE₂ 15,4 % và không đạt ý nghĩa thống kê ở nồng độ 10 μ M. Như vậy, kết quả này cũng tương tự kết quả nghiên cứu trước đã được công bố [135]. Một số khác biệt nhỏ có thể do sự khác nhau về dòng tế bào sử dụng. Tuy luận án đánh giá lại các tác dụng đã được chứng minh của lupeol, nhưng kết quả nghiên cứu giúp kiểm tra tính phù hợp của thí nghiệm này so với các công trình nghiên cứu trước đây. Đồng thời, lupeol cũng có thể coi là hợp chất tham chiếu để làm căn cứ so sánh tác dụng chống viêm của các hợp chất khác trong cùng điều kiện thí nghiệm.

➤ Về tác dụng chống viêm *in vitro* của acid alphaltolic (GL7)

Acid alphaltolic (**GL7**) là một dẫn xuất của acid betunilic. Một số công trình nghiên cứu trước đây cho biết acid alphaltolic có khả năng chống viêm mạnh. Theo kết quả nghiên cứu của M. C. Aguirre (2006), acid alphaltolic có tác dụng chống viêm tại chỗ mạnh trên mô hình chuột bị gây viêm tai bằng TPA. Liều 0,5 mg/tai, acid alphaltolic làm giảm tình trạng viêm $92,4 \pm 1,6$ %, tác dụng này tương đương với indomethacin ở cùng mức liều ($92,9 \pm 3,2$ %). Trên đại thực bào RAW264.7 bị kích thích viêm bằng LPS, acid alphaltolic được chứng minh có khả năng ức chế sản sinh NO và TNF- α với giá trị IC₅₀ lần lượt là 17,6 và 22,7 μ M [138]. Milena Masullo (2015) đánh giá ảnh hưởng của acid alphaltolic lên sự sản sinh NO và biểu hiện của iNOS trên đại thực bào J774.A1 bị kích thích viêm bằng LPS. Kết quả cho thấy, acid alphaltolic ức chế sản sinh NO và biểu hiện của iNOS một cách phụ thuộc nồng độ. Ở nồng độ 10, 25 và 100 μ M, tỉ lệ phần trăm ức chế NO so với nhóm chứng lần lượt là $88,50 \pm 0,70$ %, $93,50 \pm 0,70$ % và $98,50 \pm 0,70$ %; tỉ lệ ức chế biểu hiện iNOS lần lượt là $73,50 \pm 0,70$ %, $85,0 \pm 1,41$ % và $92,0 \pm 0,70$ % [139].

Tương tự các nghiên cứu trước của các tác giả đã công bố, khi sàng lọc tác dụng chống viêm *in vitro* của các hợp chất tinh khiết ở cùng mức nồng độ 10 μ M, trong số các hợp chất thử nghiệm, acid alphaltolic (**GL7**) cũng là hợp chất thể hiện tác dụng mạnh nhất. Acid alphaltolic (**GL7**) ức chế sản sinh PGE₂ phụ thuộc nồng độ trong khoảng 3, 10 và 30 μ M, tỉ lệ phần trăm ức chế so với nhóm LPS ở mức nồng độ cao nhất là $69,5 \pm 1,6$ %. Hợp chất cũng thể hiện tác dụng ức chế sản sinh IL-1 β , IL-6 (nồng độ 10 μ M), NO (nồng độ 2-50 μ M) rõ rệt, ức chế hoạt động gen COX-2 và làm giảm biểu hiện mRNA và protein của COX-2 phụ thuộc nồng độ trong khoảng 3, 10 và 30 μ M. Như vậy, với kết quả này, luận án đã tiếp tục chứng minh tiềm năng chống viêm của acid alphaltolic trên các tín hiệu viêm khác gồm IL-1 β , IL-6, PGE₂ và COX-2. Đây cũng là đóng góp mới của luận án.

Về mặt cấu trúc hóa học, acid alphaltolic có cấu trúc tương tự lupeol, ngoại trừ việc có thêm nhóm thế OH ở vị trí C-2 và thay nhóm methyl tại C-28 bởi nhóm carboxyl. Một số nghiên cứu cho biết, có thể nhóm thế ở vị trí C-2 góp phần làm tăng tác dụng

chống viêm cho các dẫn xuất của acid betunilic [112]. Có thể sự có mặt của nhóm chức hydroxyl tại vị trí C-2 ở hợp chất acid alphaltolic đã góp phần làm tăng tác dụng chống viêm *in vitro* của hợp chất này so với lupeol.

➤ *Về tác dụng chống viêm in vitro của acid ceanothenic (GL8)*

Acid ceanothenic là một triterpenoid vòng A nằm cạnh đặc trưng cho họ Táo ta (Rhamnaceae). Hợp chất này có mặt ở nhiều chi thuộc họ Táo ta, như chi *Alphitonia* [95], chi *Zizyphus* [108], [117], [140]. Trước đây, acid ceanothenic đã được đánh giá khả năng ức chế sản sinh NO và TNF- α trên đại thực bào phúc mạc chuột bị kích thích viêm bởi dịch chiết RK (rễ Kansui). Ở nồng độ 10 $\mu\text{g/mL}$, tác dụng ức chế sản sinh NO và TNF- α không đạt ý nghĩa thống kê. Ở nồng độ 100 $\mu\text{g/mL}$ (tương đương 220 μM), tỉ lệ ức chế sản sinh NO và TNF- α so với nhóm chứng RK lần lượt là 98,8 % và 84,3 % nhưng lại ảnh hưởng đến sự sống sót của tế bào. Do vậy tác dụng thể hiện ở nồng độ cao này có thể do hoạt tính gây độc tế bào của acid ceanothenic [108].

Luận án đã khảo sát tác dụng ức chế sản sinh NO, IL-1 β , IL-6 và PGE₂ của acid ceanothenic (**GL8**) ở nồng độ 10 μM , nồng độ thấp hơn so với nghiên cứu của L. Yu [108] và không ảnh hưởng đến khả năng sống sót của tế bào. Kết quả cho thấy, acid ceanothenic chỉ ức chế sản sinh IL-1 β và IL-6 ở mức độ trung bình, lần lượt là $33,1 \pm 4,3$ % và $27,1 \pm 4,5$ % ($p < 0,01$ khi so sánh với chứng dương LPS), không ức chế sản sinh NO và PGE₂. Những kết quả này phù hợp với kết quả đã công bố của tác giả L. Yu (2012) và làm giàu thêm hiểu biết về tác dụng chống viêm *in vitro* của acid ceanothenic.

➤ *Về tác dụng chống viêm in vitro của acid epigouanic (GL9)*

Trong hai hợp chất triterpenoid khung ceanothan (**GL8** và **GL9**), acid epigouanic (**GL9**) có tác dụng chống viêm mạnh hơn và cùng với acid alphaltolic (**GL7**) là hai hợp chất thể hiện tác dụng tốt nhất trong số các hợp chất thử nghiệm. Acid epigouanic (**GL9**) ở nồng độ 10 μM ức chế mạnh sự sản sinh PGE₂, IL-1 β và IL-6 cũng như ức chế hoạt động COX-2 luciferase, biểu hiện mRNA và protein COX-2 ở tế bào RAW264.7 bị kích thích viêm bởi LPS. Hợp chất này đã được biết đến từ lâu nhưng lại chưa từng được thăm dò tác dụng chống viêm. Vì vậy, những kết quả này là hiểu biết mới về tác dụng sinh học của acid epigouanic.

Acid epigouanic (**GL9**) có cấu trúc tương tự acid ceanothenic (**GL8**) và khác biệt với acid ceanothenic ở điểm có thêm nhóm thế $-CH_2OH$ ở vị trí C-1. Việc hợp chất này thể hiện tác dụng tốt hơn acid ceanothenic có thể đưa ra nhận định, khi có thêm nhóm thế $-CH_2OH$ ở vị trí C-1 sẽ có lợi hơn cho tác dụng chống viêm. Tuy nhiên cần có nhiều nghiên cứu sâu rộng hơn để có thể đưa ra kết luận chính xác cho dự đoán này.

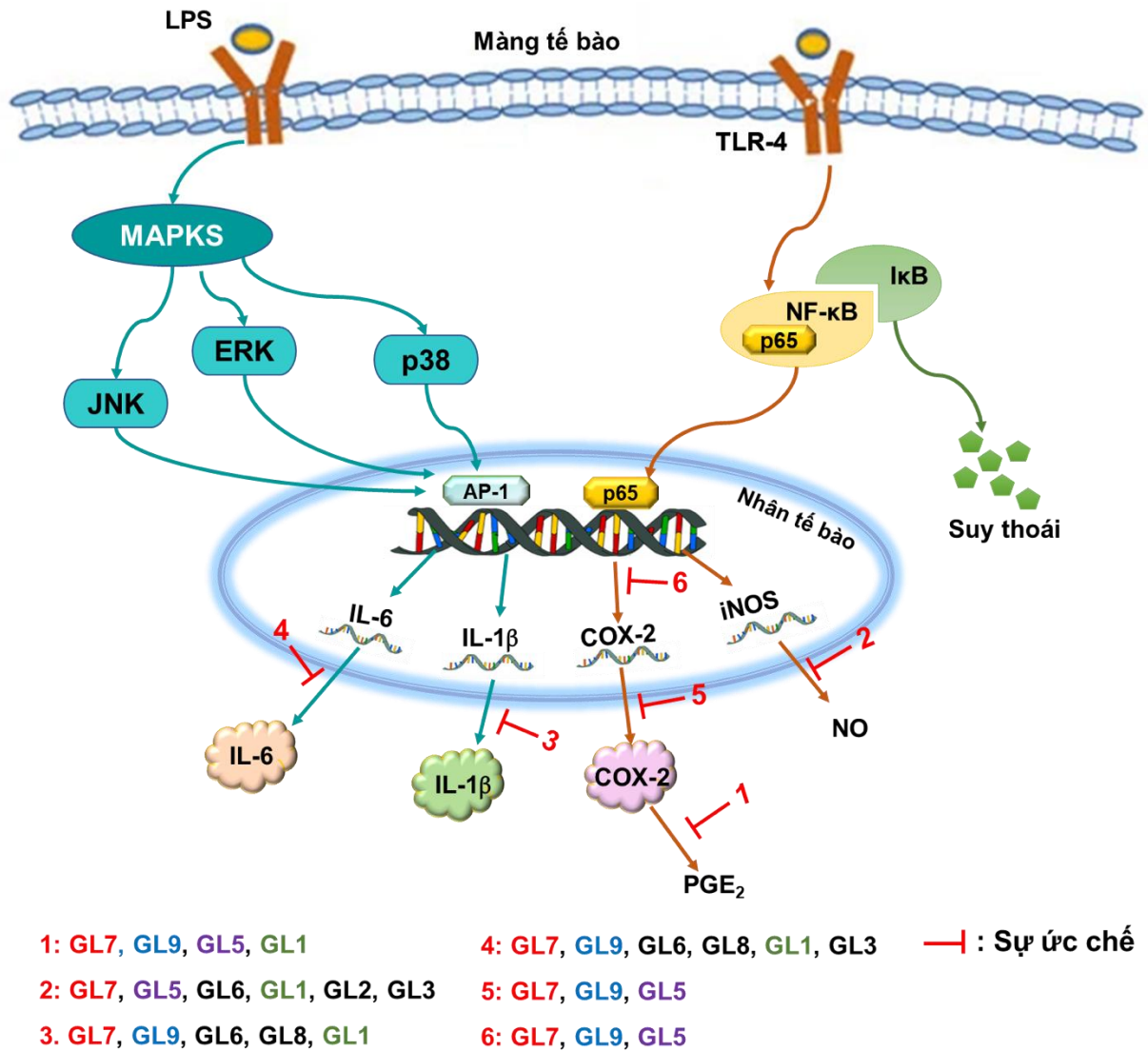
4.3.4.2. Về kết quả tác dụng chống viêm *in vitro* của các hợp chất saponin (GL1-3, GL5)

Kết quả đánh giá tác dụng chống viêm *in vitro* của các hợp chất saponin (**GL1-3** và **GL5**) cho thấy, các hợp chất đều thể hiện tác dụng ở mức độ khác nhau. Trong số các hợp chất này, gouaniosid A (**GL5**) thể hiện tác dụng nổi trội nhất khi ức chế mạnh sự sản sinh PGE_2 , NO và ức chế sự biểu hiện mRNA của COX-2 cũng như hoạt động COX-2 luciferase. Tiếp theo là gouaniasid VII (**GL1**) cho thấy khả năng chống viêm ở tất cả các thí nghiệm (ức chế sản sinh PGE_2 , NO và các cytokin tiền viêm IL-1 β , IL-6); gouaniasid VIII (**GL2**) ức chế sản sinh NO (tác dụng mạnh nhất trong số các hợp chất thử nghiệm), gouaniasid IX (**GL3**) ức chế sản sinh NO và IL-6. Các hợp chất saponin lại là hợp chất mới lần đầu được biết đến, do đó những kết quả tác dụng sinh học thu được của các hợp chất này là đóng góp mới của luận án.

Gouaniosid A (**GL5**) với khung aglycon là acid epiceanothic thể hiện tác dụng chống viêm tốt hơn ở hầu hết các thí nghiệm. Như vậy có thể suy đoán saponin khung aglycon dạng ceanothan có lợi ích chống viêm tốt hơn khung dammaran. Ba hợp chất saponin còn lại (gouaniasid VII-IX) cùng khung aglycon, chỉ có khác biệt nhỏ ở phần đường nhưng tác dụng chống viêm lại phân hóa rõ rệt. Gouaniasid VII (**GL1**) có ít đơn vị đường hơn trong công thức phân tử nhưng xu hướng tác dụng chống viêm tốt hơn trên các đích thử nghiệm. Điều đó cho thấy, khi phân tử saponin mang cấu trúc vòng kền với nhiều đơn vị đường hơn sẽ có tác dụng kém hơn. Tuy nhiên, cần có thêm nhiều nghiên cứu mới có thể khẳng định các mối liên quan cấu trúc - tác dụng trên.

Tóm lại, các hợp chất phân lập từ phân đoạn ethyl acetat (**GLE**) và *n*-butanol (**GLB**) có khả năng chống viêm *in vitro* thông qua ức chế các hợp chất trung gian của phản ứng viêm như PGE_2 và NO, đồng thời ức chế sản sinh các cytokin tiền viêm IL-1 β và IL-6. Các hợp chất cũng thể hiện tác dụng ức chế hoạt động gen COX-2, làm

giảm biểu hiện protein và mRNA của COX-2 ở đại thực bào RAW264.7 bị kích thích viêm bởi LPS. Trong số các hợp chất này, acid aliphatic (GL7) và acid epigouanic (GL9) có tác dụng tốt nhất. Khả năng chống viêm của các chất phân lập từ Dây đon gánh được thể hiện ở hình 4.5.



Hình 4.5. Sơ đồ con đường chống viêm của các hợp chất phân lập từ Dây đon gánh

Như vậy, kết quả đánh giá tác dụng chống viêm *in vitro* của các hợp chất phân lập được hoàn toàn phù hợp với kết quả khảo sát tìm kiếm phân đoạn cao chiết tiềm năng chống viêm khi các hợp chất đều thể hiện tác dụng rõ rệt trên các tín hiệu viêm khác nhau. Cao phân đoạn ethyl acetat (GLE) có chứa các hợp chất thể hiện tác dụng

chống viêm mạnh hơn (**GL7** và **GL9**), cùng với sự hiệp đồng tác dụng của các hợp chất còn lại, đặc biệt là hợp chất có khối lượng lớn như lupeol đã góp phần mang lại tác dụng chống viêm tốt nhất cho cao chiết này trên tất cả các mô hình.

Bằng các thử nghiệm *in vitro*, luận án đã chứng minh tác dụng chống viêm *in vitro* của các cao chiết tổng (**GLT**) và cao chiết phân đoạn (**GLH, GLE, GLB, GLW**) của phần trên mặt đất Dây đòn gánh. Đồng thời làm sáng tỏ các thành phần có hoạt tính chống viêm của từng phân đoạn. Các kết quả này chính là cơ sở khoa học nước đầu lý giải tri thức sử dụng dược liệu Dây đòn gánh để chữa các triệu chứng điển hình của viêm trong dân gian.

Tóm lại, luận án đã hoàn thành ba mục tiêu nghiên cứu đề ra. Những đóng góp về mặt thực vật gồm đặc điểm thực vật, đặc điểm vi học và vi phẫu Dây đòn gánh đã cung cấp dữ liệu khoa học phục vụ công tác tiêu chuẩn hóa dược liệu. Kết quả nghiên cứu về thành phần hóa học của phần trên mặt đất cây Dây đòn gánh đã bổ sung vào cơ sở dữ liệu các hợp chất thiên nhiên thông tin về 5 hợp chất saponin triterpenoid mới, cùng 5 hợp chất lần đầu tiên được phân lập từ chi *Gouania* và 4 hợp chất lần đầu tiên được phân lập từ loài *G. leptostachya*. Đồng thời, phân lập chất theo định hướng chống viêm, luận án đã có đóng góp mới trong việc tìm ra các hợp chất có tiềm năng chống viêm *in vitro* từ các cao chiết có tác dụng chống viêm *in vitro* nổi bật. Các kết quả này đã một phần giải thích kinh nghiệm sử dụng Dây đòn gánh để chữa viêm trong dân gian, cũng như góp phần cung cấp cơ sở dữ liệu cho việc sàng lọc, tìm kiếm nguồn dược liệu và hợp chất thiên nhiên phục vụ định hướng ứng dụng phát triển sản phẩm có tác dụng chống viêm.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

1. Về thực vật học

- Đã mô tả đặc điểm thực vật của mẫu Dây đòn gánh nghiên cứu
- Đã mô tả đặc điểm vi phẫu thân, lá và đặc điểm bột thân và lá của mẫu Dây đòn gánh nghiên cứu.

2. Về hóa học

- Đã sơ bộ xác định sự có mặt các nhóm chất trong Dây đòn gánh gồm: saponin, flavonoid, đường khử, sterol và caroten.
- Từ phần trên mặt đất cây Dây đòn gánh nghiên cứu, đã phân lập và xác định được cấu trúc 15 hợp chất, bao gồm: 5 hợp chất saponin mới (gouaniasid VII-IX, joazeirosid C và gouaniosid A); 4 hợp chất flavonoid (quercitrin, isoquercitrin, catechin, kaempferol-3-*O*-[(6-*O*-*E*-caffeoyl)- β -D-galactopyranosyl]-(1 \rightarrow 2)- α -L-rhamnopyranosid) cùng với 1 hợp chất fructosid (*n*-butyl- β -D-fructopyranosid) lần đầu được phân lập từ chi *Gouania*; 3 hợp chất triterpenoid (lupeol, acid alphitolic, acid epigouanic) lần đầu tiên được phân lập từ loài *G. leptostachya*; 2 hợp chất đã biết còn lại là acid ceanothenic và daucosterol.

3. Về tác dụng chống viêm *in vitro* của Dây đòn gánh

➤ *Tác dụng chống viêm in vitro của các cao chiết:*

- Cao **GLE** 20 $\mu\text{g/mL}$ ức chế sản sinh PGE_2 , $\text{IL-1}\beta$, IL-6 lần lượt là $49,2 \pm 5,6$ %, $55,2 \pm 4,0$ % và $38,8 \pm 5,5$ % ($p < 0,01$); làm giảm biểu hiện mRNA, protein COX-2 và ức chế hoạt động COX-2 luciferase lần lượt là $41,5 \pm 5,6$ %, $44,4 \pm 7,4$ % và $25,9 \pm 1,7$ % ($p < 0,01$). Cao **GLE** nồng độ 1, 5 và 25 $\mu\text{g/mL}$ ức chế sản sinh NO ($p < 0,05$ và $p < 0,001$).
- Cao **GLT** ức chế sản sinh PGE_2 (nồng độ 20 $\mu\text{g/mL}$) và NO (nồng độ 25 $\mu\text{g/mL}$).
- Cao **GLB** ức chế sản sinh NO (nồng độ 25 $\mu\text{g/mL}$) và $\text{IL-1}\beta$ (nồng độ 20 $\mu\text{g/mL}$).

- Cao **GLW** ức chế sản sinh NO (nồng độ 25 µg/mL); IL-1β và IL-6 (nồng độ 20 µg/mL).

➤ **Tác dụng chống viêm in vitro của các hợp chất tinh khiết:**

- **Acid aliphatic (GL7)** nồng độ 3, 10 và 30 µM có tác dụng ức chế sản sinh PGE₂, giảm biểu hiện mRNA và protein COX-2 phụ thuộc nồng độ, tỉ lệ ức chế ở nồng độ cao nhất lần lượt là 64,5 ± 3,3 %; 58,3 ± 4,9 % và 47,5 ± 4,4 % (p < 0,001). **GL7** (10 µM) làm giảm hoạt động COX-2 luciferase 55,4 ± 3,5 % (p < 0,001) và giảm sản sinh IL-1β, IL-6 45,1 ± 3,4 % và 39,8 ± 3,6 % (p < 0,001); ức chế sản sinh NO phụ thuộc nồng độ trong khoảng độ 2, 10, 50 µM.

- **Acid epigouanic (GL9)** nồng độ 10 µM làm giảm sản sinh PGE₂, IL-1β, IL-6 lần lượt là 52,8 ± 7,3 %, 61,5 ± 3,2 % và 57,1 ± 3,3 % (p < 0,001); làm giảm biểu hiện mRNA, ức chế hoạt động COX-2 luciferase lần lượt là 54,4 ± 2,1 % và 42,1 ± 5,7 % (p < 0,001).

- **Gouanosid A (GL5)** nồng độ 10 µM ức chế sản sinh PGE₂, làm giảm biểu hiện mRNA và hoạt động COX-2 luciferase lần lượt là 52,3 ± 6,0 %, 48,7 ± 5,7 %, và 41,0 ± 4,6 % (p < 0,001), ức chế sản sinh NO (nồng độ 5 và 25 µM).

- **Acid ceanothenic (GL8)** và **lupeol (GL6)** chế sản sinh IL-1β, IL-6 (nồng độ 10 µM). Ngoài ra, **Lupeol** còn ức chế sản sinh NO (nồng độ 25 µM).

- **Gouaniasid VII (GL1)** ức chế sản sinh PGE₂, IL-1β, IL-6 (nồng độ 10 µM) và NO (nồng độ 5, 25 µM).

- **Gouaniasid VIII (GL2)** ức chế sản sinh NO ở nồng độ 5 và 25 µM.

- **Gouaniasid IX (GL3)** ức chế sản sinh NO (nồng độ 5, 25 µM) và IL-6 (nồng độ 10 µM).

KIẾN NGHỊ

- Tiếp tục nghiên cứu thành phần hóa học cao phân đoạn nước.
- Đánh giá độ an toàn và nghiên cứu tác dụng chống viêm *in vivo* của cao chiết có tác dụng chống viêm *in vitro* tốt nhất.
- Xây dựng phương pháp định lượng chất đánh dấu của dược liệu Dây đòn gánh.

CÁC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. Nguyễn Thị Hằng, Nguyễn Thị Bích Thu, Đặng Thị Thủy, Đỗ Thị Định, Vũ Văn Tuấn, Lê Việt Dũng, Trần Văn Ôn (2017), Khảo sát thành phần hóa học của cây Dây đòn gánh và phân lập các flavonoid từ phân đoạn ethyl acetat, *Tap chí Dược liệu* 22(4), Tr. 210-216.
2. Nguyen Thi Hang, Nguyen Thi Bich Thu, Tran Van On (2021), Triterpenoids, steroid, and fructoside from the aerial parts of *Gouania leptostachya* DC., *Journal of Medicinal Materials*, 26(3):160-164.
3. Nguyen Thi Hang, Nguyen Thi Bich Thu, Le Ba Vinh, Tran Van On, Nguyen Minh Khoi, Do Thi Ha (2022), Characterization of four new triterpenoid saponins with nitric oxide inhibitory activity from aerial parts of *Gouania leptostachya*, *Natural Product Research*, 36(4): 1-7, <https://doi.org/10.1080/14786419.2022.2057971>.
4. Nguyen Thi Hang, Nguyen Thi Bich Thu, Le Ba Vinh, Nguyen Viet Phong, Tran Van On, Ki Yong Lee (2023), A New Ceanothane-Type Triterpenoid Saponin Isolated from *Gouania leptostachya* DC. var. *tonkinensis* Pit. and Its Underlying Anti-Inflammatory Effects, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(7):1-8. [10.4014/jmb.2301.01040](https://doi.org/10.4014/jmb.2301.01040).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Võ Văn Chi (2012), Từ điển cây thuốc Việt Nam, *Nhà xuất bản Y học*, Tập 1: 741.
2. Đỗ Tất Lợi (2005), Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam, *Nhà xuất bản Y học*: 126.
3. Yao C., Zhang S. J., Bai Z. Z., Zhou T., Xuan L. J. (2011), Two new benzopyran derivatives from *Gouania leptostachya* DC. var. *tonkinensis* Pitard, *Chinese Chemical Letters*, 22(2): 175-177.
4. Thuy N. T. K., Trang D. T., Trang M. T. N., Bay N. K., Tai B. H., Kiem P. V., Yen P. H., Nhiem N. X. (2019), Flavonol glycosides and dammarane saponin from *Gouania leptostachya*, *Vietnam Journal of Chemistry*, 57(3): 277-280.
5. Nguyễn Văn An (2010), Nghiên cứu đặc điểm thực vật, thành phần hóa học và tác dụng kháng khuẩn, kháng nấm cây Dây đòn gánh, *Luận văn thạc sĩ dược học, trường Đại học Dược Hà Nội*.
6. Dung T. T. M., Lee J. S., Kim E., Yoo B. C., Ha V. T., Kim Y., Yoon D. H., Hong S., Baek K. S., Sung N. Y. (2015), Anti-inflammatory activities of *Gouania leptostachya* methanol extract and its constituent resveratrol, *Phytotherapy Research*, 29(3): 381-392.
7. Nguyễn Tiên Bân (2003), Danh mục các loài thực vật Việt Nam, *NXB Nông Nghiệp, Hà Nội*, Tập II: 869-875.
8. Lecomte M. H. (1907), Flore Générale de L'indo – chine, *Paris mason et c, éditeurs 120, boulevard saint – germain(vie)*, : 932-934.
9. Medan D., Schirarend C. (2004), Rhamnaceae. In: K. Kubitzki (ed.), *The Families and Genera of Vascular Plants, Vol. 6: Celastrales, Oxalidales, Rosales, Cornales, Ericales.*: 320-338.
10. Yi C., Carsten S. (2007), *Flora of China*, 12: 163-164.
11. Buerki S., Phillipson P. B., Callmander M. W. (2011), A taxonomic revision of *Gouania* (Rhamnaceae) in Madagascar and the other islands of the Western Indian Ocean (the Comoro and Mascarene Islands, and the Seychelles), *Annals of the Missouri Botanical Garden. Missouri Botanical Garden*, 98(2): 157.
12. St John H. (1969), *Monograph of the Hawaiian Species of Gouania (Rhamnaceae). Hawaiian Plant Studies* 34.

13. Pool A. (2014), Taxonomic Revision of *Gouania* (Rhamnaceae) for North America, *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 99(3): 490-552.
14. Kai L., Supee Saksuwan L., Jules E. V. (1980), *Flore du Cambodge, du Laos et du Viêt-Nam: révision de la Flore générale de l'Indochine. 18. Légumineuses-Césalpinioïdées*, Muséum National d'Histoire Naturelle.
15. Cahen D., Stenn K. S., Utteridge T. (2020), A revision of the genus *Gouania* (Rhamnaceae) in the Philippines and Sundaland, *Kew Bulletin*, 75(1): 1-24.
16. Arozarena D. C. (2009), Notas sobre el género *Gouania* (Rhamnaceae) en Cuba, *Revista del Jardín Botánico Nacional*: 127-130.
17. Pitard J. (1912), *Gouania*, Rhamnaceae; dans: H. Lecomte (Ed.). Flore Générale de L'indochina, Tom. I, Fas. 8: 932-934.
18. Phạm Hoàng Hộ (2003), Cây cỏ Việt Nam, *NXB Trẻ*, Tập 2.
19. Võ Văn Chi (2004), Từ điển thực vật thông dụng, *NXB Khoa học Kỹ Thuật*, Tập 2.
20. Mabberley D. J. (2008), *Mabberley's Plant-Book: A Portable Dictionary of Plants, Their Classification and Uses*, 3rd ed, Cambridge University Press, Cambridge.
21. Wagner M., Kovačić M., Koblmüller S. (2021), Unravelling the taxonomy of an interstitial fish radiation: Three new species of *Gouania* (Teleostei: Gobiesocidae) from the Mediterranean Sea and redescriptions of *G. willdenowi* and *G. pigra*, *Journal of Fish Biology*, 98(1): 64-88.
22. Marshall C. J. (1988), *Gouania axilliflora* (Rhamnaceae), a new species from Peru, *Systematic Botany*: 493-495.
23. Thiele K. R., West J. G. (1995), *Gouania exilis* (Rhamnaceae), a new species from northern Australia and Papua New Guinea, with notes on the identity of *Gouania hillii* F. Muell, *Austrobaileya*: 411-416.
24. Sheela P. N., Madhusudana R. J. (1993), Gouanic acid from the leaves of *Gouania microcarpa*, *Phytochemistry*, 33(3): 711-712.
25. Green M. L. (1916), The African Species of *Gouania*, *Bulletin of Miscellaneous Information (Royal Botanic Gardens, Kew)*: 197-200.
26. Maria J. H. H., Carlos C. P. (2018), *Gouania miocenica* sp. nov. (Rhamnaceae), a Miocene fossil from Chiapas, México and paleobiological involvement, *Journal of South American Earth Sciences*, 85: 1-5.

27. Ahmed T., Khan R., Tabassum N., Aktar F., Islam M. K. (2019), Evaluation of Bioactivities of *Gouania tiliaefolia* Lam., an Indigenous Traditional Medicinal Plant of Bangladesh, *Bangladesh Pharmaceutical Journal*, 22(2): 200-207.
28. Giacomelli S. R., Maldaner G., Stücker C., Marasciulo C., Schmidt J., Wessjohann L., Dalcol I. I., Morel A. F. (2007), Triterpenoids from *Gouania ulmifolia*, *Planta Medica*, 53(05): 499-501.
29. Gossan D. P. A., Magid A. A., Yao-Kouassi P. A., Coffy A. A., Josse J., Gangloff S. C., Morjani H., Voutquenne-Nazabadioko L. (2017), Triterpene glycosides from the aerial parts of *Gouania longipetala*, *Phytochemistry*, 134: 71-77.
30. Désiré S., Ernestine N., Bruno T. B., Lazare S. S., Ulrich D. D., Lateef M., Schneider B., Ali M. S., Barthélemy N. (2021), A new dammarane type triterpene glucoside from the aerial parts of *Gouania longipetala* (Rhamnaceae), *Natural Product Research*, 35(19): 3192-3203.
31. Gossan D. P. A., Magid A. A., Yao-Kouassi P. A., Coffy A. A., Harakat D., Voutquenne-Nazabadioko L. (2015), New acylated flavonol glycosides from the aerial parts of *Gouania longipetala*, *Phytochemistry Letters*, 11: 306-310.
32. Ekuadzi E., Dickson R., Fleischer T. (2012), Antibacterial, anti-inflammatory and antioxidant properties of *Gouania longipetala* Hemsl, *International Journal of Pharmaceutical sciences and research*, 3(5): 1300.
33. Kennelly E. J., Lewis W. H., Winter R. E. K., Johnson S., Elvin-Lewis M., Gossling J. (1993), Triterpenoid saponins from *Gouania lupuloides*, *Journal of Natural Products*, 56(3): 402-410.
34. Ekuadzi E., Dickson R. A., Fleischer T. C., Amponsah I. K., Pistorius D., Oberer L. (2014), Chemical constituents from *Gouania longipetala* and *Glyphaea brevis*, *Natural Product Research*, 28(15): 1210-1213.
35. Marimoutou M., Le-Sage F., Smadja J., Lefebvre-d'Hellencourt C., Gonthier M., Silva R. (2015), Antioxidant polyphenol-rich extracts from the medicinal plants *Antirhea borbonica*, *Doratoxylon apetalum* and *Gouania mauritiana* protect 3T3-L1 preadipocytes against H₂O₂, TNF α and LPS inflammatory mediators by regulating the expression of superoxide dismutase and NF- κ B genes, *Journal of Inflammation*, 12(1): 1-15.

36. Ezeja M. I., Anaga A. O., Asuzu I. U. (2015), Antidiabetic, antilipidemic, and antioxidant activities of *Gouania longipetala* methanol leaf extract in alloxan-induced diabetic rats, *Pharmaceutical biology*, 53(4): 605-614.
37. Batmunkh T., Juan Q. H., Nga D. T., Kyung K. E., Ah K. Y., Wan S. Y., Ah K. K., Burm-Jong L. (2007), Free radicals scavenging activity of Mongolian endemic and Vietnamese medicinal plants, *Planta Medica*, 73(09): P_057.
38. Segismundo A. B., Florendo P. E., Roman P. A. (2008), In vitro antifungal activity and phytochemical screening of *Gouania javanica* Miq. leaves, *UNP Research Journal*, 17: 1-10.
39. Désiré D. D. P., Sandrine M. N. Y., Claude B. D., Mireille K., Bibi-Farouck A. O., Théophile D., Pierre K. (2015), In vivo estrogenic-like activities of *Gouania longipetala* Hemsl.(Rhamnaceae) bark extracts in a post-menopause-like model of ovariectomized Wistar rats, *Journal of Ethnopharmacology*, 168: 122-128.
40. Đỗ Huy Bích (2006), Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam, *Nhà xuất bản Khoa học kỹ thuật*, Tập 1: 639-640.
41. Medzhitov R. (2008), Origin and physiological roles of inflammation, *Nature*, 454: 428-435.
42. Văn Đình Hoa, Nguyễn Ngọc Lanh (2011), Sinh lý bệnh và miễn dịch, *NXB Y học*.
43. Charles N. S., Chiang N., Dyke V. T. E. (2008), Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators., *Nature Reviews Immunology*, 8: 49-361.
44. Howard S. S. (2006), Arachidonic Acid Pathways in Nociception, *The Journal of Supportive Oncology*, 4: 277-287.
45. Delas H., Hortelano S. (2009), Molecular basis of the anti-inflammatory effects of terpenoids, *Inflammation & Allergy - Drug Targets*, 8(1): 28-39.
46. Lin W. W., Karin M. (2007), A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer, *Journal of Clinical Investigation*, 117: 1175-1183.
47. Samuelsson B., Dahlen S. E., Lindgren J. A., Rouzer C. A., Serhan C. N. (1987), Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis, and biological effects, *Science*, 237: 1171-1176.
48. Serhan C. N., Yang R., Martinod K., Kasuga K., Pillai P. S., Porter T. F., Oh S. F., Spite M. (2009), Maresins: novel macrophage mediators with potent

- antiinflammatory and proresolving actions, *Journal of Experimental Medicine*, 206(1): 15-23.
49. Aggarwal B. B., Vijayalekshmi R. V., Bokyoung S. (2009), Targeting inflammatory pathways for prevention and therapy of cancer: Short-term Friend, Long-term Foe, *Clinical Cancer Research*, 15: 425-430.
 50. Bộ môn Miễn dịch - Sinh lý bệnh - Trường Đại học Y Hà Nội (2012), *Sinh lý bệnh học*, NXB Y học.
 51. Lê Đình Roanh, Nguyễn Văn Chủ (2009), *Bệnh học viêm và các bệnh nhiễm khuẩn*, NXB Y học.
 52. Goodman Gilman's (2011), *The pharmacological basis of therapeutics- 12th edition*, McGraw - Hill.
 53. Patil K. R., Mahajan. U. B., Unger B. S., Goyal S. N., Belemkar S., Surana S. J., Ojha S., Patil C. R. (2019), Animal models of inflammation for screening of anti-inflammatory drugs: Implications for the discovery and development of phytopharmaceuticals, *International journal of molecular sciences*, 20(18): 4367.
 54. Morham S., Langenbach R., Loftin C. D., Tiano H. F., Vouloumanos N., Jennette J. C., Mahler J. F., Kluckman K. D., Ledford A., Lee C. A., Smothies O. (1995), Prostaglandin synthase 2 gene disruption causes severe renal pathology in the mouse, *Cell Research*, 83: 473-482.
 55. Masferrer J. L., Zweifel B. S., Manning P. T., Hauser S. D., Leahy K. M., Smith W. G., Isakson P. C., Seibert K. (1994), Selective inhibition of inducible cyclooxygenase-2 *in vivo* is antiinflammatory and nonulcerogenic, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91: 3228-3232.
 56. Lê Đình Doanh, Nguyễn Văn Chủ (2009), *Bệnh học viêm và các bệnh nhiễm khuẩn*, NXB Y học: 7-56.
 57. Serhan C. N. (2008), Systems approach with inflammatory exudates uncovers novel anti-inflammatory and pro-resolving mediators, *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 79(3-5): 157-163.
 58. Phạm Văn Thức (2009), Cytokin và các biểu hiện bệnh lý lâm sàng, NXB Y học, Hà Nội.
 59. Xiaofeng L., Robert N. A., Bruce S. K. (2001), Preparation and evaluation of new L- canavanine derivatives as nitric oxide synthase inhibitors, *Tetrahedron*, 57: 6557-6565.

60. Akira M., Hajime O. (2007), Targeting NOX, INOS and COX-2 in inflammatory cells: chemoprevention using food phytochemicals, *International Journal of Cancer*, 121(11): 2357-2363.
61. Breitbach K., Klocke S., Tschernig T., Rooijen N., Baumann U., Steinmetz I. (2006), Role of inducible nitric oxide synthase and NADPH oxidase in early control of *Burkholderia pseudomallei* infection in mice, *Infection and Immunity*, 74: 6300-6309.
62. Moncada S., Palmer R. M., Higgs E. A. (1991), Nitric oxide: Physiology, pathophysiology, and pharmacology, *Pharmacological Reviews*, 43: 109-142.
63. Sacco R. E., Waters W. R., Rudolph K. M., Drew M. L. (2006), Comparative nitric oxide production by LPS-stimulated monocyte-derived macrophages from *Ovis canadensis* and *Ovis aries*., *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 29: 1-11.
64. Weiming X. U., Li Z. L., Marilena L., Mohamed A., Ian G. C. (2002), The role of nitric oxide in cancer, *Cell Research*, 12(5-6): 311-320.
65. Sarveswaran R., Jayasuriya W. J. A. B. N, Suresh T. S. (2017), *In vitro* assays to investigate the anti-inflammatory activity of herbal extracts: A review, *World Journal of Pharmaceutical Research*, 6(17): 131-141.
66. Fan G. W., Zhang Y., Jiang X., Zhu Y., Wang B., Su L., Cao W., Zhang H., Gao X. (2013), Anti-inflammatory activity of baicalein in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages via estrogen receptor and NF- κ B-dependent pathways, *Inflammation*, 36(6): 1584-1591.
67. Lee H. S., Kim D. H., Hong J. E., Lee J. Y., Kim E. J. (2015), Oxyresveratrol suppresses lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in murine macrophages, *Human and Experimental Toxicology*, 34(8): 808-818.
68. Seo S., Lee K. G., Shin J. S., Chung E. K., Lee J. Y., Kim H. J., Lee K. T. (2016), 6-O-Caffeoyldihydroxytyrosin isolated from *Aster glehni* suppresses lipopolysaccharide-induced iNOS, COX-2, TNF- α , IL-1 β and IL-6 expression via NF- κ B and AP-1 inactivation in RAW264.7 macrophages, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 26(19): 4592-4598.
69. Verma N., Tripathi S. K., Sahu D., Das H. R., Das R. H. (2010), Evaluation of inhibitory activities of plant extracts on production of LPS-stimulated pro-inflammatory mediators in J774 murine macrophages, *Mol Cell Biochem*, 336(1-2): 127-135.

70. Southern E. M. (1975), Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis, *Journal of Molecular Biology*, 98(3): 503-517.
71. Alwine J. C., Kemp D. J., Stark G. R. (1977), Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(12): 5350-5354.
72. Gershoni J. M. (1988), Protein blotting: A manual, *Methods of Biochemical Analysis* 33: 1-58.
73. Gershoni J. M., Palade G. E. (1982), Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to a positively charged membrane filter, *Analytical Biochemistry*, 124: 396-405.
74. Kost J., Liu L. S., Ferreira J., Langer R. (1994), Enhanced protein blotting from PhastGel media to membranes by irradiation of low-intensity ultrasound, *Analytical Biochemistry*, 216(1): 27-32.
75. Kurien B. T., Scofield R. H. (2006), Western blotting, *Methods*, 38(4): 283-293.
76. Nguyễn Việt Thân (2000), *Kiểm nghiệm dược liệu bằng phương pháp hiển vi*, Hà Nội, NXB Khoa học Kỹ thuật.
77. Bộ môn Dược liệu (2012), *Phương pháp nghiên cứu dược liệu*, Trường Đại học Y Dược thành phố Hồ Chí Minh.
78. Bộ môn Dược liệu (2019), *Thực tập Dược liệu*, Trường Đại học Dược Hà Nội.
79. Voutquenne-Nazabadioko L., Gevrenova R., Borie N., Harakat D., Sayagh C., Weng A., Thakur M., Zaharieva M., Henry M. (2013), Triterpenoid saponins from the roots of *Gypsophila trichotoma* Wender, *Phytochemistry*, 90: 114-127.
80. Fan H., Qi D., Yang M., Fanga H., Liua K., Zao F. (2013), *In vitro* and *in vivo* anti-inflammatory effects of 4-methoxy-5-hydroxycanthin-6-one, a natural alkaloid from *Picrasma quassioides*, *Phytomedicine*, 20: 319 - 323.
81. Jeong D., Yang M. S., Yang Y., Nam G., Kim J. H., Yoon D. H., Noh H. J., Lee S., Kim T. W., Sung G. H., Cho J. Y. (2013), *In vitro* and *in vivo* inflammatory effects of *Rhomyrtus tomentosa* methanol extract, *Journal of Ethnopharmacology*, 146: 205 - 213.

82. Yu T., Lee Y. G., Byeon S. E., Kim M. H., Sohn E. H., Lee S. G., C.J. Y. (2010), *In vitro* and *in vivo* anti-inflammatory effects of ethanol extract from *Acer tegmentosum*, *Journal of Ethnopharmacology* 128: 139 - 147.
83. Park J., Ha S. H., Abekura F., Lim H., Magae J., Ha K. T., Chung T. W., Chang Y. C., Lee Y. C., Chung E. (2019), 4-O-Carboxymethylascochlorin inhibits expression levels of on inflammation-related cytokines and matrix metalloproteinase-9 through NF- κ B/MAPK/TLR4 signaling pathway in LPS-activated RAW264. 7 cells, *Frontiers in Pharmacology*, 10: 304.
84. Shin J. S., Yun K. J., Chung K. S., Seo K. H., Park H. J., Cho Y. W., Baek N. I., Jang D. S., Lee K. T. (2013), Monotropein isolated from the roots of *Morinda officinalis* ameliorates proinflammatory mediators in RAW264.7 macrophages and dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis via NF- κ B inactivation, *Food and Chemical Toxicology*, 53: 263-271.
85. Shin J. S., Hong Y., Lee H. H., Ryu B., Cho Y. W., Kim N. J., Jang D. S., Lee K. T. (2015), Fulgic acid isolated from the rhizomes of *Cyperus rotundus* suppresses LPS-induced iNOS, COX-2, TNF- α , and IL-6 expression by AP-1 inactivation in RAW264. 7 macrophages, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 38(7): 1081-1086.
86. Vinh L. B., Nguyet N. T. M., Ye L., Dan G., Phong N. V., Anh H. L. T., Kim Y. H., Kang J. S., Yang S. Y., Hwang I. (2020), Enhancement of an *in vivo* anti-inflammatory activity of oleanolic acid through glycosylation occurring naturally in *Stauntonia hexaphylla*, *Molecules*, 25(16): 3699.
87. Rita A., Isabella B., Francesco S., Mario D.A., Cosimo P. (1986), Furostanol oligosides from *Tamus communis*, *Journal of Natural Products*, 49(6): 1096-1101.
88. Maria G. L. B., Marie-Aleth L. D., Marco A. T., Wagner H. (1993), A dammarane-type saponin from the roots of *Ampelozizyphus amazonicus*, *Phytochemistry*, 34(4): 1123-1127.
89. Perera P., Andersson R., Bohlin L., Andersson C., Li D., Owen N. L., Dunkel R., Mayne C. L., Pugmire R. J., Grant D. M. (1993), Structure determination of a new saponin from the plant *Alphitonia zizyphoides* by NMR spectroscopy, *Magnetic Resonance in Chemistry*, 31(5): 472-480.

90. Renault J. H., Ghedira K., Thepenier P., Lavaud C., Zeches-Hanrot M., Le Men-Olivier L. (1997), Dammarane saponins from *Zizyphus lotus*, *Phytochemistry*, 44(7): 1321-1327.
91. Zhang P., Xu L., Qian K., Liu J., Zhang L., Lee K. H., Sun H. (2011), Efficient synthesis and biological evaluation of epiceanothic acid and related compounds, *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 21(1): 338-341.
92. Song S. J., Nakamura N., Ma C. M., Hattori M., Xu S. X. (2001), Five saponins from the root bark of *Aralia elata*, *Phytochemistry*, 56(5): 491-497.
93. Burns D., Reynolds W. F., Buchanan G., Reese P. B., Enriquez R. G. (2000), Assignment of ^1H and ^{13}C spectra and investigation of hindered side-chain rotation in lupeol derivatives, *Magnetic Resonance in Chemistry*, 38(7): 488-493.
94. Nganso Y. O., Tchana E. M., Kahouo A. D., Abah K., Fomena H., Mamoudou H. (2020), Inhibitory Effect and Antimicrobial Activity of Secondary Metabolites of *Khaya senegalensis* (Desr.) A. Juss.(Meliaceae), *Science*, 8(4): 92-105.
95. Jou S. J., Chen C. H., Guh J. H., Lee C. N., Lee S. S. (2004), Flavonol glycosides and cytotoxic triterpenoids from *Alphitonia philippinensis*, *Journal of the Chinese Chemical Society*, 51(4): 827-834.
96. Ramos L. I. C., Netto S. K. R., Itabaiana J. I., Antunes O. A. C., Porzel A., Wessjohann L., Kuster R. M. (2010), Ceanothane and lupane type triterpenes from *Zizyphus joazeiro*—an anti-staphylococcal evaluation, *Planta Medica*, 76(01): 47-52.
97. Đoàn Thị Mai Hương, Phạm Văn Cường, Nguyễn Văn Hùng, Marc Litaudon (2009), Nghiên cứu thành phần hóa học thân cây Thần mát thùỳ dày (*Millettia pachylobadrake* – Leguminosae), *Tạp chí hóa học*, 47: 209-212.
98. Kim H. Y., Moon B. H., Lee H. J., Choi D. H. (2004), Flavonol glycosides from the leaves of *Eucommia ulmoides* O. with glycation inhibitory activity, *Journal of Ethnopharmacology*, 93(2-3): 227-230.
99. Fernandez J., Reyes R., Ponce H., Oropeza M., VanCalsteren M. R., Jankowski C., Campos M. G. (2005), Isoquercitrin from *Argemone platyceras* inhibits carbachol and leukotriene D4-induced contraction in guinea-pig airways, *European Journal of Pharmacology*, 522(1-3): 108-115.
100. Hossain M. A., Islam A., Jolly Y. N., Kabir M. J. (2006), A new flavonol glycoside from the seeds of *Zea mays*.

101. Mutalib A. A., Ashwell R. N., Kannan R. R. R., Johannes V. S. (2013), Antimicrobial and selected in vitro enzyme inhibitory effects of leaf extracts, flavonols and indole alkaloids isolated from *Croton menyharthii*, *Molecules*, 18(10): 12633-12644.
102. Fico G., Braca A., Nunziatina T., Tomè F., Morelli I. (2001), Flavonoids from *Aconitum napellus* subsp. *neomontanum*, *Phytochemistry*, 57(4): 543-546.
103. Mi K. P., Hye S. Y., Yong K. K. (2006), Isolation of *n*-Butyl- β -D-fructopyranosid from *Gastrodia elata* Blume, *Natural Product Sciences*, 12: 101-103.
104. Zhang C. Z., Xu X. Z., Li C. (1996), Fructosides from *Cynomorium songaricum*, *Phytochemistry*, 41(3): 975-976.
105. Lendl A., Werner I., Glasl S., Kletter C., Mucaji P., Presser A., Reznicek G., Jurenitsch J., Taylor D. W. (2005), Phenolic and terpenoid compounds from *Chione venosa* (SW.) Urban var. *venosa* (Bois Bande[^]), *Phytochemistry*, 66(19): 2381-2387.
106. Carlos H. C. S., Mario G. C., Franke K., Wessjohann L. (2019), Dammarane-type triterpenoids from the stem of *Ziziphus glaziovii* Warm.(Rhamnaceae), *Phytochemistry*, 162: 250-259.
107. Schühly W., Heilmann J., Çalis I., Sticher O. (2000), Novel triterpene saponins from *Zizyphus joazeiro*, *Helvetica Chimica Acta*, 83(7): 1509-1516.
108. Yu L., Jiang B. P., Luo D., Shen X. C., Guo S., Duan J. A., Tang Y. P. (2012), Bioactive components in the fruits of *Ziziphus jujuba* Mill. against the inflammatory irritant action of Euphorbia plants, *Phytomedicine*, 19(3-4): 239-244.
109. Panseeta P., Suksamrarn S. (2010), สี่ชนิดของสารประกอบไตรเทอร์พีน (Triterpenes from the root of Thai *Ziziphus mauritiana*), *Journal of Srinakharinwirot University (Journal of Science and Technology)*, 2(4): 106-118.
110. Bae G. H., Lee S. M., Lee E. S., Lee J. S., Gang J. S. (1996), Isolation and quantitative analysis of betulinic acid and alphitolic acid from *Zyziphi fructus*, *Yakhak Hoeji*, 40(5): 558-562.

111. Liu K., Zhang X., Xie L., Deng M., Chen H., Song J., Long J., Li X., Luo J. (2021), Lupeol and its derivatives as anticancer and anti-inflammatory agents: Molecular mechanisms and therapeutic efficacy, *Pharmacological Research*, 164: 105373.
112. Aguirre M. C., Delporte C., Backhouse N., Erazo S., Letelier M. E., Cassels B. K., Silva X., Alegría S., Negrete R. (2006), Topical anti-inflammatory activity of 2 α -hydroxy pentacyclic triterpene acids from the leaves of *Ugni molinae*, *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 14(16): 5673-5677.
113. Bai L. Y., Chiu C. F., Chiu S. J., Chen Y. W., Hu J. L., Wu C. Y., Weng J. R. (2015), Alphitolic acid, an anti-inflammatory triterpene, induces apoptosis and autophagy in oral squamous cell carcinoma cells, in part, through a p53-dependent pathway, *Journal of Functional Foods*, 18: 368-378.
114. Percy L. J., Josef P., Ray D. (1938), The Constituents of *Ceanothus americanus*. I. Ceanothic Acid, *Journal of the American Chemical Society*, 60(1): 77-79.
115. Grishko V. V., Tolmacheva I. A., Pereslavitseva A. V. (2015), Triterpenoids with a five-membered A-ring: distribution in nature, transformations, synthesis, and biological activity, *Chemistry of Natural Compounds*, 51(1): 1-21.
116. Mayo P. D., Starratt A. N. (1962), Terpenoids: II. Ceanothic acid: A C₂₉ A-Norlupane Derivative, *Canadian Journal of Chemistry*, 40(8): 1632-1641.
117. Ji C. J., Zeng G. Z., Han J., He W. J., Zhang Y. M., Tan N. H. (2012), Zizimauritic acids A–C, three novel nortriterpenes from *Ziziphus mauritiana*, *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 22(20): 6377-6380.
118. Muhammad D., Lalun N., Bobichon H., Debar E. M., Gangloff S. C., Nour M., Voutquenne-Nazabadioko L. (2016), Triterpenoids from the leaves of *Alphitonia xerocarpus* Baill and their biological activity, *Phytochemistry*, 129: 45-57.
119. Choi S. J., Tai B. H., Cuong N. M., Kim Y. H., Jang H. D. (2012), Antioxidative and anti-inflammatory effect of quercetin and its glycosides isolated from mampat (*Cratoxylum formosum*), *Food Science and Biotechnology*, 21(2): 587-595.
120. Cheng A. W., Tan X., Sun J. Y., Gu C. M., Liu C., Guo X. (2019), Catechin attenuates TNF- α induced inflammatory response via AMPK-SIRT1 pathway in 3T3-L1 adipocytes, *PLoS One*, 14(5): e0217090.
121. Baranwal A., Aggarwal P., Rai A., Kumar N. (2022), Pharmacological actions and underlying mechanisms of catechin: A review, *Mini reviews in medicinal chemistry*, 22(5): 821-833.

122. El O. N., Jaouadi I., Lahyaoui M., Benali T., Taha D., Bakrim S., El M. N., El K. F., Zengin G., Bangar S. P. (2022), Natural Sources, Pharmacological Properties, and Health Benefits of Daucosterol: Versatility of Actions, *Applied Sciences*, 12(12): 5779.
123. Espinoza C., Viniegra-González G., Loera O., Heredia G., Trigos A. (2008), Antibacterial activity against plant pathogens by cruded extracts and compounds from *Idriella* sp, *Revista Mexicana de Micología*, 26: 9-15.
124. Prasad P. R. C., Reddy C. S., Raza S. H., Dutt C. B. S. (2008), Folklore medicinal plants of north Andaman Islands, India, *Fitoterapia*, 79(6): 458-464.
125. Mosser D. M., Edwards J. P. (2008), Exploring the full spectrum of macrophage activation, *Nature Reviews Immunology*, 8(12): 958.
126. MacMicking J., Xie Q. W., Nathan C. (1997), Nitric oxide and macrophage function, *Annual Review of Immunology*, 15: 323.
127. Intayoung P., Limtrakul P., Yodkeeree S. (2016), Antiinflammatory Activities of Crebanine by Inhibition of NF- κ B and AP-1 Activation through Suppressing MAPKs and Akt Signaling in LPS-Induced RAW264.7 Macrophages, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 39(1): 54-61.
128. Lee S. B., Lee W. S., Shin J. S., Jang D. S., Lee K. T. (2017), Xanthotoxin suppresses LPS-induced expression of iNOS, COX-2, TNF- α , and IL-6 via AP-1, NF- κ B, and JAK-STAT inactivation in RAW264.7 macrophages, *International Immunopharmacology*, 49: 21-29.
129. Huang D., Chen Y., Chen W., Liu Y., Yao F., Xue D., Sun L. (2015), Anti-inflammatory effects of the extract of *Gnaphalium affine* D. Don *in vivo* and *in vitro*, *Journal of Ethnopharmacology*, 176: 356-364.
130. Murray P. J., Wynn T. A. (2011), Protective and pathogenic functions of macrophage subsets, *Nature Reviews Immunology*, 11(11): 723-737.
131. Ha D. T., Oh J., Khoi N. M., Dao T. T., Dung L. V., Do T. N., Lee S. M., Jang T. S., Jeong G. S., Na M. (2013), *In vitro* and *in vivo* hepatoprotective effect of ganodermanontriol against t-BHP-induced oxidative stress, *Journal of Ethnopharmacology*, 150(3): 875-885.
132. Tao J. Y., Zheng G. H., Zhao L., Wu J. G., Zhang X. Y., Zhang S. L., Huang Z. J., Xiong F. L., Li C. M. (2009), Anti-inflammatory effects of ethyl acetate fraction

from *Melilotus suaveolens* Ledeb on LPS-stimulated RAW264.7 cells, *Journal of Ethnopharmacology*, 123(1): 97-105.

133. Rietschel E. T., Kirikae T., Schade F. U., Mamat U., Schmidt G., Loppnow H., Ulmer A. J., Zähringer U., Seydel U., Padova F. D. (1994), Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function., *The FASEB Journal*, 8(2): 217-225.
134. Guha M., Mackman N. (2001), LPS induction of gene expression in human monocytes, *Cell Signal*, 13(2): 85-94.
135. Angeles F. M., Beatriz. D. H., Garcia M. D., Sáenz M. T., Villar A. (2001), New insights into the mechanism of action of the anti-inflammatory triterpene lupeol, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 53(11): 1533-1539.
136. Sánchez-Burgos J. A., Ramírez-Mares M. V., Gallegos-Infante J. A., González-Laredo R. F., Moreno-Jiménez M. R., Cháirez-Ramírez M. H., Medina-Torres L., Rocha-Guzmán N. E. (2015), Isolation of lupeol from white oak leaves and its anti-inflammatory activity, *Industrial Crops and Products*, 77: 827-832.
137. Somwong P., Theanphong O. (2021), Quantitative analysis of triterpene lupeol and anti-inflammatory potential of the extracts of traditional pain-relieving medicinal plants *Derris scandens*, *Albizia procera*, and *Diospyros rhodocalyx*, *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, 12(2): 147.
138. Raju R., Gunawardena D., Ahktar M. A., Low M., Reddell P., Münch G. (2016), Anti-inflammatory chemical profiling of the Australian rainforest tree *Alphitonia petriei* (Rhamnaceae), *Molecules*, 21(11): 1521.
139. Masullo M., Montoro P., Autore G., Marzocco S., Pizza C., Piacente S. (2015), Quali-quantitative determination of triterpenic acids of *Zizyphus jujuba* fruits and evaluation of their capability to interfere in macrophages activation inhibiting NO release and iNOS expression, *Food Research International*, 77: 109-117.
140. Fujiwara Y., Hayashida A., Tsurushima K., Nagai R., Yoshitomi M., Daiguji N., Sakashita N., Takeya M., Tsukamoto S., Ikeda T. (2011), Triterpenoids isolated from *Zizyphus jujuba* inhibit foam cell formation in macrophages, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(9): 4544-4552.