

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

VIỆN DƯỢC LIỆU



ĐOÀN XUÂN ĐÌNH

**NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM THỰC VẬT,
THÀNH PHẦN HÓA HỌC VÀ MỘT SỐ TÁC
DỤNG SINH HỌC CỦA CÂY THỦY BỒN THẢO**
(*Sedum sarmentosum* Bunge, Crassulaceae)

LUẬN ÁN TIẾN SĨ DƯỢC HỌC

HÀ NỘI, NĂM 2024

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

VIỆN DƯỢC LIỆU



ĐOÀN XUÂN ĐÌNH

**NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM THỰC VẬT,
THÀNH PHẦN HÓA HỌC VÀ MỘT SỐ TÁC
DỤNG SINH HỌC CỦA CÂY THỦY BỒN THẢO**
(*Sedum sarmentosum* Bunge, Crassulaceae)

LUẬN ÁN TIẾN SĨ DƯỢC HỌC

CHUYÊN NGÀNH: DƯỢC LIỆU - DƯỢC HỌC CỔ TRUYỀN

MÃ SỐ: 972.02.06

HÀ NỘI, NĂM 2024

LỜI CẢM ƠN

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới PGS.TS. Nguyễn Thượng Dong, nguyên Viện trưởng Viện Dược liệu - Bộ Y tế, PGS.TS. Phạm Thị Nguyệt Hằng, Trưởng Khoa Dược lý - Sinh hóa, Viện Dược liệu, người Thầy, Cô đã trực tiếp hướng dẫn và dành nhiều thời gian, công sức giúp đỡ tôi trong suốt quá trình nghiên cứu và thực hiện luận án này.

Tôi xin trân trọng cảm ơn PGS.TSKH. Nguyễn Minh Khởi - Viện trưởng Viện Dược liệu - Bộ Y tế, các Thầy, Cô trong Ban lãnh đạo Viện Dược liệu - Bộ Y tế, các Thầy, Cô thuộc phòng Khoa học và Đào tạo và các phòng, khoa, chức năng của Viện Dược liệu, đã tạo mọi điều kiện thuận lợi và giúp đỡ tôi hoàn thành luận án.

Tôi xin trân trọng cảm ơn PGS.TS. Hoàng Lê Tuấn Anh, các Thầy, Cô thuộc viện Hóa sinh biển; Viện Sinh thái, Tài nguyên sinh vật - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam; trường Đại học Dược Hà Nội, Viện Quân y 108, đã tạo điều kiện thuận lợi và giúp đỡ tôi hoàn thành luận án.

Tôi xin được bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới Thiếu tướng.PGS.TS. Phạm Xuân Phong, Giám đốc Viện Y học cổ truyền Quân đội, người Thầy luôn chỉ đạo sát sao và tạo mọi điều kiện thuận lợi cho tôi trên mọi bước đường học tập, công tác. Tôi vô cùng biết ơn Đảng ủy - Ban Giám đốc, Cấp ủy - Ban giám đốc Trung tâm Nghiên cứu ứng dụng sản xuất thuốc đông y, và các cơ quan chức năng Viện Y học cổ truyền Quân đội đã tạo điều kiện, giúp đỡ, động viên tôi trong suốt quá trình học tập, công tác.

Cuối cùng tôi xin bày tỏ lòng biết ơn đến gia đình, bạn bè, đồng nghiệp và các nhà khoa học đã luôn động viên, giúp đỡ tôi trong suốt quá trình học tập, nghiên cứu, thực hiện luận án này.

Hà Nội, ngày 12 tháng 4 năm 2024

Tác giả

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan rằng, các số liệu và các kết quả nghiên cứu trong luận án này là trung thực và chưa hề được sử dụng trong bất kì công trình nào khác.

Tôi xin cam đoan rằng, mọi sự giúp đỡ trong việc hoàn thành luận án đã được cảm ơn và các thông tin trích dẫn trong luận án này đã được ghi rõ nguồn gốc.

Tôi xin hoàn toàn chịu trách nhiệm về những số liệu trong luận án này.

MỤC LỤC

LỜI CẢM ƠN	
LỜI CAM ĐOAN	
DANH MỤC BẢNG	
DANH MỤC HÌNH	
DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT	
ĐẶT VẤN ĐỀ.....	1
CHƯƠNG I. TỔNG QUAN.....	2
1.1. Tổng quan về chi <i>Sedum</i> L.....	2
1.1.1. Vị trí phân loại, đặc điểm thực vật và phân bố của chi <i>Sedum</i> L.....	2
1.1.1.1. Vị trí phân loại chi <i>Sedum</i> L.	2
1.1.1.2. Phân bố các loài thuộc chi <i>Sedum</i> L.	2
1.1.1.3. Đặc điểm thực vật chi <i>Sedum</i> L.	3
1.1.2. Thành phần hóa học	6
1.1.3. Công dụng, tác dụng sinh học của chi <i>Sedum</i> L.	11
1.1.3.1. Công dụng của chi <i>Sedum</i> L.	11
1.1.3.2. Hoạt tính sinh học của chi <i>Sedum</i> L.....	13
1.2. Tổng quan về cây Thuỷ bồn thảo.....	21
1.2.1. Đặc điểm thực vật và phân bố của <i>Sedum sarmentosum</i> Bunge.	21
1.2.1.1. Đặc điểm thực vật	22
1.2.1.2. Phân bố.....	22
1.2.2. Thành phần hóa học	23
1.2.3. Tác dụng sinh học	32
CHƯƠNG II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	45
2.1. Nguyên vật liệu	45
2.1.1. Mẫu nghiên cứu.....	45
2.1.2. Hóa chất, dung môi	45

2.1.3. Động vật thí nghiệm.....	46
2.1.4. Máy móc thiết bị và dụng cụ.....	46
2.2. Phương pháp nghiên cứu.....	48
2.2.1. Phân tích đặc điểm thực vật	48
2.2.2. Nghiên cứu thành phần hóa học.....	48
2.2.2.1. Định tính một số nhóm chất trong mẫu nghiên cứu.....	48
2.2.2.2. Chiết xuất cao toàn phần và phân đoạn	51
2.2.2.3. Phương pháp chiết xuất và phân lập hợp chất	51
2.2.2.4. Phương pháp xác định cấu trúc hợp chất phân lập được	52
<i>Phổ khối lượng (Mass spectroscopy-MS)</i>	52
<i>Phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR)</i>	53
<i>Phổ ¹H-NMR</i>	53
<i>Phổ ¹³C-NMR</i>	53
<i>Phổ HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence)</i>	53
<i>Phổ COSY (Correlation Spectroscopy)</i>	53
<i>Phổ HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation)</i>	54
<i>Phổ NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy)</i>	54
<i>Phổ lưỡng sắc tròn (CD)</i>	54
<i>Độ quay cực ([α])</i>	54
2.2.3. Nghiên cứu về độ an toàn.....	54
- Thử độc tính cấp.....	54
- Thử độc tính bán trường diễn	55
2.2.4. Nghiên cứu về tác dụng bảo vệ gan	56
2.2.4.1. Đánh giá tác dụng của TBT trên mô hình chuột nhất bị tổn thương gan cấp tính gây bởi paracetamol	56
2.2.4.2. Đánh giá tác dụng của TBT trên mô hình chuột nhất bị tổn thương gan mạn tính gây bởi paracetamol.....	58

2.2.5. Nghiên cứu về tác dụng độc trên tế bào ung thư HeLa.....	58
2.3. Phương pháp xử lý số liệu.....	59
2.4. Địa điểm thực hiện	60
CHƯƠNG III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU.....	61
3.1. Kết quả nghiên cứu về thực vật loài Thủy bồn thảo	61
3.1.1. Đặc điểm hình thái và thẩm định tên khoa học.....	61
3.1.2. Đặc điểm vi phẫu.....	61
3.1.3. Đặc điểm bột toàn cây của loài Thủy bồn thảo.....	62
3.2. Kết quả nghiên cứu về thành phần hóa học	63
3.2.1. Kết quả định tính bằng phản ứng hóa học	63
3.2.2. Kết quả định tính bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng	64
3.2.3. Kết quả chiết xuất và phân lập hợp chất từ loài Thủy bồn thảo	66
3.2.4. Kết quả nhận dạng hợp chất phân lập được từ Thủy bồn thảo	70
- Hợp chất SSH1: Luteolin.....	70
- Hợp chất SSH2: Sarmentol A.....	71
- Hợp chất SSH3: Myrsiniosid A	73
- Hợp chất SSH4: Simplicifloranosid	74
- Hợp chất SSH7: Sedumosid I.....	76
- Hợp chất SSH8: Isorhamnetin-3,7-O-di- β -D-glucosid	78
- Hợp chất SSH9: Sedumosid C.....	79
- Hợp chất SSH10: 2-phenylethyl-D-rutinosid	81
- Hợp chất SSH12: 3'-Methoxy-3,5,4'-trihydroxyflavon-7-neohesperidosid ...	83
- Hợp chất SSH13: Quercetin-3-O- β -D-glucopyranose.....	85
- Hợp chất SSH17: 3'-methoxyluteolin-7-O- β -D-glucopyranosid	86
- Hợp chất SSH19: Acid Ferulic	88
- Hợp chất SSH20: Acid p-Hydroxybenzoic	89

- Hợp chất SSH21: Acid trans-p-Coumaric	90
- Hợp chất SSH22: Tyrosol	91
- Hợp chất SSH24: Sedumosid K	92
- Hợp chất SSH25: Lariciresinol-9-O- β -D-glucopyranosid	100
- Hợp chất SSH29: 3,4-dimethoxybenzyl alcohol	101
3.3. Kết quả nghiên cứu về độc tính và tác dụng sinh học	103
3.3.1. Kết quả nghiên cứu độc tính cấp	103
3.3.2. Kết quả nghiên cứu độc tính bán trường diễn	105
- Ảnh hưởng của cao Thủy bồn thảo lên tình trạng chung và cân nặng của động vật thí nghiệm	105
- Kết quả theo dõi các chỉ số huyết học	105
- Kết quả theo dõi các chỉ số chức năng gan	106
- Kết quả theo dõi các chỉ số chức năng thận	107
- Ảnh hưởng của cao chiết Thủy bồn thảo lên xét nghiệm mô học	108
3.3.3. Kết quả nghiên cứu tác dụng bảo vệ gan của Thủy bồn thảo	111
- Tác dụng bảo vệ gan của cao chiết MeOH Thủy bồn thảo trên mô hình tổn thương gan cấp bằng paracetamol	111
- Tác dụng bảo vệ gan của cao chiết MeOH Thủy bồn thảo trên mô hình tổn thương gan mạn bằng paracetamol	114
3.3.4. Nghiên cứu về tác dụng độc tế bào ung thư tử cung HeLa của một số hợp chất phân lập từ Thủy bồn thảo	118
CHƯƠNG IV. BÀN LUẬN	120
4.1. Về thực vật học	123
4.2. Về hóa học	124
4.3. Về độ an toàn	130
4.4. Về tác dụng sinh học của cao chiết methanol Thủy bồn thảo	128
4.5. Về đóng góp mới của luận án	133

KẾT LUẬN.....	135
KIẾN NGHỊ.....	136
CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ.....	137
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	138

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1. Phân bố một số loài thuộc chi <i>Sedum</i> ở một số quốc gia	5
Bảng 1.2. Các hợp chất trong một số loài thuộc chi <i>Sedum</i>	8
Bảng 1.3. Hoạt tính kháng khuẩn (đường kính vòng vô khuẩn và MIC) của phân đoạn chiết chloroform của <i>S. caeruleum</i>	16
Bảng 1.4. Hoạt tính chống oxy hóa của <i>S. caeruleum</i> bởi DPPH, CUPRAC và xét nghiệm chelat kim loại.	18
Bảng 1.5. Hoạt tính kháng khuẩn của Thủy bồn thảo.....	35
Bảng 1.6. Tác dụng của Thủy bồn thảo đối với mô hình viêm do carrageenan gây ra ở chuột.....	36
Bảng 3.1. Kết quả định tính các nhóm chất hóa học trong Thủy bồn thảo.....	63
Bảng 3.2. Số liệu phổ NMR của hợp chất SSH1 và hợp chất tham khảo.....	70
Bảng 3.3. Số liệu phổ NMR của hợp chất SSH2 và hợp chất tham khảo.....	72
Bảng 3.4. Số liệu phổ NMR của hợp chất SSH3 và hợp chất tham khảo.....	73
Bảng 3.5. Số liệu phổ NMR của hợp chất SSH4 và hợp chất tham khảo.....	75
Bảng 3.6. Số liệu phổ NMR của hợp chất SSH7 và hợp chất tham khảo.....	77
Bảng 3.7. Số liệu phổ NMR của hợp chất SSH8 và hợp chất tham khảo.....	78
Bảng 3.8. Số liệu phổ NMR của hợp chất SSH9 và hợp chất tham khảo.....	80
Bảng 3.9. Số liệu phổ NMR của hợp chất SSH10 và hợp chất tham khảo.....	82
Bảng 3.10. Số liệu phổ NMR của hợp chất SSH12 và hợp chất tham khảo.....	84
Bảng 3.11. Số liệu phổ NMR của hợp chất SSH13 và hợp chất tham khảo.....	85
Bảng 3.12. Số liệu phổ NMR của hợp chất SSH17 và hợp chất tham khảo.....	87

Bảng 3.13. Số liệu phổ NMR của hợp chất SSH19 và hợp chất tham khảo.....	88
Bảng 3.14. Số liệu phổ NMR của hợp chất SSH20 và hợp chất tham khảo.....	89
Bảng 3.15. Số liệu phổ NMR của hợp chất SSH21 và hợp chất tham khảo.....	91
Bảng 3.16. Số liệu phổ NMR của hợp chất SSH22 và hợp chất tham khảo.....	91
Bảng 3.17. Số liệu phổ NMR của hợp chất SSH24 và hợp chất tham khảo.....	93
Bảng 3.18. Số liệu phổ NMR của hợp chất SSH25 và hợp chất tham khảo.....	100
Bảng 3.19. Số liệu phổ NMR của hợp chất SSH29 và hợp chất tham khảo.....	102
Bảng 3.20. Kết quả thử độc tính cấp của cao chiết Thủy bồn thảo.	104
Bảng 3.21. Ảnh hưởng của cao Thủy bồn thảo lên trọng lượng chuột.....	105
Bảng 3.22. Các chỉ số huyết học của các lô chuột thí nghiệm.....	105
Bảng 3.23. Các chỉ số sinh hóa thuộc chức năng gan của các lô thí nghiệm. ..	106
Bảng 3.24. Các chỉ số sinh hóa thuộc chức năng thận của các lô thí nghiệm. .	107
Bảng 3.25. Trọng lượng các cơ quan chuột sau 30 ngày uống mẫu	108
Bảng 3.26. Ảnh hưởng của cao chiết TBT lên trọng lượng gan của chuột bị tổn thương gan cấp tính gây bởi paracetamol	111
Bảng 3.27. Ảnh hưởng của cao chiết TBT đến hoạt độ enzym ALT trong huyết thanh chuột bị tổn thương gan cấp tính gây bởi paracetamol	112
Bảng 3.28. Ảnh hưởng của cao chiết TBT đến hoạt độ enzym AST trong huyết thanh chuột bị tổn thương gan cấp gây bởi paracetamol	112
Bảng 3.29. Ảnh hưởng của cao chiết TBT lên trọng lượng gan chuột bị tổn thương mạn tính gây bởi paracetamol.....	115
Bảng 3.30. Ảnh hưởng của cao chiết đến hoạt độ enzym ALT trong huyết thanh chuột bị tổn thương mạn tính gây bởi PAR	116

Bảng 3.31. Ảnh hưởng của cao chiết TBT đến hoạt độ enzym AST trong huyết thanh chuột bị tổn thương gan mạn tính gây bởi paracetamol..... 116

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1. Sự khác biệt về hình thái của lá và môi trường sống khác nhau của một số loài thuộc chi <i>Sedum</i>	3
Hình 1.2. Tác dụng dọn gốc tự do của tanin chiết xuất từ <i>S. pubescens</i> Vah.....	20
Hình 1.3. Hình ảnh cây Thủy bồn thảo	21
Hình 1.4. Một số đặc điểm thực vật của cây Thủy bồn thảo.	22
Hình 1.5. Hoạt tính chống tạo mạch phụ thuộc vào liều của <i>S.S</i> trong phôi gà .	38
Hình 3.1. Cây Thủy bồn thảo	61
Hình 3.2. Hình ảnh vi phẫu mặt cắt ngang thân cây Thủy bồn thảo.....	62
Hình 3.3. Đặc điểm bột phấn trên mặt đất của cây Thủy bồn thảo.....	62
Hình 3.4. Sắc ký đồ TLC định tính dung dịch ethyl acetat (1).	64
Hình 3.5. Sắc ký đồ TLC định tính dịch chiết n-buthanol (2).	65
Hình 3.6. Sắc ký đồ TLC định tính dịch chiết chloroform (3).....	66
Hình 3.7. Sơ đồ phân lập các hợp chất từ phần trên mặt đất cây Thủy bồn thảo	69
Hình 3.8. Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC chính của SSH1.....	71
Hình 3.9. Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC chính của SSH2.....	72
Hình 3.10. Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC chính của SSH3.....	74
Hình 3.11. Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC chính của SSH4.....	76
Hình 3.12. Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC chính của SSH7.....	78
Hình 3.13. Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC chính của SSH8.....	79

Hình 3.14. Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC chính của SSH9.....	81
Hình 3.15. Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC chính của SSH10	82
Hình 3.16. Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC chính của SSH12	85
Hình 3.17. Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC chính của SSH13	86
Hình 3.18. Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC chính của SSH17	88
Hình 3.19. Cấu trúc hóa học của SSH19.....	89
Hình 3.20. Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC chính của SSH20	90
Hình 3.21. Cấu trúc hóa học của SSH21.....	91
Hình 3.22. Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC chính của SSH22	92
Hình 3.23. Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC chính của SSH24.	94
Hình 3.24. Cấu trúc hóa học và các tương tác COSY, HMQC, các tương tác HMBC chính của SSH24.	95
Hình 3.25. Tương tác NOESY của hợp chất SSH24	95
Hình 3.26. Phổ ^1H -NMR của hợp chất SSH24	96
Hình 3.27. Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất SSH24	96
Hình 3.28. Phổ HSQC của hợp chất SSH24	97
Hình 3.29. Phổ HMBC của hợp chất SSH24.....	97
Hình 3.30. Phổ NOESY của SSH24	98
Hình 3.31. Phổ UV của SSH24.....	98
Hình 3.32. Phổ ECD thực nghiệm và tính toán và chuyển động quay riêng của SSH24.....	99
Hình 3.33. Phổ ECD thực nghiệm của SSH24	99

Hình 3.34. Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC chính của SSH25	101
Hình 3.35. Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC chính của SSH29	103
Hình 3.36. Hình ảnh tế bào gan và thận chuột.....	110
Hình 3.37. Ảnh hưởng của cao chiết TBT đến hoạt độ enzym ALT và AST trong huyết thanh chuột bị tổn thương gan cấp gây bởi paracetamol.	113
Hình 3.38. Ảnh đại thể gan của các lô chuột thí nghiệm.....	115
Hình 3.39. Ảnh hưởng của cao chiết TBT lên ALT và AST huyết thanh trong gan của chuột bị tổn thương mạn tính bởi paracetamol.....	117
Hình 3.40. Tác dụng chống tế bào ung thư tử cung HeLa của một số hợp chất phân lập từ Thuỷ bồn thảo.....	118

DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

T T	Kí hiệu	Tiếng Anh	Diễn giải
1	[α]_D	Specific Optical Rotation	Độ quay cực
2	¹³C-NMR	Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance	Cộng hưởng từ hạt nhân carbon 13
3	1D-NMR	1D-Nuclear Magnetic Resonance	Cộng hưởng từ hạt nhân 1 chiều
4	¹H-NMR	Proton Nuclear Magnetic Resonance	Cộng hưởng từ hạt nhân proton
5	2D-NMR	2D-Nuclear Magnetic Resonance	Cộng hưởng từ hạt nhân 2 chiều
6	ALT	Alanine aminotransferase	Enzym ALT
7	ALT	Alanine aminotransaminase	Alanin aminotransaminase
8	ALP	Alkaline phosphatase	Enzym Alkaline phosphat
9	APG	Angiosperm Phylogeny Group System	Hệ thống phân loại thực vật có hoa hiện đại
10	AST	Alanine aminotransferase	Enzym AST
11	BC		Bạch cầu
12	BHT	Butylated Hydroxy Toluen	Butyl Hydroxy Toluen
13	BuOH	n-butanol	n-butanol
14	CC	Column chromatography	Sắc kí cột
15	CCl₄	Carbon tetrachloride	Carbon tetrachlorid
16	CD	Circular Dichroism	Phổ lưỡng sắc tròn
17	CH₂Cl₂	Methylene chloride	Methylen clorid
18	CHCl₃	Chloroform	Chloroform
19	CMC	Carboxymethyl cellulose	Carboxymethyl cellulose
20	CYP450, CYP2E1 ...	Cytochrom P450...	Cytochrom P450 và các loại cytochrom khác
21	DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	Môi trường nuôi cấy tế bào
20	DMSO	Dimethyl sulfoxide	Dimethyl sulfoxid
21	DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
22	FCM	flow cytometry	Dòng chảy tế bào

23	EtOAc	Ethylacetate	Ethylacetat
24	FBS	fetal bovine serum	huyết thanh bào thai bò
25	FRAP	Ferric Reducing Ability in Plasma	Khả năng khử Fe ⁺³ trong huyết tương
26	GPT	Glutamate Pyruvate Transaminase	Glutamat Pyruvat Transaminase
27	GGT	Gamma-Glutamyl Transferase	Gamma-Glutamyl Transferase
28	h	hour	Giờ
29	HeLa	Human henrietta lack cell	Tế bào ung thư cổ tử cung người
30	HepG2	Human hepatocellular carcinoma cell	Tế bào ung thư gan người
31	HMBC	Heteronuclear multiple Bond Connectivity	Tương tác dị nhân đa liên kết
32	HP	Hydroxyproline	Hydroxyprolin
33	HPLC	High-performance liquid chromatography	Sắc ký lỏng cao áp
34	HSQC	Heteronuclear Single-Quantum Coherence	Tương tác dị nhân lượng tử đơn
35	HTCO	High temperature catalytic oxidation	Hoạt tính chống oxy hoá
36	IC₅₀	Inhibitory concentration at 50%	Nồng độ ức chế 50%
37	IL	Interleukine	Interleukin
38	IFN-γ	Interferon gamma	Interferon gamma
39	KH&KT		Khoa học và Kỹ thuật
40	LD₅₀	Lethal dose 50	Liều gây chết 50% động vật thí nghiệm
41	MDA	Malondialdehyde	Malondialdehyd
42	MeOH	Methanol	Methanol
43	MS	Mass spectroscopy	Phổ khối lượng
44	NAPQI	N-acethyl-p-benzoquinone imine	N-acethyl-p-benzoquinon imin

45	NF-κB	Nuclear Factor-kappa B	Yếu tố nhân kappa B
46	NMR	Nuclear magnetic resonance	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân
47	NO	Nitric oxide	Nitric oxid
48	NSAIDs	Nonsteroidal anti-inflammatory drugs	Thuốc chống viêm không steroid
49	NXB		Nhà xuất bản
50	OD	Optical Density	Mật độ quang học
51	PAR	Paracetamol	Paracetamol
52	PBS	Phosphate Buffered Saline	Đệm phosphate
53	RP-18	Reserve phase C-18	Chất hấp phụ pha đảo C-18
54	TNF-α	Tumor Necrosis Factors- α	Yếu tố hoại tử khối u- α
55	SRB	Sulforhodamine B	Sulforhodamine B
56	TBT		Thuỷ bồn thảo
57	TLC	Thin layer chromatography	Sắc ký lớp mỏng
58	TMS	Tetramethylsilane	Tetramethylsilan
59	TGF-β1	Transforming Growth Factor β 1	Transforming Growth Factor β 1
60	TT		Thuốc thử
61	WHO	World Health Organization	Tổ chức Y tế Thế giới
62	YHCT		Y học cổ truyền

ĐẶT VẤN ĐỀ

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

Ở Việt Nam, cây Thủy bồn thảo thuộc họ Thuốc bỏng - Crassulaceae, được người dân tộc H'Mông sử dụng để tắm cho trẻ em rôm sảy, người bị mẩn ngứa, toàn cây dùng sắc uống điều trị viêm gan hoàng đản, hầu họng sưng đau, mụn nhọt, rắn độc cắn, đòn ngã tổn thương [3], [7]. Cây Thủy bồn thảo phân bố hẹp, khả năng tồn tại và phát triển trong tự nhiên yếu, nên được ghi trong sách đỏ Việt Nam với cấp đánh giá 'đang nguy cấp' (E) phân hạng VU B1+2a. [2]

Với mục đích góp phần nghiên cứu về đặc điểm thực vật, thành phần hóa học cũng như một số tác dụng sinh học của cây Thủy bồn thảo, chúng mình kinh nghiệm sử dụng vị thuốc trong dân gian, nhất là tác dụng chống viêm, điều trị viêm gan, xơ gan, bảo vệ gan,... Nghiên cứu sinh lựa chọn đề tài: **“Nghiên cứu đặc điểm thực vật, thành phần hóa học và một số tác dụng sinh học của cây Thủy bồn thảo (*Sedum sarmentosum* Bunge), Crassulaceae”** với các mục tiêu sau:

1. Mô tả được đặc điểm thực vật, vi phẫu thân và định tính được các nhóm chất có trong cây Thủy bồn thảo.
2. Xác định được các nhóm hợp chất chủ yếu, phân lập và xác định cấu trúc một số hợp chất có trong cây Thủy bồn thảo.
3. Đánh giá được độc tính cấp, độc tính bán trường diễn, tác dụng bảo vệ gan của cao toàn phần Thủy bồn thảo và khả năng chống ung thư cổ tử cung của một số hợp chất phân lập được.

CHƯƠNG I. TỔNG QUAN

1.1. Tổng quan về chi *Sedum* L.

1.1.1. Vị trí phân loại, đặc điểm thực vật và phân bố của chi *Sedum* L.

1.1.1.1. Vị trí phân loại chi *Sedum* L.

Vị trí phân loại chi *Sedum* theo hệ thống phân loại APG IV(2016) [10] như sau:

Giới thực vật (*Plantae*)

Ngành Thực vật có hoa; Mộc lan; Hạt kín (*Magnoliophyta*)

Lớp hai lá mầm (*Magnoliopsida*)

Bộ Tai hùm, Thường sơn (*Saxifragales*)

Họ thuốc bỏng (*Crassulaceae*)

Chi *Sedum* Bunge

1.1.1.2. Phân bố các loài thuộc chi *Sedum* L.

Chi *Sedum* thuộc họ (Crassulaceae), phân bố chủ yếu ở bán cầu bắc, một số nằm ở phía nam châu Phi và châu Mỹ. Có khoảng 124 loài được trồng ở Trung Quốc [55].

Sedum là chi lớn nhất và phổ biến nhất trong họ Crassulaceae [132]. Chi này gồm các loại thảo mộc hàng năm và lâu năm, với lá và thân mọng nước và phân bố chủ yếu trong môi trường khô cạn ở vùng ôn đới đến cận nhiệt đới. Phân bố nhiều nhất ở Địa Trung Hải, Trung Mỹ, Himalaya và Đông Á [117], [119], [116]. Sự đa dạng của nó cao nhất ở vùng Địa Trung Hải, Trung Mỹ, dãy Himalaya và Đông Á [66], [132]. Số lượng loài trong các quốc gia Đông Á như sau: Trung Quốc có 49 loài (27 loài đặc hữu) với hai phân loài và một giống. Nhật Bản 17 loài (năm loài đặc hữu) với bốn phân loài và ba giống [47]. Hàn Quốc có bảy loài (không có loài đặc hữu) [68] và Đài Loan 15 loài (13 loài đặc hữu) với một phân loài và hai giống. [40]

Các báo cáo gần đây cho thấy, chi *Sedum* là chi rất đa dạng trong các chi của Mỹ như *Echeveria*, *Graptopetalum*, *Lenophyllum*, *Pachyphytum*, *Villadia* và

Thompsonella [119], [44], [20]. Trong khi đó các loài thuộc chi *Sedum* châu Á tạo thành một nhánh riêng [86], [38]. Các loài thuộc chi *Sedum* châu Á đã chia thành ba chi: *Sedum*, *Oreades* và *Filipes*. *Oreades* phân bố chủ yếu ở dãy Himalaya và phía Tây Trung Quốc [86]. Đài Loan có mức độ đặc hữu cao nhất ở Đông Á, nhiều loài có sự khác biệt về hình thái. Các loài thuộc *Sedum* sinh sống ở các môi trường khác nhau như trên núi cao, dốc đá khô, thảm rừng, đá rêu, ký sinh trên thân cây, núi đá ven biển và đá vôi lộ thiên (hình 1.1), chủ yếu ở độ cao hơn 1.500 m. Chỉ có hai loài *S. formosanum* và *S. sekiteiense* sống ở vùng ven biển và vùng núi đất thấp [80]. Những môi trường này khác nhau rất nhiều về mức độ chiếu sáng, độ ẩm và nhiệt độ, cũng như chất đất, độ mặn và các đặc điểm khác.



A: *S. morrisonense* trên đá núi cao.
 B: *S. brachyrinchum* trên đá núi cao
 C: *S. truncastigmum* trên thân cây
 D: *S. triangulosepalum* trên thân cây
 E: *S. morrisonense* (đầu mũi tên) và *S. brachyrinchum* (mũi tên) cùng tồn tại trên đá núi cao.
 F: *S. actinocarpum* (đầu mũi tên) và *S. truncastigmum* (mũi tên) cùng tồn tại trên một thân cây.

Hình 1.1: Sự khác biệt về hình thái của lá và môi trường sống khác nhau của một số loài thuộc chi *Sedum*.

1.1.1.3. Đặc điểm thực vật chi *Sedum* L.

Chi *Sedum* thường là dạng cỏ sống dai, cây thảo mọc nước, nhẵn hoặc cây bụi thấp và nạc. Lá mọc so le, đôi khi mọc đối hay dính liền, không có lá kèm, chủ yếu là nhẵn, ít lông. Thân rễ thường không phát triển, thỉnh thoảng cây có rễ mọc ở đốt thân. Thân cây thẳng hay bò lan trên mặt đất, đôi khi tụ thành

chùm giống như râu, nhẵn hoặc có lông, gốc hiếm khi thân gỗ. Lá mọc xen kẽ, mọc đối hoặc mọc vòng, gốc thường phát triển (4-8 răng cưa ở *Sedum rosthornianum* và răng cưa rất nhỏ ở *S. engleri*, *S. dentatum*). Cụm hoa mọc ở đỉnh, hoặc nách lá, cụm hoa sim, thường là dạng ngù, có 1 đến nhiều hoa. Hoa thường lưỡng tính, hiếm khi đơn tính, chủ yếu là không đều (3-) 5 (- 9). Đài hoa và cánh hoa rời, hoặc hợp, chủ yếu là màu vàng, ít có màu trắng hoặc đỏ. Nhị hoa thường có kích thước gấp 2 lần cánh hoa, hiếm khi bằng số lượng với cánh hoa. Lá noãn thường nhiều như cánh hoa, đôi khi ít hơn, không có hay ngắn và liên kết. Vòi nhụy ngắn hoặc dài. Quả nang nhiều hoặc ít hạt, hạt nhẵn hoặc có áo hạt, thường ít có rãnh.

Khóa phân loại chi *Sedum* [134]

1a. lá noãn và quả đại hướng trục lồi...3. S. sect. *Sedum*

1b. lá noãn và quả đại hướng trục không lồi

2a. gốc lá có cựa; cánh hoa màu vàng, hiếm khi đỏ hoặc tím đỏ....

2. S. sect. *Oreades*

2b. gốc lá không có cựa; cánh hoa màu trắng hoặc tím đỏ, hiếm khi vàng....1. S. sect. *Filipe*

Hoa thường lưỡng tính, đều. Đài có 3-5, ít khi 6-30 phần, với lá đài đôi khi dính thành đài chẻ tư. Cụm hoa xim, chùm hay bông. Hoa đều, mẫu 4 hoặc 5 thường lưỡng tính. Cánh hoa bằng số lượng lá đài, có khi dính ở gốc, 5-20 nhị, ít khi 3-7, hay nhiều hơn, dính trên đài hay dính với tràng khi hoa cánh hợp. Lá noãn rời, có số lượng bằng số cánh hoa, rời hay dính ở phía dưới và kèm theo những vẩy nhỏ phẳng ở gốc, vòi đơn. Gồm nhóm số nhị bằng lá đài và cánh tràng, lá mọc đối và nhóm có số nhị gấp đôi cánh tràng và lá cách hay mọc đối. Họ này gần với họ *Saxifragaceae*, gồm 35-37 chi với 1.450 loài, phân bố rộng nhưng chủ yếu ở vùng ẩm khô, nhất là Nam Phi [119].

Quả phức, gồm nhiều quả đại 1 ô, nhiều noãn, mở bởi một khe trên đường nối trong và cùng dính với nhau nhiều hay ít ở gốc, ít khi lá noãn rời hợp thành

bầu nhiều ô; hạt có phôi nhũ nạc. Quả hạt mở theo đường hàn ở bụng. Thế giới có 35 chi và 1.450 loài, phân bố toàn cầu, tập trung ở Nam Phi.

Bảng 1.1: Phân bố một số loài thuộc chi *Sedum* ở một số quốc gia [117]

TT	Tên loài	Phân bố
1	<i>S. alfredii E.</i>	Trung Quốc
2	<i>S. hangzhouense</i>	Đông Trung Quốc
3	<i>S. jiulongshanense</i>	Đông Trung Quốc
4	<i>S. kiangnanense</i>	Đông Trung Quốc
5	<i>S. oligospermum</i>	Đông Trung Quốc
6	<i>S. lineare</i>	Việt Nam, Đông Trung Quốc
7	<i>S. sarmentosum</i>	Việt Nam, Đông Trung Quốc
8	<i>S. erici-magnusii</i>	Tây Trung Quốc
9	<i>S. multicaule</i>	Tây Trung Quốc
10	<i>Sedum sp.</i>	Tây Trung Quốc
11	<i>S. bulbiferum</i>	Nhật Bản
12	<i>S. hakonense</i>	Nhật Bản
13	<i>S. japonicum</i>	Nhật Bản
14	<i>S. makinoi</i>	Nhật Bản
15	<i>S. mexicanum</i>	Nhật Bản
16	<i>S. nagasakianum</i>	Nhật Bản
17	<i>S. rupifragum</i>	Nhật Bản
18	<i>S. satumense</i>	Nhật Bản
19	<i>S. subtile</i>	Nhật Bản
20	<i>S. tosaense</i>	Nhật Bản
21	<i>S. tricarpum</i>	Nhật Bản
22	<i>S. zentaro-tashiroi</i>	Nhật Bản
23	<i>S. triactina</i>	Nepan
24	<i>S. trullipetalum</i>	Nepan
25	<i>S. oreades</i>	Nepan

Ở Việt Nam có 2 loài, Trường sinh lá tròn (*Sedum lineare* Thunb) và Thủy bồn thảo (*Sedum sarmentosum* Bunge) [2], [3], [7].

Theo các nhà thực vật thuộc Viện hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam [7], gần đây mới phát hiện loài *Sedum rosea* phân bố ở đỉnh Phan Si Pan, mọc rải rác hay thành đám, trong các kẽ đá, ở độ cao 2.700-3.100m. Loài này

được phát hiện vào tháng 4 năm 1995, nhưng vì mẫu thu được không có hoa (hoặc quả) nên chưa xác định được tên khoa học chính xác.

Đầu tháng 5 năm 2015, đoàn cán bộ thuộc Viện nghiên cứu phát triển Y Dược Phương Đông, thuộc công ty cổ phần dược phẩm Quốc Gia, tiến hành điều tra lại một số điểm tại đỉnh núi Phan Si Pan, nhưng chưa thu được mẫu. Đoàn đã thu được 2 mẫu thuộc chi *Sedum* L, mẫu thu được chưa có hoa quả, nên mới dự kiến là Thuỷ bồn thảo (*Sedum sarmentosum* Bunge) và Trường sinh lá kim, còn gọi là Phật giáp thảo - *Sedum lineare* Thunb. Mẫu thu được đem về trồng tại Sa Pa.

1.1.2. Thành phần hóa học

Những cây thuộc họ Crassulaceae có nhiều tanin, acid oxalic và một loạt các alcaloid khung piperidin. [57]

Cho đến nay thành phần hóa học của 92 loài thuộc chi *Sedum* đã được nghiên cứu ở các mức độ khác nhau. Flavonoid, 3-O-glycosid (đôi khi là methyl este), acid phenolic (chủ yếu là gallic), coumarin, 6,7- các dẫn xuất, alcaloid và carbohydrat chiếm ưu thế trong tất cả các loài. [29]

Trong *S. rosea* có tới 140 hợp chất. Thân rễ chứa các hợp chất phenol, rosavin, rosin, rosarin, acid hữu cơ, terpenoid, acid phenolcarbonic, flavonoid, anthraquinon và alcaloid. Thành phần tinh dầu của thân rễ của loài này ở các nước khác nhau cũng có sự khác nhau: Hàm lượng rosavin, rosarin, rosin cao nhất ở các mẫu thu ở Nga, trong khi đó mẫu thu ở Bulgaria lại là geraniol và myrtenol, mẫu thu ở Trung Quốc là geraniol và 1-octanol, trong khi đó mẫu thu ở Ấn Độ lại là phenylethylic alcohol. Cinnamic alcohol chỉ phát hiện được ở mẫu của Bulgaria [34]. Salidroside (đôi khi còn là p-tyrosol, rhodionisid, rhodiolin và rhosiridin) được xem là hoạt chất của loài *Sedum rosea*. Các salidroside như rhodiolosid và rhodopsin có công thức hoá học là p-hydroxyphenylethyl-o-β-D-glucopyranosid. Viridosid có công thức hoá học salidroside methyl hoá. Lotaustralin là một cyanogenic glycosid. Gossypetin là 7-O-L-rhamnopyranosid, còn rhodioflavonosid là gossypetin diglycosid, ngoài ra

còn có benzyl-o-glycopyranosid. Các procyanidin có công thức cấu tạo giống như EGCG trong chè xanh và chiếm tới 35% trong cao chiết còn 70%. Procyanidin chiếm hàm lượng 3,6-5,43% trong thân rễ khô, cao hơn so với sơn tra (*crataegus pinnatifida*). Ngoài ra còn có các hợp chất phenol như acid gallic, acid cinnamic và β -sitosterol.

Sedum sarmentosum Bunge, chủ yếu chứa flavonoid, glycosid cyanogen, alkaloid, triterpen, sterol và các hợp chất khác. [93], [97], [125]

Bảng 1.2: Các hợp chất trong một số loài thuộc chi *Sedum*

Hợp chất được xác định	<i>S. acre</i>	<i>S. aizoon</i>	<i>S. ewersii</i>	<i>S. hybridum</i>	<i>S. kamtzcaticum</i>	<i>S. purpureum</i>	<i>S. telephium</i>
Phenol							
Hydroquinon	+	+	+	+	+	+	+
Phloroglucinol	+	+	+	+	+	+	+
Pyrocatechol	+		+		+		+
Pyrogallol					+		+
Arbutin	+	+	+	+	+	+	+
Acid phenolic							
Gallic	+	+	+	+	+	+	+
Caffeic	+	+	+	+	+	+	+
Ferulic	+	+	+	+		+	+
Syringic	+	+	+	+	+	+	+
Gentisic	+	+	+	+		+	+
Vanillic	+	+	+	+	+	+	+
o-coumaric	+				+	+	+
Carbonhydrat							
Glucose	+	+	+	+	+	+	+
Rhamnose	+	+	+	+	+	+	+
Fructose	+		+	+		+	+

Hợp chất được xác định	<i>S. acre</i>	<i>S. aizoon</i>	<i>S. ewersii</i>	<i>S. hybridum</i>	<i>S. kamtzcaticum</i>	<i>S. purpureum</i>	<i>S. telephium</i>
Maltose	+						+
Arabinose	+						
Acid amin							
Cystein	+	+	+	+	+	+	+
Tryptophan	+	+	+	+	+	+	+
Threonin	+	+	+	+	+	+	+
Acid glutamic	+	+	+	+	+	+	
Acid aspartic	+	+	+	+	+	+	
Methionin	+	+		+			+
Asparagin	+			+			
Glutamin			+				
Arginin	+	+		+	+	+	+
Coumarin							
Coumarin	+			+		+	+
4,5-dihydroxycoumarin			+	+	+		
7-hydroxycoumarin	+	+	+	+		+	+
Flavonoid							
Kaempferol	+	+	+	+	+	+	+
Quercetin	+	+	+	+	+	+	+
Gossypetin		+	+	+			

Hợp chất được xác định	<i>S. acre</i>	<i>S. aizoon</i>	<i>S. ewersii</i>	<i>S. hybridum</i>	<i>S. kamtzcaticum</i>	<i>S. purpureum</i>	<i>S. telephium</i>
Kaempferol 3-O- α -L-rhamnopyranosid	+		+	+			
Quercetin 3-O- α -L-rhamnopyranosid		+	+	+	+	+	+
Quercetin 3-O- β -D-(2''-O-galloyl) glucopyranosid				+	+		
Quercetin 3-O- β -D-galactopyranosido-(1-6)-O- β -D-xylopyranosid				+	+		
Quercetin 3-O-rutinosid		+	+	+	+		
Quercetin 3-O- β -D-glucopyranosid	+	+	+	+		+	+
Gossypetin 7-O- β -D-xylopyranosid			+	+			
Peonidin 3-O- β -D-glucopyranosid		+		+		+	+
Pelargonidin 3-O- β -D-glucopyranosid			+	+		+	
Hydrolyzed tannin							
2,3-digalloyl-D-glucose		+	+	+	+		
3,6-hexahydroxydiphenoyl-D-glucose			+	+			+

1.1.3. Công dụng, tác dụng sinh học của chi *Sedum* L.

1.1.3.1. Công dụng của chi *Sedum* L

Chi *Sedum* có công dụng điều trị ung thư, chống viêm, chống phóng xạ, làm giãn mạch, chữa lành vết thương, hạ huyết áp, hạ sốt, lợi tiểu, giải độc, là thành phần chính trong phương thuốc chữa bệnh viêm gan mạn tính. [71], [74]

Theo “Tân biên dược học” ghi: *S. rosea* tăng cường sự tự điều tiết trong cơ thể theo cả 2 chiều (tác dụng 2 pha), tăng khả năng đề kháng của cơ thể, để chống chịu lại các yếu tố bất lợi bên trong và tăng khả năng chịu đựng trước các điều kiện bất lợi bên ngoài, như nhiệt độ, độ cao, thiếu dưỡng khí, ô nhiễm, tiếng ồn, phóng xạ và những chất độc hại. Sách “Thực vật làm thuốc ở cao nguyên Tây Tạng” ghi: “*S. rosea* có tác dụng hạ sốt, nhuận phổi, trị viêm phổi, trị thần kinh tê liệt, làm thuốc bổ dưỡng, bổ thần kinh, lợi tim mạch, chữa trị các chứng ung bướu...”. Các sách cổ Trung Quốc còn ghi lại, vua Khang Hy đưa vị thuốc này vào danh sách các vật phẩm tiến vua và gọi là “Cỏ thần tiên ban”.

“Y học chống lão hoá” của Trung Quốc thì ghi: *S. rosea* có nhiều công năng chống lão hoá, bồi bổ cơ thể cường tráng, bổ thận tráng dương, cường tim, bổ huyết, hoạt huyết, trị được các chứng liệt dương, tiểu đường, thần kinh suy nhược, thiếu máu, huyết áp thấp, hạch trong phổi...dùng để chống mỏi mệt, nâng cao khả năng làm việc chân tay và trí lực, chữa các bệnh suy giảm chức năng thần kinh, các bệnh về nội huyết quản, chứng thiếu máu, yếu tim do tuổi cao, liệt dương, chống thiếu dưỡng khí, chống lạnh, chống độc, chống phóng xạ, làm chậm quá trình lão hoá, phòng các bệnh tuổi già. “Thiên kim dược phương” thì cho rằng, *S. rosea* còn làm mắt sáng, uống lâu giúp tinh thần sáng khoái, tươi trẻ.

Về tác dụng bồi bổ cơ thể, người Nga cũng sử dụng *S. rosea* làm thuốc cường tráng cơ thể, đã chứng minh có tác dụng tốt đối với bệnh suy tim ở người già, an thần, tiểu đường, liệt dương và chống lão hoá. Liên Xô trước đây đã đưa một số sản phẩm bào chế từ loài này vào sử dụng trong y học vũ trụ, y học thể thao, cho những người phải làm việc trong môi trường thiếu dưỡng khí.

Về tác dụng sinh học, *S. rosea* đã được chứng minh có các tác dụng sau: Cải thiện tình trạng mệt mỏi, tăng khả năng nhận thức, chống trầm cảm, cải thiện nhịp tim, chống thiếu oxy ở tim, tăng tiết sữa, giảm peroxy hoá lipid, tăng trương lực cơ, tăng khả năng tập trung, cải thiện khả năng phản xạ, tăng độ chính xác trong công việc, hạ huyết áp, hạ đường huyết, tăng khả năng hoạt động của cơ, tăng khả năng tổng hợp canxi ở xương, bảo vệ gan, ngoài ra còn có tác dụng kiểu estrogen [18], [34], [42]. Hàng nghìn năm nay, người Tây Tạng gọi *S. rosea* là thần bảo vệ sinh mệnh, bất lão đan, nhân sâm cao nguyên.

S. lineare Thunb là một loại thảo dược lâu năm, phân bố rộng rãi ở Trung Quốc và Việt Nam, có tác dụng hạ sốt, giải độc và giảm sung. Toàn bộ cây được sử dụng làm thuốc dân gian truyền thống để điều trị vàng da, viêm gan dai dẳng, viêm họng và bệnh lỵ. [27]

Chi *Sedum* được sử dụng trong y học cổ truyền Mông Cổ để giảm xuất huyết, cầm máu, băng huyết, vết thương, chấn thương, phù nề đau đớn và mất ngủ do khó chịu, cảm xúc sợ hãi. [120]

S. sarmentosum Bunge, được sử dụng rộng rãi trong y học cổ truyền Trung Quốc để điều trị viêm gan cấp tính và mãn tính, vàng da, bệnh thấp nhiệt, bệnh viêm mũi và tiểu tiện khó [35]. Các nghiên cứu dược lý cho thấy có tác dụng bảo vệ gan [47], [100], [101], [97]

Theo kinh nghiệm dân gian ở nước ta, bộ phận dùng là toàn cây, thu hái quanh năm, có thể dùng tươi hay phơi khô. Toàn cây có vị đắng, tính ôn, thường dùng trị họng sung đau, viêm gan kiểu hoàng đản, giảm mệt mỏi, đòn ngã tổn thương, ghê lở, bỏng lửa, mụn nhọt độc, đĩnh độc, rôm sảy, rắn độc cắn. Thủy bồn thảo là vị thuốc chữa bệnh viêm gan của người H'Mông [3], [6], [7].

Các nghiên cứu dược lý cho thấy *S. sarmentosum* Bunge, có tác dụng bảo vệ gan, chống khối u, cải thiện viêm tụy cấp và tổn thương phổi, chống viêm, chống oxy hóa, chống xơ hóa thận, ức chế miễn dịch và tăng cường chức năng cơ [65], [12], [13], [64], [51].

Trường sinh lá tròn (*S. lineare*) mọc ở Sa Pa được dùng để đắp trị mụn

nhọt, vết thương sung nóng, bỏng, đau sung hầu họng, viêm amygdal, viêm kết mạc cấp tính, đờn ngã tổn thương, đau nhức răng, ung sang thũng độc, rắn độc cắn, viêm gan hoàng đản, ly. Chất sarmentosin có trong *S. sarmentosum* Bunge. giúp ăn ngon, ngủ ngon, giải độc [3], [27].

Về độc tính của *S. sarmentosum* Bunge, LD₅₀ của dịch chiết *S. sarmentosum* ở chuột là 54,2 g/kgTT. Tiêm dịch chiết vào trực tràng cho chó ở mức 30g/kgTT/ngày trong 8 tuần gây ra nôn mửa và tiêu chảy, nhưng không có bất thường nào trong hình ảnh máu, GPT, bilirubin, nitơ urê và protein huyết thanh, và không có thay đổi bệnh lý rõ rệt ở các cơ quan. Dựa trên những phát hiện này và liều lượng lâm sàng có thể kết luận *S. sarmentosum* có độc tính thấp [49].

1.1.3.2. Hoạt tính sinh học của chi *Sedum* L

Dưới sự hỗ trợ của khoa học kỹ thuật, ngày càng có nhiều nghiên cứu đánh giá tác dụng sinh học của các loài thuộc chi *Sedum* L. Mục đích của những nghiên cứu này nhằm chứng minh tác dụng chữa bệnh của dược liệu theo kinh nghiệm dân gian, là một giai đoạn của quá trình nghiên cứu phát triển thuốc mới. Những nghiên cứu về tác dụng sinh học đã được công bố như: Chống viêm, chống ung thư và ức chế miễn dịch [69], [87], [112], [104], [51]. Tác dụng chống oxy hóa của flavonoid toàn phần từ *S. sarmentosum* [139], tác dụng bảo vệ gan [142] và tác dụng kháng khuẩn của tinh dầu *S. pallidum* var. *bithynicum* và *S. spurium* [121].

➤ Tác dụng bảo vệ gan

Năm 2005, Zhou Qing và cs đã nghiên cứu tác dụng bảo vệ gan của dịch chiết *S. lineare* Thunb đối với tổn thương gan cấp tính ở chuột [142]. Bằng phương pháp xác định hàm lượng bilirubin toàn phần, Alanin aminotransferase (ALT) trong huyết thanh, hàm lượng Malondialdehyd (MDA), Superoxyd dismutase (SOD), hàm lượng Nitơ monoxyd trong huyết thanh và mô gan thay đổi do CCl₄, α -naphthalin fluorescein isothiocyanat (ANIT) gây ra ở chuột, những ảnh hưởng của *S. lineare* Thunb đến những thay đổi sinh hóa đã được

phân tích. Kết quả cho thấy dịch chiết *S. lineare* Thunb có thể làm giảm đáng kể hàm lượng ALT và MDA trong huyết thanh và mô gan ở chuột nhiễm độc CCl₄ ($p < 0.01$), tăng hoạt tính của SOD và mức độ nitric oxid (NO) trong huyết thanh và mô gan tương ứng ($p < 0.01$, $p < 0.001$); dịch chiết *S. lineare* Thunb có thể làm giảm đáng kể hàm lượng bilirubin toàn phần trong huyết thanh ở chuột nhiễm độc ANIT ($p < 0.001$). Kết quả kiểm tra bệnh lý gan cho thấy dịch chiết có hiệu quả làm giảm thoái hóa và hoại tử tế bào gan. Như vậy dịch chiết của *S. lineare* Thunb có tác dụng bảo vệ tổn thương gan cấp tính ở chuột do CCl₄ và ANIT gây ra. Cơ chế có khả năng liên quan đến việc cải thiện vi tuần hoàn và chống oxy hóa lipid.

➤ **Tác dụng chống ung thư**

Năm 2015 Zhou Qing và cs đã nghiên cứu cơ chế chống khối u của dịch chiết cò *S. lineare* Thunb bằng cách nghiên cứu biểu hiện protein IL-10, TNF- α và NF- κ B trong mô khối u ở chuột mang khối u S180 [105]. Mô hình chuột mang S180 được tạo ra bằng cách tiêm dưới da khối u ascitic S180 vào nách phải. Từ ngày thứ hai, những con chuột được điều trị bằng nước muối bình thường, cyclophosphamid (50mg/kgTT) hoặc hai liều *S. lineare* Thunb (4,8g/kgTT) qua đường uống vào dạ dày trong thời gian 14 ngày. Sau lần dùng cuối cùng, trọng lượng cơ thể chuột và chỉ số khối u, biểu hiện protein của IL-10, TNF- α , NF- κ B/P65 và NF- κ B/P50 trong mô khối u được đo bằng phương pháp Western Blot. Kết quả: Trọng lượng cơ thể của chuột được điều trị bằng *S. lineare* Thunb cao hơn đáng kể so với CP. So sánh với nhóm mô hình, các nhóm *S. lineare* Thunb cho thấy giảm chỉ số khối u và có thể cải thiện đáng kể biểu hiện protein của IL-10, TNF- α , NF- κ B/P65 và NF- κ B/P50. Kết luận: hoạt hóa NF- κ B và sau đó nâng mức TNF- α và tăng hàm lượng IL-10 là một trong những cơ chế của tác dụng chống khối u của *S. lineare* Thunb.

Để đánh giá ảnh hưởng của *S. lineare* đối với sự phát triển của khối u và mức độ tập hợp tế bào lympho T và cytokin S180 ở chuột mang khối u, tìm ra cơ chế miễn dịch chống khối u trên mô hình gây u báng Sarcoma 180 trên chuột,

bằng cách tiêm dưới da S180 vào nách phải. Sử dụng liên tục *S. lineare* (liều 4,8g/kgTT) trong 14 ngày. Tính trọng lượng khối u, tỷ lệ ức chế khối u, tuyến ức và chỉ số lách. Kỹ thuật dòng tế bào (FCM) đã được sử dụng để khảo sát tỷ lệ tế bào dương tính (Cytokine Dendritic - CD) CD3+, CD4+, CD8+ trong tế bào lympho T và tính tỷ lệ CD4+/CD8+. Nồng độ interleukin-6 (IL-6), interleukin-10 (IL-10) và yếu tố hoại tử khối u (TNF- α) được phát hiện bằng xét nghiệm miễn dịch liên quan đến enzym (ELISA). Kết quả cho thấy: Tỷ lệ ức chế khối u ở nhóm *S. lineare* Thunb liều thấp và liều cao (4g/kgTT và 8g/kgTT) là 84, 26% và 62,24%, cao hơn nhóm CTX 29,28%. Sau khi được điều trị bằng *S. lineare* Thunb, chỉ số tuyến ức tăng lên, trong khi chỉ số lách giảm xuống. Hàm lượng phần trăm của tế bào lympho T CD3+, CD4+ đã được cải thiện, tỷ lệ tế bào lympho T CD8+ giảm và CD4+/CD8+ tăng lên rõ rệt. Nồng độ IL-6 và IL-10 trong huyết thanh tăng đáng kể và mức độ TNF- α có xu hướng tăng. Kết luận, *S. lineare* Thunb có tác dụng chống khối u trên chuột mang S180 và cơ chế là cải thiện chức năng đáp ứng miễn dịch. [51]

➤ **Tác dụng kháng khuẩn**

Năm 2011, Odontuya Gendaram và cs, bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch đã xác định dịch chiết phần trên mặt đất *S. hybridum* có hoạt tính kháng khuẩn *in vitro* chống lại các chủng vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Micrococcus luteus* và *Staphylococcus aureus* [68] (dùng kanamycin làm kháng sinh đối chiếu). Kết quả, *S. hybridum* ức chế mạnh các dòng vi khuẩn: *M. luteus*, *E. faecalis*, *E. coli* và *S. aureus*, và ức chế kém đối với dòng *P.aeruginosa*. Ức chế sự phát triển của tất cả các chủng vi khuẩn gram dương, sự phát triển của *M. luteus* ở nồng độ 200 μ /đĩa, để tạo ra vòng vô khuẩn 9,1mm, ức chế vừa phải đối với *S. aureus* ở nồng độ 1000 μ /đĩa và *E. faecalis* ở nồng độ 1500 μ /đĩa [39].

Năm 2016, Chawki Bensouici và cs đã công bố, dịch chiết toàn phần và các phân đoạn từ *S. caeruleum* có hoạt tính kháng khuẩn [15]. Trong đó, dịch chiết chloroform thể hiện hoạt tính kháng khuẩn chống lại một loạt các vi khuẩn

như *Escherichia coli* ATCC 25922, *E. coli* (HS), *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, *S. aureus* (HS), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *P. aeruginosa* (HS), *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *K. pneumoniae* (HS), và *Streptococcus enterococcus* (HS).

Bảng 1.3. Hoạt tính kháng khuẩn (đường kính vòng vô khuẩn và MIC) của phân đoạn chiết chloroform của *S. caeruleum*

	Vi sinh vật	Vòng ức chế (mm)	MIC (µg/mL)
Các chủng tham chiếu (ATCC)	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	12	80
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	13	80
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	13	80
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300	13	80
Chủng bệnh viện (HS)^b	<i>Escherichia coli</i> (HS) ^b	12	80
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (HS) ^b	12	80
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (HS) ^b	11	80
	<i>Staphylococcus aureus</i> (HS) ^b	12	80
	<i>Streptococcus enterococcus</i> (HS) ^b	12	80

MIC- *minimum inhibitory concentration* (nồng độ ức chế tối thiểu) (mg/mL). **Hospital strain** - (HS)^b. **vòng ức chế** - 128 µg/mL.

Kết quả cho thấy, dịch chiết chloroform ức chế nhẹ sự tăng trưởng của tất cả các chủng vi khuẩn với đường kính vòng vô khuẩn 12-13mm. Các giá trị MIC được tìm thấy là 80 µg/ml kháng sáu vi khuẩn gram (-) được thử là *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* (HS), *P. aeruginosa* ATCC 27853, *P. aeruginosa* (HS), *K.*

pneumonia (HS), *K. pneumoniae* (ATCC 700603) và ba vi khuẩn Gram (+) là *S. aureus* ATCC 43300, *S. aureus* (HS) và *S. enterococcus* (HS).

Năm 2016, Nouioua Wafa và Gaamoune Sofiane đã xác định tác dụng kháng khuẩn của tanin chiết từ *S. pubescens* Vahl [86], [87]. Kết quả cho thấy tanin có khả năng ức chế hai dòng vi khuẩn *Escherichia coli* ATCC 25922 và *Staphylococcus aureus* ATCC25923 lần lượt là $7,00 \pm 0,47$ và $9,25 \pm 0,05$ so với mẫu chuẩn là $9,25 \pm 0,05$ và $27,67 \pm 0,47$ và không có tác dụng trên dòng *Salmonella typhimurium* ATCC 13311. [109]

Năm 2018, Feng Xu, Chunxing Wang, Hongfei Wang và cs, đã nghiên cứu tác dụng kháng khuẩn của flavonoid phân lập được từ loài *S. aizoon* L [130]. Kết quả cho thấy flavonoid làm giảm nhanh mật độ tế bào vi khuẩn và gây ra sự ly giải - LAB. Dựa trên những kết quả này, nhóm nghiên cứu đã chỉ ra cơ chế kháng khuẩn của flavonoid từ *S. aizoon* L là chống lại LAB. Các xét nghiệm về độ dẫn điện và định lượng acid nucleic trên bề mặt LAB cho thấy flavonoid đã phá vỡ màng của các tế bào vi khuẩn. Độ dẫn điện luôn cao hơn ở các nhóm được điều trị bằng flavonoid so với nhóm đối chứng và phá vỡ cấu trúc của màng tế bào vi khuẩn, ảnh hưởng đến chuyển hóa tế bào và dẫn đến chết tế bào [9].

➤ **Tác dụng kháng viêm**

Năm 2004, Dong Wook Kim và cs. đã nghiên cứu tác dụng ức chế của *S. kamtschaticum* trên các mô hình gây phù tai và bàn chân chuột bởi dầu croton.

Kết quả cho thấy, Dịch chiết của *S. kamtschaticum* trong MeOH ức chế đáng kể mức độ phù tai chuột gây bởi croton (ức chế 24%-47% tại mức liều 50-400 mg/kgTT) và phù bàn chân chuột (ức chế 24-30% ở mức liều 400-800 mg/kgTT) Ngoài ra, *S. kamtschaticum* thể hiện hoạt độ giảm đau mạnh do acid acetic ($IC_{50}=125$ mg/kgTT), trong khi aspirin (200 mg/kgTT) cho ức chế 57% [69].

Năm 2015, G.O. De Melo và cs. đã nghiên cứu tác dụng chống viêm từ nước ép tươi lá của cây *S. dendroideum*. Nghiên cứu đã đánh giá tác dụng giảm

đau và chống viêm *in vivo* của loài này. Cho uống liều 0,1-1g/kgTT nước ép đông lạnh *S. dendroideum* (LJ) đã làm giảm đáng kể phản ứng đau do acid acetic ($ID_{50}=631$ mg/kg) và ức chế phù tai chuột do dầu croton (ức chế 66% ở mức 1g/kgTT). Flavonoid trong nước ép của *S. dendroideum* là hoạt chất có tác dụng giảm đau và chống viêm. [30]

Năm 2017, De Oliveira và cs đã nghiên cứu tác dụng chống viêm của polysacharid thu được từ dịch chiết lá cây *S. dendroideum*. Nhóm nghiên cứu đã chỉ ra rằng các polysacharid pectic RSBAL-H₂O và RSBAL-0.5, kích thích bài tiết các cytokin TNF- α , IL1- β và IL-10 bởi đại thực bào THP-1, đóng vai trò là tác nhân kích thích miễn dịch. Nhưng mặt khác, chúng làm giảm bài tiết TNF- α và IL1- β . [31]

➤ **Tác dụng chống oxy hóa**

Năm 2011, Odontuya Gendaram và cs đã công bố dịch chiết toàn phần và các phân đoạn phân trên mặt đất của *S. hybridum* có hoạt tính chống oxy hóa bằng xét nghiệm dọn gốc tự do DPPH *in vitro* [40]. Kết quả cho thấy, IC_{50} là $31,93 \pm 0,65$ μ g/ml, trong khi của rutin là $22,66 \pm 0,29$ μ g/ml, dịch chiết ethyl acetat và n-BuOH có các giá trị IC_{50} lần lượt là $27,11 \pm 0,58$ μ g /ml và $26,14 \pm 0,31$ μ g /ml.

Năm 2016, C. Bensouici và cs đã nghiên cứu tác dụng chống oxy hóa của *S. caeruleum* [15]. Ba phương pháp đã được chọn để xác định khả năng chống oxy hóa của các dịch chiết. Phản ứng tạo phức kim loại đã được chọn để đo khả năng liên kết của sắt với cao chiết của *S. caeruleum*. Kết quả thể hiện trên bảng 1.4.

Bảng 1.4: Hoạt tính chống oxy hóa của *S. caeruleum* bởi DPPH, CUPRAC và xét nghiệm chelat kim loại.

Dịch chiết	Hoạt tính chống oxy hóa		
	DPPH* ^a IC ₅₀ (μ g/mL)	CUPRAC A0.50 (μ g /mL)	Chelat kim loại ^a IC ₅₀ (μ g /mL)

Chloroform	129,23 ± 1,16	29,40 ± 1,109	132,23 ± 2,31
Ethyl acetat	195,36 ± 1,21	9,36 ± 1,32	161,43 ± 2,34
Butanol	28,35 ± 1,22	23,52 ± 0,44	40,83 ± 2,24
α -Tocopherol ^b	12,06 ± 0,17	2,65 ± 0,01	NT
BHT ^{b,c}	54,01 ± 1,07	3,90 ± 0,01	NT
EDTA ^{b,d}	NT ^e	NT ^e	3,47 ± 0,35
^a IC ₅₀ và A _{0,50} biểu thị giá trị trung bình của ba phép đo song song (p<0,05).			
^b Hợp chất tham khảo			
^c Butylated Hydroxyl Toluen (BHT).			
^d Ethylenediaminetetraacetic acid.			
^e Không được kiểm tra.			
CUPRAC: CUPric Reducing Antioxidant Capacity			
DPPH: 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl			

Hoạt tính bắt gốc tự do tăng tuyến tính với lượng dịch chiết. Các dịch chiết butanol thể hiện tác dụng cao nhất (IC₅₀ 28,35±1,22 µg/ml). Tác dụng dọn gốc tự do cao hơn so với BHT, nhưng thấp hơn α -tocopherol.

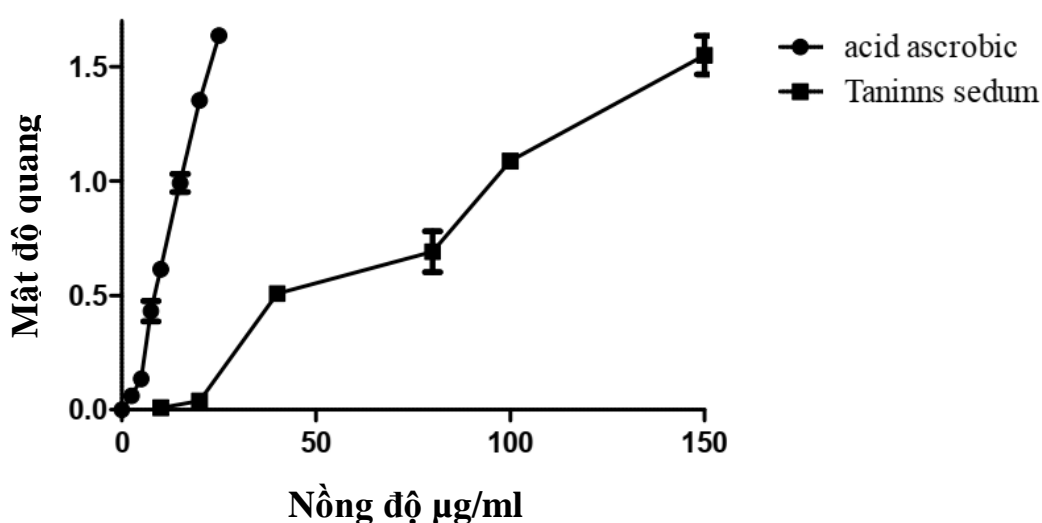
Kết quả CUPRAC của dịch chiết được so sánh với kết quả của α -tocopherol và BHT. Độ hấp thụ tăng tuyến tính với lượng dịch chiết. Các phân đoạn butanol thể hiện tác dụng cao nhất (A_{0,50} giá trị: 23,52 ± 0,44 µg/ml) trong số các dịch chiết, tiếp theo là chloroform (A_{0,50} giá trị: 29,40 ± 1,10 µg/ml) và ethyl acetat (A_{0,50} giá trị: 99,36 ± 1,32 µg/ml).

Bảng 1.4 cũng cho thấy ảnh hưởng tạo chelat của dịch chiết với các ion sắt so với EDTA. Phản ứng tạo chelat kim loại tăng tuyến tính với sự tăng nồng độ của cao chiết. Phân đoạn butanol (IC₅₀ giá trị: 40,83 ± 2,24 µg/ml) cũng cho thấy phản ứng tạo phức với kim loại mạnh nhất, tiếp theo là chloroform (IC₅₀:132,23 ± 2,31 µg/ml) và phân đoạn ethyl acetat (IC₅₀ giá trị: 161,43 ± 2,34 µg/ml).

Cũng vào năm 2016, Wafa và cs đã nghiên cứu khả năng bắt gốc tự do của tanin có trong dịch chiết loài *S. pubescens* [123]. Kết quả cho thấy tanin toàn phần có tác dụng như chất ức chế gốc tự do. Khả năng chống oxy hóa của

tanin từ *S. pubescens* được cho là làm giảm khả năng tạo phức Fe³⁺/ferricyanid thành sắt. IC₅₀ của dịch chiết đạt 5,68 ± 0,516 µg/ml cho thấy phản ứng rất mạnh, tốt hơn BHT (Butyl hydroxy toluen) 8,76 ± 0,69 µg/ml.

Kết quả cho thấy không có sự khác biệt đáng kể giữa BHT và tanin. DPPH (màu tím) là một gốc tự do ổn định, được khử thành α-diphenyl-β-picrylhydrazyl (màu vàng) bằng phản ứng với chất chống oxy hóa. Làm sạch gốc tự do là một cơ chế qua đó các chất chống oxy hóa ức chế quá trình oxy hóa lipid [14].



Hình 1.2: Tác dụng dọn gốc tự do của tanin chiết xuất từ *S. pubescens* Vah

Nghiên cứu đã chỉ ra rằng tanin là chất chống oxy hóa tự nhiên. Độ hấp thụ cao hơn tương ứng với khả năng khử sắt cao. Tanin cho thấy khả năng khử sắt tăng lên khi nồng độ tăng, với EC₅₀ tương ứng với 52±1,25 µg/ml so với 8,46±0,09 µg/ml của acid ascorbic và sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê.

1.2. Tổng quan về cây Thủy bồn thảo [2]

Cây Thủy bồn thảo có tên khoa học là *Sedum sarmentosum* Bunge, thuộc họ Thuốc bỏng - Crassulaceae. Cây Thủy bồn thảo còn có tên khác là Phây đi, Tường thảo trườn.



Hình 1.3. Hình ảnh cây Thủy bồn thảo (*Sedum sarmentosum* Bunge, Crassulaceae)

1.2.1. Đặc điểm thực vật và phân bố của cây Thủy bồn thảo - *Sedum sarmentosum* Bunge.

Thủy bồn thảo - *Sedum sarmentosum* Bunge (SSB), thuộc họ Thuốc bỏng - Crassulaceae, loài này được Bunge miêu tả đầu tiên vào năm 1838, là một loại cây lâu năm được phân bố rộng rãi trên sườn núi của các nước châu Á [97].

Theo phân loại của Zhenghao Xu và cộng sự [131] cũng như hệ thống phân loại APG IV [23]. *Sedum sarmentosum* Bunge được phân loại như sau:

Giới thực vật - Plantae

Ngành ngọc lan/ngành hạt kín - Magnoliophyta/ Angiospermae

Lớp ngọc lan/ Lớp hai lá mầm - Magnoliopsida/ Dicotyledoneae

Bộ hồ nhĩ thảo - Saxifragales

Họ thuốc bỏng - Crassulaceae

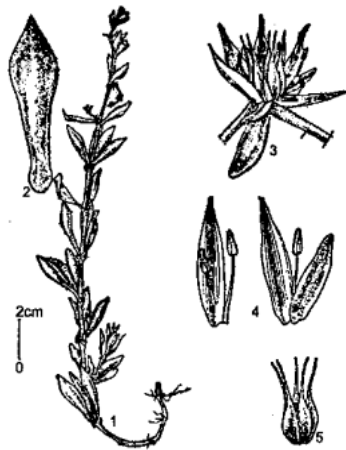
Chi Thủy bồn thảo - *Sedum*

Loài Thủy bồn thảo - *Sedum*

sarmentosum Bunge.

1.2.1.1. Đặc điểm thực vật

Thân cỏ sống nhiều năm, thân bò, rễ bám ở các đốt. Lá mọc đối hay vòng 3, thân cây mọng nước; phiến lá hình mác ngược đến hình tròn dài, dài 10-25 mm, rộng 1,5-4 mm, chóp lá nhọn, gốc lá rộng, mép nguyên và nhẵn. Cụm hoa dạng xim tán, phân nhánh 3-5. Hoa nhỏ, không có cuống. Đài 5, hình mác-tròn dài, dài 3-5 mm, chóp tù, gốc không có cựa. Tràng màu vàng nhạt, 5 cánh hình mác-hình tròn dài, dài 5-7 mm, chóp nhọn. Nhị 10, ngắn hơn cánh hoa. Lá noãn 5, rời, dài 5 mm. Quả nang mở làm hai mảnh. Mùa hoa quả tháng 5 đến tháng 8. Gặp ở rừng núi đá, ưa ẩm, ưa ánh sáng đôi khi thấy mọc ở trong bóng râm. Mọc thành đám nhỏ ở các hốc đá có mùn [2], [131].



1. Cành mang hoa; 2- lá; 3-
Hoa; 4 - Nhị; 5 - Nhụy



Sedum sarmentosum Bunge [108]

Hình 1.4. Một số đặc điểm thực vật của cây Thủy bồn thảo.

1.2.1.2. Phân bố

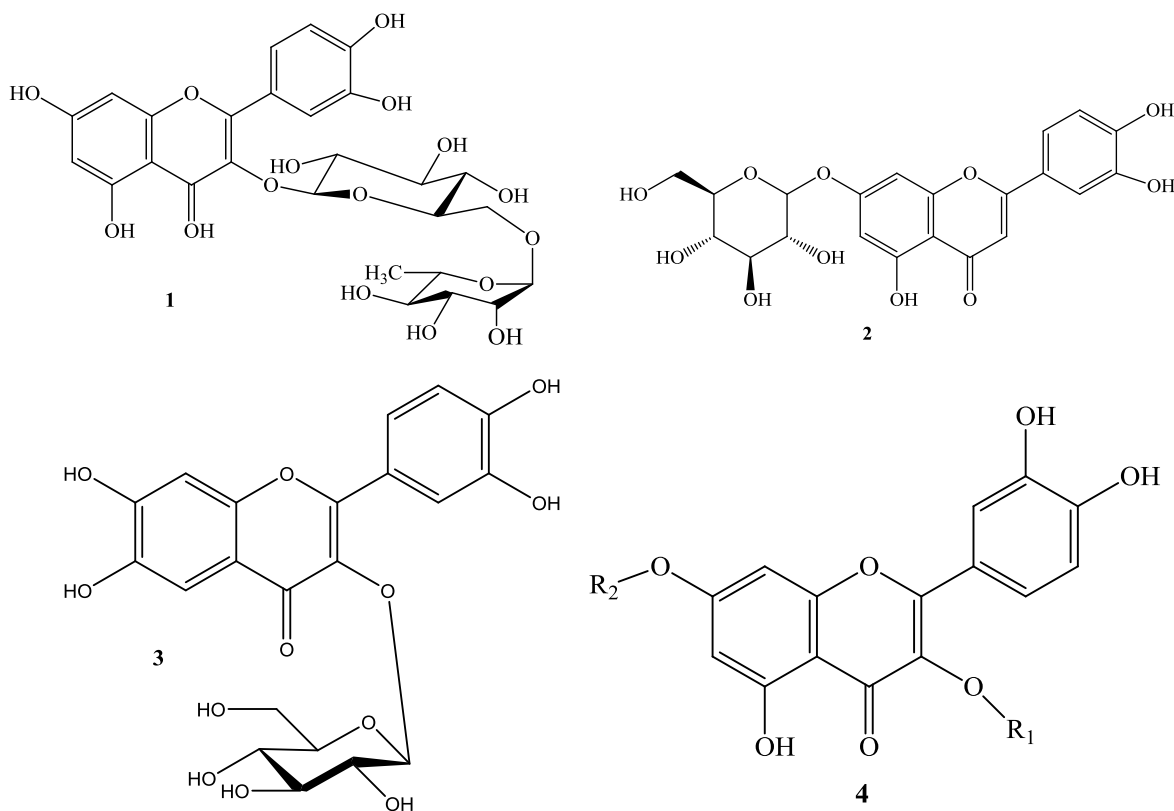
- Trong nước: Lào Cai (Sa Pa), Hà Giang, Cao Bằng, Lai Châu và một số nơi khác.
- Thế giới: Hàn Quốc, Trung Quốc, Triều Tiên, Nhật Bản, Thái Lan, khu vực Balkan, Đức.

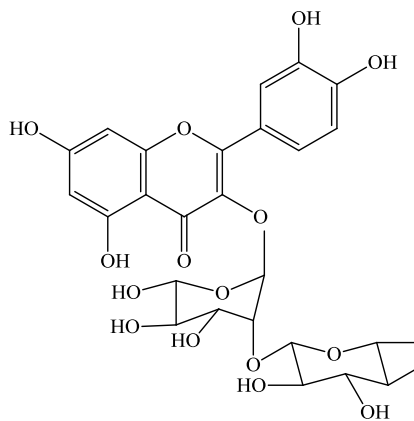
Loài đã được ghi trong Sách Đỏ Việt Nam (1996) với cấp đánh giá "nguy cấp" (E), Phân hạng: VU B1+2a. Có khu phân bố và nơi cư trú hẹp, khả năng tồn tại và phát triển trong tự nhiên yếu. Tuy nhiên nhiều nơi đã trồng làm cảnh và đó cũng là biện pháp tốt để bảo vệ nguồn gen. Thủy bồn thảo được trồng làm cảnh, làm thuốc trị bệnh gan, viêm gan, vàng da, giúp ăn ngon ngủ ngon, chữa đòn ngã tổn thương, ghẻ lở, bỏng lửa, thanh nhiệt, giải độc, chữa rắn cắn [2], [3].

1.2.2. Thành phần hóa học

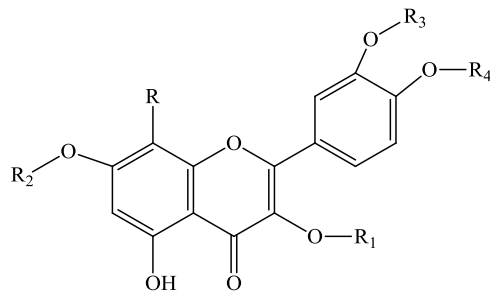
Thủy bồn thảo chủ yếu chứa flavonoid, glycosid cyanogen, alcaloid, triterpen, sterol và các hợp chất khác [125], [93].

1.2.2.1. Nhóm hợp chất Flavonoid

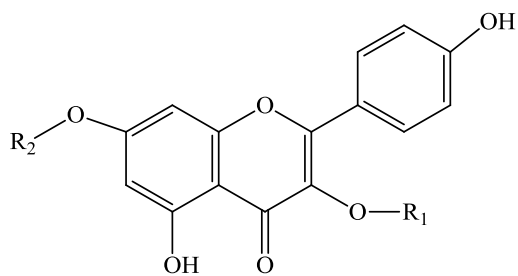




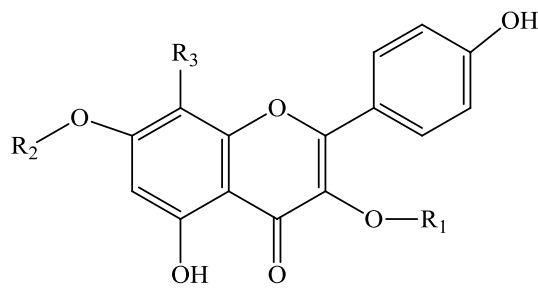
5



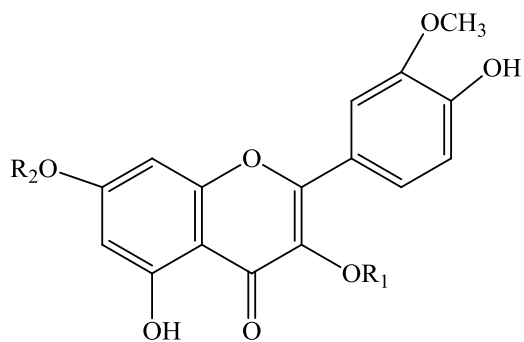
6



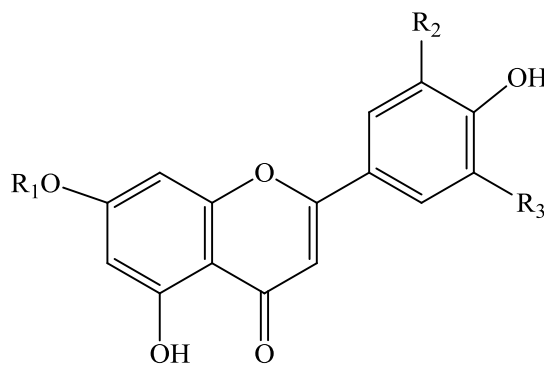
7



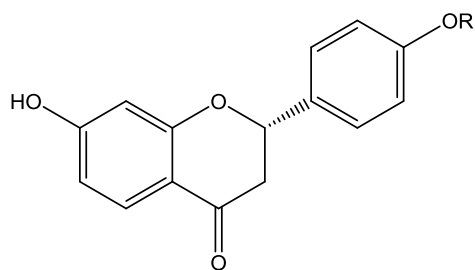
8



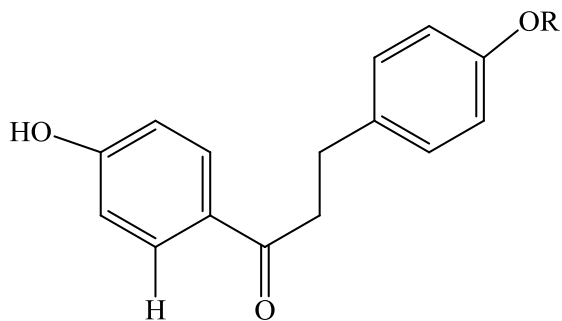
9



10

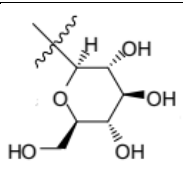
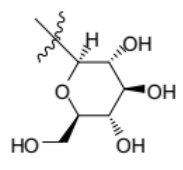


11

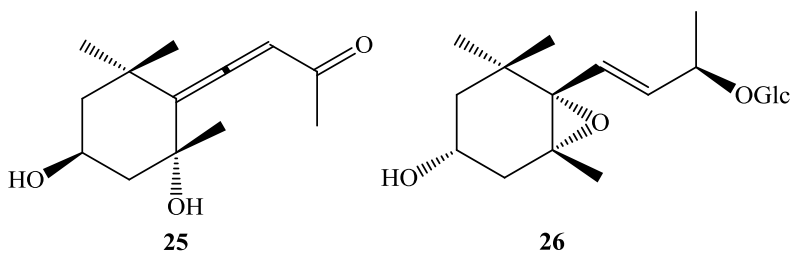
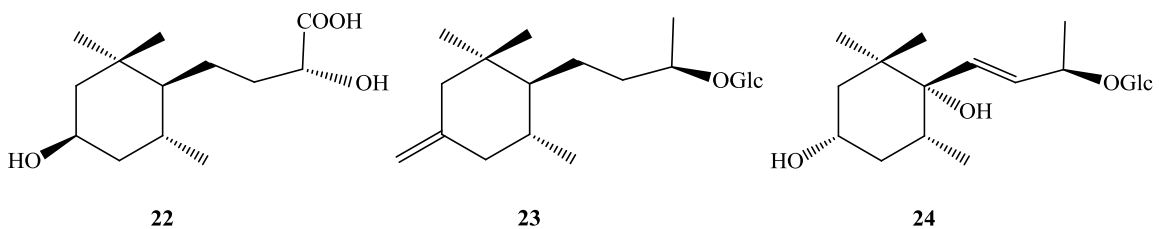
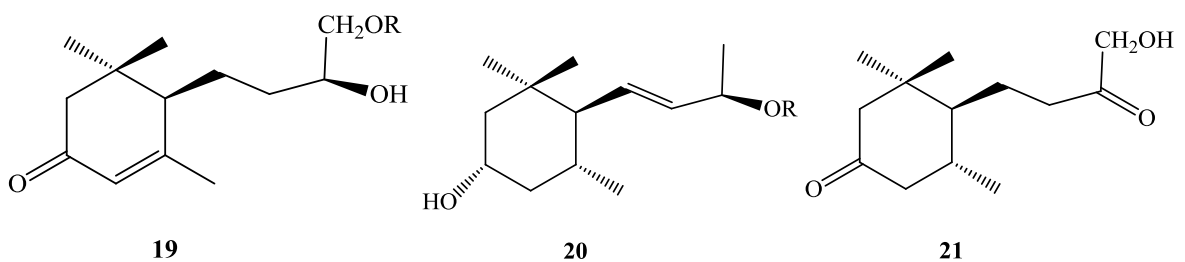
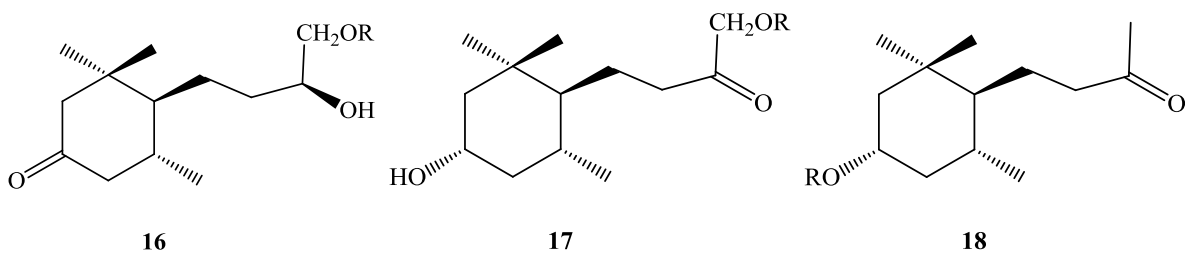
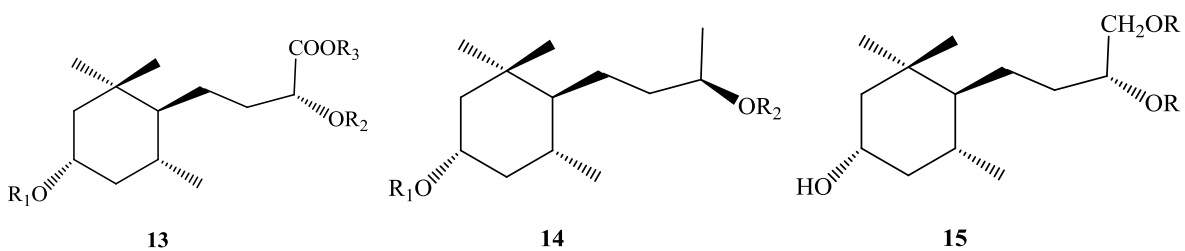


12

Số CT	Tên hợp chất					TLTK	
1	Rutin					[63]	
2	Luteolosid					[63]	
3	Hyperosid					[63]	
4	R₁	R₂	TÊN HỢP CHẤT			[63] [99] [93] [93]	
	H	H	Quercetin				
	Glu	H	Quercetin-3-O-glucosid				
	Rha	Rha	Quercetin-3,7-O-di-rhamnosid				
	Rha-Glu	Rha	Quercetin 3-O-neohesperidosid-7-O-Rhamnosid				
5	R	TÊN HỢP CHẤT				[102] [99]	
	OH	Quercetin-3-O- α -(6'''-caffeoylglucosyl- β -1,2- rhamnosid					
	H	Quercetin-3-O- α -(6'''-p coumaroylglucosyl- β -1,2- rhamnosid					
6	R₁	R₂	R₃	R₄	R	TÊN HỢP CHẤT	[126] [126] [126]
	H	H	CH ₃	H	OCH ₃	Limocitrin	
	Glu	H	CH ₃	H	OCH ₃	Limocitrin-3-O-glucosid	
	Glu	Glu	CH ₃	H	OCH ₃	Limocitrin-3,7-di-O-glucosid	
7	R₁	R₂	TÊN HỢP CHẤT			[93] [93] [99] [93]	
	H	H	Kaempferol				
	H	Glu	Kaempferol-7-O-glucosid				
	Ara	H	Kaempferol-3-O-aribinosid				
	Rha	Rha-Glu	Grosvenosin				
8	R₁	R₂	R₃	TÊN HỢP CHẤT		[110]	
	Glu	Glu	OCH ₃	Herbacetin-8-methoxy-3,7-di-O-glucosid			

9	R₁	R₂	TÊN HỢP CHẤT		
	H	H	Isorhamnetin		[126]
	H	Glu	Isorhamnetin-7-O-glucosid		[126]
	Glu	Glu	Isorhamnetin-3,7-di-O-glucosid		[126]
	Glu	Rha	Isorhamnetin-3-O-glucosid-7-O-rhamnosid		[93]
	Rha-Glu	Rha	Isorhamnetin-3-O-rhamnosylglucosid-7-O-rhamnosid		[93]
10	R₁	R₂	R₃	TÊN HỢP CHẤT	
	H	OCH ₃	OCH ₃	Tricin	[126]
	Glu	OCH ₃	OCH ₃	Tricin-7-O-glucosid	[126]
	H	OH	H	Luteolin	[126]
	Glu	OH	H	Luteolin-7-O-glucosid	[126]
	Glu	H	H	Apigenin-7-O-glucosid	[93]
11	R		TÊN HỢP CHẤT		
	H		Liquiritigenin		[126]
			Liquiritin		[126]
12	R		TÊN HỢP CHẤT		
	H		Isoliquiritigenin		[126]
			Isoliquiritin		[126]

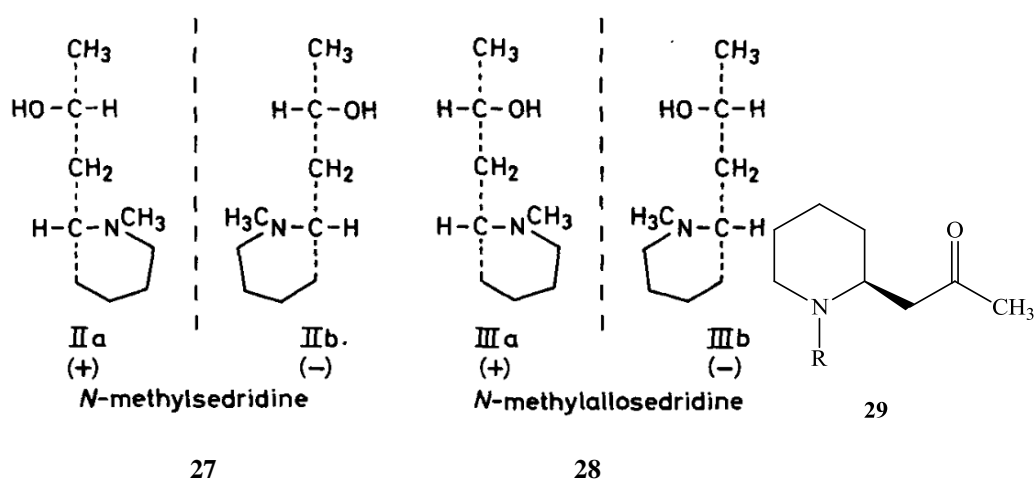
1.2.2.2. Nhóm hợp chất megastigman



Số CT	Tên hợp chất			TLTK	
13	R₁	R₂	R₃	TÊN HỢP CHẤT	
	H	H	H	Sarmentol A	[136]
	Glc	H	H	Sedumosid A ₁	[136]
	H	Glc	H	Sedumosid A ₂	[136]
	H	H	Glc	Sedumosid A ₃	[136]
	H	Xyl	H	Sedumosid A ₄	[97]
	Glc	Glc	H	Sedumosid A ₅	[97]
	Glc	Xyl	H	Sedumosid A ₆	[97]
14	R₁	R₂	TÊN HỢP CHẤT		
	Glc-Rha	H	Sedumosid E ₁	[93]	
	H	Glc - Rha	Sedumosid E ₂	[93]	
	H	Glc - Api	Sedumosid E ₃	[93]	
	H	Glc	Myrsiniosid D	[97]	
	Glc	H	Alangiosid J	[97]	
	Glc	Glc	Plataniosid D	[97]	
	H	H	(3S,5R,6S,9R)-megastigman-3,9-diol	[97]	
15	R	TÊN HỢP CHẤT			
	Glc	Sedumosid B	[136]		
	H	Sarmentol B	[97]		
16	R	TÊN HỢP CHẤT			
	Glc	Sedumosid C	[136]		
	H	Sarmentol C	[97]		
17	R	TÊN HỢP CHẤT			
	Glc	Sedumosid D	[136]		
	H	Sarmentol D	[97]		
18	R	TÊN HỢP CHẤT			
	Glc - Rha	Sedumosid G	[93]		

	H	Sarmentol G	[93]
19	R	TÊN HỢP CHẤT	
	Glc	Sedumosid H	[97]
	H	Sarmentol H	[97]
20	R	TÊN HỢP CHẤT	
	Glc	Sedumosid F ₁	[93]
	Glc	Sedumosid F ₂	[93]
	H	Sarmentol F	[93]
21	R	TÊN HỢP CHẤT	
	Glc	Sedumosid I	[97]
	H	Sarmentol I	[97]
22	Acid sarmentoic		[136]
23	Myrsiniosid A		[97]
24	Alangiosid A		[97]
25	Staphylionosid D		[97]
26	3-Hydroxy-5,6-epoxy-β- ionol-9-O-β-D-glucosid		[97]

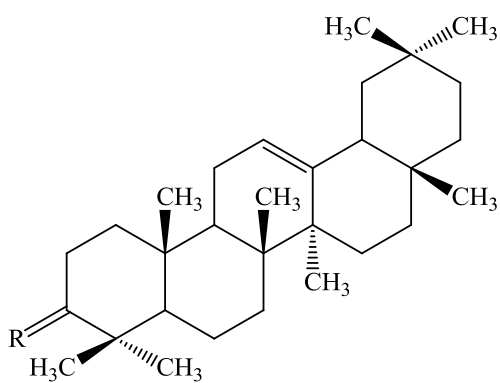
1.2.2.3. Nhóm hợp chất alcaloid



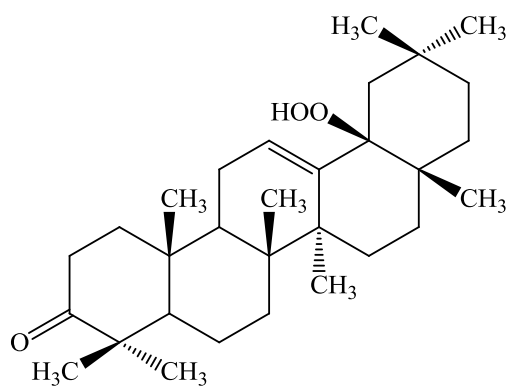
Số CT	Tên hợp chất	TLTK
27	N-methylsedridin	[17]

28	N-methylallosedridin		[17]
29	R	TÊN HỢP CHẤT	
	H	Pelletierin	[70]
	CH ₃	N-methylpelletierin	[85]

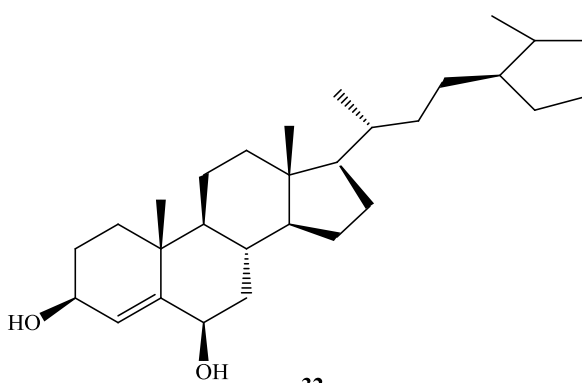
1.2.2.4. Nhóm hợp chất terpenoid



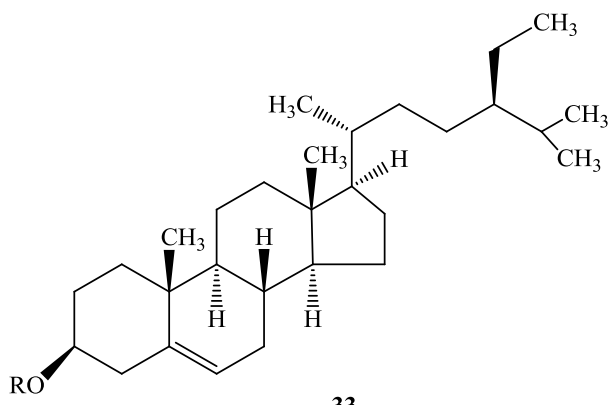
30



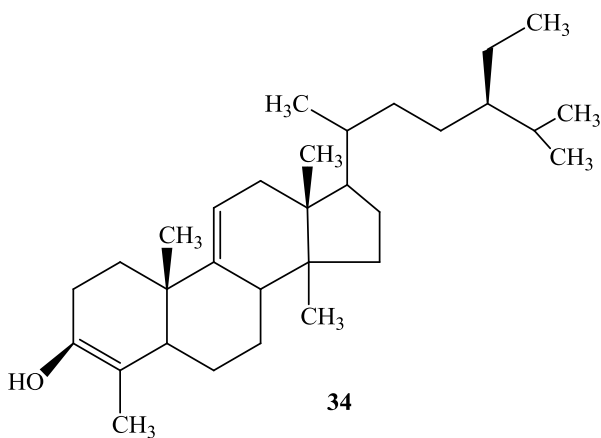
31



32

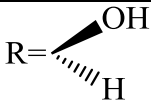
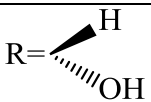


33

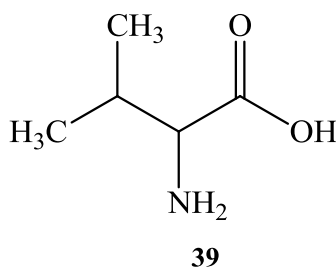
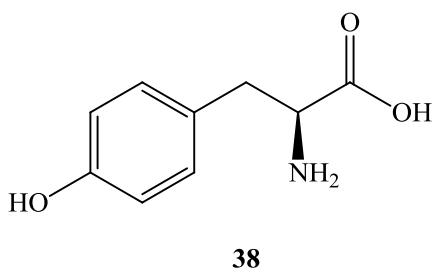
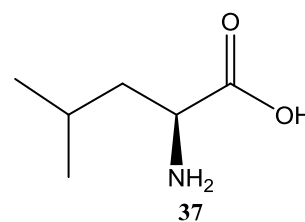
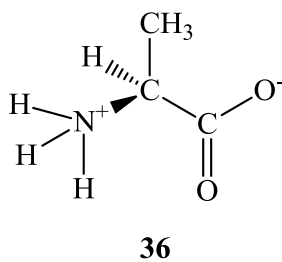
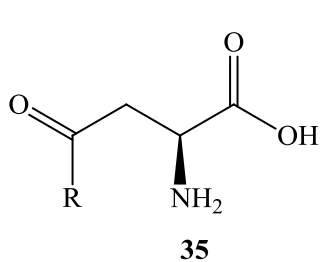


34

Số CT	Tên hợp chất		TLTK
	R	TÊN HỢP CHẤT	[47], [127], [84]

30	R=O	γ -amyron	[47], [118], [111]
	R= 	3-epi- γ -amyrin	
	R= 	γ -amyrin	
31	Sarmentolin		[128], [47]
32	3 β ,6 β -stigman-4-en-3,6-diol		[46]
33	R	TÊN HỢP CHẤT	[46]
	H	β -sitosterol	
	Glu	Daucosterol	
34	Sarmentosterol		[46]

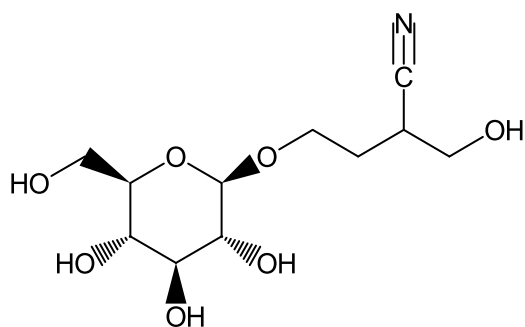
1.2.2.5. Nhóm hợp chất acid amin



Số CT	Tên hợp chất		TLTK
35	R	TÊN HỢP CHẤT	[21]
	NH ₂	L-Asparagin	
	OH	Acid aspartic	
36	L- α -alanin		[21]
37	L-Leucin		[21]

38	L-Tyrosin	[21]
39	L-Valin	[21]

1.2.2.6. Các hợp chất khác



Sarmentosin [58]

1.2.3. Tác dụng sinh học

➤ *Tác dụng bảo vệ gan*

Thủy bồn thảo đã được ghi nhận trong Dược điển của một số quốc gia và được sử dụng trong dân gian để điều trị các bệnh về gan, viêm gan mạn tính và bệnh túi mật. Thuốc được sản xuất từ cây này được sử dụng trong các phòng khám từ năm 1971, nó được coi là thuốc bảo vệ gan có tiếng, nhiều nhà khoa học đã nghiên cứu thành phần hóa học của cây và sarmentosin, một glycosid tan trong nước có trong Thủy bồn thảo được coi là thành phần có tác dụng [36], [47], [77], [37].

Năm 2010, Li-Hua Lian và cs đã nghiên cứu tác dụng bảo vệ gan của dịch chiết Thủy bồn thảo có chứa sarmentosin trên mô hình gây suy gan chuột. Khi uống Thủy bồn thảo cho thấy tác dụng bảo vệ rõ rệt ở chuột bị tổn thương gan, liên quan đến sự gia tăng đột ngột của yếu tố hoại tử khối u trong huyết thanh (TNF)- α . Thủy bồn thảo đã làm giảm đáng kể nồng độ TNF- α , alanin aminotransferase và aspartat aminotransferase. Thủy bồn thảo cũng giảm số lượng tế bào gan apoptotic và sự phân mảnh DNA trong gan, tương quan với sự ức chế kích hoạt caspase-3. Ngoài ra, Thủy bồn thảo còn làm giảm lượng thụ thể toll-like receptor 4 (TLR₄). Việc kích hoạt c-Jun NH₂-terminal kinase,

extracellular signal-regulated kinase và p38 gây ra bởi D-GalN/LPS(D-galactosamine (D-GalN)/lipopolysaccharide) cũng bị ức chế khi điều trị với Thủy bồn thảo. Hơn nữa Thủy bồn thảo ức chế việc kích hoạt yếu tố nhân- κ B. Trong tế bào RAW 264,7 tế bào được kích thích bằng LPS, giải phóng TNF- α và nồng độ TLR4 đã bị giảm bởi cao chiết Thủy bồn thảo, phù hợp với kết quả *in vivo*. Những phát hiện này cho thấy Thủy bồn thảo ngăn ngừa suy gan cấp do D-GalN/LPS gây ra, và sự bảo vệ này có khả năng liên quan đến tác dụng chống apoptotic và sự giảm hoạt độ mitogen kích hoạt protein kinase hoạt động, liên quan một phần đến việc ngăn chặn sự phiên mã của thụ thể LPS [78].

➤ **Tác dụng chống ung thư**

Năm 2010, Huang và cộng sự nghiên cứu tác dụng ức chế của dịch chiết nước từ Thủy bồn thảo (*S.S*) đối với tế bào ung thư HepG2 [51].

Kết quả: Ảnh hưởng của *S.S* đến khả năng tăng sinh của tế bào HepG2: xét nghiệm MTT cho thấy dịch chiết có tác dụng ức chế đối với sự tăng sinh của tế bào HepG2 ở nồng độ 100 hoặc 200 μ g/ml. Sau điều trị 48 giờ bằng *S.S* cho thấy tác dụng ức chế mạnh đối với các tế bào HepG2, mức độ tác dụng phụ thuộc vào liều ($p < 0,01$).

Tác dụng của *S.S* đối với cảm ứng chết theo chu kỳ tế bào HepG2: Để xác nhận việc gây chết theo chu kỳ tế bào bằng *S.S*, một xét nghiệm đã được sử dụng để kiểm tra các tế bào chết sớm. Các tế bào trải qua quá trình chết trước tiên sẽ biểu hiện phosphatidylserin ở lớp ngoài của màng tế bào được đánh dấu bằng Annexin-V-FITC liên kết và tiếp theo là màng bị tổn thương, được đánh dấu bằng sự xen kẽ trong DNA và RNA của tế bào. Chỉ có 2,48% \pm 0,27% các tế bào đối chứng ở giai đoạn đầu của quá trình cảm ứng apoptotic. Tuy nhiên, từ khi dùng *S.S* trong 48 giờ với nồng độ được chỉ định, với sự gia tăng đồng thời nồng độ thuốc, mật độ apoptotic sớm đã tăng lên 4,86% \pm 0,45%, 8,15% \pm 1,37%, 12,57% \pm 0,76% và 14,87% \pm 0,75%, gợi ý rằng các tế bào này đã biểu hiện phosphatidylserin lớp ngoài của màng và những tế bào này có thể đang trải qua quá trình apoptosis.

Tác dụng của *S.S* với tế bào HepG2 gây ra sự ức chế đáng kể phụ thuộc vào sự phát triển tế bào ung thư. Nhóm tác giả cho thấy rằng dịch chiết nước Thủy bồn thảo có khả năng ngăn ngừa và ức chế tác dụng đối với ung thư biểu mô tế bào gan, liên quan đến quá trình tự chết của các tế bào ung thư.

Thủy bồn thảo, một loại thảo dược truyền thống ở Trung Quốc, Hàn Quốc...có nhiều tác dụng lâm sàng, trong đó có tác dụng chống ung thư [133].

Năm 1999, T.H. Kang và cs đã nghiên cứu phần đoạn alcaloid thô (Crude alcaloid fraction - CAF) của Thủy bồn thảo xem có tác dụng chống ung thư trên các dòng tế bào ung thư gan không. Các dòng tế bào ung thư gan ở chuột (BNL CL.2) và ở người (HepG2) được nuôi cấy với sự có mặt CAF-Thủy bồn thảo với các liều khác nhau (50-150 μ g/ml) trong 24 hoặc 48 giờ. CAF-Thủy bồn thảo gây ra sự ức chế phụ thuộc vào liều của sự tăng sinh tế bào mà không bị hoại tử hoặc thúc đẩy tế bào ung thư tự chết. Tác dụng chống tăng sinh của CAF có liên quan đến sự gia tăng số lượng tế bào trong giai đoạn G1 của chu kỳ tế bào. Nghiên cứu này cho thấy Thủy bồn thảo có thể cải thiện khả năng sống sót của bệnh nhân ung thư gan thông qua việc ức chế sự tăng sinh quá mức của các tế bào khối u [66].

Năm 2016 Yong Heng Bai và cs đã xác định rằng cao chiết Thủy bồn thảo (*S.SBE*) có tác dụng chống ung thư tuyến tụy *in vitro* và *in vivo*. Trong dòng tế bào ung thư tuyến tụy PANC-1 nuôi cấy, *S.SBE* ức chế sự tăng trưởng tế bào phụ thuộc nồng độ, giảm hoạt động của kháng nguyên tế bào tăng sinh (PCNA). Ngoài ra, điều trị bằng *S.SBE* cũng làm tăng quá trình apoptosis của tế bào phụ thuộc ty thể. Hơn nữa, *S.SBE* gây ra tăng nồng độ p53, giảm nồng độ c-Myc và ức chế chuyển tiếp biểu mô-trung mô (EMT). Hoạt tính chống tăng sinh của *S.SBE* trong các tế bào ung thư tuyến tụy được tìm thấy có liên quan mật thiết đến việc giữ ổn định chu kỳ tế bào ở pha G2/M bằng cách điều chỉnh lại biểu hiện giai đoạn p21 (Waf1/CIP1). Nghiên cứu sâu hơn cho thấy, tác dụng ức chế này của *S.SBE* là thông qua ức chế đường truyền tín hiệu Hedgehog liên quan đến sự tăng sinh. Protein tái tổ hợp ngoại sinh đã được sử dụng để kích hoạt tín

hiệu Hedgehog, do đó dẫn đến việc loại bỏ sự ức chế qua trung gian *S.SBE* đối với sự phát triển của tế bào ung thư tuyến tụy [132].

➤ **Tác dụng kháng khuẩn**

Ji Yeon Choi và cs. (2012) đã công bố tác dụng kháng khuẩn của các phân đoạn n-hexan, methylen clorua (MC), ethyl acetat và n-butanol của *S. sarmentosum* trên *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* và *Helicobacter pylori*. Kết quả cho thấy dịch chiết methylen clorua có tác dụng kháng khuẩn đối với *E. coli* và *H. pylori* bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch. [59]

Ji Yeon Choi và cs. đã nghiên cứu tác dụng kháng khuẩn trên *S. aureus*, *E. coli* và *H. pylori*. Thủy bồn thảo được chiết bằng methanol (MeOH) bằng phương pháp chiết gia nhiệt trong 3 giờ, sau đó được lọc qua giấy lọc. Phần dịch chiết được chia thành các phần nhỏ sau đó lắc với 4 dung môi n-hexan, methylen clorua (MC), ethyl acetat (EtOAc) và n-butanol (n-BuOH). Tác dụng kháng khuẩn chống lại *E. coli*, *S. aureus* và *H. pylori* được đo bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch, trên môi trường thạch Brucella, sự ức chế *E. coli* của n-BuOH và MC là 10 và 13 mm, n-hexan biểu hiện hoạt độ kháng khuẩn chống lại *S. aureus* ở mức ức chế vòng vô khuẩn 12 mm. Hoạt tính kháng khuẩn chống lại *H. pylori* cũng đã được nghiên cứu [26].

Bảng 1.5: Hoạt tính kháng khuẩn của Thủy bồn thảo

Mẫu (50µg/30µL)	Vòng ức chế (mm)		
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>H. pylori</i>
n-Hexan	8	12	8
MC	13	8	8
EtOAc	8	8	8
n-BuOH	10	8	8

Dung dịch chứa 2g dược liệu mỗi ml, có hoạt tính chống *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus albus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa*, α - streptococcus, β - streptococcus, *Candida albicans* và *Shigella flexneri* [22].

➤ **Tác dụng kháng viêm**

Mô hình gây viêm bằng carrageenan cũng được sử dụng trong nghiên cứu dùng thuốc đối chứng dexamethason (DEXA), một chất ức chế cyclooxygenase không chọn lọc. Điều trị với cao chiết Thủy bồn thảo 0,03, 0,1 và 0,3mg/kgTT đã làm tăng sự ức chế lần lượt là 17,9%, 21,5% và 26,0% đối với thể tích dịch tiết. Tổng số bạch cầu đa nhân cũng giảm dần khi điều trị với Thủy bồn thảo ở mức 0,03, 0,1 và 0,3 mg/kgTT, tỷ lệ ức chế tương ứng là 7,2%, 19,2% và 39,4%. Như vậy, dịch chiết Thủy bồn thảo có tác dụng chống viêm cấp.

Bảng 1.6: Tác dụng của Thủy bồn thảo đối với mô hình viêm do carrageenan gây ra ở chuột

Nhóm	Liều	Dịch tiết (ml)	Tổng số bạch cầu ($\times 10^7$ tế bào)	Hàm lượng nitrit(μ M)
Chứng	-	1,58 \pm 0,11	10,91 \pm 0,15	26,00 \pm 1,68
TBT 0,03	0,03	1,30 \pm 0,04 (17,9)	10,13 \pm 0,44 (7,2)	25,07 \pm 0,96 (3,5)
TBT 0,1	0,1	1,24 \pm 0,09* (21,5)	8,81 \pm 0,58* (19,2)	22,29 \pm 1,33 (14,3)
TBT 0,3	0,3	1,17 \pm 0,06** (26,0)	6,61 \pm 0,31** (39,4)	19,32 \pm 1,40** (25,7)
DEXA	0,01	1,17 \pm 0,06** (26,0)	2,29 \pm 0,40** (79,1)	11,11 \pm 0,98** (57,3)

Các kết quả được biểu thị bằng giá trị trung bình \pm S.E của n=8. Số liệu trong ngoặc đơn cho thấy tỷ lệ phần trăm ức chế tương ứng đối với nhóm nghiên cứu. [31].

Thủy bồn thảo thường được sử dụng để điều trị bệnh viêm mãn tính ở các nước như Hàn Quốc và Trung Quốc. Thủy bồn thảo làm giảm mức độ các triệu chứng viêm, như thể tích dịch tiết, số lượng bạch cầu đa nhân và hàm lượng nitrit [54], [17].

Về tính thấm của thành mạch, một mô hình đặc trưng cho giai đoạn đầu của phản ứng viêm, các chất trung gian của phản ứng viêm được giải phóng sau khi bị kích thích, dẫn đến sự giãn nở của tiểu động mạch và tĩnh mạch và tăng tính thấm thành mạch. Thủy bồn thảo ở liều uống 10, 30 và 100 mg/kgTT cho khả năng ức chế 10,2%, 13,3% và 21,3%. Kết quả cho thấy tác dụng chống viêm của Thủy bồn thảo một phần do ngăn cản quá trình giải phóng các chất trung gian gây viêm.

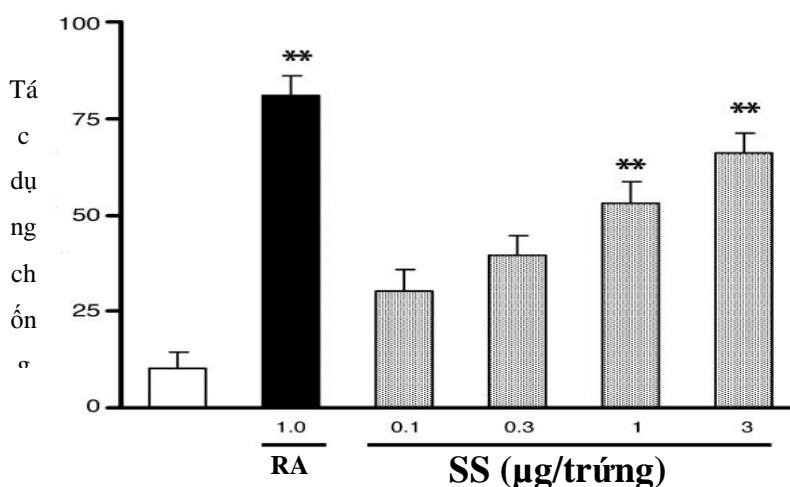
Trong mô hình gây viêm bằng cách tiêm carrageenan dưới da chuột (bảng 1.6.), điều trị với Thủy bồn thảo ở mức liều 0,03, 0,1 và 0,3 mg/kgTT, đã làm tăng sự ức chế lần lượt là 17,9%, 21,5% và 26,0% tương ứng với thể tích dịch tiết giảm. Tổng số bạch cầu đa nhân cũng giảm khi điều trị với Thủy bồn thảo ở mức 0,03, 0,1 và 0,3 mg/kgTT, tỷ lệ ức chế là 7,2%, 19,2% và 39,4%. Như vậy, dịch chiết Thủy bồn thảo có tác dụng chống viêm cấp [65].

Năm 2019, Hong Lu và cs đã nghiên cứu cao chiết Thủy bồn thảo (*S.SBE*) có tác dụng chống viêm bằng cách ngăn chặn sự phân cực của đại thực bào M1 ở chuột bị gây tắc nghẽn một bên niệu quản và trong các đại thực bào nuôi cấy. Ngoài ra cũng nghiên cứu tác dụng của *S.SBE* đối với các hoạt động điều hòa của interferon-5 (IRF5) và NF-pB p65. Kết quả cho thấy, sử dụng *S.SBE* (100mg/kgTT) đường uống đã ức chế rõ rệt sự phân cực của đại thực bào dương tính với CD68 và giảm tổn thương ống thận ở các mô thận sau chấn thương. Ngoài ra, *S.SBE* làm giảm nồng độ của cytokin tiền viêm (MIF), chemokin (MCP-1), interleukin (IL-6), IFN- γ và TNF- α , có liên quan đến sự xâm nhập và hoạt hóa đại thực bào. Hơn nữa, điều trị bằng *S.SBE* cũng làm giảm quá trình tổng hợp và giải phóng MCP-1 và MIF trong các tế bào biểu mô ống sau chấn thương. Nghiên cứu sâu hơn cho thấy *S.SBE* làm giảm mức độ IL-12 và iNOS,

cho thấy vai trò quan trọng của *S.SBE* đối với việc ức chế phân cực đại thực bào M1 trong chấn thương thận. Trong các đại thực bào nuôi cấy, lipopolysaccharid (LPS) gây ra sự phân cực của đại thực bào theo kiểu hình M1, nhưng bị ức chế khi điều trị bằng *S.SBE*. Đáng chú ý, *S.SBE* làm giảm các hoạt động của yếu tố điều hòa interferon 5 (IRF5) và NF-pB p65 ở thận bị tổn thương và trong các đại thực bào được điều trị bằng LPS, độc lập với TLR4/MyD88. Kết quả cho thấy, *S.SBE* làm giảm biểu hiện của HIF-1 α và cảm ứng GLUT1, do đó ức chế quá trình phân hủy đường trong các đại thực bào. *S.SBE* có tác dụng chống viêm rõ rệt và giảm bớt tổn thương thận, bằng cách ngăn chặn sự phân cực của đại thực bào M1 [83].

➤ **Tác dụng chống tạo mạch**

Hyun-Joo Jung và cs đã sử dụng xét nghiệm màng chorioallantoic gà [114], để kiểm tra các tác dụng chống tạo mạch của Thủy bồn thảo (*S.S*) và acid retinoic được sử dụng làm đối chứng. Sau khi điều trị 2 ngày, acid retinoic ở mức liều 1 μ g/trứng đã gây ra sự ức chế 80,9% trong các mẫu mạch máu phân nhánh. Trong khi *S.S* với mức liều 0,1; 0,3; 1 và 3 μ g/trứng trong xét nghiệm màng chorioallantoic gà, tỷ lệ ức chế lần lượt là 30,4%, 39,4%, 53,1% và 65,9%. Nồng độ *S.S* cần thiết ức chế 50% (IC₅₀) là 2,29 μ g/trứng. Như vậy, *S.S* thể hiện ức chế đáng kể trong quá trình tạo mạch màng chorioallantoic gà của gà phụ thuộc vào liều, thể hiện trên hình 1.5.



Hình 1.5: Hoạt tính chống tạo mạch phụ thuộc vào liều của *S.S* trong phôi gà

➤ **Tác dụng chống suy thận**

Đến năm 2017, Y. Bai và cs tiếp tục nghiên cứu và xác định *S.SBE* có tác dụng ức chế đối với kiểu hình myofibroblast và xơ hóa thận thông qua tín hiệu hedgehog trên *in vivo* và *in vitro*. Ở những chuột bị tắc nghẽn niệu quản một bên, *S.SBE* đã làm giảm chấn thương thận và giảm viêm thận thông qua giảm yếu tố tăng trưởng TGF- β 1 và thụ thể của nó và ức chế sự tích tụ quá mức các ngoại bào I và III collagen. Ngoài ra, *S.SBE* đã ngăn chặn kháng nguyên tế bào tăng sinh và tác dụng chống tăng sinh này có liên quan đến việc giảm hoạt động truyền tín hiệu hedgehog ở thận chuột bị tắc nghẽn niệu quản một bên được điều trị bằng *S.SBE*. Trong các tế bào biểu mô ống thận nuôi cấy, tín hiệu hedgehog kích hoạt tái tổ hợp TGF- β 1 và dẫn đến việc tạo ra kiểu hình myofibroblast. Điều trị bằng *S.SBE* đã ức chế tín hiệu hedgehog và đảo ngược một phần kiểu hình xơ hóa trong các tế bào biểu mô ống thận nuôi cấy được điều trị bằng TGF- β 1. Tương tự như vậy, tác dụng điều hòa tăng cường qua trung gian acid aristolochic của tín hiệu hedgehog đã giảm khi điều trị bằng *S.SBE*, dẫn đến việc xóa bỏ tích lũy ở ngoại bào quá mức. Những phát hiện này cho thấy *S.SBE* làm suy giảm kiểu hình myofibroblast và xơ hóa thận thông qua việc ức chế đường truyền tín hiệu hedgehog [134].

➤ **Tác dụng kiểu estrogen**

Năm 2004, Won-Bee Kim và cs đã nghiên cứu tác dụng của Thủy bồn thảo - *S.sarmentosum* Bunge (*S.S*) đối với lipid trên huyết thanh và hàm lượng collagen của các mô liên kết ở chuột suy giảm estrogen do bị cắt bỏ buồng trứng (ovariectomized-OVX): Ba nhóm được cắt bỏ buồng trứng. Nhóm thứ tư được phẫu thuật nhưng không cắt bỏ buồng trứng. Từ ngày thứ 2 đến ngày thứ 37 sau phẫu thuật cắt bỏ buồng trứng, chuột cái Sprague-Dawley được phân ngẫu nhiên vào các nhóm: Chuột đối chứng được phẫu thuật (Sham), chuột cắt bỏ buồng trứng đối chiếu (OVX-control), chuột cắt bỏ buồng trứng uống Thủy bồn thảo (phân đoạn ethyl ether) ở mức liều 10mg/kgTT/ngày (OVX-EE), chuột cắt bỏ buồng trứng uống Thủy bồn thảo (phân đoạn ethyl acetat) ở mức liều

10mg/kgTT/ngày (OVX-EA). Các phân đoạn Thủy bồn thảo được dùng qua đường uống với liều 1 ml mỗi ngày. Tác dụng kiểu estrogen của các phân đoạn ethyl ether và ethyl acetat của Thủy bồn thảo, được kiểm tra bằng xét nghiệm *in vitro* và *in vivo*. Việc bổ sung phân đoạn ethyl ether và ethyl acetat của Thủy bồn thảo đã làm tăng hoạt động phiên mã lần lượt 0,7 lần và 0,5 lần, so với điều trị với 17- β -estradiol tương ứng. Những chuột bị cắt bỏ buồng trứng nặng hơn đáng kể so với những con chuột giả được phẫu thuật trong mọi thời điểm, nhưng khi bổ sung Thủy bồn thảo có xu hướng tăng cân ít hơn so với chuột cắt bỏ buồng trứng đối chứng. Nồng độ triglycerid huyết thanh đã giảm đáng kể sau khi bổ sung phân đoạn Thủy bồn thảo trong ethyl ether và Thủy bồn thảo trong ethyl acetat. Bổ sung dịch chiết Thủy bồn thảo đã ngăn chặn sự giảm mức độ collagen trong các mô xương và sụn. Kết quả này chỉ ra rằng, Thủy bồn thảo ảnh hưởng đến quá trình tổng hợp collagen ở chuột bị cắt bỏ buồng trứng. Những kết quả này phù hợp với kết luận dựa trên các hoạt động kiểu estrogen của Thủy bồn thảo. Do đó, nó có thể sử dụng để cải thiện chất lượng cuộc sống ở phụ nữ mãn kinh [71].

➤ **Tác dụng ức chế miễn dịch**

Hoạt tính ức chế miễn dịch của Thủy bồn thảo - *S. sarmentosum* (*EES.S*) chiết xuất bằng ethanol và các phân đoạn đã được nghiên cứu liên quan đến kháng thể đặc hiệu và phản ứng của tế bào với ovalbumin (OVA) ở chuột. Chuột ICR được tiêm dưới da bằng OVA vào ngày 0 và 14. Bắt đầu vào ngày tiêm, những con chuột được tiêm màng bụng (ip) với *EES.S* và chia thành các liều 0,25, 0,5 và 1,0 mg và cyclosporin A với một liều duy nhất 0,1 mg trong thời gian 7 ngày. Vào ngày 28, đo sự tăng sinh tế bào lách và nồng độ kháng thể đặc hiệu trong huyết thanh. *EES.S* ức chế đáng kể concanavalin A (Con A)-lipopolysaccharid (LPS) và tăng sinh tế bào lách do OVA ở chuột được tiêm theo cách phụ thuộc vào liều. Nồng độ IgG, IgG1 và IgG2b trong huyết thanh đặc hiệu OVA ở chuột được tiêm cũng giảm rõ rệt nhờ *EES.S*. Trong số bốn phân đoạn của *EES.S*, phân đoạn BuOH cho hoạt tính ức chế cao nhất. Kết quả cho

thấy *EES.S* có thể ngăn chặn phản ứng miễn dịch tế bào và đáp ứng miễn dịch ở chuột [104].

➤ **Tác dụng chống oxy hóa**

Năm 2011, Eun Kyoung Mo và cs đã tiến hành chiết lá khô của cây Thủy bồn thảo với n-hexan, n-butanol, ethyl acetat và metanol. Cao chiết metanol có hiệu suất chiết cao nhất. Tổng hàm lượng polyphenol khi chiết xuất bằng ethyl acetat và metanol cao hơn đáng kể so với chiết bằng dung môi không phân cực. Dịch chiết Thủy bồn thảo trong ethyl acetat và metanol cho khả năng chống oxy hóa vượt trội trong thử nghiệm với 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), khả năng hấp thụ gốc oxy và khả năng khử sắt trong huyết tương. Lipid peroxidase đã bị ức chế một cách hiệu quả bằng việc bổ sung dịch chiết Thủy bồn thảo trong Ferric thiocyanat và acid thiobarbituric, nhưng sự khác biệt giữa các dịch chiết được thử nghiệm là không đáng kể. Dịch chiết trong metanol cho thấy lipid peroxidase ức chế mạnh tương đương với butyl hydroxy toluen. Mối tương quan giữa polyphenol tổng và các chất chống oxy hóa dựa trên thử nghiệm DPPH, khả năng hấp thụ gốc oxy và khả năng khử sắt trong huyết tương với hệ số tương quan ($R_2 > 0.899$) [16], [107]

Năm 2012, Eun Kyoung Mo và cs đã chiết xuất Thủy bồn thảo bằng ethyl acetat, phân lập được một hợp chất thuộc nhóm triterpenoid pentacyclic và được xác định là D-Friedoolean-13-en-3-on (taraxeron). Taraxeron cho thấy khả năng chống oxy hóa tương đương với butyl hydroxy toluen với thử nghiệm DPPH ($p=0.117$) và khả năng khử sắt trong huyết tương ($p=0.179$). Việc sản sinh oxyd nitric trong lipopolysaccharid kích thích đại thực bào bị ức chế bởi taraxeron ($IC_{50}=38.49\pm 3.77 \mu M$) thông qua làm giảm tổng hợp nitric oxid. Tác dụng ức chế của taraxeron trên nitric oxid là đáng kể, hiệu quả hơn so với acid caffeic và acid gallic. [90]

Ngoài ra, Thủy bồn thảo còn một số tác dụng khác cũng đã được chứng minh, như tác dụng hạ đường huyết, kháng HIV...tác dụng giảm đau [65], chống xơ hóa [13], [24].

Ở Việt Nam có 2 loài thuộc chi *Sedum* L. đều được đồng bào H'Mông sử dụng làm thuốc. Theo Phạm Hoàng Hộ [3], các loài thuộc chi *Sedum* L. Ở Việt Nam như *Sedum lineare* - Trường sinh lá tròn, mọc ở Sa Pa được dùng để đắp trị mụn nhọt, vết thương sưng nóng, bỏng, đau sưng hầu họng, viêm amygdal, viêm kết mạc cấp tính, đờn ngã tổn thương, đau nhức răng, ung sang thũng độc, rắn độc cắn, viêm gan hoàng đản, ly. Chất sarmentosin có trong loài Thủy bồn thảo giúp ăn ngon, ngủ ngon, giải độc cơ thể [3]. Nhiều nhà khoa học trên thế giới đã phát hiện ra loài *Sedum rosea* (Cánh thiên đỏ) và đã chứng minh loài Cánh thiên đỏ có các tác dụng: hoạt huyết, tăng cường chức năng tim, giảm thiếu máu cơ tim, cải thiện chức năng mạch máu, giảm tiêu hao oxy khi qua tim, điều tiết lưu lượng máu qua tim, giảm độ nhớt của máu, ức chế ngưng tập tiểu cầu, hạ mỡ máu, ức chế phát triển tế bào ung thư. Các sản phẩm bào chế từ *Sedum rosea*, được sử dụng để điều trị bệnh tim, cao huyết áp, mạch máu não, bệnh người già, mất ngủ, trầm cảm, hay quên, suy nhược thần kinh, dị ứng độ cao, hỗ trợ điều trị ung thư. Các nghiên cứu lâm sàng còn chứng minh, *Sedum rosea* còn có tác dụng tăng cường trao đổi chất trong cơ thể, chống oxy hoá, loại bỏ gốc tự do, tăng hoạt tính SOD trong cơ thể. Đối với các nhân viên làm việc trong môi trường đặc biệt như: độc hại, nhiệt độ cao, thiếu dưỡng khí, ô nhiễm, phóng xạ, tiếng ồn cao, giúp cơ thể tăng khả năng thích ứng với ngoại cảnh. [22], [74], [57]

Về tác dụng sinh học: *Sedum rosea* đã được chứng minh có các tác dụng sau: Cải thiện tình trạng mệt mỏi, tăng khả năng nhận thức, chống trầm cảm, cải thiện nhịp tim, chống thiếu oxy ở tim, tăng tiết sữa, giảm peroxy hoá lipid, tăng trương lực cơ, tăng khả năng tập trung, cải thiện khả năng phản xạ, tăng độ chính xác trong công việc, hạ huyết áp, hạ đường huyết, tăng khả năng hoạt động của cơ, tăng khả năng tổng hợp canxi ở xương, bảo vệ gan, ngoài ra còn có

tác dụng kiểu estrogen. Các nhà khoa học Liên Xô cũ, thì đánh giá cao tác dụng của *Sedum rosea* trên hệ thần kinh và tác dụng làm cho cơ thể cường tráng. Dược điển Nga qui định, hàm lượng salidroside không được thấp hơn 0,8%. Trong một nghiên cứu lâm sàng, tại một trường phổ thông trung học, trên 60 học sinh với liều 660mg/ngày, nhận thấy mọi hoạt động về thể lực và trí lực được nâng lên rõ rệt, vì vậy Nga đã sản xuất thành thuốc có tên gọi là Rodaxon. Ở Bulgaria, lại đánh giá cao tác dụng sinh thích nghi của *Sedum rosea*. Vào năm 1968, các nhà dược lý Liên Xô cũ là Brekhman và Dardymov đã sàng lọc 189 loài thực vật, xác định được 5 loài có tác dụng sinh thích nghi tốt nhất, trong đó có *Sedum rosea*. Các nghiên cứu ở Arab Saudi đã chứng minh tác dụng bảo vệ gan ở liều 200mg/kg cao chiết aceton thân rễ.

So sánh giữa *Sedum rosea* và Thuỷ bồn thảo, thấy có những điểm giống và khác như sau: Hai loài có thành phần hoá học tương đối giống nhau, do cùng 1 họ và trước đây còn cùng chi. Hai loài có một số tác dụng sinh học giống nhau như: Bảo vệ gan, chống viêm, chống oxy hoá, giảm đau, chống ung thư, hạ huyết áp, chống mỏi mệt, hạ lipid máu, ức chế enzym acetylcholinesterase. Nhưng cũng có một số điểm khác nhau như: Tác dụng bảo vệ gan ở Thuỷ bồn thảo được nhiều nhóm nghiên cứu kỹ hơn so với *Sedum rosea*, trong khi đó tác dụng trên hệ thần kinh trung ương và tác dụng làm cường tráng cơ thể ở *Sedum rosea* lại được nghiên cứu kỹ hơn. Các tác dụng khác như: Sinh thích nghi, trên hệ tim mạch, điều hoà miễn dịch, tác dụng kiểu estrogen, chống ngưng tập tiểu cầu, mới gặp trên *Sedum rosea*, rất có thể những tác dụng này chưa được nghiên cứu (chứ chưa hẳn không có) trên Thuỷ bồn thảo.

Như vậy, Thuỷ bồn thảo là cây thuốc rất gần gũi về mặt thực vật, thành phần hoá học với *Sedum rosea* và theo kinh nghiệm dân gian cũng như các kết quả nghiên cứu đã công bố, mặc dù ít hơn nhiều so với *Sedum rosea*: Thuỷ bồn thảo cũng chứa các flavonoid, saponin triterpen... đặc biệt là salidroside, mà Dược điển nhiều nước qui định hàm lượng của chất này làm tiêu chí chất lượng

và cũng có một số tác dụng như chống viêm, chống viêm gan virus, chống xơ gan, chống ung thư, giống như *Sedum rosea*.

CHƯƠNG II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên vật liệu

2.1.1. Mẫu nghiên cứu:

Mẫu dược liệu Thủy bồn thảo (*Sedum sarmentosum* Bunge) được thu hái tại Sa Pa, tỉnh Lào Cai vào tháng 6 năm 2015 bao gồm:

- Mẫu cây tươi có bộ phận sinh sản, để giám định tên khoa học, làm tiêu bản vi học cấu tạo giải phẫu, làm tiêu bản mẫu khô.

- Các bộ phận dùng nghiên cứu gồm phần trên mặt đất được phơi sấy khô, đóng gói bảo quản trong túi nilon kín để nơi khô ráo làm nguyên liệu nghiên cứu.

Tên khoa học được giám định bởi Viện Dược liệu - Bộ Y tế, Viện Sinh thái & tài nguyên sinh vật. Mẫu tiêu bản được lưu giữ tại Viện Dược liệu (mã số tiêu bản DL-300615).

2.1.2 Hóa chất, dung môi

- Dung môi: n-hexan, chloroform (CHCl_3), methylen clorid (CH_2Cl_2), ethyl acetat (EtOAc), aceton, n-butanol (BuOH), methanol (MeOH), dimethylsulfoxid (DMSO): đạt tiêu chuẩn tinh khiết phân tích (Duksan - Hàn Quốc); methanol: đạt tiêu chuẩn tinh khiết dùng cho phân tích HPLC (Merck); chloroform (CHCl_3), aceton, methanol (MeOD): đạt tiêu chuẩn tinh khiết dùng cho phân tích NMR (Sigma và Merck).

- Các thuốc thử định tính: TT Mayer, TT Dragendorff, TT Bouchardat, TT diazo mới pha, FeCl_3 5%, geletin 1%, chì acetat 5%, n-hexan, diclometan, ethyl acetat, methanol, ethanol, n-butanol, toluen, acid acetic, acid formic,....

- Hoá chất và nguyên vật liệu phục vụ nuôi cấy tế bào: tế bào ung thư cổ tử cung HeLa do giáo sư Suresh Awale, Đại học Toyama cung cấp. Môi trường nuôi cấy tế bào DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), huyết thanh bào thai bò FBS (fetal bovine serum), dung dịch kháng sinh và kháng nấm (penicillin 50,000 units/L và streptomycin 50 mg/L), PBS (Phosphate Buffered

Saline) được cung cấp bởi hãng Invitrogen, Hoa Kỳ. Trypan blue (Merck, Đức), Kit đếm tế bào WST-8 (Dojindo Molecular Technologies, Inc., Rockville, MD, Hoa Kỳ) và các hoá chất liên quan khác.

- Hoá chất phục vụ đánh giá trên động vật thực nghiệm: Kít định lượng alanin aminotransferase (ALT), alanin aminotransferase (AST), urea, creatinin, protein toàn phần, bilirubin toàn phần của hãng Erba, Cộng hoà Séc. Kít phân tích công thức máu của hãng Diatron, Hungary. Paracetamol (Efferalgan® 500 mg) của hãng Bristol-Myers Squibb, Pháp. Silymarin (Legalon® 54 mg), Madaus, Đức. Và các hoá chất khác đạt tiêu chuẩn thí nghiệm.

2.1.3. Động vật thí nghiệm

- Chuột cống trắng *Wistar* khoẻ mạnh, cả đực và cái, trọng lượng 180-250g (để đánh giá độc tính bán trường diễn) được cung cấp bởi Trại chăn nuôi Học Viện Quân Y.

- Chuột nhắt trắng chủng *Swiss albino*, cả 2 giống, khoẻ mạnh, trọng lượng 23-25g (được sử dụng để đánh giá tác dụng bảo vệ gan) và 18-20g (để đánh giá độc tính cấp) do Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương cung cấp.

Động vật thí nghiệm được nuôi ổn định 4 ngày trước khi tiến hành thí nghiệm. Điều kiện phòng chăn nuôi: nhiệt độ duy trì $22 \pm 1^\circ\text{C}$, ánh sáng: 12 h sáng/ 12 h tối (ánh sáng từ 7:00). Chuột được nuôi bằng thức ăn tiêu chuẩn do Viện vệ sinh dịch tễ trung ương cung cấp, được uống nước tự do theo nhu cầu.

Tất cả các thí nghiệm nghiên cứu trên động vật thực nghiệm đều được thực hiện theo Hướng dẫn Chăm sóc và sử dụng Động vật (NIH xuất bản số 85-23, sửa đổi năm 2015) và đã được phê duyệt bởi Hội đồng tư vấn về đạo đức với động vật trong nghiên cứu của Viện Dược liệu năm 2020.

2.1.4 Máy móc thiết bị và dụng cụ

- Phổ HR-ESI-MS được đo trên máy QTOF 6550, Agilent (Mỹ) được đặt tại phòng thí nghiệm của Đại học Toyama, Nhật Bản.

- Phổ HR-FAB-MS được đo trên máy JEOL JMS-700 MStationTM (Đức) được đặt tại phòng thí nghiệm của Đại học Toyama, Nhật bản.

- Phổ cộng hưởng từ hạt nhân một chiều và hai chiều được đo trên máy Varian Unity Inova 400 (Mỹ) được đặt tại phòng thí nghiệm của Đại học Catholic, Daegu, Hàn Quốc.

- Hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao điều chế Waters 600E (Mỹ) với đầu dò UV-Vis sử dụng cột YMC-Pack ODS-A 5 μ m, 20 x 250 mm.

- Hệ thống sắc ký lỏng áp suất trung bình Yamazen YFLC-GR (Nhật).

- Máy hứng mẫu tự động Eyela DC-1200 (Nhật).

- Hệ thống cất quay chân không (Eyela, Nhật) kết hợp bộ phận làm lạnh tuần hoàn (Daihan, Hàn Quốc).

- Máy đo quang ELISA, VERSA max (Mỹ).

- Máy đo pH Mettler Toledo (Thụy sĩ).

- Cân phân tích Mettler Toledo (Thụy sĩ) độ chính xác 0,1 mg.

- Đèn soi tử ngoại UVLS 24-EL (Anh).

- Kính lúp soi nổi Leica EZ4 (Đức).

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

- Hệ thống chiết hồi lưu dung tích bình cầu 10 lít.

- Dụng cụ thủy tinh: các loại cột đường kính từ 1 - 10cm, dài từ 30 - 100 cm; bình cầu ngoại dung tích 50 - 2.000 ml; ống nghiệm, ống đựng mẫu NMR, pipet chính xác...

- Các thiết bị, dụng cụ tại Khoa Hóa Thực Vật - Viện dược liệu, bao gồm:
Bếp đun cách thủy Memmert.

Máy siêu âm Power sonic 405.

Bản mỏng silica gel GF₂₅₄ tráng sẵn (Merck).

Đèn UV Camag.

Cân kỹ thuật Precisa BJ 610C.

- Thiết bị chính phục vụ đánh tác dụng sinh học:

Kính hiển vi soi ngược Leica, Đức

Tủ nuôi cấy tế bào Sanyo, Nhật Bản

Tủ an toàn sinh học cấp II, Thermo, Mỹ
Máy đọc đĩa 96 giếng PerkinElmer, Inc., Waltham, MA, Hoa Kỳ
Máy ly tâm Beckman Coulter, Hoa Kỳ
Đĩa 96 giếng (Thermo, Mỹ) và các máy móc khác.
Máy đo công thức máu Sysmex KX-21, Nhật Bản
Máy xét nghiệm sinh hoá, HumanLyser 2000, Đức

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phân tích đặc điểm thực vật

- Nghiên cứu về hình thái:

Thu thập mẫu nghiên cứu và làm tiêu bản theo phương pháp hiện hành. Giám định, xác định tên khoa học loài Thuỷ bồn thảo theo phương pháp so sánh hình thái (khoá phân loại chi *Sedum*, họ Crassulaceae), có đối chiếu với tiêu bản thuộc loài này tại các bảo tàng dược liệu - Viện Dược liệu và Viện Sinh thái & Tài nguyên sinh vật.

- Nghiên cứu về đặc điểm vi học:

+ Vi phẫu: Thân cây được cắt tiêu bản, tẩy, nhuộm thuốc thử, quan sát dưới kính hiển vi tìm những đặc điểm vi học về vi phẫu.

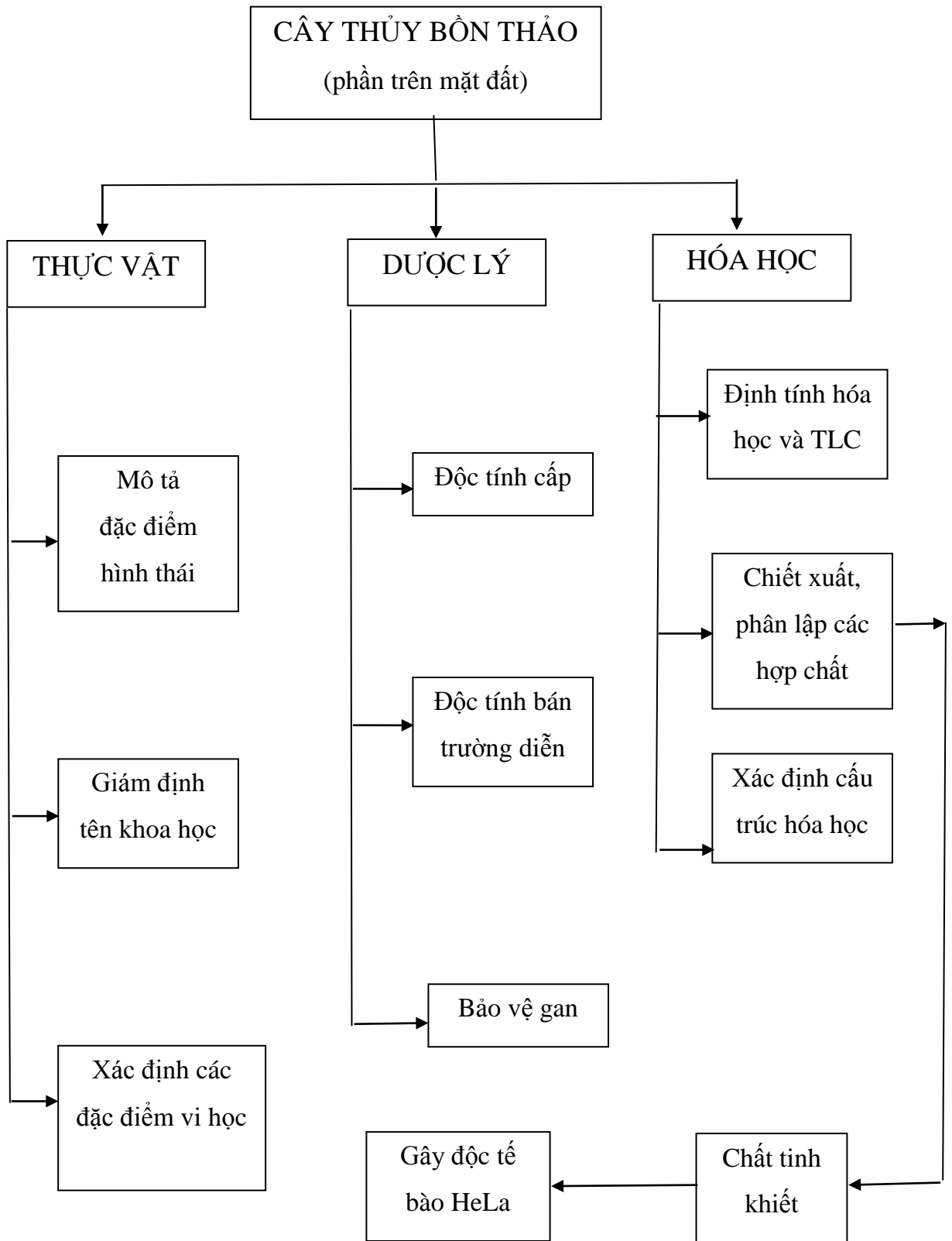
+ Soi bột: Toàn cây được phơi khô, nghiền thành bột, lên tiêu bản, quan sát dưới kính hiển vi tìm những đặc điểm vi học của bột.

2.2.2. Nghiên cứu thành phần hóa học

2.2.2.1. Định tính một số nhóm chất trong mẫu nghiên cứu

- Bằng phản ứng hóa học với các thuốc thử: Theo phương pháp hiện hành tại Viện Dược liệu và Trường Đại học Dược Hà Nội.

Sơ đồ thiết kế nghiên cứu



Định tính bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng

- Chuẩn bị mẫu:

Dung dịch 1: Lấy 5 g bột dược liệu cho vào bình nón 100 ml, thêm 50 ml ethanol 90%, chiết hồi lưu cách thủy 30 phút. Lọc thu dịch chiết, cất thu hồi dung môi đến cạn. Thêm 30 ml nước cất vào cấn, siêu âm 10 phút, sau đó với 20 ml ethyl acetat, thu dịch chiết ethyl acetat, thu hồi dung môi đến cạn, hòa tan cấn trong 2 ml methanol thu được dung dịch (1).

Dung dịch 2: dịch nước còn lại sau khi lắc với ethyl acetat ở trên tiếp tục được lắc với 20 ml *n*-butanol, gạn lấy lớp *n*-butanol, thu hồi dung môi đến cạn, hòa tan cấn trong 2 ml methanol thu được dung dịch (2).

Dung dịch 3: Lấy 5 g bột dược liệu cho vào bình nón dung tích 50 ml, thêm 30 ml dung dịch H₂SO₄ 2%, đun sôi vài phút. Để nguội, lọc dịch chiết vào bình gạn, kiềm hóa dịch lọc bằng dung dịch NH₄OH 6N đến pH kiềm. Chiết alkaloid bằng chloroform 3 lần, mỗi lần 10 ml. Dịch chiết CHCl₃ được gộp lại, thu hồi dung môi đến cạn, hòa tan cấn trong 2 ml methanol thu được dung dịch (3).

- Điều kiện sắc ký:

+ Pha tĩnh: bản mỏng tráng sẵn DC-Alufolien 60 GF254 (Merck) và RP18 (Merck).

+ Pha động: tiến hành sắc ký cho các dung dịch khác nhau với các hệ dung môi như sau:

Dung dịch (1): toluen - ethyl acetat - acid formic (5:4:1).

Dung dịch (2): ethyl acetat - acid formic - acid acetic - nước (100:11:11:27, lớp trên).

Dung dịch (3): chloroform - methanol - amoniac (100:9:1).

+ Phát hiện vết: quan sát dưới ánh sáng tử ngoại bước sóng 254 nm, 366 nm và phun thuốc thử H₂SO₄ 5% trong ethanol (với dung dịch (1), (2)) và dragendoff (dung dịch (3)).

- Tiến hành: Chấm riêng biệt 10 µl mỗi dung dịch mẫu thử và các dung dịch mẫu đối chiếu lên bản mỏng đã hoạt hóa ở 105°C trong 1 giờ, tiến hành sắc ký theo ĐĐVN V, phụ lục 5.4. Sau khi khai triển hệ dung môi được 8 cm, lấy bản mỏng ra sấy cho bay hết dung môi, phun thuốc thử và sấy ở 105°C đến khi hiện vết.

2.2.2.2. Chiết xuất cao toàn phần và phân đoạn

Chiết các lớp chất theo độ phân cực tăng dần của dung môi:

Dược liệu xay thô được chiết bằng phương pháp ngâm kiệt với dung môi methanol; cất thu hồi dung môi được cất, hòa cất vào nước, tiến hành chiết lỏng - lỏng lần lượt với các dung môi có độ phân cực tăng dần (n-hexan; dichloromethan, ethylacetat. Cất thu hồi dung môi các phân đoạn thu được cất n-hexan (cần A); cần dichloromethan (cần B); cần ethylacetat (cần C); cần lớp nước (cần D). Các phân đoạn được sử dụng để phân lập các hoạt chất tinh khiết.

2.2.2.3. Phương pháp chiết xuất và phân lập hợp chất

Quá trình nghiên cứu phân lập hợp chất từ các phân đoạn đã chọn chủ yếu sử dụng phương pháp sắc ký cột kết hợp với một số phương pháp sắc ký khác như phương pháp: sắc ký lỏng áp suất trung bình, sắc ký lỏng hiệu năng cao điều chế và sắc ký lớp mỏng điều chế. Các phân đoạn trong quá trình phân lập được theo dõi bằng sắc ký lớp mỏng và sắc ký lỏng hiệu năng cao. Đặc điểm chính của những phương pháp sắc ký sử dụng trong nghiên cứu như sau [13]:

- Sắc ký cột mở (CC):

+ Cột thủy tinh: đường kính thay đổi từ 1 - 10 cm với chiều dài thay đổi từ 30 - 100 cm.

+ Pha tĩnh: thường dùng hạt silica gel pha thuận cỡ hạt 63 - 200 µm (dùng cho cột to đường kính khoảng 10 cm) hoặc 40 - 63 µm (dùng cho cột có đường kính 5 cm trở xuống); silica gel pha đảo cỡ hạt 30 - 50 µm.

+ Phương pháp nạp cột và đưa mẫu lên cột:

Hạt silica gel được nạp vào cột theo phương pháp nạp cột ướt sử dụng hỗn hợp dung môi chính là pha động để rửa giải. Lựa chọn pha động rửa giải

căn cứ vào bản mỏng sắc ký. Mẫu phân lập được đưa lên cột bằng cách đưa thẳng dung dịch hòa tan mẫu hoặc phân tán mẫu trong silica gel, sau đó, làm khô silica gel, nghiền mịn rồi đưa lên cột.

+ Húng và gom dịch rửa giải: quá trình rửa giải, dịch rửa được húng bằng ống thủy tinh sử dụng thiết bị húng tự động. Dịch rửa giải trong các ống được gom lại dựa vào kết quả phân tích sắc ký lớp mỏng.

- Sắc ký lớp mỏng (TLC):

+ Bản mỏng: sắc ký TLC được thực hiện trên bản mỏng trắng sẵn pha thuận DC-Alufolien 60 GF254 và pha đảo RP-18 (Merck).

+ Hiện màu bản mỏng: sắc ký đồ được quan sát dưới ánh sáng đèn tử ngoại ở hai bước sóng 254 và 365 nm hoặc bản mỏng được phun dung dịch acid sulfuric 10% sau đó sấy nóng bản mỏng ở 2000C trong khoảng 5 - 10 phút.

- Sắc ký lớp mỏng điều chế (PTLC):

Được thực hiện trên tấm kính tráng sẵn silica gel 60 GF254 (Merck) kích thước 20x20 cm, phát hiện vết chất bằng đèn tử ngoại ở bước sóng 254 nm hoặc 365 nm. Sau đó, cạo lớp silica gel đã được đánh dấu, nghiền mịn, giải hấp phụ bằng rửa giải với dung môi thích hợp và loại dung môi bằng cô quay chân không.

2.2.2.4. Phương pháp xác định cấu trúc hợp chất phân lập được

Cấu trúc hóa học của hợp chất hữu cơ thường được xác định nhờ vào ứng dụng của các phương pháp phổ kết hợp. Tùy thuộc vào cấu trúc hóa học của từng chất mà sử dụng các phương pháp phổ phù hợp, cấu trúc càng phức tạp thì yêu cầu phối hợp các phương pháp phổ càng cao. Trong một số trường hợp, để xác định cấu trúc hóa học của hợp chất người ta phải dựa vào các phương pháp khác như chuyển hóa hóa học, kết hợp với phương pháp sắc kí so sánh...

Phổ khối lượng (Mass spectroscopy-MS)

Phổ khối lượng phân giải cao HR-ESI-MS cho phép xác định khối lượng phân tử với độ chính xác cao.

Phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR)

Phổ cộng hưởng từ hạt nhân là một trong những phương pháp phổ hiện đại và hữu hiệu nhất hiện nay. Với việc sử dụng kết hợp các kỹ thuật phổ NMR một chiều và hai chiều, các nhà nghiên cứu có thể xác định cấu trúc của hợp chất, kể cả cấu trúc lập thể của phân tử.

Nguyên lý chung của các phương pháp phổ NMR (phổ ^1H -NMR và ^{13}C -NMR) là sự cộng hưởng khác nhau của các hạt nhân từ ^1H và ^{13}C dưới tác dụng của từ trường ngoài. Sự cộng hưởng khác nhau này được biểu diễn bằng độ dịch chuyển hóa học (chemical shift). Ngoài ra đặc trưng của phân tử còn được xác định dựa vào tương tác spin giữa các hạt nhân từ với nhau (spin coupling).

Phổ ^1H -NMR

Trong phổ ^1H -NMR độ dịch chuyển hóa học (δ) của các proton được xác định trong thang ppm từ 0 -14 ppm, tùy thuộc vào mức độ lai hóa của nguyên tử cũng như đặc trưng của độ dịch chuyển hóa học và tương tác spin mà ta xác định được cấu trúc hóa học của các hợp chất.

Phổ ^{13}C -NMR

Phổ này cho tín hiệu phổ vạch carbon. Mỗi nguyên tử carbon sẽ cộng hưởng ở một trường khác nhau và cho tín hiệu phổ khác nhau. Thang đo phổ ^{13}C -NMR là ppm, với dải thang độ rộng 0-230 ppm.

Phổ HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence)

Thông tin tín hiệu trên phổ HSQC cho biết các tương tác trực tiếp H-C trong phân tử. Trên phổ một là trục phổ ^1H -NMR, còn trục kia là ^{13}C -NMR.

Phổ COSY (Correlation Spectroscopy)

Phổ này cho biết thông tin tín hiệu của các proton liên kết trực tiếp với carbon liền kề nhau. Phân tích phổ này sẽ gắn kết được các phần cấu trúc trong phân tử ghép nối với nhau.

Phổ HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation)

Phổ HMBC cho biết thông tin tín hiệu các tương tác xa của các dị hạt nhân qua 2-3 liên kết. Phân tích các tín hiệu trên phổ này sẽ quy kết được từng phần hoặc toàn bộ cấu trúc trong phân tử.

Phổ NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy)

Phổ này cho biết tín hiệu của các proton tương tác trong không gian không bị che khuất. Dựa vào kết quả phổ này có thể xác định cấu trúc không gian/cấu hình của 1 nhóm nguyên tử trong phân tử.

Phổ lưỡng sắc tròn (CD)

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

Độ quay cực ($[\alpha]$)

Độ quay cực được đo trên máy Jasco DIP-370 automatic polarimeter của Viện Hóa sinh biển, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

2.2.3. Nghiên cứu về độ an toàn

2.2.3.1. Thử độc tính

- Độc tính cấp:

Thử độc tính cấp được thực hiện tại Viện Dược liệu, theo hướng dẫn khảo sát độc tính cấp của thuốc do Bộ Y tế ban hành và các tài liệu. **LD₅₀ được tính theo phương pháp Behrens-Karber.** Mẫu cao chiết methanol toàn phần được sử dụng để đánh giá độc tính cấp trong nghiên cứu này (ký hiệu mẫu là TBT). [4], [5], [1]

Mô tả phương pháp:

Chuột mua về được nuôi 4 ngày trước khi thí nghiệm để chuột thích nghi điều kiện thí nghiệm, cho ăn uống thoải mái. Trước khi thí nghiệm, cho chuột nhịn đói qua đêm, để nước uống theo nhu cầu của chuột. Chuột được chia thành các lô thí nghiệm (mỗi lô 10 chuột), mỗi lô chuột được uống các mức liều khác nhau của mẫu thử.

Đường dùng thuốc: đường dùng là đường uống, cho chuột uống bằng cách dùng kim tiêm có kim đầu tù để đưa mẫu thử một cách nhẹ nhàng vào dạ dày chuột. Chuột được cho uống thể tích là 0,8 ml/20 g trọng lượng chuột.

Chuẩn bị mẫu thử: mẫu được cân một lượng chính xác rồi nghiền mịn, thêm một lượng chính xác dung dịch CMC 0,5 % để đạt được nồng độ thích hợp cho chuột uống.

Thời gian theo dõi: Sau khi được uống mẫu thử, chuột được cho ăn và uống đầy đủ. Theo dõi và quan sát các biểu hiện về hành vi, hoạt động, ăn uống, bài tiết của chuột và số chuột sống, chết trong 3 ngày (72 giờ). Tiếp tục theo dõi theo 7 ngày những chuột còn sống.

Tìm liều tối đa mà không có chuột nào của lô thí nghiệm chết (LD_{0}) và liều tối thiểu để 100% chuột của lô thí nghiệm chết (LD_{100}). Thử thêm 2-3 liều trung gian giữa 2 liều nói trên để xác định LD_{50} .

$$\text{Công thức tính: } LD_{50} = LD_{100} - \frac{\sum(dxz)}{n}$$

Trong đó: d là hiệu số của hai liều kế tiếp; z là trung bình số chuột chết giữa 2 liều kế tiếp; n là số chuột trong 1 lô.

- *Thử độc tính bán trường diễn:*

Thử độc tính bán trường diễn được thực hiện tại Viện Dược liệu, theo hướng dẫn của Bộ Y tế ban hành và các tài liệu. Mẫu thử là cao chiết methanol toàn phần từ Thuý bồn thảo (ký hiệu mẫu là TBT) [4], [5], [1].

Mô tả phương pháp:

Chuột cống trắng được chia làm 3 lô như sau:

- Lô 1 (Chứng sinh lý): dùng để tham chiếu, nhằm xác định điều kiện môi trường và các điều kiện ngoại cảnh có thể gây ảnh hưởng đến tình trạng sức khoẻ của chuột trong quá trình thí nghiệm.

- Lô 2 (cao TBT 275 mg/kgTT): Chuột cống uống cao TBT liều 275 mg/kg TT (tương đương liều có tác dụng bảo vệ gan trên mô hình động vật thực nghiệm).

- Lô 3 (cao TBT 825 mg/kgTT): Chuột cống uống cao TBT liều 825 mg/kgTT (gấp 3 lần có giá tác dụng bảo vệ gan trên mô hình động vật thực nghiệm).

Cao TBT được phân tán trong dung dịch cacboxymethylcellulose (CMC) 0,5 % và cho chuột uống 1 lần/ ngày với thể tích 1 ml/ 100g. Lô chứng uống dung dịch CMC 0,5 % với thể tích tương đương. Thời gian uống liên tục trong 30 ngày.

Các chỉ số theo dõi:

- Theo dõi chức năng gan.
- Tình trạng chung, thể trọng của chuột: quan sát hoạt động, ăn uống, vệ sinh của chuột, theo dõi trọng lượng chuột.

- Đánh giá chức năng tạo máu thông qua chỉ tiêu huyết học: số lượng hồng cầu, bạch cầu, tiểu cầu, hàm lượng hemoglobin, huyết sắc tố, % lympho bào. Máu chuột được lấy vào ống nghiệm có chứa chất chống đông và đo các thông số huyết học bằng phân tích máu tự động SYSMEX KX-21.

- Đánh giá chức năng gan thông qua các chỉ số sinh hóa gan (xét nghiệm huyết thanh): ALT, AST, bilirubin, protein toàn phần, sử dụng các bộ kit định lượng AST, ALT, bilirubin, protein toàn phần và được đo bằng máy định lượng sinh hoá bán tự động Humanlyzer

- Đánh giá chức năng thận thông qua chỉ số sinh hóa thận (xét nghiệm huyết thanh): định lượng creatinin và urea sử dụng các bộ kit định lượng creatinin và urea, đo bằng máy định lượng sinh hoá bán tự động Humanlyzer.

- Về vi phẫu: Sau 30 ngày uống mẫu, chuột được mổ để quan sát đại thể toàn bộ các cơ quan, kiểm tra ngẫu nhiên cấu trúc vi thể gan, thận của 3 con/lô thí nghiệm. Đơn vị thực hiện: Bộ môn giải phẫu bệnh - Bệnh Viện Quân Y 108.

2.2.4. Nghiên cứu về tác dụng bảo vệ gan

2.2.4.1. Đánh giá tác dụng của TBT trên mô hình chuột nhất bị tổn thương gan cấp tính gây bởi paracetamol [102].

Chuột nhắt trắng được chia ngẫu nhiên thành các lô:

- Lô 1 (chứng sinh lý): chuột được uống dung môi pha mẫu CMC 0,5%
- Lô 2 (chứng bệnh lý): chuột uống dung môi pha mẫu và paracetamol
- Lô 3 (TBT liều thấp 0,5 g/kgTT): chuột uống cao chiết TBT liều 0,5 g/kgTT và paracetamol
- Lô 4 (TBT liều cao 1,0 g/kgTT): chuột uống cao chiết TBT liều 1,0 g/kgTT và paracetamol
- Lô 5 (chứng dương silymarin): chuột được uống silymarin liều 0,2 g/kgTT và paracetamol.

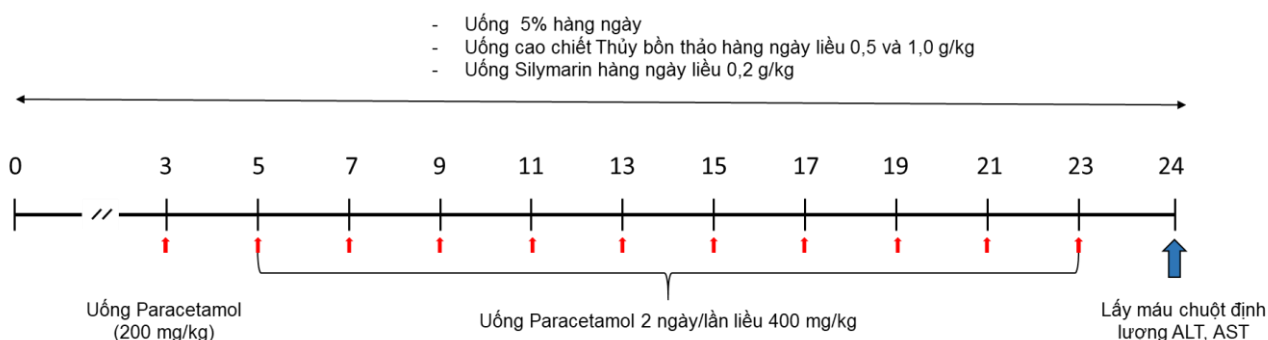
Chuột thí nghiệm được uống dung môi hoặc mẫu nghiên cứu liên tục trong 7 ngày. Cuối ngày thứ 4, cho chuột nhịn đói, nước uống tự do. Ngày thứ 5, sau uống 1 giờ, gây tổn thương gan chuột ở tất cả các lô (trừ lô chứng sinh lý) bằng cách cho uống paracetamol liều 200 mg/kgTT với thể tích 0,1ml/10gTT chuột. Ngày thứ 6, sau uống 1 giờ, gây tổn thương gan chuột ở tất cả các lô (trừ lô chứng sinh lý) bằng cách cho uống paracetamol liều 400 mg/kgTT với thể tích 0,1ml/10gTT chuột. Ngày thứ 7, sau khi cho chuột uống 1 giờ, chuột ở tất cả các lô thí nghiệm bị giết để lấy máu định lượng hoạt độ enzym ALT, AST.

2.2.4.2. Đánh giá tác dụng của TBT trên mô hình chuột nhắt bị tổn thương gan mạn tính gây bởi paracetamol [76]

Chuột nhắt trắng được chia ngẫu nhiên thành các lô:

- Lô 1 (Chứng sinh lý): chuột được uống dung môi pha mẫu (CMC 0,5%)
- Lô 2 (Chứng bệnh lý): chuột uống dung môi pha mẫu (CMC 0,5%) và paracetamol
- Lô 3 (TBT liều thấp 0,5 g/kgTT): chuột uống cao chiết TBT liều 0,5 g/kgTT và paracetamol
- Lô 4 (TBT liều cao 1,0 g/kgTT): chuột uống cao chiết TBT liều 1,0 g/kgTT và paracetamol.
- Lô 5 (Chứng dương silymarin): chuột được uống silymarin liều 0,2 g/kgTT và paracetamol.

Chuột lô sinh lý được uống dung môi trong suốt quá trình thí nghiệm. Chuột lô bệnh lý được uống dung môi và paracetamol, các lô mẫu thử được uống mẫu nghiên cứu và paracetamol. Dung môi hoặc mẫu thử được uống hàng ngày, liên tục trong 24 ngày, paracetamol được uống từ ngày thứ 3 (sau khi uống mẫu 1 giờ) tính từ khi bắt đầu uống mẫu, liều paracetamol đầu tiên là 200 mg/kgTT, uống cách ngày, từ liều paracetamol thứ 2 tăng lên 400 mg/kgTT. Sau khi uống paracetamol lần cuối 1 ngày, chuột được uống mẫu thử, 1 giờ sau thì giết chuột để lấy máu định lượng hoạt độ enzyme ALT, AST. Thiết kế thí nghiệm được chỉ ra trong sơ đồ sau:



2.2.5. Nghiên cứu về tác dụng độc trên tế bào ung thư HeLa

Thử nghiệm độc tính tế bào chống lại dòng tế bào ung thư HeLa đối với chất tinh khiết phân lập được thực hiện tại trường đại học Toyama - Nhật Bản. Quy trình thử nghiệm được tiến hành theo công bố của tác giả Lombe và cộng sự (2018) và được mô tả tóm tắt như sau [82].

- Nuôi cấy tế bào: tế bào HeLa được lưu giữ trong nitơ lỏng, đánh thức và duy trì trong môi trường DMEM đầy đủ, gồm có huyết thanh bê tươi 10%, dung dịch kháng sinh và kháng nấm 1% (penicillin 50,000 units/L và streptomycin 50 mg/L). Tế bào được nuôi cấy cho phát triển tới mức khoảng 70%, thay môi trường sạch, tế bào này được dùng làm thí nghiệm.

- Mẫu thí nghiệm: các hợp chất tinh khiết phân lập từ Thủy bồn thảo được hoà tan vào dung dịch DMSO 100% (nồng độ gốc của các hợp chất là 10

mg/ml). Tiếp theo pha mẫu nghiên cứu bằng môi trường DMEM đầy đủ thành dải nồng độ thử nghiệm cuối cùng là 3 nồng độ 200, 100, 50 μ M.

- Quy trình thử mẫu nghiên cứu và đánh giá khả năng sống sót của tế bào bằng thử nghiệm WST-8:

Nguyên tắc của thử nghiệm WST-8: Thử nghiệm WST-8 là thử nghiệm đo màu để đánh giá khả năng sống sót và tăng sinh của tế bào. Muối tetrazolium WST-8 bị khử bởi enzym dehydrogenase của ty thể tế bào thành sản phẩm formazan màu cam hòa tan trong môi trường nuôi cấy mô. Lượng formazan được tạo ra tỷ lệ thuận với số lượng tế bào sống bằng cách đo độ hấp thụ ở bước sóng 460 nm.

Sử dụng đĩa 96 giếng và cấy trải tế bào vào đĩa với mật độ (2×10^3 tế bào/giếng/180 μ l môi trường nuôi cấy, các tế bào được nuôi trong môi trường ở 37°C và 5% CO₂ trong 24 h đảm bảo tế bào gắn vào đáy mỗi giếng của đĩa nuôi cấy và ổn định. Tế bào sau đó được rửa bằng PBS và thay môi trường DMEM đầy đủ, có bổ sung thêm mẫu nghiên cứu ở các nồng độ khác nhau vào mỗi giếng. Mỗi nồng độ được lặp lại ở 3 giếng. Ủ đĩa nuôi cấy trong 72 h (37°C, 5% CO₂) để mẫu thử phát huy tác dụng. Quan sát tế bào hàng ngày bằng kính hiển vi. Sau 72 h nuôi cấy, tế bào được rửa 2 lần bằng dung dịch PBS, thêm vào mỗi giếng nuôi cấy 100 μ l môi trường nuôi cấy có bổ sung 10% WST-8 (kit đếm tế bào) và ủ trong 3 h (37°C, 5% CO₂). Sau 3h ủ, tiến hành đo mật độ quang ở bước sóng 450 nm bằng máy đọc đĩa 96 giếng (PerkinElmer, Inc., Waltham, MA, Hoa Kỳ). Thí nghiệm được tiến hành lặp lại 3 lần.

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

$$\% \text{ sống sót của tế bào} = \frac{[(\text{OD}_{\text{tế bào được xử lý mẫu thử}} - \text{OD}_{\text{chúng trắng}}) / (\text{OD}_{\text{tế bào không xử lý mẫu thử}} - \text{OD}_{\text{chúng trắng}})] \times 100\%}{}$$

2.3. Phương pháp xử lý số liệu

Với các mẫu liên tục, phân bố chuẩn, dữ liệu được biểu diễn dưới dạng $M \pm SE$ (M: giá trị trung bình, SE: sai số chuẩn), sử dụng kiểm định ANOVA kèm hậu kiểm LSD hoặc Dunnett's T3 để so sánh sự khác biệt giữa các lô, sử dụng

test so sánh cặp (pair samples T test) để so sánh sự khác nhau trong cùng một lô. Với các mẫu rời rạc hoặc không tuân theo phân bố chuẩn, dữ liệu được biểu diễn dưới dạng trung vị (khoảng tứ phân vị) và sử dụng kiểm định Kruskal- wallis để so sánh sự khác biệt giữa các lô, sử dụng test Wilcoxon để so sánh sự khác biệt trong cùng một lô. Sự khác biệt giữa các lô được coi là có ý nghĩa thống kê khi $p < 0,05$.

2.4. Địa điểm thực hiện

Viện Dược liệu - Bộ Y tế.

Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Trường đại học Toyama - Nhật Bản

CHƯƠNG III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Kết quả nghiên cứu về thực vật loài *Sedum sarmentosum*

3.1.1. Đặc điểm hình thái và giám định tên khoa học

Đặc điểm hình thái của loài thủy bồn thảo - *Sedum sarmentosum* Bunge.



Hình 3.1. Cây Thủy bồn thảo

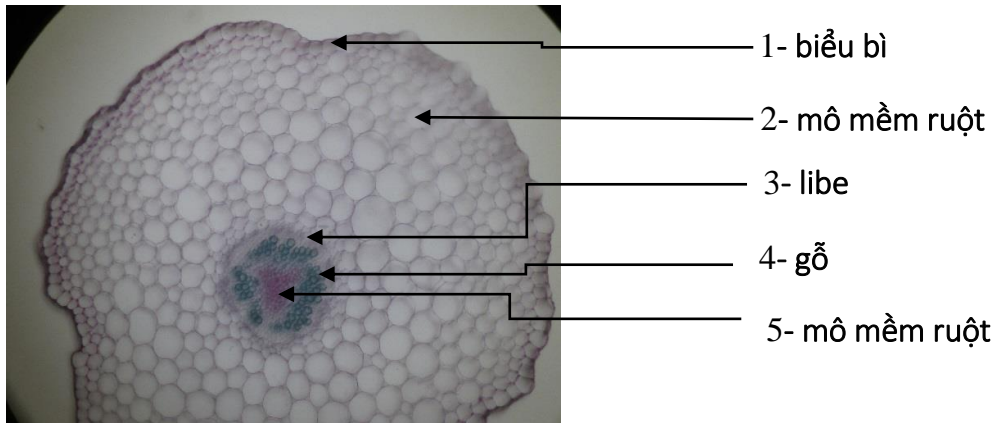
Sedum sarmentosum Bunge, thân cỏ sống nhiều năm, thân bò, rễ bám ở các đốt. Lá mọc đối hay vòng 3, thân cây mọng nước; phiến lá hình mác ngược đến hình tròn dài, dài 10-25 mm, rộng 1,5-4 mm, chóp lá nhọn, gốc lá rộng, mép nguyên và nhẵn. Cụm hoa dạng xim tán, phân nhánh 3-5. Hoa nhỏ, không có cuống. Đài 5, hình mác-tròn dài, dài 3-5 mm, chóp tù, gốc không có cựa. Tràng màu vàng nhạt, 5 cánh hình mác-hình tròn dài, dài 5-7 mm, chóp nhọn. Nhị 10, ngắn hơn cánh hoa. Lá noãn 5, rời, dài 5 mm. Quả nang mở làm hai mảnh. Mùa hoa quả tháng 5 đến tháng 8.

Tên khoa học của cây được tiến hành phân tích đặc điểm, so sánh hình thái và đối chiếu khóa phân loại của các mẫu Thủy bồn thảo thu thập tại Sa Pa, tỉnh Lào Cai vào thời điểm cây ra hoa và khi có quả (tháng 6 năm 2015). Kết quả nghiên cứu này được giám định lại bởi TS. Đỗ Văn Hải, TS. Nguyễn Thế Cường, Viện Sinh thái & Tài nguyên sinh vật và ThS. Nguyễn Quỳnh Nga, Khoa Tài nguyên Dược liệu - Viện Dược liệu (mã số tiêu bản DL-300615).

3.1.2. Đặc điểm vi phẫu

Quan sát dưới kính hiển vi mặt cắt ngang dược liệu thấy có: Biểu bì là một lớp tế bào hình tròn xếp đều đặn thành hơi hoá cutin. Mô mềm vỏ là những

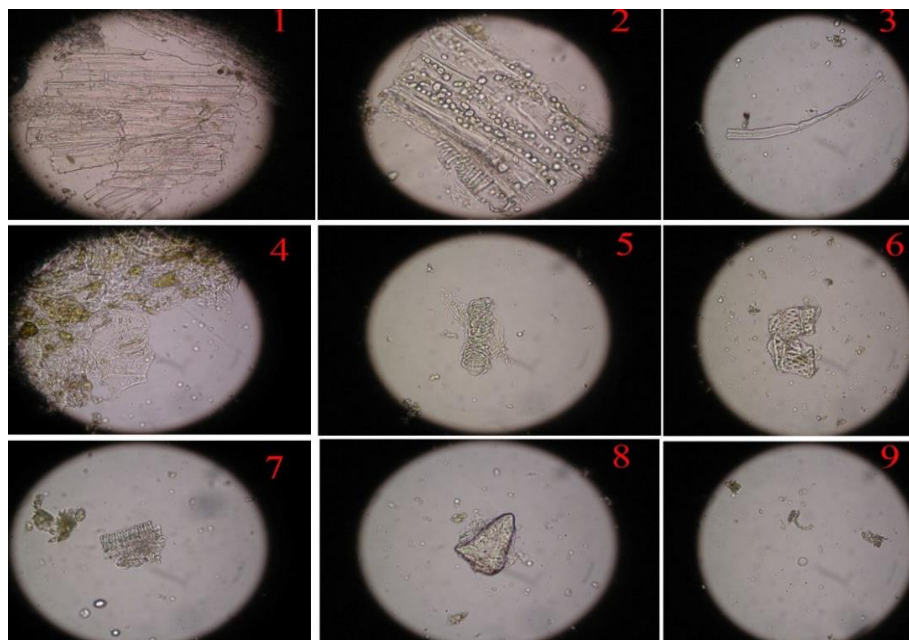
tế bào hình tròn kích thước to nhỏ khác nhau, xếp không khít nhau và để hở những khoảng gian bào nhỏ. Bó libe - gỗ nằm ở tâm của thân, libe nằm ngoài và hơi bị ép ra phía ngoài, mạch gỗ nằm ở bên trong. Mô mềm ruột là những tế bào nhỏ nằm sát nhau ở bên trong mạch gỗ.



Hình 3.2. Hình ảnh vi phẫu mặt cắt ngang thân cây Thủy bồng thảo.

3.1.3. Đặc điểm bột phần trên mặt đất của cây Thủy bồng thảo.

Đặc điểm bột phần trên mặt đất của cây Thủy bồng thảo được minh họa ở hình 3.3.



Hình 3.3. Đặc điểm bột phần trên mặt đất của cây Thủy bồng thảo.

Chú thích:

1. Mảnh mô mềm 2. Mô mềm mang tinh bột 3. Sợi

4. Biểu bì mang lỗ khí 5. Mạch mạch xoắn 6,7. Mạch mạch điểm
8. Tế bào cứng 9. Hạt tinh bột

Mô tả đặc điểm bột: Bột có màu nâu nhạt, mùi thơm nhẹ, không vị. Quan sát dưới kính hiển vi thấy có: Mảnh mô mềm (1), Mảnh mô mềm mang tinh bột (2), Sợi (3), Mảnh biểu bì mang lỗ khí (4), Mạch mạch xoắn (5), Mạch mạch điểm (6,7), Tế bào cứng (8), Hạt tinh bột (9).

3.2. Kết quả nghiên cứu về thành phần hóa học

3.2.1. Kết quả định tính bằng phản ứng hóa học

Kết quả định tính các nhóm chất hóa học thường gặp trong dược liệu bằng phản ứng hóa học được trình bày ở bảng 3.1.

Bảng 3.1. Kết quả định tính các nhóm chất hóa học trong Thủy bồn thảo

TT	Nhóm chất	Phản ứng	Kết quả	Kết luận
1	Chất béo	Vết mờ trên giấy lọc	-	Không
2	Carotenoid	Phản ứng với H ₂ SO ₄ đặc	+	Có
3	Phytosterol	Phản ứng Liberman	+	Có
4	Saponin	Phản ứng tạo bọt	-	Không
5	Coumarin	Phản ứng đóng mở vòng lacton	+	Có
		Phản ứng diazo hóa	+	
6	Flavonoid	Phản ứng cyanidin	++	Có
		Phản ứng với FeCl ₃	++	
		Phản ứng với hơi NH ₃	+	
		Phản ứng diazo hóa	+	
7	Acid hữu cơ	Phản ứng với Na ₂ CO ₃	+	Có
8	Acid amin	Phản ứng với Ninhydrin	++	Có
9	Alcaloid	Phản ứng với TT Mayer	++	Có
		Phản ứng với TT Dragendorff	++	
		Phản ứng với TT Bouchardart	++	

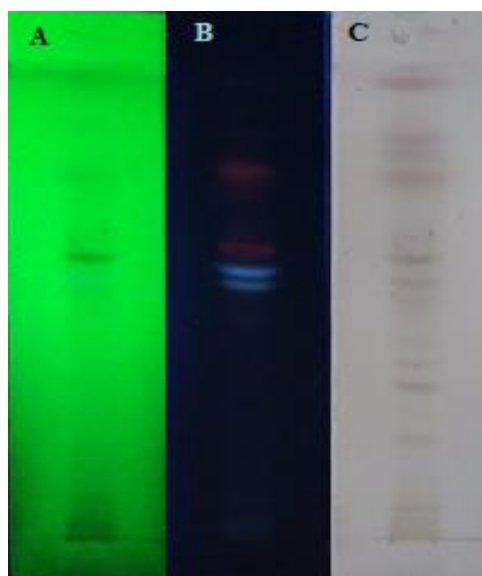
10	Anthranoid	Phản ứng với KOH	-	Không
11	Tanin	Phản ứng với gelatin 1%	++	Có
		Phản ứng với chì acetat 10%	++	
		Phản ứng với FeCl ₃ 5%	++	
12	Glycosid tim	Phản ứng Libermann	-	Không
		Bouchardart	-	
		Phản ứng Baljet	-	
13	Đường khử	Phản ứng với TT Fehling	++	Có

Chú thích: (++) : dương tính rõ, (+) : dương tính, (-) : âm tính.

Kết quả định tính bằng phản ứng hóa học cho thấy trong dược liệu có chứa các nhóm chất carotenoid, phytosterol, coumarin, flavonoid, acid hữu cơ, acid amin, alcaloid, tanin và đường khử, không chứa các nhóm chất saponin, chất béo, anthranoid và glycosid tim.

3.2.2. Kết quả sắc ký lớp mỏng

Sau khi tiến hành sắc ký lớp mỏng như đã mô tả, thu được các sắc ký đồ như sau:



Hình 3.4. Sắc ký đồ TLC dung dịch ethyl acetat (1).

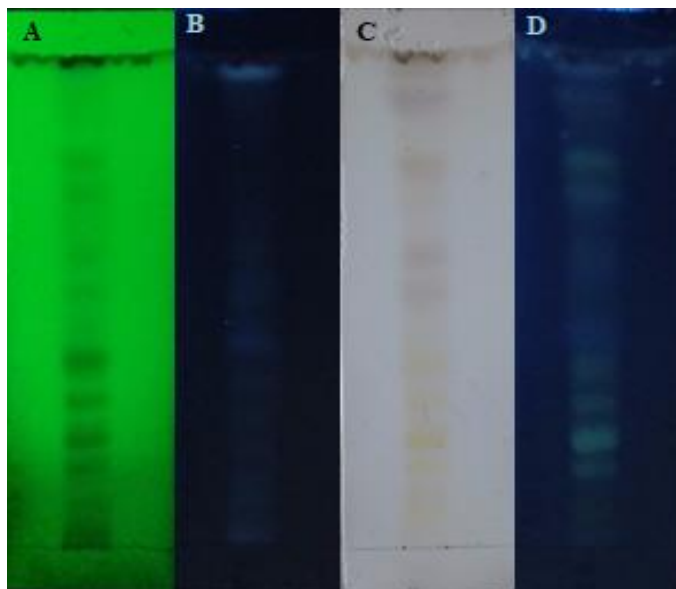
Hệ dung môi khai triển (1): toluen - ethyl acetat - acid formic (5:4:1).

A: Quan sát dưới ánh sáng tử ngoại bước sóng 254 nm

B: Quan sát dưới ánh sáng tử ngoại bước sóng 366 nm.

C: Phun thuốc thử, quan sát dưới ánh sáng thường.

Nhận xét: sau khi phun thuốc thử H_2SO_4 5% trong ethanol và quan sát dưới ánh sáng thường, sắc ký đồ của dịch chiết ethyl acetat có nhiều vết màu hồng, tím, gợi ý đây có thể là các hợp chất steroid.



Hình 3.5. Sắc ký đồ TLC dịch chiết n-butanol (2).

Hệ dung môi khai triển (2): ethyl acetat - acid formic - acid acetic - nước (100:11:11:27, lớp trên).

A: Quan sát dưới ánh sáng tử ngoại bước sóng 254 nm

B: Quan sát dưới ánh sáng tử ngoại bước sóng 366 nm.

C: Phun thuốc thử, quan sát dưới ánh sáng thường.

D: Phun thuốc thử, quan sát dưới ánh sáng tử ngoại bước sóng 366 nm.

Nhận xét: sắc ký đồ của dung dịch (2) có các vết hấp thụ ánh sáng tử ngoại bước sóng 254 nm, phát quang dưới ánh sáng tử ngoại bước sóng 366 nm. Sau khi phun thuốc thử H_2SO_4 5% trong ethanol, các vết này có màu vàng, đồng thời phát quang màu vàng sáng khi quan sát dưới ánh sáng tử ngoại bước sóng 366 nm. Kết quả này gợi ý đây là các hợp chất flavonoid hoặc coumarin.



Hình 3.6. Sắc ký đồ TLC dịch chiết chloroform (3).

Hệ dung môi khai triển (3): chloroform - methanol - amoniac (100:9:1).

A: Quan sát dưới ánh sáng tử ngoại bước sóng 254 nm

B: Quan sát dưới ánh sáng tử ngoại bước sóng 366 nm.

C: Phun thuốc thử, quan sát dưới ánh sáng thường.

Nhận xét: kết quả cho thấy sau khi phun thuốc thử Dragendoff và quan sát dưới ánh sáng thường, sắc ký đồ của dung dịch (3) xuất hiện các vết màu cam, gợi ý đây là các hợp chất alkaloid.

Kết quả: bằng phương pháp TLC cho thấy dược liệu Thủy bồn thảo có chứa các nhóm chất steroid, flavonoid, coumarin và alkaloid.

3.2.3. Kết quả chiết xuất và phân lập hợp chất từ Thủy bồn thảo.

Thủy bồn thảo (*Sedum sarmentosum* Bunge) được thu hái ở thị xã Sa Pa, huyện Sa Pa, tỉnh Lào Cai. Phần trên mặt đất cây Thủy bồn thảo được phơi khô, xay nhỏ thu được 9 kg. Bột khô này được làm ẩm rồi ngâm chiết với methanol (3 lần x 15 lít) ở nhiệt độ phòng mỗi lần 72 giờ. Dịch chiết được thu lại, lọc qua giấy lọc rồi tiến hành cất thu hồi dung môi dưới áp suất giảm thu được 400 g cặn chiết methanol. Cặn chiết này sau đó được phân tán vào trong 3 lít nước cất, rồi tiến hành chiết lần lượt với các dung môi có độ phân cực tăng dần (*n*-hexan,

dichloromethan và ethyl acetat). Các dịch chiết này được cất thu hồi dung môi dưới áp suất giảm thu được cặn *n*-hexan (SSH, 162,0 g), cặn dichloromethan (SSD, 41,0 g), cặn ethyl acetat (SSE, 14,0 g) và cặn nước (SSW, 155,0g). Kiểm tra vết chất của các cặn chiết trên sắc ký bản mỏng pha thuận (silica gel) và pha đảo (RP-18). Kết quả cho thấy vết chất ở các cặn chiết SSH và SSD chứa nhiều diệp lục, vết chất không rõ ràng. Vết chất chủ yếu tập trung ở các cặn SSE và SSW. Vì vậy, nên tập trung phân lập các hợp chất ở cặn SSE và SSW.

Cặn ethyl acetat (SSE, 14,0 g) được tẩm với silica gel rồi đưa lên cột sắc ký với hệ dung môi rửa giải dichloromethan/methanol (20/1, v/v) thu được 5 phân đoạn, SSE1-SSE5. Tiếp tục phân tách phân đoạn SSE1 trên cột sắc ký RP-18 với hệ dung môi rửa giải aceton/nước (2/1, v/v) thu được 2 phân đoạn nhỏ hơn, SSE1.1-SSE1.2. Hợp chất **SSH29** (3,0 mg) thu được khi tinh chế phân đoạn SSE1.2 trên cột sắc ký silica gel với hệ dung môi rửa giải dichloromethan/aceton (20/1, v/v). Phân đoạn SSE2 tiếp tục được đưa lên cột sắc ký RP-18 với hệ dung môi rửa giải methanol/nước (1/2, v/v) thu được 3 phân đoạn nhỏ hơn, SSE2.1-SSE2.3. Hai hợp chất **SSH20** (20,0 mg) và **SSH22** (30,0 mg) thu được khi tiếp tục phân tách phân đoạn SSE2.1 trên sắc ký cột silica gel với hệ dung môi dichloromethan/aceton/nước (50/10/1, v/v/v). Bằng phương pháp tương tự, hợp chất **SSH19** (60,0 mg) thu được khi tinh chế phân đoạn SSE2.2 trên sắc ký cột sephadex với hệ dung môi rửa giải methanol/nước (1/1, v/v). Hợp chất **SSH21** (20,0 mg) thu được khi phân tách phân đoạn SSE2.3 trên sắc ký cột pha thường với hệ dung môi rửa giải dichloromethan/methanol (20/1, v/v). Phân đoạn SSE3 được phân tách thành 5 phân đoạn nhỏ hơn (SSE3.1-SSE3.5) trên sắc ký cột pha đảo với hệ dung môi rửa giải methanol/nước (1/2, v/v). Hợp chất **SSH1** (10,0 mg) thu được khi tinh chế phân đoạn SSE3.1 trên sắc ký cột sephadex với hệ dung môi rửa giải methanol/nước (1/1, v/v). Tiếp tục phân tách phân đoạn SSE3.2 trên sắc ký cột pha thường với hệ dung môi dichloromethan/aceton/nước (50/10/1, v/v/v) thu được hai hợp chất **SSH2** (15,0 mg) và **SSH3** (50,0 mg). Bằng phương pháp tương tự hai hợp chất

SSH4 (20,0 mg) và **SSH7** (15,0 mg) lần lượt thu được khi phân lập các phân đoạn SSE3.3 và SSE3.4 trên sắc ký cột sephadex với hệ dung môi rửa giải methanol/nước (1/1, v/v). Phân đoạn SSE4 được phân tách trên cột sắc ký pha đảo với hệ dung môi methanol/nước (1/2, v/v) thu được 2 phân đoạn nhỏ hơn, SSE4.1 và SSE4.2. Hợp chất **SSH17** (12,0 mg) thu được khi phân tách phân đoạn SSE4.1 trên sắc ký cột silica gel với hệ dung môi dichloromethan/methanol/nước (600/100/5, v/v/v).

Cặn nước (SSW) được đưa lên cột diaion HP-20 để loại đường bằng nước, sau đó được rửa giải bằng hỗn hợp dung môi methanol trong nước với nồng độ methanol tăng dần (25%, 50%, 75% và 100%) thu được 4 phân đoạn, SSW1-SSW4. Phân đoạn SSW3 tiếp tục được phân tách trên sắc ký cột silica gel với hệ dung môi rửa giải dichloromethan/methanol (20/1 → 0/1, v/v) thu được 5 phân đoạn nhỏ hơn, SSW3.1-SSW3.5. Hợp chất **SSH27** (3,0 mg) thu được khi phân tách phân đoạn SSW3.3 trên sắc ký cột pha thường với hệ dung môi dichloromethan/methanol/nước (30/10/1, v/v/v). Phân đoạn SSW3.4 tiếp tục được đưa lên cột sắc ký RP-18 với hệ dung môi rửa giải methanol/nước (10/25, v/v) thu được 5 phân đoạn, SSW3.4A-SSW3.4E. Bốn hợp chất **SSH8** (12,0 mg), **SSH9** (10,0 mg), **SSH10** (15,0 mg) và **SSH12** (15,0 mg) thu được khi phân tách phân đoạn SSW3.4A trên sắc ký cột silica gel với hệ dung môi dichloromethan/aceton/nước (10/20/1, v/v/v). Tương tự, hai hợp chất **SSH24** (41,0 mg) và **SSH25** (4,0 mg) thu được khi phân tách phân đoạn SSW3.4C trên sắc ký cột silica gel với hệ dung môi rửa giải dichloromethan/aceton/nước (10/15/1, v/v/v).

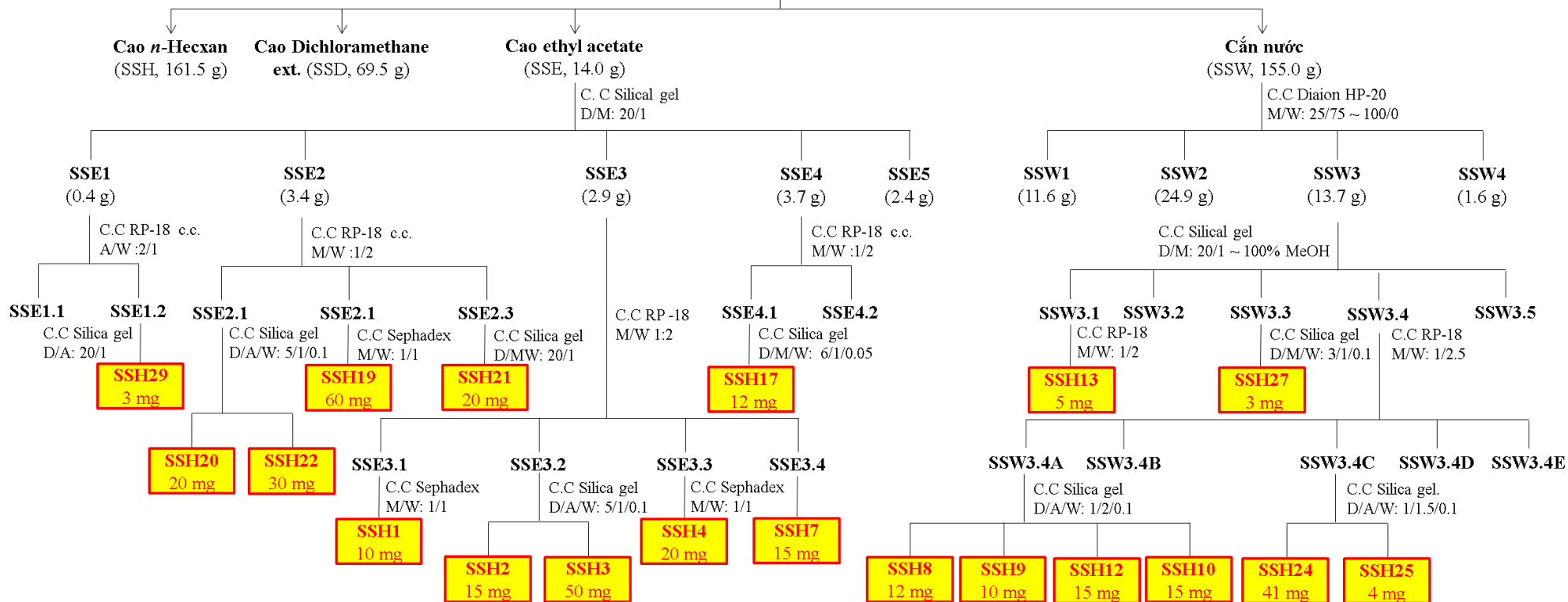
- A : Acetone
- E : Ethylacetate
- H : *n*-Hexane
- c.c : Chromatography column
- M : Methanol
- D : Dichloromethane
- W : Water

***Sedum sarmentosum* (9 kg bột khô)**

Chiết với methanol (3 lần × 15 L)

Methanol ext. (400g)

Bổ sung nước và chiết phân lớp lần lượt với các dung môi *n*-hexan, dichloromethane và ethyl acetate



Hình 3.7: Sơ đồ phân lập các hợp chất từ phần trên mặt đất cây thủy bồn thảo

3.2.4. Kết quả nhận dạng hợp chất phân lập được từ cây Thủy bồn thảo

- Hợp chất SSH1: Luteolin ($C_{15}H_{10}O_6$; M: 286)

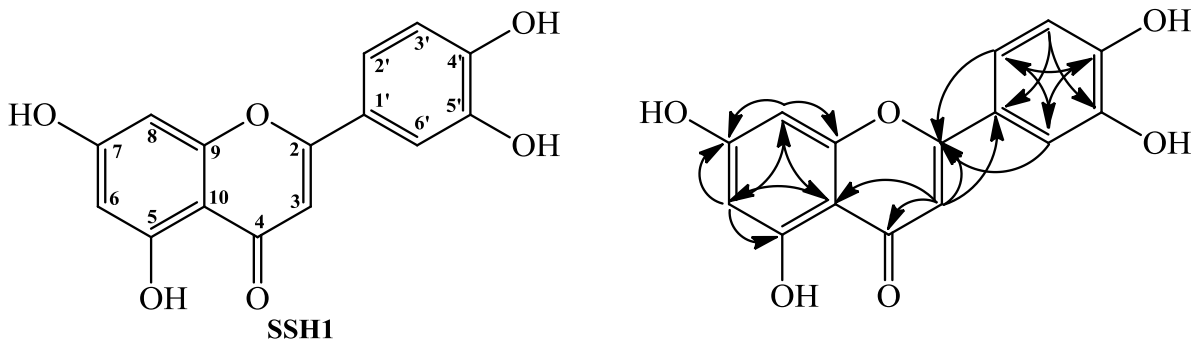
Hợp chất **SSH1** thu được dưới dạng chất bột, màu vàng. Trên phổ 1H -NMR của **SSH1** xuất hiện tín hiệu của 6 proton thơm tại δ_H 6,18 (1H, s), 6,43 (1H, s), 6,64 (1H, s), 6,88 (1H, d, $J = 8,0$ Hz), 7,39 (1H, s), 7,40 (1H, d, $J = 8,0$ Hz). Bên cạnh đó, trên phổ ^{13}C -NMR và HSQC của **SSH1** quan sát thấy tín hiệu của 15 carbon, gồm: 8 carbon bậc 4, 6 carbon methin và một nhóm carbonyl (bảng 3.2). Các tín hiệu phổ 1H , ^{13}C -NMR và HSQC của **SSH1** cho phép dự đoán đây là một flavon. Các tương tác trên phổ HMBC giữa H-2' (δ_H 7,39) với C-2 (δ_C 163,8)/ C-3' (δ_C 145,8)/C-4' (δ_C 149,9)/ C-6' (δ_C 118,9), H-5' (δ_H 6,88) với C-1' (δ_C 121,3)/ C-4' (δ_C 149,9) và H-6' (δ_H 7,40) với C-2 (δ_C 163,8)/ C-2' (δ_C 113,3)/ C-4' (δ_C 149,9) xác định giá trị độ dịch chuyển hóa học của các carbon thuộc vòng C. Tương tự, giá trị độ dịch chuyển hóa học của các carbon thuộc vòng A và B được xác định dựa vào các tương tác HMBC giữa H-3 (δ_H 6,64) với C-2 (δ_C 163,8)/ C-4 (δ_C 181,5)/ C-10 (δ_C 103,5), H-6 (δ_H 6,18) với C-5 (δ_C 161,4)/ C-7 (δ_C 164,4)/ C-8 (δ_C 93,8)/ C-10 (δ_C 103,5) và H-8 (δ_H 6,43) với C-6 (δ_C 98,9)/ C-7 (δ_C 164,4)/ C-9 (δ_C 157,3)/ C-10 (δ_C 103,5) (hình 3.8.). Vị trí của 4 nhóm hydroxy tại C-5, C-7, C-3' và C-4' được xác định dựa vào độ dịch chuyển hóa học của các carbon tương ứng lần lượt là δ_C 161,4, 164,4, 145,8, và 149,9. Từ những phân tích trên kết hợp so sánh giá trị phổ NMR của luteolin [89], cho phép khẳng định hợp chất **SSH1** là luteolin.

Bảng 3.2. Số liệu phổ NMR của hợp chất SSH1 và hợp chất tham khảo

C	$\delta_C^{\#}$	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ (mult., J in Hz)
2	163,92	163,8	-
3	102,91	102,7	6,64 (s)
4	181,70	181,5	-
5	161,52	161,4	-
6	98,87	98,9	6,18 (s)
7	164,16	164,4	-
8	93,88	93,8	6,43 (s)
9	157,32	157,3	-

10	103,74	103,5	-
1'	121,56	121,3	-
2'	113,40	113,3	7,39 (s)
3'	145,77	145,8	-
4'	149,73	149,9	-
5'	116,05	116,0	6,88 (d, 8,0)
6'	119,02	118,9	7,40 (d, 8,0)

^a đo trong DMSO-d₆, ^b đo tại 125 MHz, ^c đo tại 500 MHz. [#] δ_C của hợp chất luteolin[89].



Hình 3.8. Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC chính của SSH1

- Hợp chất SSH2: Sarmenol A (C₁₃H₂₆O₃; M: 230)

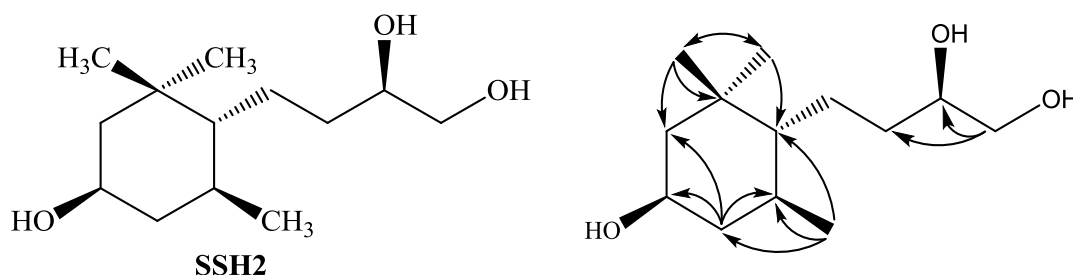
Hợp chất **SSH2** thu được dưới dạng dầu trong không màu. Trên phổ ¹H-NMR của **SSH2** xuất hiện tín hiệu của ba nhóm methyl tại δ_H 0,75 (3H, s), 0,87 (3H, s), 0,89 (3H, d, *J* = 6,5 Hz), một nhóm oxymethylen δ_H 3,23 (2H, dd, *J* = 5,0, 11,0 Hz), hai nhóm oxymethin tại δ_H 3,30 (1H, m), 3,51 (1H, m). Bên cạnh đó, trên phổ ¹³C-NMR và HSQC của **SSH2** xuất hiện tín hiệu của 13 carbon, bao gồm: ba nhóm methyl, năm nhóm methylen, bốn nhóm methin và một carbon bậc 4 (bảng 3.3). Các tín hiệu phổ ¹H- và ¹³C-NMR của **SSH2** gợi ý đây là một megastigman. Trên phổ HMBC của **SSH2** cho thấy có tương tác giữa H-11 (δ_H 0,75) và H-12 (δ_H 0,87) với C-1 (δ_C 35,4)/ C-2 (δ_C 51,1)/ C-6 (δ_C 52,4) xác định vị trí của hai nhóm methyl tại C-1. Vị trí của nhóm 2 methyl còn lại tại C-5 được xác định dựa vào tương tác giữa H-13 (δ_H 0,89) với C-4 (δ_C 45,8)/C-5 (δ_C 33,1)/ C-6 (δ_C 52,4). Vị trí của nhóm hydro tại C-3 được xác định dựa vào giá trị độ

chuyển dịch hóa học tại C-3 (δ_C 64,6) và tương tác HMBC giữa H-4 (δ_H 0,79, 1,76) với C-3 (δ_C 64,6). Tương tác HMBC giữa H-10 (δ_H 3,23) với C-8 (δ_C 35,8)/ C-9 (δ_C 71,7) và giá trị độ dịch chuyển hóa học tại C-9 (δ_C 71,7), C-10 (δ_C 65,8) cho phép xác định vị trí của hai nhóm hydro còn lại tại C-9 và C-10. Từ các bằng chứng phổ trên kết hợp đối chiếu so sánh số liệu phổ thu được của **SSH2** với dữ liệu phổ của hợp chất sarmentol A [94], hợp chất **SSH2** được xác định là sarmentol A. Hợp chất này được Yoshikawa và cộng sự thông báo phân lập lần đầu tiên từ loài *Sedum sarmentosum* năm 2007.

Bảng 3.3. Số liệu phổ NMR của hợp chất SSH2 và hợp chất tham khảo

C	$\delta_C^{\#}$	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ (mult., J in Hz)
1	35,9	35,4	-
2	51,0	51,1	0,96 (t, 12,0) 1,52 (m)
3	66,9	64,6	3,51 (m)
4	45,6	45,8	0,79 (t, 12,0) 1,76 (m)
5	33,6	33,1	1,33 (m)
6	52,7	52,4	0,43 (dd, 3,0, 11,0)
7	24,9	24,7	0,93 (m) 1,53 (m)
8	35,5	35,8	1,17 (m) 1,51 (m)
9	72,8	71,7	3,30 (m)
10	66,7	65,8	3,23 (dd, 5,0, 11,0)
11	21,0	20,9	0,75 (s)
12	30,7	30,6	0,87 (s)
13	21,5	20,8	0,89 (d, 6,5)

^a đo trong DMSO-*d*₆, ^b đo tại 125 MHz, ^c đo tại 500 MHz. [#] δ_C của hợp chất sarmentol A đo trong CDCl₃[94].



Hình 3.9. Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC chính của SSH2

- Hợp chất SSH3: Myrsiniosid A ($C_{19}H_{34}O_7$; M: 374) (Lần đầu phân lập từ chi *Sedum*)

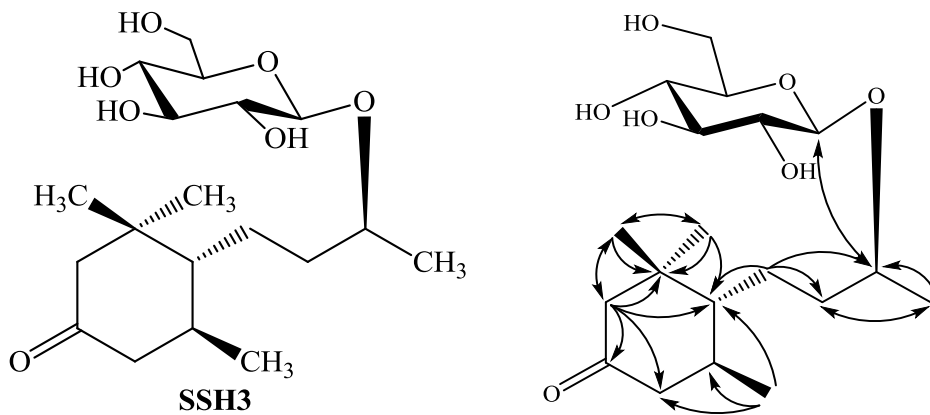
Hợp chất **SSH3** thu được dưới dạng chất bột màu trắng. Trên phổ 1H -NMR của **SSH3** quan sát thấy tín hiệu của bốn nhóm methyl tại δ_H 0,75 (3H, s), 1,05 (3H, s), 1,07 (3H, d, $J = 6,5$ Hz), 1,18 (3H, d, $J = 6,5$ Hz) và một proton anomer tại δ_H 4,33 (d, 8,0). Trên phổ ^{13}C -NMR và HSQC của **SSH3** xuất hiện tín hiệu của 19 carbon, gồm: bốn nhóm methyl, năm nhóm methylen, tám nhóm methin và hai carbon không liên kết với hydro (bảng 3.4). Giá trị độ dịch chuyển hóa học của các carbon thuộc phần đường (102,1, 75,1, 78,1, 71,8, 77,8, 62,9) cùng với hằng số tương tác của proton anomer $J_{H-1'/H-2'} = 8,0$ Hz cho phép xác định sự có mặt của phần đường β -glucopyranosyl trong cấu trúc hóa học của **SSH3**. Các tín hiệu phổ 1D-NMR của **SSH3** gợi ý đây là một megastigman glycosid. Các tương tác HMBC giữa H-11 (δ_H 0,75)/ H-12 (δ_H 1,05) với C-1 (δ_C 40,4)/ C-2 (δ_C 57,1)/ C-6 (δ_C 53,5) xác định vị trí của hai nhóm methyl tại C-1. Vị trí của hai nhóm methyl còn lại tại C-5 và C-9 lần lượt được xác định dựa vào các tương tác HMBC giữa H-13 (δ_H 1,07) với C-4 (δ_C 50,9)/ C-5 (δ_C 37,6)/ C-6 (δ_C 53,5) và H-10 (δ_H 1,18) với C-8 (δ_C 40,4)/ C-9 (δ_C 75,9). Vị trí của nhóm carbonyl tại C-3 được xác định dựa vào tương tác giữa H-2 (δ_H 1,95, 2,36) với C-3 (δ_C 214,5) và giá trị độ dịch chuyển hóa học của C-3 (δ_C 214,5). Ngoài ra, phần đường β -glucopyranosyl gắn với phần khung chất tại C-9 được xác định dựa vào tương tác HMBC giữa proton anomer (δ_H 4,33) với C-9 (δ_C 75,9). Tổng hợp các dữ liệu phổ thu được kết hợp với tài liệu tham khảo [52], hợp chất **SSH3** được xác định là myrsiniosid A. Hợp chất này được Otsuka và cộng sự (2001) thông báo phân lập được lần đầu tiên từ loài *Myrsine seguinii* LEV.

Bảng 3.4. Số liệu phổ NMR của hợp chất SSH3 và hợp chất tham khảo

C	$\delta_C^{\#}$	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ (mult., J in Hz)
1	40,4	40,4	-
2	57,2	57,1	1,95 (dd, 2,5, 13,0) 2,36 (d, 13,0)
3	214,5	214,5	-

4	50,9	50,9	2,13 (m) 2,20 (m)
5	37,7	37,6	1,78 (m)
6	53,6	53,5	1,13 (m)
7	26,0	25,9	1,95 (dd, 2,5, 13,0) 1,66 (m)
8	40,5	40,4	1,66 (m)
9	75,9	75,9	3,86 (m)
10	19,8	19,8	1,18 (d, 6,5)
11	21,1	21,1	0,75 (s)
12	30,3	30,3	1,05 (s)
13	21,5	21,5	1,07 (d, 6,5)
1'	102,2	102,1	4,33 (d, 8,0)
2'	75,2	75,1	3,15 (m)
3'	78,2	78,1	3,35 (m)
4'	71,7	71,8	3,28 (m)
5'	77,9	77,8	3,25 (m)
6'	63,0	62,9	3,65 (dd, 5,5, 11,5) 3,84 (m)

^a đo trong CD₃OD, ^b đo tại 125 MHz, ^c đo tại 500 MHz. [#]δ_C của hợp chất myrsiniosid A[52].



Hình 3.10. Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC chính của SSH3

- Hợp chất **SSH4**: *Simplicifloranosid* (C₁₉H₃₂O₇; M: 372) (Lần đầu phân lập từ chi *Sedum*)

Hợp chất **SSH4** thu được dưới dạng chất bột vô định hình. Trên phổ ¹H-NMR của **SSH4** xuất hiện tín hiệu của bốn nhóm methyl tại δ_H 0,84 (3H, s), 0,96 (3H, d, *J* = 6,5 Hz), 1,03 (3H, s), 1,33 (3H, d, *J* = 6,5 Hz) đặc trưng của hợp

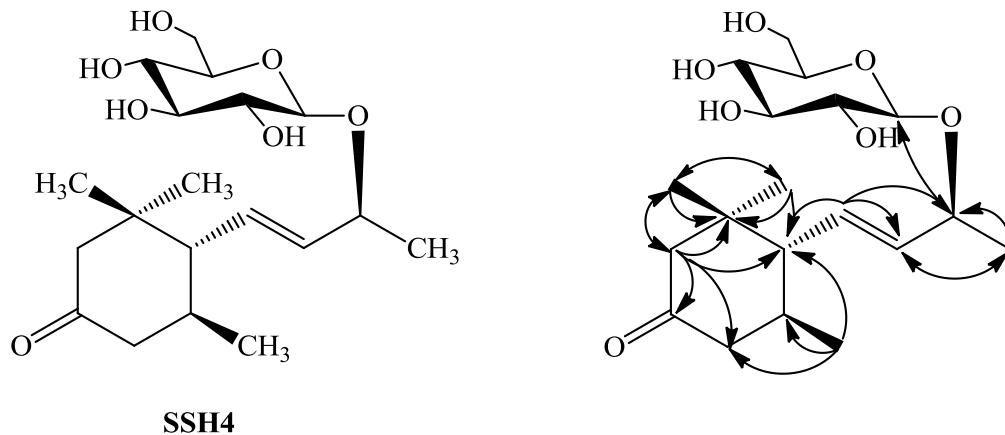
chất megastigman, hai proton olefin tại δ_{H} 5,46 (1H, dd, $J = 9,5, 15,5$ Hz), 5,71 (1H, dd, $J = 7,0, 15,5$ Hz) gợi ý sự có mặt của liên kết CH=CH cấu hình *E* và một proton anomer tại δ_{H} 4,39 (1H, d, $J = 7,5$ Hz). Trên phổ ^{13}C -NMR và HSQC của **SSH4** xuất hiện tín hiệu của 19 carbon gồm: bốn nhóm methyl, ba nhóm methylen, 10 nhóm methin và hai carbon không liên kết với hydro (bảng 3.5). Số liệu phổ thu được từ **SSH4** khá tương đồng với **SSH3** ngoại trừ sự có mặt của một liên kết đôi CH=CH cấu hình *E*, do đó hợp chất **SSH4** được dự đoán là một megastigman glycosid. Vị trí của liên kết CH=CH được xác định dựa vào tương tác HMBC giữa H-7 (δ_{H} 5,46) với C-5 (δ_{C} 34,8)/C-6 (δ_{C} 57,9)/ C-9 (δ_{C} 77,6) và H-8 (δ_{H} 5,71) với C-6 (δ_{C} 57,9)/ C-10 (δ_{C} 21,7). Tương tác giữa proton anomer H-1' (δ_{H} 4,39) với C-9 (δ_{C} 77,6) cho phép xác định vị trí của phần đường liên kết với khung chất tại C-9 qua cầu nối ether. Những bằng chứng phổ trên và kết quả đối chiếu số liệu phổ của **SSH4** với tài liệu tham khảo [88], hợp chất **SSH4** được xác định là simplicifloranosid.

Bảng 3.5. Số liệu phổ NMR của hợp chất SSH4 và hợp chất tham khảo

C	$\delta_{\text{C}}^{\#}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,c}}$ (mult., J in Hz)
1	39,4	39,3	-
2	56,6	56,6	2,04 (dd, 2,0, 11,0) 2,45 (d, 11,0)
3	214,5	214,0	-
4	49,9	50,0	2,17 (t, 13,0) 2,33 (m)
5	34,8	34,8	1,92 (m)
6	57,8	57,9	1,97 (d, 9,5)
7	131,7	131,6	5,46 (dd, 9,5, 15,5)
8	137,5	137,6	5,71 (dd, 7,0, 15,5)
9	78,1	77,6	4,41 (m)
10	21,7	21,7	0,96 (d, 6,5)
11	21,4	21,4	0,84 (s)
12	31,2	31,2	1,03 (s)
13	21,4	21,3	1,33 (d, 6,5)
1'	102,4	102,4	4,39 (d, 7,5)
2'	75,3	75,4	3,21 (m)
3'	77,8	77,9	3,22 (m)

4'	71,4	71,5	3,34 (m)
5'	77,9	78,1	3,35 (m)
6'	62,5	62,6	3,70 (dd, 5,0, 11,5) 3,83 (dd, 2,0, 11,5)

^a đo trong CD₃OD, ^b đo tại 125 MHz, ^c đo tại 500 MHz. # δ_C của hợp chất *simplicifloranosid*[88].



Hình 3.11. Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC chính của SSH4

- Hợp chất *SSH7*: *Sedumosid I* (C₁₉H₃₂O₈; M: 388)

Hợp chất **SSH7** thu được dưới dạng chất bột vô định hình. Trên phổ ¹H-NMR của **SSH7** quan sát thấy tín hiệu của ba nhóm methyl tại δ_H 0,80 (3H, s), 1,09 (3H, s), 1,11 (3H, d, $J = 6,5$ Hz) và proton anomer tại δ_H 4,33 (1H, d, $J = 8,0$ Hz).

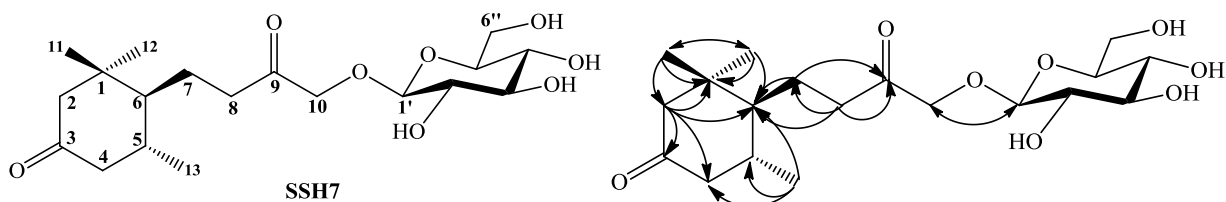
Trên phổ ¹³C-NMR và HSQC của **SSH7** quan sát thấy tín hiệu của hai nhóm carbonyl tại δ_C 210,7, 214,0; một carbon bậc 4 tại δ_C 40,3; bảy nhóm methin tại δ_C 37,50, 52,7, 71,6, 75,0, 77,9, 78,2, 104,3; sáu nhóm methylen tại δ_C 23,3, 41,4, 57,1, 50,8, 62,8, 74,8 và ba nhóm methyl tại 21,0, 21,3, 30,3. Số liệu phổ NMR của **SSH7** gợi ý đây là một megastigman glycosid. Giá trị độ dịch chuyển hóa học của các carbon thuộc phần đường (bảng 3.6) và hằng số tương tác của proton anomer ($J_{H-1'-H-2'} = 7,5$ Hz) cho phép xác định phần đường của **SSH7** là β -glucopyranosyl. Các tương tác HMBC giữa H-2 (δ_H 2,01, 2,42)/ H-4 (δ_H 2,19, 2,25) với C-3 (δ_C 214,0) và H-7 (δ_H 1,50, 1,87)/ H-8 (δ_H 2,71) với C-9

(δ_C 210,7) xác định vị trí của hai nhóm carbonyl tại C-3 và C-9. Phần đường liên kết với khung chất tại C-10 được xác định dựa vào tương tác HMBC giữa proton anomer H-1' (δ_H 4,33) với C-10 (δ_C 74,8) (hình 3.12). Từ các phân tích trên kết hợp so sánh với tài liệu tham khảo [94], hợp chất **SSH7** được xác định là sedumosid I.

Bảng 3.6. Số liệu phổ NMR của hợp chất SSH7 và hợp chất tham khảo

C	$\delta_C^{\#}$	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ (mult., J in Hz)
1	40,2	40,3	-
2	57,0	57,1	2,01 (dd, 2,0, 13,5) 2,42 (d, 13,5)
3	214,0	214,0	-
4	50,7	50,8	2,19 (m) 2,25 (m)
5	37,5	37,5	1,82 (m)
6	52,6	52,7	1,25 (m)
7	23,2	23,3	1,50 (m) 1,87 (m)
8	41,3	41,4	2,71 (m)
9	210,6	210,7	-
10	74,7	74,8	4,33 (d, 17,0) 4,53 (d, 17,0)
11	21,1	21,0	0,80 (s)
12	30,3	30,3	1,09 (s)
13	21,4	21,3	1,11 (d, 6,5)
1'	104,2	104,3	4,33 (d, 8,0)
2'	74,9	75,0	3,29 (m)
3'	77,8	77,9	3,38 (m)
4'	71,6	71,6	3,30 (m)
5'	78,1	78,2	3,30 (m)
6'	62,8	62,8	3,68 (dd, 5,5, 12,0) 3,89 (dd, 1,0, 12,0)

^a đo trong CD_3OD , ^b đo tại 125 MHz, ^c đo tại 500 MHz. [#] δ_C của hợp chất sedumosid I [94].



Hình 3.12. Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC chính của SSH7

- Hợp chất **SSH8**: *Isorhamnetin-3,7-O-di-β-D-glucosid* ($C_{28}H_{32}O_{17}$; M: 640).

Hợp chất **SSH8** thu được dưới dạng chất bột màu vàng. Các tín hiệu trên phổ 1H - và ^{13}C -NMR của **SSH8** gợi ý đây là một flavon glycosid với các tín hiệu của một vòng thơm thế ABX tại δ_H 7,94 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-2'), 6,93 (1H, d, $J = 8,5$ Hz, H-5'), 7,54 (1H, dd, $J = 2,0, 8,5$ Hz, H-6'); hai proton thơm meta-coupled tại δ_H 6,45 (1H, d, $J = 1,5$ Hz, H-6) và 6,80 (1H, d, $J = 1,5$ Hz, H-8), hai proton anomer tại δ_H 5,57 (1H, d, $J = 7,5$ Hz, H-1'''), 5,08 (1H, d, $J = 7,5$ Hz, H-1''), và một nhóm methoxy tại δ_H 3,84 (3H, s, 3'-OCH₃). Phân tích giá trị độ dịch chuyển hóa học của các carbon thuộc phần đường và hằng số tương tác của hai proton anomer (bảng 3.7) xác định phần đường của **SSH8** là β-glucopyranosyl. Tương tác HMBC giữa H-1'' (δ_H 5,57) với C-3 (δ_C 133,3) và H-1''' (δ_H 5,08) với C-7 (δ_C 162,9) lần lượt xác định vị trí của các phần đường nối với khung chất tại C-3 và C-7. Ngoài ra, vị trí của nhóm methoxy tại C-3' được xác định dựa vào tương tác HMBC giữa các proton thuộc nhóm methoxy (δ_H 3,84) với C-3' (δ_C 147,0). Từ những phân tích trên hợp chất **SSH8** được xác định là isorhamnetin-3,7-O-di-β-D-glucosid [75].

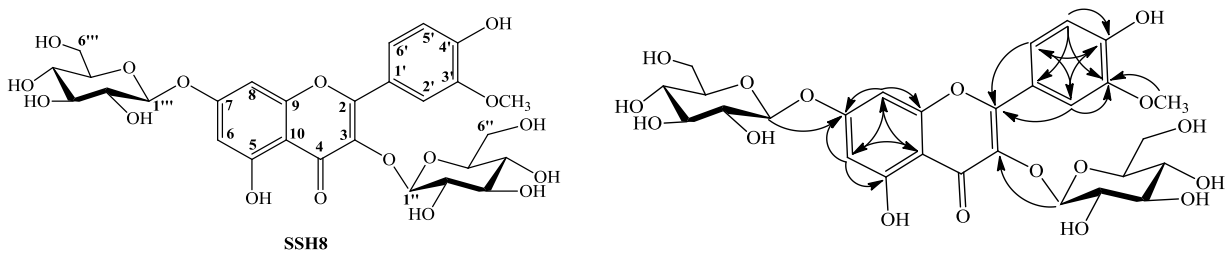
Bảng 3.7. Số liệu phổ NMR của hợp chất SSH8 và hợp chất tham khảo

C	$\delta_C^{\#}$	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ (mult., J in Hz)
2	156,9	156,8	-
3	133,3	133,3	-
4	177,6	177,6	-
5	160,9	160,8	-
6	99,4	99,4	6,45 (d, 1,5)
7	162,9	162,9	-
8	94,6	94,5	6,80 (d, 1,5)

9	156,0	156,0	-
10	105,7	105,7	-
1'	120,9	120,9	-
2'	113,5	113,5	7,94 (d, 2,0)
3'	146,9	147,0	-
4'	149,6	149,7	-
5'	115,2	115,2	6,93 (d, 8,5)
6'	115,2	122,2	7,54 (dd, 2,0, 8,5)
1''	100,7	100,7	5,57 (d, 7,5)
2''	74,3	74,3	3,23 (m)
3''	77,5	76,4	3,28 (m)*
4''	69,8	69,8	3,09 (m)
5''	76,5	77,5	3,11 (m)
6''	60,6	60,6	3,38 (m) 3,58 (brd, 11,5)
1'''	99,7	99,8	5,08 (d, 7,5)
2'''	73,1	73,1	3,26 (m)
3'''	77,2	76,4	3,24 (m)*
4'''	69,6	69,6	3,15 (m)
5'''	76,4	77,2	3,43 (m)
6'''	60,6	60,6	3,44 (m) 3,69 (brd, 9,5)
3'-OCH ₃	55,7	55,7	3,84 (s)

^a đo trong DMSO-d₆, ^b đo tại 125 MHz, ^c đo tại 500 MHz * có thể hoán đổi vị trí cho nhau,

[#] δ_C của hợp chất isorhamnetin-3,7-O-di-β-D-glucosid[75].



Hình 3.13. Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC chính của SSH8

- Hợp chất SSH9: Sedumosid C (C₁₉H₃₄O₈; M: 390)

Hợp chất **SSH9** thu được dưới dạng chất bột, vô định hình. Trên phổ ¹H-NMR của **SSH9** quan sát thấy tín hiệu của ba nhóm methyl tại δ_H 0,88 (3H, s), 1,11 (3H, s), 1,13 (3H, d, *J* = 6,5 Hz) và một proton anomer tại δ_H 4,33 (1H, d, *J*

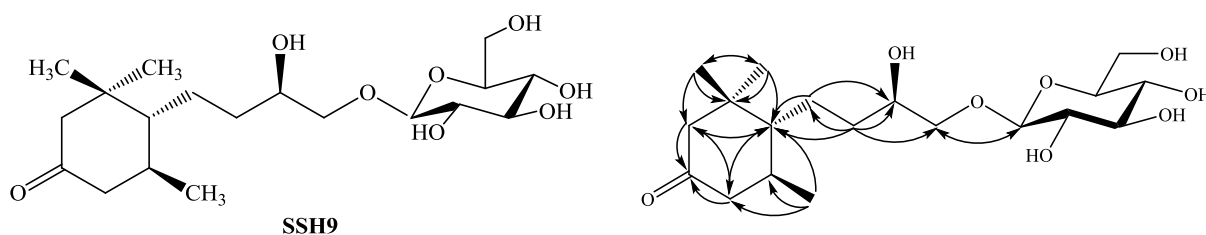
= 8,0 Hz). Bên cạnh đó, trên phổ ^{13}C -NMR và HSQC của **SSH9** xuất hiện tín hiệu của 19 carbon gồm: ba nhóm methyl, sáu nhóm methylen, một nhóm carbonyl và một carbon bậc 4 (bảng 3.8). Số liệu phổ ^1H - và ^{13}C -NMR của **SSH9** khá giống với **SSH7** ngoại trừ sự thiếu vắng một nhóm carbonyl và có nhiều hơn một nhóm oxymethin so với **SSH7**. Điều này gợi ý hợp chất **SSH9** là một megastigman glycosid. Vị trí của nhóm oxymethin tại C-9 được xác định dựa vào tương tác HMBC giữa H-7 (δ_{H} 1,22, 1,78)/ H-8 (δ_{H} 1,53, 1,68) với C-9 (δ_{C} 72,1) (hình 3.14). Ngoài ra, số liệu phổ NMR của **SSH9** hoàn toàn trùng khớp với số liệu của sedumosid C trong tài liệu đã công bố [94]. Từ tất cả các bằng chứng trên hợp chất **SSH9** được xác định là sedumosid C.

Bảng 3.8. Số liệu phổ NMR của hợp chất SSH9 và hợp chất tham khảo

C	$\delta_{\text{C}}^{\#}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,c}}$ (mult., <i>J</i> in Hz)
1	40,4	40,3	-
2	57,1	57,1	2,01 (dd, 2,5, 13,0) 2,43 (d, 13,0)
3	214,2	214,5	-
4	50,9	50,8	2,18 (m) 2,27 (m)
5	37,7	37,6	1,82 (m)
6	52,2	53,5	1,20 (m)
7	26,1	26,0	1,22 (m) 1,78 (m)
8	36,5	36,4	1,53 (m) 1,68 (m)
9	72,2	72,1	3,80 (m)
10	75,4	75,3	3,46 (dd, 7,5, 10,0) 3,97 (dd, 3,0, 10,0)
11	21,1	21,1	0,88 (s)
12	30,3	30,2	1,11 (s)
13	21,5	21,4	1,13 (d, 6,5)
1'	104,9	104,7	4,33 (d, 8,0)
2'	75,1	75,2	3,26 (m)
3'	77,9	77,9	3,42 (m)
4'	71,6	71,6	3,33 (m)
5'	78,0	77,8	3,32 (m)
6'	62,7	62,7	3,70 (brd, 11,5)

			3,91 (brd, 11,5)
--	--	--	------------------

^a đo trong CD₃OD, ^b đo tại 125 MHz, ^c đo tại 500 MHz. # δ_C của hợp chất sedumosid C [94].



Hình 3.14. Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC chính của SSH9

- Hợp chất **SSH10**: 2-phenylethyl-D-rutinosid (C₂₀H₃₀O₁₀; M: 389)

Hợp chất **SSH10** thu được dưới dạng chất bột vô định hình. Số liệu phổ NMR của **SSH10** cho thấy sự có mặt của một phenylethyl alcohol và hai đơn vị đường trong cấu trúc của **SSH10** (bảng 3.9). Các tín hiệu của năm proton thuộc vòng thơm thể một vị trí tại δ_H 7,28 (2H, dd, $J = 8,0, 11,0$ Hz, H-2/H-6), 7,27 (2H, s, H-3/H-5), 7,19 (1H, ddd, $J = 3,0, 6,5, 8,0$ Hz, H-4); hai proton thuộc nhóm oxymethylen tại δ_H 3,79 (1H, m, H₁- β), 4,05 (1H, m, H₂- β) và hai proton thuộc nhóm methylen tại δ_H 2,96 (2H, ddd, $J = 3,0, 7,5, 10,0$ Hz, H- α) xác định sự có mặt của phần khung phenylethyl alcohol. Sự có mặt của tín hiệu methyl tại δ_H 1,28 và δ_C 18,0 trên phổ ¹H- và ¹³C-NMR gợi ý sự có mặt của phần đường rhamnopyranosyl. Ngoài ra, giá trị độ dịch chuyển hóa học của các carbon thuộc phần đường còn lại 104,4, 75,0, 78,0, 71,6, 76,8, 68,1 và hằng số tương tác của proton anomer tương ứng $J_{H-1'/H-2'} = 7,5$ Hz gợi ý phần đường này là β -glucopyranosyl. Vị trí của phần đường β -glucopyranosyl liên kết với khung chất tại C- β được xác định dựa vào tương tác giữa proton anomer H-1' (δ_H 4,31) với C- β (δ_C 71,8).

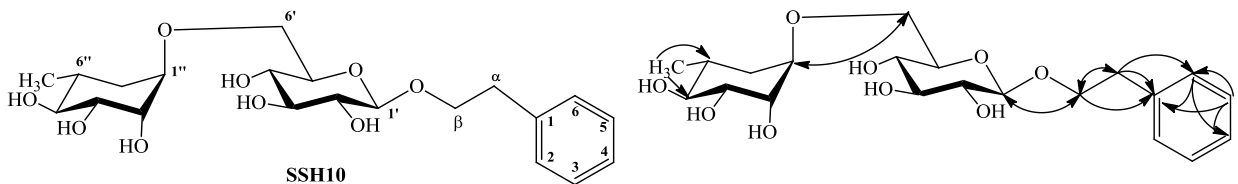
Tương tác HMBC giữa H-1'' (δ_H 4,77) với C-6' (δ_C 68,1) và H-6' (δ_H 3,64, 4,00) với C-1'' (δ_C 102,2) xác định phần đường α -rhamnopyranosyl kết nối phần đường β -glucopyranosyl tại C-1'' và C-6' qua cầu nối ether. Từ các bằng chứng trên, hợp chất **SSH10** được xác định là 2-phenylethyl-D-rutinosid. Dữ liệu phổ

của **SSH10** cũng hoàn toàn phù hợp với số liệu phổ của 2-phenylethyl-D-rutinosid ở công bố trước đây [73].

Bảng 3.9. Số liệu phổ NMR của hợp chất SSH10 và hợp chất tham khảo

C	$\delta_C^{\#}$	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ (mult., <i>J</i> in Hz)
1	139,4	138,0	-
2	128,6	129,4	7,28 (dd, 8,0, 11,0)
3	129,4	128,0	7,27 (s)
4	126,4	127,2	7,19 (ddd, 3,0, 6,5, 8,0)
5	129,3	130,0	7,27 (s)
6	128,6	129,4	7,28 (dd, 8,0, 11,0)
α	36,6	37,3	2,96 (ddd, 3,0, 7,5, 10,0)
β	71,7	71,8	3,79 (m) 4,05 (m)
1'	104,5	104,4	4,31 (d, 7,5)
2'	74,9	75,0	3,20 (m)
3'	78,5	78,0	3,37 (m)
4'	70,5	71,6	3,31 (m)
5'	77,0	76,8	3,41 (m)
6'	68,2	68,1	3,64 (dd, 6,0, 11,0) 4,00 (dd, 2,0, 11,0)
1''	102,3	102,2	4,77 (d, 1,5)
2''	72,1	72,2	3,86 (m)
3''	72,7	72,4	3,69 (m)
4''	74,0	74,0	3,39 (m)
5''	69,7	69,8	3,70 (m)
6''	18,6	18,0	1,28 (d, 6,0)

^a đo trong MeOD, ^b đo tại 125 MHz, ^c đo tại 500 MHz. [#] δ_C của hợp chất 2-phenylethyl-D-rutinosid đo trong pyridin-*d*₅ [73].



Hình 3.15. Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC chính của SSH10

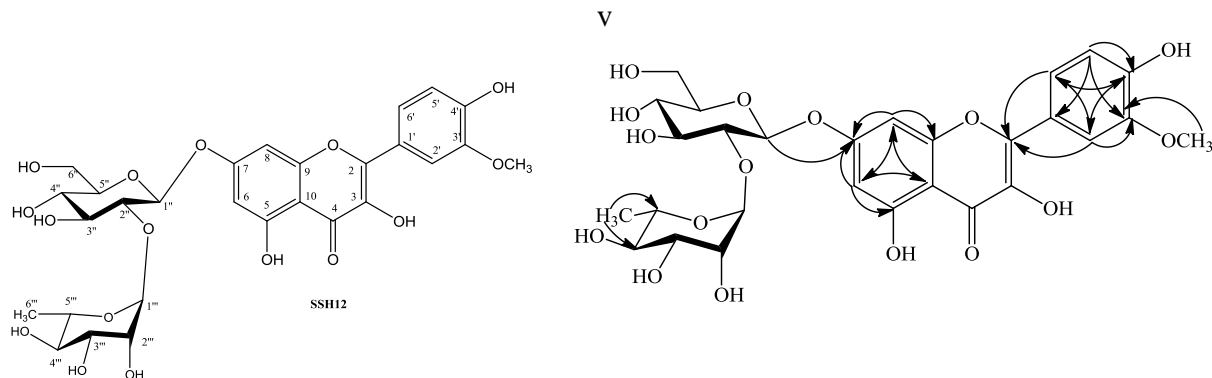
- Hợp chất **SSH12**: 3'-Methoxy-3,5,4'-trihydroxyflavon-7-neohesperidosid ($C_{28}H_{32}O_{16}$; M: 624) (Lần đầu phân lập từ chi *Sedum*)

Hợp chất **SSH12** thu được dưới dạng chất bột màu vàng. Số liệu phổ 1D-NMR thu được của **SSH12** gợi ý đây là một flavon glycosid (bảng 3.10). Trên phổ $^1\text{H-NMR}$ của **SSH12** xuất hiện tín hiệu của ba proton thuộc hệ tương tác spin-spin ABX tại δ_{H} 7,95 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-2'), 6,91 (1H, d, $J = 8,5$ Hz, H-5'), 7,57 (1H, dd, $J = 2,0, 8,5$ Hz, H-6''); hai proton thơm meta-coupled tại 6,45 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-6), 6,84 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-8); hai proton anomer tại δ_{H} 5,57 (1H, d, $J = 7,5$ Hz, H-1''), 5,56 (1H, s, H-1'''); một nhóm methoxy tại δ_{H} 3,85 (3H, s, 3'-OCH₃) và một nhóm methyl tại δ_{H} 1,12 (3H, d, $J = 6,0$ Hz, C-6''). Trên phổ $^{13}\text{C-NMR}$ và HSQC của **SSH12** quan sát thấy tín hiệu của 15 carbon thuộc phần khung flavon gồm: một nhóm carbonyl, năm oxygenat carbon; bốn carbon bậc 4 và năm nhóm methin. Ngoài ra còn quan sát thấy tín hiệu của 13 carbon thuộc hai đơn vị đường và một nhóm methoxy (bảng 3.10). Sự có mặt của tín hiệu methyl tại δ_{H} 1,12 và δ_{C} 17,9 trên phổ $^1\text{H-}$ và $^{13}\text{C-NMR}$ gợi ý sự có mặt của phần đường rhamnopyranosyl. Giá trị độ dịch chuyển hóa học của 12 carbon thuộc hai phần đường hoàn toàn phù hợp với công bố trước đây của -O- α -L-rhamnopyranosyl- β -D-glucopyranose (neohesperidose) [81]. Phân tích các tương tác trên phổ HMBC giữa nhóm methoxy (δ_{H} 3,85) với C-3' (δ_{C} 147,0) và proton H-1'' (δ_{H} 5,57) với C-7 (δ_{C} 161,6) lần lượt xác định vị trí của nhóm methoxy và phần đường glucopyranosyl gắn vào phần khung chất tại C-3' và C-7. Sự chuyển dịch về vùng trường thấp của C-2'' với giá trị độ dịch chuyển hóa học δ_{C} 76,3 gợi ý phần đường còn lại kết nối với phần đường glucopyranosyl thông qua cầu nối ether tại C-1''' và C-2''. Bên cạnh đó, kết quả đối chiếu số liệu phổ NMR của hợp chất **SSH12** với số liệu được công bố của hợp chất 3'-methoxy-3,5,4'-trihydroxyflavon-7-neohesperidosid [91] cho thấy các giá trị đều phù hợp. Từ những bằng chứng đã phân tích trên, hợp chất **SSH12** được xác định là 3'-methoxy-3,5,4'-trihydroxyflavon-7-neohesperidosid.

Bảng 3.10. Số liệu phổ NMR của hợp chất SSH12 và hợp chất tham khảo

C	$\delta_C^{\#}$	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ (mult., <i>J</i> in Hz)
2	157,3	156,8	-
3	133,8	133,3	-
4	178,1	177,5	-
5	161,2	160,6	-
6	99,8	99,3	6,45 (d, 2,0)
7	162,1	161,6	-
8	95,1	94,6	6,84 (d, 2,0)
9	156,5	156,0	-
10	106,2	105,6	-
1'	121,4	120,7	-
2'	114,0	113,5	7,95 (d, 2,0)
3'	147,4	147,0	-
4'	150,1	149,6	-
5'	115,7	115,2	6,91 (d, 8,5)
6'	122,8	122,3	7,57 (dd, 2,0, 8,5)
1''	101,3	100,7	5,57 (d, 7,5)
2''	76,9	76,3	3,24 (m)
3''	74,8	74,2	3,24 (m)
4''	70,4	69,8	3,09 (m)
5''	77,9	77,4	3,11 (m)
6''	61,2	60,6	3,38 (m) 3,58 (brd, 11,5)
1'''	98,9	98,3	5,56 (s)
2'''	70,7	69,8	3,85 (m)
3'''	70,5	70,0	3,64 (dd, 3,0, 9,0)
4'''	72,1	71,5	3,30 (m)
5'''	70,3	70,2	3,42 (m)
6'''	18,4	17,9	1,12 (d, 6,0)
3'-OCH ₃	56,2	55,7	3,85 (s)

^a đo trong DMSO-d₆, ^b đo tại 125 MHz, ^c đo tại 500 MHz. [#] δ_C của hợp chất 3'-methoxy-3,5,4'-trihydroxyflavon-7-neohesperidosid [91].



Hình 3.16. Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC chính của SSH12

- Hợp chất **SSH13**: *Quercetin-3-O-β-D-glucopyranose* (C₂₁H₂₀O₁₂; M: 464)

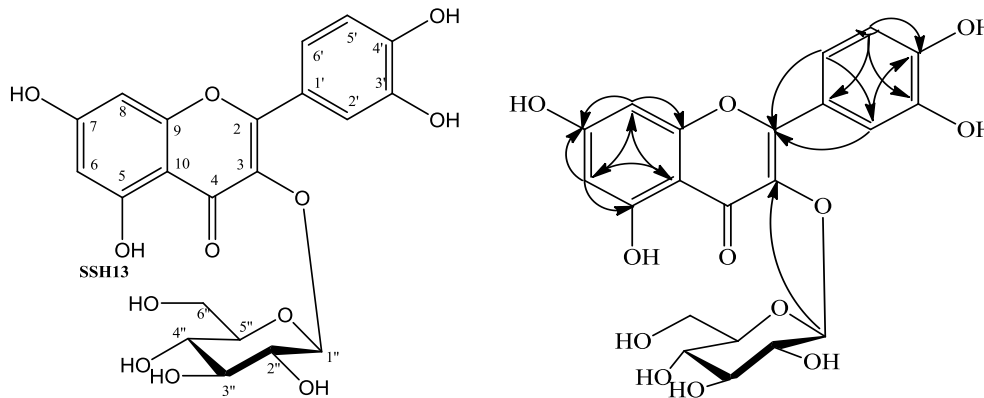
Hợp chất **SSH13** thu được dưới dạng chất bột, màu vàng. Phổ NMR thu được của **SSH13** gợi ý đây là một flavon glycosid. Trên phổ ¹H-NMR của **SSH13** xuất hiện tín hiệu của hai proton meta-coupled tại δ_H 6,19 (1H, d, *J* = 2,0 Hz, H-6), 6,40 (1H, d, *J* = 2,0 Hz, H-8), ba proton thuộc hệ ABX tại δ_H 7,57 (1H, d, *J* = 2,0 Hz, H-2'), 6,84 (1H, d, *J* = 9,0 Hz, H-5'), 7,57 (1H, dd, *J* = 2,0, 9,0 Hz, H-6') và tín hiệu của một proton anomer tại δ_H 5,45 (1H, d, *J* = 7,0 Hz, H-1''). Trên phổ ¹³C-NMR của **SSH13** xuất hiện tín hiệu của 21 carbon gồm 15 carbon thuộc phần khung flavon và sáu carbon thuộc phần đường (bảng 3.11). Giá trị độ dịch chuyển hóa học của các carbon thuộc phần đường gồm δ_C 100,9 (C-1''), 74,1 (C-2''), 76,5 (C-3''), 69,9 (C-4''), 77,5 (C-5''), 61,0 (C-6'') và hằng số tương tác $J_{H-1''-H-2''} = 7,0$ Hz xác định phần đường của **SSH13** là β-glucopyranosyl. Tương tác HMBC giữa H-1'' (δ_H 5,45) với C-3 (δ_C 133,3) xác định vị trí của phần đường tại C-3. Từ những phân tích trên hợp chất **SSH13** được xác định là quercetin-3-O-β-D-glucopyranose [139].

Bảng 3.11. Số liệu phổ NMR của hợp chất SSH13 và hợp chất tham khảo

C	δ _C [#]	δ _C ^{a,b}	δ _H ^{a,c} (mult., <i>J</i> in Hz)
2	156,78	156,3	-
3	133,76	133,3	-
4	177,90	177,4	-
5	161,70	161,2	-
6	99,11	98,7	6,19 (d, 2,0)
7	164,59	164,2	-

8	93,96	93,5	6,40 (d, 2,0)
9	156,62	156,1	-
10	104,43	103,9	-
1'	121,62	121,1	-
2'	115,66	115,2	7,57 (d, 2,0)
3'	145,27	144,2	-
4'	148,92	148,4	-
5'	116,66	116,2	6,84 (d, 9,0)
6'	122,06	121,6	7,57 (dd, 2,0, 9,0)
1''	101,30	100,9	5,45 (d, 7,0)
2''	74,55	74,1	3,10-3,25*
3''	76,95	76,5	3,10-3,25*
4''	70,39	69,9	3,10-3,25*
5''	78,04	77,5	3,10-3,25*
6''	61,43	61,0	3,09 (brd, 4,5) 3,58 (brd, 11,0)

^a đo trong DMSO-d₆, ^b đo tại 125 MHz, ^c đo tại 500 MHz, * Tín hiệu bị che lấp, [#]δ_C của hợp chất quercetin-3-O-β-D-glucopyranose [139].



Hình 3.17. Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC chính của SSH13

- Hợp chất SSH17: 3'-methoxyluteolin-7-O-β-D-glucopyranosid (C₂₂H₂₂O₁₁; M: 462).

Hợp chất **SSH17** thu được dưới dạng chất bột màu vàng. Phổ 1D-NMR của **SSH17** gợi ý đây là một flavon glycosid. Trên phổ ¹H-NMR của **SSH17** xuất hiện tín hiệu của sáu proton thơm tại δ_H 6,45 (1H, d, *J* = 2,0), 6,87 (1H, d, *J* = 2,0), 6,97 (1H, s), 7,58 (1H, s), 6,95 (1H, d, *J* = 8,5), 7,59 (1H, brd, *J* = 7,0), ba proton thuộc một nhóm methoxy tại δ_H 3,90 (3H, s) và một proton anomer tại δ_H

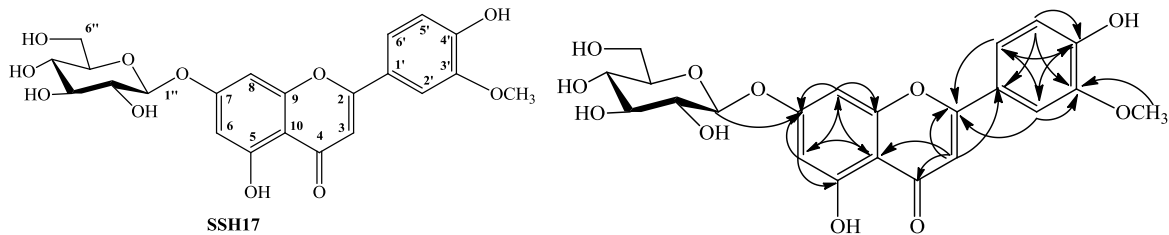
5,06 (1H, d, $J = 7,0$ Hz). Trên phổ ^{13}C -NMR và HSQC của **SSH17** quan sát thấy tín hiệu của một nhóm carbonyl, tám carbon không liên kết với hydro, 11 nhóm methin, một nhóm methylen và một nhóm methoxy (bảng 3.12). Số liệu phổ NMR của **SSH17** khá giống với **SSH8** ngoại trừ sự thiếu vắng một đơn vị đường glucopyranose ở **SSH17**. Tương tác HMBC giữa proton của nhóm methoxy ($\delta_{\text{H}} 3,90$) với C-3' ($\delta_{\text{C}} 148,0$) và proton anomer H-1'' ($\delta_{\text{H}} 5,06$) với C-7 ($\delta_{\text{C}} 163,0$) lần lượt xác định vị trí của nhóm methoxy tại C-3' và phần đường tại C-7. (hình 3.18). Từ các phân tích phổ trên cùng với kết quả so sánh số liệu phổ thu được của **SSH17** và số liệu phổ được công bố của 3'-methoxyluteolin-7-O- β -D-glucopyranosid [122], hợp chất **SSH17** được xác định là 3'-methoxyluteolin-7-O- β -D-glucopyranosid.

Bảng 3.12. Số liệu phổ NMR của hợp chất SSH17 và hợp chất tham khảo

C	$\delta_{\text{C}}^{\#}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,c}}$ (mult., J in Hz)
2	164,10	164,1	-
3	103,28	103,4	6,97 (s)
4	181,93	182,0	-
5	160,99	161,1	-
6	99,40	99,5	6,45 (d, 2,0)
7	162,87	163,0	-
8	94,92	95,0	6,87 (d, 2,0)
9	156,82	156,9	-
10	105,23	105,3	-
1'	121,07	121,3	-
2'	110,18	110,3	7,58 (s)
3'	148,00	148,0	-
4'	151,00	150,9	-
5'	115,73	115,8	6,95 (d, 8,5)
6'	120,45	120,5	7,59 (brd, 7,0)
1''	99,91	100,0	5,06 (d, 7,0)
2''	73,02	73,1	3,27 (m)
3''	76,30	76,4	3,30 (m)
4''	69,51	69,6	3,18 (m)
5''	77,10	77,2	3,44 (m)
6''	60,52	60,6	3,47 (m) 3,72 (brd, 11,0)
3'-	55,87	56,0	3,90 (s)

OCH ₃			
------------------	--	--	--

^a đo trong DMSO-d₆, ^b đo tại 125 MHz, ^c đo tại 500 MHz, [#]δ_C của hợp chất 3'-methoxyluteolin-7-O-β-D-glucopyranosid [122].



Hình 3.18. Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC chính của SSH17

- Hợp chất SSH19: Acid Ferulic (C₁₀H₁₀O₄; M: 194).

(Lần đầu phân lập từ loài *Sedum sarmentosum* Bunge)

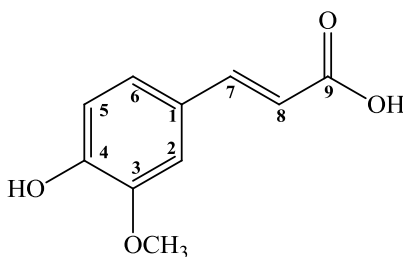
Hợp chất **SSH19** thu được dưới dạng chất bột vô định hình. Trên phổ ¹H-NMR của **SSH19** quan sát thấy tín hiệu của ba proton thơm thuộc hệ tương tác ABX tại δ_H 7,18 (1H, d, *J* = 2,0 Hz), 6,83 (1H, d, *J* = 8,0 Hz), 7,07 (1H, dd, *J* = 2,0, 8,0 Hz); hai proton của một nhóm ethenyl cấu hình *E* tại δ_H 7,61 (1H, d, *J* = 16,0 Hz), 6,32 (1H, d, *J* = 16,0 Hz) và ba proton của một nhóm methoxy tại δ_H 3,90 (s). Trên phổ ¹³C-NMR của **SSH19** xuất hiện tín hiệu của 10 carbon bao gồm một nhóm carbonyl tại δ_C 171,0, tám carbon olefin tại δ_C 150,5, 149,3, 146,9, 127,8, 123,9, 116,5, 115,9, 111,7 và một nhóm methoxy tại δ_C 56,5. Phân tích số liệu phổ ¹H- và ¹³C-NMR của **SSH19** cho thấy sự có mặt của một vòng thơm thế 1,3,4; một liên kết đôi CH=CH cấu hình *E*, một nhóm carbonyl và một nhóm methoxy trong cấu trúc hóa học của hợp chất này. So sánh số liệu phổ NMR thu được của **SSH19** với hợp chất acid ferulic ở tài liệu đã công bố [98]. Kết quả cho thấy số liệu của **SSH19** và acid ferulic hoàn toàn trùng khớp ở tất cả các vị trí. Từ tất cả các phân tích trên **SSH19** được xác định là acid ferulic.

Bảng 3.13. Số liệu phổ NMR của hợp chất SSH19 và hợp chất tham khảo

C	δ _C [#]	δ _C ^{a,b}	δ _H ^{a,c} (mult., <i>J</i> in Hz)
1	127,7	127,8	-
2	111,5	111,7	7,18 (d, 2,0)

3	149,2	149,3	-
4	150,2	150,5	-
5	116,2	115,9	6,83 (d, 8,0)
6	123,7	123,9	7,07 (dd, 2,0, 8,0)
7	146,4	146,9	7,61 (d, 16,0)
8	116,3	116,5	6,32 (d, 16,0)
9	171,1	171,0	-
3-OCH ₃	56,4	56,5	3,90 (s)

^a đo trong MeOD, ^b đo tại 125 MHz, ^c đo tại 500 MHz, [#]δ_C của hợp chất acid ferulic[98].



SSH19

Hình 3.19. Cấu trúc hóa học của SSH19

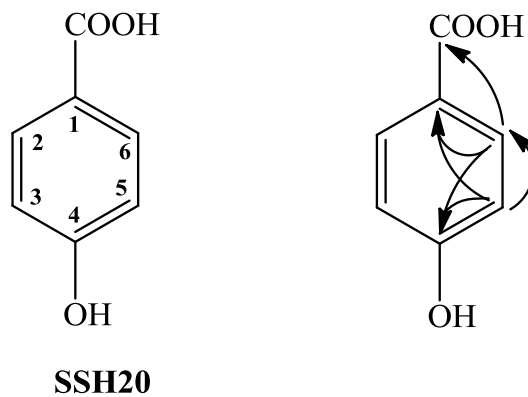
- Hợp chất SSH20: Acid *p*-hydroxybenzoic (C₇H₆O₃; M: 138).

Hợp chất **SSH20** thu được dưới dạng tinh thể, không màu. Trên phổ ¹H-NMR của **SSH20** xuất hiện tín hiệu của bốn proton thuộc vòng thơm thế 1,4 tại δ_H 6,84 (2H, d, *J* = 9,0 Hz), 7,90 (2H, d, *J* = 9,0 Hz). Trên phổ ¹³C-NMR của **SSH20** quan sát thấy tín hiệu của năm carbon, gồm: bốn nhóm methin tại δ_C 116,0 (2xCH), 133,0 (2xCH) và một carbon không liên kết với hydro. Ngoài ra, hai carbon không liên kết khác được xác định dựa vào tương tác trên HMBC tại δ_C 122,7 và 170,1. Các bằng chứng phổ trên gợi ý hợp chất **SSH20** là acid *p*-hydroxybenzoic. Các tương tác HMBC giữa H-2 (δ_H 7,90) với C-3 (δ_C 116,0)/C-4 (δ_C 163,2)/COOH (δ_C 170,1) và H-3 (δ_H 6,84) với C-1 (δ_C 122,7)/ C-2 (δ_C 133,0)/ C-4 (δ_C 163,2) xác định giá trị độ dịch chuyển hóa học của các vị trí thuộc vòng thơm và sự có mặt của các nhóm hydroxy và carbonnyl tại C-1 và C-4. Từ tất cả các phân tích trên hợp chất **SSH20** được xác định là acid *p*-hydroxybenzoic [41].

Bảng 3.14. Số liệu phổ NMR của hợp chất SSH20 và hợp chất tham khảo

C	$\delta_C^{\#}$	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ (mult., J in Hz)
1	122,78	122,7*	-
2	133,02	133,0	7,90 (d, 9,0)
3	116,04	116,0	6,84 (d, 9,0)
4	163,35	163,2	-
5	116,04	116,0	6,84 (d, 9,0)
6	133,02	133,0	7,90 (d, 9,0)
COOH	170,18	170,1*	-

^a đo trong MeOD, ^b đo tại 125 MHz, ^c đo tại 500 MHz, * xác định trên HMBC, [#] δ_C của hợp chất acid *p*-hydrobenzoic[41].



Hình 3.20. Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC chính của SSH20

- Hợp chất SSH21: Acid *trans-p*-coumaric ($C_9H_8O_3$; M: 164).

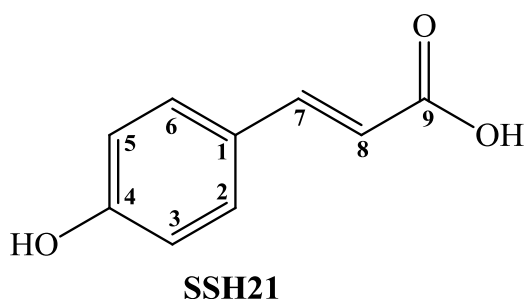
(Lần đầu phân lập từ loài *Sedum sarmentosum* Bunge)

Hợp chất **SSH21** thu được dưới dạng tinh thể hình kim, màu trắng. Trên phổ 1H -NMR của **SSH21** quan sát thấy tín hiệu của bốn proton thuộc vòng thơm thế 1,4 tại δ_H 6,83 (2H, d, $J = 9,0$ Hz), 7,45 (2H, d, $J = 9,0$ Hz) và hai proton olefin thuộc một liên kết đôi $CH=CH$ cấu hình *E* tại δ_H 6,30 (1H, d, $J = 16,0$ Hz), 7,62 (1H, d, $J = 16,0$ Hz). Trên phổ ^{13}C -NMR của **SSH21** xuất hiện tín hiệu của chín carbon gồm: một nhóm carbonyl, hai carbon không liên kết với hydro và sáu nhóm methin (bảng 3.15). Các tín hiệu phổ 1H - và ^{13}C -NMR của **SSH21** cho thấy cấu trúc của hợp chất này có mặt một nhóm carbonyl, một liên kết đôi $CH=CH$ và một vòng thơm thế 1,4. Ngoài ra, giá trị độ dịch chuyển hóa học của C-4 (δ_C 161,1) gợi ý sự có mặt của một nhóm hydroxy tại vị trí này. Từ các phân tích trên hợp chất **SSH21** được xác định là acid *trans-p*-coumaric [48].

Bảng 3.15. Số liệu phổ NMR của hợp chất SSH21 và hợp chất tham khảo

C	$\delta_C^{\#}$	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ (mult., <i>J</i> in Hz)
1	127,09	127,3	-
2	130,68	131,1	7,45 (d, 9,0)
3	115,71	116,8	6,83 (d, 9,0)
4	160,45	161,1	-
5	115,71	116,8	6,83 (d, 9,0)
6	130,68	131,1	7,45 (d, 9,0)
7	145,64	146,7	7,62 (d, 16,0)
8	116,65	116,8	6,30 (d, 16,0)
9	168,29	171,1	-

^a đo trong MeOD, ^b đo tại 125 MHz, ^c đo tại 500 MHz, [#] δ_C của hợp chất acid *trans-p-coumaric*[48].

**Hình 3.21. Cấu trúc hóa học của SSH21**

- Hợp chất SSH22: Tyrosol (C₈H₁₀O₂; M: 138).

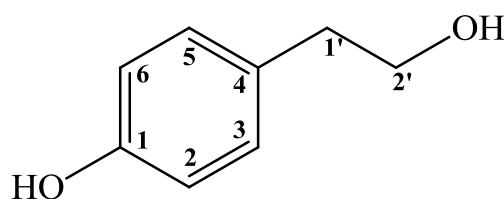
Hợp chất **SSH22** thu được dưới dạng dầu, màu nâu nhạt. Trên phổ ¹H-NMR của **SSH22** quan sát thấy tín hiệu của bốn proton thuộc vòng thơm thế 1,4 tại δ_H 6,73 (2H, d, *J* = 8,5 Hz), 7,05 (2H, d, *J* = 8,5 Hz), hai proton thuộc một nhóm oxygenmetylen tại δ_H 3,71 (2H, t, *J* = 7,0 Hz) và hai proton thuộc một nhóm methylen tại δ_H 2,74 (2H, t, *J* = 7,0 Hz). Bên cạnh đó, trên phổ ¹³C-NMR của **SSH22** xuất hiện tín hiệu của tám carbon tại δ_C 156,7, 131,0, 130,9 (2xC), 116,1 (2xC), 64,5, 39,3. Số liệu phổ thu được ¹H- và ¹³C-NMR của **SSH22** gợi ý đây là một phenylethyl alcohol. Từ các phân tích trên kết hợp đối chiếu với tài liệu tham khảo [109] cho phép khẳng định **SSH22** là phenylethyl alcohol.

Bảng 3.16. Số liệu phổ NMR của hợp chất SSH22 và hợp chất tham khảo

C	$\delta_C^{\#}$	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ (mult., <i>J</i> in Hz)
---	-----------------	------------------	--

1	156,7	156,7	-
2	116,0	116,1	7,05 (d, 8,5)
3	130,8	130,9	6,73 (d, 8,5)
4	130,9	131,0	-
5	130,8	130,9	6,73 (d, 8,5)
6	116,0	116,1	7,05 (d, 8,5)
1'	39,3	39,3	2,74 (t, 7,0)
2'	64,5	64,5	3,71 (t, 7,0)

^a đo trong MeOD, ^b đo tại 125 MHz, ^c đo tại 500 MHz, [#] δ_C của hợp chất phenylethyl alcohol[109].



SSH22

Hình 3.22. Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC chính của SSH22

- Hợp chất SSH24: Sedumosid K (C₁₉H₃₄O₈; M: 390) (chất mới)

Hợp chất **SSH24** thu được dưới dạng dầu, màu vàng nhạt. Trên phổ ¹H-NMR của **SSH24** quan sát thấy tín hiệu của ba nhóm methyl tại δ_H 0,81 (3H, s), 1,12 (3H, s), 1,14 (3H, d, $J = 6,5$ Hz) và một proton anomer tại δ_H 4,48 (1H, d, $J = 7,5$ Hz). Bên cạnh đó, trên phổ ¹³C-NMR và HSQC của **SSH24** xuất hiện tín hiệu của một nhóm carbonyl tại δ_C 214,6; một carbon bậc 4 tại δ_C 40,4; tám nhóm methin tại δ_C 37,6, 53,7, 71,7, 75,5, 77,9, 78,0, 82,3, 103,9; sáu nhóm methylen tại δ_C 26,0, 34,9, 50,9, 57,1, 62,9, 64,8 và ba nhóm methyl tại δ_C 21,1, 21,5, 30,3. Hằng số tương tác của proton anomer ($J_{H-1'-H-2'} = 7,5$ Hz) cùng với giá trị độ dịch chuyển hóa học của các carbon thuộc phần đường (bảng 3.17) cho phép xác định phần đường của **SSH24** là β -glucopyranosyl. Số liệu phổ của hợp chất **SSH24** khá giống với số liệu phổ của hợp chất sedumosid C (**SSH9**) ngoại trừ tại các vị trí C-8 (δ_C 34,9), C-9 (δ_C 82,3) và C-10 (δ_C 64,8) ở **SSH24** so với C-8 (δ_C 36,4), C-9 (δ_C 72,1) và C-10 (δ_C 75,3) ở **SSH9** (bảng 3.17). Điều này cho phép dự đoán cấu trúc hóa học của **SSH24** và **SSH9** khá giống nhau ngoại trừ vị

trí gắn kết của phần đường. Sự dịch chuyển về vùng trường thấp hơn của tín hiệu C-9 và dịch chuyển về vùng trường cao hơn của C-10 ở **SSH24** gợi ý phần đường của hợp chất **SSH24** liên kết với phần aglycon tại C-9. Ngoài ra, tương tác HMBC giữa proton H-2 (δ_H 2,01, 2,43)/ H-4 (δ_H 2,20, 2,25) và C-3 (δ_C 214,6) xác định vị trí của nhóm carbonyl tại C-3. Vị trí của phần đường tại C-9 và nhóm hydroxy tự do tại C-10 được xác định dựa vào các tương tác HMBC giữa H-1' (δ_H 4,48)/H-7 (δ_H 1,25, 1,80)/ H-8 (δ_H 1,69, 1,79)/ H-10 (δ_H 3,59, 3,71) với C-9 (δ_C 82,3) cùng với giá độ dịch chuyển hóa học tại C-10 (δ_C 64,8). So sánh giá trị độ dịch chuyển hóa học các carbon C-9 (δ_C 82,3) và C-10 (δ_C 64,8) của **SSH24** với hợp chất sedumosid A₂ có cấu hình 9*S* [(C-9, δ_C 82,5), (C-10, δ_C 64,8)] và hợp chất sedumosid B có cấu hình 9*R* [(C-9, δ_C 83,2), (C-10, δ_C 65,9)] [94].

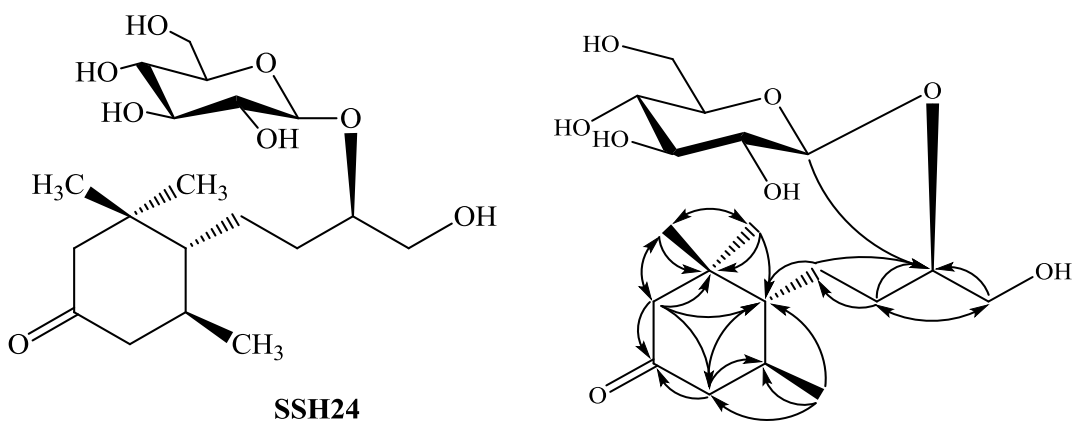
Hằng số tương tác lớn ($J_{1',2'} = 7,5$ Hz) gợi ý cấu hình trans của H-1' (α) và H-2' (β). Tương tác NOESY giữa H-1'/H-3' và H-1'/H-5' gợi ý H-1' có hướng α -axial, trong khi tương tác giữa H-2' và H-4' gợi ý hướng H-2' hướng β -axial (hình 3.24). Với các nghiên cứu gần đây, phân tích cấu hình ở MM2, kết hợp với tối ưu hóa hình học sử dụng DFT ở mức CAM-B3LYP/6-31G*, cho cấu hình bền nhất như trong hình 3.24. Tính toán ECD lý thuyết về tối ưu hóa hình học được tiến hành cùng mức so sánh với lý thuyết (hình 3.31). Kết quả tính toán ECD cho 5*R*,6*S*,9*R* và 5*R*,6*S*,9*S* cho các giá trị âm tại bước sóng 280 nm. Kết quả ECD thu được là dương, hợp chất mới này phải có cấu hình tuyệt đối là 5*S*,6*R*. Hơn nữa, cường độ quay của hiệu ứng Cotton hoàn toàn phù hợp với dữ liệu thực nghiệm của cấu hình 5*S*,6*R*,9*R* (hình 3.32). Từ các bằng chứng phổ trên cấu trúc hóa học của **SSH24** được xác định là (5*S*,6*R*,9*R*)-megastigman-3-on-9,10-diol-9 β -glucopyranosid. Tra cứu trên cơ sở dữ liệu Scifinder cho phép kết luận **SSH24** là một hợp chất mới. Hợp chất này được đặt tên là **Sedumosid K**.

Bảng 3.17. Số liệu phổ NMR của hợp chất SSH24 và hợp chất tham khảo

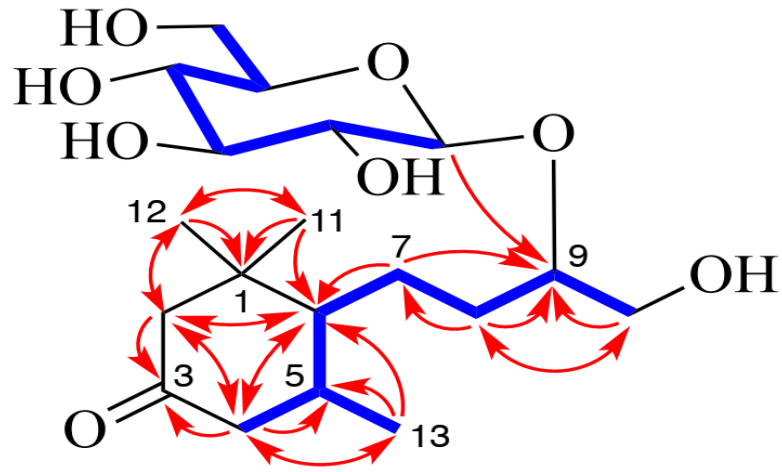
C	SSH9	SSH24
---	------	-------

	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ (mult., J in Hz)
1	40,3	40,4	-
2	57,1	57,1	2,01 (dd, 2,0, 13,0) 2,43 (d, 13,0)
3	214,5	214,6	-
4	50,8	50,9	2,20 (t-like, 13,0) 2,25 (m)
5	37,6	37,6	1,83 (m)
6	53,5	53,7	1,20 (m)
7	26,0	26,0	1,25 (m) 1,80 (m)
8	36,4	34,9	1,69 (m) 1,79 (m)
9	72,1	82,3	3,79 (m)
10	75,3	64,8	3,59 (dd, 6,0, 12,0) 3,71 (m)
11	21,1	21,1	0,81 (s)
12	30,2	30,3	1,12 (s)
13	21,4	21,5	1,14 (d, 6,5)
1'	104,7	103,9	4,48 (d, 7,5)
2'	75,2	75,5	3,62 (dd-like, 7,5, 9,0)
3'	77,9	78,0	3,42 (m)
4'	71,6	71,7	3,35 (m)
5'	77,8	77,9	3,33 (m)
6'	62,7	62,9	3,71 (m) 3,91 (dd, 2,0, 12,0)

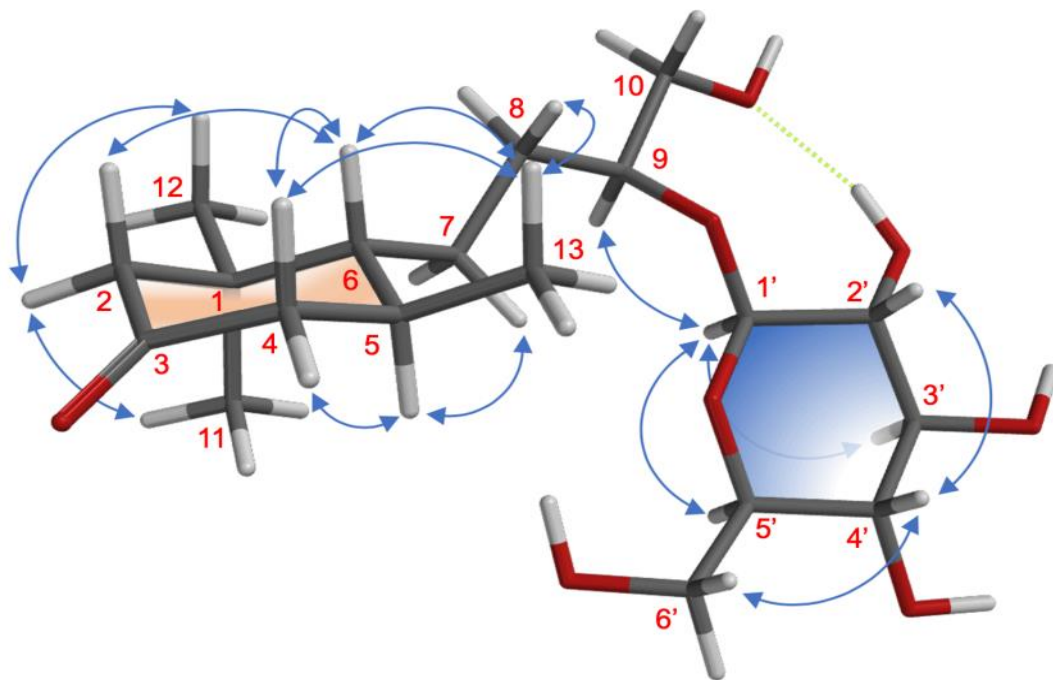
^a đo trong CD_3OD , ^b đo tại 125 MHz, ^c đo tại 500 MHz.



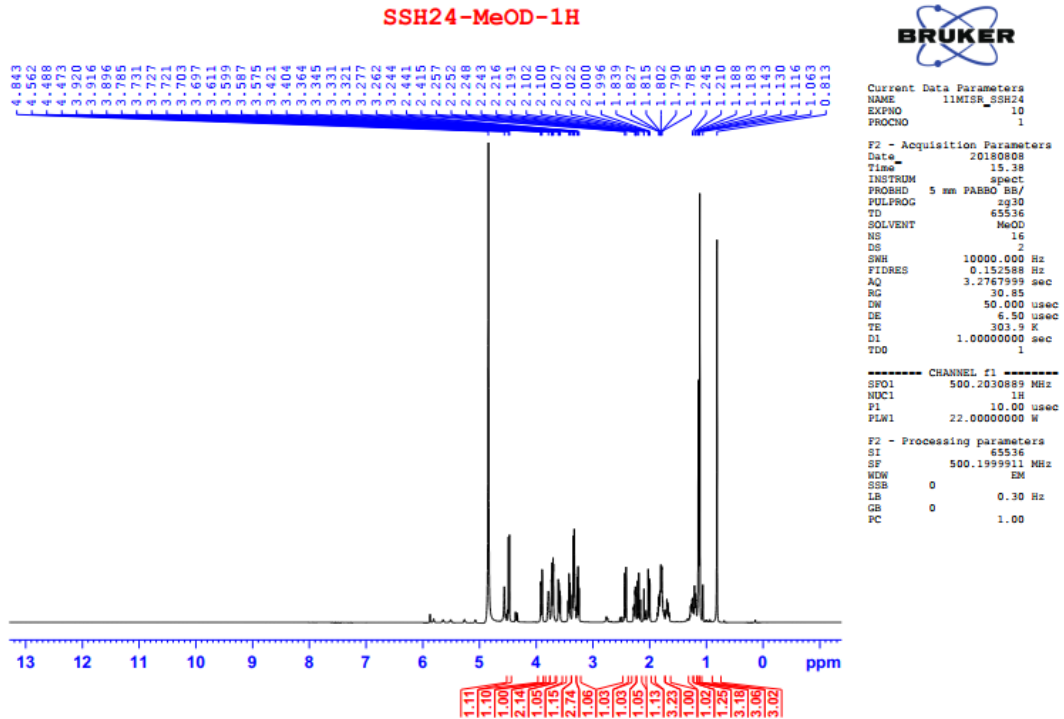
Hình 3.23. Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC chính của SSH24.



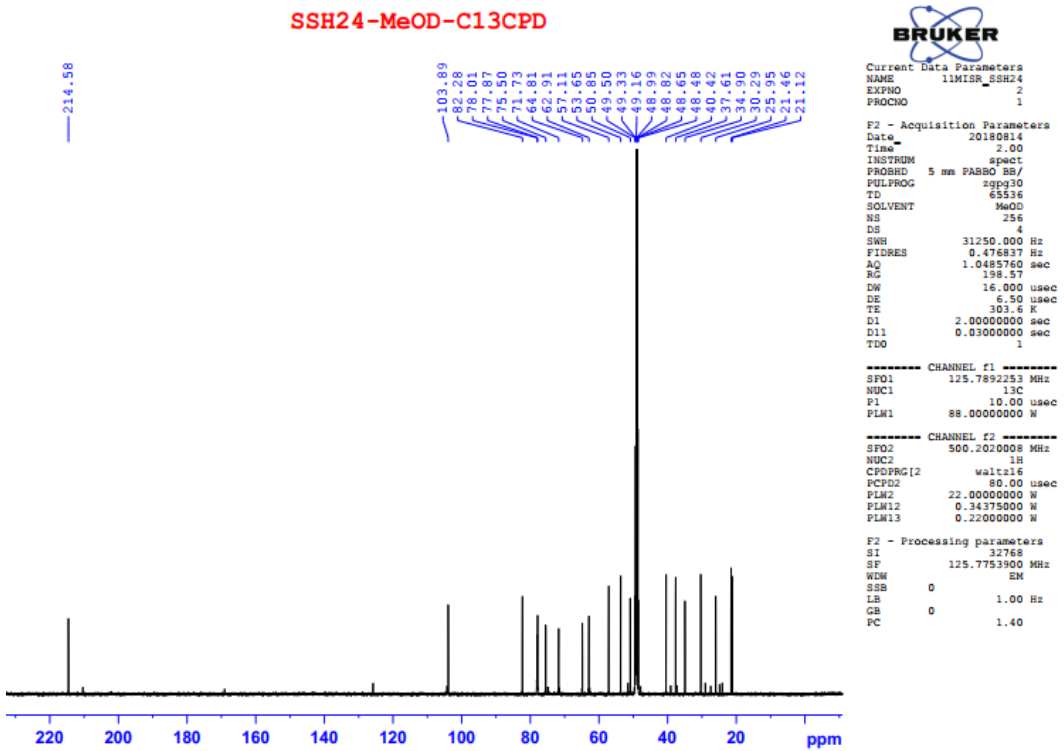
Hình 3.24. Cấu trúc hóa học và các tương tác COSY, HMQC (đường xanh đậm), các tương tác HMBC chính (đường màu đỏ) của SSH24.



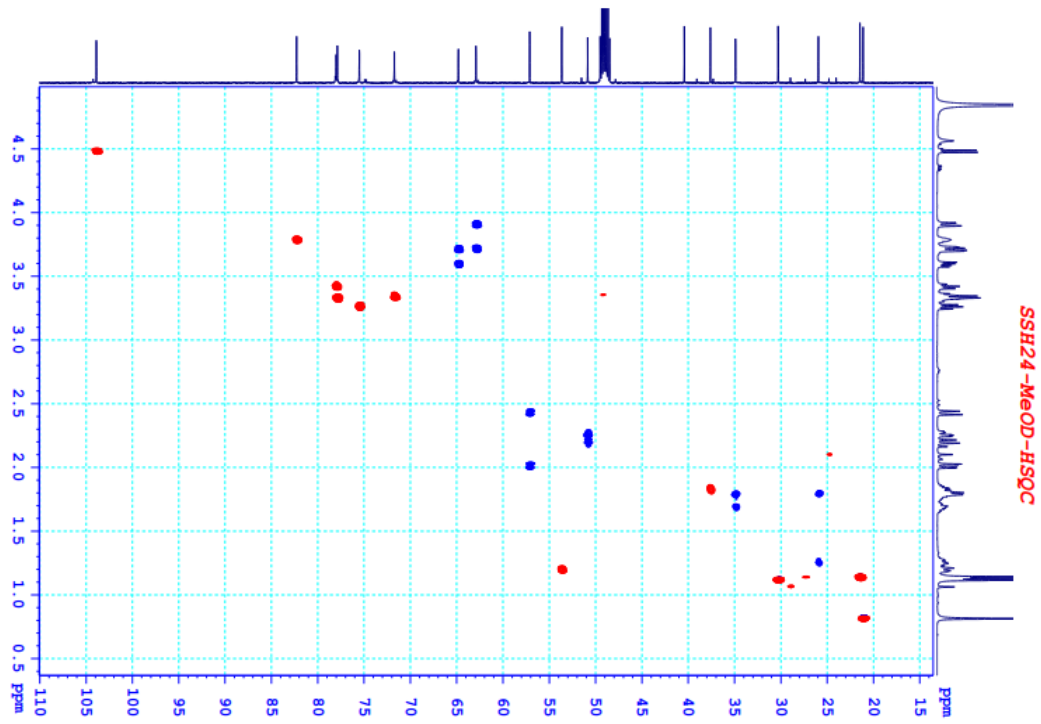
Hình 3.25. Tương tác NOESY của hợp chất SSH24



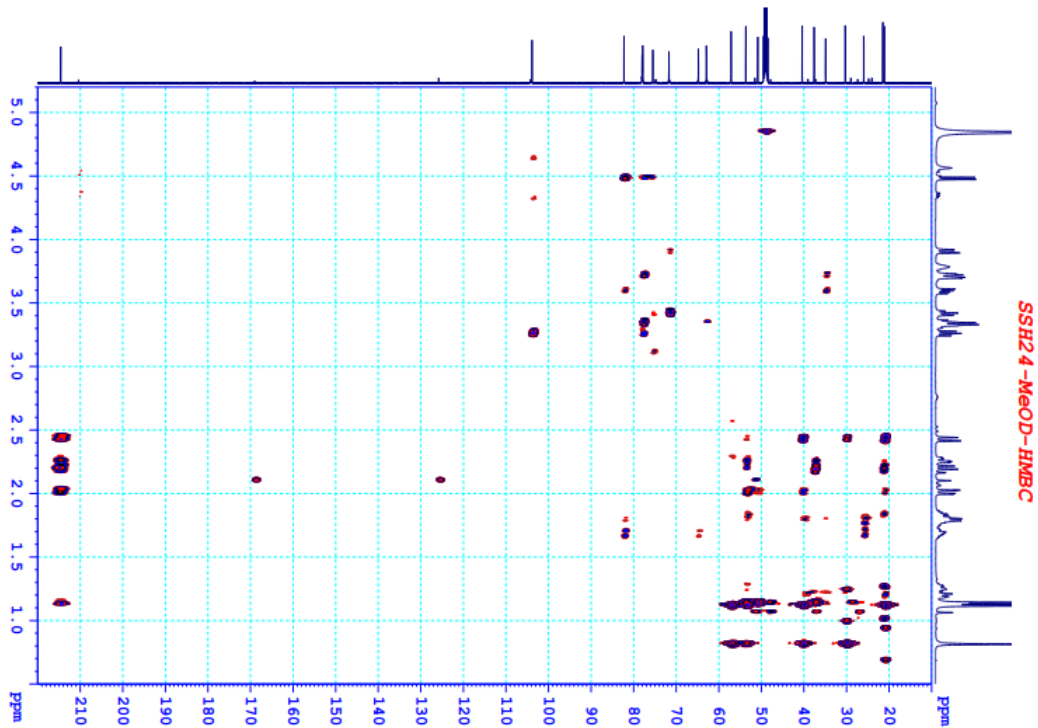
Hình 3.26. Phổ ^1H -NMR của hợp chất SSH24



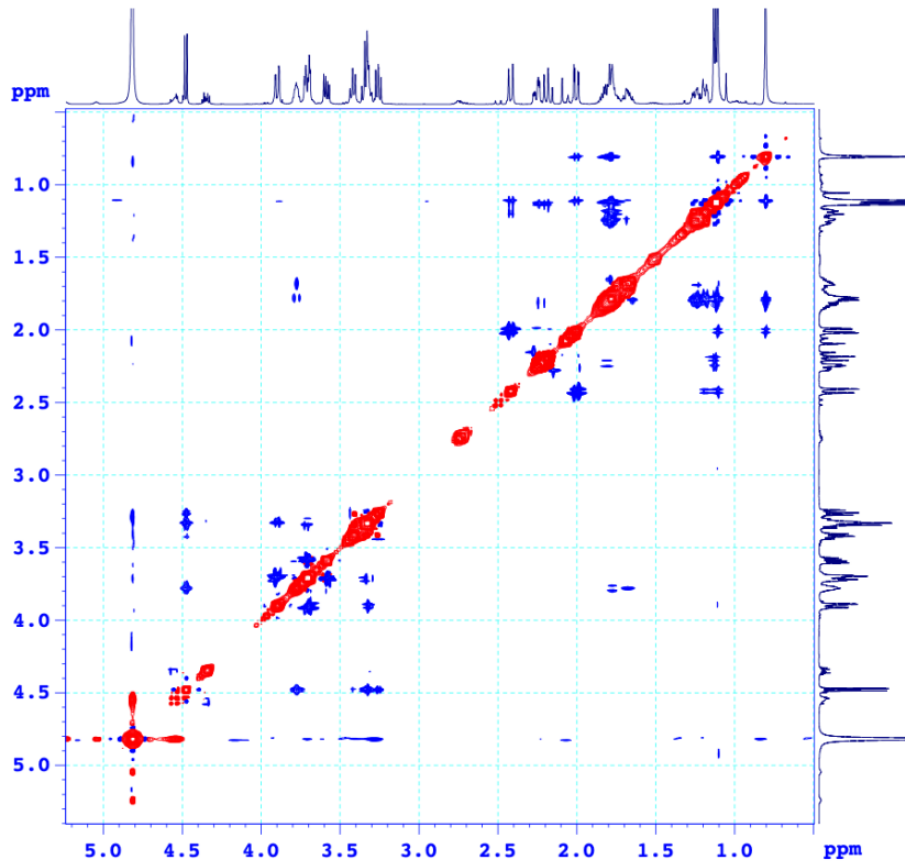
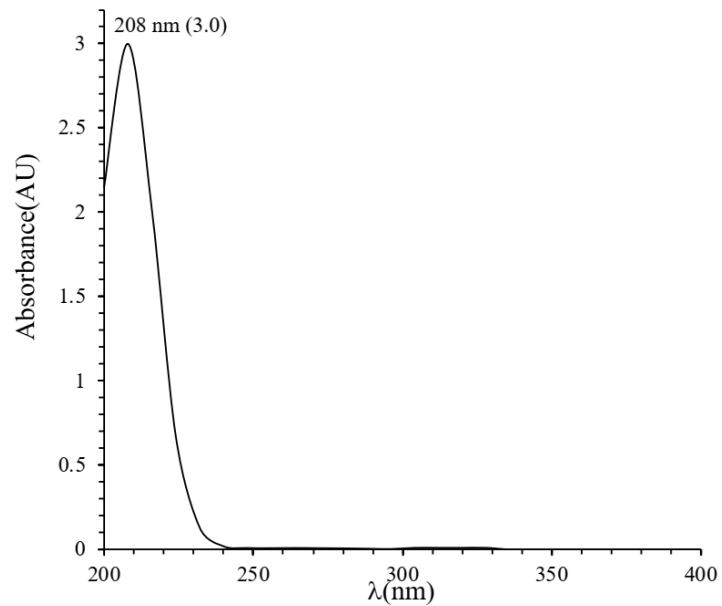
Hình 3.27. Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất SSH24

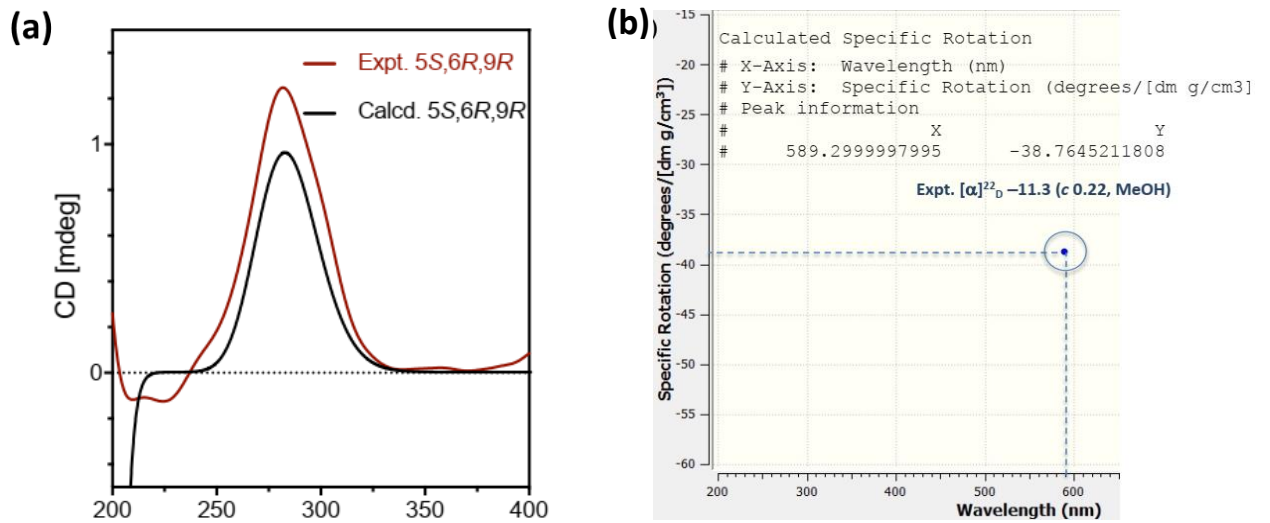


Hình 3.28. Phổ HSQC của hợp chất SSH24

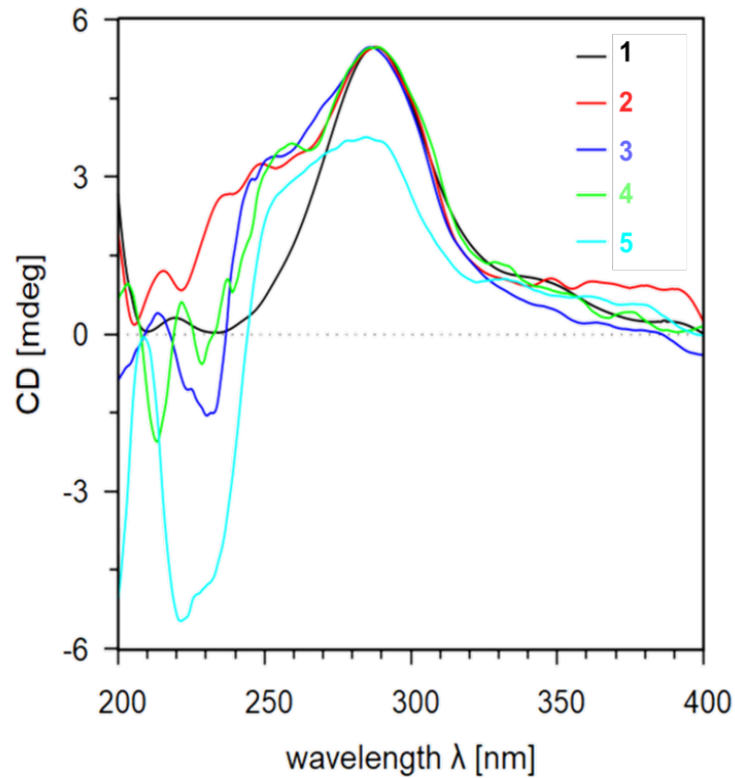


Hình 3.29. Phổ HMBC của hợp chất SSH24

SHS24-*HeOD*-NOESY**Hình 3.30. Phổ NOESY của SSH24****Hình 3.31. Phổ UV của SSH24**



Hình 3.32. (a) Phổ ECD thực nghiệm và tính toán và (b) chuyển động quay riêng của SSH24



Hình 3.33. Phổ ECD thực nghiệm (SSH24-đường -1, màu đen)

- Hợp chất SSH25: Lariciresinol-9-*O*- β -D-glucopyranosid (C₂₆H₃₄O₁₁; M: 522).

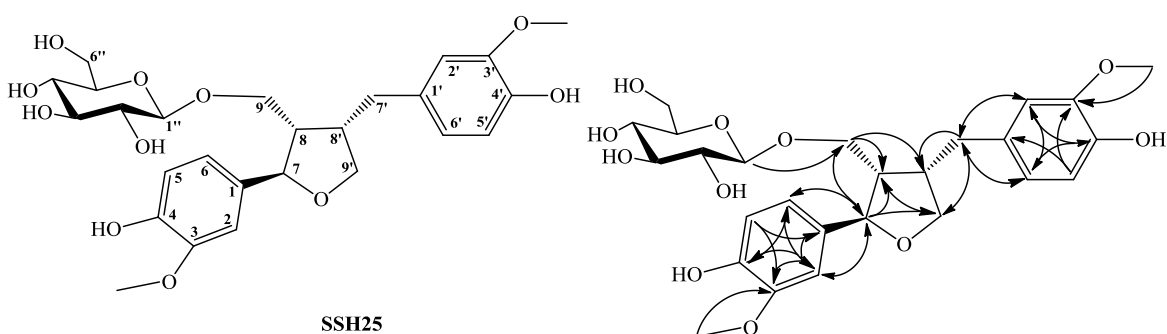
Hợp chất **SSH25** thu được dưới dạng chất bột, màu trắng. Trên phổ ¹H-NMR của **SSH25** xuất hiện tín hiệu của sáu proton thơm thuộc hai hệ tương tác spin-spin ABX tại δ_{H} 6,68 (1H, dd, $J = 2,0, 8,0$ Hz), 6,73 (1H, d, $J = 8,0$ Hz), 6,78 (1H, d, $J = 8,0$ Hz), 6,82 (1H, brdd, $J = 2,0, 6,5$ Hz), 6,83 (1H, d, $J = 2,0$ Hz), 6,95 (1H, d, $J = 2,0$ Hz), bốn proton thuộc hai nhóm oxymethylen tại δ_{H} 3,75 (2H, dd, $J = 6,5, 8,0$ Hz), 4,01 (1H, dd, $J = 6,5, 8,0$ Hz), 4,07 (1H, dd, $J = 6,5, 9,5$ Hz), sáu proton thuộc hai nhóm methoxy tại δ_{H} 3,85 (6H, s) và một proton anomer tại δ_{H} 4,32 (1H, d, $J = 8,0$ Hz). Trên phổ ¹³C-NMR và HSQC của **SSH25** quan sát thấy tín hiệu của 26 carbon gồm: sáu carbon không liên kết với hydro, 14 nhóm methin, bốn nhóm methylen và hai nhóm methoxy (bảng 3.18). Số liệu phổ NMR của **SSH25** gợi ý đây là một lignan glycosid với phần khung có chứa nhân furan. Phần đường của hợp chất này được xác định là β -glucopyranosyl dựa vào giá trị độ dịch chuyển hóa học của các carbon thuộc phần đường (104,8, 75,2, 78,2, 71,7, 78,0, 62,8) và hằng số tương tác của proton anomer ($J_{\text{H-1}''\text{-H-2}''} = 8,0$ Hz). Vị trí của 2 nhóm methoxy tại C-3, C-3' và phần đường tại C-9 lần lượt được xác định dựa vào tương tác giữa các proton thuộc hai nhóm methoxy (δ_{H} 3,85) với C-3 (δ_{C} 149,0)/C-3' (δ_{C} 149,0) và tương tác giữa proton anomer H-1'' (δ_{H} 4,32) với C-9 (δ_{C} 68,5). Từ những phân tích trên và tham khảo số liệu phổ của lariciresinol-9-*O*- β -D-glucopyranosid [28], hợp chất **SSH25** được xác định là lariciresinol-9-*O*- β -D-glucopyranosid.

Bảng 3.18. Số liệu phổ NMR của hợp chất SSH25 và hợp chất tham khảo

C	$\delta_{\text{C}}^{\#}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,c}}$ (mult., J in Hz)
1	134,4	135,6	-
2	109,6	110,9	6,95 (d, 2,0)
3	147,8	149,0	-
4	144,6	147,0	-
5	114,8	116,0	6,78 (d, 8,0)
6	118,6	119,8	6,82 (brdd, 2,0, 6,5)
7	83,00	84,2	4,85*
8	50,5	51,7	2,52 (m)

9	67,3	68,5	3,79 (dd, 7,5, 9,5) 4,07 (dd, 6,5, 9,5)
1'	132,5	133,7	-
2'	112,3	113,6	6,83 (d, 2,0)
3'	147,8	149,0	-
4'	144,6	145,8	-
5'	114,9	116,8	6,73 (d, 8,0)
6'	121,1	122,3	6,68 (dd, 2,0, 8,0)
7'	32,7	33,9	2,54 (m) 2,97 (dd, 5,0, 18,5)
8'	42,7	43,9	2,79 (m)
9'	72,4	73,6	3,75 (dd, 6,5, 8,0) 4,01 (dd, 6,5, 8,0)
1''	103,6	104,8	4,32 (d, 8,0)
2''	74,00	75,2	3,24 (dd, 8,0, 9,0)
3''	76,8	78,2	3,39 (dd, 8,5, 9,0)
4''	70,5	71,7	3,32 (m)
5''	76,9	78,0	3,30 (m)
6''	61,5	62,8	3,71 (dd, 5,0, 12,0) 3,88*
3-OCH ₃	55,2	56,5	3,85 (s)
3'-OCH ₃	55,2	56,5	3,85 (s)

^a đo trong MeOD, ^b đo tại 125 MHz, ^c đo tại 500 MHz, * Tín hiệu bị che lấp, # δ_c của hợp chất lariciresinol-9-O- β -D-glucopyranosid [28].



Hình 3.34. Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC chính của SSH25

- Hợp chất SSH29: 3,4-dimethoxybenzyl alcohol (C₉H₁₂O₃; M: 168).

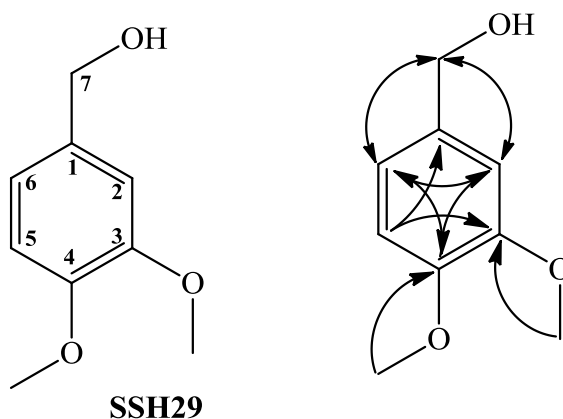
Hợp chất **SSH29** thu được dưới dạng dầu, không màu. Trên phổ ¹H-NMR của **SSH29** xuất hiện tín hiệu của ba proton thơm tại δ_H 6,91 (1H, d, $J = 8,0$ Hz),

6,93 (1H, d, $J = 8,0$ Hz), 7,40 (1H, s), hai proton của một nhóm oxymethylen tại δ_{H} 4,55 (2H, s) và sáu proton thuộc hai nhóm methoxy tại δ_{H} 3,84 (3H, s), 3,86 (3H, s). Trên phổ ^{13}C -NMR và HSQC của **SSH29** quan sát thấy tín hiệu của chín carbon gồm: ba carbon không liên kết với hydro tại δ_{C} 135,7, 149,9, 150,5; ba nhóm methin tại δ_{C} 112,4, 113,0, 120,8; một nhóm oxymethylen tại δ_{C} 65,1 và hai nhóm methoxy tại δ_{C} 56,4, 56,6. Giá trị độ dịch chuyển hóa học của các vị trí thuộc vòng thơm được xác định dựa vào tương tác HMBC giữa H-2 (δ_{H} 7,40)/H-6 (δ_{H} 6,91) với C-4 (δ_{C} 149,9) và H-5 (δ_{H} 6,93) với C-1 (δ_{C} 135,7)/ C-3 (δ_{C} 150,5). Tương tác HMBC giữa H-2 (δ_{H} 7,40)/H-6 (δ_{H} 6,91) với C-7 (δ_{C} 65,1) và giá trị độ dịch chuyển hóa học của C-7 xác định vị trí của nhóm oxymethylen tại C-1. Vị trí của hai nhóm methoxy tại C-3 và C4 lần lượt được xác định dựa vào các tương tác giữa các proton của nhóm methoxy thứ nhất (δ_{H} 3,86) với C-3 (δ_{C} 150,5) và nhóm methoxy thứ hai (δ_{H} 3,84) với C-4 (δ_{C} 149,9). Từ những phân tích trên hợp chất **SSH29** được xác định là 3,4-dimethoxybenzyl alcohol. [50]

Bảng 3.19. Số liệu phổ NMR của hợp chất SSH29 và hợp chất tham khảo

C	$\delta_{\text{C}}^{\#}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,c}}$ (mult., J in Hz)
1	135,6	135,7	-
2	112,8	112,4	7,40 (s)
3	150,5	150,5	-
4	149,8	149,9	-
5	112,2	113,0	6,93 (d, 8,0)
6	120,7	120,8	6,91 (d, 8,0)
7	65,1	65,1	4,55 (s)
3-OCH3	56,4*	56,4	3,86 (s)
4-OCH3	56,5*	56,6	3,84 (s)

^a đo trong MeOD, ^b đo tại 125 MHz, ^c đo tại 500 MHz, * Vị trí có thể được hoán đổi, [#] δ_{C} của hợp chất 3,4-dimethoxybenzyl alcohol[50].



Hình 3.35. Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC chính của SSH29

3.3. Kết quả nghiên cứu về độc tính và tác dụng sinh học

3.3.1. Kết quả nghiên cứu độc tính cấp

Đã tiến hành pha mẫu và cho 5 lô chuột uống như sau

- Lô chuột 1: chuột được cho uống với liều tương đương 20,0 g cao TP/kgTT, chuột không có biểu hiện bất thường nào sau khi uống mẫu, vận động bình thường. Sau 72 giờ theo dõi không có chuột nào chết, tất cả chuột của lô thí nghiệm đều sống, khỏe mạnh.

- Lô chuột 2: chuột được cho uống với liều 25,0 g cao TP/kgTT, uống một lần duy nhất. Sau khi uống đa số chuột vẫn hoạt động bình thường, sau khoảng 30 phút thì có 04 chuột có biểu hiện chậm chạp, thờ dốt, co giật và chết sau khoảng 1giờ, 1 chuột chết sau khoảng 10 giờ. Mô bụng chuột chết không phát hiện được sự bất thường về tim, gan, thận, dạ dày chứa đầy mẫu thử màu đen. Sau 72 giờ theo dõi, có tất cả 4 chuột chết, số chuột sống sót đều khỏe mạnh. Theo dõi thêm 1 tuần, các chuột sống sót vẫn bình thường.

- Lô chuột 3: chuột được cho uống với liều tương đương 28,0 g cao TP/kgTT. Sau khi uống khoảng 10-20 phút, nhiều chuột có biểu hiện ít vận động, có 5 chuột chết sau khi uống khoảng 15-30 phút, sau 3-5 giờ có thêm 4 chuột chết. Mô bụng chuột chết không phát hiện được sự bất thường về tim, gan, thận. Sau 72 giờ theo dõi, có 9 chuột chết, 1 chuột sống sót khỏe mạnh. Theo dõi thêm 1 tuần, chuột sống sót vẫn bình thường.

- Lô chuột 4: chuột được cho uống với liều tương đương 31,25 g cao TP/kgTT. Sau uống khoảng 5-10 phút, một số chuột có biểu hiện ít vận động, co giật và chết, 2 chuột chết sau khoảng 10-15 phút, 5 chuột chết sau 20-40 phút, 1 chuột chết sau 70 phút và 1 chuột chết sau uống khoảng 10 giờ. Mổ bụng chuột chết không phát hiện được sự bất thường về tim, gan, thận, dạ dày chứa đầy mẩu thử màu đen. Sau 72 giờ theo dõi, có 9 chuột chết, 1 chuột sống sót khỏe mạnh. Theo dõi thêm 1 tuần, chuột sống sót vẫn bình thường.

- Lô chuột 5: chuột được cho uống với liều tương đương 35,0 g cao TP/kgTT. Sau khi uống tất cả chuột có biểu hiện ít vận động, co giật và chết hết trong vòng 10-20 phút. Mổ bụng chuột chết không phát hiện được sự bất thường về tim, gan, thận.

Liều uống, số chuột sống chết của cao chiết được trình bày trong bảng 3.20.

Bảng 3.20. Kết quả thử độc tính cấp của cao chiết TP Thủy bồn thảo.

Lô thí nghiệm	Liều uống (g TP /kg)	n	Số chuột chết / lô	D	z	d x z
1	20,00	10	0			
2	25,00	10	4	5,00	2	10
3	28,00	10	9	3,00	6,5	19,5
4	31,25	10	9	3,25	9	29,25
5	35,00	10	10	3,75	9,5	35,625
$\Sigma (d \times z)$						94,375

Kết quả bảng 3.20 cho thấy LD₀ của cao toàn phần Thủy bồn thảo là 20,0g cao TP/kgTT, liều LD₁₀₀ là 35,0 g cao TP/kgTT. Tính toán được LD₅₀ = 25,56g cao TP/kgTT.

Theo cách tính toán liều an toàn, liều có tác dụng của cao chiết phải nhỏ hơn ít nhất 10 lần liều LD₅₀, hệ số này càng lớn thì cao chiết có độ an toàn càng cao. Liều dự kiến thử tác dụng của cao chiết thủy bồn thảo là 1,0 g cao chiết methanol TP/kgTT, (tương đương 22,5g dược liệu/kgTT), như vậy liều LD₅₀ gấp

khoảng 25,5 lần liều dự kiến nên cao chiết tương đối an toàn về mặt độc tính cấp khi thử liều dự kiến trên chuột nhắt.

3.3.2. Kết quả nghiên cứu độc tính bán trường diễn

- Ảnh hưởng của cao toàn phần Thủy bồn thảo lên tình trạng chung và cân nặng của động vật thí nghiệm

Ở các lô uống mẫu thử và lô chứng sinh lý hoạt động ăn uống, bài tiết của các chuột vẫn bình thường, không có sự khác biệt nào. Không có chuột nào chết.

Trọng lượng chuột ở tất cả các lô đều tăng lên so với ban đầu, sự tăng lên này giữa lô chứng và lô thử là như nhau, sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê, tuy nhiên có sự khác nhau có ý nghĩa thống kê của lần 3 so với lần 1 trong cùng một lô. Điều này cho thấy mẫu thử không có ảnh hưởng đến cân nặng chuột (bảng 3.21).

Bảng 3.21. Ảnh hưởng của cao TP Thủy bồn thảo lên trọng lượng chuột

Lô	Ngày 0	Ngày 15	Ngày 30
Sinh lý	218,1 ± 10,4	226,5 ± 9,8	248,2 ± 13,4*
TBT (275 mg/kgTT)	228,9 ± 7,7	235,0 ± 8,2	247,8 ± 9,9*
TBT (825 mg/kgTT)	228,0 ± 4,7	238,9 ± 5,4	260,7 ± 11,0*

*: Trọng lượng khác nhau có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$ so với lần 1 trong cùng 1 lô.

- Kết quả theo dõi các chỉ số huyết học

Kết quả theo dõi các chỉ số huyết học của chuột trong quá trình nghiên cứu được trình bày trong bảng 3.22.

Bảng 3.22. Các chỉ số huyết học của các lô chuột thí nghiệm

Chỉ số	Lô thí nghiệm	Ngày 0	Ngày 15	Ngày 30
Bạch cầu ($10^3/mm^3$)	Sinh lý	8,6 ± 0,2	8,2 ± 0,3	8,8 ± 0,3
	TBT (275 mg/kgTT)	8,4 ± 0,3	7,9 ± 0,3	8,7 ± 0,4
	TBT (825 mg/kgTT)	687,1 ± 56,6	706,1 ± 48,5	674,1 ± 61,7
Hồng cầu ($10^6/mm^3$)	Sinh lý	691,6 ± 38,7	714,2 ± 46	693,9 ± 39,6
	TBT (275 mg/kgTT)	787,8 ± 42,2	750,8 ± 79,3	711,0 ± 95,4
	TBT (825 mg/kgTT)	14,1 ± 0,3	13,9 ± 0,4	15,1 ± 0,4
Tiểu cầu	Sinh lý	13,9 ± 0,3	14,2 ± 0,5	14,6 ± 0,4

$(10^3/mm^3)$	TBT (275 mg/kgTT)	$13,7 \pm 0,5$	$13,6 \pm 0,4$	$14,4 \pm 0,3$
	TBT (825 mg/kgTT)	$46,9 \pm 1,0$	$43,1 \pm 1,7$	$49,2 \pm 0,8$
Hemoglobin (g/dL)	Sinh lý	$46,2 \pm 0,9$	$43,9 \pm 1,4$	$47,2 \pm 1,1$
	TBT (275 mg/kgTT)	$45,3 \pm 1,4$	$41,5 \pm 2,2$	$47,9 \pm 1,1$
	TBT (825 mg/kgTT)	$76,9 \pm 4,4$	$81,1 \pm 3,6$	$77,6 \pm 3,8$
Hematocrit (%)	Sinh lý	$77,0 \pm 4,2$	$84,5 \pm 5,0$	$79,6 \pm 4,6$
	TBT (275 mg/kgTT)	$74,8 \pm 4,7$	$73,6 \pm 6,2$	$81,1 \pm 4,1$
	TBT (825 mg/kgTT)	$8,8 \pm 0,7$	$9,5 \pm 0,6$	$9,0 \pm 0,7$
Lympho bào ($10^3/mm^3$)	Sinh lý	$8,7 \pm 0,6$	$9,4 \pm 0,6$	$9,4 \pm 0,7$
	TBT (275 mg/kgTT)	$7,3 \pm 0,7$	$8,5 \pm 1,0$	$9,1 \pm 0,5$
	TBT (825 mg/kgTT)	$8,6 \pm 0,2$	$8,2 \pm 0,3$	$8,8 \pm 0,3$
Lympho bào (%)	Sinh lý	$8,4 \pm 0,3$	$7,9 \pm 0,3$	$8,7 \pm 0,4$
	TBT (275 mg/kgTT)	$687,1 \pm 56,6$	$706,1 \pm 48,5$	$674,1 \pm 61,7$
	TBT (825 mg/kgTT)	$691,6 \pm 38,7$	$714,2 \pm 46,0$	$693,9 \pm 39,6$

Ghi chú: *p* (chứng-thử) ở tất cả các lô đều $> 0,05$, *p* (trước-sau) ở tất cả các lô $> 0,05$.

Kết quả bảng 3.22 cho thấy, sau 15 ngày, 30 ngày uống cao TBT tất cả các xét nghiệm đánh giá như số lượng hồng cầu, số lượng bạch cầu, số lượng tiểu cầu, nồng độ hemoglobin, giá trị hematocrit, % lympho bào ở cả 3 lô đều không ghi nhận có sự khác biệt đạt ý nghĩa thống kê khi so sánh ở các thời điểm 15/30 ngày sau uống cao chiết so với thời điểm trước thử nghiệm (ngày 0) ($p > 0,05$).

- *Kết quả theo dõi các chỉ số thuộc chức năng gan*

Các chỉ số hóa sinh gan của các lô chuột sau 3 lần xét nghiệm được trình bày trong bảng 3.23.

Bảng 3.23. Các chỉ số sinh hóa thuộc chức năng gan của các lô thí nghiệm.

Chỉ số	Lô thí nghiệm	Ngày 0	Ngày 15	Ngày 30
ALT (U/L)	Sinh lý	$66,9 \pm 3,7$	$79,6 \pm 4,6$	$70,6 \pm 4,2$
	TBT (275 mg/kgTT)	$73,9 \pm 2,7$	$72,9 \pm 3,6$	$67,4 \pm 2,6$
	TBT (825 mg/kgTT)	$64,7 \pm 3,3$	$73,0 \pm 6,0$	$62,0 \pm 5,5$
AST (U/L)	Sinh lý	$166,2 \pm 6,0$	$165,2 \pm 5,7$	$166,1 \pm 6,0$
	TBT (275 mg/kgTT)	$167,3 \pm 5,4$	$160,1 \pm 8,2$	$163,7 \pm 4,0$
	TBT (825 mg/kgTT)	$164,0 \pm 5,5$	$167,9 \pm 5,6$	$162,7 \pm 7,2$
Protein	Sinh lý	$76,2 \pm 3,4$	$80,5 \pm 2,5$	$78,1 \pm 1,6$

tp (g/L)	TBT (275 mg/kgTT)	75,3 ± 2,8	80,4 ± 1,8	78,1 ± 1,7
	TBT (825 mg/kgTT)	76,5 ± 2,9	79,6 ± 3,3	74,4 ± 1,5
Bilirubin ($\mu\text{mol/L}$)	Sinh lý	16,1 ± 1,4	16,1 ± 1,8	19,4 ± 1,9
	TBT (275 mg/kgTT)	15,9 ± 1,4	16,3 ± 1,0	18,7 ± 1,2
	TBT (825 mg/kgTT)	16,0 ± 1,9	18,8 ± 1,5	19,5 ± 0,9

Ghi chú: p (chứng-thử) ở tất cả các lô đều $> 0,05$, p (trước-sau) ở tất cả các lô $> 0,05$.

Kết quả từ bảng 3.23 cho thấy, sau 15 ngày, 30 ngày uống cao TBT tất cả các xét nghiệm đánh giá chức năng gan: nồng độ bilirubin, nồng độ protein, hoạt độ enzym AST và ALT huyết thanh ở cả 2 lô uống đều không ghi nhận có sự khác biệt đạt ý nghĩa thống kê so sánh ở các thời điểm 15/30 ngày sau khi uống cao chiết toàn phần TBT so với thời điểm trước thử nghiệm (ngày 0) ($p > 0,05$).

- Kết quả theo dõi các chỉ số thuộc chức năng thận

Các chỉ số hóa sinh thận của các lô chuột sau 3 lần xét nghiệm được trình bày trong bảng 3.24.

Bảng 3.24. Các chỉ số sinh hóa thuộc chức năng thận của các lô thí nghiệm.

Chỉ số	Lô thí nghiệm	Ngày 0	Ngày 15	Ngày 30
Creatinin ($\mu\text{mol/L}$)	Sinh lý	78,3 ± 5,3	82,0 ± 3,3	72,0 ± 4,5
	TBT (275 mg/kgTT)	79,2 ± 3,9	85,4 ± 2,6	73,9 ± 6,2
	TBT (825 mg/kgTT)	76,1 ± 2,7	80,0 ± 2,0	69,9 ± 5,6
Ure (mg/dL)	Sinh lý	5,0 ± 0,3	5,7 ± 0,4	5,0 ± 0,6
	TBT (275 mg/kgTT)	5,5 ± 0,3	5,5 ± 0,3	5,2 ± 0,6
	TBT (825 mg/kgTT)	5,6 ± 0,4	5,4 ± 0,4	5,6 ± 0,7

Ghi chú: p (chứng-thử) ở tất cả các lô đều $> 0,05$, p (trước-sau) ở tất cả các lô $> 0,05$.

Kết quả từ bảng 3.24. cho thấy, sau 15 ngày, 30 ngày uống mẫu thử 2 xét nghiệm đánh giá chức năng thận là nồng độ ure và nồng độ creatinin huyết thanh ở cả 2 lô uống cao toàn phần TBT không đều không ghi nhận có sự khác biệt đạt

ý nghĩa thống kê khi so sánh ở các thời điểm 15/30 ngày sau uống cao chiết toàn phần TBT so với thời điểm trước thử nghiệm (ngày 0) ($p > 0,05$).

- *Ảnh hưởng của cao chiết Thủy bồn thảo lên xét nghiệm mô học*

Sau khi cho chuột uống mẫu thử 30 ngày, mỗi lô lấy ngẫu nhiên 3 chuột mổ để quan sát đại thể các cơ quan và kiểm tra cấu trúc vi thể gan và thận. Kết quả như sau:

Về đại thể các cơ quan, tất cả các chuột ở cả 3 lô được mổ để quan sát không thấy có thay đổi bệnh lý nào về mặt đại thể của các cơ quan tim, phổi, gan lách, thận và hệ thống tiêu hóa. Không có sự khác nhau về trọng lượng của gan, thận, tim giữa các lô uống mẫu so với lô chứng sinh lý (trọng lượng của các cơ quan được trình bày trong bảng 3.25)

Bảng 3.25. Trọng lượng các cơ quan chuột sau 30 ngày uống mẫu (n=10)

Lô thí nghiệm	Gan (g/100 g chuột)	Thận (g/100 g chuột)	Tim (g/100 g chuột)
Chứng	3,20 ± 0,21	0,63 ± 0,03	0,36 ± 0,02
TBT (225 mg/kgTT)	2,99 ± 0,16	0,58 ± 0,02	0,32 ± 0,01
TBT (825 mg/kgTT)	3,50 ± 0,19	0,64 ± 0,03	0,33 ± 0,02

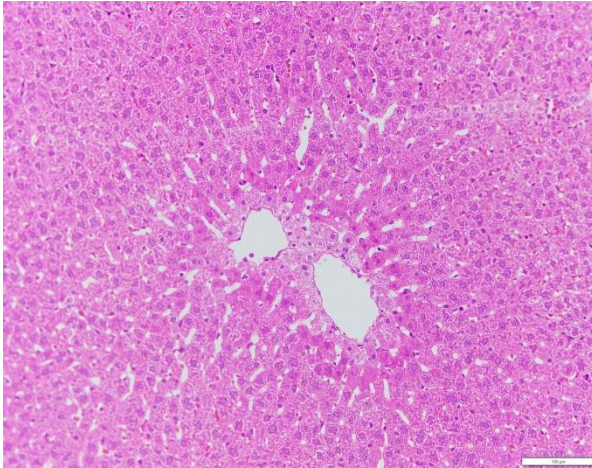
+ *Hình thái vi thể của gan:*

- Lô chứng: tế bào gan có kích thước đều, không có thoái hóa hoặc các ổ hoại tử, khoảng cửa không viêm.
- Lô uống cao TBT liều 275 mg/kgTT: sau 30 ngày uống mẫu thử, các tế bào gan bình thường, có kích thước đều, không có thoái hóa, hoại tử, khoảng cửa không viêm.
- Lô uống cao TBT liều 825 mg /kgTT: sau 30 ngày uống mẫu thử, các tế bào gan bình thường, có kích thước đều, không có thoái hóa, hoại tử, khoảng cửa không viêm.

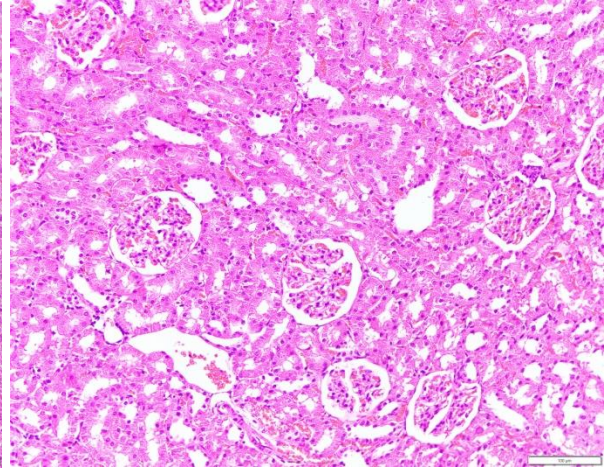
+ *Hình ảnh vi thể thận:*

- Lô chứng: cầu thận kích thước đều, không xơ hóa, ống thận không tổn thương, mô kẽ không viêm, không xung huyết.

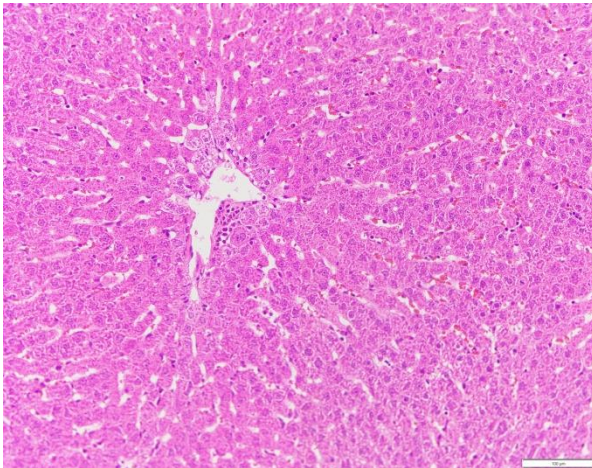
- Lô uống cao TBT liều 275 mg/kgTT: sau 30 ngày uống, cầu thận kích thước đều, mô kẽ không viêm, ống thận không có tổn thương, không xung huyết.
- Lô uống cao TBT liều 825 mg/kgTT: sau 30 ngày uống, cầu thận kích thước đều, mô kẽ không viêm, ống thận không có tổn thương, không xung huyết.



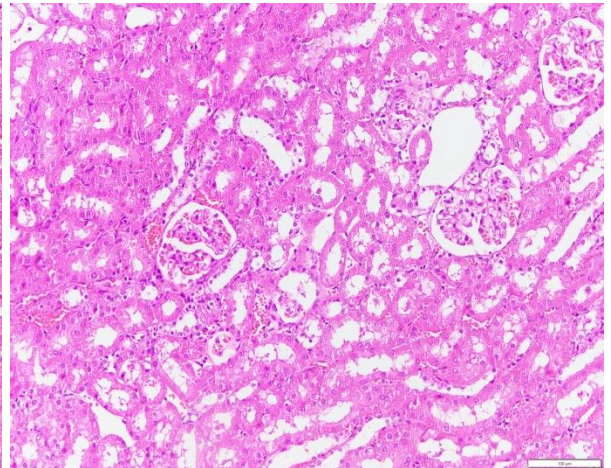
Hình ảnh tế bào gan chuột lô 1 sau 30 ngày thí nghiệm (HE.20x)



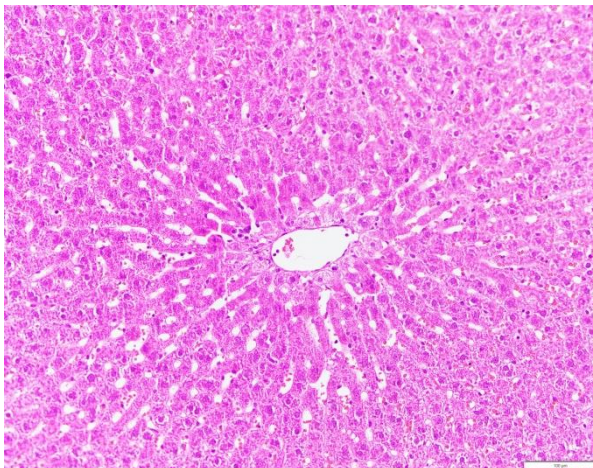
Hình ảnh tế bào thận chuột lô 1 sau 30 ngày thí nghiệm (HE.20x)



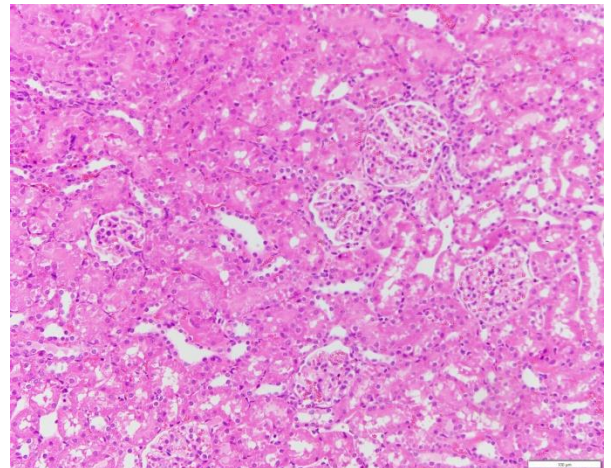
Hình ảnh tế bào gan chuột lô 2 sau 30 ngày thí nghiệm (HE.20x)



Hình ảnh tế bào thận chuột lô 2 sau 30 ngày thí nghiệm (HE.20x)



C. Hình ảnh tế bào gan chuột lô 3 sau 30 ngày thí nghiệm (HE.20x)



F. Hình ảnh tế bào thận chuột lô 3 sau 30 ngày thí nghiệm (HE.20x)

Hình 3.36. Hình ảnh tế bào gan và thận chuột

Như vậy, kết quả xét nghiệm mô học cho thấy không có sự khác biệt trong hình ảnh vi thể gan và thận giữa chuột uống mẫu nghiên cứu liều thấp, liều cao và lô chuột sinh lý sau 30 ngày uống mẫu nghiên cứu.

3.3.3. Kết quả nghiên cứu tác dụng bảo vệ gan của Thuỷ bồn thảo

- Tác dụng bảo vệ gan của cao toàn phần Thuỷ bồn thảo trên mô hình tổn thương gan cấp bằng paracetamol

Đã nghiên cứu tác dụng bảo vệ gan của cao toàn phần TBT với 2 mức liều 0,5 g và 1,0 g cao TP/kgTT chuột.

✓ Ảnh hưởng của cao chiết đến trọng lượng gan chuột

Ảnh hưởng của cao chiết TBT lên trọng lượng gan chuột bị tổn thương gây bởi paracetamol được thể hiện trong bảng 3.26.

Bảng 3.26. Ảnh hưởng của cao chiết TBT lên trọng lượng gan của chuột bị tổn thương gan cấp tính gây bởi paracetamol

Lô thí nghiệm	n	Trọng lượng gan (mg/100 g chuột)	% giảm so chứng bệnh lý	p so với chứng bệnh lý	p so với chứng sinh lý
Chứng sinh lý	10	5,2 ± 0,3		< 0,05	
Chứng bệnh lý	11	6,1 ± 0,3			< 0,05
Silymarin (0,2 g/kgTT)	12	6,1 ± 0,2	0,2	> 0,05	< 0,05
TBT (0,5 g/kgTT)	11	6,3 ± 0,1	-2,9	> 0,05	< 0,05
TBT (1,0 g/kgTT)	12	6,0 ± 0,3	2,4	> 0,05	< 0,05

Kết quả bảng 3.26 cho thấy, paracetamol đã làm tăng trọng lượng gan chuột của tất cả các lô so với lô sinh lý ($p < 0,05$), các lô uống cao toàn phần TBT (liều 0,5 và 1,0 g/kgTT) và silymarin (0,2 g/kgTT) đều có trọng lượng gan tương tự lô bệnh lý. Như vậy TBT ở cả 2 mức liều thử nghiệm đều chưa có tác dụng ức chế việc tăng trọng lượng gan chuột gây bởi paracetamol.

✓ Ảnh hưởng của cao chiết đến hoạt độ enzym ALT và AST trong huyết thanh chuột bị tổn thương gan cấp tính gây bởi paracetamol:

Bảng 3.27. Ảnh hưởng của cao TBT đến hoạt độ enzym ALT trong huyết thanh chuột bị tổn thương gan cấp tính gây bởi paracetamol

Lô thí nghiệm	n	Hoạt độ ALT (U/L)	% giảm so chứng bệnh lý	p so với chứng bệnh lý	p so với chứng sinh lý
Chứng sinh lý	10	57,9 ± 4,5		< 0,001	
Chứng bệnh lý	11	1318,7 ± 161,2			< 0,001
TBT (0,5 g/kgTT)	11	692,7 ± 167,4	47,50	< 0,01	< 0,01
TBT (1,0 g/kgTT)	12	758,5 ± 191,1	42,50	< 0,05	< 0,01
Silymarin (0,2 g/kgTT)	12	331,7 ± 48,6	56,37	< 0,001	< 0,001

Kết quả bảng 3.27 cho thấy:

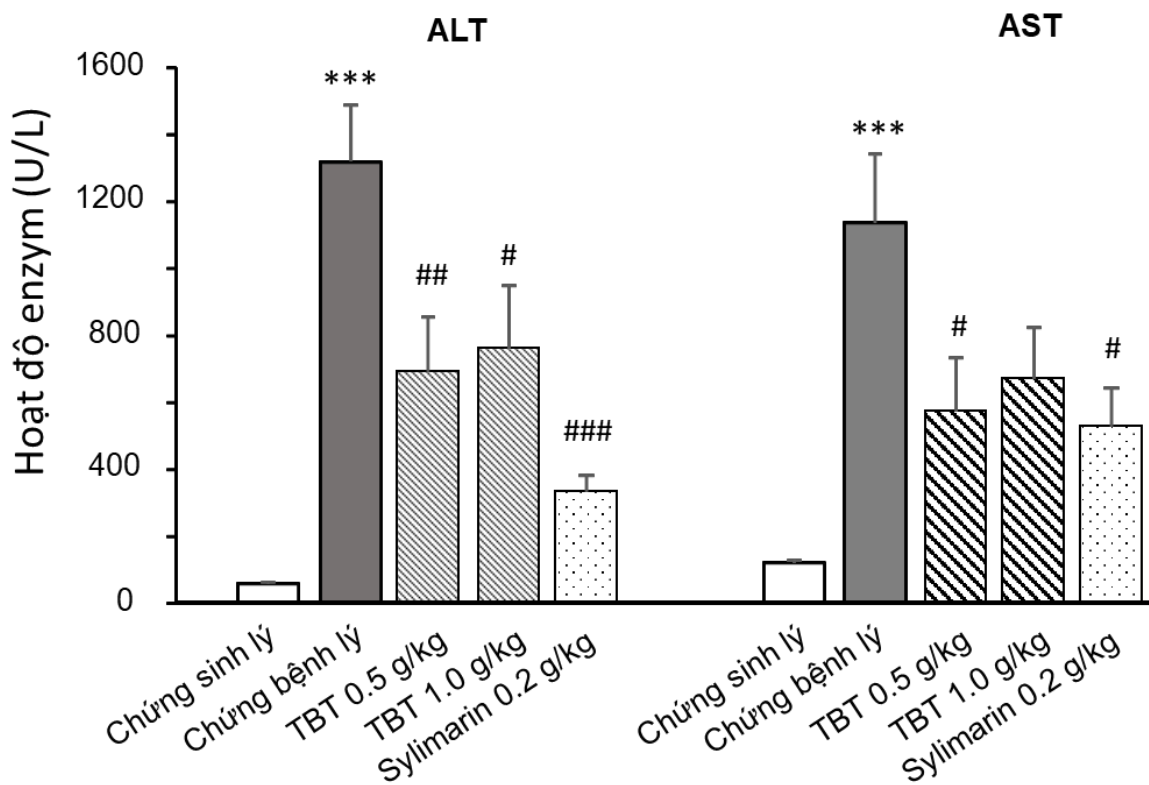
- Hoạt độ ALT ở lô chuột bệnh lý (chuột được uống paracetamol) tăng rõ rệt so với lô chứng sinh lý ($p < 0,001$).
- Hoạt độ ALT ở lô uống silymarin (0,2 g/kgTT) giảm rõ rệt so với chứng bệnh lý (56,37%; $p < 0,001$), nhưng vẫn còn tăng so với lô chứng sinh lý ($p < 0,01$ và $p < 0,001$).
- Hoạt độ ALT ở hai lô uống cao TBT (liều 0,5 g và 1,0 g /kgTT) giảm rõ rệt so với chứng bệnh lý (% giảm lần lượt là 47,5 và 42,5 %; giá trị $p < 0,01$ và $p < 0,05$), nhưng vẫn còn tăng so với lô chứng sinh lý ($p < 0,01$ và $p < 0,001$). Không có sự khác biệt về tỷ lệ % giảm hoạt độ enzym ALT giữa lô chuột uống cao TBT liều 0,5 g/kgTT so với lô chuột uống silymarin (0,2 g/kgTT); tuy nhiên tỷ lệ % giảm hoạt độ enzym này ở lô chuột uống cao TBT liều 1,0 g/kgTT thấp hơn đáng kể ($p < 0,05$) so với lô chuột uống silymarin.

Bảng 3.28. Ảnh hưởng của cao chiết TBT đến hoạt độ enzym AST trong huyết thanh chuột bị tổn thương gan cấp gây bởi paracetamol

Lô thí nghiệm	n	Hoạt độ AST (U/L)	% giảm so chứng bệnh lý	p so với chứng bệnh lý	p so với chứng sinh lý
Chứng sinh lý	10	118,3 ± 7,1		< 0,001	

Chứng bệnh lý	11	1137,1 ± 203,5			< 0,001
TBT (0,5 g/kgTT)	11	572,6 ± 159,1	49,6	< 0,05	< 0,05
TBT (1,0 g/kgTT)	12	667,8 ± 152,4	41,3	> 0,05	< 0,01
Silymarin (0,2 g/kg)	12	526,7 ± 115,8	53,7	< 0,05	< 0,01

Kết quả bảng 3.28 cho thấy, paracetamol đã làm tăng hoạt độ AST của tất cả các lô chuột thử nghiệm so với lô chứng sinh lý (với giá trị p được chỉ ra ở bảng 3.28). Lô uống mẫu TBT liều 0,5 g ức chế 49,6 % so với lô chứng bệnh lý, đạt ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$. Lô uống mẫu TBT liều 1,0 g mặc dù có xu hướng ức chế sự tăng AST 41,3 % so với chứng bệnh lý, tuy nhiên chưa đạt ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Silymarin cũng có tác dụng ức chế đáng kể sự tăng hoạt độ enzym AST gây bởi paracetamol trên chuột nhắt trắng ($p < 0,05$).



Hình 3.37. Ảnh hưởng của cao chiết TBT đến hoạt độ enzym ALT và AST trong huyết thanh chuột bị tổn thương gan cấp gây bởi paracetamol. (*) p**

<0,001 so với chứng trắng; # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,01$ so với chứng paracetamol. $n = 10-12$ chuột / nhóm).

Như vậy, cao chiết methanol toàn phần Thuỷ bồn thảo liều 0,5g/kgTT và 1,0g/kgTT thể trọng chuột có tác dụng bảo vệ gan trên mô hình tổn thương gan cấp gây bởi paracetamol, thể hiện thông qua khả năng làm giảm hoạt độ ALT (ở cả 2 mức liều) và AST (ở mức liều 0,5 g/kgTT).

- Tác dụng bảo vệ gan của cao chiết MeOH toàn phần Thuỷ bồn thảo trên mô hình tổn thương gan mạn bằng paracetamol

Đã nghiên cứu tác dụng bảo vệ gan của cao toàn phần TBT với 2 mức liều 0,5 g và 1,0g/kgTT trên mô hình chuột bị tổn thương gan mạn tính gây bởi paracetamol.

✓ Ảnh hưởng của cao chiết đến đại thể gan chuột:

Quan sát đại thể gan chuột (hình 3.39) cho thấy:

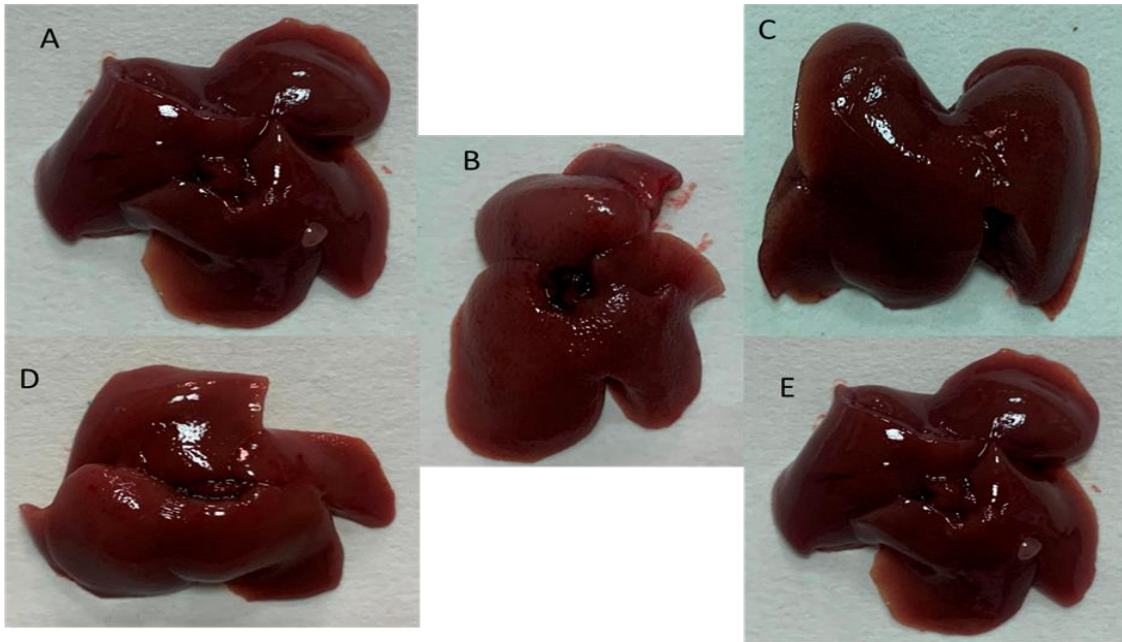
- Ở lô chứng sinh lý: gan mềm, mật độ đồng đều, đồng nhất, sẫm màu, không xuất huyết, bề mặt nhẵn bóng, hình dạng và kích thước bình thường

- Lô chứng bệnh lý: hầu hết các mẫu gan có màu nâu nhạt so với lô chứng sinh lý, kích thước gan tăng rõ rệt, gan to, xốp và không đồng nhất, bề mặt không bóng, sần.

- Lô uống cao TBT liều 0,5 g/kgTT: gan bị bạc màu nhẹ, kích thước tăng rõ rệt, gan to, xốp và không đồng nhất, độ bóng giảm tuy nhiên so với lô chứng bệnh lý thì mức độ giảm hơn.

- Lô uống cao TBT liều 1,0 g/kgTT: gan bị bạc màu nhẹ, gan to, bề mặt không nhẵn, ít bóng, so với lô chứng bệnh lý thì mức độ nhẹ hơn.

- Lô chứng dương Silymarin 0,2 g/kgTT: các mẫu gan vẫn có màu nâu nhạt so với lô chứng sinh lý, không đồng nhất, hình dạng và kích thước có thay đổi.



Hình 3.38. Ảnh đại thể gan của các lô chuột thí nghiệm

- A. Chứng sinh lý B. Chứng bệnh lý C. TBT 0,5 g/kgTT
D. TBT 1,0 g/kgTT E. Silymarin 0,2 g/kgTT

Ảnh hưởng của cao chiết toàn phần TBT lên trọng lượng gan chuột bị tổn thương gan mãn tính gây bởi paracetamol được thể hiện trong bảng 3.29.

Bảng 3.29. Ảnh hưởng của cao chiết TBT lên trọng lượng gan chuột bị tổn thương mạn tính gây bởi paracetamol

Lô Thí nghiệm	n	Trọng lượng gan (mg/100g chuột)	% giảm so chứng bệnh lý	p so với chứng bệnh lý	p so với chứng sinh lý
Chứng sinh lý	10	4,73 ± 0,3		< 0,01	
Chứng bệnh lý	13	6,74 ± 0,5			< 0,01
TBT 0,5 g/kgTT	12	6,67 ± 0,3	1,1	> 0,05	< 0,001
TBT 1,0 g/kgTT	11	6,85 ± 0,3	-1,6	> 0,05	< 0,001
Silymarin 0,2g/kgTT	13	6,46 ± 0,2	4,2	> 0,05	< 0,001

Kết quả bảng 3.29 cho thấy, paracetamol đã làm tăng trọng lượng gan chuột của tất cả các lô so với lô chứng sinh lý ($p < 0,05$), các lô uống mẫu thử và chứng dương đều có trọng lượng gan tương tự lô chứng bệnh lý. Như vậy mẫu thử chưa có tác dụng ức chế việc tăng trọng lượng gan chuột gây bởi

paracetamol.

- ✓ Ảnh hưởng của cao chiết đến hoạt độ các enzym ALT và AST trong huyết thanh chuột bị tổn thương gan mạn tính gây bởi paracetamol:

Bảng 3.30. Ảnh hưởng của cao chiết toàn phần TBT đến hoạt độ enzym ALT trong huyết thanh chuột bị tổn thương mạn tính gây bởi PAR

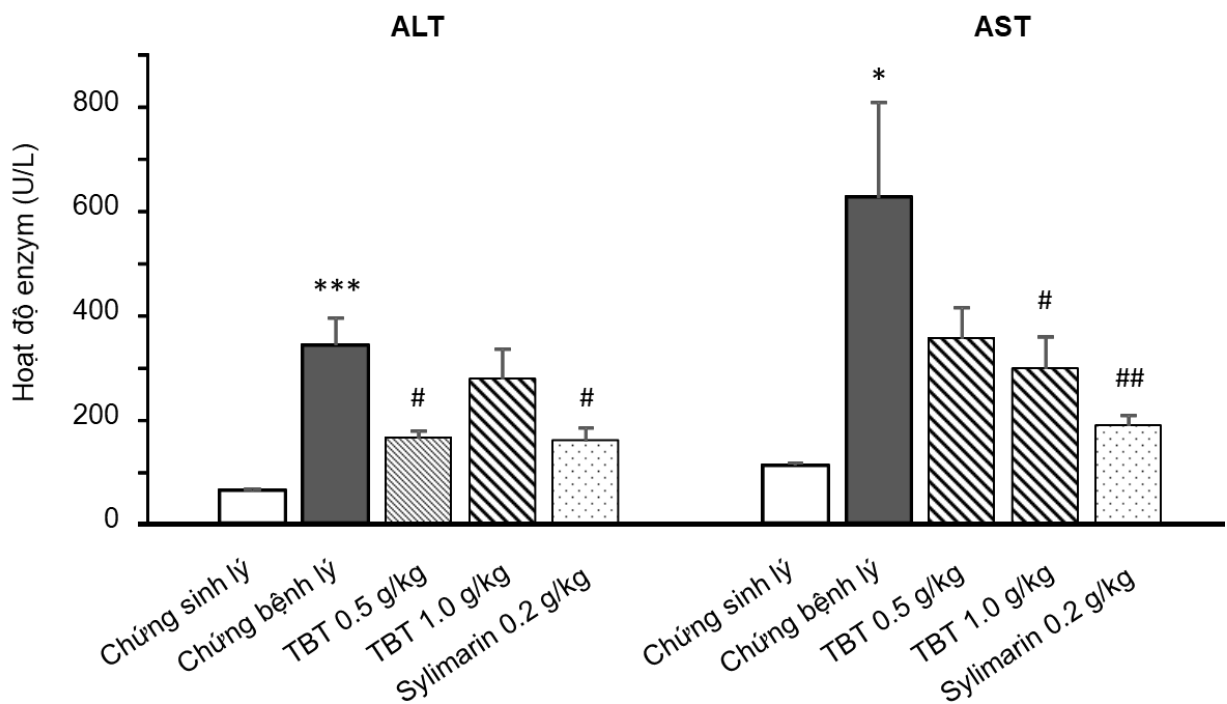
Lô thí nghiệm	n	Hoạt độ ALT (U/L)	% giảm so lô chứng bệnh lý	p so với lô chứng bệnh lý	p so với lô chứng sinh lý
Lô chứng sinh lý	10	61,8 ± 3,0		< 0,001	
Lô chứng bệnh lý	13	340,2 ± 56,5			< 0,001
TBT (0,5g/kgTT)	12	161,7 ± 12,9	52,5	< 0,05	< 0,001
TBT (1,0g/kgTT)	11	276,4 ± 54,8	18,7	> 0,05	< 0,01
Silymarin (0,2g/kgTT)	13	157,1 ± 23,8	53,8	< 0,05	< 0,01

Kết quả bảng 3.30 cho thấy, PAR đã làm tăng hoạt độ ALT của tất cả các lô so với lô chứng sinh lý ($p < 0,05$ hoặc 0,001), lô chuột uống mẫu cao toàn phần TBT liều 0,5 g/kgTT và lô chuột được uống silymarin liều 0,2 g/kgTT có tác dụng ức chế sự tăng hoạt độ ALT so với lô chứng bệnh lý đạt ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$ và % ức chế lần lượt là 52,5% và 53,8%. Mặc dù vậy, không có sự khác biệt đạt ý nghĩa thống kê giữa lô chuột được uống mẫu cao TBT liều 1,0 g/kgTT so với lô chứng bệnh lý.

Bảng 3.31. Ảnh hưởng của cao chiết toàn phần TBT đến hoạt độ enzym AST trong huyết thanh chuột bị tổn thương gan mạn tính gây bởi paracetamol

Lô thí nghiệm	n	Hoạt độ AST (U/L)	% giảm so lô chứng bệnh lý	p so với lô chứng bệnh lý	p so với lô chứng sinh lý
Lô chứng sinh lý	10	109,3 ± 4,8		< 0,05	
Lô chứng bệnh lý	13	624,1 ± 182,0			< 0,05
TBT (0,5g/kgTT)	12	352,2 ± 58,9	43,6	> 0,05	< 0,01
TBT (1,0g/kgTT)	11	295,5 ± 60,4	52,6	< 0,05	< 0,05
Silymarin (0,2g/kgTT)	13	184,8 ± 20,7	70,4	< 0,01	< 0,01

Kết quả bảng 3.31 cho thấy, paracetamol đã làm tăng hoạt độ AST của tất cả các lô so với lô chứng sinh lý ($p < 0,05$ hoặc $0,01$), lô chuột uống mẫu cao toàn phần TBT liều $1,0g$ và lô chuột được uống sylimarin liều $0,2 g/kgTT$ có tác dụng ức chế sự tăng hoạt độ AST so với chứng bệnh lý với % ức chế lần lượt là $52,5\%$ và $70,4\%$ ($p < 0,05$ và $p < 0,01$). Mặc dù lô chuột uống mẫu TBT liều $0,5 g/kgTT$ đã ức chế $43,6\%$ so với chứng bệnh lý nhưng chưa đạt ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

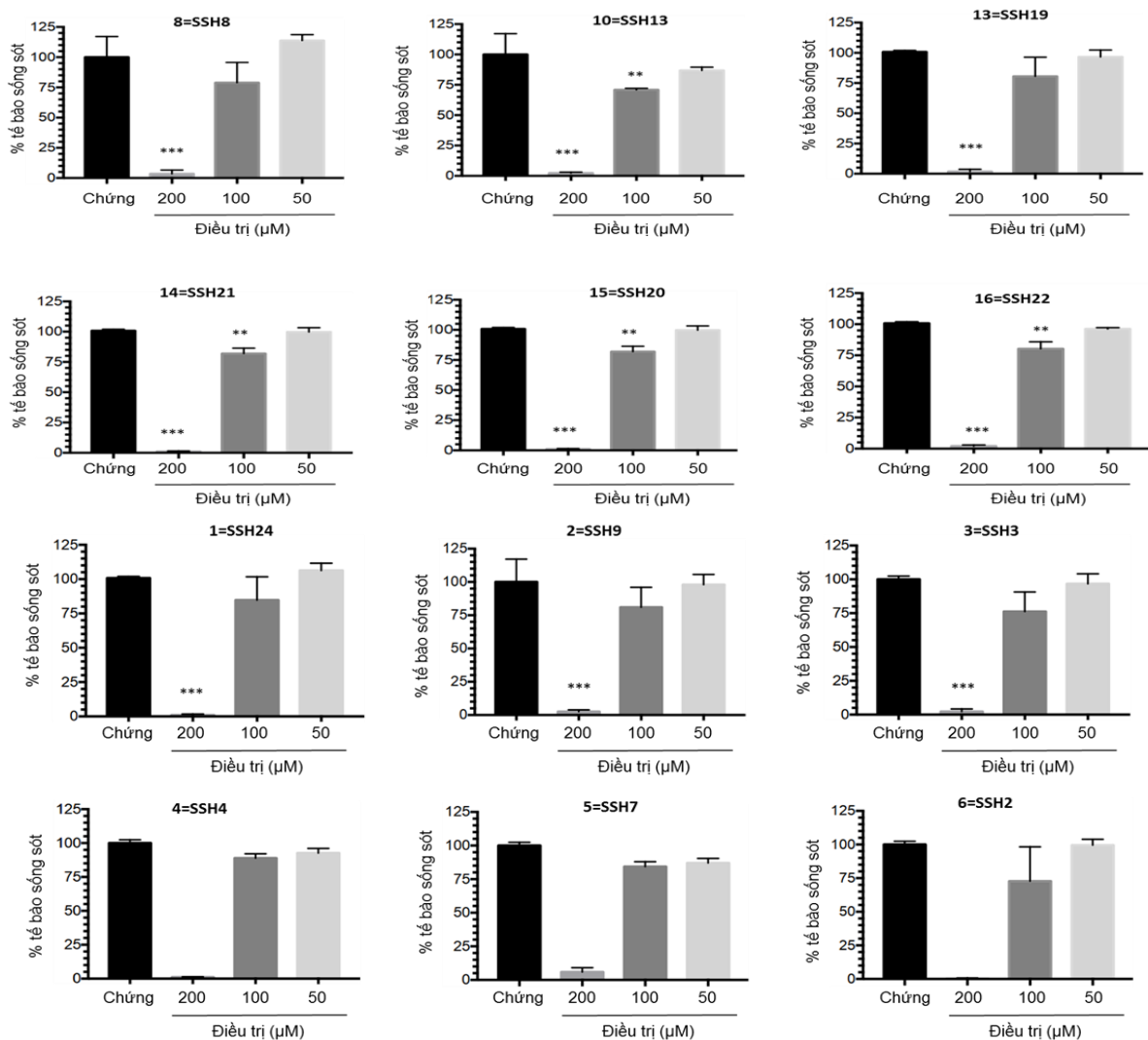


Hình 3.39. Ảnh hưởng của cao chiết TBT lên ALT và AST huyết thanh trong gan của chuột bị tổn thương mạn tính bởi paracetamol. (* $p < 0,001$; * $p < 0,05$ so với chứng trắng; # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$ so với chứng paracetamol; $n = 10-13$ con chuột / nhóm).**

Như vậy, cao chiết methanol toàn phần Thuỷ bồn thảo có tác dụng bảo vệ gan trên mô hình tổn thương gan mạn tính gây bởi paracetamol, thể hiện thông qua khả năng làm giảm hoạt độ ALT (ở liều $0,5g/kgTT$) và AST (ở mức liều $1,0g/kgTT$).

3.3.4. Nghiên cứu về tác dụng độc tế bào ung thư tử cung HeLa của một số hợp chất phân lập từ Thuỷ bồn thảo

Thử nghiệm đánh giá tác dụng gây độc trên tế bào ung thư HeLa của 12 hợp chất (1- SSH24, 2- SSH9, 3- SSH3, 4- SSH4, 5- SSH7, 6- SSH2, 8- SSH8, 10- SSH13, 13- SSH19, 14- SSH21, 15- SSH20, và 16- SSH22) được tiến hành tại Phòng thí nghiệm của GS. Suresh, Trường Đại học Toyama, Nhật Bản. Kết quả thu được như sau:



Hình 3.40. Tác dụng chống tế bào ung thư tử cung HeLa của một số hợp chất phân lập từ Thuỷ bồn thảo.

Kết quả ở hình 3.41 cho thấy:

- Ở nồng độ 200 µM, 12 hợp chất phân lập từ TBT đều có tác dụng gây độc mạnh đối với tế bào HeLa, đạt ý nghĩa thống kê với $p < 0,001$ (tỷ lệ tế bào

chết dao động khoảng 92,5% đến 100%).

- Ở nồng độ 100 μM , các hợp chất số 10, 14, 15, và 16 (SSH19, SSH21, SSH20, và SSH22) có tác dụng diệt tế bào HeLa, với tỷ lệ tế bào chết lần lượt là 30%, 26%, 18% và 24%.
- Ở nồng độ 50 μM , cả 12 hợp chất đều chưa thể hiện tác dụng gây độc đối với tế bào HeLa.

Như vậy, 12 hợp chất phân lập từ Thuỷ bồn thảo đều có tác dụng diệt tế bào ung thư tử cung HeLa ở mức độ trung bình.

CHƯƠNG IV. BÀN LUẬN

Loài Cánh thiên đỏ (*Sedum rosea*) trước đây cùng chi với Thủy bồn thảo (*Sedum sarmentosum*), đến năm 1963 mới tách thành chi *Rhodiola* và đổi tên thành *Rhodiola rosea*. Loài này ở nước ta, các nhà khoa học thuộc Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật đã phát hiện thấy ở đỉnh Phan Si Pan vào tháng 4 năm 1995, mọc rải rác trong các kẽ đá ở độ cao 2.700-3.100m, nhưng vì mẫu thu được không có hoa nên chưa khẳng định được tên khoa học. Cánh thiên đỏ mọc nhiều ở cao nguyên Tây Tạng Trung Quốc, vùng Scandinavia của Nga và một số nước châu Âu, được sử dụng làm thuốc ở Thụy Điển, Na Uy, Pháp, Đức, Liên Xô cũ và Iceland... Từ năm 1960 đến nay đã có hơn 180 công bố khoa học về thành phần hóa học, tác dụng dược lý và lâm sàng của loài này. Người Tây Tạng hơn 1000 năm về trước đã biết sản xuất ra một loại rượu thuốc, được xem là rượu bồi bổ sức khỏe, chống thiếu oxy tốt nhất cho những người dân ở vùng cao và lạnh, có tác dụng làm tăng khả năng chống chịu với điều kiện khắc nghiệt của môi trường bên ngoài còn mạnh hơn cả nhân sâm. Dược điển Trung Quốc còn ghi về tác dụng và công dụng của loài này như sau: “Sản phẩm này vị hơi đắng, tính hàn, chỉ khái, nhuận phổi, bổ khí, dưỡng âm, cường tim, ích trí, dùng để chữa bệnh gan phổi nóng, ho ra máu, viêm phổi, mỏi mệt, yếu tim, hay quên, liệt dương, di tinh, tứ chi phù thũng...”. Cánh thiên đỏ là một trong 18 loại thượng phẩm, là vật phẩm cung tiến với tên gọi “Cỏ thần tiên ban” có tác dụng làm cơ thể thư thái, kéo dài tuổi thanh xuân, bồi bổ cơ thể cường tráng, bổ thận tráng dương, bổ huyết, hoạt huyết.... Về tác dụng bổ dưỡng, người Nga cũng sử dụng làm thuốc cường tráng cơ thể, đã nghiên cứu chứng minh có tác dụng tốt đối với bệnh suy tim ở người cao tuổi, an thần, chống lão hóa.... Liên Xô trước đây đã đưa một số sản phẩm bào chế từ loài này sử dụng trong y học vũ trụ, y học thể thao, cho những người phải làm việc trong môi trường thiếu dưỡng khí. Hàng nghìn năm nay, người Tây Tạng gọi là dược liệu bồi bổ cơ thể, kéo dài tuổi thọ. Trung Quốc đã xây dựng chương trình nghiên cứu phát triển loài này ở qui mô

lớn, được Bộ hàng không, Viện Y học quân đội, Đại học Thanh Hoa, Đại học Bắc Kinh, Đại học Hoa Tây, Viện Y học Bắc Kinh nghiên cứu từ những năm 1963.... Đã nghiên cứu tác dụng dược lý, độ an toàn, đã chứng minh có tác dụng tăng cường miễn dịch, tác dụng bổ dưỡng..., tác dụng bổ dưỡng được đánh giá như kiểu bổ tận gốc của Y học cổ truyền. Ngoài ra còn chứng minh các tác dụng hoạt huyết, tăng cường chức năng tim, cải thiện chức năng mạch máu, giảm thiếu máu cơ tim, giảm hao phí oxy khi máu qua tim, giảm độ nhớt của máu, điều tiết lưu lượng máu qua tim, ức chế ngưng tập tiểu cầu, hạ mỡ máu, ức chế phát triển tế bào ung thư.... Các nghiên cứu lâm sàng còn chứng minh, Cánh thiên đỏ có tác dụng tăng cường trao đổi chất trong cơ thể, chống oxy hóa, loại gốc tự do, tăng hoạt tính SOD.... Đối với nhân viên làm việc trong môi trường độc hại, nhiệt độ cao, thiếu dưỡng khí, ô nhiễm phóng xạ, tiếng ồn cao..., Cánh thiên đỏ tăng khả năng thích nghi với ngoại cảnh.

Về tác dụng sinh học, Cánh thiên đỏ đã được chứng minh có các tác dụng cải thiện tình trạng mệt mỏi, tăng khả năng nhận thức, chống trầm cảm, cải thiện nhịp tim, chống thiếu oxy ở tim, tăng tiết sữa, giảm peroxy hóa lipid, tăng trương lực cơ, tăng khả năng tập trung, cải thiện khả năng phản xạ, tăng độ chính xác trong công việc, hạ huyết áp, hạ đường huyết, tăng khả năng hoạt động của cơ, tăng khả năng tổng hợp canxi ở xương, bảo vệ gan.... Các nhà khoa học Liên Xô cũ thì đánh giá cao tác dụng trên hệ thần kinh và tác dụng làm cơ thể cường tráng.... Dược điển Nga quy định hàm lượng salidroside không được thấp hơn 0,8%. Trong một nghiên cứu lâm sàng trên 60 học sinh trung học với liều 660 mg/ngày, hoạt động về thể lực và trí lực được nâng lên rõ rệt, vì vậy Liên bang Nga đã sản xuất thành thuốc với tên gọi Rodaxon. Bulgaria lại đánh giá cao tác dụng sinh thích nghi (adaptogen). Các nghiên cứu ở Arab Saudi đã chứng minh tác dụng bảo vệ gan ở mức liều 200 mg cao chiết aceton thân rễ /kgTT. Thuốc YHCT “Weikang Keli” của Trung Quốc bào chế từ bạch truật, nghệ ten đồng, củ bán hạ, đảng sâm, dương đào và Cánh thiên đỏ (tỷ lệ 1:1:1:2:2:2) sử dụng điều trị ung thư dạ dày với $IC_{50}=0,2g/ml$ ở mức liều 2.400-

9.600 mg/kg, đã làm giảm trọng lượng khối u tương ứng là 43 và 57%, trong khi đó số liệu này với nhóm dùng 5-fluororacil là 51%.

Loài Trường sinh lá tròn (*Sedum lineare*) cũng là loài thảo dược sống lâu năm, phân bố ở Việt Nam và Trung Quốc, có tác dụng hạ sốt, giảm sưng, giải độc. Toàn cây sử dụng làm thuốc điều trị vàng da, viêm gan dai dẳng, viêm họng và ly.... Trường sinh lá tròn mọc ở Sa Pa, được dùng trị mụn nhọt, vết thương sưng nóng, bỏng, đau sưng hầu họng, amygdal, viêm kết mạc cấp, đờn ngã tổn thương, đau nhức răng, ung sang thũng độc, rắn độc cắn, ly và viêm gan hoàng đản.... Năm 2005, Zhou Qing và cs đã chứng minh tác dụng bảo vệ gan, làm giảm hàm lượng ALT và MDA trong huyết thanh..., trên mô hình gây độc gan bằng CCl₄, tăng hoạt tính SOD, giảm bilirubin toàn phần.... Đến năm 2015 Zhou Qing nghiên cứu trên biểu hiện protein IL10, TNF α và NF β trong mô khối u S180, đã chứng minh cơ chế tác dụng chống khối u của dịch chiết cồn Trường sinh lá tròn, như vậy các nhà khoa học Trung Quốc cũng quan tâm đến tác dụng bảo vệ gan và chống ung thư của loài Trường sinh lá tròn.

Loài Thủy bồn thảo (*Sedum sarmentosum* Bunge) cũng được sử dụng rộng rãi trong y học cổ truyền Trung Quốc để điều trị viêm gan cấp và mạn, bệnh vàng da, bệnh thấp nhiệt, viêm mũi, tiểu tiện khó, các nghiên cứu bằng Y học hiện đại đã chứng minh tác dụng bảo vệ gan.... Theo kinh nghiệm dân gian ở nước ta, toàn cây có vị đắng, tính ôn, dùng điều trị họng sưng đau, viêm gan hoàng đản..., là vị thuốc chữa bệnh viêm gan của người H'Mông.... Các nghiên cứu dược lý hiện đại đã chứng minh, Thủy bồn thảo có tác dụng bảo vệ gan, chống khối u, viêm tụy cấp, viêm phổi, chống xơ hóa thận, ức chế miễn dịch và tăng cường chức năng cơ....

So sánh giữa Cánh thiên đỏ, Trường sinh lá tròn và Thủy bồn thảo cho thấy, đặc điểm thực vật có phiến lá và thân cây lớn hơn Thủy bồn thảo và Trường sinh lá tròn rất nhiều, lá mọc vòng, viền lá có phốt ánh tím rất dễ phân biệt với Thủy bồn thảo và Trường sinh lá tròn. Đặc điểm nhận dạng của Thủy bồn thảo và Trường sinh lá tròn khá giống nhau, tuy nhiên lá Thủy bồn thảo dẹt

và lớn hơn so với lá của Trường sinh lá tròn. Ngoài ra, so với Trường sinh lá tròn thì Thủy bồn thảo có đặc điểm dễ phân biệt là cây và lá khi còn non có màu hơi tím nhạt. Để phục vụ mục đích bảo tồn và nghiên cứu tiếp sau này, trong điều kiện cho phép nên NCS đã đưa về trồng tại vườn bảo tồn cây thuốc của Viện YHCT Quân đội, tại đây cây Thủy bồn thảo và Trường sinh lá tròn phát triển rất tốt, đặc biệt vào mùa lạnh, phát triển yếu về mùa hạ, cây ưa ẩm, ưa sáng, không chịu úng ngập. Thành phần hóa học của 3 loài này tương đối giống nhau, do cùng một họ và trước đây còn cùng chi, các loài này có một số tác dụng giống nhau như: Bảo vệ gan, chống viêm, chống oxy hóa, chống ung thư, hạ huyết áp, chống mệt mỏi, hạ lipid máu, ức chế enzym acetylcholinesterase, nhưng cũng có một số khác biệt như: Tác dụng bảo vệ gan ở Thủy bồn thảo và Trường sinh lá tròn được nghiên cứu kỹ hơn, trong khi đó, tác dụng trên hệ thần kinh trung ương và tác dụng làm cường tráng cơ thể, tác dụng sinh thích nghi ở Cánh thiên đỏ lại được nghiên cứu kỹ hơn.

Trong phạm vi của một luận án tiến sĩ, Nghiên cứu sinh đã lựa chọn cây Thủy bồn thảo làm đối tượng nghiên cứu về đặc điểm thực vật, thành phần hóa học và một số tác dụng sinh học của cây Thủy bồn thảo (*Sedum sarmentosum* Bunge), Crassulaceae, với 3 mục tiêu: Mô tả được đặc điểm thực vật, vi phẫu thân và định tính được các nhóm chất có trong cây Thủy bồn thảo. Xác định được các nhóm hợp chất chủ yếu, phân lập và xác định cấu trúc một số hợp chất có trong cây Thủy bồn thảo. Đánh giá được độc tính cấp, độc tính bán trường diễn, tác dụng bảo vệ gan của cao toàn phần Thủy bồn thảo và khả năng chống ung thư cổ tử cung của một số hợp chất phân lập được. Các kết quả nghiên cứu của luận án đã góp phần làm sáng tỏ các vấn đề trên.

4.1. Về thực vật học

Vấn đề đầu tiên của luận án là xác định đúng tên khoa học của đối tượng nghiên cứu. Mẫu dược liệu được thu tại Sa Pa, tỉnh Lào Cai vào tháng 6 năm 2015. Tên khoa học được giám định bởi ThS. Nguyễn Quỳnh Nga, Khoa Tài

nguyên Dược liệu - Viện Dược liệu (mã số tiêu bản DL-300615) thẩm định theo phương pháp so sánh hình thái, có đối chiếu với tiêu bản hiện đang lưu giữ tại bảo tàng dược liệu Viện Dược liệu và bảo tàng Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật. Mẫu tiêu bản được lưu giữ tại Viện y học cổ truyền Quân Đội. Mẫu cây sống, NCS đã trồng tại vườn bảo tồn cây thuốc của Viện YHCT Quân đội. Vi phẫu thân và đặc điểm bột dược liệu được quan sát dưới kính hiển vi. Các kết quả giám định đã xác nhận tên khoa học đúng là *Sedum sarmentosum* Bunge, họ thuốc bỏng Crassulaceae.

4.2. Về hóa học

Theo tài liệu thu thập được, bộ phận dùng làm thuốc chủ yếu là phần trên mặt đất, bao gồm thân, cành lá và một ít rễ bám ở các đốt thân. Khi NCS thu hái chỉ lấy được toàn bộ thân, lá, phần rễ rất nhỏ bám trên mặt đất đá sau khi rửa sạch, sấy khô gần như không còn, vì vậy mẫu dược liệu nghiên cứu là phần trên mặt đất của cây Thủy bồn thảo. Thành phần hóa học quan trọng là các nhóm chất như coumarin, flavonoid, megastigman glycosid, alcaloid, acid hữu cơ và tanin. Cho đến nay các nhà khoa học đã xác định trong Thủy bồn thảo chứa 140 hợp chất tự nhiên. Thân rễ chứa các hợp chất như phenol, rosavin, rosin, rosarin, acid hữu cơ, terpenoid, acid phenolcarboxylic, flavonoid, anthraquinon và alcaloid. Thành phần tinh dầu thân rễ của loài này ở các nước cũng khác nhau, hàm lượng rosavin, rosarin, rosin cao nhất ở các mẫu thu ở Nga, trong khi đó mẫu thu ở Bulgaria lại là geraniol và myrtenol, mẫu thu ở Trung Quốc là geraniol là octanol, trong khi đó mẫu thu ở Ấn Độ lại là pheylethilic alcohol. Cinnamic alcohol chỉ phát hiện được ở mẫu của Bulgaria. Các salidroside như rhodiololide và rhodosin (megastigman glycosid) được xem là hoạt chất.... Như vậy, ở các xuất xứ khác nhau, thành phần hóa học, đặc biệt hàm lượng của một số nhóm chất có thể có sự khác nhau. Trong phạm vi của một luận án, Nghiên cứu sinh mới nghiên cứu được trên một mẫu thu tại Sa Pa tỉnh Lào Cai. Sau này,

nếu điều kiện cho phép, NCS sẽ nghiên cứu trên nhiều mẫu hơn, ở nhiều vùng khác nhau.

Kết quả định tính cho thấy, mẫu Thủy bồn thảo thu ở Sa Pa vào tháng 6 năm 2015 có chứa các nhóm chất như carotenoid, phytosterol, coumarin, flavonod, acid hữu cơ, acid amin, alcaloid, tanin và đường khử, không chứa các nhóm chất saponin, chất béo, anthranoid và glycosid tim.

Theo các tài liệu đã công bố, các nhóm chất như flavon, flavon glycosid, megastigman, megastigman glycosid, đặc biệt các salidroside và sarmentosin (một glucosid tan trong nước) có tác dụng bảo vệ gan mạnh, **nên NCS tập trung nghiên cứu 2 phân đoạn cao nước và cao ethylacetat**. Trên thực tế, 2 phân đoạn cao n-hexan và dicloromethan chứa nhiều tạp chất và diệp lục, khi chạy trên sắc kí sơ bộ thì có nhiều tạp chất và diệp lục nên vết chất không rõ ràng.

Từ 14g cao ethylacetat sau khi chạy trên cột silica gel pha thuận, pha đảo và tinh chế thu được 11 hợp chất: 3,4-dimethoxybenzyl alcohol (SSH29), acid p-hydrobenzoic (SSH20), phenylethyl alcohol (SSH22/tyrosol), acid ferulic (SSH19), acid trans-p-coumaric (SSH21), luteolin (SSH1), sarmentol A (SSH2), myrsiniosid A (SSH3), simplicifloranosid (SSH4), sedumosid I (SSH7) và 3'-methoxyluteolin-7-O- β -D-glucopyranosid (SSH17).

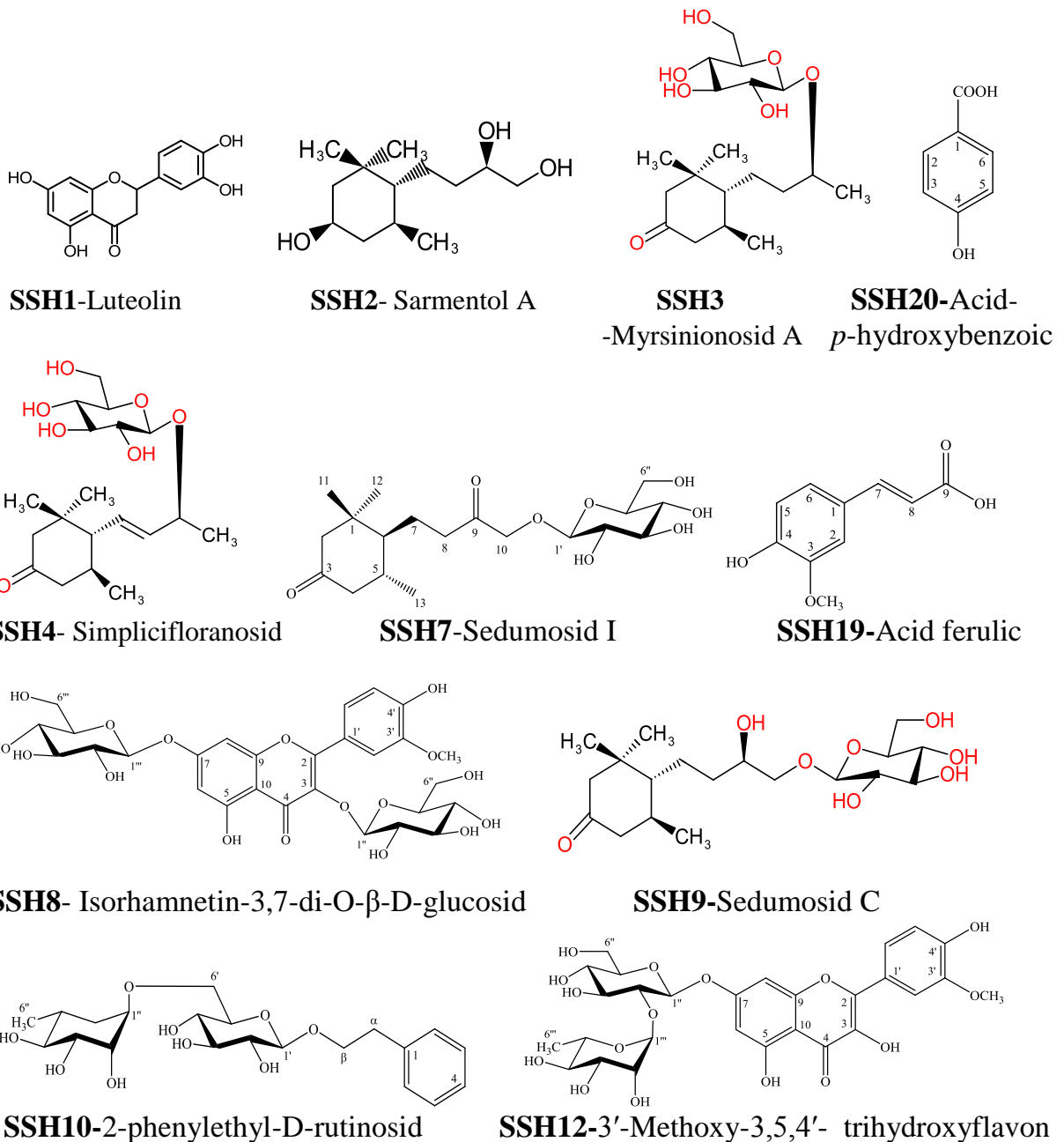
Từ 155g cao nước thu được 7 hợp chất: Quercetin-3-O- β -glucopyranose (SSH13), sedumosid K (**SSH24 - hợp chất mới**), sedumosid C (SSH9), isorhamnetin-3,7-O-di- β -D-glucosid (SSH8), 3'-methoxy-3,5,4'-trihydroxyflavon-7-neohesperidosid (SSH12), 2-phenylethyl-D-rutinosid (SSH10) và lariciresinol-9-O- β -D-glucopyranosid (SSH25).

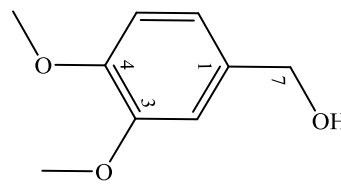
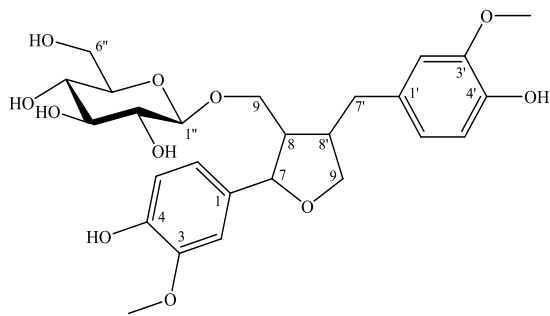
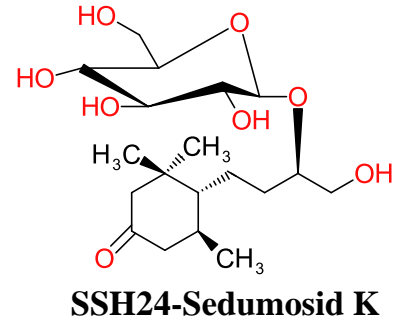
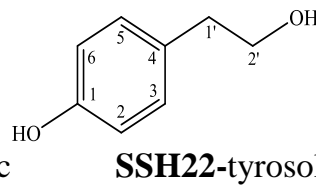
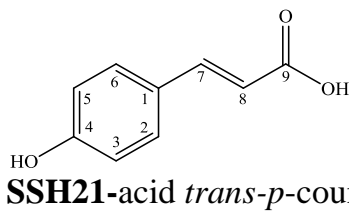
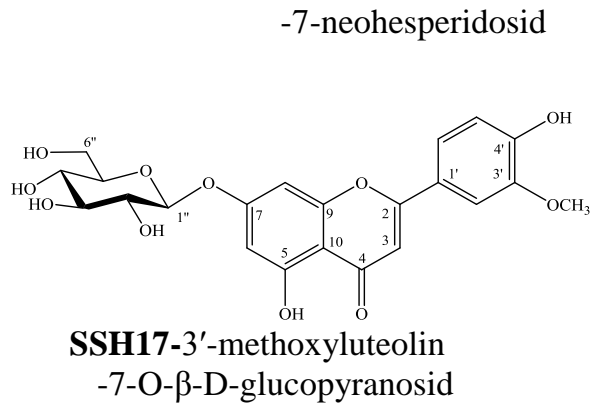
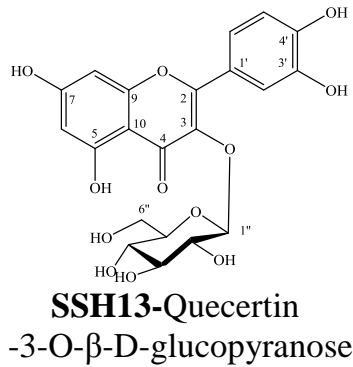
Như vậy, từ phần trên mặt đất NCS đã phân lập được 18 hợp chất tinh khiết, bao gồm 1 megastigman (SSH2/sarmentol A), 5 megastigman glycosid (SSH3, SSH4, SSH7, SSH9 và SSH24), 1 flavon (SSH1/luteolin), 5 flavon glycosid (SSH8, SSH10, SSH12, SSH13 và SSH17), 1 lignan glycosid (SSH25), 2 alcohol (SSH22 và SSH29) và 3 acid phenolic (SSH19, SSH20 và SSH21),

trong đó có 1 chất mới là **SSH24**, đặt tên là **Sedumosid K**. Phần lớn các hợp chất phân lập được đều có tác dụng sinh học, đặc biệt là các chất thuộc các nhóm megastiman, megastigman glycosid và flavon glycosid.

Cấu trúc hóa học của các chất phân lập được xác nhận bằng phổ UV, IR, ^1H NMR, ^{13}C NMR, HNBC, HSQC, NOESY và HRMS có đối chiếu với số liệu phổ của các chất đối chiếu.

Danh sách các hợp chất phân lập được như sau:





SSH25-Lariciresinol-9-O- β -D-glucopyranosid **SSH29-3,4-dimethoxybenzyl alcohol**

Trong đó hợp chất mới đặt tên là Sedumosid K có cấu trúc hóa học là *5S,6R,9R*-megastigman-3-on-9,10-diol-9- β -glucopyranosid, được tra cứu trên cơ sở dữ liệu Scifinder và kết luận là hợp chất mới. Các hợp chất còn lại là những hợp chất đã biết như: Hợp chất Sarmentol A đã được Yoshikawa phân lập từ Thủy bồn thảo vào năm 2007, hợp chất Myrsinosid A được Otsuka và cs phân lập từ loài *Myrsine seguinii* vào năm 2001...

Các chất khác như SSH5; SSH6; SSH11; SSH14; SSH15; SSH16; SSH18; SSH23; SSH27; SSH28, một số hợp chất trùng với hợp chất khác, một số còn có tạp chất, nên khi chạy phổ không rõ ràng, không xác định được cấu trúc hóa học.

4.3. Về độc tính

Khi nghiên cứu độc tính chủ yếu đánh giá ảnh hưởng của mẫu thuốc thử đến tình trạng chung, trọng lượng cơ thể, ảnh hưởng trên cơ quan tạo máu, ảnh hưởng đến chức năng gan và ảnh hưởng đến chức năng thận. Nếu trọng lượng của động vật đều tăng so với trước khi dùng thuốc thử ở tất cả các lô và sự tăng trọng lượng ở lô thử không khác so với lô chứng, chứng tỏ thuốc thử không ảnh hưởng đến sự phát triển bình thường của động vật thí nghiệm.

Máu phản ánh trạng thái của cơ quan tạo máu, nếu thuốc có ảnh hưởng đến cơ quan tạo máu, trước hết các thành phần của máu sẽ thay đổi, vì vậy có thể đánh giá ảnh hưởng của cao chiết Thủy bồn thảo đến chức năng của hệ thống tạo máu, thông qua xác định các thông số của máu.

Về chức năng gan, trong cơ thể gan là cơ quan đảm nhận nhiều chức năng quan trọng. Khi thuốc thử vào cơ thể được chuyển hóa ở gan, nên có thể gây độc với gan, làm ảnh hưởng đến chức năng gan. Vì vậy khi nghiên cứu ảnh hưởng của thuốc thử đối với chức năng gan thông qua các xét nghiệm các enzym gan như AST, ALT, nếu gan bị tổn thương hoạt độ của AST và ALT luôn tăng cao, nhưng khác với ALT (có nhiều nhất trong bào tương của tế bào nhu mô gan) AST lại khu trú phần lớn (hai phần ba) trong ty thể, chỉ 1 phần ba trong bào tương, nên nồng độ AST thường thấp hơn.

Về chức năng thận, creatinin là thành phần đậm trong máu ổn định nhất, hầu như không phụ thuộc vào chế độ ăn, hoặc những thay đổi sinh lý, chỉ phụ thuộc vào khả năng đào thải của thận. Để đánh giá ảnh hưởng của thuốc thử đối với chức năng thận, thường thông qua định lượng creatinin huyết thanh. Khi cầu thận bị tổn thương do thuốc thử, creatinin huyết thanh tăng sớm hơn ure. Định lượng creatinin huyết thanh được sử dụng nhiều hơn để đánh giá chức năng thận.

Kết quả thử độc tính cấp cao chiết methanol toàn phần Thủy bồn thảo đã xác định được liều LD₅₀ là 25,56g cao/kgTT. Theo cách tính toán liều an toàn và liều có tác dụng của cao chiết phải nhỏ hơn ít nhất 10 lần liều LD₅₀,

hệ số này càng lớn thì cao chiết có độ an toàn cao. **Liều dự kiến thử tác dụng sinh học của cao Thủy bồn thảo là 0,5 và 1g/kgTT, như vậy liều LD₅₀ cao gấp 25,5 và 51 lần liều dự kiến, nên cao chiết methanol Thủy bồn thảo đem thử là an toàn khi thử trên chuột nhắt.**

Kết quả nghiên cứu độc tính bán trường diễn: Thiết kế đánh giá độc tính bán trường diễn đường uống trên chuột cống trắng của cao methanol Thủy bồn thảo với 2 mức liều là 275 và 825 mg/kg là dựa trên việc ngoại suy liều có tác dụng bảo vệ gan là 500 mg/kg trên chuột nhắt với hệ số quy đổi từ chuột nhắt sang chuột cống là 0,55 lần [1], [5].

Kết quả đánh giá độc tính bán trường diễn của cao chiết methanol trên chuột cống trắng cho thấy, trọng lượng chuột ở tất cả các lô thử đều tăng, sự tăng này giữa lô thử và lô chứng là như nhau, sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê, tuy nhiên có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê của 3 lần thử so với lần 1, như vậy cao methanol toàn phần Thủy bồn thảo không ảnh hưởng đến cân nặng ở chuột. Sau 15 và 30 ngày uống cao chiết Thủy bồn thảo, số lượng hồng cầu, bạch cầu, tiểu cầu, nồng độ hemoglobin, giá trị hematocrit, % lympho bào ở cả 3 lô thử đều không có sự khác biệt ($p > 0,05$). Các chỉ số hóa sinh về chức năng gan như nồng độ bilirubin, protein, hoạt độ AST và ALT ở cả 2 lô uống Thủy bồn thảo đều không có sự khác biệt ($p > 0,05$). Chỉ số sinh hóa về chức năng thận như nồng độ creatinin ở 2 lô uống Thủy bồn thảo (liều 0,5 g và 1g/kgTT) không có sự khác biệt so với lô chứng ($p > 0,05$). Về đại thể, các cơ quan như gan, thận ở cả 3 lô đều không có sự thay đổi bệnh lý. Về vi thể, các cơ quan tim, phổi, gan, lách, thận, hệ thống tiêu hóa, qua xét nghiệm mô học nhận thấy, không có sự khác biệt trong hình ảnh vi thể giữa lô chuột uống liều thấp, liều cao và lô chuột sinh lý, sau 30 ngày uống cao Thủy bồn thảo. Như vậy, **cao chiết methanol toàn phần Thủy bồn thảo là an toàn.** Tuy vậy, trong nghiên cứu này độc tính bán trường diễn của cao chiết methanol toàn phần Thủy bồn thảo mới chỉ được đánh giá bước đầu trong 30 ngày. Như vậy, trong các nghiên

cứu tiếp theo, việc đánh giá độc tính bán trường diễn đường uống 90 ngày là cần thiết nếu có định hướng phát triển sản phẩm bảo vệ gan từ Thủy bồn thảo.

4.4. Về tác dụng sinh học của cao chiết toàn phần methanol Thủy bồn thảo

Nghiên cứu tác dụng bảo vệ gan của một thuốc là đánh giá tác dụng ngăn ngừa các tổn thương gan có thể xảy ra do các tác nhân gây độc cho gan. Mô hình được áp dụng ở đây là gây tổn thương gan cấp và mạn bằng paracetamol trên động vật. Trên người khi dùng quá liều, paracetamol gây tổn thương gan nghiêm trọng, do tạo thành phức hợp với protein của gan, gây tổn thương ty thể và ADN. Khi vào cơ thể, khoảng 90% paracetamol liên kết với sulphat hoặc glucuronid thành chất chuyển hóa không có độc tính và được thải trừ qua nước tiểu, khoảng 10% chuyển hóa qua CYP450, CYP2E1 và CYP1A2 thành gốc tự do có tính ái nhân cao là N-acetyl-p-benzoquinonimin (NAPQI). Với liều điều trị thông thường, PAR ít gây độc cho gan do lượng NAPQI sinh ra nhanh chóng được đào thải bằng cách liên kết với sulhydryl của glutathion trong gan, tạo thành chất chuyển hóa mới không còn độc tính. Nhưng nếu dùng quá liều hoặc dài ngày, paracetamol sẽ tạo ra một lượng lớn NAPQI, từ đó làm cạn kiệt glutathion của gan. NAPQI sẽ gây peroxy hóa lipid trong lớp phospholipid kép của màng tế bào gan, dẫn đến tổn thương tế bào gan, tạo thành MDA cùng các gốc tự do superoxyd.

AST và ALT là các enzym chuyển hóa acid amin và có mặt ở tất cả các tế bào của cơ thể. AST phân bố nhiều ở tim, gan, thận, trong khi đó ALT lại chủ yếu ở gan, thận, cơ. Khi gan bị tổn thương, AST và ALT giải phóng từ tế bào gan vào máu, làm cho hoạt độ của chúng trong huyết thanh tăng. Mức độ tăng tùy thuộc vào mức độ tổn thương gan. Do đó định lượng hoạt độ AST và ALT huyết thanh sẽ đánh giá được mức độ tổn thương gan. MDA là sản phẩm cuối cùng của quá trình peroxy hóa lipid. Paracetamol gián tiếp làm tăng quá trình peroxy hóa lipid trong tế bào gan, dẫn đến làm tăng MDA, do vậy xác định hàm lượng MDA trong gan sẽ đánh giá được quá trình peroxy hóa lipid gây ra bởi paracetamol.

Ngoài MDA, hàm lượng GSH (glutathion) và hoạt độ của một số enzym khác ở gan như SOD (superoxyd dismutase) cũng phản ánh chức năng gan, glutathion là một chất chống oxy hóa, có khả năng ngăn ngừa các chất oxy hóa hoạt động như gốc tự do, peroxy hóa lipid và kim loại nặng ảnh hưởng đến tế bào gan, còn SOD là một enzym đặc biệt, có thể chuyển hóa các gốc superoxyd thành hydrogen peroxyd ít độc hơn, sau đó chuyển hóa thành nước và oxy bởi enzym catalase. Tuy nhiên, trong khuôn khổ của luận án này, do điều kiện hạn hẹp về thời gian và kinh phí nên Nghiên cứu sinh chưa thực hiện được trên các chỉ số trên. Trong tương lai gần, nếu điều kiện cho phép, luận án cần được nghiên cứu tiếp, sâu hơn và rộng hơn nữa, cần tiến hành đánh giá thêm trên các chỉ số MDA, GSH và SOD...để có thể tiến tới có nghiên cứu đầy đủ hơn về dược liệu Thủy bồn thảo.

Silymarin là hỗn hợp của các flavonolignan được chiết xuất từ quả cây ké sưa, ít độc khi sử dụng ở liều cao, đã được chứng minh có tác dụng cải thiện tổn thương gan gây ra bởi rượu, carbon tetraclohid và paracetamol, được sử dụng điều trị các bệnh về gan, nên nghiên cứu sinh sử dụng làm chất đối chiếu.

Trên mô hình gây tổn thương gan cấp, paracetamol đã làm tăng trọng lượng gan chuột ở tất cả các lô so với lô sinh lý, sau khi cho chuột uống cao toàn phần methanol Thủy bồn thảo với 2 mức liều 0,5 và 1g/kgTT và silymarin (liều 0,2g/kgTT), trọng lượng gan tương tự như lô bệnh lý, như vậy ở 2 mức liều này đều chưa có tác dụng ức chế việc tăng trọng lượng gan chuột gây ra bởi paracetamol, hình ảnh đại thể các mẫu gan không đồng nhất, xốp, to hơn so với lô sinh lý. Trong khuôn khổ của luận án này, chưa trình bày được hình ảnh vi thể gan ở các lô thí nghiệm. Vậy nên, dược liệu Thủy bồn thảo cần được nghiên cứu tiếp theo, sâu hơn về tác dụng sinh học.

Khi cho chuột uống silymarin với mức liều 0,2g/kgTT, làm giảm hoạt độ 2 enzym AST và ALT lần lượt 53,7 và 56,37% so với lô chứng bệnh lý, mức giảm này cho thấy tác dụng bảo vệ gan của silymarin.

Kết quả đánh giá tác dụng bảo vệ gan của các mẫu thử cho thấy, ở 2 mức liều 0,5 và 1g/kgTT chuột cao chiết methanol toàn phần Thủy bồn thảo, làm giảm hoạt độ 2 men gan AST và ALT có ý nghĩa thống kê so với lô chứng bệnh lý. Paracetamol làm tăng hoạt độ AST ở tất cả các lô thử. Lô uống Thủy bồn thảo liều 0,5g/kgTT ức chế 49,6% so với lô chứng bệnh lý, đạt ý nghĩa thống kê. Lô uống liều 1 g/kgTT có xu hướng ức chế sự tăng của AST 41,3%, tuy nhiên chưa đạt ý nghĩa thống kê ($p>0,05$). Silymarin cũng có tác dụng ức chế sự tăng hoạt độ AST gây bởi paracetamol ($p<0,05$). Như vậy, **cao methanol toàn phần Thủy bồn thảo liều 0,5 và 1g/kgTT chuột, có tác dụng bảo vệ gan trên mô hình gây tổn thương gan cấp bằng paracetamol, thể hiện thông qua khả năng làm giảm hoạt độ ALT ở cả 2 mức liều và AST ở mức liều 0,5g/kgTT.**

Tác dụng bảo vệ gan của cao chiết methanol Thủy bồn thảo trên mô hình gây tổn thương gan mạn cũng bằng paracetamol cũng được nghiên cứu trên 2 mức liều 0,5g và 1g/kgTT chuột và quan sát đại thể gan chuột và đánh giá ảnh hưởng của cao chiết Thủy bồn thảo lên hoạt độ các men gan ALT và AST ở chuột bị gây tổn thương gan mạn bằng paracetamol. Kết quả cho thấy, paracetamol làm tăng hoạt độ ALT ở tất cả các lô thử ($p<0,05$), lô uống cao Thủy bồn thảo liều 0,5g/kgTT và lô uống silymarin liều 0,2g/kgTT có tác dụng ức chế sự tăng hoạt độ ALT đạt ý nghĩa thống kê với $p<0,05$ và % ức chế lần lượt là 52,5 và 53,8%, nhưng ở lô cho uống mức liều 1g/kgTT lại không có sự khác biệt đạt ý nghĩa thống kê giữa lô chuột uống cao methanol toàn phần Thủy bồn thảo so với lô chứng bệnh lý. Trong khi đó, paracetamol làm tăng hoạt độ AST ở tất cả các lô ($p<0,05$). Hai lô uống cao methanol toàn phần Thủy bồn thảo liều 0,5 và 1g/kgTT ức chế 43,6% và 52,6% so với lô chứng bệnh lý, nhưng chưa đạt ý nghĩa thống kê ($p>0,05$). Lô chuột uống silymarin liều 0,2g/kgTT ức chế sự tăng hoạt độ AST 70,4% ($p<0,05$). Như vậy, **cao chiết methanol toàn phần Thủy bồn thảo có tác dụng bảo vệ gan trên mô hình gây tổn thương**

gan mạn bằng paracetamol, thể hiện thông qua khả năng làm giảm hoạt độ ALT ở liều 0,5g/kgTT và AST ở mức liều 1g/kgTT.

Thử nghiệm đánh giá tác dụng gây độc trên tế bào ung thư HeLa của 12 hợp chất (ký hiệu 1- SSH24, 2- SSH9, 3- SSH3, 4- SSH4, 5- SSH7, 6- SSH2, 8- SSH8, 10- SSH13, 13- SSH19, 14- SSH21, 15- SSH20, và 16- SSH22) được tiến hành tại Phòng thí nghiệm của GS. Suresh, Trường Đại học Toyama, Nhật Bản.

Kết quả cho thấy rằng: Ở nồng độ 200 μ M, 12 hợp chất phân lập từ TBT đều có tác dụng gây độc mạnh đối với tế bào HeLa, đạt ý nghĩa thống kê với $p < 0,001$ (tỷ lệ tế bào chết dao động khoảng 92,5% đến 100%). Ở nồng độ 100 μ M, các hợp chất số 10, 14, 15, và 16 có tác dụng diệt tế bào HeLa, với tỷ lệ tế bào chết lần lượt là 30%, 26%, 18% và 24%. Ở nồng độ 50 μ M, cả 12 hợp chất đều chưa thể hiện tác dụng gây độc đối với tế bào HeLa. Như vậy, **12 hợp chất phân lập từ Thủy bồn thảo đem thử đều có tác dụng diệt tế bào ung thư cổ tử cung HeLa ở mức độ trung bình.**

4.5. Về đóng góp mới của luận án

(1) Thủy bồn thảo ở trong nước chưa thấy có nghiên cứu, như vậy các kết quả nghiên cứu của luận án được xem là đóng góp mới ở Việt Nam.

(2) Lần đầu tiên ở Việt Nam đã phân lập được 18 hợp chất tự nhiên từ phần trên mặt đất của cây Thủy bồn thảo, gồm 1 megastigman, 5 megastigman glycosid, 1 flavon, 5 flavon glucosid, 1 lignan glucosid, 2 alcohol, 3 acid phenolic, trong đó **Sedumosid K** là hợp chất mới.

(3) Lần đầu tiên xác định liều LD_{50} là 25,56g/kgTT, từ đó dự kiến liều thử tác dụng sinh học là 0,5g và 1g/kgTT, cao gấp 25,5 và 51 lần liều thử nghiệm, nên cao chiết methanol toàn phần Thủy bồn thảo là rất an toàn trong nghiên cứu và sử dụng, cả về cân nặng, chỉ số huyết học, chỉ số hóa sinh gan và thận, không có sự khác biệt về hình ảnh đại thể và vi thể giữa lô điều trị liều thấp, liều cao sau 30 ngày uống cao Thủy bồn thảo.

(4) Lần đầu tiên đã chứng minh cao chiết methanol toàn phần Thủy bồn thảo liều 0,5g và 1g/kgTT có tác dụng bảo vệ gan trên cả 2 mô hình gây tổn thương gan cấp và mạn bằng paracetamol.

(5) Thử tác dụng trên tế bào ung thư cổ tử cung của 12 hợp chất phân lập được từ Thủy bồn thảo, 12 hợp chất phân lập đều có tác dụng diệt tế bào ung thư cổ tử cung HeLa ở mức độ trung bình.

KẾT LUẬN

Luận án đã hoàn thành 3 mục tiêu nghiên cứu:

(1) Đã mô tả được đặc điểm hình thái dược liệu Thủy bồn thảo thu tại Sa Pa Lào Cai và giám định đúng tên khoa học là *Sedum sarmentosum* Bunge. Đã mô tả đặc điểm vi phẫu thân và đặc điểm bột phần trên mặt đất.

(2) Đã định tính bằng phản ứng hóa học và sắc ký lớp mỏng và xác định trong Thủy bồn thảo có chứa các nhóm chất như carotenoid, phytosterol, coumarin, flavonoid, acid hữu cơ, acid amin, alcaloid, tanin và đường khử, không chứa saponin, chất béo, anthranoid và glycosid trợ tim.

Từ phần trên mặt đất nghiên cứu sinh đã phân lập được 18 hợp chất tinh khiết, bao gồm 1 megastigman (SSH2 - *Sarmentol A*), 5 megastigman glycosid (SSH3 - *Myrsiniosid A*, SSH4 - *Simplicifloranosid*, SSH7 - *Sedumosid I*, SSH9 - *Sedumosid C* và SSH24 - *Sedumosid K*), 1 flavon (SSH1 - *Luteolin*), 5 flavon glycosid (SSH8 - *Isorhamnetin-3,7-O-di-β-D-glucosid*, SSH10 - *2-phenylethyl-D-rutinosid*, SSH12 - *3'-Methoxy-3,5,4'-trihydroxyflavon-7-neohesperidosid*, SSH13 - *Quercetin-3-O-β-D-glucopyranose* và SSH17 - *3'-methoxyluteolin-7-O-β-D-glucopyranosid*), 1 lignan glycosid (SSH25 - *Lariciresinol-9-O-β-D-glucopyranosid*), 2 alcohol (SSH22 - *Tyrosol* và SSH29 - *3,4-dimethoxybenzyl alcohol*) và 3 acid phenolic (SSH19 - *Acid Ferulic*, SSH20 - *Acid p-Hydroxybenzoic* và SSH21 - *Acid trans-p-coumaric*), trong đó có 1 chất mới là **SSH24**, đặt tên là **Sedumosid K**.

(3) Đã chứng minh cao chiết methanol toàn phần Thủy bồn thảo an toàn khi sử dụng với mức liều 0,5g và 1g/kgTT chuột.

Đã chứng minh cao chiết methanol toàn phần Thủy bồn thảo liều 0,5g và 1g/kgTT chuột, có tác dụng bảo vệ gan trên mô hình gây tổn thương gan cấp bằng paracetamol, thể hiện thông qua khả năng làm giảm hoạt độ ALT ở cả 2 mức liều và AST ở mức liều 0,5g/kgTT.

Đã chứng minh cao chiết methanol toàn phần Thủy bồn thảo có tác dụng bảo vệ gan trên mô hình gây tổn thương gan mạn bằng paracetamol, thể hiện

thông qua khả năng làm giảm hoạt độ ALT ở liều 0,5g/kgTT và AST ở mức liều 1g/kgTT.

Đã chứng minh được 12 hợp chất phân lập từ Thủy bồn thảo có tác dụng diệt tế bào ung thư cổ tử cung người (HeLa) ở mức độ trung bình.

KIẾN NGHỊ

Bổ sung cây Thủy bồn thảo vào các tài liệu về cây thuốc Việt Nam, cần được bảo vệ và phát triển.

Tiếp tục nghiên cứu sâu hơn về tác dụng bảo vệ gan của cao chiết toàn phần methanol Thủy bồn thảo, về tác dụng chống ung thư của các chất phân lập được trên các loại tế bào ung thư khác nhằm khẳng định giá trị dược liệu của Thủy bồn thảo.

Tiếp tục nghiên cứu rộng hơn nữa, trên nhiều chỉ số, mở rộng thêm thời gian nghiên cứu nhằm tạo ra các sản phẩm từ cây Thủy bồn thảo để chăm sóc sức khỏe cộng đồng.

CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ

1	Đoàn Xuân Đình, Nguyễn Minh Dũng, Nguyễn Thượng Dong, Phạm Thị Nguyệt Hằng, Lê Cảnh Việt Cường, Lê Thị Liên, Nguyễn Phúc Khánh Nhi, Hoàng Lê Tuấn Anh (2018), “ Ba hợp chất Flavonoid glycosid phân lập từ cao chiết nước của cây Thủy bồn thảo (<i>Sedum sarmentosum</i> Bunge) thu tại Sapa ”, <i>Tạp chí Dược học</i> , số 12/2018, (số 512 năm 58), trang: 17-20.
2	Đoàn Xuân Đình, Nguyễn Minh Dũng, Nguyễn Thượng Dong, Phạm Thị Nguyệt Hằng, Lê Cảnh Việt Cường, Lê Thị Liên, Nguyễn Phúc Khánh Nhi, Hoàng Lê Tuấn Anh (2019), “ Các hợp chất Flavon và Phenolic phân lập từ phân đoạn Ethyl acetat của cây Thủy bồn thảo (<i>Sedum sarmentosum</i> Bunge) thu tại Sapa ”, <i>Tạp chí Dược học</i> , số 1/2019, (số 513 năm 59), trang: 58-61.
3	Dinh Xuan Doan, Sijia Sun, Ashraf M. Omar, Dong Thuong Nguyen, Anh Le Tuan Hoang, Hironori Fujiwara, Kinzo Matsumoto, Hang Thi Nguyet Pham, Suresh Awale (2020), “ Chemical constituents and absolute configuration reassignment of megastigmanes’ isolated from <i>Sedum sarmentosum</i> Bunge ” <i>Natural Product Research</i> , Published online: 20 Oct 2020.
4	Doan Xuan Dinh, Nguyen Thuong Dong, Pham Thi Nguyet Hang (2022), “ Hepatoprotective Effects and Safety Evaluation of Methanolic Extract from <i>Sedum sarmentosum</i> Bunge ” <i>Journal of Medicinal Materials</i> , 8/2022, Vol. 27, No. 4, 2022, 244-251.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

I. Tiếng việt.

1. Đỗ Trung Đàm (2014). *Phương pháp xác định độc tính của thuốc*, Nxb Y học - Hà Nội,.
2. Nguyễn Tiến Bản và Cs (2007). *Sách đỏ Việt Nam - Phần II - Thực vật*, NXB Khoa học tự nhiên và công nghệ. Trang 161-162.
3. Phạm Hoàng Hộ (2006). *Cây có vị thuốc ở Việt Nam*. Nhà xuất bản Trẻ. Trang 159.
4. Quyết định số 141/QĐ-KHĐT ngày 27/10/2015 của Cục Khoa học và Đào tạo Bộ Y tế hướng dẫn “*thử nghiệm tiền lâm sàng và lâm sàng thuốc đông y, thuốc từ dược liệu*”,
5. Viện Dược liệu - Bộ Y tế (2006). *Phương pháp nghiên cứu tác dụng dược lý của thuốc từ dược thảo*. Nxb. Khoa học và Kỹ thuật, 140- 149.
6. Viện sinh thái tài nguyên sinh vật, họ *Crassulaceae*, tr.768,
7. Võ Văn Chi (1997). *Từ điển cây thuốc Việt Nam*, tr.1282

II. Tiếng anh.

8. A.-M. He, M.-S. Wang, H.-Y. Hao, D.-C. Zhang, K. H. Lee. (1998) *Phytochemistry*, 49, 2607.
9. Aimin He; Mingshi Wang; Hongyan Hao; Decheng Zhang; Kuo-Hsiung Lee. (1998). Hepatoprotective triterpenes from *Sedum sarmentosum*. *Phytochemistry Vol. 49*, No. 8, pp. 2607-2610.
10. Angiosperm Phylogeny Group (2016). “An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV”, *Botanical Journal of the Linnean Society*. 181, 1-20.
11. Bai, Y., Chen, B., Hong, W., Liang, Y., Zhou, M., & Zhou, L. (2016). *Sedum sarmentosum* Bunge extract induces apoptosis and inhibits

proliferation in pancreatic cancer cells via the hedgehog signaling pathway. *Oncology reports*, 35(5), 2775-2784.

12. Bai, Y., Lu, H., Zhang, G., Wu, C., Lin, C., Liang, Y., & Chen, B. (2014). *Sedum sarmentosum* Bunge extract exerts renal anti-fibrotic effects in vivo and in vitro. *Life sciences*, 105(1-2), 22-30.
13. Bai, Y., Wu, C., Hong, W., Zhang, X., Liu, L., & Chen, B. (2017). Anti-fibrotic effect of *Sedum sarmentosum* Bunge extract in kidneys via the hedgehog signaling pathway. *Molecular Medicine Reports*, 16(1), 737-745.
14. Barrau, E., Fabre, N., Fouraste, I., & Hoste, H. (2005). Effect of bioactive compounds from Sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) on the in vitro larval migration of *Haemonchus contortus*: role of tanins and flavonol glycosides. *Parasitology*, 131(4), 531-538.
15. Bensouici, C., Kabouche, A., Karioti, A., Öztürk, M., Duru, M. E., Bilia, A. R., & Kabouche, Z. (2016). Compounds from *Sedum caeruleum* with antioxidant, anticholinesterase, and antibacterial activities. *Pharmaceutical biology*, 54(1), 174-179.
16. Benzie, I. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical biochemistry*, 239(1), 70-76.
17. Beyerman, H. C., Bordes, B. S. L., Maat, L., & Warnaar, F. M. (1972). Synthesis, optical rotatory dispersion and absolute configuration of (+)-N-methylallosedridine[(+)-(2R)-2-{(2S)-2-hydroxypropyl}-1-methylpiperidin] from *Sedum sarmentosum* Bunge and its isomers. *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas*, 91(12), 1441-1446.
18. Brown, R. P., Gerbarg, P. L., & Ramazanov, Z. (2002). *Rhodiola rosea*. A phytomedicinal overview. *HerbalGram*, 56, 40-52.
19. Cao, X. L., & YU, S. (2014). The antioxtion effect of *Sedum lineare* Thunb on adjuvant arthritis mice. *Journal of Gannan Medical University*, (3), 2.
20. Carrillo-Reyes, P., Sosa, V., Mort, M.E., 2009. Molecular phylogeny of the

Acre clade (Crassulaceae): Dealing with the lack of definitions for *Echeveria* and *Sedum*. *Mol. Phylogenet. Evol.* 53, 267-276.

21. Chang, H. M., & BUT, P. P. H. (1987). Chuipencao. *In Pharmacology and Applications of Chinese Materia Medica: (Volume II)* (pp. 766-768).
22. Chang, H. M., & BUT, P. P. H. (1987). Dangshen. *In Pharmacology and Applications of Chinese Materia Medica: (Volume II)* (pp. 989-994).
23. Chase, M. W., Christenhusz, M. J. M., Fay, M. F., Byng, J. W., Judd, W. S., Soltis, D. E., ... & Stevens, P. F. (2016). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: *APG IV*. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 181(1), 1-20.
24. Chen, M., & Sun, Q. (2021). Systemic pharmacology understanding of the key mechanism of *Sedum sarmentosum* Bunge in treating hepatitis. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 394(2), 421-430.
25. Cho, S., Lee, J., Rodriguez, J. P., Ryu, B. Y., Han, C. K., & Lee, S. (1989), (2017). A new 5 H-purin-6-amine from the leaves of *Sedum sarmentosum*. *Applied Biological Chemistry*, 60(2), 109-111.
26. Choi, J. Y., Kim, H. M., Mok, S. Y., Choi, K., Ku, J., Park, K. W., ... & Lee, S. (2012). Antibacterial activity and protective role against gastric cancer by *Sedum sarmentosum*. *Journal of Applied Biological Chemistry*, 55(3), 157-161.
27. College Jiangsu New Medical (1990). Dictionary of Chinese Materia Medica. Shanghai: *Shanghai Science and Technology Publishers*; p. 1142.
28. C. Hyeon Kyung, S. Won Se, K. Ki Hyun, K. Sun Yeou, L. Kang Ro, Phytochemical constituents of *Salsola komarovii* and their effects on NGF induction, 2014, 20 (2), 95-101.
29. D. Yu. Korulkin (1998). Candidate Dissertation in Chemical Sciences, All-Farabi *Kazakh State Univ.*, Almaty.
30. De Melo, G. O., Malvar, D. D. C., Vanderlinde, F. A., Pires, P. A., Côrtes, W. S., Germano Filho, P., ... & Costa, S. S. (2005). Phytochemical and

- pharmacological study of *Sedum dendroideum* leaf juice. *Journal of ethnopharmacology*, 102(2), 217-220.
31. De Oliveira, A. F., do Nascimento, G. E., Iacomini, M., Cordeiro, L. M. C., & Cipriani, T. R. (2017). *Chemical structure and anti-inflammatory effect of polysaccharides obtain*.
 32. Dutt, U. C. (1977). *The Materia Medica of the Hindus: Compiled from Sanskrit Medical Works*. Thacker, Spink.
 33. Eggli, U., (2005). *Illustrated Handbook of Succulent Plants*. Springer, Berlin, Heidenberg, New York, pp. 423-467.
 34. Evstatieva, L., Todorova, M., Antonova, D., & Staneva, J. (2010). Chemical composition of the essential oils of *Rhodiola rosea* L. of three different origins. *Pharmacognosy magazine*, 6(24), 256.
 35. F. Qin, H.-X. Sun, Z.-X. Ge (2006). *Journal of Traditional Chinese Veterinary Medicine* 2006. p 6, 33.
 36. Fang SD, Yan XQ, Li JF (1979). The isolation and structure of the active principle sarmentosin. *KeXue Tongbao* 24:431.
 37. Fang, S. D. (1982). Studies on the chemical constituents of *Sedum sarmentosum* bunge IV. The structures of sarmentosin and iso-sarmentosin. *Acta Chimica Sinica*, 40, 273.
 38. Fu và Ohba (2001) Fu, K., Ohba, H., 2001. Crassulaceae, in: Editorial Committee of Flora of China (Ed.) *Flora of China* 8. Missouri Botanical Garden Press, St. Louis, pp. 244-401.
 39. Gendaram, O., Choi, Y. H., Kim, Y. S., & Ryu, S. Y. (2011). Anti-oxidative and antibacterial constituents from *Sedum hybridum*. *Natural Product Sciences*, 17(4), 279-284.
 40. Guo-Wei Wang, Xiao-Long Zhang, Qing-Hua Wu, Yong-Biao Jin, Chun-Tao Ning, Rui Wang, Jing-Xin Mao, Min Chen, (2018). The hepatoprotective effects of *Sedum sarmentosum* extract and its isolated major constituent through Nrf2 activation and NF-κB inhibition,

Phytomedicine.

41. G.-y. Chen, C.-y. Dai, T.-s. Wang, C.-w. Jiang, C.-r. Han, X.-p. Song, (2010). A new flavonol from the stem-bark of *Premna fulva*, , ii 179-185.
42. Ha, Z., Zhu, Y., Zhang, X., Cui, J., Zhang, S., Ma, Y., ... & Jian, X. (2002). The effect of *Rhodiola* and acetazolamide on the sleep architecture and blood oxygen saturation in men living at high altitude. *Chinese journal of tuberculosis and respiratory diseases*, 25(9), 527-530.
43. Hao, L., Liu, M. W., Gu, S. T., Huang, X., Deng, H., & Wang, X. (2020). *Sedum sarmentosum* Bunge extract ameliorates lipopolysaccharide-and D-galactosamine-induced acute liver injury by attenuating the hedgehog signaling pathway via regulation of miR-124 expression. *BMC complementary medicine and therapies*, 20(1), 1-20.
44. Hart, H., Bleij, B., 2003. *Sedum*, in: Egli, U. (Ed.), *Illustrated Handbook of Succulent Plants: Crassulaceae*. Springer, Berlin, Germany, pp. 235-332.
45. Hassan, M. H., Elwekeel, A., Moawad, A., Afifi, N., Amin, E., & El Amir, D. (2021). Phytochemical constituents and biological activity of selected genera of family Crassulaceae: A review. *South African Journal of Botany*, 141, 383-404.
46. He, A., Hao, H., Wang, M., & Zhang, D. (1997). Sterols from *Sedum sarmentosum*. *Journal of China Pharmaceutical University*, 28(5), 271-274
47. He, A., Wang, M., Hao, H., Zhang, D., & Lee, K. H. (1998). Hepatoprotective triterpenes from *Sedum sarmentosum*. *Phytochemistry*, 49(8), 2607-2610.
48. H. Ren, H. Zhai, Y. Zhang, Y. Jin, S. Omori, (2013) Isolation of acetosyringone and cinnamic acids from straw soda cooking black liquor and simplified synthesis of hydroxyacetophenones, *Cellulose Chemistry and Technology*, , 47 (3), 219-229.
49. Hson-Mou Chang, Sih-Cheng Yao. (1987). *Pharmacology and Applications of Chinese Materia Medica*. *Chuipencao*. Pp 766-768.

50. H. Kanho, S. Yaoya, N. Kawahara, T. Nakane, Y. Takase, K. Masuda, M. Kuroyanagi. (2005) Biotransformation of benzaldehyde-type and acetophenone-type derivatives by *Pharbitis nil* hairy roots, 53 (4), 361-365.
51. Huang, D., Zhang, W., Huang, D., & Wu, J. (2010). Antitumor activity of the aqueous extract from *Sedum sarmentosum* Bunge in vitro. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, 25(1), 81-88.
52. H. Otsuka, X.-N. Zhong, E. Hirata, T. Shinzato, Y. Takeda. (2001) Myrsiniosides A-E: Megastigmane Glycosides from the Leaves of *Myrsine seguinii* LEV, 49 (9), 1093-1097.
53. Huang, L., Cheng, Y., Huang, K., Zhou, Y., Ma, Y., & Zhang, M. (2018). Ameliorative effect of *Sedum sarmentosum* Bunge extract on Tilapia fatty liver via the PPAR and P53 signaling pathway. *Scientific reports*, 8(1), 1-11.
54. Hyun-Joo Jung, Hyun-Jung Kang, Yun Seon Song, Eun-Hee Park, Young-Myeong Kim, Chang-Jin Lim. (2008). Anti-inflammatory, anti-angiogenic and anti-nociceptive activities of *Sedum sarmentosum* extract, *Journal of Ethnopharmacology*, 116 (2008) 138-143.
55. Institute of Botany, Chinese Academy of Science & Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Science. (1999). *Flora Reipublicae Popularis Sinicae, vol. 34. Beijing: Science Press; p. 72*
56. Ismail, S. M., Hui, C. K., Aminuddin, A., & Ugusman, A. (2018). *Piper sarmentosum* as an antioxidant: A systematic review. *Sains Malaysiana*, 47(10), 2359-2368.
57. Ito, T., Yu, C. C., Nakamura, K., Chung, K. F., Yang, Q. E., Fu, C. X., ... & Kokubugata, G. (2017). Unique parallel radiations of high-mountainous species of the genus *Sedum* (Crassulaceae) on the continental island of Taiwan. *Molecular phylogenetics and evolution*, 113, 9-22.
58. J. F. Li, X. L. Huang, C. Q. Ye, (1981). Determination of sarmentosime content in *Sedum sarmentosum* Bunge and its related species during different growing seasons. *Yao. Hsueh. Tung Pao*, 16, 12-13.

59. Ji Yeon Choi, Hye Min Kim, So-Youn Mok, Kyung Choi, Kwang-Woo Park, Eun Ju Cho, Sanghyun Lee. (2012). Antibacterial Activity and Protective Role against Gastric Cancer by *Sedum sarmentosum*. *J Appl Biol Chem* 55(3), 157-161.
60. Ji, K.L., Gan, X.Q., Xu, Y.K., Li, X.F., Guo, J., Dahab, M.M., Zhang, P., (2016). Protective effect of the essential oil of *Zanthoxylum myriacanthum* var. *Pubescens* against dextran sulfate sodium-induced intestinal inflammation in mice. *Phytomedicine* 23: 883-890.
61. Jiang Su. (1993). Encyclopedia of Chinese Materia Medica (Zhong Yao Da Chi Dian). *Shanghai Science and Technology Publisher*, pp. 608.
62. Jiang, Z., Han, Y., Zhang, Y., Li, J., & Liu, C. (2021). *Sedum sarmentosum* Bunge Attenuates Drug-Induced Liver Injury via Nrf2 Signaling Pathway: An Experimental Verification Based on Network Pharmacology Prediction. *Journal of Healthcare Engineering*.
63. Jiang, Z., Wang, X., Wang, J., Liu, C., & Pan, J. (2019). Simultaneous determination of 8 flavonoids in *Sedum sarmentosum* Bunge from different areas by UHPLC with triple quadrupole MS/MS. *Biomedical Chromatography*, e4601.
64. Jin, Y., Liu, L., Chen, B., Bai, Y., Zhang, F., Li, Q., ... & Yang, L. (2017). Involvement of the PI3K/Akt/NF- κ B Signaling Pathway in the Attenuation of Severe Acute Pancreatitis-Associated Acute Lung Injury by *Sedum sarmentosum* Bunge Extract. *BioMed research international*, 2017.
65. Jung, H. J., Kang, H. J., Song, Y. S., Park, E. H., Kim, Y. M., & Lim, C. J. (2008). Anti-inflammatory, anti-angiogenic and anti-nociceptive activities of *Sedum sarmentosum* extract. *Journal of ethnopharmacology*, 116(1), 138-143.
66. Kang TH, Pae HO, Yoo JC, et al. (2000). Antiproliferative effects of alkaloids from *Sedum sarmentosum* on murine and human hepatoma cell lines. *J Ethnopharmacol* 70:177-182.

67. Karaman, I., Şahin, F., Güllüce, M., Öğütçü, H., Şengül, M., & Adıgüzel, A. (2003). Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L. *Journal of ethnopharmacology*, 85(2-3), 231-235.
68. Kim CY, Lee MY, Park I. (2006). Antioxidant activities of fractions from *Sedum sarmentosum*. *J. Food Sci. Nutr.* 11: 6-9.
69. Kim, D. W., Son, K. H., Chang, H. W., Bae, K., Kang, S. S., & Kim, H. P. (2004). Anti-inflammatory activity of *Sedum kamtschaticum*. *Journal of ethnopharmacology*, 90(2-3), 409-414.
70. Kim, J. H., Hart, H. T., & Stevens, J. F. (1996). Alkaloids of some Asian *Sedum* species. *Phytochemistry*, 41(5), 1319-1324.
71. Kim, W. B., Park, Y. J., Park, M. R., HA, T. Y., Lee, S. H., Bae, S. J., & Kim, M. (2004). Estrogenic effects of *Sedum sarmentosum* Bunge in ovariectomized rats. *Journal of nutritional science and vitaminology*, 50(2), 100-105.
72. Kim, Y. D., Kim, Y. M., & Mo, E. K. (2017). Antibacterial, antioxidant, and antiaging effects of the ethanol extract of Dolnamul (*Sedum sarmentosum*) and the production of the oil in water cream. *Journal of the Society of Cosmetic Scientists of Korea*, 43(3), 211-221.
73. K. Umehara, I. Hattori, T. Miyase, A. Ueno, S. Hara, C. Kageyama. (1988). Studies on the constituents of leaves of *Citrus unshiu* MARCOV, 36 (12), 5004-5008.
74. Korul'kin, D. Y. (2001). Chemical composition of certain *Sedum* species of Kazakhstan. *Chemistry of natural compounds*, 37(3), 219-223.
75. K. Sasaki, T. Takahashi. (2002) A flavonoid from *Brassica rapa* flower as the UV-absorbing nectar guide, 61 (3), 339-343.
76. Lebda M.A., Taha N.M., Korshom M.A., Mandour A.E.A., Goda R.I. (2013). Ginger (*Zingiber officinale*) potentiate paracetamol induced chronic hepatotoxicity in rats. *International Journal of Toxicological and Pharmacological Research*. 5(4): 87-93.

77. Lee, S. L., Chin, T. Y., Lai, C. L., & Wang, W. H. (2015). *Sedum mexicanum* Britt. Induces apoptosis of primary rat activated hepatic stellate cells. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*.
78. Lian, L. H., Jin, X., Wu, Y. L., Cai, X. F., Lee, J. J., & Nan, J. X. (2010). Hepatoprotective Effects of *Sedum sarmentosum* on D-Galactosamine/Lipopolysaccharide - Induced Murine Fulminant Hepatic Failure. *Journal of pharmacological sciences*, 1009090445-1009090445.
79. Liao, Y. H., Wu, L. Z., Cheng, G. Z., Zhou, L., Sui, R. Y., & Zhou, Q. (2011). Anti-inflammatory Effect of *Sedum lineare* in Mice. *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae*, 3.
80. Lin, H., (1999). A taxonomic study of *Sedum* L. (Crassulaceae) of Taiwan. Doctor course thesis, *National Taiwan Normal University, Taipei, Taiwan*.
81. Lin, Y., Luo, H., Wang, X., Zheng, M., Jin, Q., Chen, H., ... & Zhang, J. (2018). Flavanones from *Sedum sarmentosum* Bunge alleviate CCl₄-induced liver fibrosis in rats by targeting TGF- β 1/T β R/Smad pathway in turn inhibiting epithelial mesenchymal transition. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*.
82. Lombe, B. K., Feineis, D., Mudogo, V., Brun, R., Awale, S., & Bringmann, G. (2018). Michellamines A 6 and A 7, and further mono-and dimeric naphthylisoquinoline alkaloids from a Congolese *Ancistrocladus liana* and their antiausterity activities against pancreatic cancer cells. *RSC advances*, 8(10), 5243-5254.
83. Lu, H., Cheng, S., Wu, C., Zheng, S., Hong, W., Liu, L., & Bai, Y. (2019). *Sedum sarmentosum* Bunge extract alleviates inflammation and kidney injury via inhibition of M1-macrophage polarization. *Phytomedicine*, 62, 152976.
84. Manners, G. D., & Davis, D. G. (1984). Epicuticular wax constituents of North American and European *Euphorbia esula* biotypes. *Phytochemistry*, 23(5), 1059-1062.

85. Marion, L., & Chaput, M. (1949). A new occurrence of dl-methylisopelletierine. *Canadian journal of research*, 27(4), 215-217.
86. Mayuzumi, S., & Ohba, H. (2004). The phylogenetic position of eastern Asian *Sedoideae* (Crassulaceae) inferred from chloroplast and nuclear DNA sequences. *Systematic Botany*, 29(3), 587-598.
87. Meléndez, M. C., Buendía, M. R., Ramos, D. Z., Cardona, P. C., & Villarreal, M. M. (2002). Study of the anti-inflammatory effect of *Sedum praealtum* (Siempreviva) in the rat: dose-dependent response. *In Proceedings of the Western Pharmacology Society* (Vol. 45, pp. 129-130).
88. M. Hye Yean, J. Sun Kim, S. Sik Kang, Y. Shik Kim. (2014) A New Megastigmane Glucoside and Three New Flavonoid Glycosides from *Spiraea prunifolia* var. *simpliciflora*, 97 (8), 1123-1131.
89. M.A.A. Alwahsh, M. Khairuddean, W.K. Chong. (2015) Chemical constituents and antioxidant activity of *Teucrium barbeyanum* Aschers, 9 (1), 159-163.
90. Mo, E. K., Han, B. H., Kim, S. M., Yang, S. A., Kang, S. K., Oh, C. J., ... & Sung, C. K. (2012). Identification of d-friedoolean-13-en-3-one (Taraxerone) as an antioxidant compound from sedum (*Sedum sarmentosum*). *Food Science and Biotechnology*, 21(2), 485-489.
91. M.S. Abdel-Kader, S.I. Alqasoumi, A.M. Al-Taweel. (2009) Hepatoprotective constituents from *Cleome droserifolia*, 57 (6), 620-624.
92. Mo, E. K., Kim, S. M., Yang, S. A., Oh, C. J., & Sung, C. K. (2011). Assessment of antioxidant capacity of *Sedum* (*Sedum sarmentosum*) as a valuable natural antioxidant source. *Food Science and Biotechnology*, 20(4), 1061-1067.
93. Morikawa, T., Zhang, Y., Nakamura, S., Matsuda, H., Muraoka, O., & Yoshikawa, M. (2007). Bioactive constituents from Chinese natural medicines. XXII. Absolute structures of new megastigmane glycosides, sedumosides E1, E2, E3, F1, F2, and G, from *Sedum sarmentosum*

- (Crassulaceae). *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 55(3), 435-441.
94. Megastigmanes and Their Glucosides from the Whole Plant of *Sedum sarmentosum*. *J. Nat. Prod.* 2007, 70, 575-583.
 95. National Committee for Clinical Laboratory Standards (1997). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test. *Wayne Pa. 6th ed. Approved Standard, M2-A6.*
 96. National Committee. Clinical Laboratory Standards. (1999). Performance standards for antimicrobial disc susceptibility test. *Approved Standard. NCCLS Publication M2-A5, Villanova, PA, USA.*
 97. Ninomiya, K., Morikawa, T., Zhang, Y., Nakamura, S., Matsuda, H., Muraoka, O., & Yoshikawa, M. (2007). Bioactive constituents from Chinese natural medicines. XXIII. Absolute structures of new megastigmane glycosides, sedumosides A4, A5, A6, H, and I, and hepatoprotective megastigmanes from *Sedum sarmentosum*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 55(8), 1185-1191.
 98. N.T.H. Van, N.T.H. Anh, T.V. Sung, K. Franke, L. Wessjohann, Stilbene. (2014). Ferulic acid and its derivatives from the roots of *Angelica sinensis*, *Journal of Chemistry*, 42 (4), 508-511.
 99. Oh, H., Kang, D. G., Kwon, J. W., Kwon, T. O., Lee, S. Y., Lee, D. B., & Lee, H. S. (2004). Isolation of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory flavonoids from *Sedum sarmentosum*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 27(12), 2035-2037.
 100. Pan, J. H., He, M. T., Luo, L., & Yan, J. (2001). Test of protecting liver and reducing enzyme levels on different extraction sites from *Sedum sarmentosum* Bunge. *Lishizhen Med Mater Med Res*, 12, 888.
 101. Pan, J. H., Xue, C. Y., Yan, J., & Liu, X. H. (2002). Test of protecting liver and reducing enzyme levels of isorhamnetin-3, 7-di-O- β -D-glucopyranoside. *Lishizhen Med Mater Med Res*, 13, 714-5.
 102. Papackova Z., Heczko M., Dankova H., Sticova E., Lodererova A.,

- Bartonova L., Poruba M., Cahova M. (2018). Silymarin prevents acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *PLoS One*, 13(1): e0191353.
103. Park, Y. J., Kim, M. H., & Bae, S. J. (2001). Effects of cytotoxicity and Quinone reductase induced activity of *Sedum sarmentosum* on Human cancer cells. In Proceedings of the Korean Society of Life Science Conference (pp. 40-40). *Korean Society of Life Science*.
104. Qin F., Sun H.X. (2008). Immunosuppressive activity of the ethanol extract of *Sedum sarmentosum* and its fractions on specific antibody and cellular responses to ovalbumin in mice. *Chemistry & Biodiversity*, 5(12), 2699-2709.
105. Qing, Z., Leifan, L., Lizhen, W., Xingling, C., Haijuan, M., & Zhihua, H. (2015). The effects of *Sedum lineare* Thunb on IL-10, TNF- α and NF- κ B protein expression in tumor tissue of S180-bearing mice. *Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica*, (2), 19.
106. R. Lloyd Praeger, B.A (1921). An account of the genus *Sedum* as found in cultivation. *Royal Horticultural Society*. Vol. XLVI: p226.
107. Ratty, A. K., Sunamoto, J., & Das, N. P. (1988). Interaction of flavonoids with 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl free radical, liposomal membranes and soybean lipoxygenase-1. *Biochemical pharmacology*, 37(6), 989-995.
108. Richard P. Brown, Patricia L. Gerbarg, Zakir Ramazanov. (2002). *Rhodiola rosea*: a phytomedicinal overview, *HerbalGram*, 56, 40-52.
109. R. Capasso, G. Cristinzio, A. Evidente, F. Scognamiglio. (1992). Isolation, spectroscopy and selective phytotoxic effects of polyphenols from vegetable waste waters, 31 (12), 4125-4128.
110. Sakar, M. K., Petereit, F., & Nahrstedt, A. (1993). Two phloroglucinol glucosides, flavan gallates and flavonol glycosides from *Sedum sediforme* flowers. *Phytochemistry*, 33(1), 171-174.
111. Sarkar, A., & Ganguly, S. N. (1979). Gymnorhizol, a new triterpene alcohol from *Bruguera gymnorhiza*. *Chemischer Informationsdienst*, 10(5),

no-no.

112. Sendl, A., Mulinacci, N., Vincieri, F. F., & Wagner, H. (1993). Anti-inflammatory and immunologically active polysaccharides of *Sedum telephium*. *Phytochemistry*, 34(5), 1357-1362.
113. Shevtsov, V. A., Zholus, B. I., Shervarly, V. I., Vol'skij, V. B., Korovin, Y. P., Khristich, M. P., ... & Wikman, G. (2003). A randomized trial of two different doses of a SHR-5 *Rhodiola rosea* extract versus placebo and control of capacity for mental work. *Phytomedicine*, 10(2-3), 95-105.
114. Song, Y.S., Kim, S.H., Sa, J.H., Jin, C., Lim, C.-J., Park, E.-H., (2003). Antiangiogenic, antioxidant and xanthine oxidase inhibition activities of the mushroom *Phellinus linteus*. *Journal of Ethnopharmacology* 88, 113-116.
115. Stephenson, R. (1994). *Sedum*: cultivated stonecrops. *Timber Press Inc.*
116. Stephenson, R., (1994). *Sedum* cultivated stonecrops. Timber Press, Portland, Oregon. Sun, Y., Wang, A., Wan, D., Wang, Q., Liu, J., (2012). Rapid radiation of *Rheum* (Polygonaceae) and parallel evolution of morphological traits. *Mol. Phylogenet. Evol.* 63, 150-158.
117. Takuro Ito, Chih-Chieh Yu, Koh Nakamura, Kuo-Fang Chung, Qin-er Yang, Cheng-Xin Fu, Zhe-Chen Qi, Goro Kokubugata (2017). Unique parallel radiations of high-mountainous species of the genus *Sedum* (Crassulaceae) on the continental island of Taiwan. *Molecular Phylogenetics and Evolution Volume* 113, P 9-22.
118. Tanaka, R., & Matsunaga, S. (1988). Triterpene constituents from *Euphorbia supina*. *Phytochemistry*, 27(11), 3579-3584.
119. Thiede, J., Egli, U., (2007). Crassulaceae, in: Kubitzki, K. (Ed.) The families and genera of vascular plants vol. 9. Springer, *Berlin Heidelberg*, pp. 83-118.
120. Turner R.A. (1965). Screening methods in pharmacology, Vol 1, *Test for hematocity*, 299-300.

121. U. Ligaa. (1996) Medicinal plants of Mongolia used in Mongolian traditional medicine. *Seoul, Korea*, 339-340.
122. U. Harput, I. Calis, I. Saracoglu, A. Dönmez, A. Nagatsu. (2006) Secondary metabolites from *Phlomis syriaca* and their antioxidant activities, *Turkish Journal of Chemistry*, 30 383-390.
123. Wafa, N., & Sofiane, G. (2016). Evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of tanins extracted from *Sedum pubescens* Vahl. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 8(4), 1382-1387.
124. Wang, G. W., Zhang, X. L., Wu, Q. H., Jin, Y. B., Ning, C. T., Wang, R., ... & Chen, M. (2019). The hepatoprotective effects of *Sedum sarmentosum* extract and its isolated major constituent through Nrf2 activation and NF- κ B inhibition. *Phytomedicine*, 53, 263-273.
125. Wang, L., Mei, Q., & Wan, D. (2014). Simultaneous determination by HPLC of quercetin and kaempferol in three *Sedum* medicinal plants harvested in different seasons. *Journal of Chromatographic Science*, 52, 334-338.
126. Wang, M. (1997). Flavonoids from stringy stonecrop (*Sedum sarmentosum*). *Chinese traditional and herbal drugs*, 28(9), 517-522
127. Wollenweber, E. (1974). Zum Vorkommen von δ -Amyrenon in Alnus-Arten/On the Occurrence of δ -Amyrenone in Alnus-Species. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 29(7-8), 362-363.
128. Wollenweber, E., Doerr, M., Siems, K., Faure, R., Bombarda, I., & Gaydou, E. M. (1999). Triterpenoids in lipophilic leaf and stem coatings. *Biochemical systematics and ecology*, 27(1), 103-105.
129. Xing-ling CAO, Rong-yan SUI, Hai-juan MA, Qing ZHOU, Li-zhen WU, Zhi-hua HUANG. (2013). Therapeutic effect of *Sedum lineare* Thunb on adjuvant arthritis rat and its mechanism. *Acta Pharmacologica Sinica* volume 34, pages S81-S99.
130. Xu, F., Wang, C., Wang, H., Xiong, Q., Wei, Y., & Shao, X. (2018).

Antimicrobial action of flavonoids from *Sedum aizoon* L. against lactic acid bacteria in vitro and in refrigerated fresh pork meat. *Journal of Functional Foods*, 40, 744-750.

131. Xu, Z., & Deng, M. (2017). *Crassulaceae*. In Identification and Control of Common Weeds: Volume 2 (pp. 475-477). Springer, Dordrecht.
132. Y Bai, B Chen, Y Liang, M Zhou, L Zhou (2016), *Sedum sarmentosum* Bunge extract induces apoptosis and inhibits proliferation in pancreatic cancer cells via the hedgehog signaling pathway, *Oncology reports* 35 (5), 2775-2784.
133. Y. Bai et al. (2014). *Sedum sarmentosum* Bunge extract exerts renal anti-fibrotic effects in vivo and in vitro. *Life Sciences* 105(1-2):22-30.
134. Y. Bai et al (2017). Anti-fibrotic effect of *Sedum sarmentosum* Bunge extract in kidneys via the hedgehog signaling pathway. *Molecular Medicine Reports* 16: 737.
135. Yang, P. C., Bai, W. Z., Wang, J., Yan, C. H., Huang, W. F., & Jiang, S. Z. (2020). *Sedum sarmentosum* Total Flavonoids Alleviate Schistosomiasis-Induced Liver Fibrosis by Altering TGF- β 1 and Smad7 Expression. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*.
136. Yoshikawa, M., Morikawa, T., Zhang, Y., Nakamura, S., Muraoka, O., & Matsuda, H. (2007). Megastigmanes and their glucosides from the whole plant of *Sedum sarmentosum*. *Journal of Natural products*, 70(4), 575-583.
137. Yu, K., Huang, K., Jiang, S., Tang, X., Huang, X., Sun, L., ... & Mo, C. (2021). Protective function on liver and proteomic analysis of the improvement mechanism of *Sedum sarmentosum* Bunge extract on nonalcoholic fatty liver disease in Nile tilapia. *Aquaculture*, 531, 735977.
138. Y. Zhang, D. Wang, L. Yang, D. Zhou, J. Zhang. (2014) Purification and characterization of flavonoids from the leaves of *Zanthoxylum bungeanum* and correlation between their structure and antioxidant activity, 9 (8), e105725.

139. Zhang Jun-sheng, Chen Li-hua, Hou Xiao-xuan et al. (2012). Ultrasonic-assisted ethanol extraction and antioxidant activity of total flavonoids from *Sedum sarmentosum* Bunge. *Food Science*, 33(8), 18-23.
140. Zhang, X., Bi, C., Chen, Q., Xu, H., Shi, H., & Li, X. (2021). Structure elucidation of arabinogalactoglucon isolated from *Sedum sarmentosum* Bunge and its inhibition on hepatocellular carcinoma cells *in vitro*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 180, 152-160.
141. Zhang, Y., Tang, K., & Song, H. (2019). Research Advance in the Effect and Mechanism of Active Compounds of *Sedum sarmentosum* on Improving Liver Injury.
142. Zhou, Q., Liu, J. X., Zhou, L., Xiong, X. Q., & Zhao, H. Y. (2005). Protective Effects of *Sedum Lineare* Thunb on Experimental Acute Hepatic Injury in Mice [J]. *LiShiZhen Medicine and Materia Medica Research*, 12. page:1228-1229,1231.
143. Zhu, Z. B., Yang, J. F., Guo, Q. S., Liu, F., Wang, R., & Zhang, W. X. (2018). Effects of light intensity on growth, quality and antioxidant activities of *Sedum sarmentosum*. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 43(22), 4404-4409.