

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

VIỆN DƯỢC LIỆU



NGUYỄN VIỆT DŨNG

**NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM THỰC VẬT,
THÀNH PHẦN HÓA HỌC VÀ MỘT SỐ TÁC DỤNG
SINH HỌC CỦA CÂY BAN LÁ DÍNH
Hypericum sampsonii Hance., họ Ban (Hypericaceae)**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ DƯỢC HỌC

HÀ NỘI, NĂM 2023

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

VIỆN DƯỢC LIỆU

NGUYỄN VIỆT DŨNG

NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM THỰC VẬT,
THÀNH PHẦN HÓA HỌC VÀ MỘT SỐ TÁC DỤNG
SINH HỌC CỦA CÂY BAN LÁ DÍNH
Hypericum sampsonii Hance., họ Ban (Hypericaceae)

Chuyên ngành: Dược liệu - Dược học cổ truyền

Mã số: 9720206

LUẬN ÁN TIẾN SĨ DƯỢC HỌC

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:

- PGS.TS. Nguyễn Duy Thuận
- PGS.TS. Phạm Thị Vân Anh

HÀ NỘI, NĂM 2023

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của riêng tôi với sự hướng dẫn của PGS.TS. Nguyễn Duy Thuận, PGS.TS. Phạm Thị Vân Anh. Các số liệu, kết quả nêu trong luận án là trung thực và chưa từng được ai công bố trong bất kỳ công trình nào khác.

Tác giả

Nguyễn Việt Dũng

LỜI CẢM ƠN

Trong quá trình thực hiện luận án tại Viện Dược liệu, tôi đã nhận được rất nhiều sự giúp đỡ quý báu của các thầy, cô, các nhà khoa học thuộc nhiều lĩnh vực cùng bạn bè đồng nghiệp và gia đình.

Trước hết, tôi xin trân trọng cảm ơn Ban lãnh đạo, các khoa phòng Viện Dược Liệu. Ban giám đốc, Khoa dược Viện YHCT Quân đội đã tạo mọi điều kiện thuận lợi nhất giúp tôi hoàn thành công trình này.

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới PGS. TS Nguyễn Duy Thuận và PGS. TS Phạm Thị Vân Anh, những người thầy đã tận tình hướng dẫn, hết lòng giúp đỡ và tạo mọi điều kiện cho tôi trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu thực hiện luận án.

Xin bày tỏ lòng cảm ơn tới: PGS.TS Phương Thiện Thương, PGS.TS. Nguyễn Thị Bích Thu, PGS.TS. Đỗ Thị Hà, TS. Phạm Thanh Huyền, ThS. Nguyễn Quỳnh Nga, CN. Hoàng Văn Toán - Viện Dược liệu; TS. Nguyễn Thế Cường Viện sinh thái và Tài nguyên sinh vật, PGS. TS Hoàng Lê Tuấn Anh Viện hóa sinh vật biển - Viện hàn lâm khoa học và công nghệ Việt Nam đã có những ý kiến đóng góp quý báu giúp tôi hoàn thiện luận án.

Xin trân trọng cảm ơn các đồng nghiệp Khoa tài nguyên dược liệu, phòng quản lý khoa học - Viện Dược liệu; Bộ môn Dược liệu, Bộ môn Thực vật Trường Đại học Dược Hà Nội; Bộ môn Dược lý Trường Đại học Y Hà Nội; Khoa Dược Viện YHCT Quân đội; Viện sinh thái tài nguyên, Viện hóa sinh vật biển - Viện hàn lâm khoa học và công nghệ Việt Nam đã nhiệt tình giúp đỡ và cộng tác để hoàn thành luận án.

Xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc đến những người thân trong gia đình đã luôn ủng hộ, chia sẻ và tạo mọi điều kiện tốt nhất để tôi hoàn thành luận án này.

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

Tác giả

Nguyễn Việt Dũng

MỤC LỤC

Trang phụ bì	
Lời cam đoan	
Lời cảm ơn	
Mục lục	
Danh mục chữ viết tắt	
Danh mục các bảng	
Danh mục các hình	
ĐẶT VẤN ĐỀ	1
CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN	3
1.1. Tổng quan về chi <i>Hypericum</i> L.....	3
1.1.1. Vị trí phân loại của chi <i>Hypericum</i> L.	3
1.1.2. Phân bố của chi <i>Hypericum</i> L.	6
1.1.3. Đặc điểm thực vật chi <i>Hypericum</i> L.....	8
1.1.4. Thành phần hóa học của chi <i>Hypericum</i> L.....	9
1.1.5. Tác dụng sinh học của chi <i>Hypericum</i> L.	14
1.2. Tổng quan về cây ban lá dím	16
1.2.1. Vị trí phân loại	16
1.2.2. Đặc điểm thực vật.....	17
1.2.3. Phân bố	19
1.2.4. Thành phần hóa học.....	20
1.2.5. Tác dụng sinh học	23
1.2.6. Công dụng và liều dùng.....	26
CHƯƠNG 2: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	27
2.1. Đối tượng nghiên cứu.....	27
2.1.1. Mẫu nghiên cứu.....	27
2.1.2. Hóa chất, dung môi	28
2.1.3. Thiết bị và dụng cụ nghiên cứu	29
2.2. Phương pháp nghiên cứu	30
2.2.1. Giám định tên khoa học, mô tả đặc điểm hình thái thực vật và nghiên cứu đặc điểm vi học các mẫu nghiên cứu.....	31

2.2.2. Nghiên cứu thành phần hóa học phần trên mặt đất cây ban lá dính.....	31
2.2.3. Đánh giá độc tính cấp của cao chiết BLD1	32
2.2.4. Nghiên cứu một số tác dụng sinh học của cao chiết BLD1 và một số chất tinh khiết phân lập được.....	32
2.2.5. Xử lý số liệu	43
CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU	44
3.1. Kết quả mô tả đặc điểm hình thái thực vật, giám định tên khoa học và xác định đặc điểm vi học của mẫu nghiên cứu	44
3.1.1. Đặc điểm hình thái thực vật	44
3.1.2. Giám định tên khoa học.....	45
3.1.3. Đặc điểm vi học.....	46
3.2. Kết quả nghiên cứu thành phần hóa học phần trên mặt đất cây ban lá dính	50
3.2.1. Định tính các nhóm chất hữu cơ	50
3.2.2. Xác định cấu trúc các hợp chất phân lập từ phần trên mặt đất cây ban lá dính.....	51
3.3. Kết quả đánh giá độc tính cấp của cao chiết BLD1.....	82
3.4. Kết quả nghiên cứu một số tác dụng sinh học của cao chiết BLD1 và một số chất tinh khiết phân lập được	82
3.4.1. Đánh giá hoạt tính chống oxy hóa in vitro của cao chiết BLD1 và một số chất tinh khiết phân lập được	82
3.4.2. Đánh giá hoạt tính chống viêm in vitro của cao chiết BLD1 và một số chất tinh khiết phân lập được.....	84
3.4.3. Đánh giá hoạt tính ức chế enzym acetylcholinesterase in vitro của cao chiết BLD1 và một số chất tinh khiết phân lập được	86
3.4.4. Kết quả nghiên cứu tác dụng chống oxy hóa bảo vệ gan in vivo của cao chiết BLD1	87
3.4.5. Kết quả nghiên cứu tác dụng cải thiện trí nhớ in vivo của cao chiết BLD1	92
CHƯƠNG 4: BÀN LUẬN.....	99
4.1. Về thực vật học	99
4.2. Về thành phần hóa học	101
4.2.1. Về kết quả định tính các nhóm chất hữu cơ.....	101

4.2.2. Về kết quả phân lập và xác định cấu trúc các hợp chất.....	101
4.3. Về đánh giá độc tính cấp của cao chiết BLD1	106
4.4. Về đánh giá một số tác dụng sinh học của cao chiết BLD1 và một số chất tinh khiết phân lập được	107
4.4.1. Về hoạt tính chống oxy hóa in vitro của cao chiết BLD1 và một số chất tinh khiết phân lập được.....	107
4.4.2. Về hoạt tính chống viêm in vitro của cao chiết BLD1 và một số chất tinh khiết phân lập được	109
4.4.3. Về hoạt tính ức chế enzym acetylcholinesterase in vitro của cao chiết BLD1 và một số chất tinh khiết phân lập được	110
4.4.4. Về tác dụng chống oxy hóa bảo vệ gan in vivo của cao chiết BLD1	112
4.4.5. Về tác dụng cải thiện trí nhớ in vivo của cao chiết BLD1	114
KẾT LUẬN.....	117
KIẾN NGHỊ.....	119
TÀI LIỆU THAM KHẢO	
PHỤ LỤC	

DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT TRONG LUẬN ÁN

Viết tắt	Viết đầy đủ	Tiếng Việt
(NF-κ)	Nuclear factor-kappa	
[α] _D	Specific Optical Rotation	Độ quay cực
¹³ C-NMR	Carbon 13 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân cacbon 13
¹ H-NMR	Proton Magnetic Resonance Spectroscopy	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân proton
AChE	Enzym acetylcholinesterase	
DNA	Deoxyribonucleic acid	
ALT	Alanin Aminotransferase	
APG	Angiosperm Phylogeny Group System	Hệ thống phân loại thực vật có hoa hiện đại
APG III	Angiosperm Phylogeny Group System III	Hệ thống phân loại thực vật có hoa hiện đại III
APG IV	Angiosperm Phylogeny Group System IV	Hệ thống phân loại thực vật có hoa hiện đại IV
AST	Aspartat Aminotransferase	
ALT	Alanine Aminotransferase	
BLD		Ban lá dính
BLD1		Cao chiết nước phần trên mặt đất của cây Ban lá dính
BuChE	Butylcholinesterase	
CC	Column Chromatography	Sắc ký cột
CCl ₄	Carbon tetrachlorid	
CD	Circular Dichroism	Phổ lưỡng sắc tròn
CD ₃ OD	Deuterated methanol	
CDCl ₃	Deuterated chloroform	
COSY	¹ H- ¹ H Correlation Spectroscopy	Phổ Cosy
COX-2	Enzym cyclooxygenase-2	
Cs		Cộng sự
CTPT		Công thức phân tử
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarisation Transfer	Phổ DEPT
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	

DMSO	Dimethyl sulfoxid	
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl	
DTNB	5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid)	
ED ₅₀	Effective dose	Liều có hiệu quả ở 50% số con vật thí nghiệm
FBS	Fetal bovine serum	
FC	Flavonoid	
G6Pase	Enzym glucose-6-phosphatase	
GSH	Glutathione	
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Connectivity	
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	Sắc ký lỏng hiệu năng cao
HR-ESI-MS	High-resolution electrospray ionisation mass spectrometry	Phổ khối lượng phân giải
HSCCC	High-speed counter-current chromatography	
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence	Phổ HSQC
IL	Interleukin	
IC ₅₀	Inhibitory Concentration	Nồng độ ức chế 50%
iNOS	Inducible nitric oxid synthase	
JAK-STATs	Janus kinase-signal transducers and activators of transcription.	
KH		Khoa học
LD ₅₀	Lethal dose 50	Liều gây chết 50%
LPS	Lipopolysaccharid	
LT	Luteolin	
MAPKs	Enzym mitogen-activated protein kinase	
MDA	Malonyl dialdehyd	
Mp	Melting point	Điểm nóng chảy
mRNA	Messenger Ribonucleic acid	
MS	Mass Spectrometry	Phổ khối lượng
MTT	[3- (4,5- dimethylthiazol-2-YL) 2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid]	Phương pháp đánh giá hoạt tính diệt tế bào ung thư, sử dụng MTT

NC		Nghiên cứu
NCI	National Cancer Institute	
NMR	Nuclear magnetic resonance spectrometry	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân
NO	Nitric oxid	
NOESY	Nucler Overhauser Effect Spectroscopy	Phổ NOESY
OD	Optical Density	Mật độ quang học
RP-18	Reserve phase C-18	Chất hấp phụ pha đảo C - 18
P/ ư		Phản ứng
PE	Polyethylen	
PG	Prostaglandin	
PPAP	Polycyclic polyprenylated acylphloroglucinols	
QU	Quercetin	
SRB	Sulforhodamine B	
TBUT		Tế bào ung thư
TCA	Acid Trichloracetic	
TD		Tác dụng
TLC	Thin layer chromatography	Sắc ký lớp mỏng
TLCT		Trọng lượng cơ thể
TLTK		Tài liệu tham khảo
TMS	Tetrametyl Silan	
TNF	Tumor necrosis factor	Yếu tố hoại tử khối u
UV	Ultra Violet	
YHCT		Y học cổ truyền
WHO	World Health Qrganization	Tổ chức Y tế thế giới

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 1.1: Vị trí phân loại của họ Ban (<i>Hypericaceae</i>)	3
Bảng 1.2. Vị trí phân loại của chi <i>Hypericum</i> L.	4
Bảng 1.3. Danh sách các loài thuộc chi <i>Hypericum</i> L.	7
Bảng 1.4. Các hợp chất có hoạt tính sinh học của loài <i>Hypericum perforatum</i> .	10
Bảng 1.5. Các hợp chất có hoạt tính gây độc tế bào và chống viêm trong cây ban lá dính.....	24
Bảng 3.1: Kết quả định tính các nhóm chất chính trong phần trên mặt đất.....	50
cây ban lá dính.....	50
Bảng 3.2. Số liệu phổ NMR của hợp chất HSA1.....	54
Bảng 3.3. Số liệu phổ NMR của hợp chất HSA2.....	56
Bảng 3.4. Số liệu phổ NMR của hợp chất HSA4 và hợp chất tham khảo.....	58
Bảng 3.5. Số liệu phổ NMR của hợp chất HSA6.....	59
Bảng 3.6. Số liệu phổ NMR của hợp chất HSA9.....	61
Bảng 3.7. Số liệu phổ NMR của hợp chất HSA11.....	63
Bảng 3.8. Số liệu phổ NMR của hợp chất HSA12.....	65
Bảng 3.9. Số liệu phổ NMR của hợp chất HSA13.....	67
Bảng 3.10. Số liệu phổ NMR của hợp chất HSA15	68
Bảng 3.11. Số liệu phổ NMR của hợp chất HSA16	70
Bảng 3.12. Số liệu phổ NMR của hợp chất HSA17	71
Bảng 3.13. Số liệu phổ NMR của hợp chất HSA18	73
Bảng 3.14. Số liệu phổ NMR của hợp chất HSA20	75
Bảng 3.15. Số liệu phổ NMR của hợp chất HSA21	77
Bảng 3.16. Số liệu phổ NMR của hợp chất HSA22	79
Bảng 3.17. Kết quả đánh giá độc tính cấp của cao chiết BLD1	82
Bảng 3.18. Kết quả hoạt tính thu dọn gốc tự do DPPH của cao chiết BLD1 và một số chất tinh khiết phân lập được	83
Bảng 3.19. IC ₅₀ của các mẫu có hoạt tính chống oxy hóa	84
Bảng 3.20. Hoạt tính ức chế sự sản sinh NO của các mẫu nghiên cứu	84
Bảng 3.21. IC ₅₀ của các mẫu có tác dụng ức chế sự sản sinh NO	85

Bảng 3.22. Kết quả đánh giá hoạt tính ức chế enzym acetylcholinesterase của các mẫu nghiên cứu.....	86
Bảng 3.23. IC ₅₀ của các mẫu có hoạt tính ức chế enzym acetylcholinesterase ..	87
Bảng 3.24. Kết quả ảnh hưởng của cao chiết BLD1 lên trọng lượng gan chuột	87
Bảng 3.25. Kết quả ảnh hưởng của cao chiết BLD1 lên hoạt độ AST	88
Bảng 3.26. Kết quả ảnh hưởng của cao chiết BLD1 lên hoạt độ ALT	89
Bảng 3.27. Kết quả ảnh hưởng của cao chiết BLD1 lên nồng độ MDA	89
Bảng 3.28. Ảnh hưởng của cao chiết BLD1 đến thời gian chuột tìm thấy bեն đố .	92
Bảng 3.29. Ảnh hưởng của cao chiết BLD1 đến % thời gian chuột bơi ở 1/4 bể trước đó có chứa bեն đố	93
Bảng 3.30. Ảnh hưởng của cao chiết BLD1 đến % quãng đường chuột bơi ở 3/4 bể trước đó không chứa bեն đố	94
Bảng 3.31. Ảnh hưởng của cao chiết BLD1 đến thời gian chuột tìm thấy khoang đích	94
Bảng 3.32. Ảnh hưởng của cao chiết BLD1 đến chiều dài quãng đường chuột đi để tới được khoang đích	97
Bảng 4.1. Các hợp chất phân lập được từ phần trên mặt đất cây ban lá dính thu hái ở xã Hà Vĩ, huyện Bạch Thông (Bắc Kạn)	103

DANH MỤC CÁC HÌNH

Hình 1.1. Hình ảnh cây ban lá dính ở thời kỳ ra hoa.....	17
Hình 1.2. Đặc điểm vi phẫu lá của cây ban lá dính	18
Hình 2.1. Sơ đồ chiết xuất cao chiết BLD1 (3:1)	27
Hình 2.2. Phản ứng của gốc tự do DPPH với hợp chất chống oxy hóa	33
Hình 2.3. Sơ đồ thiết kế nghiên cứu tác dụng cải thiện trí nhớ	38
Hình 2.4. Mô hình mê cung nước Morris.....	38
Hình 2.5. Sơ đồ nghiên cứu tác dụng cải thiện trí nhớ trên mô hình MWM	40
Hình 2.6. Mô hình mê công nhiều chữ T	40
Hình 2.7. Sơ đồ nghiên cứu tác dụng cải thiện trí nhớ trên mô hình MTM.....	41
Hình 2.8. Mô hình trục quay Rotarod.....	42
Hình 2.9. Sơ đồ nghiên cứu tác dụng cải thiện trí nhớ trên mô hình Rotarod	43
Hình 3.1. Một số đặc điểm hình thái cây ban lá dính.....	44
Hình 3.2. Tiêu bản cây ban lá dính (2016) lưu tại Viện Dược liệu.....	46
Hình 3.3. Tiêu bản cây ban lá dính (2016) lưu tại Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật.....	46
Hình 3.4. Vi phẫu lá cây ban lá dính.....	46
Hình 3.5. Vi phẫu thân cây ban lá dính	47
Hình 3.6. Vi phẫu rễ cây ban lá dính	48
Hình 3.7. Đặc điểm bột thân cây ban lá dính.....	48
Hình 3.8. Đặc điểm bột lá cây ban lá dính	49
Hình 3.9. Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC chính của hợp chất HSA1.....	54
Hình 3.10. Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC chính của hợp chất HSA2	56
Hình 3.11. Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC chính của hợp chất HSA4	57
Hình 3.12. Cấu trúc hóa học của hợp chất HSA6.....	59

Hình 3.13. Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC chính của hợp chất HSA9	62
Hình 3.14. Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC chính của hợp chất HSA11 ..	63
Hình 3.15. Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC chính của hợp chất HSA12 ..	65
Hình 3.16. Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC chính của hợp chất HSA13 ..	66
Hình 3.17. Cấu trúc hóa học của hợp chất HSA15	68
Hình 3.18. Cấu trúc hóa học của hợp chất HSA16	69
Hình 3.19. Cấu trúc hóa học của hợp chất HSA17	71
Hình 3.20. Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC chính của hợp chất HSA18 ..	74
Hình 3.21. Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC chính của hợp chất HSA20 ..	76
Hình 3.22. Cấu trúc hóa học của hợp chất HSA21	76
Hình 3.23. Cấu trúc hóa học của hợp chất HSA22	78
Hình 3.24. Sơ đồ phân lập các hợp chất từ phần trên mặt đất cây ban lá dính từ cặn dichloromethan	80
Hình 3.25. Sơ đồ phân lập các hợp chất từ phần trên mặt đất cây ban lá dính từ cặn ethyl acetat.....	81
Hình 3.26. Hình ảnh đại thể và vi thể gan chuột lô chứng sinh học (chuột số 72).....	90
Hình 3.27. Hình ảnh đại thể và vi thể gan chuột lô mô hình (chuột số 90).....	90
Hình 3.28. Hình ảnh đại thể và vi thể gan chuột lô silymarin (chuột số 05).....	91
Hình 3.29. Hình ảnh đại thể và vi thể gan chuột lô dùng cao chiết BLD1 liều 3,6 g/kg (chuột số 62).....	91
Hình 3.30. Hình ảnh đại thể và vi thể gan chuột lô dùng cao chiết BLD1 liều 10,8 g/kg (chuột số 68)	91
Hình 3.31. Ảnh hưởng của cao chiết BLD1 đến thời gian chuột tìm thấy khoang đích	96
Hình 3.32. Ảnh hưởng của cao chiết BLD1 đến thời gian chuột ở trên trục quay	97
Hình 4.1. Cấu trúc hóa học của 15 hợp chất phân lập từ phần trên mặt đất cây ban lá dính.....	105

ĐẶT VẤN ĐỀ

Trên thế giới hiện nay với sự phát triển, tiến bộ không ngừng của khoa học công nghệ, kinh tế xã hội, chất lượng cuộc sống của con người ngày càng được nâng cao và cải thiện. Bên cạnh đó, sự tác động của phát triển khoa học và kinh tế cũng đã ảnh hưởng không nhỏ đến môi trường, xã hội và đặc biệt là sức khỏe của cộng đồng. Theo thống kê của Tổ chức y tế Thế giới thì tỉ lệ mắc một số chứng bệnh hiểm nghèo của con người càng ngày càng gia tăng, cũng như xuất hiện một số loại bệnh mới. Một số bệnh mà có tỷ lệ mắc cao hiện nay như: tiểu đường, huyết áp, tim mạch, Alzheimer và một số bệnh có liên quan tới cholesterol ... Để phòng và điều trị bệnh, các nhà nghiên cứu Y Dược đang quan tâm chú ý khai thác các hợp chất tự nhiên, mà chủ yếu là từ dược liệu bởi tính ưu việt của nó là có hiệu quả nhưng ít độc hại.

Cây ban lá dính (*Hypericum sampsonii* Hance.) có nguồn gốc ở Trung Quốc, Việt Nam, Nhật Bản, Ấn Độ và Myanmar. Ở Việt Nam, cây ban lá dính thường mọc dại ở những nơi đất ẩm, ở ven rừng, chân ruộng nước, bãi cỏ. Theo y học cổ truyền và kinh nghiệm dân gian, cây ban lá dính thường được sử dụng để điều trị nhiều loại bệnh như chảy máu cam, thổ huyết, đái ra máu, lý, kinh nguyệt không đều, ho, ra mồ hôi trộm ... Ngày nay, nhiều nghiên cứu đã chứng minh cây ban lá dính có một số tác dụng sinh học như giải lo âu, trị suy nhược tâm thần, giảm sự phát triển của khối u, kháng khuẩn, tác dụng chống trầm cảm, tác dụng chống viêm và giảm đau, ức chế thần kinh trung ương, chống oxy hóa, tăng cường miễn dịch [1], [2].

Hiện nay, ở nước ta chưa có công trình nghiên cứu nào công bố về thành phần hóa học, tác dụng sinh học của cây ban lá dính, và việc sử dụng cây này làm thuốc còn mang tính kinh nghiệm dân gian. Nhằm tạo cơ sở khoa học cho khai thác và sử dụng có hiệu quả hơn cây ban lá dính làm thuốc chữa bệnh ở Việt Nam, đề tài “**Nghiên cứu đặc điểm thực vật, thành phần hóa học và một số tác dụng**

sinh học của cây ban lá dính - *Hypericum sampsonii* Hance., họ Ban (Hypericaceae)” được thực hiện với ba mục tiêu sau:

1. Giám định tên khoa học, nghiên cứu đặc điểm thực vật và đặc điểm vi học của thân, lá, rễ cây ban lá dính.

2. Nghiên cứu thành phần hóa học phần trên mặt đất cây ban lá dính.

3. Đánh giá độc tính cấp của cao chiết phần trên mặt đất cây ban lá dính, nghiên cứu một số tác dụng sinh học của cao chiết phần trên mặt đất cây ban lá dính và một số hoạt chất phân lập được.

Để thực hiện ba mục tiêu trên, các nội dung nghiên cứu gồm:

1. Giám định tên khoa học, mô tả đặc điểm hình thái thực vật, nghiên cứu đặc điểm vi học các mẫu nghiên cứu.
2. Nghiên cứu thành phần hóa học: định tính các nhóm chất hữu cơ, chiết xuất, phân lập và xác định cấu trúc các hợp chất trong phần trên mặt đất cây Ban lá dính.
3. Đánh giá độc tính cấp của cao chiết phần trên mặt đất cây ban lá dính.
4. Nghiên cứu tác dụng chống oxy hóa, chống viêm, hoạt tính ức chế enzym acetylcholinesterase *in vitro* cao chiết phần trên mặt đất cây ban lá dính và một số hoạt chất phân lập được.
5. Nghiên cứu tác dụng bảo vệ gan, cải thiện trí nhớ *in vivo* của cao chiết phần trên mặt đất cây ban lá dính.

CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN

1.1. Tổng quan về chi *Hypericum* L.

1.1.1. Vị trí phân loại của chi *Hypericum* L.

1.1.1.1. Vị trí phân loại của họ Ban (*Hypericaceae*)

Bảng 1.1: Vị trí phân loại của họ Ban (*Hypericaceae*)

Tác giả / Bậc phân loại	Robson (1977, 1981,1985, 1987, 1990)	Bậc phân loại	A.P.G. IV (2016)
Ngành		Nhánh (clade)	Angiospermae
Lớp	<i>Equisetopsida</i> C. Agardh	Nhánh	Eudicots
Phân lớp	<i>Magnoliidae</i> Novák ex Takht	Nhánh	Rosids
Bộ	<i>Malpighiales</i> Juss. ex Bercht. & J. Presl	Bộ	Malpighiales
Họ	<i>Hypericaceae</i>	Họ	Hypericaceae

Họ Ban (*Hypericaceae*) được Antoine Laurent de Jussieu đưa ra năm 1789 là một họ thực vật có hoa bao gồm khoảng 6 - 9 chi và 477 - 590 loài các cây thân thảo sống một năm hoặc lâu năm hay cây bụi [3]. Lá của chúng mọc đối với các đốm trong suốt hay sẫm màu, mép lá nhẵn, bộ nhị thường tụ lại thành chùm, núm nhụy đôi khi có nhũ rõ ràng và hạt nhỏ (thường dài không quá 4 mm). Họ này phân bố rộng khắp thế giới, trước đây được gộp chung như là phân họ Hypericoideae trong họ Bứa (*Clusiaceae*) [4], [5], [6]. Theo hệ thống phân loại thực vật có hoa hiện đại Angiosperm Phylogeny Group System (APG II), họ này thuộc về bộ Sori (*Malpighiales*). Năm 2009, hệ thống phân loại APG III dựa trên phân tích nhiều trình tự ADN thuộc các gen đặc trưng, phản ánh sự tiến hóa của các loài như gen mã hóa lục lạp, ti thể và nhân ribosom [7]. Hệ thống này cho

phép dự đoán tốt hơn các hệ thống phân loại trước đó bởi các nhóm phản ánh được mối quan hệ tiến hóa của thực vật có hoa. Đối với các bậc phân loại trên đất liền, APG sử dụng thuật ngữ “Nhánh - Clade” thay cho các bậc phân loại truyền thống (trên bộ, phân lớp, lớp, ngành...) vốn thường bị giới hạn về số lượng. Cũng theo hệ thống này, phân họ Hypericaceae không còn thuộc họ Clusiaceae (hoặc Guttiferae) nữa mà được tách ra thành một họ riêng biệt thuộc bộ Sori (Malpighiales). Trong hệ thống APG IV phiên bản mới nhất năm 2016, họ Hypericaceae được đặt vào các nhánh theo thứ tự là Rosids → Eudicots → Angiospermae → Tracheophytes [8].

1.1.1.2. Vị trí phân loại của chi *Hypericum* L.

Bảng 1.2. Vị trí phân loại của chi *Hypericum* L.

Tác giả	Kimura (1951)	Robson (1977, 1981,1985, 1987, 1990)	APG III (2009)	APG IV (2016)	Robson (2016)
Đơn vị phân loại					
Họ	Guttiferae	Guttiferae	Hypericaceae	Hypericaceae	Hypericaceae
Phân họ	Hypericaceae	Hypericaceae			
Chi	<i>Hypericum</i>	<i>Hypericum</i>	<i>Hypericum</i>	<i>Hypericum</i>	<i>Hypericum</i>

Hypericum L. (*Hypericum*) là một chi gồm khoảng 450 loài cây gỗ, cây bụi và thảo mộc xuất hiện ở tất cả các vùng ôn đới trên thế giới nhưng chỉ có một loài ở miền nam Nam Mỹ và hai loài ở Úc và New Zealand. Các loài của chi này không xuất hiện ở các môi trường sống quá khô, nóng hoặc lạnh. Ở vùng nhiệt đới, chúng hầu như chỉ xuất hiện ở những nơi có độ cao lớn. Hầu hết các loài của chi *Hypericum* có thể được nhận biết bởi toàn bộ các lá mọc đối nhau, có chứa các tuyến tiết trong suốt có màu đen hoặc đỏ. Hoa có bao hoa mẫu 5 bao gồm các lá đài màu xanh lục, màu vàng, đôi khi có màu đỏ, cánh hoa thường nhuộm màu đỏ, nhị hoa thành 3 - 5 bó hoặc chùm và một bầu nhụy có 3 - 5 kiểu mảnh (tự do hoặc hợp nhất). Quả hình mũ chứa nhiều hạt nhỏ hình trụ [7].

Chi *Hypericum* là một trong 9 chi tạo thành họ Hypericaceae thuộc nhánh Clusioid của bộ Malpighiales. Nhánh Clusioid bao gồm các họ Bonnetiaceae, Calophyllaceae, Clusiaceae, Podostem và Hypericaceae, đại diện bởi 94 chi và khoảng 900 loài. Bộ Malpighiales gồm khoảng 16000 loài, là một bộ lớn của thực vật có hoa, nằm trong nhánh hoa hồng [9], [10]. Bộ Malpighiales tạo thành một nhóm chiếm tỷ lệ lớn các loài trong tầng cây bụi và cây nhỏ trong rừng mưa nhiệt đới [11]. Hầu hết các họ trong bộ Malpighiales chỉ phân bố chủ yếu ở vùng khí hậu nhiệt đới nhưng một số họ đã vượt ra khỏi vùng nhiệt đới và đã phát triển, tồn tại ở vùng ôn đới phía bắc, bao gồm họ Violaceae (hoa violet), họ Salicaceae (liễu) và chi *Hypericum* [12].

Trong họ Hypericaceae, ba tông Cratoxyleae (gồm 7 loài, phân loại thành *Cratoxylum* và *Eliea*), Hypericeae (khoảng 494 loài, phân loại thành *Hypericum*, *Lianthus*, *Santomasia*, *Thrnea*, và *Triadenum*) và Vismieae (khoảng 102 loài, phân loại thành *Harungana* và *Vismia*) được công nhận, phù hợp với các phân tích phân tử. Chi *Hypericum* cùng với chi *Triadenum* và chi *Lianthus* là nhóm duy nhất của nhánh Clusioid phân bố ở vùng ôn đới. Tất cả các thành viên khác đều có nguồn gốc từ các vùng đất thấp nhiệt đới hoặc cận nhiệt đới trên thế giới [13], [14].

Năm 1951, Kimura trong hệ thống phân loại chưa đầy đủ của mình đã xếp chi *Hypericum* thuộc phân họ Hypericeae của họ Guttiferae [4]. Sau này, Robson trong các nghiên cứu của mình đã phân loại chi *Hypericum* thuộc họ Clusiaceae (tên khác là Guttiferae) với nhiều đặc điểm tương đồng với hầu hết các chi khác của họ, bao gồm lá mọc đối, trong lá xuất hiện các tuyến tiết, cánh hoa tự do, nhị hoa có cuống và hạt thiếu nội nhũ [5], [6]. Tuy nhiên, theo hệ thống phân loại thực vật có hoa hiện đại APG, họ này thuộc về họ Ban (Hypericaceae), bộ Sori (Malpighiales) [7], [8]. Năm 2009, các thành viên của Hiệp hội Linnaeus đã đề xuất xây dựng cây phát sinh chủng loài chính thức cho toàn bộ thực vật trên cạn tương thích với hệ thống phân loại APG III, tuy nhiên, phân loại chi

Hypericum thuộc họ Hypericaceae vẫn được giữ nguyên và tiếp tục tồn tại trong hệ thống phân loại APG IV [7]. Hiện nay, Robson cũng đã công nhận hệ thống phân loại APG IV, theo đó, chi *Hypericum* thuộc họ Hypericaceae [15].

1.1.2. Phân bố của chi *Hypericum* L.

1.1.2.1. Trên thế giới

Hầu hết các loài của chi *Hypericum* phân bố khắp Bắc bán cầu, rừng nhiệt đới Nam Mỹ và Nam Phi, Madagascar, Đông Nam Á, chỉ trừ vùng Bắc Cực hay sa mạc. Một số loài cũng xuất hiện ở Australia và Châu Đại Dương. Trung tâm phân bố đa dạng nhất của chi *Hypericum* được tìm thấy ở khu vực Palaearctic, bao gồm đại lục Á - Âu và Bắc Phi, nơi hơn 45% các loài được mô tả là bản địa. Tâm thứ hai nằm trong khu vực Neotropic trải dài từ Trung đến Nam Mỹ, với khoảng 30% số loài. Các khu vực khác như Bắc Mỹ, Nam Á và Đông Nam Á, Trung và Nam Phi có ít sự đa dạng hơn so với 2 khu vực lớn phía trên. Mặc dù vậy, đặc điểm chung của các loài thuộc chi *Hypericum* là thường sống ở khí hậu mát mẻ, ở các vùng nhiệt đới thì sống ở vùng núi cao [16], [17].

Một số loài của chi *Hypericum* được tìm thấy trong một phạm vi khá hẹp chủ yếu ở phía nam Nhật Bản, Đài Loan, trung và nam Trung Quốc, miền trung Myanmar và vùng Meghalaya (miền đông Ấn Độ). Ở Trung Quốc, loài này được tìm thấy ở An Huy, Phúc Kiến, Quảng Đông, Quảng Tây, Quý Châu, Hà Nam, Hồ Bắc, Hồ Nam, Giang Tô, Giang Tây, Thiểm Tây và Tứ Xuyên. Chúng thường xuất hiện ở các bụi rậm, các khu vực thảm cỏ, ven sông và những nơi gần đất canh tác, ở độ cao 100 - 1700 mét so với mực nước biển [18].

1.1.2.2. Ở Việt Nam

Ở Việt Nam, chi *Hypericum* được biết đến phổ biến với tên gọi là chi Ban trong các bài thuốc y học cổ truyền. Phạm Hoàng Hộ là người tổng hợp và mô tả đầy đủ nhất đặc điểm cũng như phân bố của các loài Ban được tìm thấy ở Việt Nam. Theo ông, chi Ban ở Việt Nam có 7 loài là những cây ưa ẩm và ưa sáng, thường mọc ở ven rừng, bãi đất trống trong thung lũng, trên nương rẫy hay ruộng

cao. Vùng phân bố chủ yếu là ở các tỉnh miền núi phía bắc như Cao Bằng, Lạng Sơn, Bắc Kạn, Thái Nguyên, Bắc Giang, Yên Bái, Tuyên Quang, Phú Thọ, Hòa Bình, Hà Nội, Sơn La, Lào Cai, Đà Lạt và Lâm Đồng. Độ cao phân bố từ 400 - 800 m. Cây ra hoa quả nhiều hàng năm. Cây con mọc từ hạt thường thấy vào cuối mùa xuân đến giữa mùa hè và cây trồng được bằng hạt [1].

Các loài của chi Ban cũng được thống kê và đề cập trong các nghiên cứu về các loài thực vật có tác dụng sinh học ở Việt Nam. Năm 2003, Averyanov và cộng sự khi nghiên cứu về thực vật có hoa ở miền núi phía bắc Việt Nam đã ghi nhận được loài *Hypericum hookerianum* tại khu vực vùng núi Hoàng Liên Sơn tỉnh Lào Cai [19]. Ngoài ra, trong một nghiên cứu khác đã ghi nhận loài *Hypericum uralum* ở khu vực Đà Lạt, Lâm Đồng và các tỉnh miền Nam [20], [21]. Năm 2006, một loài khác thuộc chi Ban là *Hypericum japonicum* cũng được đề cập trong bộ sưu tập cây thuốc Việt Nam của Đỗ Huy Bích và cộng sự, đã ghi nhận sự phân bố chủ yếu của chúng tại các tỉnh miền Bắc Việt Nam [2]. Mặc dù vậy, thống kê đầy đủ nhất vẫn thuộc về nghiên cứu của Phạm Hoàng Hộ. Danh sách các loài Ban phân bố ở Việt Nam được trình bày như trong bảng 1.3.

Bảng 1.1. Danh sách các loài thuộc chi *Hypericum* L.

TT	Tên khoa học	Tên tiếng Việt	Phân bố	Trích dẫn
1	<i>H. japonicum</i> Thunb. ex Murray	Ban Nhật	Sống ở ruộng, nơi ẩm. Sapa, Huế, Đà Lạt	[1], [2]
2	<i>H. ascyron</i> L.	Ban Rở	Sapa	[1]
3	<i>H. hookerianum</i> Wight & Arn	Ban hooker	Sapa	[1], [20]
4	<i>H. napaulense</i> Choisy	Ban Nepan	Vùng núi	[1]
5	<i>H. uralum</i> Buch.-Ham. ex D. Don	Ban tràn	Đà Lạt, Lâm Đồng	[1], [20]
6	<i>H. petiolatum</i> L.	Ban có cuống	Sông Đà Hòa Bình	[1]
7	<i>H. sampsonii</i> Hance	Ban Sầm sơn, Ban lá dĩnh, Lưu ký nô, Nguyên bản thảo	Hà Nam, Nam Định, Ninh Bình, Hà Nội, Hà Tây, Sơn Tây, Bắc Kạn	[1]

1.1.3. Đặc điểm thực vật chi *Hypericum* L.

Cây bụi, cây hàng năm hoặc lâu năm và một số cây bụi cao đến 12 m. Lá sáng bóng hoặc có lông đơn giản, có gân lá hoặc các hóc, nốt sần (dạng đục lỗ) có chứa nhựa (màu hổ phách), tinh dầu và hyperforin (các hóc mờ hoặc trong suốt), hypericin và dẫn xuất (các nốt sần đỏ đến hơi đen) [9], [22]. Thân có màu xanh lục đến nâu vàng hoặc đỏ, nhựa ruồi ở một số loại thảo mộc hoặc có 2, 4, hoặc 6 đường gân nổi lên dọc theo mỗi lông khi còn non (những đường này mọc từ gân giữa của lá, phía trên thường nổi rõ nhất và đôi khi mở rộng ra để tạo thành cánh hẹp), cuối cùng là mụn nước hoặc các tuyến nhạt màu hoặc sậm màu. Vỏ cây mịn, màu nâu đỏ đến nâu tía hoặc bạc, mỏng, dai hoặc tróc vảy thành từng mảng [21]. Lá mọc đối hay hình chùm, đôi khi mọc thành chùm xen kẽ từ 3 – 4 lá. Lá đơn giản, hình đầu nhọn, không cuống đến cuống lá ngắn và nhỏ dần (cuống lá thường dài < 2 mm), đôi khi có khớp ở gốc, có gân hoặc nèn có viền tuyến, vân thường hình lông chim. Hoa lưỡng tính, hình tam giác (đối xứng xuyên tâm), phần lớn là hình sao đôi khi hình ống, hình hoa và hiếm khi dị hình [2].

Lá đài (3 -) 4 - 5 (- 6) màu xanh lục và có khi nhuộm màu đỏ tương đương với lưỡng hình, đôi khi dạng lá, tự do hoặc hợp nhất, dai hoặc rụng lá, rìa toàn bộ hoặc tuyến - răng - răng thành sợi. Các tuyến từ rìa đến nhiều lớp, tuyến tính đến dạng lỗ, nhạt hoặc sẫm màu, không có các đường chỉ trên bề mặt lưng. Cánh hoa (3 -) 4 - 5 (- 6), màu vàng chanh đến vàng hoặc vàng cam, hiếm khi màu kem đến trắng, mặt lưng có màu đỏ nhạt hoặc có vân ở những chỗ có thể nhìn thấy trong nụ, có đốm hoặc hoàn toàn màu đỏ carmin, méo mó, đều nhau, không dính liền, thường không đối xứng [23], [24].

Các nhị hoa được sắp xếp thành 4 - 5 chùm (bó), đối đỉnh, tự do hoặc liên kết khác nhau (2 + 1 + 1 + 1) tạo ra 4 chùm có thể nhìn thấy (2 + 2 + 1) dẫn đến 3 chùm có thể nhìn thấy. Mỗi chùm có 1 - 60 (hoặc 80) nhị hoa, các sợi có màu vàng đến cam hoặc hiếm khi màu kem đến trắng hoặc đỏ thẫm, mảnh, chỉ thông nhất về phía gốc. Bao phấn màu vàng từ cam đến hơi đỏ, hình thuôn dài đến hình elip, màu

nâu, có màu hồng phách hoặc màu đỏ đến hơi đen trên tuyến liên kết, thường bị biến dạng [25]. Nang noãn nhiều ngăn, màu vàng đến hơi xanh lục, xếp chồng lên nhau, có các tiên mao tự do hoặc hợp nhất một phần đến hoàn toàn hợp nhất, với các vòi nhụy riêng biệt. Quả hình mũ, màu bạc đến nhạt đến nâu sẫm đến hơi đen. Hạt nhỏ, dài 0,3 - 1,5 mm, màu nâu nhạt đến nâu sẫm đến đen, màu trắng đục, hình trụ thẳng đến hình trứng đến hình ellip, hơi cong đến thẳng, đôi khi có hình carina một bên hoặc cánh mỏng và có nhụy với một đỉnh màu trắng đục, phôi hình lưới dạng vảy, nội nhũ không có (hoặc nhỏ), phôi mảnh, thẳng, lá mầm bằng nhau, tự do, lồi lõm, ngắn hơn lá mầm [22]. Nhiễm sắc thể dài 1,3 - 3,5 μm , các hệ số cơ bản (n): 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, thể đa bội từ 2 - 6 [26], [27], [28].

1.1.4. Thành phần hóa học của chi *Hypericum* L.

Nhiều hợp chất được phân lập ở một số loài thuộc chi *Hypericum* đã được nghiên cứu và đánh giá có hoạt tính sinh học tốt, do vậy các hợp chất đó có giá trị cao trong quá trình nghiên cứu bào chế các dạng thuốc có nguồn gốc từ thiên nhiên [24], [29]. Loài *Hypericum perforatum* là đại diện nổi tiếng và phong phú nhất trên toàn thế giới, ngày nay là loài được nghiên cứu và điều tra nhiều nhất trong chi *Hypericum*. Khoảng 2500 nghiên cứu về chi *Hypericum* đã được công bố cho đến nay, bao gồm một số đánh giá tập trung vào hóa thực vật của *Hypericum perforatum*, dược lý học hoặc cả hai khía cạnh [30], [31].

1.1.4.1. Thành phần hóa học loài *Hypericum perforatum*

Có khoảng 150 hợp chất khác nhau đã được xác định trong dịch chiết loài *Hypericum perforatum*, trong đó có khoảng 30% - 50% hợp chất chưa được mô tả một cách rõ ràng. Nhóm hợp chất lớn nhất trong *Hypericum perforatum* là glycosid flavonoid (lên đến 4%) [32]. Các flavonoid chính là rutin, hyperosid, isoquercitrin, quercitrin, miquelianin và quercetin [33]. Đặc biệt đã tìm thấy một số bioflavonoid với hàm lượng rất cao, điển hình là I3, II8-biapigenin (3,8-biapigenin) và amentoflavon. Chiết xuất thô từ thân và lá cây có chứa naphthodianthron hypericin (0,03% đến 0,3%) và pseudohypericin ở mức gấp 2

đến 10 lần hypericin (bảng 1.4) [31]. Hyperforin (acylphloroglucinol đa vòng hoặc hai vòng) là hợp chất quan trọng trong nhóm phloroglucinol [34]. Adhyperforin và hyperforin được hình thành trong nhụy hoa và quả xanh. Tùy thuộc vào phương pháp bào chế, hàm lượng hyperforin trong dịch chiết thô có thể dao động từ 2% đến 5% hoặc 6% sau khi được tinh chế. Hyperforin dạng tinh khiết không ổn định khi có ánh sáng và oxy [35].

Bảng 1.2. Các hợp chất có hoạt tính sinh học của loài *Hypericum perforatum*

Nhóm hợp chất	Tên hợp chất (%)	Mô chứa hàm lượng cao	Dược tính
Naphthodianthron	Hypericin (0.09)	Nụ, hoa, tuyến đen trên lá	Chống trầm cảm Kháng virus
	Pseudohypericin (0.23)		
Phloroglucinol	Hyperforin (2.0–4.5)	Nụ, hoa, quả xanh các tuyến mờ	Chống trầm cảm Kháng khuẩn
	Adhyperforin (0.2–1.8)		
Flavonoid	Quercetin (2.0)	Nụ, hoa, thân	Chống trầm cảm Chống viêm
	Hyperosid (0.7)		
	Quercitrin (0.5)		
	Isoquercitrin (0.3)		
	Rutin (0.3)		
	Miquelianin		
	Isorhamnetin		
Biflavonoid	Biapigenin (0.1–0.5)	Hoa	An thần Chống viêm
	Amentoflvon (0.01–0.05)		
Procyanidin (hydrophilic)	Procyanidin	Nụ, hoa, lá, thân	Chống viêm Chống oxy hóa
	Catechin		
	Epicatechin		
Tinh dầu	Terpen	Hoa, lá	Hương thơm
	Alcohol		
Amino acid	Gamma aminobutyric Acid	Hoa, lá	Chống trầm cảm
Phenylpropan	Acid Caffeic	Hoa, lá	Chống oxy hóa
	Acid Chlorogenic		
Xanthon	Norathyriol	Rễ, hoa	Chống trầm cảm

Hàm lượng hyperforin cao nhất được tìm thấy trong dịch chiết từ quả, ngoài ra còn có trong các bộ phận khác như nụ và hoa của loài *Hypericum perforatum* [36]. Các dẫn xuất hyperforin bị oxy hóa có thể là các hợp chất được hình thành trong quá trình chiết xuất [37]. Orthoforin và dihydrofuran furohyperforin được mô tả là sản phẩm oxy hóa của hyperforin. Năm 2000, Verotta và cộng sự đã chiết xuất và phân lập được 3 dẫn xuất khác của hyperforin là 33-deoxy-33-hydroperoxyfurohyperforin, oxepahyperforin, 8-hydroxyhyperforin 8,1-hemiacetal. Trong năm này các hợp chất tương tự hyperforin như pyrano (7,28-b) hyperforin, (2R, 3R, 4S, 6R) -6-metoxycacbonyl-3-metyl-4,6-di (3-metyl-2-butenyl) -2- (2-metyl-1-oxopropyl) - 3- (4-metyl-3-pentenyl) xiclohexanon và (2R, 3R, 4S, 6S) -3-metyl-4,6-di (3-metyl-2-butenyl) -2- (2-metyl-1-oxopropyl) -3- (4-metyl-3-pentenyl) xiclohexanon cũng đã được công bố bởi Vugdelija và cộng sự [38], [39].

Các flavonoid aglycon nổi bật nhất là các flavonol quercetin, kaempferol, myricetin, dihydroflavonol dihydroquercetin và flavon luteolin, trong đó chỉ quercetin được hiển thị dưới dạng các glycosid aglycon flavonol [40]. Jürgenliemk và Nahrstedt (2002) đã nghiên cứu các hợp chất phenolic của loài *Hypericum perforatum*, phát hiện ra quercetin và một số glycosid quercetin (rutin, hyperosid, isoquercitrin, miquelianin, astilbin, guaijaverin, quercitrin, quercetin-3-O-(2-acetyl)- β -D-galactosid), cũng như isoorientin (6 β -glucosylluteolin) và cyanidin-3-O- α -L-rhamnosid như anthocyanin [41]. Các biflavonoid nổi bật nhất của loài *Hypericum perforatum* là biapigenin (C₃₀H₁₈O₁₀), I3, II8-biapigenin và amentoflavon = I3, II8-biapigenin được phát hiện bởi Berghöfer và Hölzl năm 1987 - 1989. Nồng độ dao động trong khoảng 0,1 đến 0,5% đối với I3, II8-biapigenin và 0,01 - 0,05% đối với amentoflavon [42].

Xanthon được tìm thấy chủ yếu ở rễ của loài *Hypericum perforatum*. Loại xanthon điển hình là 1,3,6,7-tetrahydroxyxanthon (norathyriol) có nồng độ 0,4 mg/100g khối lượng khô, bên cạnh một số hợp chất khác như mangiferin,

isomangiferin và xanthonelignoid. Tuy nhiên, quá trình tổng hợp xanthon cũng được ghi nhận xảy ra trên lá của loài *Hypericum perforatum* từ 2 tiền chất là chalcon synthase (CHS) và benzophenol synthase (BPS). Kết quả nghiên cứu cho thấy cả CHS và BPS đều nằm trong trung bì của mô lá, trong đó cường độ huỳnh quang quan sát được đối với CHS cao hơn đáng kể so với BPS. Sử dụng phương pháp nhuộm mô hóa học cho thấy rằng các vị trí sinh tổng hợp và tích tụ xanthon trùng khớp với vị trí có tín hiệu huỳnh quang, chứng tỏ xanthon đã được tổng hợp tại các vị trí này. Quá trình tổng hợp xanthon ở rễ cũng được làm sáng tỏ ở các cấp độ phiên mã, protein và sản phẩm bằng sự kết hợp giữa phương pháp huỳnh quang miễn dịch và phân tích khối phổ (AP-SMALDI-FT-Orbitrap MSI) cung cấp sự hiểu biết đầy đủ về sự sinh tổng hợp xanthon trong các bộ phận của loài *Hypericum perforatum* [31], [43].

Loài *Hypericum perforatum* có các tuyến trong suốt chứa tinh dầu có thể nhìn thấy được ở tất cả các cơ quan trên mặt đất trừ chồi xanh. Tinh dầu được phân lập từ các bộ phận tươi của loài *Hypericum perforatum* và được phân tích bởi phương pháp sắc ký kết hợp khối phổ đã xác định được 134 hợp chất chiếm 98,7% tổng số tinh dầu. Các thành phần chính của tinh dầu được xác định bao gồm: germacren D (18,6%), (E)-caryophyllen (11,2%), 2-metyloctan (9,5%), α -pinen (6,5%), bicyclogermacren (5,0%) và (E)- β -ocimen (4,6%). Những hợp chất dễ bay hơi bao gồm một hàm lượng lớn sesquiterpenoid (57,7%), đặc biệt là hydrocacbon sesquiterpen (48,7%). Monoterpenoid (22,4%) cũng bao gồm hầu hết các hydrocacbon. Các hợp chất phi terpenoid chiếm 18,1% tổng lượng tinh dầu. Trong một nghiên cứu khác, 46 hợp chất khác nhau đã được xác định trong loài *Hypericum perforatum*. Trong số các hợp chất, 2,6-dimethyl-heptan (6,25 - 36,07%), -pinen (5,56 - 26,03%), 1-cadinen (0,0 - 22,58%) và -cadinen (0,0 - 16,9%) được tìm thấy là các hợp chất phong phú nhất. Phân tích cấu trúc xác định được bốn kiểu cấu trúc khác nhau, bao gồm kiểu 1 (cadinen/humulen), kiểu 2 (pinen), kiểu 3 (cadinen) và kiểu 4 (2,6-dimethyl-heptan/ -pinen) [38], [44].

1.1.4.2. Thành phần hóa học một số loài khác thuộc chi *Hypericum* L.

Các acid phenolic như acid chlorogenic và acid caffeic đã được tìm thấy ở các loài thuộc chi *Hypericum* [45]. Năm 2014, nghiên cứu của Camas và cộng sự còn cho thấy một tập hợp phong phú các hợp chất bao gồm acid chlorogenic, acid neochlorogenic, acid caffeic, acid 2,4-Dihydroxybenzoic, amentoflavin, hyperosid, isoquercitrin, quercitrin, quercetin, avicularin, rutin, (-)-epicatechin bên cạnh hypericin, pseudohypericin, hyperforin, adhyperforin ở loài *Hypericum Orientale* và *Hypericum pallens* miền Bắc Thổ Nhĩ Kỳ [46].

Nghiên cứu về thành phần hóa học và tác dụng sinh học trên ba loài thuộc chi *Hypericum* bao gồm *Hypericum reflexum*, *Hypericum canariense* và *Hypericum grandifolium* từ quần đảo Canary đã chiết xuất và phân lập được 8 hợp chất có tác dụng sinh học có hàm lượng khác nhau (hypericin, hyperforin, acid chlorogenic, rutin, hyperosid, isoquercitrin, quercitrin, quercetin) và một số loại tinh dầu. *Hypericum reflexum* là loài duy nhất có chứa một lượng nhỏ naphthodiantron (hypericin và pseudohypericin), hàm lượng cao acid chlorogenic, rutin, các mono và sesquiterpen dễ bay hơi [33]. Một nghiên cứu khác chứng minh thêm một số chất như acid neochlorogenic (acid 2-O-E-caffeoylquinic), acid 3-O-E-4-coumaroylquinic, acid 3-O-Z-4-coumaroylquinic, acid cryptochlorogenic (acid 4-O-E-caffeoylquinic) và acid protocatechuic [41].

Một dẫn xuất phloroglucinol có cấu trúc đơn giản mới có đặc điểm là 1-(6-hydroxy-2,4-dimethoxyphenyl)-2-methyl-1-propanon được phân lập từ *Hypericum cistifolium* như một thành phần chính của cây. Một lượng nhỏ hợp chất mới này, ngoài hai dẫn xuất phloroglucinol có liên quan về cấu trúc đã biết, còn có hai dẫn xuất terpenoid mới được phát hiện. Chúng có công thức tương ứng là 2-benzoyl-3,3-dimethyl-4R, 6S-bis-(3-methylbut-2-enyl)-cyclohexanon và 2-benzoyl-3,3-dimethyl-4S, 6R-bis-(3-methylbut-2-enyl)-cyclohexanon, được phân lập từ *Hypericum galioides*. Các cấu trúc hóa học được thiết lập bằng cách sử dụng phương pháp quang phổ 2D - NMR và khối phổ [47].

1.1.5. Tác dụng sinh học của chi *Hypericum* L.

1.1.5.1. Tác dụng ức chế tế bào ung thư

Năm 2018, nghiên cứu của You và cộng sự đã chỉ ra chi *Hypericum* có thể kìm hãm sự phát triển và loại bỏ tế bào ung thư vú ở người MCF - 7. Dịch chiết của chi *Hypericum* tăng cường sự phosphoryl hóa của protein kinase hoạt hóa AMP (AMP_K) và giảm sự biểu hiện của rapamycin (p-mTOR) và yếu tố khởi đầu (p-eukaryotic). Ngoài ra, dịch chiết này còn ức chế quá trình phosphoryl hóa của protein kinase B và cho thấy sự gia tăng biểu hiện của các protein kích thích apoptosis Bax và Bad, cùng với sự giảm biểu hiện của các protein chống apoptosis bao gồm u lympho tế bào B 2 (Bcl-2), B -cell lymphoma-cực lớn (Bcl-xL), và p-Bcl-2 (p-Bad). Kết quả này cho thấy dịch chiết của chi *Hypericum* tác dụng chống tăng sinh và hỗ trợ quá trình apoptosis thông qua việc ức chế AMPK/mTOR và kích hoạt một con đường ty thể [48].

Hypericin là một chất nhạy cảm với ánh sáng tự nhiên mạnh được tìm thấy trong chi *Hypericum*. Trong những năm gần đây các nghiên cứu cho thấy hypericin như một tác nhân tiềm năng trong ức chế tế bào ung thư trên lâm sàng. Hypericin có thể gây ra cả quá trình apoptosis và hoại tử theo kiểu phụ thuộc vào nồng độ và liều lượng ánh sáng. Hơn nữa, Hypericin dẫn đến việc kích hoạt nhiều con đường có thể thúc đẩy hoặc chống lại chương trình chết tế bào [49].

1.1.5.2. Tác dụng kháng viêm, chống dị ứng

Các nghiên cứu cho thấy hoạt động chống viêm là tác dụng hiệp đồng của các hợp chất có hoạt tính sinh học trong chiết xuất ethanol của *Hypericum perforatum*. Trong nghiên cứu của Huang và cộng sự (2011) đã đánh giá tác dụng chống viêm của cao chiết ethanol của các loài trong chi *Hypericum* thông qua tác dụng ức chế sản xuất prostaglandin E₂ (PGE₂) và nitric oxid trong đại thực bào chuột RAW 264.7. Trong số các hợp chất này, những chất chiết được từ *Hypericum perforatum* và *Hypericum gentianoides* cho thấy hiệu quả tổng thể mạnh hơn. Phân tích LC - MS chỉ ra *Hypericum perforatum* có chứa

pseudohypericin là chất quan trọng nhất cho khả năng chống viêm. Các phân đoạn ưa dầu của chiết xuất *H. gentianoide*, không chứa các thành phần hoạt tính đã được xác định trước đó, làm giảm đáng kể PGE₂ và NO. Những phần này rất giàu acylphloroglucinol bao gồm uliginosin A chiếm một tỷ lệ trong hoạt động chống viêm cũng đã được ghi nhận [50].

Acylphloroglucinol hyperforin (Hyp) được chiết xuất từ chi *Hypericum* cũng sở hữu các đặc tính chống viêm và chống ung thư có tác dụng ức chế 5-lipoxygenase. Nghiên cứu của Koeberle và cộng sự (2011) đã đánh giá khả năng Hyp can thiệp vào việc tạo ra prostanoid trong các hệ thống sinh học, đặc biệt là với các enzym quan trọng tham gia vào quá trình sinh tổng hợp prostaglandin (PG) E₂, bao gồm cyclooxygenases (COX) -1/2 và microsomal PGE₂ synthase (mPGES)-1 đóng vai trò quan trọng trong việc hình thành khối viêm và khối u. Tương tự như các chất ức chế mPGES-1 MK-886 và MD-52, Hyp ức chế đáng kể sự hình thành PGE₂ trong các xét nghiệm máu toàn phần bắt đầu từ 0,03 - 1 μM, trong khi đó sự tạo đồng thời của COX 12 (S)-hydroxy-5-cis-acid 8,10-trans-heptadecatrienoic, thromboxan B₂, và 6-keto PGF₁α không bị ức chế đáng kể lên đến 30 μM. Trong các thử nghiệm không có tế bào, Hyp đã ngăn chặn hiệu quả sự chuyển đổi PGH₂ thành PGE₂ qua trung gian mPGES-1 (IC₅₀ = 1 μM) và các enzyme COX cô lập không bị (COX-2) hoặc hầu như không bị ức chế (COX-1). Sử dụng Hyp (4 mg/kg-1) trong phúc mạc cho chuột làm suy giảm thể tích dịch tiết và số lượng bạch cầu trong bệnh viêm màng phổi do carrageenan liên quan đến giảm mức PGE₂ và Hyp ức chế sự hình thành phù chân chuột do carrageenan gây ra (ED₅₀ = 1 mg/kg) vượt trội hơn indomethacin (ED₅₀ = 5 mg/kg). Nghiên cứu này chứng minh rằng việc ức chế sinh tổng hợp PGE₂ *in vitro* và *in vivo* bằng cách tác động lên mPGES-1 góp phần quan trọng vào hiệu quả chống viêm của acylphloroglucinol hyperforin [51].

Ngoài ra, các dẫn xuất của hyperforin còn có khả năng kháng khuẩn tốt, trong đó naphthodianthron hypericin và phloroglucinol hyperforin là các hợp chất

kháng khuẩn hiệu quả chống lại các vi khuẩn khác nhau như *E. coli*, *S. dysenteriae*, *S. typhi*, *B. cereus* và *S. aureus* [39]. Một nghiên cứu khác đã chứng minh các chất chiết xuất và phân đoạn của *Hypericum perforatum* có hoạt tính kháng khuẩn chống lại một số vi khuẩn phân lập từ miệng bao gồm *S. mutans*, *S. sobrinus*, *L. plantarum* và *E. faecalis* [52].

1.2. Tổng quan về cây ban lá dính

Cây ban lá dính có tên khoa học là *Hypericum sampsonii* Hance., thuộc họ Ban (Hypericaceae).

1.2.1. Vị trí phân loại

Vị trí phân loại theo hệ thống phân loại APG IV (Xu, 2017) như sau:

Giới: Thực vật

Nhánh: Tracheophytes (Thực vật có mạch)

Nhánh: Angiosperms (Thực vật có hoa)

Nhánh: Eudicots (Thực vật hai lá mầm)

Nhánh: Rosids (Thực vật hạt kín)

Bộ: Malpighiales

Họ: Hypericaceae (họ Ban)

Chi: *Hypericum* L. (chi Ban)

Tông: *Hypericum* sect. *Sampsonia*

Loài: *H. sampsonii*

Pháp danh 2 chữ:

Hypericum sampsonii Hance

Tên đồng dạng:

Hypericum electrocarpum Maxim.

Hypericum esquirolii H.Lév.

Hypericum oshimaense R.Keller

Tên tiếng Việt:

Ban lá dính, Lưu ký nô hoặc Ban sâm sơn [1]

1.2.2. Đặc điểm thực vật

1.2.2.1. Đặc điểm hình thái học

Cây thảo sống lâu năm, phần gốc thân đôi khi trở thành gỗ, cao tới 80 cm. Thân thẳng, tròn, nhẵn, có các tuyến sẫm màu, ở dưới thẳng, phân nhánh phía trên. Thân rễ to khỏe, nhiều rễ dạng sợi. Lá mọc đối, hình mác dày, không cuống, dính liền với nhau ở gốc lá. Phiến lá rộng hoặc hẹp hình mũi mác đến thuôn dài hoặc hình mác, dài 2 - 8 cm, rộng 0,7 - 3,5 cm, đỉnh tù hoặc tròn, rộng hơn đáy, có mặt trên màu xanh lục, rìa lá màu lục nhạt, mép có nhiều chấm tuyến màu nhạt hoặc đen, phiến lá rải rác trong suốt hoặc chấm tuyến màu đen, từ giữa lên đến rìa đỉnh, các gân bên bốn cạnh, lan tỏa xiên, lưới bậc ba khá lỏng lẻo.

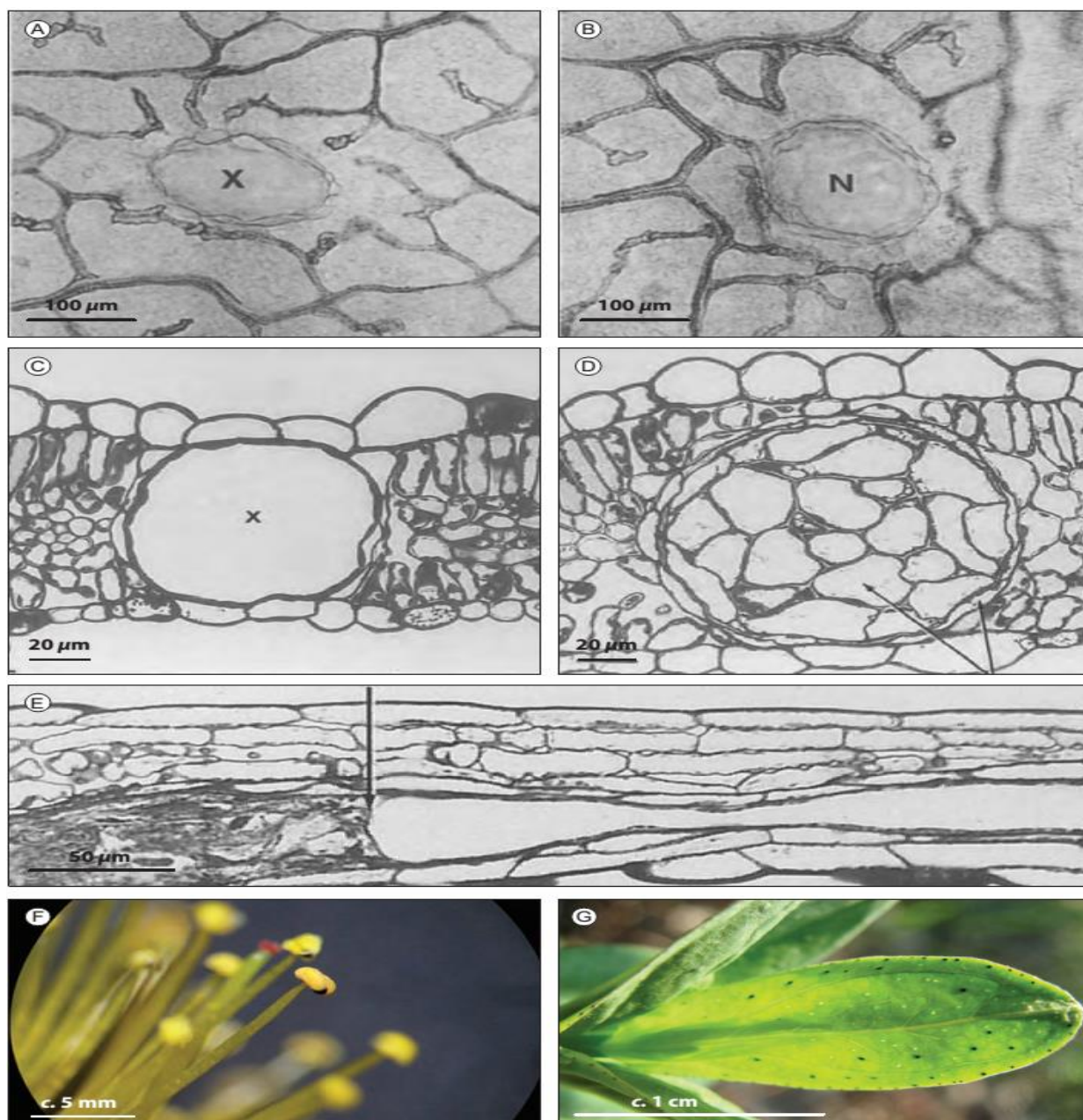


Hình 1.1. Hình ảnh cây ban lá dính ở thời kỳ ra hoa

Hoa mọc thành xim ở ngọn và ở nách lá, cụm hoa gồm 12 - 40 hoa. Lá bắc và lá bắc con hình mác hoặc tuyến tính, dài đến 4 mm, đỉnh có hình chóp. Chồi hình trứng, đỉnh tù. Các lá đài không bằng nhau, hình trứng thuôn dài hoặc thuôn dài hoặc hình mũi mác, dài 3 - 10 mm, rộng 1 - 3 mm, rải rác các đốm đen và các chấm tuyến trong suốt. Cánh hoa hình elip thuôn dài, dài 4 - 13 mm, rộng 1,5 - 7 mm, màu vàng nhạt, dai, mép có các tuyến sẫm màu không cuống hoặc không cuống, rải rác các chấm tuyến nhạt màu hoặc hiếm khi sẫm màu và có vân trên tất cả. Nhị nhiều, mỗi hoa có 30 - 42 nhị, nhị mọc thành chùm 3 nhị, dai. Bao phấn màu vàng nhạt, có các chấm tuyến sẫm màu. Nhụy hình trứng hẹp hình nón, dài 2 - 3 mm. Nhụy có 3 lá noãn hoàn toàn hoặc không hoàn toàn, có 3 vòi nhụy. Quả

nang hình trứng rộng đến hình trứng rộng hoặc hẹp hình tháp, dài 6 - 9 mm, rộng 4 - 5 mm, trên các lá dài, van có hình trứng rải rác đến các tuyến hình lỗ nhỏ màu hồng phách kéo dài. Hạt hình trứng thuôn dài, dài 0,5 - 1 cm, màu nâu cam, vỏ hạt có gân, vô hương. Cây ban lá dính ra hoa từ tháng 5 đến tháng 7 và kết quả giữa tháng 6 và tháng 10 [22].

1.2.2.2. Đặc điểm giải phẫu học



Hình 1.2. Đặc điểm vi phẫu lá của cây ban lá dính

Trong đó: A - Tuyến màu nhạt (X) được nhìn thấy trong một chiếc lá ở góc

nhìn từ trên xuống, được bao quanh bởi các gân phụ; B - TUYẾN SẮM MÀU HOẶC NỐT ĐEN (N) ĐƯỢC NHÌN THẤY TRONG MỘT CHIẾC LÁ ĐƯỢC LÀM SẠCH Ở GÓC NHÌN TỪ TRÊN XUỐNG, ĐƯỢC BAO QUANH BỞI CÁC GÂN PHỤ VÀ ĐẦU CUỐI CỦA GÂN; C - TUYẾN NHẬT MÀU VỚI BIỂU MÔ HÌNH VẼ BAO QUANH KHOANG NGUYÊN SINH (X) Ở MẶT CẮT NGANG CỦA LÁ; D - TUYẾN SẮM MÀU VỚI CÁC CỤM TẾ BÀO BÊN TRONG VÀ CÁC TẾ BÀO HÌNH MŨI TÊN Ở MẶT CẮT NGANG CỦA LÁ; E - ĐƯỜNG CẮT NGANG CỦA MỘT VẾT RANH GIỚI GIỮA PHẦN NỐT Ở BÊN TRÁI VÀ PHẦN KHOANG Ở BÊN PHẢI. MŨI TÊN CHỈ RANH GIỚI; F - TUYẾN SẮM MÀU Ở CHỖ NỐI CỦA BAO PHẦN. G) CÁC TUYẾN NHẬT VÀ SẮM MÀU Ở LÁ [53].

Cấu trúc vi phẫu của cây ban lá dính mang nhiều đặc điểm phổ biến của chi *Hypericum*. Các tuyến nhật màu có mặt khắp nơi trên lá, gồm một khoang phân sinh được bao quanh bởi một hoặc nhiều lớp tế bào biểu mô [54]. Các nghiên cứu về hình thái, vị trí của cấu trúc các tuyến của các cơ quan khác nhau ở cây ban lá dính cho thấy cấu trúc bài tiết của nó có thể được chia thành một số dạng như nốt tiết và khoang tiết. Đồng thời chỉ ra vị trí và mật độ của ba loại cấu trúc bài tiết trong mọi cơ quan. Các xét nghiệm mô hóa kết quả cho thấy các nốt này có thể chứa hypericin hoặc chất dầu dễ bay hơi [55], [56].

1.2.2.3. Đặc điểm sinh thái

Cây ban lá dính thường sống ở sườn núi, lè ruộng, đồng cỏ, nương rãnh, đất ngập nước, ven đường, bụi rậm, ven suối, ưa thích những môi trường màu mỡ, ẩm ướt và thích hợp với môi trường xung quanh khô hạn hoặc hơi cần cỗi [22].

1.2.3. Phân bố

1.2.3.1. Trên thế giới

Mặc dù hầu hết các loài của chi *Hypericum* phân bố khắp Bắc bán cầu, rừng nhiệt đới Nam Mỹ, Nam Phi, Madagascar, Đông Nam Á, chỉ trừ vùng Bắc cực và sa mạc, ở khí hậu mát mẻ hoặc vùng núi cao nhiệt đới. Tuy nhiên cây ban lá dính chỉ được tìm thấy trong một phạm vi khá hẹp chủ yếu ở phía nam Nhật Bản, Đài Loan, trung và nam Trung Quốc, miền trung Myanmar và vùng Meghalaya, miền đông Ấn Độ. Chúng được coi là loài đặc hữu cho vùng Đông Á và Đông Nam Á.

Ở Trung Quốc, cây ban lá dính được tìm thấy ở các tỉnh An Huy, Phúc Kiến, Quảng Đông, Quảng Tây, Quý Châu, Hà Nam, Hồ Bắc, Hồ Nam, Giang Tô, Giang Tây, Thiểm Tây và Tứ Xuyên. Chúng thường mọc ở các bụi rậm, các khu vực thảm cỏ và ven sông và những nơi gần đất canh tác ở độ cao 100 - 1700 m so với mực nước biển [18].

1.2.3.2. Ở Việt Nam

Ở Việt Nam, cây ban lá dính được xác định là cây ưa ẩm và ưa sáng, thường mọc ở ven rừng, bãi đất trống trong thung lũng, trên nương rẫy hay ruộng cao. Độ cao phân bố từ 400 - 800m. Cây ra hoa quả nhiều hàng năm. Cây con mọc từ hạt thường thấy vào cuối mùa xuân đến giữa mùa hè. Cây trồng được bằng hạt [1].

1.2.4. Thành phần hóa học

Các thành phần có hoạt chất sinh học trong cây ban lá dính từ lâu đã được nghiên cứu, chủ yếu là xanthon, acylphloroglucinol đa vòng và các dẫn xuất. Dựa vào các tài liệu đã thu thập được, thành phần hóa học của cây ban lá dính được trình bày theo các nhóm chất [57].

1.2.4.1. Xanthon và các dẫn xuất

Xanthon là hợp chất hữu cơ có vòng thơm, công thức phân tử $C_{13}H_8O_2$. Xanthon được sử dụng như một loại thuốc trừ sâu để diệt trứng sâu bướm và ấu trùng. Ngoài ra, xanthon cũng được sử dụng để điều chế xanthidrol là hợp chất dùng để xác định nồng độ urê trong máu [58].

Xanthon được chiết xuất từ thực vật có vai trò như tác nhân ngăn ngừa phản ứng hóa học tự nhiên nên có thể trở thành một thuốc chống ung thư tiềm năng [59]. Xanthon có nhiều tác dụng dược lý như chống oxy hóa, ức chế sự phát triển của khối u, kháng viêm, kháng khuẩn, kháng nấm và kháng virus. Trong các giai đoạn khác nhau của bệnh ung thư (khởi đầu, thúc đẩy và tiến triển) thì tác dụng phòng ngừa và trị liệu hóa học tiềm năng của xanthon đã được chứng minh, nó có khả năng kiểm soát sự phân chia và tăng trưởng của tế bào, apoptosis, viêm và di căn [60], [61], [62].

Xanthon và các dẫn xuất benzophenol (polyprenyl hóa) đã phân lập được từ cây ban lá dính. Một số polyisoprenyl benzophenol mới trong đó sampsonones A và I cho thấy có đặc tính gây độc tế bào. Các nghiên cứu sâu hơn về thành phần hóa học của cây ban lá dính đã phân lập được 2 xanthon sulfonat mới là 1,3-dihydroxy-5-methoxyxanthon-4-sulfonat và 1,3-dihydroxy-5-*O*- β -D-glycopyranosyl-xanthon-4-sulfonat có tác dụng ức chế tế bào ung thư P388, cùng với 9 hợp chất đã biết [63], [64], [65].

Năm 2004, Don và cộng sự đã phân lập và xác định được cấu trúc của 5 hợp chất phenolic cùng với 16 hợp chất có tác dụng kháng virus viêm gan B trong cây ban lá dính. Trong đó có 2 benzophenol mới là 2,6-dihydroxy-4-(*E*)-5-hydroxy-3,7-dimethylocta-2,7-dienyloxy benzophenol và 2,6-dihydroxy-4-(*E*)-7-hydroxy-3,7-dimethylocta-2-enyloxy benzophenol, hợp chất xanthon mới là hyperxanthon, hợp chất glycosid bisanthraquinon mới là R-(-)-skyrin-6-*O*- β -D-xylopyranosid, 2-caffeoyloxy-3-hydroxy-3-(3,4-dihydroxyphenyl) propyl alcohol và 16 dẫn xuất của xanthon. Cấu trúc của chúng đã được xác định bằng các phương pháp quang phổ, chủ yếu là phép đo phổ 2D-NMR và khối phổ [66].

1.2.4.2. Acylphloroglucinol đa vòng và dẫn xuất

Các acylphloroglucinol đa vòng (PPAP) là một nhóm chất chuyển hóa thứ cấp có 3 cấu trúc vòng hoặc cấu trúc lõi giống homoadamantyl. Chúng có các tác dụng sinh học khác nhau như ức chế sự phát triển của khối u, kháng khuẩn và kháng virus HIV. Ngày nay, các nghiên cứu về PPAP tự nhiên và tổng hợp có cấu trúc phức tạp đã thu hút sự quan tâm của các nhà nghiên cứu trên thế giới bởi chúng là những hợp chất có nhiều tác dụng sinh học. Các loài thuộc chi *Hypericum* đã được chứng minh có chứa hàm lượng lớn PPAP. Trong nhiều năm qua, các nghiên cứu sâu về hóa thực vật được tiến hành bởi các nhà nghiên cứu đã phân lập và xác định cấu trúc được hơn 50 PPAP có tác dụng sinh học khác nhau từ chi *Hypericum* [63], [64], [67], [68].

Năm 2015, Zhu và cộng sự đã phân lập và xác định được cấu trúc 6 hợp

chất PPAP mới đặt tên là hyperisampsin H-M và 5 hợp chất PPAP đã biết. Hợp chất hyperisampsin H và hyperisampsin I có vòng γ -lacton hiếm ở C-23. Các hợp chất hyperisampsin J-M có vòng 1,2-dioxan khác với các hợp chất PPAP đã biết. Ngoài ra, nghiên cứu này đã nghiên cứu tác dụng gây độc tế bào của các hợp chất hyperisampsin H-M trên 5 dòng tế bào ung thư người trong đó hợp chất hyperisampsin J, hyperisampsin K và hyperisampsin M thể hiện tác dụng gây độc tế bào mạnh với IC_{50} nằm trong khoảng từ 0,56 đến 3,00 μ M. Trong một nghiên cứu khác, cơ chế tác dụng gây độc tế bào của hợp chất hyperisampsin J đã được chứng minh là thông qua quá trình apoptosis trong các tế bào bệnh bạch cầu, qua trung gian kích hoạt caspase-3, thoái hóa PARP, yếu tố điều hòa Bax và điều hòa giảm của các gen kháng ung thư Bcl-2 và Bcl-xl [69].

Hai sampsonin A-B và đồng phân quang học tương ứng của chúng là các benzophenol đa vòng thơm được phân lập từ phần trên mặt đất của cây ban lá dính bằng kỹ thuật HPLC. Kết quả nghiên cứu tác dụng gây độc tế bào của các hợp chất này đối với tế bào HeLa cho thấy ở nồng độ 5 - 20 μ M gây ra sự giảm hoạt tính luciferase, còn ở nồng độ 20 μ M ức chế sự tăng sinh của tế bào HeLa. Điều đáng chú ý là các đồng phân quang học cho thấy tác dụng tốt hơn chất đồng phân hóa học [70]. Các nghiên cứu khác từ cao chiết ethanol phần trên mặt đất của cây ban lá dính đã phân lập được thêm các hợp chất gồm sampsonion K-M cùng với các sampsonion A-J tạo thành nhóm các dẫn xuất benzoylphloroglucinol được hình thành bởi các chu trình phức tạp của các nhóm prenyl. Cấu trúc của các hợp chất này đã được xác định dựa trên các phương pháp kỹ thuật đo phổ khác nhau. Sampsonion A-M được tổng hợp từ các dẫn xuất benzoyl phloroglucinol trong đó một số hợp chất có cấu trúc mới. Hầu hết các dẫn xuất phloroglucinol có chứa nhóm acyl, một số hợp chất đã được đánh giá tác dụng gây độc tế bào trên dòng tế bào ung thư P388 [71].

Ngoài ra, các hợp chất norsampsones A-D là 4 acylphloroglucinol đa vòng mới và hợp chất liên quan đến di truyền sinh học mới hypersampson M cũng được

phân lập từ phần trên mặt đất của cây ban lá dính. Các hợp chất norsampsones A-D có bộ khung carbon được hình thành do trong cấu trúc đã mất C-2 cacbonyl trong vòng phloroglucinol. Cấu trúc của các hợp chất này được xác định bằng các phương pháp phổ NMR, tính toán ECD và nhiễu xạ tia X đơn tinh thể [72].

Hợp chất norsampson E là một acylphloroglucinol đa vòng không chứa decarbonyl mới cũng đã được phân lập từ phần trên mặt đất của cây ban lá dính. Hợp chất này có cấu trúc khung homoadamantyl bất thường với sự mất đi cacbonyl C-4 và tiếp theo là sự hình thành liên kết C-C mới giữa C-3 và C-5. Cấu trúc và cấu hình tuyệt đối của chúng đã được xác định bằng quang phổ NMR mở rộng, thí nghiệm tia X đơn tinh thể. Hợp chất này liên kết trực tiếp với protein RXR α - trong vai trò ức chế phiên mã RXR α mạnh mẽ theo cách phụ thuộc vào liều lượng, có vai trò tích cực trong việc kìm hãm sự phát triển của các tế bào ung thư [73].

1.2.5. Tác dụng sinh học

1.2.5.1. Tác dụng kháng khuẩn

Theo Đỗ Huy Bích và cộng sự trong tuyển tập cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam, dịch chiết cây ban lá dính ở nồng độ 10% có tác dụng ức chế tụ cầu khuẩn và liên cầu khuẩn. Chất quercitrin được chiết từ cây ban lá dính có tác dụng ức chế và tiêu diệt trực khuẩn lao, phế cầu khuẩn, tụ cầu khuẩn vàng, trực khuẩn lỵ và phẩy khuẩn tả. Các dẫn xuất phloroglucinol được tách chiết từ cây ban lá dính như saroaspidin (A, B, C), sarothralen (A, B, C, D), sarothralin và sarothralin G đều có tác dụng kháng khuẩn. Trong đó sarothralin và sarothralin G có tác dụng mạnh nhất với các chủng vi khuẩn gram dương như *S. aureus*, *B. cereus* và *N. gardneri* [2].

1.2.5.2. Tác dụng chống viêm

Năm 2020, Chen và cộng sự đã tiến hành chiết xuất và phân lập các hợp chất có hoạt tính gây độc tế bào và chống viêm trong cây ban lá dính. Kết quả phân lập được 25 hợp chất đã biết trong dịch chiết ethanol của cây ban lá dính

(bảng 1.5). Sau đó tiếp tục nghiên cứu tác dụng chống viêm của 25 hợp chất phân lập được thì các hợp chất (1-2, 5-23) cho thấy tác dụng chống viêm, trong số đó, các hợp chất 5, 6, 13, 14 và 15 thể hiện hoạt tính cao [74].

Bảng 1.5. Các hợp chất có hoạt tính gây độc tế bào và chống viêm trong cây ban lá dính

TT	Tên hợp chất	Công thức phân tử
1	Acid gallic	C ₇ H ₆ O ₅
2	Acid 3,4-dihydroxybenzoic	C ₇ H ₆ O ₄
3	5,7-dihydroxy-3-methylchromon	C ₁₀ H ₈ O ₄
4	Octadecyl ferulate	C ₂₈ H ₄₆ O ₄
5	Emodin	C ₁₅ H ₁₀ O ₅
6	3-ethyl-1,8-dihydroxy-6-methoxyanthracen-9,10-dion	C ₁₇ H ₁₄ O ₅
7	2-methoxy-9H-xanthen-9-on	C ₁₄ H ₁₀ O ₃
8	1-hydroxy-7-methoxy-9H-xanthen-9-on	C ₁₄ H ₁₀ O ₄
9	1,7-dihydroxy-9H-xanthen-9-on	C ₁₃ H ₈ O ₄
10	5-O-methyl-2-deprenylrheediaxanthon B	C ₁₉ H ₁₈ O ₆
11	5'-Demethoxycadensin G	C ₂₃ H ₁₈ O ₉
12	Jacareubin	C ₁₈ H ₁₄ O ₆
13	Garcimangoson	C ₁₉ H ₂₀ O ₉
14	Hyperforatin F	C ₃₃ H ₄₈ O ₅
15	Quercetin	C ₁₅ H ₁₀ O ₇
16	Quercetin 3-galactosid	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂
17	Quercetin 3-O-arabinosid	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₁
18	Rutin	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆
19	Quercitrin	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁
20	Kaempferol	C ₁₅ H ₁₀ O ₆
21	3,8''-Biapigenin	C ₃₀ H ₁₈ O ₁₀
22	Naringenin	C ₁₅ H ₁₂ O ₅
23	(+)-catechin	C ₁₅ H ₁₄ O ₆
24	β-Sitosterol	C ₂₉ H ₅₀ O
25	6-ethoxy-1H-pyrimidin-2,4-dion	C ₆ H ₈ N ₂ O ₃

Tác dụng chống viêm của 5 hợp chất gồm 2 xanthon (mangiferin, neolancerin) và 3 benzophenol (sampsin A, sampsin B và petiolin F) được phân lập từ phần trên mặt đất của cây ban lá dính được nghiên cứu bằng cách đo sự sản

sinh oxit nitric (NO) trong tế bào RAW 264.7 do lipopolysaccharid (LPS) gây ra. Kết quả cho thấy hợp chất petiolin F có hoạt động ức chế mạnh nhất chống lại sự sản sinh NO do LPS kích thích trong các tế bào RAW 264.7 với giá trị IC_{50} nằm trong khoảng từ $2,00 \pm 0,34 \mu\text{M}$ [75].

1.2.5.3. Tác dụng chống trầm cảm

Nghiên cứu của Shi và cộng sự năm 2010 đã cho thấy dịch chiết nước và *n*-butanol của cây ban lá dính có tác dụng chống trầm cảm tốt, cơ chế tác dụng có quan hệ chặt chẽ với noradrenalin và thụ thể dopamin [76].

1.2.5.4. Tác dụng ức chế tế bào ung thư

Các sản phẩm có nguồn gốc từ thực vật cung cấp một nguồn nguyên liệu phong phú để phát triển các loại thuốc chống ung thư mới. Các nghiên cứu gần đây cho thấy việc điều tiết sự bám dính dưới tế bào của thụ thể retinoid X-alpha ($RXR\alpha$) là một cách tiếp cận tiềm năng để gây ra quá trình tự chết của tế bào ung thư. Trong nghiên cứu này, một nhóm hợp chất sinh học được sàng lọc để tạo ra sự chuyển vị của $RXR\alpha$ từ nhân sang tế bào chất. Chiết xuất của cây ban lá dính có tác dụng đáng kể đối với sự định vị tế bào dưới $RXR\alpha$ trong các tế bào ung thư khác nhau. Điều trị các tế bào ung thư phổi ở người NIH-H460 bằng dịch chiết cây ban lá dính dẫn đến việc tái phân cấp $RXR\alpha$ từ nhân đến tế bào chất, có liên quan đến ty thể, đi kèm với sự phóng thích cytochrom C và kích thích quá trình apoptosis. Dịch chiết của cây ban lá dính ức chế hiệu quả sự phát triển các dòng tế bào ung thư khác nhau bao gồm ung thư phổi NIH-H460, ung thư dạ dày MGC-803 và tế bào ung thư gan SMMC7721. Tác dụng ức chế tế bào ung thư của dịch chiết cây ban lá dính phụ thuộc vào mức độ $RXR\alpha$, vì nó không thể ức chế sự phát triển của các tế bào CV-1 thiếu $RXR\alpha$ có thể phát hiện được, trong khi sự chuyển nạp $RXR\alpha$ vào các tế bào CV-1 đã khôi phục phản ứng apoptotic của nó đối với *Hypericum sampsonii*. Hơn nữa, tác dụng apoptotic của *Hypericum sampsonii* được tăng cường đáng kể khi $RXR\alpha$ biểu hiện quá mức trong các tế bào NIH-H460. Kết quả này đã chứng minh rằng trong dịch chiết *Hypericum sampsonii*

chứa các thành phần gây ra quá trình chết rụng của tế bào ung thư bằng cách điều chỉnh mức độ bám dính tế bào của $RXR\alpha$ [77].

1.2.5.5. Tác dụng đối với hệ tim mạch

Thử nghiệm cao lỏng của cây ban lá dính với nồng độ thấp trên tim ếch thấy ở giai đoạn đầu có tác dụng kích thích nhưng sau đó ức chế sức co bóp của tim. Còn ở nồng độ cao, dịch cao lỏng gây rung tim và cuối cùng là tim ngừng đập. Thí nghiệm gây mê trên chó, liều dùng 1 - 2 g/con làm hạ huyết áp nhưng không gây ảnh hưởng rõ rệt đến nhịp đập của tim [1].

1.2.6. Công dụng và liều dùng

Cây ban lá dính là một cây thuốc quan trọng được sử dụng ở Việt Nam để chữa nhiều bệnh như đau lưng, bỏng, tiêu chảy, sung tấy. Theo Đông y, cây ban lá dính có vị đắng, cay, the, tính lạnh. Tác dụng thanh nhiệt, giải độc, thông kinh hoạt lạc, chỉ huyết, giảm đau. Trị chảy máu như chảy máu cam, thổ huyết, đại tiểu tiện huyết, lý huyết, kinh nguyệt không đều, phong thấp, đau lưng nhức xương, ho, mồ hôi trộm, thiếu máu và thiếu sữa sau đẻ. Ngoài ra, cây ban lá dính cũng được dùng để chữa bệnh vàng da, lên sởi, mụn nhọt, rắn cắn. Trên thế giới như ở Đài Loan - Trung Quốc, cây ban lá dính là một loại thuốc thảo dược được sử dụng để điều trị huyết ứ, giảm sưng và ức chế tế bào ung thư. Còn ở Trung Quốc cây ban lá dính đã được sử dụng để điều trị nhiều bệnh như đau lưng, bỏng, tiêu chảy, rắn cắn và sung tấy [57], [78].

Theo Đỗ Huy Bích và cộng sự trong tuyển tập cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam, để chữa bệnh viêm gan vàng da cần dùng 40 g cây ban lá dính tươi, sắc nước uống. Trẻ em lên sởi cần dùng cây ban lá dính tươi sắc nước uống để giải độc, hoặc kết hợp với kim ngân hoa và lá diếp cá sắc nước uống. Chữa rắn độc cắn dùng 30 g ban lá dính, 30 g thiên hồ thảo, 15 g thanh mộc hương sắc nước hoặc ngâm rượu uống. Dùng kết hợp với trị ngoài da với lá ban lá dính giã nát, thêm băng phiến và đắp vào vết thương [2].

CHƯƠNG 2: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

2.1.1. Mẫu nghiên cứu

2.1.1.1. Mẫu nghiên cứu về thực vật học

- Mẫu cây ban lá dính có đầy đủ các bộ phận (rễ, thân, lá, hoa, quả, hạt) thu hái tại xã Hà Vị, huyện Bạch Thông, tỉnh Bắc Kạn tháng 06 năm 2016.

- Tiêu bản được lưu giữ tại Phòng tiêu bản Khoa tài nguyên dược liệu - Viện Dược liệu - NIMM (số hiệu DL-130616); phòng Tiêu bản thực vật Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (số hiệu DTT 20160611).

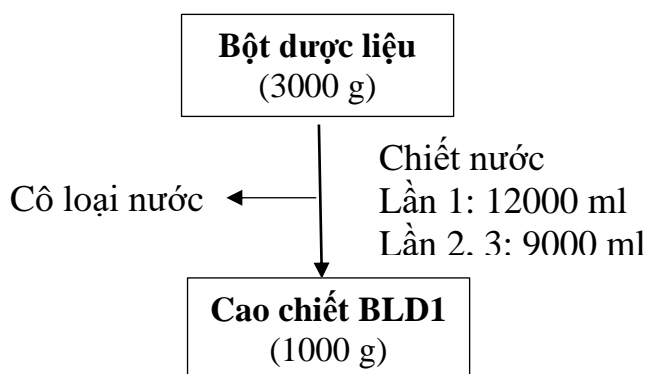
2.1.1.2. Mẫu nghiên cứu thành phần hóa học và thử tác dụng sinh học

- Phần trên mặt đất của cây ban lá dính thu hoạch vào tháng 06 năm 2016.

- Nguyên liệu sau khi thu hái được rửa sạch, thái thành đoạn ngắn, phơi sấy khô ở 40⁰ - 50⁰C, bảo quản trong túi PE và bao bì kín.

- Nguyên liệu dùng để chiết xuất được tán thành bột thô.

- Mẫu đánh giá độc tính cấp và tác dụng chống oxy hóa, bảo vệ gan, cải thiện trí nhớ *in vivo*: chiết với nước theo sơ đồ hình 2.1 thu được cao chiết phần trên mặt đất cây ban lá dính (cao chiết BLD1). Khi sử dụng có thể được cô đặc thêm hay pha loãng với nước cất tùy theo yêu cầu thí nghiệm và được tính ra liều lượng tương đương với số gam dược liệu.



Hình 2.1. Sơ đồ chiết xuất cao chiết BLD1 (3:1)

- Mẫu đánh giá tác dụng chống oxy hóa, chống viêm, hoạt tính ức chế enzym acetylcholinesterase *in vitro*: cao chiết BLD1 và các chất tinh khiết phân lập được từ phần trên mặt đất của cây ban lá dính.

2.1.2. Hóa chất, dung môi

- Hóa chất:

+ Các hóa chất và thuốc thử dùng trong định tính hóa học đạt tiêu chuẩn phân tích theo quy định của Dược điển Việt Nam V.

+ Silica gel pha thuận - Kieselgel 60, 0,04 - 0,063 mm (Merck, Đức); silica gel pha đảo - YMC RP-18 30 - 50 μ m (Fujisilisa Chemical Ltd., Aichi, Japan); diaion HP-20 250 - 850 μ m (Sigma 13605).

+ Bản mỏng sắc ký DC Alufolien 60 silica gel F₂₅₄ (Merck 1.05715.0001) hoặc DC Platenn RP18 F_{254s} (Merck 1.15685.0001).

- Dung môi: *n*-hexan, methanol, aceton, ethyl acetat, dichloromethan... đạt tiêu chuẩn phân tích.

- Thuốc đối chiếu: Viên nang silymarin 70 mg - công ty TNHH LD STADA, Việt Nam; scopolamin hydrobromid lọ 1gam - Sigma Aldrich, Mỹ; viên sủi efferalgan (paracetamol 500mg) - công ty Sanofi Aventis; Viên nén aricept (donepezil hydrochlorid 5mg) - Pfizer, Mỹ.

- Động vật thí nghiệm: chuột nhắt trắng chủng Swiss, cả hai giống khỏe mạnh, trọng lượng 20 - 25 g cung cấp bởi Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương.

- Môi trường nuôi cấy DMEM, FBS, kháng sinh và các hóa chất cần thiết khác của các hãng Sigma, GIBCO, Invitrogen..., sulfanamid, acid phosphoric, *n*-alpha-naphthyl-ethylenediamin.

- Dòng tế bào đại thực bào: macrophage RAW 264.7 (ATCI) do GS. TS. J. M. Pezzuto trường Đại học Hawaii và GS. Jeanette Maier trường Đại học Milan, Italia cung cấp.

- Các hóa chất, dung môi khác đạt tiêu chuẩn phân tích hoặc theo tiêu chuẩn Dược điển Việt Nam V.

2.1.3. Thiết bị và dụng cụ nghiên cứu

- Kính hiển vi Axioskop 40 (Carl Zeiss Light Microscopy, Đức) của Khoa Hóa phân tích - Tiêu chuẩn, Viện Dược liệu.

- Máy chiết siêu âm, máy cô quay chân không, đèn tử ngoại hai bước sóng 254 và 570 nm, tủ sấy chân không, máy sấy.

- Phở khối lượng đo trên máy Agilent 1100 LC - MSD Trap; phở khối lượng phân giải cao HR-ESI-MS đo trên máy FT-ICR-Mass spectrophotometer; phở cộng hưởng từ hạt nhân đo trên máy Bruker Advance AM500 FT-NMR; phở lưỡng sắc tròn đo trên máy Chirascan TM-CD spectrometer; điểm nóng chảy đo trên máy Kofler micro-hotstage; độ quay cực đo trên máy Jasco DIP-1000 KUY polarimeter tại Viện Hóa sinh biển, Viện Hàn Lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

- Máy xét nghiệm sinh hoá tự động Chemix 180 hãng Sysmex; máy xét nghiệm huyết học tự động XE2100, hãng Sysmex; máy xét nghiệm sinh hóa Erba Chem 5 V3 (Ấn Độ); mê cung nước Morris, mê cung nhiều chữ T; mô hình thanh quay Rotarod của hãng Ugo Basile, model 7650.

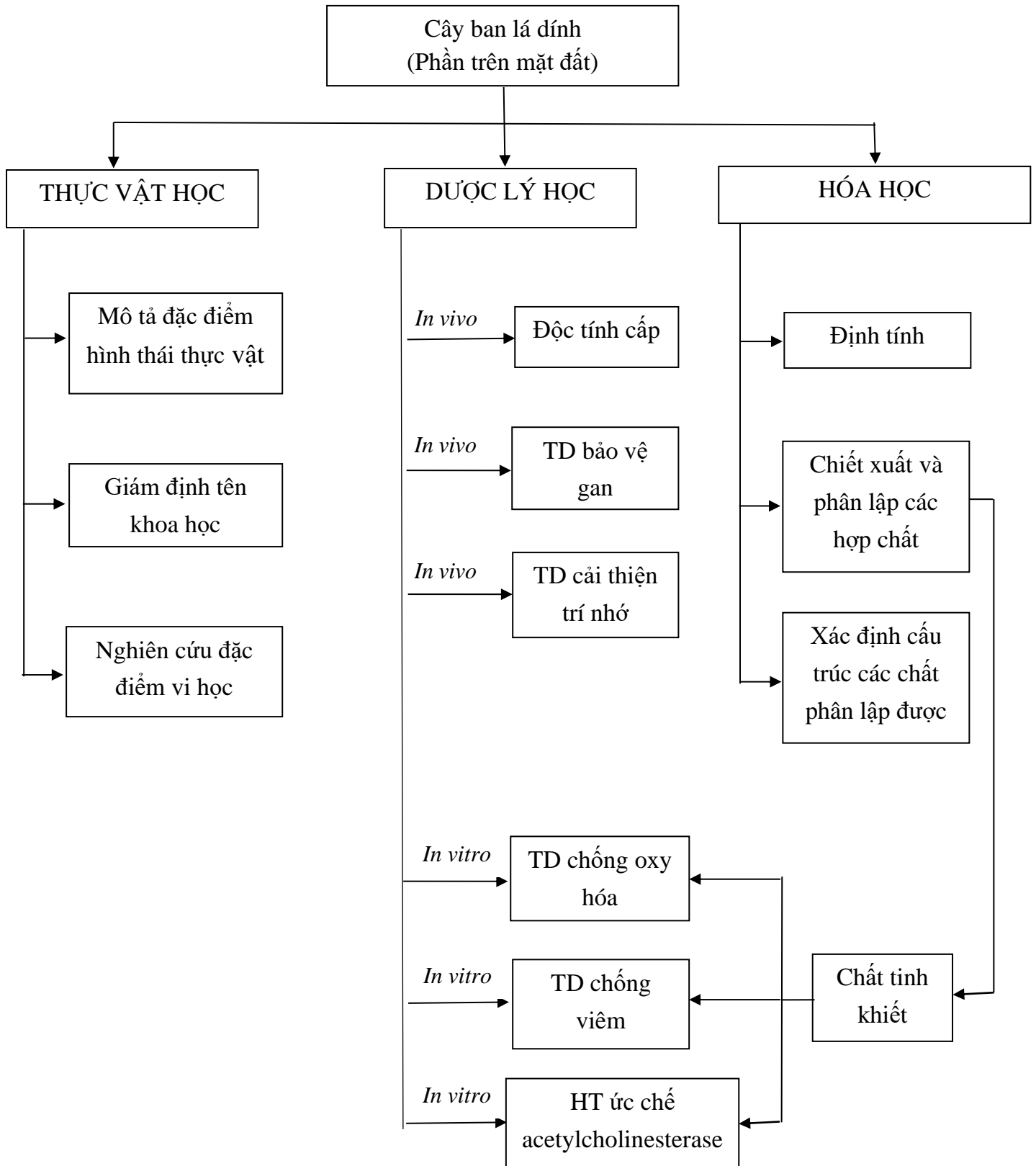
- Phần mềm phân tích kết quả anymaze, Công ty US Biotech, Hoa Kỳ.

- Cân phân tích (Sartorius - Đức); bộ dụng cụ mô động vật cỡ nhỏ, kim đầu tù, cốc chia vạch, bơm kim tiêm 1ml, 5ml...

- Đĩa 96 giếng (SPL Life Sciences, Hàn Quốc), micropipet, pipet đa kênh, đầu tip pipet, pasteur pipet (Isolab, Đức), máy đọc ELISA 96 giếng (ELISA Bio-Rad machine, M).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Sơ đồ thiết kế nghiên cứu



2.2.1. Giám định tên khoa học, mô tả đặc điểm hình thái thực vật và nghiên cứu đặc điểm vi học các mẫu nghiên cứu

- Quan sát và mô tả đặc điểm hình thái thực vật, điều kiện sinh thái của cây tại thực địa.

- Thu mẫu có hoa, quả làm tiêu bản và lưu mẫu tại phòng tiêu bản khoa Tài nguyên Dược liệu - Viện Dược liệu.

- Giám định tên khoa học mẫu nghiên cứu bằng phương pháp so sánh hình thái dựa trên các khóa phân loại và bản mô tả các loài thuộc chi *Hypericum* của APG IV (Xu, 2017); một số mẫu tiêu bản có tên ban lá dính hiện đang được lưu trữ tại các phòng tiêu bản thực vật của Khoa Tài nguyên - Viện Dược liệu, Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật - Viện Hàn lâm khoa học và Công nghệ Việt Nam; sự thẩm định của các chuyên gia phân loại thực vật.

- Nghiên cứu đặc điểm vi học bằng phương pháp cắt, làm tiêu bản vi phẫu và soi bột lá, thân và toàn cây ban lá dính, quan sát các đặc điểm, mô tả và chụp ảnh tiêu bản dưới kính hiển vi [79].

2.2.2. Nghiên cứu thành phần hóa học phần trên mặt đất cây ban lá dính

2.2.2.1. Định tính các nhóm chất hữu cơ

Định tính các nhóm chất hữu cơ chính trong mẫu nghiên cứu bằng phản ứng hóa học theo phương pháp phân tích sàng lọc các nhóm hợp chất thiên nhiên có trong dược liệu [80].

2.2.2.2. Chiết xuất và phân lập các hợp chất trong phần trên mặt đất cây ban lá dính

Mẫu phần trên mặt đất cây ban lá dính (4,5 kg) được thái nhỏ, nghiền thành bột, chiết xuất bằng phương pháp ngâm với 30 lít methanol ở 40°C, chiết 3 lần, mỗi lần 3 ngày. Các dịch chiết được gộp lại và lọc qua giấy lọc, loại dung môi dưới áp suất giảm thu lấy cặn. Cặn này được lắc đều với khoảng 1 lít nước cất và chiết phân bố lần lượt với *n*-hexan, dichloromethan, ethyl acetat. Sau đó loại dung môi dưới áp suất giảm thu lấy cặn. Các cặn được phân lập và tinh chế bằng sắc ký

cột pha thuận DC Alufolien 60 GF₂₅₄ và sắc ký cột pha đảo DC Platenn RP-18GF_{254S}.

2.2.2.3. *Xác định cấu trúc hóa học các hợp chất phân lập*

Xác định cấu trúc hóa học các hợp chất phân lập dựa vào các chỉ số lý hóa như nhiệt độ nóng chảy, độ quay cực và các dữ liệu phổ ESI-MS, HR-ESI-MS, NMR một chiều (¹H-NMR, ¹³C-NMR, DEPT), NMR hai chiều (HSQC, HMBC), CD [81], [82].

2.2.3. *Đánh giá độc tính cấp của cao chiết BLD1*

Nghiên cứu độc tính cấp và xác định LD₅₀ của cao chiết BLD1 trên chuột nhắt trắng theo đường uống [83], [84].

Chuột nhắt trắng cả đực và cái, trọng lượng 20 - 25 g, nhịn ăn 12 giờ qua đêm, chia ngẫu nhiên thành các lô, mỗi lô 10 con.

Cho chuột uống cao chiết BLD1 với liều tăng dần trong cùng một thể tích để xác định liều thấp nhất gây chết 100% số chuột và liều cao nhất không gây chết chuột (0%).

Theo dõi tình trạng chung của chuột, quá trình diễn biến bắt đầu có dấu hiệu nhiễm độc (như nôn, co giật, kích động, bài tiết...) và số lượng chuột chết trong vòng 72 giờ sau khi uống thuốc. Tất cả chuột chết được mổ để đánh giá tổn thương đại thể. Từ đó xây dựng đồ thị để xác định LD₅₀ của mẫu. Sau đó tiếp tục theo dõi tình trạng của chuột đến hết ngày thứ 7 sau khi uống cao chiết BLD1.

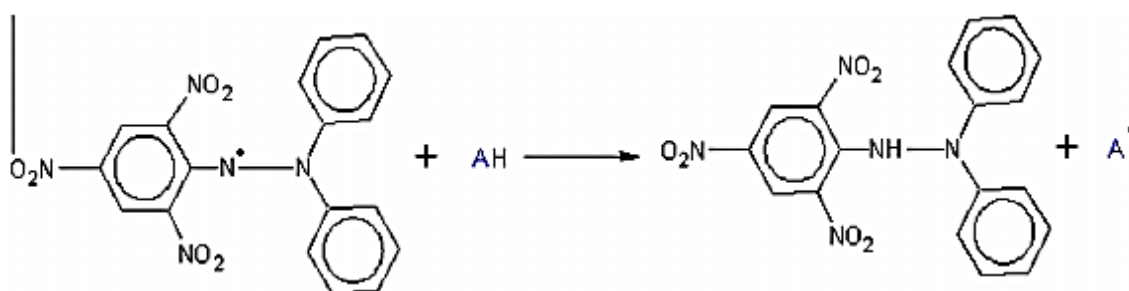
Tiến hành phẫu tích quan sát tình trạng các tạng ngay sau khi có chuột chết (nếu có) để xác định nguyên nhân gây độc.

2.2.4. *Nghiên cứu một số tác dụng sinh học của cao chiết BLD1 và một số chất tinh khiết phân lập được*

2.2.4.1. *Đánh giá hoạt tính chống oxy hóa in vitro của cao chiết BLD1 và một số chất tinh khiết phân lập được*

Tác dụng chống oxy hóa *in vitro* được đánh giá theo phương pháp thu dọn gốc tự do DPPH [85].

* Nguyên tắc của phương pháp: 1,1- diphenyl-1-2-picrylhydrazyl (DPPH) là một gốc tự do bền, có màu tím và có độ hấp thụ cực đại ở bước sóng 517 nm. Khi có mặt chất chống oxy hóa (AH), nó sẽ bị khử thành 2,2- diphenyl-1-1-picrylhydrazin (DPPH-H) có màu vàng. Đo độ giảm hấp thụ ở bước sóng 517 nm để xác định khả năng khử gốc DPPH của chất chống oxy hóa.



Hình 2.2. Phản ứng của gốc tự do DPPH với hợp chất chống oxy hóa

* Tiến hành thí nghiệm:

- Mẫu thử được pha trong DMSO
- Pha 1mg DPPH trong 10mL MeOH (0,1mg/mL).
- Lấy 10µl mẫu thử được ủ với 190µl dung dịch DPPH, ở nhiệt độ 37°C trong 20 phút và đo trên máy ELISA ở bước sóng 517nm. Chất đối chứng acid ascorbic được dùng để kiểm soát độ ổn định và đánh giá hoạt tính ức chế tương đương [86], [87]. Các phép thử được lặp lại 3 lần.

- Kết quả được tính theo công thức sau:

$$\% \text{ ức chế} = 100 - [(OD_s) / (OD_c) \times 100]$$

- Trong đó:

- + OD_s: Mật độ quang trung bình của mẫu thử

- + OD_c: Mật độ quang trung bình của mẫu đối chứng (không có mẫu thử, chỉ có DPPH, coi như giá trị ức chế 0%).

2.2.4.2. Đánh giá hoạt tính chống viêm *in vitro* của cao chiết BLD1 và một số chất tinh khiết phân lập được

Hoạt tính chống viêm *in vitro* được đánh giá theo cơ chế ức chế sự sản sinh NO trên dòng tế bào đại thực bào chuột RAW264.7.

* *Nguyên tắc của phương pháp:* Khả năng ức chế sản sinh NO của mẫu thử được đánh giá theo phương pháp Griess. Phương pháp được sử dụng để xác định gián tiếp NO bằng cách đo màu các thành phần sản phẩm của nó là nitrat (NO_3^-) và nitrit (NO_2^-). NO_3^- được chuyển thành NO_2^- dưới tác động của nitrat reductase. NO_2^- sau đó được phát hiện và phân tích bằng cách hình thành một màu hồng đỏ khi mẫu thử có chứa NO_2^- với thuốc thử Griess và được định lượng bằng phương pháp đo quang [88].

* *Tiến hành thí nghiệm:*

Tế bào RAW264.7 (tế bào đại thực bào chuột) được nuôi cấy ở 37°C trong môi trường DMEM có bổ sung huyết thanh nhau thai bò 10% (FBS), 100 U/ml penicillin và 100 $\mu\text{g/ml}$ streptomycin trong tủ nuôi cấy CO_2 5% trong 48 giờ.

Sau đó chúng được nuôi cấy trong đĩa 96 giếng với mật độ $2,5 \times 10^5$ tế bào/giếng. Tế bào được kích thích với LPS trong 24 giờ với sự có mặt của các hợp chất thử ở nhiều nồng độ khác nhau được pha sẵn trong DMSO. Dịch nổi của tế bào phản ứng với thuốc thử Griess gồm 1% sulganilamid, 0,1% N-1-naphthylenediamin dihydrochlorid và 2,5% acid phosphoric. NaNO_2 ở các nồng độ khác nhau được sử dụng để xây dựng đường chuẩn. Độ hấp thụ được đo ở 570 nm. Cardamonin được sử dụng làm mẫu đối chứng.

Phần tế bào còn lại sau khi đã sử dụng để đánh giá các hoạt tính *in vitro* được bổ sung dung dịch MTT (5 mg/ml pha trong PBS), ủ 4 giờ ở 37°C và 5% CO_2 . Sau đó hút bỏ hết môi trường trên bề mặt, kết tủa formazan được hòa tan trong isopropanol. Độ hấp thụ được đo ở 570 nm.

* *Tính kết quả:*

- Tính % ức chế NO: Hàm lượng NO của mẫu thử được xác định dựa vào đường cong hàm lượng chuẩn NaNO_2 và được so sánh với mẫu chứng viêm LPS

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

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

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

Trong đó: OD: mật độ quang σ : độ lệch tiêu chuẩn

+ Độ lệch chuẩn tính theo công thức:

$$\sigma = \sqrt{\frac{(\sum x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Trong đó: x_i : giá trị OD tại giếng i ; \bar{x} : giá trị OD trung bình; n : số giếng thử lặp lại.

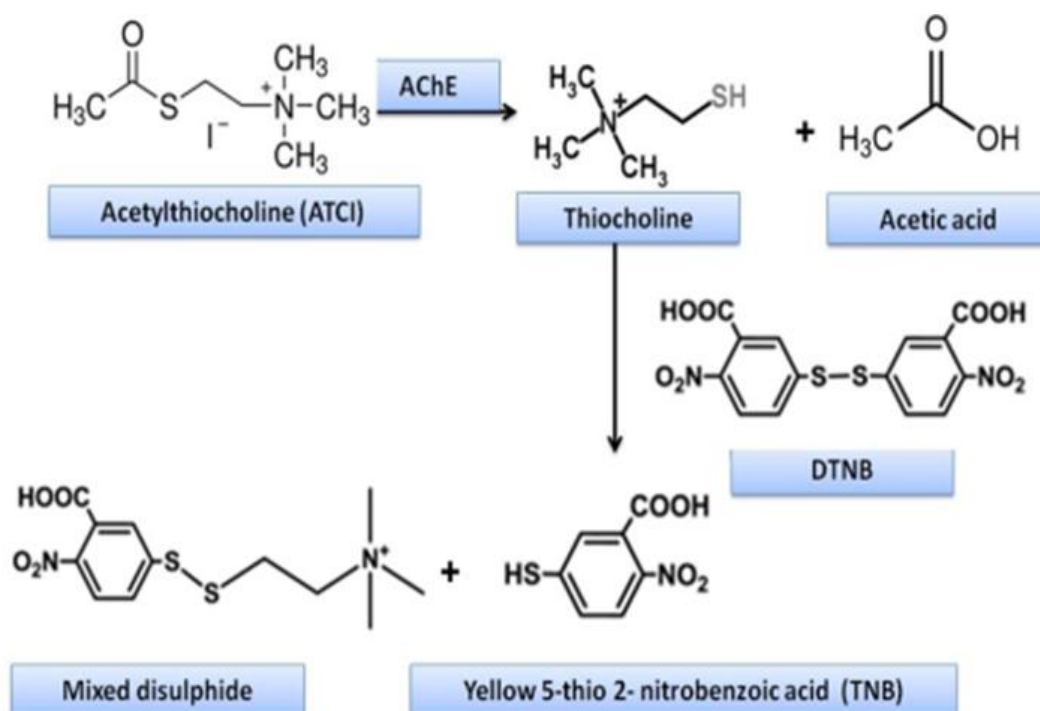
- Giá trị IC_{50} (nồng độ ức chế 50% sự sản sinh NO) được xác định theo phương trình hồi quy tuyến tính trên phần mềm Graphpad Prism 5.0.

2.2.4.3. Đánh giá hoạt tính ức chế enzyme acetylcholinesterase *in vitro* của cao chiết BLD1 và một số chất tinh khiết phân lập được

Phương pháp đánh giá hoạt tính ức chế enzyme acetylcholinesterase được xây dựng dựa trên phương pháp của Ellman's [87].

* Nguyên tắc của phương pháp:

Enzyme acetylcholinesterase thủy phân cơ chất acetylthiocholin tạo thành thiocholin và acid acetic. Thiocholin phản ứng với acid 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic (DTNB) sản sinh ra 5-thio-2-nitrobenzoat có màu vàng. Hoạt động của enzyme được đánh giá dựa vào sự thay đổi mật độ quang của acid 5-thio-2-nitro-benzoic ở bước sóng 412 nm.



** Tiến hành thí nghiệm:*

Tiến hành trên đĩa 96 giếng, 100 μ l DTNB 3 mM, 20 μ l AChE (0,245 U/ml), 40 μ l đệm Tris HCl 50 mM, dung dịch đệm natri phosphat pH8 và 20 μ l mẫu thử nghiệm được cho vào giếng. Sau khi trộn đều các thành phần trong giếng, ủ đĩa 96 giếng ở nhiệt độ 25 $^{\circ}$ C trong 15 phút. Phản ứng enzym được bắt đầu bằng việc bổ sung 20 μ l ACTI 15 mM. Sau khi ủ đĩa 20 phút ở 25 $^{\circ}$ C, sự thủy phân của acetylthiocholin được đo ở bước sóng 412 nm. Berberin được sử dụng làm chất đối chứng dương [90]. Tất cả các phản ứng đều được thực hiện lặp lại 3 lần.

** Tính kết quả:*

Phần trăm ức chế hoạt độ AchE được tính theo công thức:

$$\%I = \frac{A_c - A_t}{A_c - A_o} \times 100$$

Trong đó: %I: phần trăm hoạt tính AChE bị ức chế

A_c : độ hấp thu của mẫu chứng (không chứa 20 μ l dung dịch thử)

A_t : độ hấp thu của mẫu thử

A_o : độ hấp thu của mẫu trắng (1 ml dung dịch đệm natri phosphat)

2.2.4.4. Nghiên cứu tác dụng chống oxy hóa bảo vệ gan *in vivo* của cao chiết BLD1

Tác dụng chống oxy hóa bảo vệ gan *in vivo* của cao chiết BLD1 được thực hiện trên mô hình chuột nhắt trắng gây độc gan cấp bằng paracetamol đường uống liều cao [91], [92].

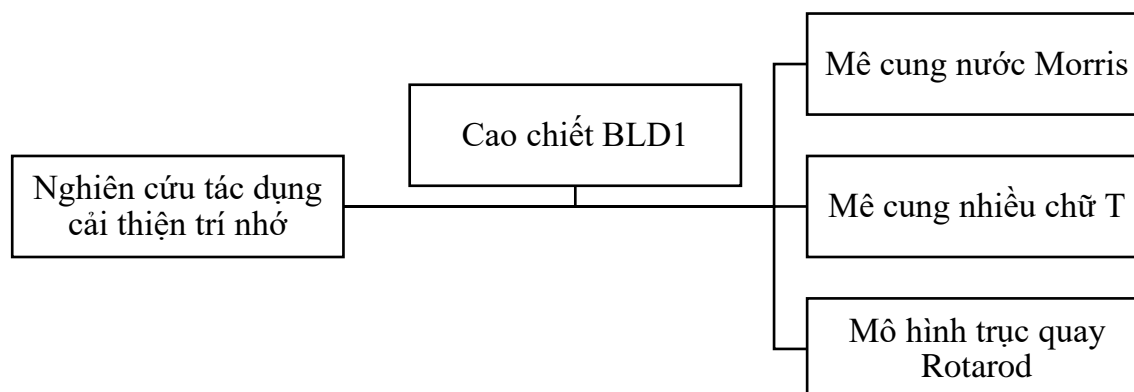
Chuột nhắt trắng được chia ngẫu nhiên thành 5 lô, mỗi lô 10 con. Các lô chuột thí nghiệm lần lượt được uống các mẫu thử như sau:

- Lô 1 (chứng sinh học): uống nước cất 0,2 ml/10 g.
- Lô 2 (mô hình): uống nước cất 0,2 ml/10 g + paracetamol 400 mg/kg.
- Lô 3 (chứng dương): uống silymarin 140 mg/kg + paracetamol 400 mg/kg.
- Lô 4: uống cao chiết BLD1 (liều thấp 3,6 g/kg) 1,2 ml/kg + paracetamol 400 mg/kg.
- Lô 5: uống cao chiết BLD1 (liều cao 10,8 g/kg) 3,6 ml/kg + paracetamol 400 mg/kg.

Chuột được cho uống thuốc thử hoặc nước cất liên tục vào các buổi sáng trong 10 ngày. Đến ngày thứ 10, sau khi uống thuốc thử 3 giờ (chuột được nhịn đói 16 - 18 giờ trước đó) tiến hành gây tổn thương tế bào gan bằng cách cho chuột từ lô 2 đến lô 5 uống paracetamol liều 400 mg/kg. Sau 48 giờ gây độc bằng paracetamol, tiến hành giết chuột, lấy máu động mạch cảnh chuột để đo hoạt độ enzym AST, ALT huyết thanh. Tách nhanh gan ra ngay lúc đó để quan sát hình ảnh đại thể, rửa sạch bằng nước muối sinh lý, thấm khô bằng giấy lọc và cân trọng lượng gan. Xác định hàm lượng malonyl dialdehyd (MDA) trong dịch đồng thể gan và giải phẫu mô bệnh học gan của 30% số chuột mỗi lô.

2.2.4.5. Nghiên cứu tác dụng cải thiện trí nhớ *in vivo* của cao chiết BLD1

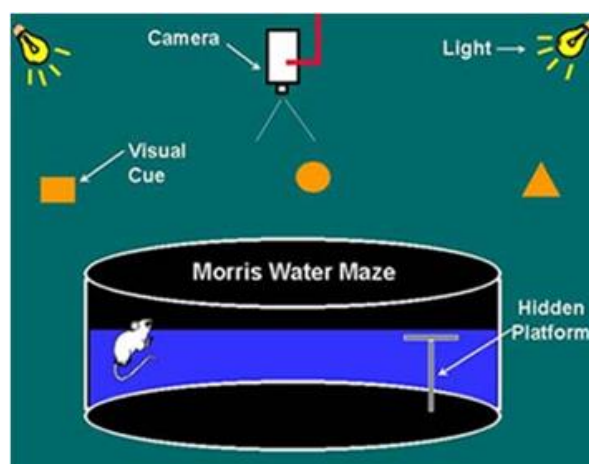
Tác dụng cải thiện trí nhớ *in vivo* của cao chiết BLD1 được tiến hành trên 3 mô hình là mê cung nước Morris, mê cung nhiều chữ T và mô hình trục quay Rotarod.



Hình 2.3. Sơ đồ thiết kế nghiên cứu tác dụng cải thiện trí nhớ

a) Mô hình Mê cung nước Morris (Morris water maze - MWM)

Thử nghiệm Mê cung nước Morris được thực hiện theo phương pháp của Lee và cộng sự (2011) [93].



Hình 2.4. Mô hình mê cung nước Morris

Chuột nhắt trắng được chia ngẫu nhiên thành 5 lô, mỗi lô 10 con. Chuột ở các lô được uống thuốc thử hoặc nước cất 30 phút trước khi tiêm màng bụng NaCl 0,9% hoặc scopolamin 1 mg/kg trong 6 ngày liên tiếp như sau:

- Lô 1 (chứng trắng): uống nước cất 0,2 ml/10 g + tiêm màng bụng NaCl 0,9% 0,1 ml/10 g.

- Lô 2 (mô hình): uống nước cất 0,2 ml/10 g + tiêm màng bụng scopolamin (1 mg/kg) 0,1 ml/10 g.

- Lô 3 (chứng dương): uống donepezil (2,4 mg/kg) 0,2 ml/10 g, sau đó 30 phút tiêm màng bụng scopolamin (1 mg/kg) 0,1 ml/10 g.

- Lô 4: uống cao chiết BLD1 (liều thấp 3,6 g/kg) 0,2 ml/10 g, sau 30 phút tiêm màng bụng scopolamin (1 mg/kg) 0,1 ml/10 g.

- Lô 5: uống cao chiết BLD1 (liều cao 10,8 g/kg) 3,6 ml/10gam, sau đó 30 phút tiêm màng bụng scopolamin (1 mg/kg) 0,1 ml/10 g.

Thử nghiệm gồm 2 giai đoạn:

* Giai đoạn học hỏi: thời gian 5 ngày, chia thành 2 bài tập

- Bài tập nhìn thấy bẹn đồ:

Ngày 1 của nghiên cứu, bẹn đồ được đặt cao hơn mực nước 1 cm. Sau khi tiêm scopolamin 30 phút, chuột được làm quen với môi trường nước trong 1 phút. Sau đó chuột được hướng đến vị trí bẹn đồ và đặt lên vị trí bẹn đồ trong 15 giây để nhận biết. Lần lượt đưa chuột đến các vị trí 1/4 bể còn lại, hướng đầu chuột vào thành bể. Chuột sẽ được hướng dẫn nếu nó không tự tìm thấy bẹn đồ trong 2 phút (nếu trong khoảng thời gian đó mà chuột không tìm thấy bẹn đồ thì lấy kết quả là 2 phút). Sau khi kết thúc mỗi lần thử, lấy chuột ra và dùng khăn bông lau khô chuột, ủ ấm bằng đèn hồng ngoại trong 10 - 15 giây. Chuột được tập 2 lần/ngày, vị trí xuất phát lần 1 ở góc phần tư đối diện vị trí bẹn đồ, lần 2 ở góc phần tư cạnh bên phải vị trí bẹn đồ và mỗi lần cách nhau 15 phút.

- Bài tập không tìm thấy bẹn đồ:

Ngày 2, 3, 4 và 5 của giai đoạn học hỏi tiến hành như ngày 1, nhưng lúc này bẹn đồ được giấu đi bằng cách đặt bẹn đồ dưới mực nước 1cm.

- Chỉ số đánh giá: thời gian chuột tìm thấy bẹn đồ và chiều dài quãng đường chuột tìm thấy bẹn đồ.

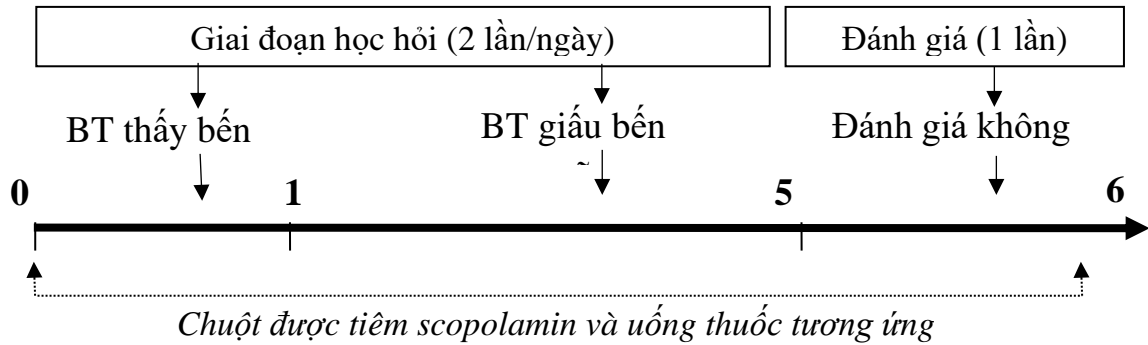
* Giai đoạn đánh giá chính thức:

- Thực hiện vào ngày thứ 6, bẹn đồ được bỏ ra khỏi bể, chuột được thả vào vị trí đối diện góc 1/4 bể trước đó chứa bẹn đồ. Cho chuột được bơi một lần duy nhất trong bể 1 phút. Nếu có trí nhớ tốt, chuột sẽ dựa vào các vật định hướng không gian trong phòng và bơi lâu tại 1/4 bể có đặt bẹn đồ từ những ngày tập trước.

- Chỉ số đánh giá:

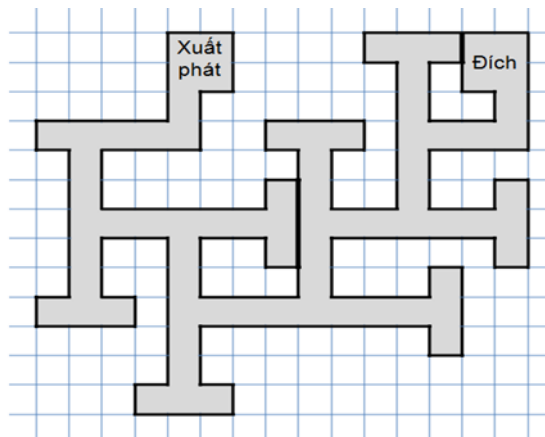
+ Phần trăm thời gian chuột ở 1/4 bề trước đó có đặt bẻ đũa.

+ Phần trăm quãng đường chuột bơi ở 3/4 bề trước đó không đặt bẻ đũa.



Hình 2.5. Sơ đồ nghiên cứu tác dụng cải thiện trí nhớ trên mô hình MWM
b) Nghiên cứu trên mô hình Mê cung nhiều chữ T (Multiple T maze - MTM)

Thử nghiệm Mê cung nhiều chữ T được tiến hành theo phương pháp của Falsafi SK và cộng sự (2012) [94].



Hình 2.6. Mô hình mê cung nhiều chữ T

Chuột nhất được chia thành các lô tương tự thí nghiệm Mê cung nước Morris.

Chuột được tiêm và cho uống thuốc trong 8 ngày liên tiếp. Thử nghiệm được tiến hành sau khi tiêm scopolamin 30 phút. Trước mỗi thử nghiệm, chuột được nhịn ăn 16 giờ để tạo động lực tìm kiếm thức ăn.

Chuột được đặt ở khoang xuất phát là một buồng tối trong 10 giây. Khi bắt đầu thử nghiệm, buồng tối được mở ra, chuột bắt đầu hành trình đi tìm kiếm thức

ăn ở khoang đích. Nếu thời gian tìm quá 8 phút mà chuột không tìm thấy khoang đích gọi là tìm kiếm thất bại và lấy kết quả là 8 phút. Khi tới được khoang đích, chuột được nhận phần thưởng là một viên thức ăn nhỏ, sau đó chuột được trả về lồng cũ và được cho ăn với lượng 120 g/kg thể trọng để duy trì trọng lượng, sau đó tiếp tục để chuột nhịn đói nhằm chuẩn bị cho các thử nghiệm ngày hôm sau.

Ngay khi kết thúc mỗi thử nghiệm, toàn bộ mê cung được lau sạch bằng dung dịch cồn 70⁰.

Thử nghiệm chia thành 2 giai đoạn:

* Giai đoạn học hỏi:

- Trước khi thử nghiệm chuột được làm quen và khám phá mê cung vào ngày 0 (chuột chưa được tiêm và uống thuốc), những chuột nào tìm đến được khoang đích trong 8 phút mới được lựa chọn tiếp tục đưa vào thử nghiệm.

- Sau đó chuột được học hỏi trong 5 ngày liên tiếp tính từ ngày đầu tiên chuột tiêm và uống thuốc, 1 lần/ngày.

- Chỉ số đánh giá: thời gian chuột tìm tới được khoang đích.

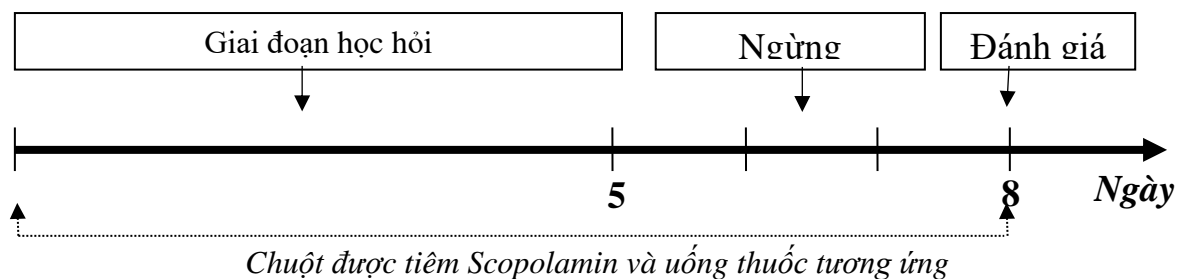
* Giai đoạn đánh giá chính thức

- Vào ngày 8 của thử nghiệm, chuột được đưa vào mê cung một lần duy nhất tương tự như trên.

- Chỉ số đánh giá:

+ Thời gian chuột tìm tới được khoang đích.

+ Chiều dài quãng đường chuột đi để tới được khoang đích.



Hình 2.7. Sơ đồ nghiên cứu tác dụng cải thiện trí nhớ trên mô hình MTM

Các chỉ số nghiên cứu ở mô hình MWM và MTM được phân tích bằng phần

mềm Anymaze, công ty US Biotech, Mỹ.

c) Nghiên cứu trên mô hình trục quay Rotarod

Thử nghiệm trục quay Rotarod được tiến hành theo phương pháp của Falsafi SK và cộng sự (2012) [94].



Hình 2.8. Mô hình trục quay Rotarod

Chuột nhất được chia thành các lô tương tự thí nghiệm Mê cung nước Morris.

Chuột được tiêm và cho uống thuốc trong 7 ngày liên tiếp. Trước mỗi thử nghiệm chuột phải được đưa vào phòng thử nghiệm trước 30 phút để làm quen với môi trường thí nghiệm.

Thử nghiệm được chia thành 2 giai đoạn:

* Giai đoạn học hỏi:

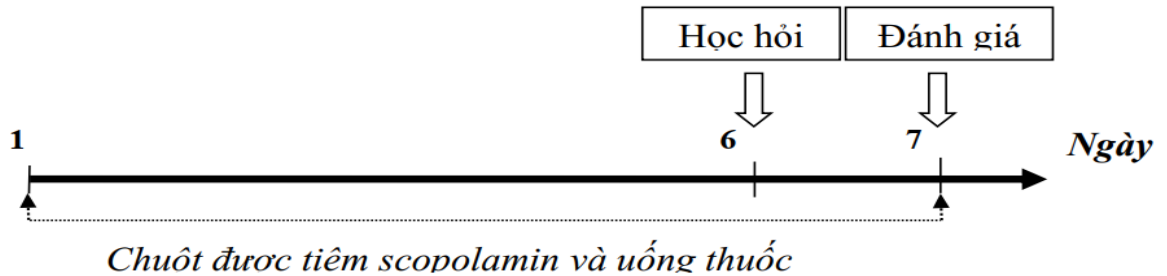
Chuột được huấn luyện vào ngày thứ 6 tính từ ngày đầu tiên dùng thuốc. Cài đặt máy để tăng tốc độ từ 4 đến 40 vòng/phút trong 8 phút. Máy sẽ giữ nguyên tốc độ 4 vòng/phút không đổi cho đến khi bắt đầu chính thức ghi thời gian. Thử nghiệm bắt đầu được tiến hành sau khi tiêm scopolamin 30 phút. Lần lượt cho chuột lên trục quay 3 lần, mỗi lần cách nhau 10 phút. Trong mỗi lần thử nghiệm, nếu quá 8 phút mà chuột vẫn không rời khỏi trục quay thì dừng lại và ghi kết quả 8 phút. Sau mỗi lần huấn luyện lau sạch máy với cồn 70⁰.

* Giai đoạn đánh giá chính thức:

- Tiến hành vào ngày thứ 7, tính từ ngày đầu tiên dùng thuốc, tiến hành

tương tự như giai đoạn học hỏi.

- Chỉ số đánh giá: thời gian chuột ở lại trên trục quay (thời gian lâu nhất chuột ở lại trên trục quay trong 3 lần thăm dò).



Hình 2.9. Sơ đồ nghiên cứu tác dụng cải thiện trí nhớ trên mô hình Rotarod

2.2.5. Xử lý số liệu

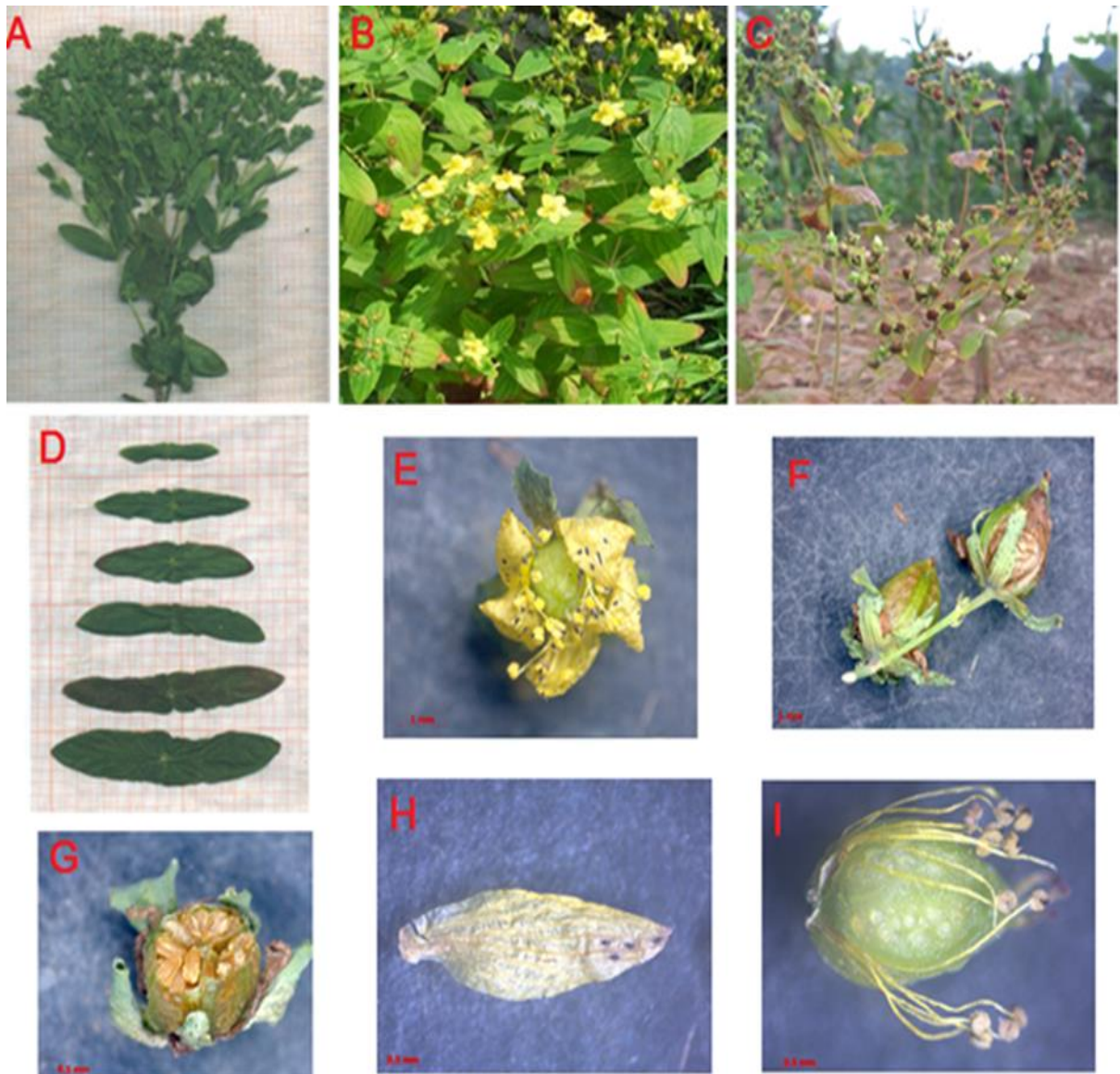
Các số liệu được xử lý theo phương pháp thống kê y sinh học: Số liệu nghiên cứu được biểu diễn dưới dạng $\bar{X} \pm SD$. Kiểm định các giá trị trung bình bằng T-test Student, test trước sau (Avant - Après) sử dụng phần mềm Microsoft Excel 2010, Ananova và SPSS 16.0. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$.

CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Kết quả mô tả đặc điểm hình thái thực vật, giám định tên khoa học và xác định đặc điểm vi học của mẫu nghiên cứu

3.1.1. Đặc điểm hình thái thực vật

Quan sát thực địa và phân tích hình thái, mẫu nghiên cứu có các đặc điểm sau (hình 3.1):



Hình 3.1. Một số đặc điểm hình thái cây ban lá dính

Chú thích: A- Toàn cây, B- Cụm hoa, C- Quả già, D- Lá, E- Hoa, F- Quả non, G- Bầu cắt ngang, H- Cánh hoa, I- Nhị và bầu

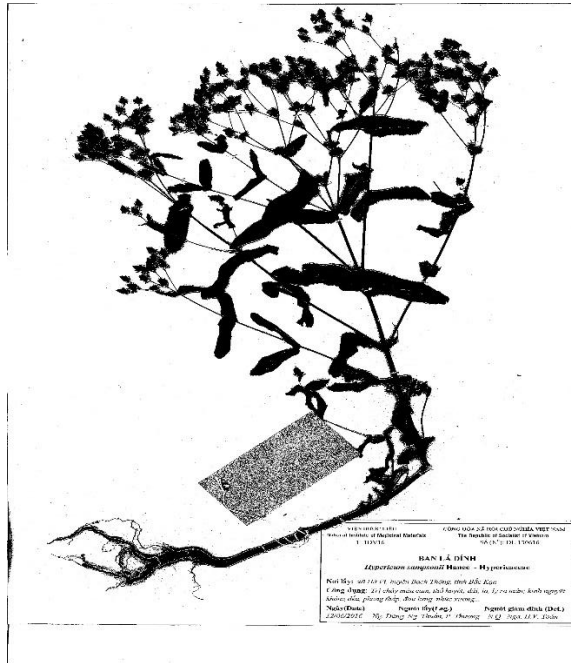
- Thân thảo mọc hàng năm cao chừng 60 - 70 cm. Thân tròn, nhẵn, thân non có màu xanh lá cây, thân già màu nâu nhạt. Rễ có vỏ ngoài màu nâu nhạt, bên trong màu trắng, có một rễ chính và nhiều rễ phụ. Lá mọc đối không có cuống, dính lấy nhau và ôm lấy thân cây, lá dài 4 - 9 cm, rộng 2 - 4 cm, phiến hình trứng, mép lá nguyên. Mặt trên và dưới màu xanh, mặt trên có đốm trong, mặt dưới có điểm tuyến màu đen dày đặc, 2 mặt không có lông. Gân lông chim.

- Cụm hoa xim ngù ở đầu cành và ở ngọn. Lá bắc nhỏ hình mác, dài 3 mm, đầu thuôn nhọn. Lá đài dài 4 - 6 mm, rộng 2 - 3 mm, hình bầu dục, có các điểm tuyến màu đen. Đường kính hoa 8 - 10 mm. Hoa nhỏ màu vàng 5 cánh, tiền khai hoa vặn, trên cánh hoa và mép cánh có điểm tuyến màu đen. Nhị hợp thành 3 nhóm, mỗi nhóm 12 - 15 nhị. Chi nhị dài. Bao phấn màu vàng nhạt, hình thận, nứt dọc, dính lưng, có điểm tuyến màu đen. Bầu trên, hình trứng nhọn, dài khoảng 3 mm, bầu 3 ô, dính noãn trung trụ, 3 vòi nhụy, rời nhau, đầu vòi màu tím đỏ.

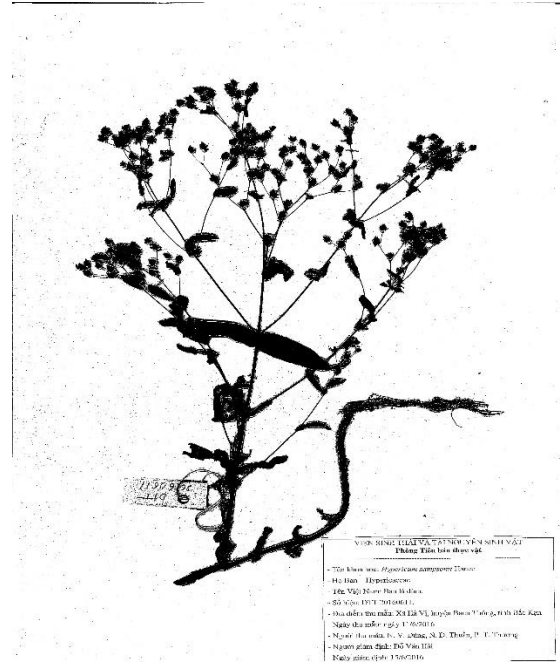
- Quả nang hình tròn, có 3 mảnh vỏ, rộng 4 - 5 mm, dài 6 - 9 mm, có 10 - 12 cạnh lồi dọc. Hạt màu vàng nâu, hình trứng thuôn, dài khoảng 1 mm, có nhiều vân sóng thưa rõ. Mùa hoa vào tháng 4 - 5, quả chín và rụng vào tháng 7 - 8.

3.1.2. Giám định tên khoa học

Sau khi quan sát, phân tích các đặc điểm hình thái của mẫu nghiên cứu được thu hái ở xã Hà Vị, huyện Bạch Thông, tỉnh Bắc Kạn tháng 6 năm 2016, đối chiếu với khóa phân loại và bản mô tả của các loài thuộc chi *Hypericum* họ Ban (Hypericaceae) của Li Xiwen và cộng sự (2007) [95]. Đồng thời tham khảo các tài liệu thực vật đã công bố, kết hợp đối chiếu với tiêu bản của loài ban lá dính đang được lưu trữ mẫu tại Viện Dược liệu, Viện sinh thái tài nguyên sinh vật - Viện Hàn lâm khoa học và Công nghệ Việt Nam, ý kiến của các chuyên gia thực vật và được giám định bởi Khoa Tài nguyên Dược liệu - Viện Dược liệu (hình 3.2) và Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (hình 3.3). Mẫu nghiên cứu được định tên là ban lá dính có tên khoa học *Hypericum sampsonii* Hance., họ Ban (Hypericaceae).



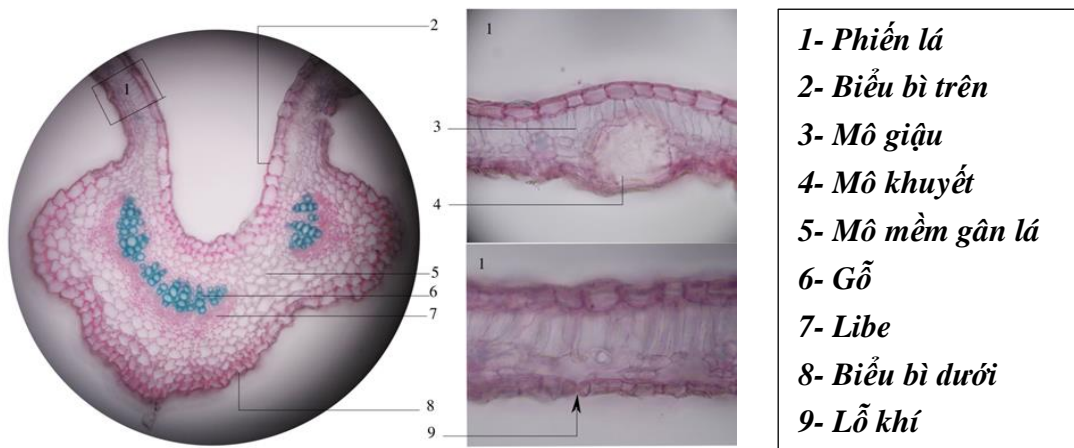
Hình 3.2. Tiêu bản cây ban lá dính (2016) lưu tại Viện Dược liệu



Hình 3.3. Tiêu bản cây ban lá dính (2016) lưu tại Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật

3.1.3. Đặc điểm vi học

3.1.3.1. Lá



Hình 3.4. Vi phẫu lá cây ban lá dính

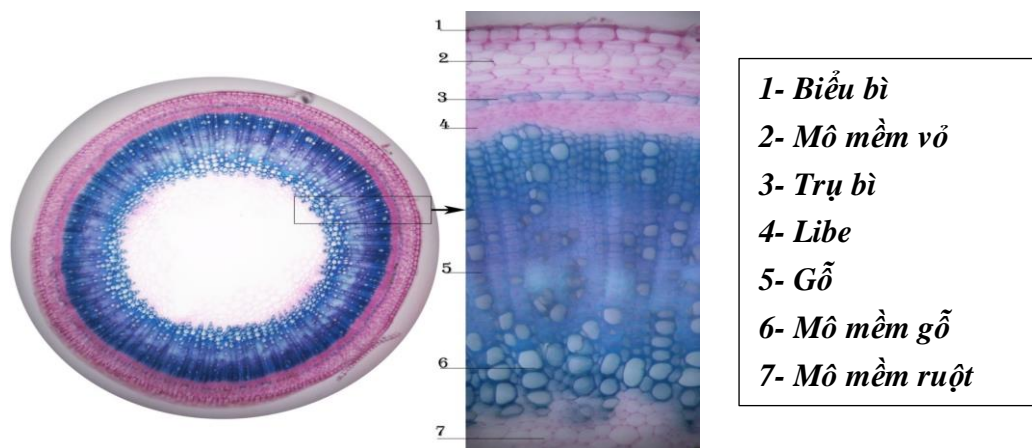
Gân lá: Mặt cắt ngang gân lá có mặt trên lõm, mặt dưới lồi, ngoài cùng là lớp biểu bì hình chữ nhật xếp đều đặn thành dày đã hóa cutin một phần. Mô mềm là những tế bào hình đa giác hoặc hình tròn, kích thước to nhỏ khác nhau và sắp xếp khít nhau. Bó libe - gỗ xếp theo kiểu vòng cung với gỗ hướng vào tâm. Libe - gỗ tập trung thành một bó chủ yếu ở chính giữa gân lá, đôi khi xếp thành các bó

rời nhau. Ở hai bên của gân chính rải rác có những bó libe - gỗ phụ.

Phiến lá: Biểu bì là một lớp tế bào xếp liên tục, đều đặn. Biểu bì dưới gồm các tế bào có kích thước nhỏ hơn biểu bì trên và mang lỗ khí. Mô giậu là một hàng tế bào hình chữ nhật xếp sát nhau, vuông góc với biểu bì trên. Mô khuyết gồm những tế bào có kích thước khác nhau sắp xếp lộn xộn, rải rác có bó libe - gỗ nhỏ.

3.1.3.2. Thân

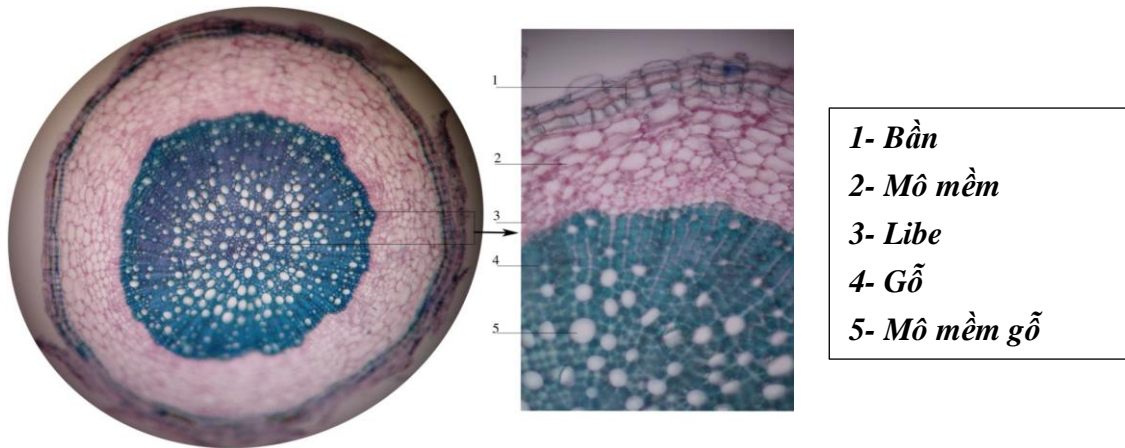
Thiết diện cắt ngang thân cây ban lá dính hình tròn hay gần tròn. Quan sát từ ngoài vào trong, biểu bì là một lớp tế bào hình chữ nhật sắp xếp liên tục, đều đặn. Mô mềm vỏ là những tế bào hình chữ nhật, sắp xếp khít nhau nằm sát lớp biểu bì. Hàng tế bào trụ bì gồm các tế bào hình chữ nhật dài, xếp thành một lớp sát libe. Bó libe - gỗ xếp theo vòng tròn, libe ở bên ngoài thường bị ép bẹp. Mô mềm ruột gồm những tế bào hình đa giác, có kích thước lớn xếp sát nhau.



Hình 3.5. Vi phẫu thân cây ban lá dính

3.1.3.3. Rễ

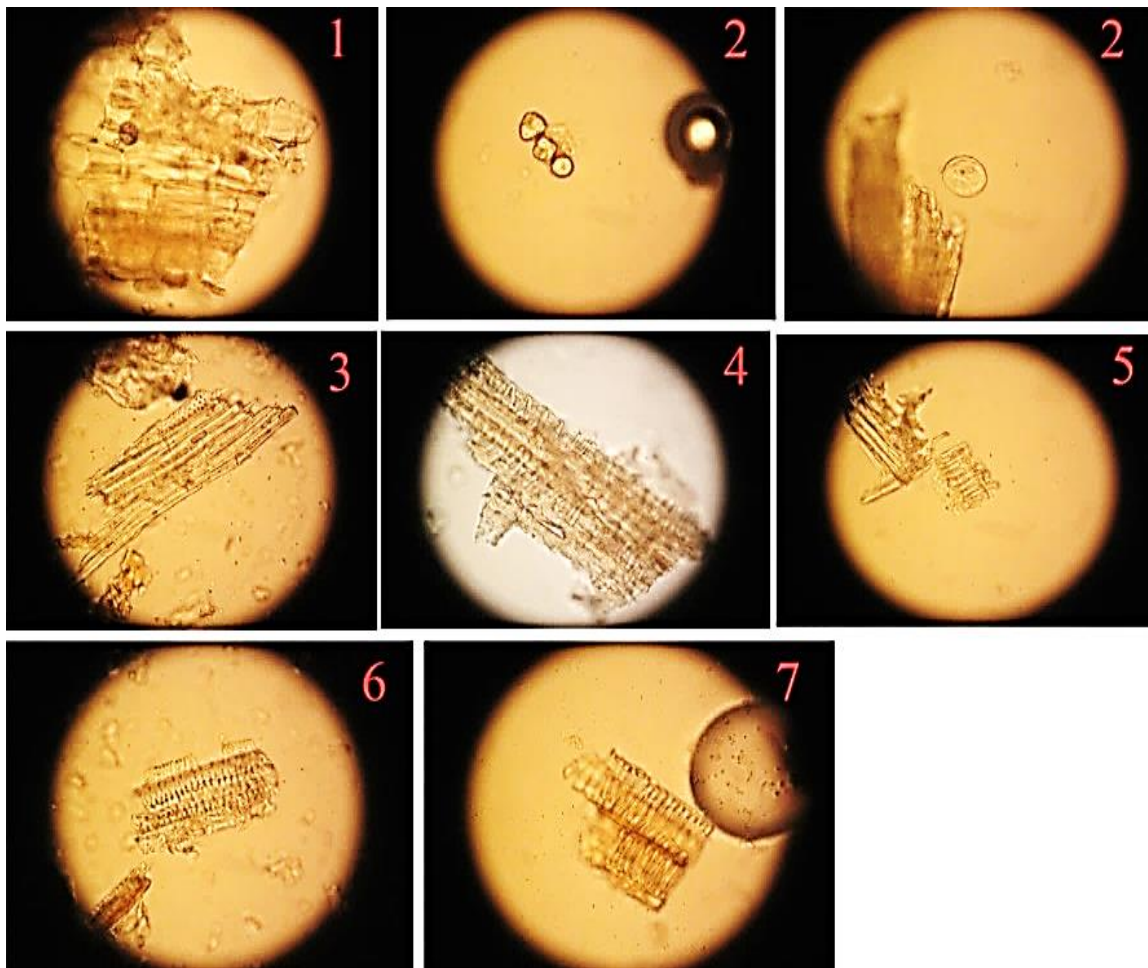
Mặt cắt ngang rễ cây ban lá dính tròn hoặc gần tròn. Quan sát từ ngoài vào trong thấy: Bần gồm từ 3 - 5 lớp tế bào hình chữ nhật xếp liên tục, đều đặn thành vòng tròn đồng tâm. Mô mềm là những tế bào hình tròn, bầu dục, kích thước to nhỏ khác nhau, sắp xếp sát nhau. Libe - gỗ nằm ở phần trung tâm của rễ, gỗ chiếm phần lớn thiết diện nằm ở trong, libe gồm 5 - 7 lớp tế bào nhỏ, thành mỏng thường bị ép bẹp.



Hình 3.6. Vi phẫu rễ cây ban lá dứa

3.1.3.4. Đặc điểm bột thân, lá

a) Bột thân



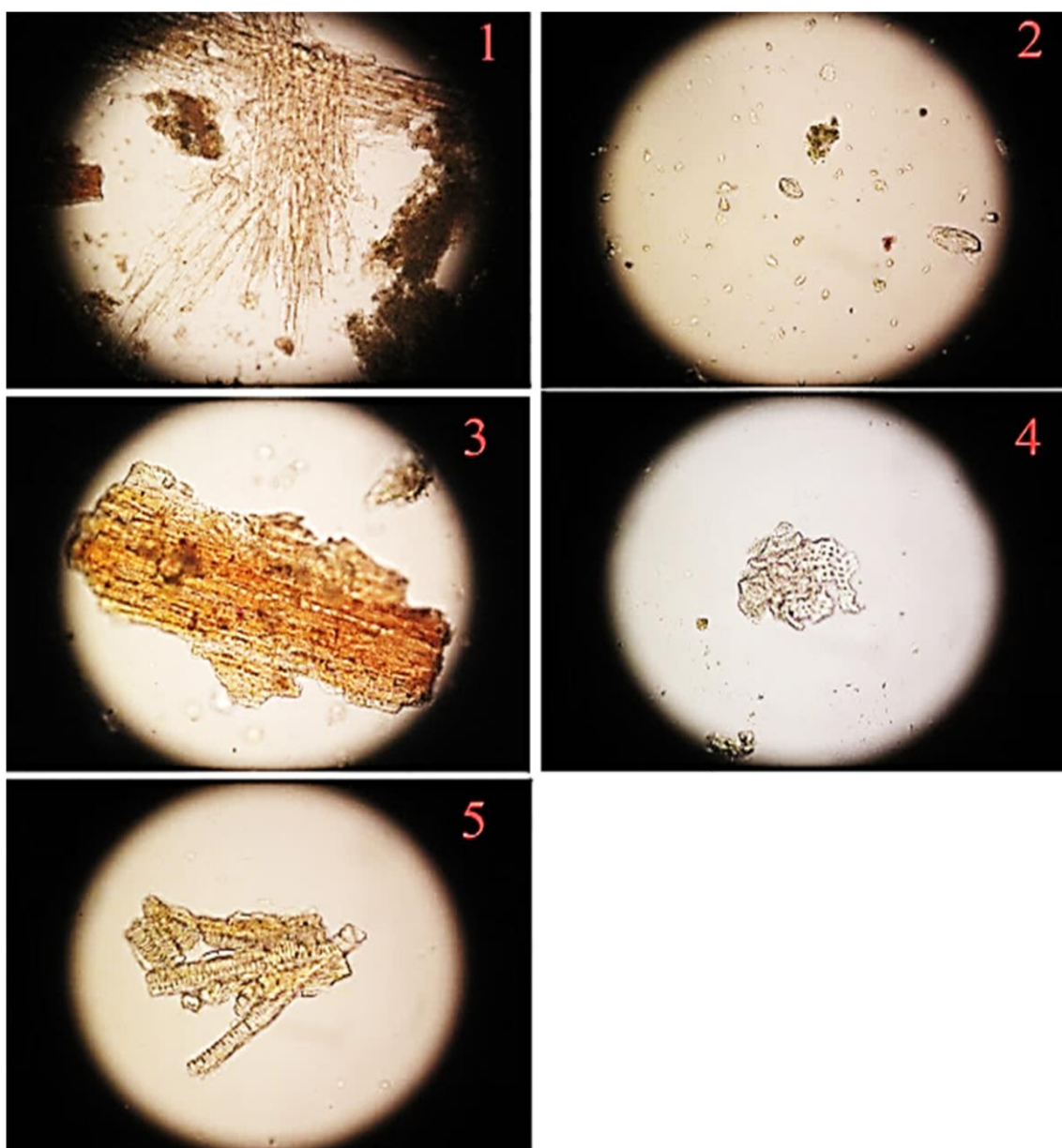
Hình 3.7. Đặc điểm bột thân cây ban lá dứa

Ghi chú: 1- Mảnh bần; 2- Hạt tinh bột; 3- Bó sợi; 4- Mảnh mạch xoắn; 5,7- Mảnh mạch vòng; 6- Mảnh mạch điểm

Bột có màu nâu nhạt, không mùi, không vị. Quan sát dưới kính hiển vi thấy có mảnh bần, hạt tinh bột hình cầu có rốn dạng chấm hoặc chia vạch, bó sợi, mảnh mạch xoắn, mảnh mạch vòng, mảnh mạch điểm, mảnh mạch vạch.

b) Bột lá

Bột màu xanh nhạt, mùi thơm nhẹ. Quan sát dưới kính hiển vi thấy có mảnh mô mềm, lỗ khí, mảnh biểu bì phiến lá, mảnh mạch điểm và mảnh mạch xoắn.



Hình 3.8. Đặc điểm bột lá cây ban lá dĩnh

Ghi chú: 1- Mô mềm; 2- Lỗ khí; 3- Mảnh biểu bì phiến lá; 4- Mảnh mạch điểm;

5- Mảnh mạch xoắn

3.2. Kết quả nghiên cứu thành phần hóa học phần trên mặt đất cây ban lá dính

3.2.1. Định tính các nhóm chất hữu cơ

Kết quả định tính các nhóm chất chính trong phần trên mặt đất cây ban lá dính bằng phản ứng hóa học được trình bày ở bảng 3.1.

Bảng 3.1: Kết quả định tính các nhóm chất chính trong phần trên mặt đất cây ban lá dính

TT	Nhóm chất	Phản ứng định tính	Kết quả	Kết luận
1	Chất béo	Dấu hiệu vết mờ trên giấy lọc	+	Có
	Carotenoid	H ₂ SO ₄ đậm đặc	-	Không
	Sterol	Liebermann-Burchardt	-	Không
2	Flavonoid	Cyanidin	++	Có
		NaOH hoặc NH ₄ OH đặc	++	
		FeCl ₃ 5%	++	
		Diazo hóa	++	
3	Coumarin	Mở, đóng vòng lacton	-	Không
		Diazo hóa	-	
		Phát huỳnh quang (chuyển dạng đồng phân cis-trans)	-	
4	Tanin	FeCl ₃ 5%	+	Có
		Gelatin	+	
		Chì acetat	+	
5	Acid hữu cơ	Với Na ₂ CO ₃	-	Không
6	Glycosid tim	Liebermann- Burchardt	-	Không
		Keller-Kiliani	-	
		Baljet	-	
		Legal	-	
7	Anthranoid	Borntraeger	-	Không
		Vi thăng hoa	-	
8	Saponin	Tạo bọt	+	Có
		Phân biệt saponin	+	
		Salkowski	+	
9	Đường tự do	TT Fehling	+	Có
10	Acid amin	TT Ninhydrin	-	Không
11	Polysaccarid	TT Lugol	+	Có
12	Alcaloid	TT Mayer	-	Không
		TT Dragendoff	-	
		TT Bouchardat	-	

Ghi chú : (-): Phản ứng âm tính; (+): Phản ứng dương tính; (++) : Phản ứng dương tính rõ.

Kết quả cho thấy trong phần trên mặt đất cây ban lá dính có flavonoid,

saponin, đường khử, tanin, polysaccharid, chất béo.

3.2.2. Xác định cấu trúc các hợp chất phân lập từ phần trên mặt đất cây ban lá dính

Phần trên mặt đất cây ban lá dính được phơi khô rồi nghiền thành 4,5 kg bột, sau đó ngâm chiết trong methanol ở nhiệt độ 40°C (3 lần x 10 lít, mỗi lần 3 ngày). Các dịch chiết được lọc, gộp lại và cất loại dung môi dưới áp suất giảm thu được 214 g cặn chiết methanol. Cặn chiết này được phân bố đều trong 1,5 lít nước cất và chiết phân bố lần lượt với các dung môi có độ phân cực tăng dần gồm *n*-hexan, dichloromethan, ethyl acetat. Cất loại dung môi hữu cơ thu được các cặn chiết tương ứng *n*-hexan (HS1, 60 g), dichloromethan (HS2, 78 g), ethyl acetat (HS3, 11 g) và lớp nước (HS4, 65 g).

Phần cặn HS2 (78 g) được phân tách trên cột sắc ký silica gel với hệ dung môi rửa giải *n*-hexan/acetone (20/1, 10/1, 5/1, 3/1, 0/1, v/v) thu được 5 phân đoạn (ký hiệu HS2A đến HS2E).

- Phân đoạn HS2B được phân tách trên cột sắc ký silica gel, rửa giải với hệ dung môi dichloromethan/ethyl acetat (30/1, v/v) thu được 5 phân đoạn (ký hiệu HS2B1 đến HS2B5).

+ Phân đoạn HS2B2 được phân lập bằng sắc ký cột pha đảo RP-18, rửa giải bằng hệ dung môi acetone/nước (2/1, v/v) thu được hợp chất **HSA16** (10 mg).

+ Phân đoạn HS2B3 được phân lập bằng sắc ký cột pha đảo RP-18, rửa giải bằng hệ dung môi acetone/nước (2/1, v/v) thu được hợp chất **HSA15** (5 mg).

+ Phân đoạn HS2B5 được phân lập bằng sắc ký cột pha đảo RP-18, rửa giải bằng hệ dung môi methanol/nước (4/1, v/v) thu được 2 phân đoạn HS2B5A và HS2B5B. Phân đoạn HS2B5A được phân lập trên cột sắc ký silica gel với hệ dung môi rửa giải *n*-hexan/dichloromethan/methanol (1/3/0.1, v/v/v) thu được hợp chất **HSA18** (5 mg). Phân đoạn HS25B phân lập trên cột sắc ký silica gel với hệ dung môi rửa giải *n*-hexan/ethyl acetate (5/1, v/v) thu được hợp chất **HSA17** (5 mg).

- Phân đoạn HS2E được phân tách trên cột sắc ký silica gel, rửa giải với hệ dung

môi dichloromethan/ethyl acetat (5/1, v/v) thu được 3 phân đoạn HS2E1 đến HS2E3.

+ Phân đoạn HS2E2 được phân lập bằng sắc ký cột pha đảo RP-18, rửa giải bằng hệ dung môi methanol/nước (1/1, v/v) thu được hợp chất **HSA20** (20 mg).

+ Phân đoạn HS2E3 được phân lập trên cột sắc ký silica gel với hệ dung môi rửa giải dichloromethan/acetone (2/1, v/v) thu được hợp chất **HSA21** (9 mg) và phân đoạn HS2E3B. Phân đoạn HS2E3B phân lập trên cột sắc ký silica gel với hệ dung môi rửa giải dichloromethan/methanol (10/1, v/v) thu được hợp chất **HSA22** (6 mg).

Phần cặn HS3 (11 g) được phân tách trên cột sắc ký silica gel với hệ dung môi rửa giải dichloromethan/methanol (20/1, 10/1, 5/1, 3/1, 0/1, v/v) thu được 5 phân đoạn (ký hiệu HS3A đến HS3E).

- Phân đoạn HS3B được phân tách trên cột sắc ký pha đảo RP-18, rửa giải với hệ dung môi methanol/nước (1/1, v/v) thu được 2 phân đoạn (ký hiệu HS3B1, HS3B2).

+ Phân đoạn HS3B1 được phân lập bằng sắc ký cột silica gel, rửa giải bằng hệ dung môi dichloromethan/methanol/nước (8/1/0,05, v/v/v) thu được hợp chất **HSA4** (15 mg).

+ Phân đoạn HS3B2 được phân lập trên cột sephadex LH-20, rửa giải bằng hệ dung môi methanol/nước (1/2, v/v) thu được hợp chất **HSA2** (40 mg).

- Phân đoạn HS3C được phân tách trên cột sắc ký pha đảo RP-18, rửa giải với hệ dung môi methanol/nước (1/1,5, v/v) thu được 2 phân đoạn (ký hiệu HS3C1, HS3C2).

+ Phân đoạn HS3C1 được phân lập bằng sắc ký cột silica gel, rửa giải bằng hệ dung môi dichloromethan/methanol/nước (15/1, v/v) thu được hợp chất **HSA9** (5 mg).

+ Phân đoạn HS3C2 được phân lập trên cột sephadex LH-20, rửa giải bằng hệ dung môi methanol/nước (1/1, v/v) thu được hợp chất **HSA6** (15 mg).

- Phân đoạn HS3D được phân tách trên cột sắc ký silica gel, rửa giải với hệ dung môi ethyl acetat/methanol/nước (30/1/0,1, v/v/v) thu được 2 phân đoạn (ký

hiệu HS3D1, HS3D2).

+ Phân đoạn HS3D1 được phân lập bằng sắc ký cột pha đảo RP-18, rửa giải bằng hệ dung môi methanol/nước (1/1, v/v) thu được hợp chất **HSA13** (5 mg).

+ Phân đoạn HS3D2 được phân lập bằng sắc ký cột pha đảo RP-18, rửa giải bằng hệ dung môi methanol/nước (1/1, v/v) thu được 2 hợp chất **HSA12** (7 mg) và **HSA11** (5 mg).

- Phân đoạn HS3E được phân tách trên cột sắc ký pha đảo RP-18, rửa giải với hệ dung môi methanol/nước (1/1,5, v/v) thu được phân đoạn ký hiệu HS3E1. Phân đoạn HS3E1 được phân lập trên cột sephadex LH-20, rửa giải bằng hệ dung môi methanol/nước (2/1, v/v) thu được hợp chất **HSA1** (50 mg).

3.2.2.1. Hợp chất HSA1

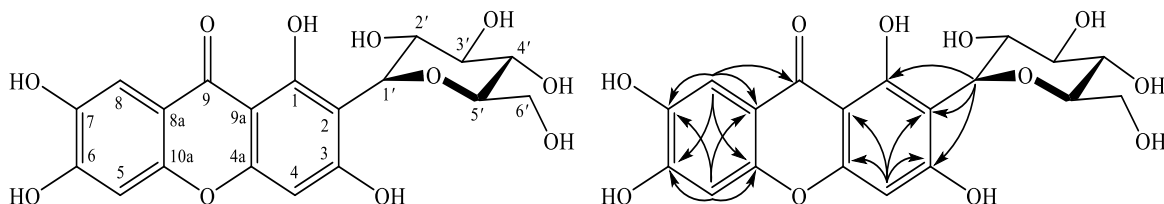
Hợp chất **HSA1** thu được dưới dạng bột màu vàng.

Công thức phân tử được xác định là $C_{19}H_{18}O_{11}$ bởi sự xuất hiện của píc ion giả phân tử $[M+H]^+$ tại m/z 423,0922 trên phổ khối lượng phân giải cao HR-ESI-MR (tính toán lý thuyết cho công thức $[C_{19}H_{19}O_{11}]^+$: 423,0927).

Phổ 1H -NMR của hợp chất **HSA1** xuất hiện tín hiệu đặc trưng bao gồm tín hiệu của 3 proton thơm dạng đơn được quan sát thấy tại δ_H 6,36 (1H, s), 6,85 (1H, s), 7,37 (1H, s) và tín hiệu của proton tại δ_H 4,59 (1H, d, $J = 10,0$ Hz) gợi ý cấu trúc của hợp chất **HSA1** có mặt hai vòng thơm và một phân tử. Trên phổ ^{13}C -NMR quan sát thấy xuất hiện 19 tín hiệu carbon bao gồm 12 tín hiệu carbon thơm tại δ_C 93,3, 102,6, 101,3, 107,6, 108,0, 111,7, 143,7, 150,8, 154,1, 156,2, 161,8, 163,8, một tín hiệu carbon carbonyl tại δ_C 179,1 và 6 carbon thuộc phân tử đường tại δ_C 61,5, 70,2, 70,6, 73,1, 78,9, 81,5.

Các tín hiệu trên phổ 1H -NMR và ^{13}C -NMR gợi ý cấu trúc của hợp chất **HSA1** có dạng xanthon glycosid. Các tín hiệu proton được gán với các tín hiệu carbon tương ứng được xác định dựa vào tương tác trực tiếp từ H đến C trên phổ HSQC. Vị trí của các nhóm hydroxy tại C-1, C-3 và phân đường tại C-2 được xác định dựa vào tương tác HMBC giữa H-4 (δ_H 6,36) với C-2 (δ_C 107,6)/ C-3 (δ_C

163,8) và tương tác giữa proton H-1' (δ_H 4,59) với C-2 (δ_C 107,6)/ C-3 (δ_C 163,8)/ C-4 (δ_C 93,3). Các tương tác giữa H-5 (δ_H 6,85) với C-6 (δ_C 154,1)/ C-7 (δ_C 143,7) và H-8 (δ_H 7,37) với C-6 (δ_C 154,1)/ C-7 (δ_C 143,7)/ C-9 (δ_C 179,1) cho phép xác định vị trí của hai nhóm hydroxy tại C-6, C-7. Từ các phân tích phổ trên kết hợp so sánh với tài liệu tham khảo, hợp chất **HSA1** được xác định là mangiferin (hình 3.9) [96].



Hình 3.9. Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC chính của hợp chất HSA1

Bảng 3.2. Số liệu phổ NMR của hợp chất HSA1

Vị trí C	$\delta_C^{\#}$	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ mult.; J (Hz)	HMBC (H→C)
1	161,9	161,8	-	-
2	107,7	107,6	-	-
3	163,9	163,8	-	-
4	93,4	93,3	6,36 (s)	2, 3, 4a, 9a
4a	156,3	156,2	-	-
5	102,7	102,6	6,85 (s)	6, 7, 8a, 9, 10a
6	154,1	154,1	-	-
7	143,8	143,7	-	-
8	108,1	108,0	7,37 (s)	6, 7, 8a, 10a
8a	111,8	111,7	-	-
9	179,2	179,1	-	-
9a	101,4	101,3	-	-
10a	150,9	150,8	-	-
1'	73,2	73,1	4,59 (d, 10,0)	1, 2, 3
2'	70,4	70,2	4,04 (m)	
3'	79,1	78,9	3,18 (m)	
4'	70,7	70,6	3,12 (m)	
5'	81,7	81,5	3,15 (m)	
6'	61,6	61,5	3,40 (dd, 6,0, 12,0); 3,68 (brd, 12,0)	

^a Đo trong DMSO-d₆, ^b 125 MHz, ^c 500 MHz. [#] δ_C của hợp chất mangiferin [96]

3.2.2.2. Hợp chất HSA2

Hợp chất **HSA2** thu được dưới dạng bột màu vàng.

Công thức phân tử của **HSA2** được xác định là $C_{14}H_{10}O_6$ bởi sự xuất hiện pic ion giả phân tử $[M+H]^+$ tại m/z 275,0549 trên phổ khối lượng phân giải cao HR-ESI-MS (tính toán lý thuyết cho công thức $[C_{14}H_{11}O_6]^+$: 275,0556).

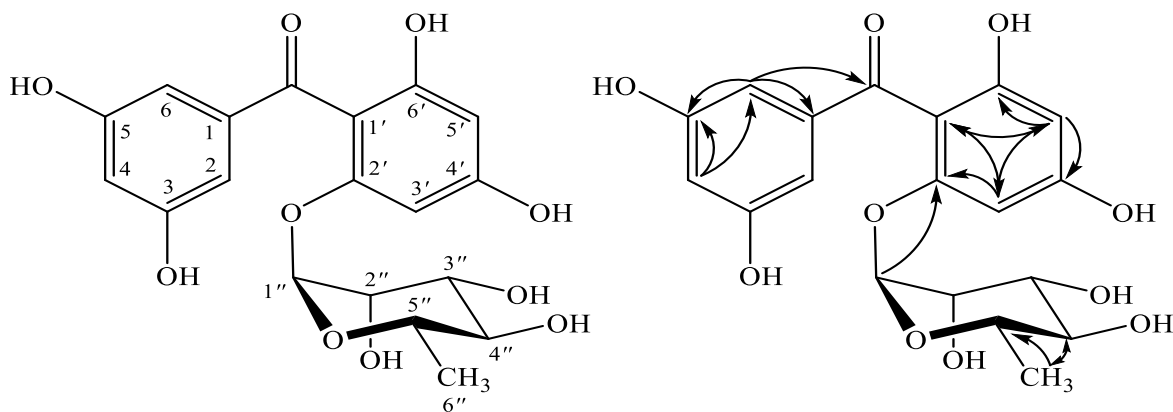
Phổ 1H -NMR của hợp chất **HSA2** xuất hiện 4 tín hiệu proton thơm tại δ_H 6,33 (1H, s), 6,45 (1H, s), 6,81 (1H, d, $J = 8,5$ Hz), 7,38 (1H, d, $J = 8,5$ Hz) và một nhóm methoxy tại δ_H 3,81 (s). Trên phổ ^{13}C -NMR của hợp chất **HSA2** xuất hiện 14 tín hiệu carbon bao gồm 12 carbon thơm tại δ_C 95,1, 95,5, 104,8, 112,4, 115,9, 116,1, 132,0, 145,0, 150,2, 159,0, 161,8, 163,2, một carbon carbonyl tại δ_C 173,3 và một carbon methoxy tại δ_C 55,9.

Các tín hiệu trên phổ 1H -NMR và ^{13}C -NMR gợi ý cấu trúc của hợp chất **HSA2** có dạng xanthon. Vị trí của các nhóm methoxy tại C-1 và hydroxy tại C-3 được xác định dựa vào tín hiệu tương tác trên phổ HMBC giữa H-2 (δ_H 6,33) với C-1 (δ_C 161,8)/ C-3 (δ_C 163,2)/ C-4 (δ_C 95,1); H-4 (δ_H 6,45) với C-2 (δ_C 95,5)/ C-3 (δ_C 163,2)/ C-4a (δ_C 159,0)/ C-9a (δ_C 104,8) và giữa các proton methoxy (δ_H 3,81) với C-1 (δ_C 161,8). Các tương tác HMBC giữa H-7 (δ_H 6,81) với C-5 (δ_C 132,0)/ C-6 (δ_C 150,2)/ C-8a (δ_C 116,1) và H-8 (δ_H 7,38) với C-6 (δ_C 150,2)/ C-9 (δ_C 173,3)/ C-10a (δ_C 145,0) cho phép xác định vị trí của các nhóm methoxy tại C-5 và C-6. Từ những phân tích trên kết hợp so sánh số liệu phổ NMR với hợp chất 3,6-dihydroxy-1,5-dimethoxyxanthon, hợp chất **HSA2** được xác định là 3,5,6-trihydroxy-1-methoxyxanthon [97]. Hợp chất này được phân lập lần đầu tiên từ loài *Cudrania fruticosa* Wight. [98]. Tuy nhiên, đây là lần đầu tiên hợp chất này được phân lập từ cây ban lá dính (hình 3.10).

Công thức phân tử của **HSA4** được xác định là $C_{19}H_{20}O_{10}$ bởi sự xuất hiện của pic ion phân tử $[M+H]^+$ tại m/z 407,1016 trên phổ khối lượng phân giải cao HR-ESI-MS (tính toán lý thuyết cho công thức $[C_{19}H_{21}O_{10}]^+$: 407,0978).

Phổ 1H -NMR của hợp chất **HSA4** quan sát thấy 3 tín hiệu proton thuộc vòng thơm đối xứng thể 1,3,5 tại δ_H 6,47 (1H, t, $J = 2,0$ Hz), 6,59 (2H, d, $J = 2,0$ Hz), hai proton thuộc vòng thơm thể 3,5,4',6' tại δ_H 6,07 (1H, d, $J = 1,5$ Hz), 6,31 (1H, d, $J = 1,5$ Hz), một proton anome tại δ_H 5,24 (1H, d, $J = 1,0$ Hz) và một nhóm methyl bậc 2 tại δ_H 1,22 (3H, d, $J = 6,0$ Hz). Trên phổ ^{13}C -NMR của hợp chất **HSA4** xuất hiện 19 tín hiệu carbon bao gồm một nhóm carbon carbonyl (δ_C 199,3), 12 carbon thơm và 6 carbon đặc trưng của phân đường rhamnopyranose. Giá trị độ dịch chuyển hóa học của phân đường cùng với hằng số tương tác của proton anome ($J_{H-1''/H-2''} = 1,0$ Hz) cho phép dự đoán phân đường của hợp chất **HSA4** là *O*- α -L-rhamnopyranose.

Dữ liệu phổ gợi ý hợp chất **HSA4** là một benzophenol glycosid. Các tín hiệu tương tác trên phổ HMBC cho phép xác định phần khung của hợp chất **HSA4** là 3,5,2',4',6'-pentahydroxybenzophenon-2'-*O*- α -L-rhamnopyranosid. Vị trí của phân đường liên kết với khung chất tại C-2' bằng liên kết glycosid được xác định dựa vào tín hiệu tương tác giữa proton anome (δ_H 5,24) với C-2' (δ_C 159,4) trên phổ HMBC. Từ những phân tích trên kết hợp so sánh số liệu phổ NMR với hợp chất petiolin F, hợp chất **HSA4** được xác định là petiolin F (hình 3.11) [99].



Hình 3.11. Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC chính của hợp chất HSA4

Bảng 3.4. Số liệu phổ NMR của hợp chất HSA4 và hợp chất tham khảo

Vị trí C	$\delta_C^{\#}$	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ mult.; J (Hz)	HMBC (H \rightarrow C)
1	143,9	144,1	-	-
2	106,7	107,9	6,59 (d, 2,0)	1, 3, C=O
3	158,5	159,5	-	-
4	106,1	107,5	6,47 (t, 2,0)	2/6, 3/5
5	158,5	159,5	-	-
6	106,7	107,9	6,59 (d, 2,0)	1, 5, C=O
1'	106,8	108,6	-	-
2'	159,3	159,4	-	-
3'	94,8	95,5	6,31 (d, 1,5)	1', 2', 4', 5'
4'	163,9	164,6	-	-
5'	97,0	97,7	6,07 (d, 1,5)	1', 3', 4', 6'
6'	163,1	162,4	-	-
C=O	198,2	199,3	-	-
1''	99,5	100,4	5,24 (d, 1,0)	2'
2''	70,4	71,5	3,40 (dd, 1,0, 3,5)	
3''	71,2	72,0	3,11 (dd, 9,5, 3,5)	
4''	72,8	73,7	3,33 (m)	
5''	69,9	70,9	3,45 (m)	5'', 6''
6''	17,6	18,0	1,22 (d, 6,0)	4'', 5''

^a Đo trong CD₃OD, ^b125 MHz, ^c500 MHz. [#] δ_C của hợp chất petiolin F đo trong Acetone-d₆ [99].

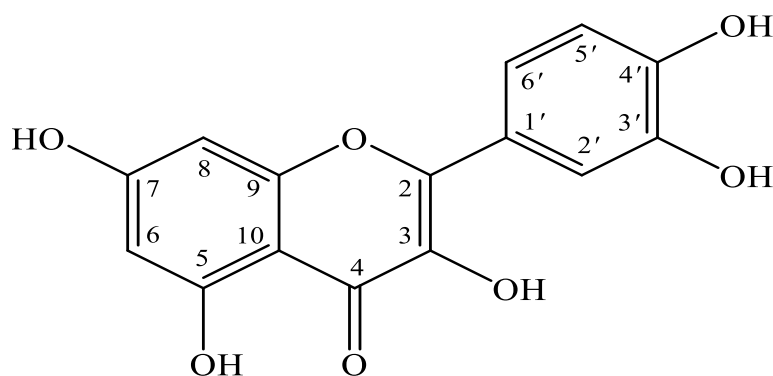
3.2.2.4. Hợp chất HSA6

Hợp chất **HSA6** thu được dưới dạng bột màu vàng.

Phổ ¹H-NMR của hợp chất **HSA6** xuất hiện tín hiệu của ba proton thơm thuộc hệ tương tác spin-spin ABX tại δ_H 6,89 (1H, d, $J = 8,5$ Hz), 7,68 (1H, d, $J = 2,0$ Hz), 7,54 (1H, dd, $J = 2,0, 8,5$ Hz) và hai proton thơm thuộc hệ tương tác spin-spin AX tại δ_H 6,14 (1H, d, $J = 2,0$ Hz), 6,18 (1H, d, $J = 2,0$ Hz). Trên phổ ¹³C-NMR và DEPT của hợp chất **HSA6** quan sát thấy xuất hiện 15 tín hiệu của carbon đặc trưng cho dạng hợp chất flavonoid khung quercetin bao gồm một tín

hiệu carbon carbonyl tại δ_C 175,9, năm tín hiệu carbon methin tại δ_C 93,5, 98,3, 115,2, 115,7, 120,1 và 9 tín hiệu carbon không liên kết trực tiếp với hydro tại δ_C 103,1, 122,1, 135,8, 145,2, 146,9, 147,8, 156,3, 160,8 và 164,0.

Từ những phân tích và số liệu thu được ở trên, kết hợp so sánh với số liệu phổ NMR hợp chất **HSA6** và hợp chất quercetin ở tài liệu công bố trước đây, giá trị phổ ở các vị trí hoàn toàn tương ứng [100]. Hợp chất **HSA6** được xác định là quercetin (hình 3.12).



Hình 3.12. Cấu trúc hóa học của hợp chất HSA6
Bảng 3.5. Số liệu phổ NMR của hợp chất HSA6

Vị trí C	$\delta_C^{\#}$	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ mult.; J (Hz)
2	146,8	146,9	-
3	135,6	135,8	-
4	175,7	175,9	-
5	160,6	160,8	-
6	98,1	98,3	6,18 (d, 2,0)
7	163,8	164,0	-
8	93,3	93,5	6,14 (d, 2,0)
9	156,1	156,3	-
10	103,0	103,1	-
1'	121,9	122,1	-
2'	115,1	115,2	7,68 (d, 2,0)
3'	145,0	145,2	-
4'	147,6	147,8	-
5'	115,5	115,7	6,89 (d, 8,5)
6'	119,9	120,1	7,54 (dd, 2,0, 8,5)

^a Đo trong DMSO-*d*₆, ^b125 MHz, ^c500 MHz. [#] δ_C của hợp chất quercetin [100]

3.2.2.5. Hợp chất HSA9

Hợp chất **HSA9** thu được dưới dạng bột màu vàng.

Công thức phân tử của hợp chất **HSA9** được xác định là $C_{22}H_{26}O_{10}$ bởi sự xuất hiện của pic ion giả phân tử $[M+H]^+$ tại m/z 451,1598 trên phổ khối lượng phân giải cao HR-ESI-MS (tính toán lý thuyết cho công thức $[C_{22}H_{27}O_{10}]^+$: 451,1604).

Phổ 1H -NMR của hợp chất **HSA9** xuất hiện 5 tín hiệu proton thơm bao gồm 3 proton thuộc vòng thơm thế 1,3,5 tại δ_H 6,75 (1H, t, $J = 2,0$ Hz), 6,89 (1H, dd, $J = 1,5, 2,0$ Hz), 6,95 (1H, dd, $J = 1,5, 2,0$ Hz) và 2 proton thơm tại δ_H 6,31 (2H, s). Bên cạnh đó còn quan sát thấy tín hiệu của 3 nhóm methoxy tại δ_H 3,72 (6H, s), 3,88 (3H, s) và các tín hiệu đặc trưng của một đơn vị đường gồm một proton anome tại δ_H 5,35 (1H, d, $J = 1,5$ Hz), một nhóm methyl tại δ_H 1,23 (3H, d, $J = 6,0$ Hz) và 4 proton ở vùng có độ dịch chuyển hóa học từ 3,46 đến 3,98. Trên phổ ^{13}C -NMR và HSQC của hợp chất **HSA9** xuất hiện tín hiệu của 4 nhóm methyl tại δ_C 18,0, 56,0 (4'-OCH₃), 56,3 (2'-OCH₃, 6'-OCH₃), 10 nhóm methine tại δ_C 70,7, 72,0, 72,2, 73,8, 91,9 (C-3', C-5'), 100,1, 109,7, 110,0, 111,3 và 6 tín hiệu carbon không liên kết với hydro tại δ_C 111,8, 141,8, 159,0, 160,1 (C-5, C-2', C-6'), 164,4, 197,2.

Phân tích số liệu phổ 1H -NMR, ^{13}C -NMR và HSQC cho phép xác định cấu trúc của **HSA9** có mặt hai vòng thơm, một nhóm keton, ba nhóm methoxy và một đơn vị đường. Giá trị độ dịch chuyển hóa học của các carbon thuộc phần đường (δ_C 100,1, 72,2, 72,0, 73,8, 70,7, 18,0) và hằng số tương tác nhỏ giữa H-1'' và H-2'' của proton anome ($J_{H-1''/H-2''} = 1,5$ Hz) gợi ý phần đường của hợp chất **HSA9** là α -L-rhamnopyranosid.

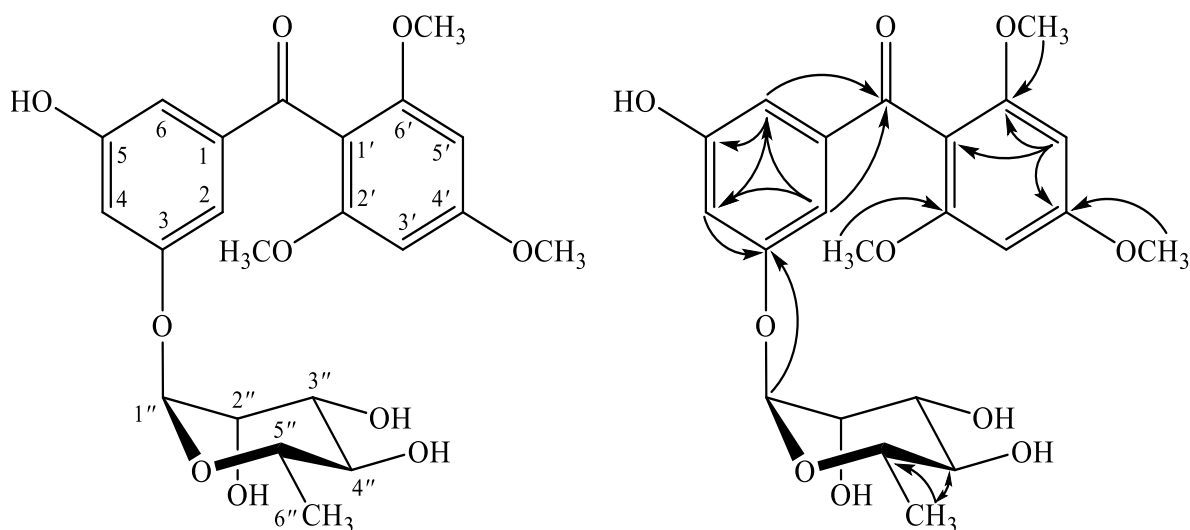
Các tín hiệu tương tác trên phổ HMBC giữa H-2 (δ_H 6,95) với C-4 (δ_C 110,0)/C-6 (δ_C 111,3)/C=O (δ_C 197,2), giữa H-4 (δ_H 6,75) với C-3 (δ_C 159,0), giữa H-6 (δ_H 6,89) với C-4 (δ_C 110,0)/C-5 (δ_C 160,1)/C=O (δ_C 197,2) và proton anome (δ_H 5,35) với C-3 (δ_C 159,0) cho phép xác định vị trí của nhóm keton, phần đường và hydroxy

lần lượt tại C-1, C-3 và C-5. Tương tự, vị trí của các nhóm methoxy tại C-2', C-4', C-6' ở vòng thơm đối xứng còn lại được xác định dựa vào phổ HMBC quan sát thấy có các tương tác giữa proton H-3', H-5' ($\delta_{\text{H}} 6,31$) với C-1' ($\delta_{\text{C}} 111,8$)/ C-2', C-6' ($\delta_{\text{C}} 160,1$)/ C-4' ($\delta_{\text{C}} 164,4$) và các proton của nhóm methoxy ($\delta_{\text{H}} 3,72$) với C-2', C-6' ($\delta_{\text{C}} 160,1$) và nhóm methoxy ($\delta_{\text{H}} 3,88$) với C-4' ($\delta_{\text{C}} 164,4$). Từ những phân tích trên, hợp chất **HSA9** được xác định là 3,5-dihydroxy-2',4',6'-trimethoxybenzophenon-3-O- α -L-rhamnopyranosid (hình 3.13).

Bảng 3.6. Số liệu phổ NMR của hợp chất HSA9

Vị trí C	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,c}}$ mult.; J (Hz)	HMBC (H \rightarrow C)
1	141,8	-	-
2	109,7	6,95 (dd, 1,5, 2,0)	3,4,6, C=O
3	159,0	-	-
4	110,0	6,75 (t, 2,0)	3
5	160,1	-	-
6	111,3	6,89 (dd, 1,5, 2,0)	4, 5, C=O
1'	111,8	-	-
2'	160,1	-	-
3'	91,9	6,31 (s)	1', 2', 4'
4'	164,4	-	-
5'	91,9	6,31 (s)	1', 4', 6'
6'	160,1	-	-
C=O	197,2	-	-
1''	100,1	5,35 (d, 1,5)	3, 2'', 3'', 5''
2''	72,0	3,98 (dd, 1,5, 3,5)	4''
3''	72,2	3,81 (dd, 3,5, 9,5)	-
4''	73,8	3,46 (t, 9,5)	2'', 3'', 6''
5''	70,7	3,63 (dd, 6,0, 9,5)	-
6''	18,0	1,23 (d, 6,0)	4'', 5''
2'-OCH ₃	56,3	3,72 (s)	2'
4'-OCH ₃	56,0	3,88 (s)	4'
6'-OCH ₃	56,3	3,72 (s)	6'

^a Đo trong CD₃OD, ^b 125 MHz, ^c 500 MHz

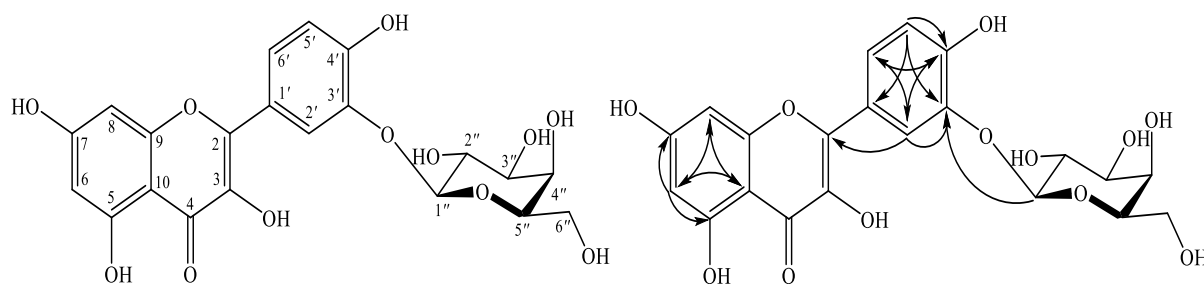


Hình 3.13. Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC chính của hợp chất HSA9
 3.2.2.6. Hợp chất HSA11

Hợp chất HSA11 thu được dạng bột vô định hình, màu vàng.

Phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất **HSA11** quan sát thấy tín hiệu của 2 proton thơm thể meta tại δ_{H} 6,20 (1H, d, $J = 1,5$ Hz, H-6), 6,46 (1H, brs, H-8), 3 proton thơm hệ ABX ở vòng B tại δ_{H} 8,19 (1H, s, H-2'), 6,99 (1H, d, $J = 8,5$ Hz, H-5'), 7,90 (1H, d, $J = 8,5$ Hz, H-6') và một proton anome tại δ_{H} 4,82 (1H, d, $J = 8,0$ Hz, H-1'') gợi ý sự có mặt của 1 đơn vị đường. Trên phổ $^{13}\text{C-NMR}$ và HSQC của hợp chất **HSA11** xuất hiện 21 tín hiệu carbon bao gồm 15 carbon đặc trưng của phần khung flavon và 6 carbon của một đơn vị đường. Số liệu độ dịch chuyển hóa học của các carbon thuộc phần đường (δ_{C} 105,2, 72,4, 74,6, 70,1, 77,2, 62,3) và hằng số tương tác của proton anome ($J_{\text{H-1''/H-2''}} = 8,0$ Hz) cho phép xác định phần đường của hợp chất **HSA11** là *O*- β -galactopyranosyl [101].

Vị trí phần đường của hợp chất **HSA11** tại C-3'' được xác định dựa vào tương tác HMBC giữa H-1'' (δ_{H} 4,82) với C-3' (δ_{C} 146,7). Vị trí của các nhóm thế còn lại được xác định dựa vào các tương tác trên phổ HSQC và HMBC. Từ các phân tích trên kết hợp so sánh giá trị phổ NMR với tài liệu tham khảo, hợp chất **HSA11** được xác định là quercetin-3'-*O*- β -*D*-galactopyranosid (hình 3.14) [101].



Hình 3.14. Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC chính của hợp chất HSA11

Bảng 3.7. Số liệu phổ NMR của hợp chất HSA11

Vị trí C	$\delta_C^{\#}$	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ mult.; J (Hz)	HMBC (H \rightarrow C)
2	147,4	147,3	-	-
3	137,5	137,5	-	-
4	177,4	177,5	-	-
5	162,5	162,8	-	-
6	99,4	99,4	6,20 (d, 1,5)	5, 7, 8, 10
7	165,8	165,8	-	-
8	94,7	94,7	6,46 (brs)	6, 10
9	158,3	158,2	-	-
10	104,6	104,5	-	-
1'	124,4	124,4	-	-
2'	118,4	118,4	8,19 (s)	2, 3', 4', 6'
3'	146,8	146,7	-	-
4'	150,6	150,6	-	-
5'	117,2	117,2	6,99 (d, 8,5)	1', 3', 4'
6'	125,2	125,1	7,90 (d, 8,5)	2', 4'
1''	105,2	105,2	4,82 (d, 8,0)	3
2''	72,4	72,4	3,90 (dd, 8,0, 9,5)	
3''	74,6	74,6	3,64 (dd, 3,5, 9,5)	
4''	70,2	70,1	3,97 (d, 3,0)	
5''	77,3	77,2	3,76 (t, 6,0)	
6''	62,3	62,3	3,84-3,88 (chồng chập vào nhau)	

^aĐo trong CD₃OD, ^b125 MHz, ^c500 MHz. [#] δ_C của hợp chất quercetin-3'-O- β -D galactopyranosid [101].

3.2.2.7. Hợp chất HSA12

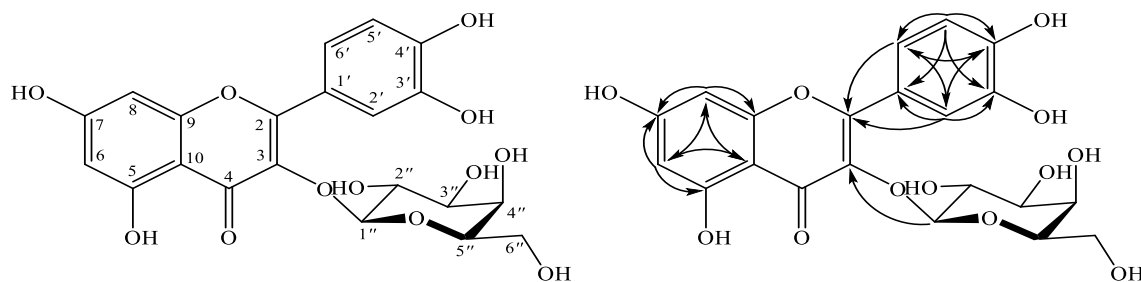
Hợp chất **HSA12** thu được dưới dạng chất bột vô định hình, màu vàng nhạt.

Công thức phân tử của **HSA12** được xác định là $C_{21}H_{20}O_{12}$ bởi sự xuất hiện của pic ion giả phân tử $[M+H]^+$ tại m/z 465,1029 trên phổ khối lượng phân giải cao HR-ESI-MS (tính toán lý thuyết cho công thức $[C_{21}H_{21}O_{12}]^+$: 465,1033).

Phổ 1H -NMR của hợp chất **HSA12** xuất hiện tín hiệu của hai proton thơm thuộc hệ tương tác spin-spin AX ở vòng A tại δ_H 6,20 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-6) và 6,42 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-8), ba proton thơm thuộc hệ tương tác spin-spin ABX ở vòng B tại δ_H 7,85 (1H, d, $J = 2,5$ Hz, H-2'), 6,88 (1H, d, $J = 8,5$ Hz, H-5') và 7,61 (1H, dd, $J = 2,5, 8,5$ Hz, H-6') gợi ý sự có mặt của khung flavon. Sự xuất hiện của proton anome tại δ_H 5,17 (1H, d, $J = 8,0$ Hz, H-1'') gợi ý sự có mặt của một đơn vị đường. Trên phổ ^{13}C -NMR và HSQC của hợp chất **HSA12** quan sát thấy xuất hiện 21 tín hiệu carbon bao gồm 1 carbon carbonyl tại δ_C 179,5; 9 carbon không liên kết trực tiếp với hydro tại δ_C 166,3, 163,0, 158,8, 158,5, 150,0, 145,8, 135,8, 122,9 và 105,4; 10 carbon methin tại δ_C 123,0, 117,8, 116,1, 105,4, 100,0, 94,8, 77,2, 75,1, 73,2 và 70,0; 1 carbon methylen tại δ_C 62,0. Số liệu phổ 1H -NMR và ^{13}C -NMR của hợp chất **HSA12** giống với hợp chất quercetin-3-*O*- β -D-galactopyranosid [102].

Trên phổ HMBC quan sát thấy có sự tương tác giữa H-6 (δ_H 6,20) với C-5 (δ_C 163,0)/ C-7 (δ_C 166,3)/ C-8 (δ_C 94,8)/ C-10 (δ_C 105,4) và H-8 (δ_H 6,42) với C-6 (δ_C 100,0)/ C-7 (δ_C 166,3)/ C-9 (δ_C 158,5)/ C-10 (δ_C 105,4) xác định 2 proton thơm hệ AX tại C-6 và C-8. Hằng số tương tác $J_{H-1''/H-2''} = 8,0$ Hz và giá trị độ chuyển dịch hóa học của phần đường (δ_C 105,4, 77,2, 75,1, 73,2, 70,0 và 62,0) cho phép xác định phần đường của hợp chất **HSA12** là *O*- β -galactopyranosyl. Bên cạnh đó, vị trí của phần đường liên kết với khung chất tại C-3 được xác định dựa vào tương tác HMBC giữa H-1'' (δ_H 5,17) với C-3 (δ_C 135,8). Tương tác HMBC giữa H-2' (δ_H 7,85) với C-2 (δ_C 158,8)/C-3' (δ_C 145,8)/ C-4' (δ_C 150,0), giữa H-5' (δ_H 6,88) với C-1' (δ_C 122,9)/ C-3' (δ_C 145,8)/ C-4' (δ_C 150,0) và giữa H-6' (δ_H 7,61) với C-1' (δ_C 122,9)/ C-4' (δ_C 150,0) gợi ý sự có mặt của các nhóm hydroxy tại C-3' và C-4'. Từ những phân tích trên hợp chất **HSA12** được xác định là quercetin-3-*O*-

β -D-galactopyranosid (hình 3.15).



Hình 3.15. Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC chính của hợp chất HSA12

Bảng 3.8. Số liệu phổ NMR của hợp chất HSA12

Vị trí C	$\delta_C^{\#}$	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ mult.; J (Hz)	HMBC (H \rightarrow C)
2	156,5	158,8	-	-
3	133,7	135,8	-	-
4	177,6	179,5	-	-
5	161,1	163,0	-	-
6	98,8	100,0	6,22 (d, 2,0)	5, 7, 8, 10
7	164,2	166,3	-	-
8	93,7	94,8	6,42 (d, 2,0)	6, 7, 9, 10
9	156,4	158,5	-	-
10	104,0	105,4	-	-
1'	121,3	122,9	-	-
2'	116,1	117,8	7,85 (d, 2,5)	2, 1', 3', 4', 6'
3'	144,8	145,8	-	-
4'	148,4	150,0	-	-
5'	115,3	116,1	6,88 (d, 8,5)	1', 3', 4', 6'
6'	122,0	123,0	7,61 (dd, 2,5, 8,5)	2, 2', 4'
1''	102,0	105,4	5,17 (d, 8,0)	3
2''	71,3	73,2	3,86 (dd, 8,0, 9,0)	
3''	73,2	75,1	3,57 (m)	
4''	67,9	70,0	3,83 (m)	
5''	75,9	77,2	3,49 (t, 6,0)	
6''	60,2	62,0	3,58 (m) 3,65 (dd, 6,0, 11,5)	

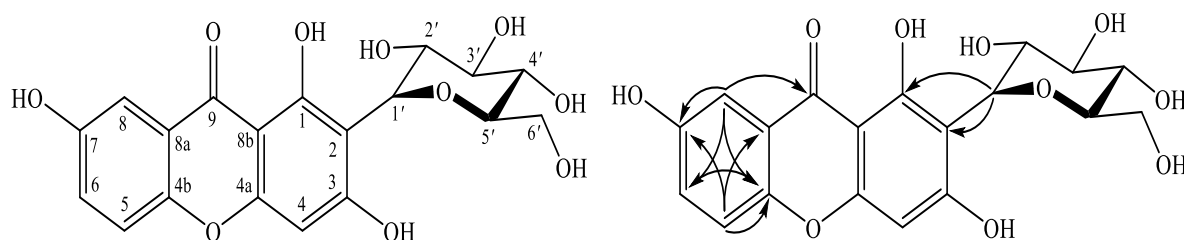
^aĐo trong CD₃OD, ^b125 MHz, ^c 500 MHz. [#] δ_C của hợp chất quercetin-3-O- β -D-galactopyranosid [102]

3.2.2.8. Hợp chất HSA13

Hợp chất **HSA13** thu được dưới dạng bột màu vàng.

Phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất **HSA13** xuất hiện tín hiệu của bốn proton thơm tại δ_{H} 6,27 (1H, s), 7,22 (1H, d, $J = 8,5$ Hz), 7,32 (1H, d, $J = 8,5$ Hz) và 7,48 (1H, s); một proton anome tại δ_{H} 4,92 (d, 9,5) và các proton của một đơn vị đường tại vùng có độ dịch chuyển hóa học từ 3,44 đến 4,30 ppm. Trên phổ $^{13}\text{C-NMR}$ và HSQC của hợp chất **HSA13** quan sát thấy xuất hiện 19 tín hiệu carbon bao gồm 13 carbon đặc trưng của khung xanthon tại δ_{C} 163,6 (C-1), 108,7 (C-2), 165,4 (C-3), 94,5 (C-4), 159,2 (C-4a), 155,1 (C-4b), 119,5 (C-5), 124,8 (C-6), 151,0 (C-7), 109,5 (C-8), 122,2 (C-8a), 102,3 (C-8b), 181,0 (C-9) và một đơn vị đường tại δ_{C} 75,5 (CH), 72,4 (CH), 80,5 (CH), 71,7 (CH), 82,5 (CH) và 62,8 (CH_2). Từ những phân tích trên hợp chất **HSA13** được dự đoán là một xanthon glycosid. Bên cạnh đó, dữ liệu phổ của hợp chất **HSA13** khá giống với hợp chất **HSA1** (mangiferin) ngoại trừ các tín hiệu thuộc vòng A, do sự thiếu vắng nhóm thế hydroxy tại vị trí C-6.

Trên phổ HMBC quan sát thấy các tín hiệu tương tác giữa proton H-5 (δ_{H} 7,32) với carbon C-4b (δ_{C} 155,1)/ C-7 (δ_{C} 151,0)/ C-8a (δ_{C} 122,2) và proton H-8 (δ_{H} 7,48) với C-6 (δ_{C} 124,8)/ C-7 (δ_{C} 151,0)/ C-8a (δ_{C} 122,2)/ C-9 (δ_{C} 181,0) cùng với giá trị độ dịch chuyển hóa học của C-7 (δ_{C} 151,0) cho phép xác định vị trí của nhóm hydroxy tại vòng A. Vị trí của phân đường tại C-2 được xác định dựa vào tương tác HMBC giữa proton anome (δ_{H} 4,92) với C-1 (δ_{C} 163,6)/ C-2 (δ_{C} 108,7)/ C-3 (δ_{C} 165,4). Từ những phân tích trên kết hợp so sánh giá trị phổ NMR của **HSA13** với hợp chất neolancerin [103]. Hợp chất **HSA13** được xác định là neolancerin (hình 3.16).



Hình 3.16. Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC chính của hợp chất HSA13

Bảng 3.9. Số liệu phổ NMR của hợp chất HSA13

Vị trí C	$\delta_C^{\#}$	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ (mult., J in Hz)	HMBC (H \rightarrow C)
1	162,3	163,6	-	
2	107,8	108,7	-	
3	165,3	165,4		
4	93,4	94,5*	6,27 (s)	
4a	156,3	159,2	-	
4b	153,9	155,1	-	
5	118,9	119,5	7,32 (d, 8,5)	4b, 7, 8a
6	124,3	124,8	7,22 (d, 8,5)	4b
7	148,8	151,0	-	
8	108,0	109,5	7,48 (s)	4b, 6, 7, 9
8a	120,3	122,2	-	
8b	101,6	102,3	-	
9	179,8	181,0	-	
1'	73,0	75,5	4,92 (d, 9,5)	1, 2
2'	70,6	72,4	4,30 (dd, 9,0, 9,5)	
3'	78,9	80,5	3,50 (m)	
4'	70,1	71,7	3,54 (m)	
5'	81,6	82,5	3,44 (m)	
6'	61,5	62,8	3,77 (dd, 5,0, 12,0) 3,82 (brd, 10,5)	

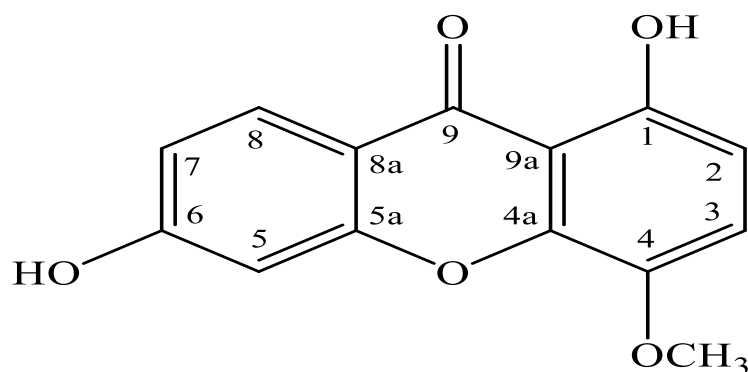
^aĐo trong CD₃OD, ^b125 MHz, ^c500 MHz, [#] δ_C của hợp chất neolancerin đo trong DMSO-d₆[103]

3.2.2.9. Hợp chất HSA15

Hợp chất **HSA15** thu được dưới dạng bột màu vàng.

Phổ ¹H-NMR của hợp chất **HSA15** xuất hiện tín hiệu của ba proton thơm thuộc hệ tương tác spin-spin ABX tại δ_H 7,32 (1H, dd, $J = 3,0, 9,0$ Hz), 7,48 (1H, d, $J = 9,0$ Hz), 7,51 (1H, d, $J = 3,0$ Hz) và hai proton ở vị trí ortho của vòng thơm tại δ_H 6,65 (1H, d, $J = 9,0$ Hz), 7,34 (1H, d, $J = 9,0$ Hz) và một nhóm methoxy tại δ_H 3,94 (3H, s). Trên phổ ¹³C-NMR và DEPT của hợp chất **HSA15** quan sát thấy xuất hiện 14 tín hiệu carbon bao gồm một nhóm methoxy tại δ_C 57,8, năm nhóm methin tại δ_C 109,0, 109,2, 120,4, 121,4, 126,4 và tám carbon không liên kết với hydro tại δ_C 109,3, 122,2, 141,6, 147,4, 151,4, 155,5, 155,6 và 183,4. Các tín hiệu

trên phổ 1D-NMR gợi ý hợp chất **HSA15** có cấu trúc khung xanthon, chứa ba nhóm thế (hai nhóm hydroxy và một nhóm methoxy). So sánh số liệu phổ NMR của hợp chất **HSA15** với hợp chất cratoxyarborenon F, kết quả cho thấy số liệu tại các vị trí hoàn toàn phù hợp [96]. Hợp chất **HSA15** được xác định là cratoxyarborenon F (hình 3.17).



Hình 3.17. Cấu trúc hóa học của hợp chất HSA15
Bảng 3.10. Số liệu phổ NMR của hợp chất HSA15

Vị trí C	$\delta_C^{\#}$	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ mult.; <i>J</i> (Hz)
1	157,1	155,6	-
2	110,9	109,0	6,65 (d, 9,0)
3	123,1	121,4	7,34 (d, 9,0)
4	143,0	141,6	-
4a	148,7	147,4	-
5	110,9	109,2	7,51 (d, 3,0)
5a	156,9	155,5	-
6	152,8	151,4	-
7	128,0	126,4	7,32 (dd, 3,0, 9,0)
8	122,2	120,4	7,48 (d, 9,0)
8a	123,7	122,2	-
9	184,7	183,4	-
9a	111,4	109,3	-
4-OCH ₃	59,3	57,8	3,94 (s)

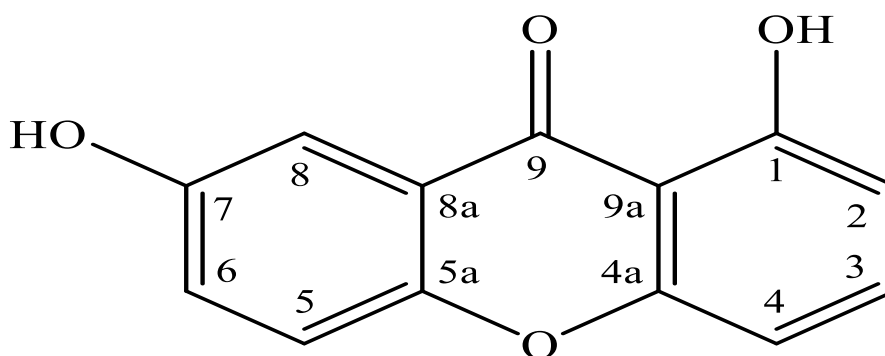
^aĐo trong CD₃OD, ^b125 MHz, ^c500 MHz. [#] δ_C của hợp chất cratoxyarborenon F đo trong DMSO-d₆ [96]

3.2.2.10. Hợp chất HSA16

Hợp chất **HSA16** thu được dưới dạng bột vô định hình, màu vàng.

Công thức phân tử của **HSA16** được xác định là $C_{13}H_8O_4$ bởi sự xuất hiện của pic ion giả phân tử $[M+H]^+$ tại m/z 229,0497 trên phổ khối lượng phân giải cao HR-ESI-MS (tính toán lý thuyết cho công thức $[C_{13}H_9O_4]^+$: 229,0501).

Phổ 1H -NMR của hợp chất **HSA16** quan sát thấy xuất hiện tín hiệu của ba proton thuộc vòng thơm thế 1,3,4 tại δ_H 7,33 (1H, dd, $J = 2,0, 9,0$ Hz), 7,44 (1H, d, $J = 9,0$ Hz), 7,53 (1H, d, $J = 2,0$ Hz) và ba proton thuộc vòng thơm thế 1,2,3 tại δ_H 6,74 (1H, d, $J = 8,0$ Hz), 6,95 (1H, d, $J = 8,5$ Hz), 7,63 (1H, dd, $J = 8,0, 8,5$ Hz). Trên phổ ^{13}C -NMR và DEPT của hợp chất **HSA16** quan sát thấy xuất hiện các tín hiệu, điều này cho phép xác định sự có mặt của 6 nhóm CH tại δ_C 108,1, 109,3, 110,7, 120,2, 126,4, 137,9 và 7 carbon không liên kết với hydro tại 109,5, 122,2, 151,5, 155,5, 157,9, 162,9 và 183,5. Phân tích dữ liệu 1D-NMR cùng với công thức phân tử đã được xác định là $C_{13}H_8O_4$ cho phép dự đoán **HSA16** là một hợp chất xanthon có hai nhóm thế hydroxy. So sánh số liệu phổ NMR của **HSA16** với hợp chất euxanthon, kết quả cho thấy các giá trị phổ ở các vị trí hoàn toàn phù hợp [104]. Hợp chất HSA16 được xác định là euxanthon. Hợp chất này đã được Hong và cộng sự thông báo phân lập được từ loài *Hypericum sampsonii* Hance. (hình 3.18) [65].



Hình 3.18. Cấu trúc hóa học của hợp chất HSA16

Bảng 3.11. Số liệu phổ NMR của hợp chất HSA16

Vị trí C	$\delta_C^{\#}$	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ mult.; J (Hz)
1	160,7	162,9	-
2	109,7	110,7	6,95 (d, 8,5)
3	137,3	137,9	7,63 (dd, 8,0, 8,5)
4	107,4	108,1	6,74 (d, 8,0)
4a	154,0	155,5	-
5	119,5	120,2	7,44 (d, 9,0)
4b	149,5	151,5	-
6	125,6	126,4	7,33 (dd, 2,0, 9,0)
7	156,0	157,9	-
8	107,9	109,3	7,53 (d, 2,0)
8a	120,6	122,2	-
9	181,6	183,5	-
8b	108,0	109,5	-

^aĐo trong CD_3OD , ^b125 MHz, ^c500 MHz, $\delta_C^{\#}$ của hợp chất euxanthon đo trong $DMSO-d_6$ [104]

3.2.2.11. Hợp chất HSA17

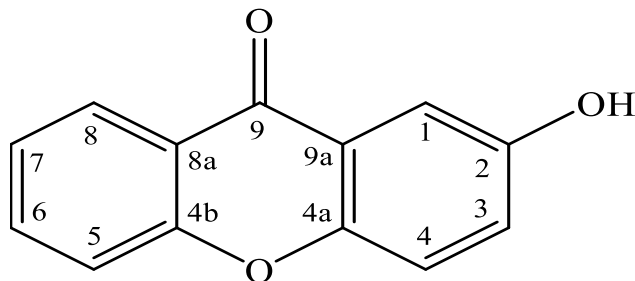
Hợp chất **HSA17** thu được dưới dạng bột màu vàng.

Công thức phân tử của **HSA17** được xác định là $C_{13}H_8O_3$ bởi sự xuất hiện của pic ion giả phân tử $[M+H]^+$ tại m/z 213,0546 trên phổ khối lượng phân giải cao HR-ESI-MS (tính toán lý thuyết cho công thức $[C_{13}H_9O_3]^+$: 213.0552).

Phổ 1H -NMR của hợp chất **HSA17** quan sát thấy xuất hiện tín hiệu của 7 proton thuộc vòng thơm thế 1,2 tại δ_H 7,44 (1H, ddd, $J = 1,0, 8,0, 8,0$ Hz), 7,59 (1H, brd, $J = 7,0$ Hz), 7,83 (1H, ddd, $J = 1,5, 7,0, 8,0$ Hz), 8,27 (1H, dd, $J = 1,5, 8,0$ Hz) và vòng thơm thế 1,3,4 tại δ_H 7,34 (1H, dd, $J = 3,0, 9,0$ Hz), 7,59 (1H, d, $J = 3,0$ Hz) và 7,51 (1H, d, $J = 9,0$ Hz). Trên phổ ^{13}C -NMR và DEPT của hợp chất **HSA17** quan sát thấy xuất hiện 13 tín hiệu carbon bao gồm 1 nhóm carbonyl (δ_C 179,0), 7 nhóm CH (δ_C 109,8, 119,2, 120,5, 124,9, 125,9, 127,2, 136,3) và 5 carbon không liên kết với hydro (δ_C 122,0, 123,3, 151,6, 155,5, 157,7).

Phân tích dữ liệu phổ 1D-NMR và công thức phân tử đã được xác định dựa vào phổ khối lượng phân giải cao gợi ý hợp chất **HSA17** là một hợp chất khung xanthon đơn giản, có một nhóm thế hydroxy. So sánh số liệu phổ NMR của

HSA17 với hợp chất 2-hydroxyxanthon, kết quả cho thấy, số liệu phổ tại các vị trí hoàn toàn phù hợp [105]. Hợp chất **HSA17** được xác định là 2-hydroxyxanthon (hình 3.19).



Hình 3.19. Cấu trúc hóa học của hợp chất HSA17
Bảng 3.12. Số liệu phổ NMR của hợp chất HSA17

Vị trí C	$\delta_C^{\#}$	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ mult.; J (Hz)
1	108,5	109,8	7,59 (d, 3,0)
2	153,9	155,5	-
3	124,6	125,9	7,34 (dd, 3,0, 9,0)
4	119,5	120,5	7,51 (d, 9,0)
4a	149,2	151,6	-
5	118,2	119,2	7,59 (brd, 7,0)
4b	155,6	157,7	-
6	135,2	136,3	7,83 (ddd, 1,5, 7,0, 8,0)
7	124,0	124,9	7,44 (ddd, 1,0, 8,0, 8,0)
8	125,9	127,2	8,27 (dd, 1,5, 8,0)
8a	120,4	122,0	-
9	175,9	179,0	-
9a	121,7	123,3	-

^aĐo trong CD₃OD, ^b125 MHz, ^c500 MHz, [#] δ_C của hợp chất 2-hydroxyxanthon đo trong DMSO-d₆ [105]

3.2.2.12. Hợp chất HSA18

Hợp chất **HSA18** thu được dưới dạng tinh thể hình kim, màu trắng.

Công thức phân tử của **HSA18** được xác định là C₃₀H₄₈O₃ bởi sự xuất hiện của pic ion giả phân tử [M+H]⁺ tại m/z 457,3680 trên phổ khối lượng phân giải

cao HR-ESI-MS (tính toán lý thuyết cho công thức $[C_{30}H_{49}O_3]^+$: 457,3682).

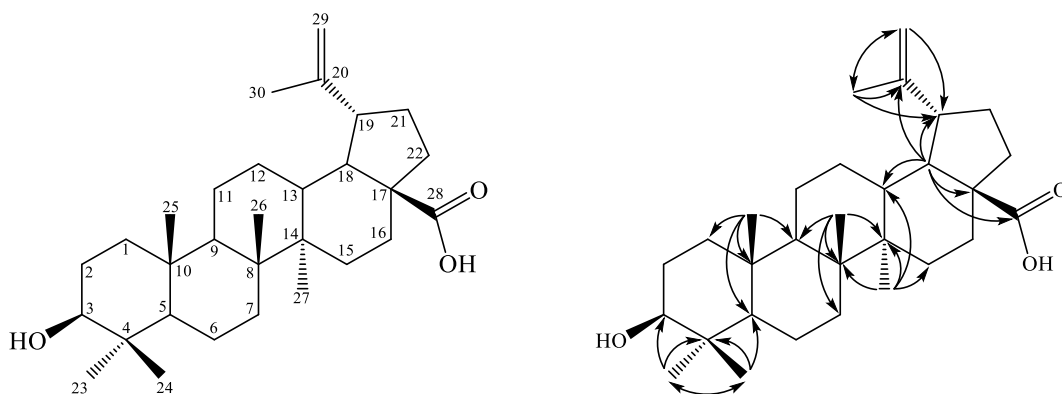
Phổ 1H -NMR của hợp chất **HSA18** xuất hiện tín hiệu của sáu nhóm methyl tại δ_H 0,76 (3H, s), 0,83 (3H, s), 0,94 (3H, s), 0,97 (3H, s), 0,98 (3H, s) và 1,69 (3H, s), hai proton olefin tại δ_H 4,61 (1H, s), 4,74 (1H, s) và một proton oxymethin tại δ_H 3,19 (1H, dd, $J = 5,0, 11,0$ Hz). Trên phổ ^{13}C -NMR và HSQC của hợp chất **HSA18** quan sát thấy xuất hiện 30 tín hiệu carbon bao gồm 1 nhóm carboxyl tại δ_C 180,0; 6 carbon bậc 4 tại δ_C 37,3, 38,9, 40,7, 42,5, 56,3 và 150,4; 6 nhóm methin tại δ_C 38,4, 46,9, 49,3, 50,6, 55,4 và 79,0; 11 nhóm methylen tại δ_C 18,3, 20,9, 25,6, 27,4, 29,7, 30,6, 32,2, 37,1, 34,4, 38,8 và 109,7; 6 nhóm methyl tại δ_C 14,7, 15,4, 16,1, 16,1, 19,4 và 28,0. Phân tích dữ liệu phổ 1H -NMR, ^{13}C -NMR và HSQC cho phép dự đoán hợp chất **HSA18** thuộc lớp chất triterpenoid có cấu trúc khung lupan.

Trên phổ HMBC của hợp chất **HSA18** quan sát thấy có tín hiệu tương tác giữa các proton thuộc hai nhóm methyl H-23 (δ_H 0,76), H-24 (δ_H 0,83) với carbon C-3 (δ_C 79,0)/ C-4 (δ_C 38,9)/ C-5 (δ_C 55,4) và giá trị độ dịch chuyển hóa học của C-3 (δ_C 79,0) cho phép xác định vị trí của nhóm hydro tại C-3 và hai nhóm methyl tại C-4. Tương tự, vị trí của các nhóm methyl còn lại tại C-8, C-10, C-14, C-20 lần lượt được xác định dựa vào tương tác HMBC giữa proton H-26 (δ_H 0,94) với C-7 (δ_C 34,4)/ C-8 (δ_C 40,7)/ C-9 (δ_C 50,6)/ C-14 (δ_C 42,5), proton H-25 (δ_H 0,83) với C-1 (δ_C 38,8)/ C-5 (δ_C 55,4)/ C-9 (δ_C 50,6)/ C-10 (δ_C 37,3), proton H-27 (δ_H 0,98) với C-8 (δ_C 40,7)/ C-13 (δ_C 38,4)/ C-14 (δ_C 42,5)/ C-15 (δ_C 30,6) và proton H-30 (δ_H 1,69) với C-19 (δ_C 46,9)/ C-20 (δ_C 150,4)/ C-29 (δ_C 109,7). Ngoài ra, tương tác giữa proton H-18 (δ_H 1,62) với C-13 (δ_C 38,4)/ C-17 (δ_C 56,3)/ C-19 (δ_C 46,9)/ C-28 (δ_C 180,0) cho phép xác định vị trí của nhóm carbonyl tại C-28. Từ những phân tích trên kết hợp so sánh số liệu phổ NMR với tài liệu tham khảo hợp chất **HSA18** được xác định là acid betulinic (hình 3.20) [106].

Bảng 3.13. Số liệu phổ NMR của hợp chất HSA18

Vị trí C	$\delta_C^{\#}$	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ mult.; <i>J</i> (Hz)	HMBC (H→C)
1	37,8	38,8	0,91 (m) 1,66 (m)	
2	27,4	27,4	1,56 (m) 1,61 (m)	
3	78,9	79,0	3,19 (dd, 5,0, 11,0)	23, 24
4	38,8	38,9	-	
5	55,3	55,4	0,68 (brd, 9,0)	
6	18,3	18,3	1,37 (m) 1,41 (m)	
7	34,3	34,4	1,37 (m)	
8	40,7	40,7	-	
9	50,5	50,6	1,26 (m)	
10	37,2	37,3	-	
11	20,8	20,9	1,24 (m) 1,43 (m)	
12	25,5	25,6	1,04 (m) 1,61 (m)	
13	38,4	38,4	2,20 (m)	
14	42,4	42,5	-	
15	30,5	30,6	1,41 (m) 1,98 (m)	
16	32,1	32,2	1,42 (m) 2,28 (m)	
17	56,3	56,3	-	
18	46,8	46,9	3,00 (m)	13, 17, 19, 20, 28
19	49,2	49,3	1,62 (m)	
20	150,3	150,4	-	
21	29,7	29,7	1,19 (m) 1,53 (m)	
22	37,0	37,1	1,47 (m) 1,96 (m)	
23	27,9	28,0	0,97 (s)	3, 4, 5, 24
24	15,3	15,4	0,76 (s)	3, 4, 5, 23
25	16,0	16,1	0,83 (s)	1, 5, 9, 10
26	16,1	16,1	0,94 (s)	7, 8, 9, 14
27	14,7	14,7	0,98 (s)	8, 13, 14, 15
28	180,5	180,0	-	
29	109,6	109,7	4,61 (s) 4,74 (s)	19, 30
30	19,4	19,4	1,69 (s)	19, 20, 29

^aĐo trong CDCl₃. ^b125 MHz. ^c500 MHz. [#] δ_C của hợp chất acid betulinic [106]



Hình 3.20. Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC chính của hợp chất HSA18

3.2.2.13. Hợp chất HSA20

Hợp chất **HSA20** thu được dưới dạng bột màu vàng.

Công thức phân tử của hợp chất **HSA20** được xác định là $C_{16}H_{16}O_6$ bởi sự xuất hiện của pic ion giả phân tử $[M+H]^+$ tại m/z 305,1018 trên phổ khối lượng phân giải cao HR-ESI-MS (tính toán lý thuyết cho công thức $[C_{16}H_{17}O_6]^+$: 305,1025).

Phổ 1H -NMR của hợp chất **HSA20** xuất hiện tín hiệu của ba proton thuộc vòng thơm đối xứng thế 1,3,5 tại δ_H 6,49 (1H, t, $J = 2,5$ Hz), 6,71 (2H, d, $J = 2,5$ Hz) hai proton của một vòng thơm đối xứng còn lại tại δ_H 6,30 (2H, brs) và chín proton thuộc ba nhóm methoxy tại δ_H 3,70 (6H, s), 3,86 (3H, s). Trên phổ ^{13}C -NMR của hợp chất **HSA20** quan sát thấy xuất hiện 16 tín hiệu carbon bao gồm 5 nhóm methin tại δ_C 91,6 (C-3', C-5'), 108,6, 108,8 (C-2, C-6); 8 carbon không liên kết với hydro tại δ_C 112,1, 141,7, 159,7 (C-3, C-5), 160,0 (C-2', C-6'), 164,3, 197,7 và 3 nhóm methoxy tại δ_C 56,2, 56,3. Số liệu phổ 1H -NMR và ^{13}C -NMR của hợp chất **HSA20** và hợp chất **HSA9** khá giống nhau ngoại trừ sự thiếu vắng các tín hiệu thuộc phần đường α -rhamnopyranose so với hợp chất **HSA9**. Kết quả so sánh cho phép dự đoán hợp chất **HSA20** là một dẫn xuất của benzophenol.

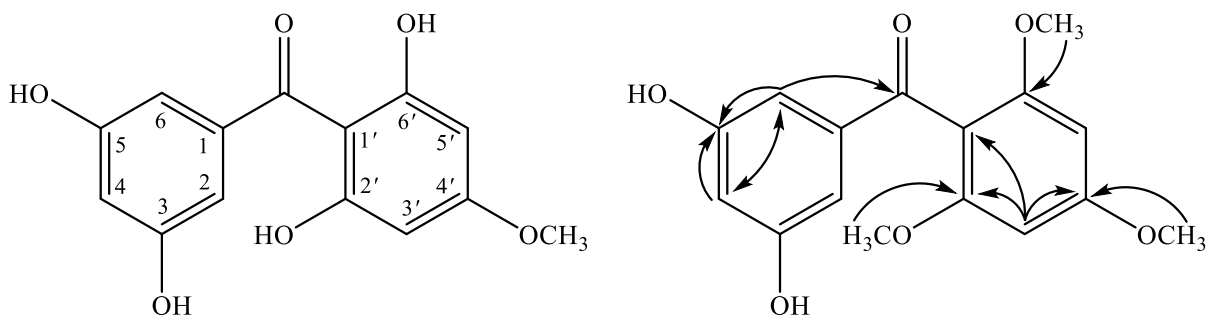
Trên phổ HMBC thấy xuất hiện các tín hiệu tương tác giữa proton H-4 (δ_H 6,49) với C-2, C-6 (δ_C 108,8)/ C-3, C-5 (δ_C 159,7), giữa proton H-2, H-6 (δ_H 6,71) với C-3, C-5 (δ_C 159,7)/ C-4 (δ_C 108,6)/ C=O (δ_C 197,7) cùng với giá trị độ dịch

chuyển hóa học của carbon C-3, C-5 (δ_C 159,7) cho phép xác định vị trí của nhóm keton và hai nhóm hydro lần lượt tại C-1, C-3 và C-5. Tương tự, vị trí của ba nhóm methoxy tại C-2', C-4', C-6' được xác định dựa vào tương tác HMBC giữa proton H-3', H-5' (δ_H 6,30) với C-1' (δ_C 112,1)/ C-2', C-6' (δ_C 160,0)/ C-4' (δ_C 164,3) và tín hiệu tương tác của hai nhóm methoxy (δ_H 3,70) với C-2', C-6' (δ_C 160,0) và nhóm methoxy (δ_H 56,2) với C-4' (δ_C 164,3). Từ những phân tích trên, hợp chất **HSA20** được xác định là 3,5-dihydroxy-2',4',6'-trimethoxybenzophenol (hình 3.21).

Bảng 3.14. Số liệu phổ NMR của hợp chất HSA20

Vị trí C	HSA9		HSA20		HMBC (H→C)
	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ mult.; J (Hz)	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ mult.; J (Hz)	
1	141,8	-	141,7	-	-
2	109,7	6,95 (dd, 1,5, 2,0)	108,8	6,71 (d, 2,5)	3, 4, 6, C=O
3	159,0	-	159,7	-	-
4	110,0	6,75 (t, 2,0)	108,6	6,49 (t, 2,5)	2, 3, 5, 6
5	160,1	-	159,7	-	-
6	111,3	6,89 (dd, 1,5, 2,0)	108,8	6,71 (d, 2,5)	2, 4, 5, C=O
1'	111,8	-	112,1	-	-
2'	160,1	-	160,0	-	-
3'	91,9	6,31 (s)	91,6	6,30 (brs)	1', 2', 4', 5'
4'	164,4	-	164,3	-	-
5'	91,9	6,31 (s)	91,6	6,30 (brs)	1', 3', 4', 6'
6'	160,1	-	160,0	-	-
C=O	197,2	-	197,7	-	-
1''	100,1	5,35 (d, 1,5)	-	-	-
2''	72,2	3,81 (dd, 3,5, 9,5)	-	-	-
3''	72,0	3,98 (dd, 1,5, 3,5)	-	-	-
4''	73,8	3,46 (t, 9,5)	-	-	-
5''	70,7	3,63 (dd, 6,0, 9,5)	-	-	-
6''	18,0	1,23 (d, 6,0)	-	-	-
2'-OCH ₃	56,3	3,72 (s)	56,3	3,70 (s)	2'
4'-OCH ₃	56,0	3,88 (s)	56,2	3,86 (s)	4'
6'-OCH ₃	56,3	3,72 (s)	56,3	3,70 (s)	6'

^aĐo trong CD₃OD, ^b125 MHz, ^c500 MHz.

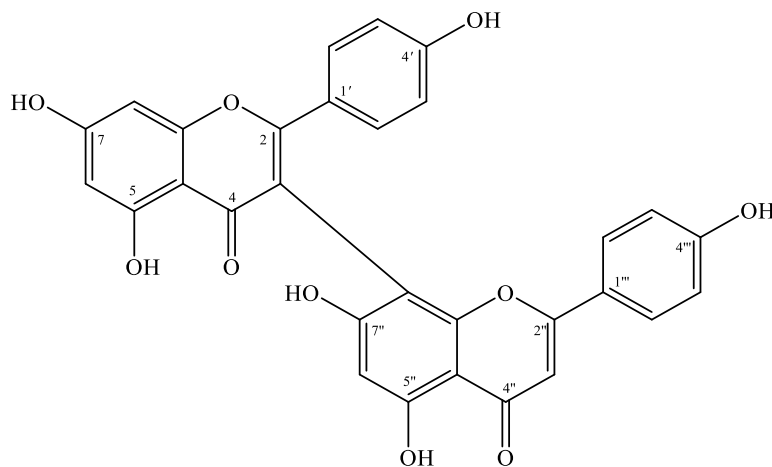


Hình 3.21. Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC chính của hợp chất HSA20

3.2.2.14. Hợp chất HSA21

Hợp chất **HSA21** thu được dưới dạng bột màu vàng nhạt.

Phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất **HSA21** xuất hiện tín hiệu của 12 proton thơm bao gồm tám proton thơm thuộc hai hệ tương tác spin-spin AA'BB' tại δ_{H} 6,67 (2H, dd, $J = 1,5, 7,0$ Hz), 6,80 (2H, brd, $J = 9,0$ Hz), 7,35 (2H, , dd, $J = 1,5, 7,0$ Hz) và 7,57 (2H, brd, $J = 9,0$ Hz), hai proton thuộc hệ tương tác spin-spin AX tại δ_{H} 6,32 (1H, d, $J = 2,0$ Hz), 6,53 (1H, d, $J = 2,0$ Hz) và hai proton thơm đơn tại δ_{H} 6,32 (1H, s), 6,56 (1H, s). Trên phổ $^{13}\text{C-NMR}$ và DEPT của hợp chất **HSA21** quan sát thấy xuất hiện 30 tín hiệu carbon bao gồm 12 nhóm methin và 18 carbon không liên kết với hydro. Số liệu phổ 1D-NMR của hợp chất **HSA21** gợi ý hợp chất này thuộc dạng bisflavon. So sánh số liệu phổ NMR của **HSA21** với hợp chất I3-II8-biapigenin cho thấy, số liệu tại các vị trí hoàn toàn phù hợp [42]. Từ các bằng chứng phổ trên có thể xác định hợp chất **HSA21** là I3-II8-biapigenin (hình 3.22).



Hình 3.22. Cấu trúc hóa học của hợp chất HSA21

Bảng 3.15. Số liệu phổ NMR của hợp chất HSA21

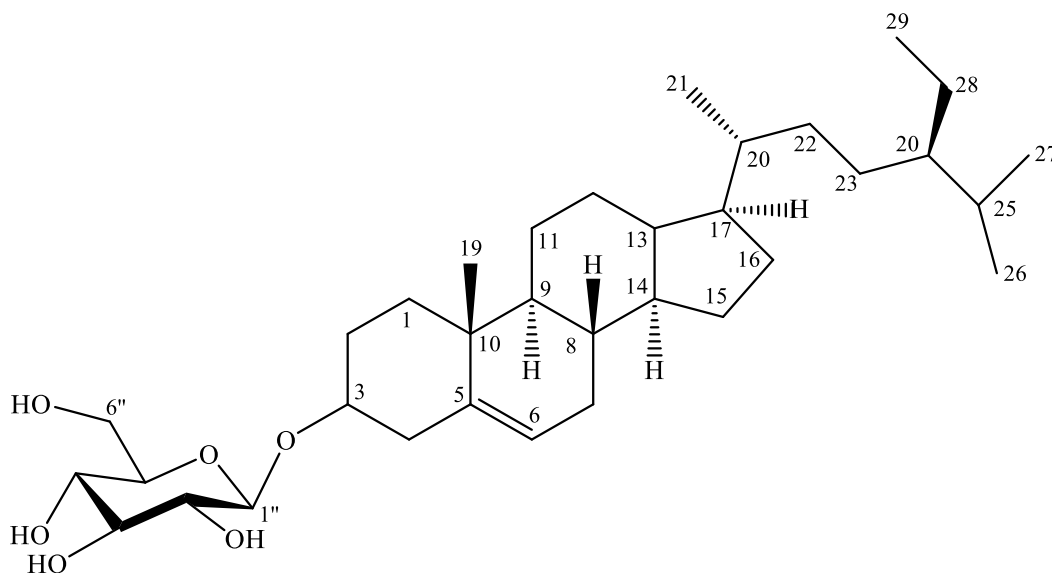
Vị trí C	$\delta_C^{\#}$	$\delta_H^{\#}$ mult.; J (Hz)	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ mult.; J (Hz)
2	165,9	-	166,1	-
3	112,1	-	111,9	-
4	183,9	-	184,0*	-
5	162,7	-	162,7	-
6	100,4	6,28 (d, 2,1)	100,0	6,32 (d, 2,0)
7	165,9	-	166,1	-
8	95,1	6,55 (d, 2,1)	94,9	6,53 (d, 2,0)
9	159,6	-	159,5	-
10	104,7	-	104,9	-
1'	125,2	-	125,1	-
2'	131,0	7,50 (dd, 2,0, 8,8)	131,0	7,35 (dd, 1,5, 7,0)
3'	116,1	6,75 (dd, 2,0, 8,8)	116,1	6,67 (dd, 1,5, 7,0)
4'	163,4	-	163,5	-
5'	116,1	6,75 (dd, 2,0, 8,8)	116,1	6,67 (dd, 1,5, 7,0)
6'	131,0	7,50 (dd, 2,0, 8,8)	131,0	7,35 (dd, 1,5, 7,0)
2''	166,9	-	166,2	-
3''	103,6	6,56 (s)	103,8	6,56 (s)
4''	182,8	-	182,7	-
5''	161,2	-	161,3	-
6''	100,5	6,3 (s)	100,2	6,32 (s)
7''	165,5	-	164,1	-
8''	101,2	-	100,9	-
9''	156,9	-	156,8	-
10''	105,3	-	105,6	-
1'''	123,2	-	123,2	-
2'''	129,1	7,66 (dd, 2,0, 8,9)	129,2	7,57 (brd, 9,0)
3'''	117,0	6,87 (dd, 2,0, 8,9)	116,9	6,80 (brd, 9,0)
4'''	161,1	-	163,2	-
5'''	117,0	6,87 (dd, 2,0, 8,9)	116,9	6,80 (brd, 9,0)
6'''	129,1	7,66 (dd, 2,0, 8,9)	129,2	7,57 (brd, 9,0)

^a Đo trong CD₃OD, ^b125 MHz, ^c500 MHz

3.2.2.15. Hợp chất HSA22

Hợp chất **HSA22** thu được dưới dạng bột màu trắng.

Phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất **HSA22** xuất hiện tín hiệu của 6 nhóm methyl tại δ_{H} 0,65 (3H, s), 0,96 (3H, s), 0,90 (3H, d, $J = 6,5$ Hz), 0,78 (3H, d, $J = 7,0$ Hz), 0,80 (3H, d, $J = 6,5$ Hz) và 0,81 (3H, d, $J = 6,5$ Hz); một proton olefin tại δ_{H} 5,32 (1H, t, $J = 2,5$ Hz) và một proton anom tại δ_{H} 4,22 (1H, d, $J = 8,5$ Hz). Trên phổ $^{13}\text{C-NMR}$ của hợp chất **HSA22** quan sát thấy xuất hiện 35 tín hiệu carbon bao gồm 29 carbon của phần aglycon và 6 carbon của một đơn vị đường. Giá trị độ dịch chuyển hóa học carbon của phần đường (δ_{C} 100,8, 73,4, 76,7, 70,1, 76,7, 61,1) cùng với hằng số tương tác của proton anome ($J_{\text{H-1}''/\text{H-2}''} = 8,5$ Hz) cho phép dự đoán phần đường của hợp chất **HSA22** là *O-β*-glucopyranose. Bên cạnh đó, cặp tín hiệu δ_{C} 140,4 (C-5), 121,1 (C-6) đặc trưng cho một liên kết đôi 3 lần thế. Từ các dữ liệu phổ trên cho phép dự đoán hợp chất **HSA22** là một sterol glycosid. So sánh số liệu phổ NMR của hợp chất **HSA22** với hợp chất tham khảo đã được công bố, hợp chất **HSA22** được xác định là daucosterol (hình 3.23) [107].

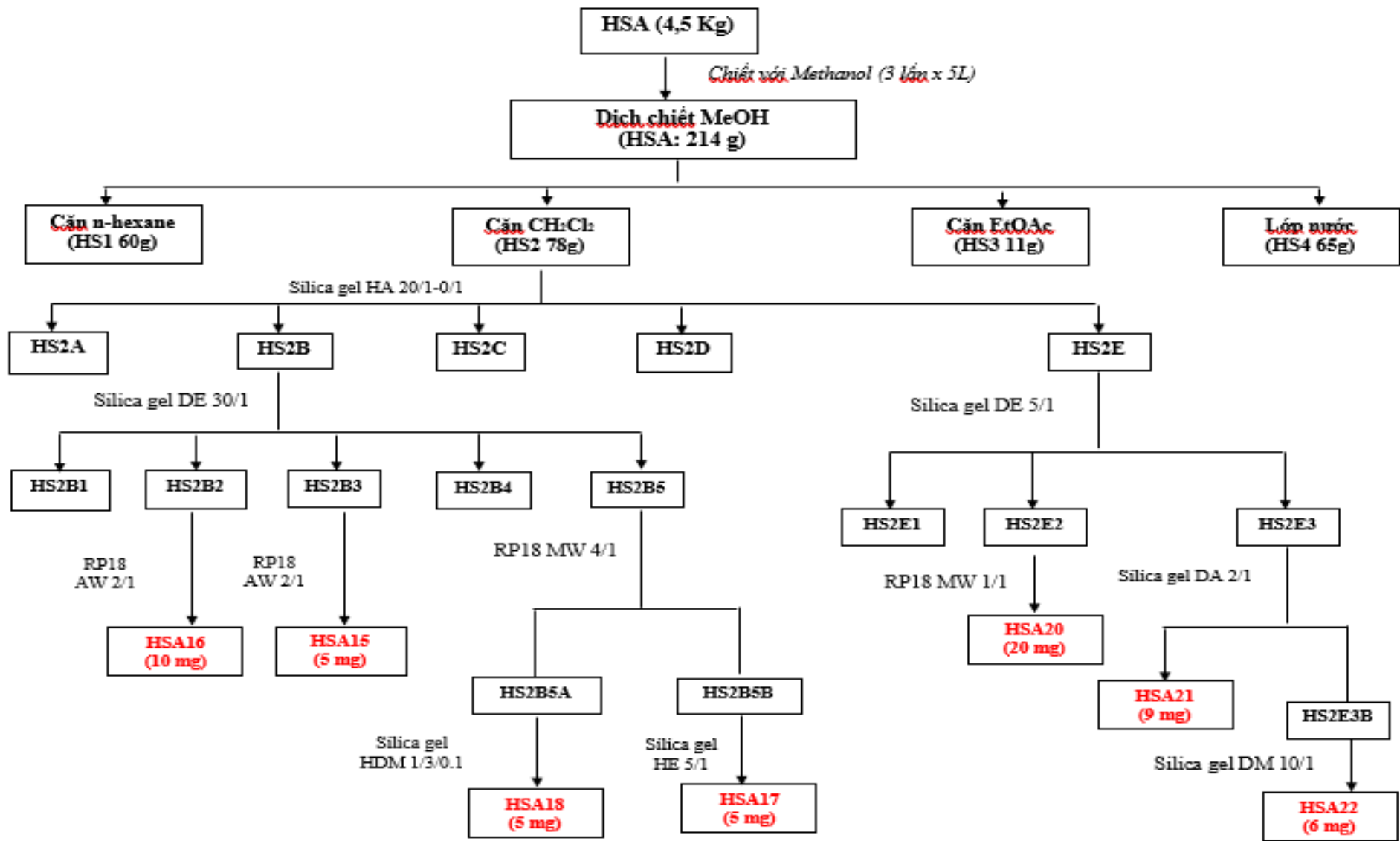


Hình 3.23. Cấu trúc hóa học của hợp chất HSA22

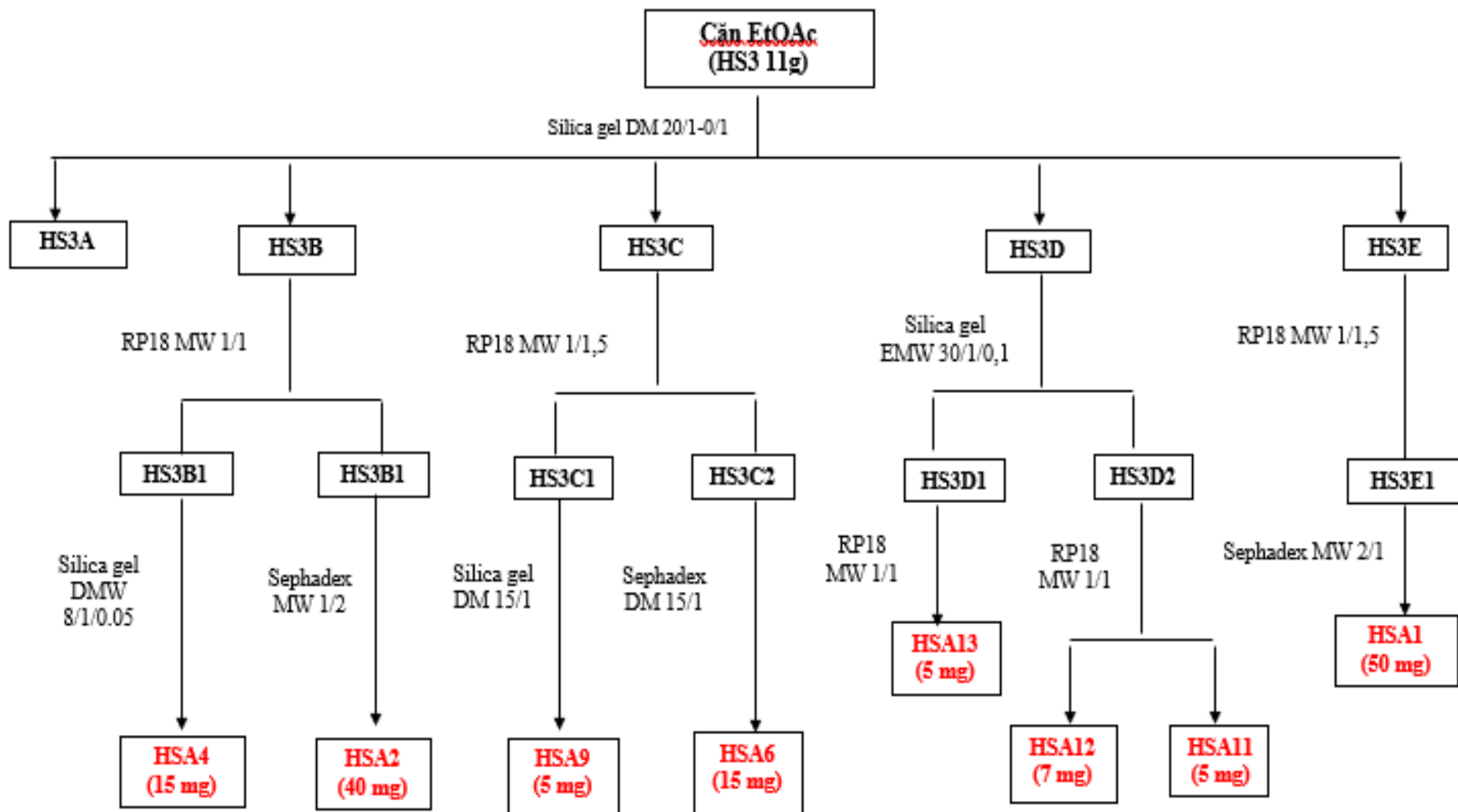
Bảng 3.16. Số liệu phổ NMR của hợp chất HSA22

Vị trí C	$\delta_C^{\#}$	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ mult.; <i>J</i> (Hz)
1	36,78	36,8	
2	29,12	29,3	
3	76,88	76,9	3,42 (m)
4	38,27	38,3	
5	140,21	140,4	-
6	121,11	121,1	5,32 (t, 2,5)
7	31,34	31,3	
8	31,37	31,4	
9	49,57	49,6	
10	36,15	36,2	-
11	20,54	20,5	
12	39,17	39,0	
13	41,80	41,8	-
14	56,12	56,1	
15	23,79	23,8	
16	27,71	27,7	
17	55,40	55,4	
18	11,60	11,6	0,65 (s)
19	19,03	19,0	0,96 (s)
20	35,41	35,4	
21	18,07	18,6	0,90 (d, 6,5)
22	33,32	33,3	
23	25,46	25,5	
24	45,12	45,1	
25	28,69	28,7	
26	18,55	18,9	0,78 (d, 7,0)
27	19,63	19,6	0,80 (d, 6,5)
28	22,57	22,6	
29	11,65	11,7	0,81 (d, 6,5)
1'	100,8	100,8	4,22 (d, 8,5)
2'	73,40	73,4	2,90 (m)
3'	76,66	76,7	3,12 (m)
4'	70,08	70,1	3,02 (m)
5'	76,48	76,7	3,06 (m)
6'	61,07	61,1	3,41 (dd, 5,5, 11,5) 3,64 (dd, 1,5, 11,5)

^a Đo trong DMSO-*d*₆, ^b 125 MHz. ^c 500 MHz [107]



Hình 3.24. Sơ đồ phân lập các hợp chất từ phần trên mặt đất cây ban lá dính từ cần dichloromethan



Hình 3.25. Sơ đồ phân lập các hợp chất từ phần trên mặt đất cây ban lá dứa từ căn ethyl acetat

3.3. Kết quả đánh giá độc tính cấp của cao chiết BLD1

Bảng 3.17. Kết quả đánh giá độc tính cấp của cao chiết BLD1

Lô chuột	Số chuột thí nghiệm	Liều dùng (ml cao/kg TT)	Liều dùng (g DL khô/kg TT)	Số chuột sống/chết sau 72 giờ	Dấu hiệu bất thường khác
Lô 1	10	30	90	10/0	Không
Lô 2	10	45	135	10/0	Không
Lô 3	10	60	180	10/0	Không
Lô 4	10	75	225	10/0	Không

Kết quả cho thấy chuột nhắt trắng uống cao chiết BLD1 với các mức liều khác nhau từ liều thấp nhất là 90 g dược liệu khô/kg thể trọng đến liều cao nhất chuột có thể dung nạp là 225 g dược liệu khô/kg thể trọng tương đương 0,25 ml cao/10 g TT, 3 lần trong 24 giờ. Qua theo dõi tất cả các chuột đều vận động, bài tiết bình thường, không có chuột nào chết, không xuất hiện triệu chứng bất thường nào trong 72 giờ sau uống cao chiết BLD1 lần cuối và trong suốt 7 ngày sau uống cao chiết BLD1.

Vì vậy, chưa xác định được LD₅₀ của cao chiết BLD1 theo đường uống trên chuột nhắt trắng. Với mức liều cao nhất có thể cho chuột uống trong 24 giờ là 225 g dược liệu khô/kg TT không có biểu hiện độc tính cấp.

Cao chiết BLD1 ở liều gấp 46,87 lần liều dùng dự kiến trên người nhưng không có độc tính cấp trên chuột nhắt, theo đường uống (tính người lớn trưởng thành 50 kg, hệ số ngoại suy trên chuột nhắt 12, liều tối đa 20 gam dược liệu/ngày/người).

3.4. Kết quả nghiên cứu một số tác dụng sinh học của cao chiết BLD1 và một số chất tinh khiết phân lập được

3.4.1. Đánh giá hoạt tính chống oxy hóa in vitro của cao chiết BLD1 và một số chất tinh khiết phân lập được

Trong 15 hợp chất phân lập được, tiến hành lấy 9 mẫu hợp chất và cao chiết

BLD1 đánh giá hoạt tính chống oxy hóa thông qua phương pháp thu dọn gốc tự do DPPH. Kết quả được trình bày trong bảng 3.18.

Bảng 3.18. Kết quả hoạt tính thu dọn gốc tự do DPPH của cao chiết BLD1 và một số chất tinh khiết phân lập được

STT	Tên mẫu	Nồng độ thử	% Ức chế
1	HSA1	30 μ M	41,56 \pm 1,24
		100 μ M	91,83 \pm 0,13
2	HSA2	30 μ M	28,37 \pm 1,37
		100 μ M	68,81 \pm 1,06
3	HSA4	30 μ M	2,04 \pm 0,79
		100 μ M	3,23 \pm 1,55
4	HSA9	30 μ M	5,66 \pm 0,56
		100 μ M	6,39 \pm 0,13
5	HSA13	30 μ M	6,56 \pm 0,82
		100 μ M	39,34 \pm 0,76
6	HSA15	30 μ M	3,44 \pm 1,05
		100 μ M	10,80 \pm 0,51
7	HSA16	30 μ M	8,91 \pm 0,3
		100 μ M	8,99 \pm 1,09
8	HSA17	30 μ M	1,75 \pm 0,56
		100 μ M	8,33 \pm 1,4
9	HSA20	30 μ M	3,52 \pm 0,19
		100 μ M	29,51 \pm 0,67
10	Cao chiết BLD1	100 μ g/ml	57,21 \pm 2,16
		500 μ g/ml	86,30 \pm 2,49
	Ascorbic acid*	10 μ g/ml	26,84 \pm 1,18
		50 μ g/ml	93,69 \pm 0,29

* Ascorbic acid được dùng làm chất đối chứng

Kết quả cho thấy, ở nồng độ 100 μ M, hai hợp chất HSA1 và HSA2 có hoạt tính chống oxy hóa thu dọn gốc tự do DPPH tốt hơn so với các hợp chất khác trong nghiên cứu. Mẫu cao chiết BLD1 có khả năng chống oxy hóa thu dọn gốc tự do DPPH tốt ở cả 2 nồng độ thử nghiệm 100 μ g/ml và 500 μ g/ml. Các hợp chất HSA1, HSA2 và cao chiết BLD1 có hoạt tính chống oxy hóa tốt được xác định giá trị IC₅₀.

Bảng 3.19. IC₅₀ của các mẫu có hoạt tính chống oxy hóa

Tên mẫu	Giá trị IC ₅₀ (μM)
HSA1	35,48 ± 1,23
HSA2	87,10 ± 2,16
Cao chiết BLD1	93,33 ± 1,78 μg/ml
Ascorbic acid*	10,96 ± 0,47 μg/ml

* Ascorbic acid được dùng làm chất đối chứng

Kết quả cho thấy, hợp chất HSA1 có hoạt tính chống oxy hóa tốt nhất với IC₅₀ = 35,48 ± 1,23 μM. Còn lại hợp chất HSA2 và cao chiết BLD1 ở cả 2 nồng độ cho hoạt tính chống oxy hóa thấp tương ứng với giá trị (IC₅₀ = 87,10 ± 2,16 μM và IC₅₀ = 93,33 ± 1,78 μg/ml).

3.4.2. Đánh giá hoạt tính chống viêm in vitro của cao chiết BLD1 và một số chất tinh khiết phân lập được

Bảng 3.20. Hoạt tính ức chế sự sản sinh NO của các mẫu nghiên cứu

Tên mẫu	Nồng độ	% ức chế sản sinh NO	% tế bào sống
Control		100,00 ± 0,23	87,74 ± 1,01
LPS		0,00 ± 1,07	100,00 ± 0,72
HSA4	30 μM	102,98 ± 0,59	63,81 ± 1,69
	100 μM	108,93 ± 0,23	53,37 ± 0,79
HSA9	30 μM	98,21 ± 0,41	58,12 ± 1,91
	100 μM	106,55 ± 0,36	56,98 ± 0,16
HSA20	30 μM	110,71 ± 0,05	76,50 ± 0,14
	100 μM	112,50 ± 0,23	65,69 ± 1,66
Cao chiết BLD1	30 μg/ml	5,48 ± 0,61	91,44 ± 0,65
	100 μg/ml	15,75 ± 0,17	82,80 ± 0,81
Cardamonin*	0.3 μM	17,12 ± 0,72	99,62 ± 1,67
	3 μM	93,45 ± 1,16	81,35 ± 0,39

* Cardamonin được dùng làm chất đối chứng dương

Kết quả cho thấy ở cả 2 nồng độ thử nghiệm 30 μM và 100 μM thì 3 hợp chất tinh khiết phân lập được HSA4, HSA9 và HSA20 có hoạt tính ức chế sự sản sinh NO tốt. Tuy nhiên 3 hợp chất này gây độc cho tế bào, vì thế tiếp tục thử nghiệm ở nồng độ thấp hơn 10 μM . Ở nồng độ này cả 3 hợp chất đều không gây độc tế bào với % tế bào sống > 75%. Các hợp chất có tác dụng ức chế sự sản sinh NO > 50% sẽ được đánh giá ở nồng độ nhỏ hơn từ đó xác định giá trị IC_{50} .

Bảng 3.21. IC_{50} của các mẫu có tác dụng ức chế sự sản sinh NO

Tên mẫu	Giá trị IC_{50} (μM)
HSA4	2,00 \pm 0,34
HSA9	2,29 \pm 0,12
HSA20	2,40 \pm 0,69
Cardamonin*	1,41 \pm 0,03

* Cardamonin được dùng làm chất đối chứng dương

Kết quả cho thấy, cả ba hợp chất đều có tác dụng ức chế sự sản sinh NO tốt, trong đó hợp chất HSA4 có hoạt tính ức chế sản sinh NO tốt nhất với giá trị IC_{50} là 2,00 \pm 0,34 μM , gần tương đương với chất đối chứng dương.

3.4.3. Đánh giá hoạt tính ức chế enzyme acetylcholinesterase in vitro của cao chiết BLD1 và một số chất tinh khiết phân lập được

Bảng 3.22. Kết quả đánh giá hoạt tính ức chế enzyme acetylcholinesterase của các mẫu nghiên cứu

STT	Tên mẫu	Nồng độ thử	% Ức chế
1	HSA1	50 μ M	5,63 \pm 0,07
		200 μ M	13,29 \pm 0,83
2	HSA2	50 μ M	6,84 \pm 1,74
		200 μ M	14,19 \pm 0,33
3	HSA4	50 μ M	28,84 \pm 0,27
		200 μ M	37,04 \pm 0,34
4	HSA9	50 μ M	9,90 \pm 2,22
		200 μ M	39,81 \pm 1,32
5	HSA13	50 μ M	5,14 \pm 0,83
		200 μ M	35,96 \pm 0,07
6	HSA15	50 μ M	66,02 \pm 1,63
		200 μ M	68,19 \pm 1,87
7	HSA16	50 μ M	34,85 \pm 0,95
		200 μ M	35,93 \pm 0,52
8	HSA17	50 μ M	35,06 \pm 0,40
		200 μ M	39,54 \pm 0,70
9	HSA20	50 μ M	37,04 \pm 0,34
		200 μ M	40,00 \pm 0,35
10	Cao chiết BLD1	100 μ g/ml	64,73 \pm 0,32
		500 μ g/ml	92,91 \pm 1,13
	Berberin*	0.01 μ g/ml	49,35 \pm 1,45
		0.1 μ g/ml	75,37 \pm 0,62

**Berberin được dùng làm chất đối chứng*

Kết quả cho thấy, hợp chất HSA15 có hoạt tính ức chế phản ứng thủy phân enzyme acetylcholinesterase ở 2 nồng độ thử nghiệm 50 μ M và 200 μ M mạnh hơn so với các hợp chất khác trong nghiên cứu. Ở 2 nồng độ thử nghiệm 100 μ g/ml và 500 μ g/ml, mẫu cao chiết BLD1 đều thể hiện hoạt tính ức chế enzyme acetylcholinesterase mạnh. Từ đó xác định giá trị IC₅₀ của các mẫu có

hoạt tính ức chế enzym acetylcholinesterase, kết quả được trình bày ở bảng 3.23.

Bảng 3.23. IC₅₀ của các mẫu có hoạt tính ức chế enzym acetylcholinesterase

Tên mẫu	Giá trị IC ₅₀
HSA15	26,30 ± 1,31 μM
Cao chiết BLD1	19,95 ± 1,09 μg/ml
Berberin*	0,009 ± 0,001 μg/ml

*Berberin được dùng làm chất đối chứng

Kết quả cho thấy, cao chiết BLD1 có hoạt tính ức chế enzym acetylcholinesterase mạnh hơn so với hợp chất HSA15 với giá trị IC₅₀ là 19,95 ± 1,09 μg/ml. Cả hai mẫu nghiên cứu đều thể hiện hoạt tính ức chế enzym acetylcholinesterase ở mức trung bình.

3.4.4. Kết quả nghiên cứu tác dụng chống oxy hóa bảo vệ gan in vivo của cao chiết BLD1

3.4.4.1. Ảnh hưởng của cao chiết BLD1 lên trọng lượng gan chuột

Bảng 3.24. Kết quả ảnh hưởng của cao chiết BLD1 lên trọng lượng gan chuột

Lô nghiên cứu		Trọng lượng gan (g/10g thể trọng)
Lô 1	Chứng sinh học	0,570 ± 0,065
Lô 2	Mô hình	0,630 ± 0,064***
Lô 3	Silymarin 140 mg/kg	0,551 ± 0,107 ⁺
Lô 4	Cao chiết BLD1 liều 3,6 g/kg + paracetamol 400 mg/kg	0,485 ± 0,054 ⁺⁺⁺
Lô 5	Cao chiết BLD1 liều 10,8 g/kg + paracetamol 400 mg/kg	0,668 ± 0,079

***: so với lô chứng sinh học; ⁺⁺⁺ so với lô mô hình

Kết quả cho thấy:

- Trọng lượng gan chuột ở lô mô hình chỉ uống paracetamol 400 mg/kg tăng cao rõ rệt (p < 0,001) so với lô chứng sinh học.

- Trọng lượng gan chuột ở lô uống silymarin 140 mg/kg giảm rõ rệt so với

lô mô hình, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$.

- Trọng lượng gan chuột ở lô dùng cao chiết BLD1:

+ Lô dùng liều 3,6 g/kg giảm rõ rệt so với lô mô hình, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,001$.

+ Lô dùng liều 10,8 g/kg sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$) so với lô mô hình.

3.4.4.2. Ảnh hưởng của cao chiết BLD1 lên hoạt độ AST, ALT

Bảng 3.25. Kết quả ảnh hưởng của cao chiết BLD1 lên hoạt độ AST

Lô nghiên cứu		AST (UI/L)	p so với lô uống silymarin
Lô 1	Chứng sinh học	140,91 ± 25,82	
Lô 2	Mô hình	409,58 ± 98,75***	p < 0,001
Lô 3	Silymarin 140 mg/kg	296,75 ± 75,83 ⁺⁺	p < 0,01
Lô 4	Cao chiết BLD1 liều 3,6 g/kg + paracetamol 400 mg/kg	152,08 ± 34,99 ⁺⁺⁺	p < 0,001
Lô 5	Cao chiết BLD1 liều 10,8 g/kg + paracetamol 400 mg/kg	142,18 ± 31,70 ⁺⁺⁺	p < 0,001

***: so với lô 1 chứng sinh học; ⁺⁺⁺ so với lô 2 mô hình

Kết quả cho thấy:

- Hoạt độ AST tăng cao ở lô chuột mô hình, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với ($p < 0,001$) so với lô chứng sinh học.

- Silymarin liều 140 mg/kg/ngày có tác dụng làm giảm rõ rệt hoạt độ AST so với lô mô hình ($p < 0,01$).

- Cao chiết BLD1 ở cả hai mức liều nghiên cứu đều có tác dụng làm giảm có ý nghĩa thống kê hoạt độ AST so với lô mô hình ($p < 0,001$). Cao chiết BLD1 thể hiện tác dụng làm giảm hoạt độ AST tốt hơn silymarin liều 140 mg/kg ($p < 0,001$).

Bảng 3.26. Kết quả ảnh hưởng của cao chiết BLD1 lên hoạt độ ALT

Lô nghiên cứu		ALT (UI/L)	p so với lô uống silymarin
Lô 1	Chứng sinh học	76,45 ± 11,93	
Lô 2	Mô hình	288,08 ± 65,56***	p < 0,001
Lô 3	Silymarin 140 mg/kg	186,17 ± 36,99+++	p < 0,001
Lô 4	Cao chiết BLD1 liều 3,6 g/kg + paracetamol 400 mg/kg	84,92 ± 17,03+++	p < 0,001
Lô 5	Cao chiết BLD1 liều 10,8 g/kg + paracetamol 400 mg/kg	90,82 ± 22,48+++	p < 0,001

***: so với lô 1 chứng sinh học; +++ so với lô 2 mô hình

Kết quả cho thấy:

- Hoạt độ ALT của lô mô hình tăng cao rõ rệt so với lô chứng sinh học, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với p < 0,001.

- Silymarin liều 140 mg/kg/ngày có tác dụng làm giảm rõ rệt hoạt độ ALT so với lô mô hình (p < 0,001).

- Cao chiết BLD1 ở cả hai mức liều nghiên cứu đều có tác dụng làm giảm có ý nghĩa thống kê hoạt độ ALT so với lô mô hình (p < 0,001). Cao chiết BLD1 thể hiện tác dụng làm giảm hoạt độ ALT tốt hơn silymarin liều 140 mg/kg (p < 0,001).

3.4.4.3. Ảnh hưởng của cao chiết BLD1 lên nồng độ MDA trong dịch đồng thể gan chuột

Bảng 3.27. Kết quả ảnh hưởng của cao chiết BLD1 lên nồng độ MDA

Lô nghiên cứu		Hàm lượng MDA (nmol/100 mg)	p so với lô uống silymarin
Lô 1	Chứng sinh học	10,75 ± 2,90	
Lô 2	Mô hình	13,66 ± 2,04*	p < 0,05
Lô 3	Silymarin 140 mg/kg	12,50 ± 2,52	
Lô 4	Cao chiết BLD1 liều 3,6 g/kg + paracetamol 400 mg/kg	12,70 ± 1,84	p > 0,05
Lô 5	Cao chiết BLD1 liều 10,8 g/kg + paracetamol 400 mg/kg	12,04 ± 2,77	p > 0,05

***: so với lô 1 chứng sinh học; +++ so với lô 2 mô hình

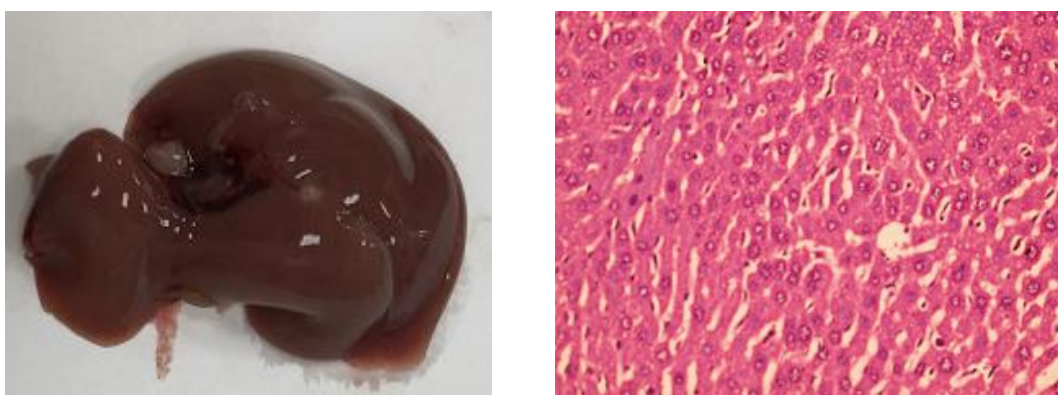
Kết quả cho thấy:

- Nồng độ MDA của lô mô hình tăng cao rõ rệt so với lô chứng sinh học, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$.

- Silymarin liều 140 mg/kg/ngày và cao chiết BLD1 ở cả hai mức liều nghiên cứu đều có xu hướng làm giảm nồng độ MDA so với lô mô hình, tuy nhiên sự khác biệt là chưa có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

3.4.4.4. Hình ảnh đại thể và vi thể gan chuột sau 10 ngày uống thuốc

a) Hình ảnh đại thể và vi thể gan chuột lô chứng sinh học

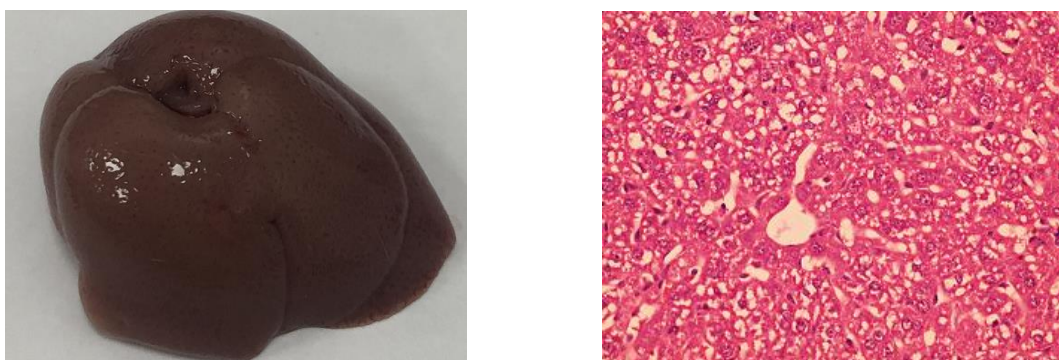


Hình 3.26. Hình ảnh đại thể và vi thể gan chuột lô chứng sinh học (chuột số 72)

(HE x 400, Nhuộm Hematoxylin - Eosin)

Kết quả cho thấy, hình ảnh đại thể gan chuột không thấy xuất hiện các ổ hoại tử, thoái hóa tế bào gan.

b) Hình ảnh đại thể và vi thể gan chuột lô mô hình

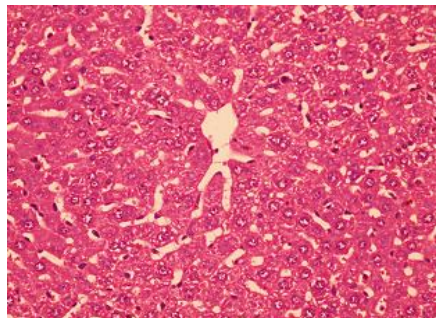


Hình 3.27. Hình ảnh đại thể và vi thể gan chuột lô mô hình (chuột số 90)

(HE x 400, Nhuộm Hematoxylin - Eosin)

Kết quả cho thấy, tế bào gan có khá nhiều hóc sáng nhỏ, có vùng hoại tử, gan thoái hóa vừa.

c) Hình ảnh đại thể và vi thể gan chuột lô silymarin

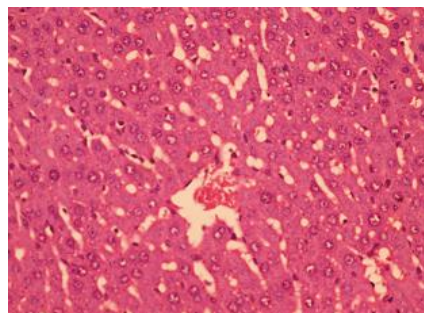


Hình 3.28. Hình ảnh đại thể và vi thể gan chuột lô silymarin (chuột số 05)

(HE x 400, Nhuộm Hematoxylin - Eosin)

Kết quả cho thấy, tế bào gan có hình ảnh thoái hóa nhẹ.

d) Hình ảnh đại thể và vi thể gan chuột lô dùng cao chiết BLD1 liều 3,6 g/kg

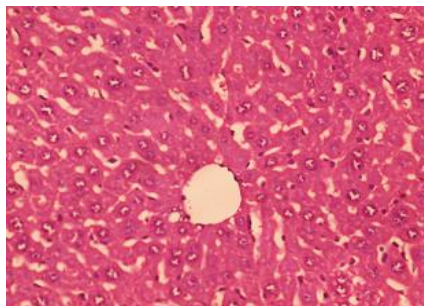


Hình 3.29. Hình ảnh đại thể và vi thể gan chuột lô dùng cao chiết BLD1 liều 3,6 g/kg (chuột số 62)

(HE x 400, Nhuộm Hematoxylin - Eosin)

Kết quả cho thấy, gan chuột lô dùng cao chiết BLD1 liều 3,6 g/kg không thấy xuất huyết hoặc ổ hoại tử, thoái hóa tế bào gan, không có sự khác biệt so với hình ảnh vi thể gan chuột ở lô chứng sinh học.

e) Hình ảnh đại thể và vi thể gan chuột lô dùng cao chiết BLD1 liều 10,8 g/kg



Hình 3.30. Hình ảnh đại thể và vi thể gan chuột lô dùng cao chiết BLD1 liều 10,8 g/kg (chuột số 68)

(HE x 400, Nhuộm Hematoxylin - Eosin)

Kết quả cho thấy, hình ảnh vi thể gan chuột lô dùng cao chiết BLD1 liều 10,8 g/kg không thấy xuất huyết hoặc ổ hoại tử, thoái hóa tế bào gan, không có sự khác biệt so với hình ảnh vi thể gan chuột ở lô chứng sinh học.

3.4.5. Kết quả nghiên cứu tác dụng cải thiện trí nhớ *in vivo* của cao chiết BLD1

3.4.5.1. Mô hình mê cung nước Morris

a) Giai đoạn học hỏi

Bảng 3.28. Ảnh hưởng của cao chiết BLD1 đến thời gian chuột tìm thấy bển đồ

Lô thí nghiệm	Thời gian tìm thấy bển đồ (giây) $\bar{X} \pm SD$ (n = 10)				
	Bài tập nhìn thấy bển đồ	Bài tập không nhìn thấy bển đồ			
	Ngày 1	Ngày 2	Ngày 3	Ngày 4	Ngày 5
Chứng sinh học	64,10 \pm 16,16**	64,10 \pm 20,59*	42,00 \pm 12,93* $\Delta\Delta$	43,80 \pm 8,61* $\Delta\Delta$	29,10 \pm 8,67*** $\Delta\Delta\Delta$
Mô hình	90,30 \pm 21,07	93,60 \pm 26,81	59,20 \pm 17,53 Δ	55,50 \pm 15,12 $\Delta\Delta$	55,60 \pm 17,75 $\Delta\Delta$
Donepezil 2,4 mg/kg	64,10 \pm 15,37**	71,00 \pm 15,47*	46,10 \pm 7,37* $\Delta\Delta\Delta$	36,40 \pm 10,08** $\Delta\Delta\Delta$	26,00 \pm 7,89*** $\Delta\Delta\Delta$
Cao chiết BLD1 liều 3,6 g/kg	77,20 \pm 23,22	75,30 \pm 19,14	43,80 \pm 12,63* $\Delta\Delta$	36,30 \pm 7,20** $\Delta\Delta$	39,20 \pm 11,89* $\Delta\Delta\Delta$
Cao chiết BLD1 liều 10,8 g/kg	66,70 \pm 15,27**	60,50 \pm 19,37**	44,50 \pm 12,35* Δ	41,20 \pm 12,43* Δ	31,80 \pm 9,21*** $\Delta\Delta$

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ so với lô mô hình

$\Delta p < 0,05$; $\Delta\Delta p < 0,01$; $\Delta\Delta\Delta p < 0,001$ so với ngày 2

Kết quả cho thấy:

- Lô chứng sinh học: thời gian tìm thấy bển đồ giảm sau mỗi ngày luyện tập, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở các ngày 3, 4 và 5 so với ngày 2 (ngày đầu tiên của bài tập không thấy bển đồ) ($p < 0,01$ và $0,001$).

- Lô mô hình dùng scopolamin: thời gian tìm thấy bển đồ giảm có sự khác biệt rõ rệt so với ngày 2 ở tất cả các ngày 3, 4, 5 ($p < 0,05$ và $0,01$). So sánh với lô chứng sinh học cho thấy lô dùng scopolamin làm kéo dài thời gian tìm thấy bển đồ ở tất cả các ngày từ 1 - 5, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

- Lô chứng dương uống donepezil: thời gian tìm thấy bện đở giảm sau từng ngày luyện tập so với ngày 2, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê từ ngày 3 ($p < 0,05$; $0,01$ và $0,001$). Trong tất cả các ngày nghiên cứu, thời gian tìm thấy bện đở rút ngắn rõ rệt so với lô mô hình, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

- Lô dùng cao chiết BLD1 liều 3,6 g/kg: thời gian tìm thấy bện đở tại các thời điểm nghiên cứu đều có xu hướng giảm sau từng ngày luyện tập so với ngày 2 và so với lô mô hình, mức giảm có ý nghĩa thống kê được quan sát thấy từ ngày 3 ($p < 0,05$).

- Lô dùng cao chiết BLD1 liều 10,8 g/kg: thời gian tìm thấy bện đở giảm có sự khác biệt so với ngày thứ 2 ở tất cả các ngày 3, 4, 5 ($p < 0,05$ và $0,01$). So sánh với lô mô hình cho thấy cao chiết BLD1 liều 10,8g/kg làm rút ngắn thời gian tìm thấy bện đở ở tất cả các ngày từ 1-5, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

- Không có sự khác biệt về thời gian tìm thấy bện đở giữa 2 lô dùng BLD1 ở các thời điểm nghiên cứu ($p > 0,05$).

b) Giai đoạn đánh giá chính thức

Bảng 3.29. Ảnh hưởng của cao chiết BLD1 đến % thời gian chuột bơi ở 1/4 bể trước đó có chứa bện đở

Lô thí nghiệm (n = 10)	% thời gian
Chứng sinh học	22,08 ± 5,85*
Mô hình	16,25 ± 4,98
Donepezil 2,4 mg/kg	20,97 ± 4,15*
Cao chiết BLD1 liều 3,6 g/kg	19,05 ± 6,22
Cao chiết BLD1 liều 10,8 g/kg	21,04 ± 4,21*

* $p < 0,05$ so với lô mô hình

Kết quả cho thấy, tại các lô uống cao chiết BLD1, % thời gian chuột bơi ở 1/4 bể trước đó có chứa bện đở có xu hướng kéo dài hơn so với lô mô hình, trong đó mức kéo dài có ý nghĩa thống kê được quan sát thấy ở lô uống cao chiết BLD1 liều 10,8 g/kg ($p < 0,05$).

Bảng 3.30. Ảnh hưởng của cao chiết BLD1 đến % quặng đường chuột bơi ở 3/4 bể trước đó không chứa bեն đố

Lô thí nghiệm (n=10)	% quặng đường
Chứng sinh học	71,09 ± 8,06**
Mô hình	84,50 ± 7,86
Donepezil 2,4 mg/kg	74,76 ± 8,00*
Cao chiết BLD1 liều 3,6 g/kg	79,01 ± 14,39
Cao chiết BLD1 liều 10,8 g/kg	77,25 ± 5,88*

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ so với lô mô hình

Kết quả cho thấy, tại các lô uống cao chiết BLD1, % quặng đường chuột bơi ở 3/4 bể trước đó không chứa bեն đố có xu hướng giảm hơn so với lô mô hình, trong đó mức giảm có ý nghĩa thống kê được quan sát thấy ở lô uống cao chiết BLD1 liều 10,8 g/kg ($p < 0,05$).

3.4.5.2. Mô hình mê cung nhiều chữ T

a) Giai đoạn học hỏi

Bảng 3.31. Ảnh hưởng của cao chiết BLD1 đến thời gian chuột tìm thấy khoang đích

Lô thí nghiệm	Thời gian tìm thấy khoang đích (giây) (n=10)				
	Ngày 1	Ngày 2	Ngày 3	Ngày 4	Ngày 5
Chứng sinh học	184,80 ± 43,93***	244,70 ± 68,65**	168,80 ± 52,43*** Δ	164,00 ± 38,40*** Δ	177,40 ± 40,51*** Δ
Mô hình	365,10 ± 76,35	368,40 ± 108,25	307,90 ± 70,12	312,60 ± 90,42	316,10 ± 86,57
Donepezil 2,4 mg/kg	275,30 ± 71,03*	337,30 ± 65,83	264,80 ± 68,90 $\Delta\Delta$	238,40 ± 64,32* $\Delta\Delta$	228,90 ± 71,56* $\Delta\Delta$
Cao chiết BLD1 liều 3,6 g/kg	312,50 ± 84,14	253,60 ± 65,29**	235,80 ± 67,13*	200,80 ± 50,27** $\Delta\Delta\Delta$	145,60 ± 47,91*** $\Delta\Delta\Delta$
Cao chiết BLD1 liều 10,8 g/kg	263,67 ± 81,98*	283,89 ± 76,82*	233,67 ± 74,00*	201,78 ± 51,33** Δ	201,78 ± 47,87** Δ

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ so với lô mô hình

$\Delta p < 0,05$; $\Delta\Delta p < 0,01$; $\Delta\Delta\Delta p < 0,001$ so với ngày thứ 2

Kết quả cho thấy:

- Lô chứng sinh học: chuột có sự tiến bộ sau các ngày tập luyện, so với ngày 2 thời gian tìm thấy khoang đích giảm với sự khác biệt có ý nghĩa thống kê từ ngày 3 ($p < 0,05$).

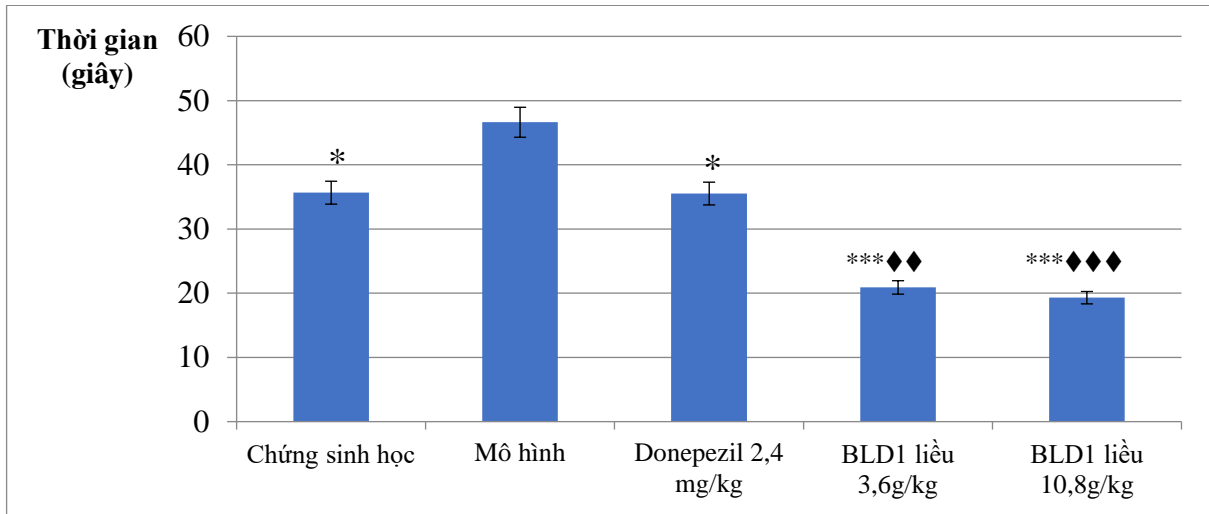
- Lô mô hình dùng scopolamin: thời gian tìm thấy khoang đích không có sự khác biệt so với ngày đầu ở tất cả các ngày nghiên cứu ($p > 0,05$). So với lô chứng sinh học, lô dùng scopolamin làm kéo dài thời gian tìm thấy khoang đích ở tất cả các ngày nghiên cứu, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,01$ và $0,001$).

- Lô chứng dương dùng donepezil: thời gian tìm thấy khoang đích đều giảm dần ở các ngày nghiên cứu so với ngày 2 ($p < 0,01$) và rút ngắn so với lô mô hình ở tất cả các ngày nghiên cứu, khác biệt có ý nghĩa thống kê tại các ngày 1, 4 và 5 ($p < 0,05$).

- Lô dùng cao chiết BLD1 liều 3,6 g/kg: so với ngày 2, thời gian tìm thấy khoang đích giảm dần qua các ngày học hỏi, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê được quan sát thấy ở các ngày 4 và 5 với $p < 0,001$. So với lô mô hình, thời gian tìm thấy khoang đích của chuột có xu hướng rút ngắn hơn tại tất cả thời điểm nghiên cứu, sự khác biệt là có ý nghĩa thống kê ở từ ngày thứ 2 của giai đoạn học hỏi của nghiên cứu ($p < 0,05$).

- Lô dùng cao chiết BLD1 liều 10,8 g/kg: so với ngày 2, thời gian tìm thấy khoang đích giảm dần qua các ngày học hỏi, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê được quan sát thấy ở các ngày 4 và 5 với $p < 0,05$. So với lô mô hình, thời gian tìm thấy khoang đích của chuột đều giảm rõ rệt tại tất cả thời điểm nghiên cứu ($p < 0,05$ và $0,01$).

b. Giai đoạn đánh giá chính thức



Hình 3.31. Ảnh hưởng của cao chiết BLD1 đến thời gian chuột tìm thấy khoang đích

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ so với lô mô hình ♦♦ $p < 0,01$; ♦♦♦ $p < 0,001$ so với lô uống donepezil

Kết quả cho thấy:

- Trong giai đoạn đánh giá chính thức, thời gian và quãng đường chuột tìm thấy khoang đích ở lô mô hình dùng scopolamin kéo dài hơn rõ rệt so với lô chứng sinh học ($p < 0,01$).

- Lô uống donepezil có thời gian chuột tìm thấy khoang đích rút ngắn rõ rệt so với lô mô hình ($p < 0,05$).

- Thời gian chuột tìm thấy khoang đích ở 2 lô dùng cao chiết BLD1 đều giảm đáng kể so với lô mô hình ($p < 0,001$)

- Thời gian chuột tìm thấy khoang đích ở các lô dùng cao chiết BLD1 đều ngắn hơn so với donepezil liều 2,4 mg/kg ($p < 0,05$).

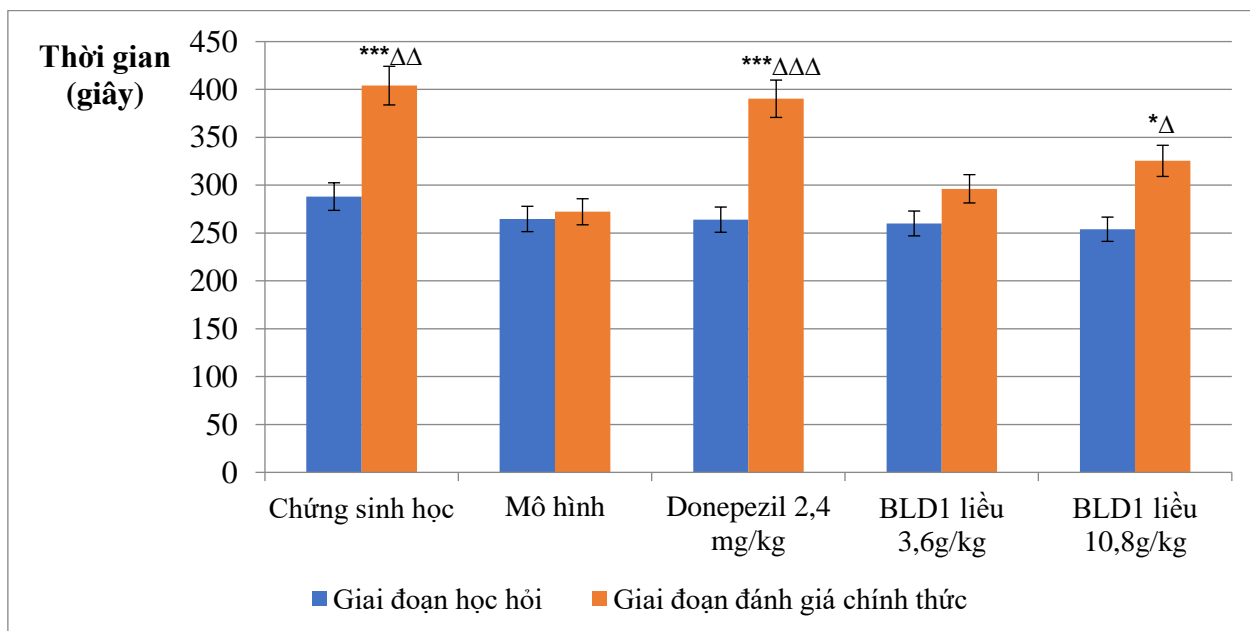
Bảng 3.32. Ảnh hưởng của cao chiết BLD1 đến chiều dài quãng đường chuột đi để tới được khoang đích

Lô thí nghiệm (n=10)	Quãng đường (m)
Chứng sinh học	0,94 ± 0,17*
Mô hình	1,44 ± 0,37
Donepezil 2,4 mg/kg	0,44 ± 0,09***
Cao chiết BLD1 liều 3,6 g/kg	0,62 ± 0,17***
Cao chiết BLD1 liều 10,8 g/kg	0,50 ± 0,13***

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ so với lô mô hình

Kết quả cho thấy: Tại các lô dùng cao chiết BLD1 quãng đường chuột cần đi chuyển để tới được khoang đích đều giảm rõ rệt so với lô mô hình ($p < 0,05$).

3.4.5.3. Mô hình thanh quay Rotarod



Hình 3.32. Ảnh hưởng của cao chiết BLD1 đến thời gian chuột ở trên trục quay

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ so với lô mô hình

$\Delta p < 0,05$; $\Delta\Delta p < 0,01$; $\Delta\Delta\Delta p < 0,001$ so với giai đoạn học hỏi

Kết quả cho thấy:

- Giai đoạn học hỏi: thời gian chuột ở trên trục quay ở các tất cả các lô không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô mô hình ($p > 0,05$).

- Giai đoạn đánh giá chính thức:

+ Lô mô hình: thời gian chuột ở lại trên trục quay không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với giai đoạn học hỏi ($p > 0,05$).

+ Lô chứng sinh học và lô uống donepezil: thời gian chuột ở lại trên trục quay đều tăng so với lô mô hình và so với giai đoạn học hỏi, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,01$ và $0,001$).

+ Lô dùng cao chiết BLD1: thời gian chuột ở lại trên trục quay đều có xu hướng tăng so với lô mô hình và so với giai đoạn học hỏi, trong đó mức tăng có ý nghĩa thống kê được quan sát thấy ở lô dùng cao chiết BLD1 liều $10,8 \text{ g/kg}$ ($p < 0,05$).

CHƯƠNG 4: BÀN LUẬN

4.1. Về thực vật học

Chi *Hypericum* là một trong những chi thực vật đa dạng nhất của thực vật hạt kín với gần 500 loài, phân bố trên hầu hết các lục địa. Trung tâm phân bố đa dạng nhất của chi *Hypericum* được tìm thấy ở khu vực Palaearctic, bao gồm đại lục Á - Âu và Bắc Phi chiếm hơn 45% số loài, khoảng 30% số loài nằm trong khu vực Neotropic trải dài từ Trung đến Nam Mỹ. Các khu vực khác như Bắc Mỹ, Nam Á và Đông Nam Á, Trung và Nam Phi có ít sự đa dạng hơn so với 2 khu vực trên. Các loài thuộc chi thường mọc ở các vùng có khí hậu mát mẻ, ở các vùng nhiệt đới thì sống ở vùng núi cao [108].

Ở Việt Nam, Phạm Hoàng Hộ là người tổng hợp, mô tả đầy đủ nhất đặc điểm cũng như phân bố của chi *Hypericum*. Theo tác giả, chi *Hypericum* có 7 loài phân bố chủ yếu là ở các tỉnh miền núi phía bắc như Cao Bằng, Lạng Sơn, Bắc Kạn, Thái Nguyên, Bắc Giang, Yên Bái, Tuyên Quang, Phú Thọ, Hòa Bình, Hà Nội, Sơn La, Lào Cai, Đà Lạt và Lâm Đồng. Các loài này thường mọc ở ven rừng, bãi đất trống trong thung lũng, trên nương rẫy hay ruộng cao, độ cao phân bố từ 400 - 800 m [1].

Cây ban lá dính là một loài thuộc chi *Hypericum* phân bố trong một phạm vi khá hẹp quanh khu vực phía nam Trung Quốc, Việt Nam, Myanmar, Ấn Độ, Đài Loan và Nhật Bản [18]. Ở Việt Nam, cây ban lá dính thường mọc tự nhiên ở ven rừng, các bãi đất trống trong thung lũng hay trên nương rẫy có độ cao khoảng 400 - 800 m tại các tỉnh miền núi phía Bắc [1]. Xiwen và các cộng sự mô tả cây ban lá dính là một loại thảo mộc lâu năm cao từ 20 - 80 cm với các lá dạng xuyên thân. Các lá dày có hình mũi mác đến hình chữ nhật, dài 2 - 8 cm và ngang 0,7 - 3,5 cm, với mặt dưới nhạt và dày đặc các chấm tuyến nhạt hoặc đen. Hoa mọc thành cụm, mỗi cụm có từ 20 - 40 bông, mỗi hoa có đường kính 6 - 15 mm với 5 cánh hoa màu vàng tươi. Mỗi cánh hoa dài 4 - 13 mm và ngang 1,4 - 7 mm với

các vết hoặc chấm tuyến nhạt trên bề mặt và các tuyến màu đen dọc theo mép. Mỗi hoa có 30 - 42 nhị, 3 kiểu và 3 phần phụ. Các quả nang hình trứng đến hình chóp đạt chiều dài 5 - 9 mm với các tuyến mụn nước màu hồng phách nằm rải rác trên các van, các hạt màu nâu cam dài khoảng 1 mm. Cây ban lá dính ra hoa từ tháng 5 đến tháng 7 và kết quả giữa tháng 6 và tháng 10 [95].

Trong quá trình nghiên cứu về thực vật của mẫu cây ban lá dính, chúng tôi đã thu hái được đầy đủ các bộ phận (rễ, thân, lá, hoa, quả, hạt) tại xã Hà Vị, huyện Bạch Thông, tỉnh Bắc. Mẫu nghiên cứu có đặc điểm đặc trưng là thân tròn, nhẵn, rễ gồm một rễ chính và nhiều rễ phụ. Lá cây mọc đối, không có cuống lá, dính lấy nhau và ôm lấy thân cây. Hoa màu vàng 5 cánh, mọc thành cụm hoa dạng xim ngụ ở đầu cành hay ngọn cây. Lá bắc nhỏ hình mác, lá đài hình bầu dục. Nhị hoa nhiều (30 - 45 nhị) hợp thành 3 nhóm với chỉ nhị dài. Quả nang hình tròn, hạt nhiều hình trứng thuôn dài. Mùa hoa vào tháng 4 - 5, quả chín và rụng vào tháng 7 - 8.

Căn cứ vào đặc điểm hình thái đặc trưng, đối chiếu với khóa phân loại và bản mô tả của các loài thuộc chi *Hypericum* của Xiwen và các cộng sự, so sánh tiêu bản mẫu nghiên cứu với tiêu bản lưu giữ tại phòng tiêu bản Khoa tài nguyên dược liệu - Viện Dược liệu; phòng tiêu bản thực vật Viện sinh thái và Tài nguyên sinh vật - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam dưới sự giúp đỡ của các chuyên gia về phân loại thực vật, đã xác định mẫu nghiên cứu là cây ban lá dính có tên khoa học là *Hypericum sampsonii* Hance, họ Ban (Hypericaceae) [95].

Việc giám định chính xác tên khoa học là kết quả nghiên cứu của luận án này, giúp xác định rõ nguồn gốc của nguyên liệu phục vụ cho các nghiên cứu và công bố về thành phần hóa học và tác dụng sinh học. Các kết quả nghiên cứu về đặc điểm vi phẫu cây ban lá dính cũng là dữ liệu quan trọng trong việc nhận biết và góp phần tiêu chuẩn hóa trong nghiên cứu, kiểm nghiệm, sử dụng dược liệu ban lá dính.

4.2. Về thành phần hóa học

4.2.1. Về kết quả định tính các nhóm chất hữu cơ

Sử dụng các phép thử định tính trên 14 nhóm chất chính cho thấy trong phần trên mặt đất cây ban lá dính có 6 nhóm chất là flavonoid, tanin, saponin, polysaccarid, đường tự do và chất béo. Kết quả nghiên cứu cho thấy sự tương đồng về thành phần nhóm chất chính với một số loài thuộc chi *Hypericum* đã công bố. Điều này phù hợp với nhận định của các nhà khoa học là các loài trong cùng một chi thường có mối liên hệ về thành phần hóa học, thường là các chất hoặc nhóm chất tương tự nhau.

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

Từ phần trên mặt đất cây ban lá dính đã phân lập và xác định cấu trúc của 15 hợp chất bao gồm 6 hợp chất xanthon (HSA1, HSA2, HSA13, HSA15, HSA16, HSA17), 3 hợp chất benzophenol (HSA4, HSA9, HSA20), 4 hợp chất flavonoid (HSA6, HSA11, HSA12, HSA21) và 2 hợp chất saponin (HSA18 và HSA22). Trong đó có 5 hợp chất HSA2, HSA4, HSA11, HSA12, HSA15 lần đầu tiên phân lập được từ phần trên mặt đất cây ban lá dính.

Hợp chất **HSA1** (mangiferin): là chất được phân lập đầu tiên từ loài *Mangifera indica*, sau đó được phát hiện ở nhiều loài khác nhau như *Iris unguicularis*, *Anemarrhena asphodeloides*... [109], [110]. Mangiferin đã được tìm thấy trên 26 loài khác nhau thuộc chi *Hypericum* như *Hypericum perforatum*, *Hypericum calycinum*, *Hypericum aucheri*, *Hypericum montanum*, *Hypericum bithynicum*... bao gồm cả loài ban lá dính *Hypericum sampsonii* [111], [112], [113].

Hợp chất **HSA2** (3,5,6-trihydroxy-1-methoxyxanthon): là một hợp chất xanthon được phân lập lần đầu tiên từ loài *Cudrania fruticosa* [98]. Đây là lần đầu tiên hợp chất này được phân lập từ loài ban lá dính (*Hypericum sampsonii* Hance.).

Hợp chất **HSA4** (petiolin F): là một benzophenol rhamnosod được phân lập

và công bố lần đầu tiên từ loài *Hypericum pseudopetiolum* var. *Kiusianum* thuộc chi *Hypericum* năm 2009 [99]. Tuy nhiên, đây là lần đầu tiên Petionlin F được phân lập từ loài ban lá dính.

Hợp chất **HSA6** (quercetin): là một trong những hợp chất flavonoid phổ biến nhất ở thực vật và được biết đến với phổ hoạt tính rộng [114]. Quercetin được tìm thấy nhiều trong các loại thực phẩm bao gồm táo, các loại quả mọng, rau cải, nho, hành tây, họ, trà và cà chua cũng như nhiều loại hạt, hoa, vỏ cây và lá. Quercetin cũng được tìm thấy trong nhiều loài dược liệu bao gồm *Ginkgo biloba*, *Hypericum perforatum* và *Sambucus canadensis* [115], [116], [117]. Zeng và cộng sự là những người đầu tiên phân lập được quercetin trong cây ban lá dính, sau đó một số nghiên cứu khác cũng đã xác định quercetin có trong cây ban lá dính [118], [119].

Hợp chất **HSA9** (3,5-dihydroxy-2',4',6'-trimethoxybenzophenon-3-*O*- α -L-rhamnopyranosid): là một hợp chất đã được phân lập từ loài ban lá dính.

Hợp chất **HSA11** (quercetin-3'-*O*- β -D-galactopyranosid): là một hợp chất flavonoid lần đầu tiên được phân lập từ loài ban lá dính.

Hợp chất **HSA12** (quercetin-3-*O*- β -D-galactopyranosid): là một dẫn xuất của quercetin được thông báo phân lập lần đầu tiên từ loài *Rumex acetosa* năm 1955 [147], sau đó hợp chất này cũng đã được phân lập ở nhiều loài cây khác nhau như *Podophyllum hexandrum*, *Aconogonon molle*, *Sibiraea angustata* [120], [121], [122], [123]. Tuy nhiên, đây là lần đầu tiên hợp chất này được phân lập từ loài ban lá dính.

Hợp chất **HSA13** (neolancerin): là một dạng hợp chất xanthon phổ biến, được phân lập từ nhiều loài thực vật khác nhau như *Swertia kouitchensis*, *Hypericum perforatum* L và đặc biệt là các loài của chi *Polygala* như *Polygala caudata*, *Polygala tenuifolia* [124], [125], [126]. Neolancerin cũng đã được phân lập từ loài *Hypericum perforatum* và loài ban lá dính thuộc chi *Hypericum* [66], [103].

Bảng 4.1. Các hợp chất phân lập được từ phần trên mặt đất cây ban lá dính thu hái ở xã Hà Vị, huyện Bạch Thông (Bắc Kạn)

TT	Ký hiệu	Tên gọi	Ghi chú
1	HSA1	Mangiferin	
2	HSA2	3,5,6-trihydroxy-1-methoxyxanthon	Lần đầu được phân lập từ loài <i>Hypericum sampsonii</i> Hance
3	HSA4	Petiolin F	Lần đầu được phân lập từ loài <i>Hypericum sampsonii</i> Hance
4	HSA6	Quercetin	
5	HSA9	3,5-dihydroxy-2',4',6'-trimethoxybenzophenon-3-O- α -L-rhamnopyranosid	
6	HSA11	Quercetin-3'-O- β -D-galactopyranosid	Lần đầu được phân lập từ loài <i>Hypericum sampsonii</i> Hance
7	HSA12	Quercetin-3-O- β -D-galactopyranosid	Lần đầu được phân lập từ loài <i>Hypericum sampsonii</i> Hance
8	HSA13	Neolancerin	
9	HSA15	Cratoxyarborenon F	Lần đầu được phân lập từ loài <i>Hypericum sampsonii</i> Hance
10	HSA16	Euxanthon	
11	HSA17	2-hydroxyxanthon	
12	HSA18	acid betulinic	
13	HSA20	3,5-dihydroxy-2',4',6'-trimethoxybenzophenon	
14	HSA21	I3-II8-biapigenin	
15	HSA22	Daucosterol	

Hợp chất **HSA15** (cratoxyarborenon F): là một hợp chất xanthon được phân lập lần đầu từ loài *Cratoxylum sumatranum* có vai trò như một chất chuyển hóa và chống ung thư, thể hiện độc tính tế bào đối với dòng tế bào ung thư KB (biểu bì miệng ở người) [127]. Ngoài ra, cratoxyarborenon F cũng được phân lập từ

loài *Hypericum perforatum* và một số loài khác của chi *Cratoxylum* như *Cratoxylum formosum*, *Cratoxylum pruniflorum* [128], [129]. Tuy nhiên đây là lần đầu tiên chất này được phân lập từ loài ban lá dính.

Hợp chất **HSA16** (euxanthon): là một hợp chất xanthon tự nhiên xuất hiện ở nhiều loài thực vật. Hợp chất này được phân lập và công bố lần đầu từ loài *Polygala caudata* năm 1984 [125]. Bên cạnh đó hợp chất này cũng đã được phân lập ở nhiều loài thuộc chi *Hypericum* như *Hypericum perforatum*, *Hypericum androsaemum*, *Hypericum mysorense* và *Hypericum sampsonii* (loài ban lá dính) [130].

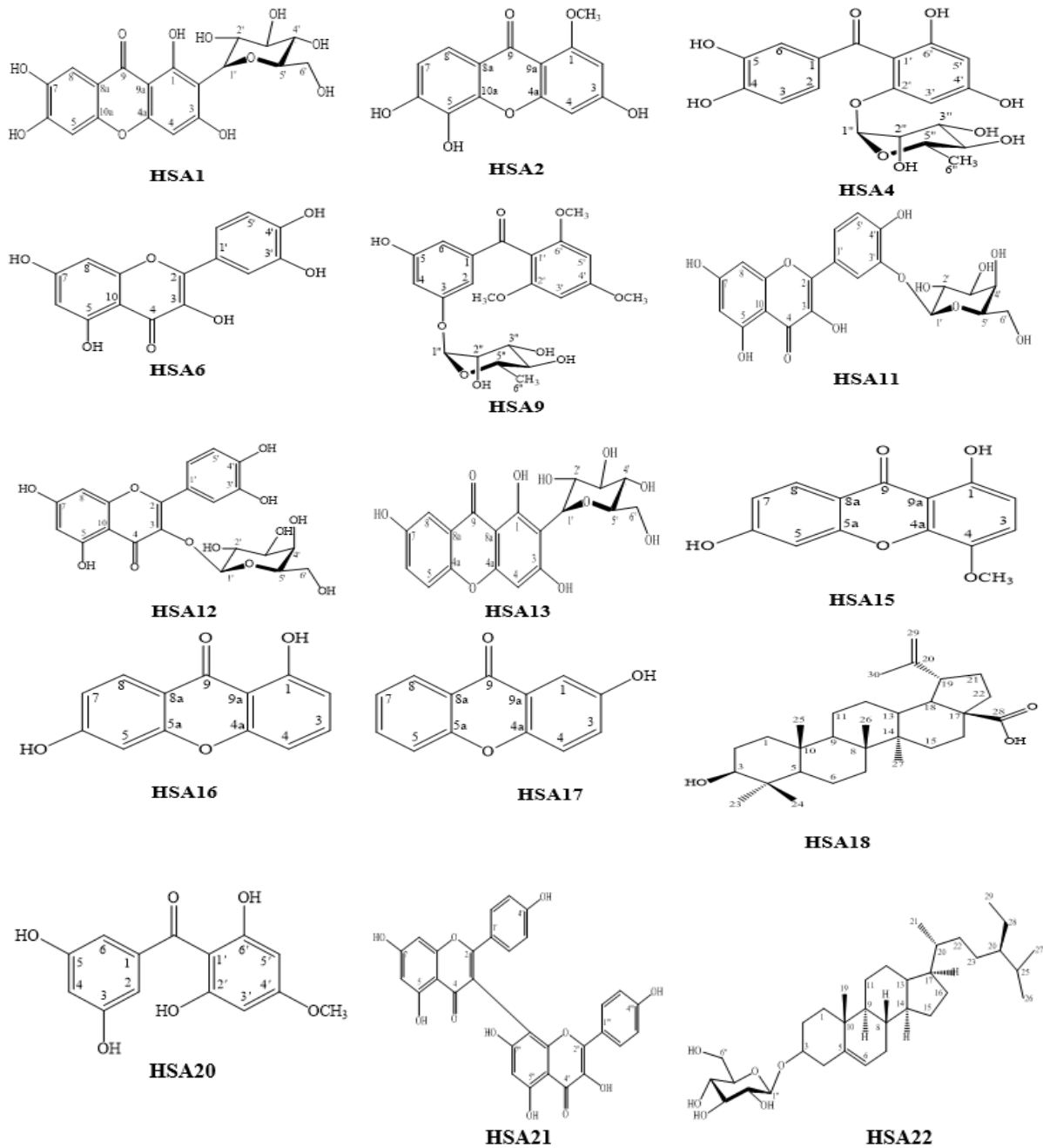
Hợp chất **HSA17** (2-hydroxyxanthon): là một hợp chất xanthon phổ biến và đã được phân lập từ rất nhiều loài thực vật khác nhau như *Calophyllum inophyllum*, *Calophyllum teysmannii*, *Ochrocarpos odoratus*, *Garcinia schomburgkiana*, *Mammea americana* [131], [132]. Hợp chất này cũng đã được phân lập từ một số loài thuộc chi *Hypericum* như *Hypericum nysorense*, *Hypericum roeperanum*, *Hypericum laricifolium* [133], [134]. Ngoài ra, Xiao và cộng sự đã công bố phân lập được hợp chất này từ loài ban lá dính [135].

Hợp chất **HSA18** (acid betulinic): là một saponin triterpenoid năm vòng được phân lập lần đầu tiên từ loài *Betula pubescens* năm 1995 [136]. Ngoài ra, hợp chất này còn được phân lập từ nhiều loài cây khác nhau bằng phương pháp chiết với methanol như *Quisqualis fructus*, *Orthosiphon stamineus*... Và cũng được phân lập từ các loài *Tovomita krukovii*, *Ipomoea pes-caprae*... bằng phương pháp chiết với ethanol [137], [138]. Acid betulinic cũng được phân lập từ loài ban lá dính và nhiều loài khác nhau thuộc chi *Hypericum* như *Hypericum wightianum*, *Hypericum lanceolatum*, *Hypericum hircinum*, *Hypericum roeperianum* [139], [140].

Hợp chất **HSA20** (3,5-dihydroxy-2',4',6'-trimethoxybenzophenon): là một hợp chất benzophenol và đã được phân lập từ loài ban lá dính.

Hợp chất **HSA21** (I3-II8-biapigenin): là biflavon dồi dào nhất trong loài *Hypericum perforatum*. Ngoài ra, chất này cũng được tìm thấy ở loài *Hypericum richeri* [141], [142].

Hợp chất **HSA22** (daucosterol): là một steroid saponin đã được phân lập từ nhiều loài thực vật khác nhau như *Panax japonicus*, *Panax notoginseng*, *Choerospondias axillaris*, *Breynia fruticosa* [143], [144]. Chất này cũng đã được phân lập và công bố từ các loài *Hypericum stellatum*, *Hypericum wightianum*, *Hypericum riparium* thuộc chi *Hypericum* [145], [146].



Hình 4.1. Cấu trúc hóa học của 15 hợp chất phân lập từ phần trên mặt đất cây ban lá dĩnh

4.3. Về đánh giá độc tính cấp của cao chiết BLD1

Theo hướng dẫn của Tổ chức y tế thế giới (WHO) về thuốc có nguồn gốc dược liệu, các thuốc có nguồn gốc từ dược liệu phải đánh giá độc tính cấp trên động vật trước khi đưa vào thử nghiệm trên người. Cao chiết BLD1 là chế phẩm được bào chế từ phần trên mặt đất cây ban lá dính, với định hướng phát triển thành sản phẩm dùng cho người nên việc nghiên cứu độc tính cấp trên động vật thực nghiệm là cần thiết. Việc đánh giá độc tính cấp là thông tin đầu tiên thể hiện tính an toàn của cao chiết BLD1 và là cơ sở để chọn liều thử tác dụng cho các bước nghiên cứu tiếp theo [147]. Kết quả thử nghiệm độc tính cấp của cao chiết BLD1 cho thấy, liều tối đa có thể cho chuột uống là 225 g/kg thể trọng. Tương ứng với liều sử dụng trên người là 18,75 g/kg, nếu người nặng 60 kg thì tương đương 1125 g cao chiết BLD1. Ở liều này thuốc rất đậm đặc, vừa đủ để có thể bơm thuốc qua kim đầu tù vào dạ dày chuột. Sau 72 giờ uống thuốc với liều từ 90 g/kg đến 225 g/kg chuột vẫn bình thường, không thấy có biểu hiện ngộ độc ở chuột và không có chuột nào chết. Vì vậy, chưa xác định được LD₅₀ của cao chiết BLD1 trên chuột nhắt trắng bằng đường uống theo phương pháp Litchfield - Wilcoxon. Đây là phương pháp kinh điển được sử dụng để thử độc tính cấp của thuốc [148]. Từ đó có thể khẳng định sản phẩm cao chiết BLD1 không gây độc với liều tối đa 225 g/kg chuột.

Dân gian thường sử dụng phần trên mặt đất cây ban lá dính, tuy nhiên phần rễ của cây cũng được dùng tương đối phổ biến chữa bệnh ngoài da hoặc kết hợp với các loài thực vật khác dùng để chữa trị liên quan đến chảy máu, kinh nguyệt không đều. Liều dùng dân gian sử dụng khoảng từ 15 - 20 g dược liệu khô/ người 50 kg, tức 0,3 - 0,4 g dược liệu khô/kg. Với hệ số quy đổi liều từ người sang chuột nhắt là 12, tính được liều có tác dụng trên chuột nhắt là $0,4 \times 12 = 4,8$ g/kg. Một chất được xem là có khoảng an toàn điều trị tốt khi LD₅₀ lớn hơn 10 lần so với liều có tác dụng (liều điều trị). Cao chiết BLD1 đã cho chuột uống với liều 225 g dược liệu khô/kg, tức gấp $225/4,8 = 46,87$ lần so với liều có tác dụng mà vẫn chưa

gây ra độc tính cấp trên chuột nhắt theo đường uống. Các kết quả này chứng tỏ cao chiết phần trên mặt đất cây ban lá dính có tính an toàn khi thử độc cấp tính theo đường uống trên chuột nhắt trắng.

4.4. Về đánh giá một số tác dụng sinh học của cao chiết BLD1 và một số chất tinh khiết phân lập được

4.4.1. Về hoạt tính chống oxy hóa *in vitro* của cao chiết BLD1 và một số chất tinh khiết phân lập được

Các tác nhân gây viêm làm tổn thương mô từ đó giải phóng ra hàng loạt các chất ảnh hưởng tiêu cực lên tế bào và mô, trong các chất đó phải kể đến các gốc tự do một tên gọi khác của các chất oxy hóa. Gốc tự do là các phân tử không ổn định vì chúng có chứa một electron chưa ghép cặp. Khi một phân tử gốc tự do tiếp xúc với các electron của một phân tử ổn định, phân tử gốc tự do sẽ tăng hoặc mất các điện tử để đạt được cấu hình electron ghép cặp ổn định. Tuy nhiên, trong quá trình này, sự cân bằng điện tử của phân tử ổn định bị xáo trộn và phân tử ổn định trở thành một phân tử gốc tự do. Các gốc tự do bắt đầu một phản ứng dây chuyền của sự phá hủy. Các gốc tự do có thể làm hỏng DNA, protein và chất béo. Tổn thương do các gốc tự do gây ra là cơ sở sinh bệnh học của những trạng thái bệnh thường gặp như bệnh tim mạch, bệnh tiểu đường, bệnh ung thư, rối loạn chức năng miễn dịch [149]. Việc thu dọn các gốc tự do hay chống lại sự oxy hóa là một trong các những mục tiêu hướng đến của nhiều loại thuốc. Vì vậy, các sản phẩm nguồn gốc tự nhiên có hoạt tính chống oxy hóa từ lâu đã được sử dụng như là một phương thuốc dân gian dùng để điều trị các triệu chứng viêm, cũng như bảo vệ sự toàn vẹn của tế bào, ngăn ngừa được một số tai biến, làm chậm quá trình lão hoá cơ thể, bảo vệ chức năng gan, hạn chế các tác nhân gây viêm, bảo vệ chức năng của hệ thần kinh, giảm thiểu các tác nhân gây ung thư, ... Thành phần của những sản phẩm này thường chứa một số hợp chất chính như flavonoid, phenolic, carotenoid và hợp chất có lưu huỳnh [150].

Trên thế giới có nhiều phương pháp nghiên cứu *in vitro* để đánh giá hoạt

tính chống oxy hóa như khả năng dọn gốc tự do (DPPH), khả năng hấp thụ gốc tự do oxy (ORAC), khả năng chống oxy hóa tương đương với Trolox (TEAC), khả năng chống oxy hóa do khử sắt (FRAP), khả năng oxy hóa bằng cách bẫy các gốc tự do (TRAP), phương pháp sắt thiocyanat (FTC), phương pháp Thiobarbituric acid (TBA), ... Trong đó phương pháp DPPH là một phương pháp kinh điển được ứng dụng nhiều để đánh giá hoạt tính chống oxy hóa của một hợp chất, một chất hoặc các chất có nguồn sinh học khác [151].

Luận án đã áp dụng phương pháp thu dọn gốc tự do DPPH để đánh giá hoạt tính chống oxy hóa của cao chiết BLD1 và các chất tinh khiết HSA1, HSA2, HSA4, HSA9, HSA13, HSA15, HSA16, HSA17, HSA20 phân lập được từ phần trên mặt đất cây ban lá dính. Nguyên tắc của phương pháp này dựa trên việc đo lường khả năng loại bỏ chất chống oxy hóa. Điện tử lẻ của nguyên tử nitơ trong DPPH bị khử khi nhận một nguyên tử hydro từ chất chống oxy hóa thành hydrazin tương ứng. Việc xác định hoạt tính chống oxy hóa bằng phương pháp DPPH đã được tiến hành với nhiều hợp chất được chiết xuất từ các loài trong chi *Hypericum* như isogarcinol chiết xuất từ *Hypericum lanceolatum*; 1,3,6,7-THX từ các loài *Hypericum perforatum* và *Hypericum tetrapterum* và dịch chiết từ các loài *Hypericum thymbrifolium*, *Hypericum spectabile* và *Hypericum pseudolaeve* [152], [153], [154].

Kết quả cho thấy, hai hợp chất HSA1 (mangiferin) và HSA2 (3,5,6-trihydroxy-1-methoxyxanthon) cùng với cao chiết Ban lá dính có hoạt tính chống oxy hóa quét gốc tự do DPPH tốt hơn so với các hợp chất khác trong nghiên cứu. Trong đó, hợp chất HSA1 có hoạt tính chống oxy hóa tốt nhất với $IC_{50} = 35,48 \pm 1,23 \mu\text{M}$ phù hợp với công bố của các nghiên cứu trước đây. Còn hợp chất HSA2 và cao chiết BLD1 cho hoạt tính chống oxy hóa thấp hơn tương ứng với giá trị ($IC_{50} = 87,10 \pm 2,16 \mu\text{M}$ và $IC_{50} = 93,33 \pm 1,78 \mu\text{g/ml}$). Theo các tài liệu thu thập được thì đây là lần đầu tiên hoạt tính chống oxy hóa của hợp chất HSA2 được công bố [108], [153].

4.4.2. Về hoạt tính chống viêm in vitro của cao chiết BLD1 và một số chất tinh khiết phân lập được

Viêm là một phản ứng bảo vệ cơ thể của hệ miễn dịch để chống lại sự tấn công của những tác nhân bên ngoài như nhiệt độ, virus, vi khuẩn, ký sinh trùng, chấn thương, chất hóa học ... hoặc những tác nhân bên trong như thiếu oxy tại chỗ, hoại tử mô, bệnh tự miễn, xuất huyết ... Tại ổ viêm có biến đổi bất thường sẽ gây rối loạn tuần hoàn, rối loạn chuyển hóa, tổn thương mô, tăng sinh tế bào trong cơ thể. Có nhiều cách phân loại viêm theo nguyên nhân (viêm nhiễm khuẩn và viêm vô khuẩn), theo tính chất (viêm đặc hiệu và viêm không đặc hiệu), theo vị trí (viêm nông và viêm sâu) và theo diễn biến (viêm cấp tính và viêm mạn tính). Khi bị viêm thường có 4 triệu chứng chính là nóng, đỏ, sưng, đau, kèm theo các rối loạn chức năng của cơ quan bị viêm. Các tác nhân gây viêm làm tổn thương tổ chức từ đó giải phóng ra các chất trung gian hóa học như bradykinin, prostaglandin, histamin, protease, leucotrien, các interleukin, TNF, các gốc tự do và đặc biệt là NO. Cơ chế chống viêm của các thuốc thường thông qua quá trình làm giảm giải phóng các chất trung gian hóa học hoặc dọn gốc tự do [156].

NO đóng vai trò quan trọng trong cơ chế bệnh sinh của viêm, được tạo ra với số lượng lớn bởi enzym tổng hợp NO (iNOS). NO chịu trách nhiệm với sự giãn mạch máu và tăng huyết áp được biểu hiện trong sốc nhiễm khuẩn và quá trình viêm. Sự sản sinh NO làm thay đổi hoạt tính gây ức chế sinh trưởng tế bào và gây độc trên các đại thực bào nhằm chống lại các vi khuẩn và các tế bào ung thư. NO là nhân tố trung gian tiền viêm (pro-inflammatory) là một phân tử tín hiệu đóng một vai trò quan trọng trong quá trình sinh bệnh của viêm. NO liên quan đến đáp ứng miễn dịch bởi các đại thực bào kích hoạt cytokin. Nó mang lại hiệu quả chống viêm trong điều kiện sinh lý bình thường. Tuy nhiên, NO ở nồng độ cao gây ra chứng viêm quá mức trong các tình huống bất thường. NO còn tác động vào quá trình sinh bệnh viêm khớp, viêm ruột và viêm phổi. Do đó, ức chế

NO là sự tiến bộ quan trọng trong việc điều trị các bệnh viêm. Những tác động không mong muốn của NO là khiếm khuyết của quá trình sinh ra nó, bao gồm gây co mạch, viêm và tổn thương mô [157], [158].

Luận án tiến hành đánh giá hoạt tính chống viêm in vitro của cao chiết BLD1 và các chất tinh khiết HSA4, HSA9, HSA20 phân lập được từ phần trên mặt đất cây ban lá dính theo phương pháp xác định khả năng ức chế sản sinh NO của đại thực bào RAW264.7. Kết quả cho thấy ba hợp chất HSA4, HSA9 và HSA20 đều có tác dụng ức chế sự sản sinh NO tốt, trong đó hợp chất HSA4 có hoạt tính ức chế sản sinh NO tốt nhất với giá trị IC_{50} là $2,00 \pm 0,34$ và giá trị này gần tương đương với chất đối chứng dương. Trong nghiên cứu về hoạt tính sinh học của một số hợp chất chiết xuất từ cây ban lá dính của Xin và cộng sự cho thấy có sự ức chế mạnh mẽ sự sản sinh NO do LPS gây ra trong đại thực bào RAW 264,7 với giá trị IC_{50} tương ứng là 27,3 và 29,3 μM [159]. Kết quả nghiên cứu của Huang và cộng sự tìm hiểu về cơ chế chống viêm của các hợp chất benzophenol và benzoylphloroglucinol trong cây ban lá dính cho thấy các hợp chất *hypericumone A*, *sampsonione J* và *otogirinin A* thể hiện sự ức chế mạnh mẽ (giá trị $IC_{50} \leq 40,32 \mu M$) chống lại sự tạo ra NO do LPS gây ra. *Otogirinin A* có hiệu quả nhất trong số các hợp chất được phân lập, với giá trị IC_{50} là $32,87 \pm 1,60 \mu M$, chống lại sự tạo NO do LPS gây ra. Kết quả này đã chứng minh rằng *otogirinin A* ngăn chặn sự biểu hiện iNOS do LPS gây ra và sự tạo NO và TNF- α thông qua việc ngăn chặn sự phosphoryl hóa MAPK / JNK và sự phân hủy của I κ B α , trong khi nó không ảnh hưởng đến sự phosphoryl hóa MAPKs / ERK và p38. Ngoài ra, *otogirinin A* còn được chứng minh kích thích kiểu hình M2 chống viêm bằng cách nâng cao sự biểu hiện của arginase 1 và KLF4 [160].

4.4.3. Về hoạt tính ức chế enzyme acetylcholinesterase in vitro của cao chiết BLD1 và một số chất tinh khiết phân lập được

Acetylcholin là một chất dẫn truyền thần kinh quan trọng hoạt động trong cả hệ thống thần kinh trung ương và hệ thống thần kinh ngoại vi. Trong não,

acetylcholin hoạt động như một chất dẫn truyền và điều hòa thần kinh. Bộ não chứa một số vùng cholinergic, mỗi vùng có chức năng riêng biệt, chẳng hạn như đóng một vai trò quan trọng trong việc khơi dậy, chú ý, trí nhớ và động lực. Acetylcholin cũng có vai trò tại điểm nối thần kinh cơ, là chất hóa học mà các tế bào thần kinh vận động của hệ thần kinh giải phóng để kích hoạt cơ bắp. Tính chất này có nghĩa là các loại thuốc ảnh hưởng đến hệ thống cholinergic có thể gây ra các tác dụng rất nguy hiểm, từ tê liệt đến co giật [161].

Acetylcholinesterase là một enzym quan trọng trong hệ thần kinh của con người và động vật. Bằng cách thủy phân nhanh chóng và bất hoạt acetylcholin, acetylcholinesterase chấm dứt sự dẫn truyền thần kinh tại các khớp thần kinh. Acetylcholinesterase là một loại enzym hoạt động rất nhanh, đặc biệt là đối với một serine hydrolase, hoạt động với tốc độ gần với tốc độ của phản ứng có kiểm soát khuếch tán. Việc ức chế acetylcholinesterase có thể làm tăng cả mức độ và thời gian hoạt động của chất dẫn truyền thần kinh acetylcholine trong hệ thần kinh trung ương, hạch tự chủ và các điểm nối thần kinh cơ, vốn giàu thụ thể acetylcholin. Đến nay, đã có 3 loại thuốc quan trọng là donepezil, galantamin và rivastigmin sản xuất dựa trên việc ức chế acetylcholinesterase đã được FDA chấp thuận để quản lý bệnh Alzheimer. Như vậy, có thể thấy việc tìm ra hợp chất có thể ức chế acetylcholinesterase sẽ là một tín hiệu tốt cho việc điều trị các bệnh thần kinh [162].

Kết quả nghiên cứu cho thấy, hợp chất HSA15 (cratoxyarborenon F) có hoạt tính ức chế enzym acetylcholinesterase ở 2 nồng độ thử nghiệm cao hơn so với các hợp chất khác trong nghiên cứu. Tuy nhiên, cao chiết BLD1 còn thể hiện hoạt tính ức chế enzym acetylcholinesterase tốt hơn với giá trị ($IC_{50} = 19,95 \pm 1,09 \mu\text{g/ml}$) so với hợp chất HSA15 ($IC_{50} = 26,30 \pm 1,31 \mu\text{g/ml}$). Theo các tài liệu thu thập được, cratoxyarborenon F là hợp chất lần đầu được phân lập từ cây ban lá dính và đây cũng là lần đầu cratoxyarborenon F được công bố với khả năng ức chế enzym acetylcholinesterase.

4.4.4. Về tác dụng chống oxy hóa bảo vệ gan in vivo của cao chiết BLD1

Nghiên cứu tác dụng bảo vệ gan trên thực nghiệm là đánh giá khả năng hạn chế sự tổn thương gan của thuốc khi gan bị các tác nhân có hại như thuốc, hóa chất, rượu... tấn công với sự có mặt của thuốc từ trước đó. Đánh giá mức độ tổn thương trong viêm gan có 2 chỉ số sinh hóa quan trọng nhất hay được sử dụng là hoạt độ enzym AST và ALT. Đây là những enzym có ở mọi mô, nhưng có nhiều nhất là ở gan và ở tim. Khi có tổn thương tế bào gan, các enzym này sẽ thoát vào máu làm tăng nồng độ enzym trong huyết thanh. Một thuốc được coi là có tác dụng bảo vệ gan nếu làm giảm tổn thương tế bào gan dẫn đến giảm hoạt độ enzym AST, ALT, cải thiện tổn thương gan.

Tác dụng chống oxy hóa bảo vệ gan in vivo của cao chiết BLD1 được đánh giá trên mô hình gây tổn thương gan bằng paracetamol. Có nhiều loại thuốc hoặc hóa chất được sử dụng gây tổn thương gan trong các nghiên cứu của các nhà khoa học trên thế giới và Việt Nam như paracetamol, CCl₄, D-galactosamin... Các mô hình này đều được chứng minh rõ ràng về cơ chế gây tổn thương gan. Mức độ tăng hoạt độ các enzym AST, ALT thường rất cao, có thể tăng từ 7 - 12 lần so với lô chứng sinh học. Tuy nhiên trong nghiên cứu của luận án với mục đích thêm tác dụng chống oxy hóa của chế phẩm nên lựa chọn paracetamol là thuốc hạ sốt giảm đau được chuyển hóa qua CYP2E1 (một isoenzym của cytochrom P450) tạo ra gốc tự do NAPQI (N-acetyl-benzoquinonimin) là gốc tự do gây peroxy hóa lipid, gây tổn thương màng tế bào, tạo ra nhiều malonyl dialdehyd (MDA) và làm giải phóng nhiều enzym AST, ALT vào máu. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng chứng dương là silymarin để so sánh tác dụng. Silymarin là một chất được chiết xuất từ cây cúc gai đen có tác dụng bảo vệ gan với cơ chế tác dụng đã được chứng minh rõ ràng. Qua thu thập các tài liệu và nhiều nghiên cứu thăm dò thì silymarin liều 140 mg/kg mới có tác dụng rõ rệt.

Kết quả nghiên cứu cho thấy, chuột được uống cao chiết BLD1 liều 3,6 g/kg và liều 10,8 g/kg thể trọng liên tục trong 10 ngày liên tục trước khi gây độc

đã hạn chế hoạt độ AST, ALT một cách rõ rệt, có ý nghĩa thống kê ($p < 0,001$) và có tác dụng bảo vệ tế bào gan cao hơn silymarin liều 140 mg/kg (bảng 3.25 và 3.26). Để đánh giá tác dụng bảo vệ gan, ngoài việc xác định hoạt độ các enzym ALT, AST, luận án còn tiến hành xác định các chỉ tiêu khác như chỉ số gan, hình ảnh vi thể, hình ảnh đại thể. Kết quả cho thấy ở các lô gây độc có dùng thuốc silymarin và cao chiết BLD1 liều 3,6 g/kg thể trọng đều giảm, sự khác biệt so với lô chứng sinh học có ý nghĩa thống kê với $p < 0,001$ và tương đương với lô dùng silymarin liều 140 mg/kg (bảng 3.24). Mặt khác hình ảnh đại thể và vi thể gan không có sự khác biệt so với hình ảnh vi thể gan chuột ở lô chứng sinh học.

Ngoài ra, để góp phần làm sáng tỏ cơ chế bảo vệ tổn thương gan cấp do paracetamol của cao chiết BLD1 luận án đã xác định nồng độ MDA trong dịch đồng thể gan. Kết quả nghiên cứu cho thấy hàm lượng MDA gan chuột ở các lô gây độc bằng paracetamol có dùng thuốc silymarin, cao chiết BLD1 ở 2 mức liều 3,6 g/kg và 10,8 g/kg thể trọng đều giảm so với lô mô hình, tuy nhiên sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$) do đó cần phải nghiên cứu tiếp để làm rõ cơ chế bảo vệ tổn thương gan cấp (bảng 3.27).

Như vậy, cao chiết BLD1 có tác dụng chống oxy hóa bảo vệ gan trên mô hình gây tổn thương gan chuột bằng paracetamol. Kết quả nghiên cứu này phù hợp với các nghiên cứu khác về hoạt tính chống oxy hóa bảo vệ gan của các loài thuộc chi *Hypericum*. Kết quả nghiên cứu của Hariharapura và cộng sự về hoạt tính chống oxy hóa và bảo vệ gan của loài *Hypericum mysorense* cho thấy chiết xuất của loài này có hoạt tính chống oxy hóa mạnh và khi thử nghiệm chiết xuất này trong *in vivo* đã không gây ra bất kỳ độc tính nào trên mô hình bệnh học gan [163]. Tác dụng chống oxy hóa và bảo vệ gan cũng đã được công bố ở loài *Hypericum perforatum* bởi Bayramoglu và cộng sự. Kết quả cho thấy, khi chuột được tiêm ở liều 50 mg/kg thể trọng dịch chiết *Hypericum perforatum* đã dẫn đến sự giảm đáng kể các hoạt động ALT, AST, LDH và mức MDA so với nhóm đối chứng [164].

4.4.5. Về tác dụng cải thiện trí nhớ *in vivo* của cao chiết BLD1

Sa sút trí nhớ và bệnh Alzheimer là căn bệnh phổ biến ở người cao tuổi nhưng cũng có ghi nhận số ca mắc ở độ tuổi dưới 60. Bệnh gây ảnh hưởng nghiêm trọng đến chất lượng cuộc sống của cả người bệnh và gia đình, dẫn đến tử vong ở giai đoạn nặng. Tuy nhiên, các thuốc điều trị sa sút trí nhớ hiện nay còn hạn chế về số lượng với 6 thuốc được chấp nhận trong điều trị sa sút trí nhớ thuộc hai nhóm: nhóm ức chế enzym acetylcholinesterase và nhóm đối kháng thụ thể NMDA. Bản thân các thuốc này còn có nhiều nhược điểm như thời gian bán thải ngắn, tác dụng làm giảm triệu chứng nhưng không ngăn chặn hoặc làm chậm được diễn tiến bệnh, cùng các tác dụng phụ không mong muốn khi dùng thuốc. Trước những hạn chế trên, việc nghiên cứu phát triển thuốc mới là vô cùng cần thiết. Trong đó, việc tìm kiếm thuốc mới từ các hợp chất tự nhiên là một hướng đi có tính khả thi cao.

Trên thế giới, đã có một số nghiên cứu tác dụng tăng cường trí nhớ của một số loài thuộc chi *Hypericum*. Như nghiên cứu năm 2010 của Trofimiuk và cộng sự về tác dụng của chi *Hypericum* lên nhận thức của chuột đã cho thấy loài *Hypericum perforatum* cải thiện đáng kể xử lý thông tin về không gian ở chuột già (mô hình mê cung nước Morris, thử nghiệm khu vực mở và mô hình mê lộ chữ thập) [165]. Hiện nay có rất ít các nghiên cứu về cây ban lá dính ở Việt Nam. Vì vậy trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng cao chiết BLD1 từ cây ban lá dính để đánh giá tác dụng cải thiện trí nhớ trên mô hình gây sa sút trí nhớ ở chuột nhắt trắng bằng scopolamin. Scopolamin là một chất đối kháng với chất dẫn truyền thần kinh acetylcholin, gây giảm trí nhớ và nhận thức ở chuột. Luận án sử dụng mô hình gây sa sút trí nhớ bằng scopolamin không đòi hỏi khắt khe về điều kiện vật chất và kỹ thuật, đồng thời có độ lặp lại và tỷ lệ sống sót cao nên được lựa chọn để thực hiện thử nghiệm. Chuột được tiêm scopolamin liều 1 mg/kg ở thử nghiệm mê cung nước Morris, mê cung nhiều chữ T và mô hình trục quay Rotarod. Trong thời gian tiến hành thử nghiệm đánh giá trí nhớ và khả năng nhận

thức của chuột, các yếu tố như ánh sáng, nhiệt độ, tiếng ồn,... được kiểm soát để đảm bảo không gây ảnh hưởng đến kết quả thực nghiệm.

- Về mô hình mê cung nước Morris

Mô hình mê cung nước Morris được áp dụng để đánh giá khả năng học tập và trí nhớ không gian dài hạn của loài gặm nhấm. Thử nghiệm dựa vào bản năng sinh tồn của động vật sống trên cạn, khi đưa vào nước, chúng sẽ cố gắng bơi và tìm cách trốn thoát khỏi môi trường xa lạ. Mô hình thử nghiệm cho phép động vật thử nghiệm tự do lựa chọn hướng di chuyển. Do đó, thử nghiệm hạn chế được những sai số không cần thiết. Kết quả nghiên cứu cho thấy, cao chiết BLD1 ở cả 2 mức liều 3,6 g/kg và 10,8 g/kg thể trọng uống trong 6 ngày liên tục có hiệu quả cải thiện khả năng học hỏi và trí nhớ của chuột. Ở giai đoạn học hỏi đã làm giảm thời gian tìm thấy bến đỗ. Còn ở giai đoạn chính thức đã làm tăng % thời gian chuột bơi trong 1/4 bể trước đó đặt bến đỗ đồng thời với giảm % quãng đường chuột bơi trong 3/4 bể trước đó không đặt bến đỗ. Mức cải thiện có ý nghĩa thống kê được quan sát thấy ở lô uống cao chiết BLD1 liều 10,8 g/kg thể trọng.

- Về mô hình mê cung chữ T

Kết quả cho thấy cao chiết BLD1 ở cả hai mức liều uống trong 8 ngày liên tục đều thể hiện xu hướng cải thiện khả năng học hỏi và trí nhớ trên chuột nhắt trắng bị gây suy giảm trí nhớ bằng Scopolamin, thông qua tác dụng rút ngắn thời gian và quãng đường tìm thấy khoang đích khi so với lô mô hình.

- Về mô hình trục quay Rotarod

Phương pháp Rotarod là mô hình được sử dụng để đánh giá nhiều chức năng khác nhau trên động vật gặm nhấm như: an thần, cơ lực, trí nhớ. Với mục đích đánh giá trí nhớ thì thiết kế nghiên cứu sẽ được chia thành 2 giai đoạn: học hỏi và đánh giá chính thức. Chuột nào có trí nhớ tốt hơn thì thời gian chuột ở lại trên trục quay ở giai đoạn đánh giá chính thức sẽ lâu hơn. Phương pháp Rotarod đã được sử dụng để nghiên cứu tác dụng trên trí nhớ của nhiều tác giả trong nước cũng như trên thế giới. Kết quả cho thấy, cao chiết BLD1 liều 10,8 g/kg uống

trong 7 ngày liên tục thể hiện tác dụng cải thiện khả năng học hỏi và trí nhớ trên chuột nhắt trắng bị gây suy giảm trí nhớ bằng Scopolamin, thông qua hiệu quả kéo dài thời gian chuột ở lại trên trục quay.

KẾT LUẬN

1. Về thực vật

- Đã mô tả chi tiết có đầy đủ ảnh chụp kèm theo về đặc điểm hình thái thực vật, đối chiếu với khóa phân loại giám định được tên khoa học của cây ban lá dính thu hái ở xã Hà Vị, huyện Bạch Thông, tỉnh Bắc Kạn là *Hypericum sampsonii* Hance., thuộc họ Ban (Hypericaceae).

- Đã xác định được các đặc điểm vi phẫu và đặc điểm bột dược liệu góp phần tiêu chuẩn hóa dược liệu.

2. Về thành phần hóa học

- Đã định tính xác định có 6 nhóm chất chính gồm flavonoid, saponin, đường khử, tanin, polysaccharide, chất béo.

- Đã chiết xuất, phân lập và xác định cấu trúc hóa học 15 hợp chất từ phần trên mặt đất cây ban lá dính (*Hypericum sampsonii* Hance.) gồm 4 hợp chất flavonoid, 2 hợp chất saponin, 6 hợp chất dạng xanthon và 3 hợp chất dạng benzophenol. Trong đó có:

+ 5 hợp chất lần đầu tiên được phân lập từ phần trên mặt đất cây ban lá dính: 3,5,6-trihydroxy-1-methoxyxanthon (**HSA2**), petiolin F (**HSA4**), quecertin-3'-*O*- β -*D*-galactopyranosid (**HSA11**), quecertin-3'-*O*- β -*D*-galactopyranosid (**HSA12**), cratoxyarborenol F (**HSA15**).

+ 10 hợp chất đã công bố được phân lập từ phần trên mặt đất cây ban lá dính: mangiferin (**HSA1**), quecertin (**HSA6**), 3,5-dihydroxy-2',4',6'-trimethoxybenzophenon-3'-*O*- α -*L*-rhamnopyranosid (**HSA9**), neolancerin (**HSA13**), euxanthon (**HSA16**), 2-hydroxyxanthon (**HSA17**), acid betulinic (**HSA18**), 3,5-dihydroxy-2',4',6'-trimethoxybenzophenon (**HSA20**), I3-II8-biapigenin (**HSA21**), Daucosterol (**HSA22**).

3. Về độc tính cấp và tác dụng sinh học

- Cao chiết phần trên mặt đất cây ban lá dính (cao chiết BLD1) cho chuột

uống tối đa 225 g/kg thể trọng không quan sát thấy hiện tượng ngộ độc và không có chuột nào chết sau 72 giờ theo dõi. Chưa xác định được LD₅₀ theo đường uống trên chuột nhắt trắng.

- Hợp chất mangiferin (HSA1) phân lập được có hoạt tính chống oxy hóa tốt nhất với IC₅₀ = 35,48 ± 1,23 μM. Còn hợp chất 3,5,6-trihydroxy-1-methoxyxanthon (HSA2) phân lập được và cao chiết phần trên mặt đất cây ban lá dính (cao chiết BLD1) có hoạt tính chống oxy hóa thấp tương ứng với giá trị (IC₅₀ = 87,10 ± 2,16 μM và IC₅₀ = 93,33 ± 1,78 μg/ml).

- Ba hợp chất phân lập được có tác dụng ức chế sự sản sinh NO là petiolin F (HSA4); 3,5-dihydroxy-2',4',6'-trimethoxybenzophenol-3-*O*-α-L-rhamnopyranosid (HSA9) và 3,5-dihydroxy-2',4',6'-trimethoxybenzophenol (HSA20) trong đó hợp chất HSA4 có hoạt tính ức chế sản sinh NO tốt nhất với giá trị IC₅₀ là 2,00 ± 0,34 μM, gần tương đương với chất đối chứng dương (cardamonin).

- Cao chiết phần trên mặt đất cây ban lá dính (cao chiết BLD1) có hoạt tính ức chế enzyme acetylcholinesterase mạnh hơn so với hợp chất cratoxyarborenol F (HSA15) với giá trị IC₅₀ là 19,95 ± 1,09 μg/ml.

- Cao chiết phần trên mặt đất cây ban lá dính (cao chiết BLD1) với các mức liều 3,6 g và 10,8 g/kg thể trọng chuột có tác dụng bảo vệ gan như làm giảm AST, ALT, giảm trọng lượng tương đối của gan, giảm tổn thương mô bệnh gan so với lô chứng gây độc.

- Cao chiết phần trên mặt đất cây ban lá dính (cao chiết BLD1) ở mức liều 10,8 g/kg thể trọng chuột dùng liên tiếp trong 8 ngày có tác dụng cải thiện khả năng học hỏi và trí nhớ trên chuột nhắt trắng bị gây suy giảm trí nhớ bằng scopolamin.

KIẾN NGHỊ

- Tiếp tục nghiên cứu chứng minh một số tác dụng liên quan đến tim mạch, giải độc chống viêm đang được sử dụng theo kinh nghiệm cổ truyền của cây ban lá dính.

- Nghiên cứu trồng trọt cây ban lá dính để phát triển nguồn nguyên liệu có chất lượng, ổn định, cung cấp nguyên liệu cho nghiên cứu phát triển sản phẩm liên quan đến sức khỏe.

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

- 1. Nguyễn Việt Dũng**, Nguyễn Duy Thuần, Phương Thiện Thương, Trần Thị Lan (2017). Nghiên cứu đặc điểm thực vật của cây Ban lá dính (*Hypericum sampsonii* Hance.), *Tạp chí Y Dược cổ truyền Việt Nam*, 12, 4-8.
- 2. Nguyễn Việt Dũng**, Nguyễn Duy Thuần, Phạm Thị Vân Anh, Lê Cảnh Việt Cường, Hà Xuân Anh, Lê Thị Liên, Hoàng Lê Tuấn Anh, Nguyễn Phan Hằng (2018). Các hợp chất flavonoid từ phần trên mặt đất loài Ban lá dính (*Hypericum sampsonii* Hance.), *Tạp chí Dược học*, 503(3), 67-70.
- 3. Nguyễn Việt Dũng**, Nguyễn Duy Thuần, Phạm Thị Vân Anh, Lê Cảnh Việt Cường, Lê Thị Liên, Hoàng Lê Tuấn Anh (2018). Ba hợp chất được phân lập từ phân đoạn Dichloromethan từ phần trên mặt đất loài Ban lá dính (*Hypericum sampsonii* Hance.), *Tạp chí Dược học*, 506(6), 45-50.
- 4. Dung Nguyen Viet**, Vinh Le Ba, Thuan Nguyen Duy, Van Anh Pham Thi, Han Tran Thi, Viet Cuong Le Canh, Giang Bach Long, Young Ho Kim & Hoang Le Tuan Anh (2019). Bioactive compounds from the aerial parts of *Hypericum sampsonii*. *Natural Product Research*: p. 1-3.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Phạm Hoàng Hộ (1999). *Cây cỏ Việt Nam. Quyển 1: Từ khuyết thực vật, lãa tử, hoa cánh rời đến họ đậu*, Nhà Xuất bản Trẻ, Hà Nội.
2. Đỗ Huy Bích và cộng sự (2006). *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam - Tập 1*, Nhà xuất bản khoa học và kỹ thuật, Hà Nội.
3. Christenhusz M.J.M and Byng J.W (2016). The number of known plants species in the world and its annual increase. *Phytotaxa*, 261(3), 201-217.
4. Kimura Y (1951). Hypericaceae. *Nova Flora Japonica*, 1-273.
5. Robson N.K.B (1987). Studies in the genus *Hypericum* L. (Guttiferae): 7. Section 29. Brathys (part 1). *Bull. Brit. Mus. (Nat. Hist.) Bot.*, 16, 1-106.
6. Robson N.K.B (1990). Studies in the genus *Hypericum* L. (Guttiferae): 8. Sections 29. Brathys (part 2) and 30. Trigynobrathys. *Bull. Brit. Mus. (Nat. Hist.) Bot.*, 20, 1-151.
7. The Angiosperm Phylogeny Group (2009). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Bot. J. Linn. Soc*, 161(2), 105-121.
8. The Angiosperm Phylogeny Group (2016). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Bot. J. Linn. Soc*, 181(1), 1-20.
9. B., R.N.K. (2003). *Hypericum: the genus Hypericum*. Hypericum botany, London: Taylor & Francis.
10. Stevens P.F (2007). Hypericaceae. *The Families and Genera of Vascular Plants*, Springer, Berlin, 194-195.
11. Davis C.C, Webb C.O, Wurdack K.J et al (2005). Explosive radiation of Malpighiales supports a mid-cretaceous origin of modern tropical rain forests. *Am Nat*, 165(3), E36-65.
12. Donoghue M.J (2008). A phylogenetic perspective on the distribution of plant diversity. *PNAS*, 105(Supplement 1), 11549-11555.

13. Gustafsson M.H.G, Bittrich V and Stevens P (2002). Phylogeny of Clusiaceae Based on rbcL sequences. *Int J Plant Sci*, 163(6), 1045-1054.
14. Ruhfel B.R, Bittrich V, Bove C.P et al (2011). Phylogeny of the clusioid clade (Malpighiales): Evidence from the plastid and mitochondrial genomes. *Am J Bot*, 98(2), 306-325.
15. Robson N.K.B (2016). And then came molecular phylogenetics—Reactions to a monographic study of *Hypericum* (Hypericaceae). *Phytotaxa*, 255(3), 181-198.
16. Robson N.K.B (1977). Studies in the genus *Hypericum* L. (Guttiferae): 1. Infrageneric classification. *Bull. Brit. Mus. (Nat. Hist.) Bot.*, 5, 291-255.
17. Robson N.K.B (1993). Parallel evolution in tropical montane *Hypericum*. *Opera Botanica*, 121, 263–274.
18. Robson N.K.B (2001). Studies in the genus *Hypericum* L. (Guttiferae). 4(1). Sections 7. *Roscyna* to 9. *Hypericum sensu lato* (part 1). *Bull. nat. Hist. Mus. Lond (Bot.)*, 31(2), 37–88.
19. Averyanov L.V, Loc P.K, Hiep N.T et al (2003), Highland vegetation and flora of Van Ban district, Lao Cai province in northern Viet Nam. *Turczaninowia*, 6(4), 47-86.
20. Averyanov L.V, Loc P.K, Hiep N.T et al (2003). Phytogeographic review of Vietnam and adjacent areas of Eastern Indochina. *Komarovia*, 3, 1-83.
21. Crockett S.L and Robson N.K.B (2011). Taxonomy and Chemotaxonomy of the Genus *Hypericum*. *Med Aromat Plant Sci Biotechnol*, 5(Special Issue 1), 1-13.
22. Xu Z and Deng M (2017). Hypericaceae. *Identification and Control of Common Weeds: Volume 2*, Springer, Dordrecht, 737-741.
23. Koch M.A, Scheriau C, Betzin A et al (2013). Evolution of cryptic gene pools in *Hypericum perforatum*: the influence of reproductive system and gene flow. *Ann. Bot.*, 111(6), 1083-1094.
24. Crockett S.L, Poller B, Tabanca N et al (2011). Bioactive xanthenes from the roots of *Hypericum perforatum* (common St John's wort). *J. Sci. Food Agric*. 91(3), 428-434.

25. Tekin M (2017). Pharmacobotanical study of *Hypericum thymopsis*. *Rev. Bras*, 27, 143-152.
26. Matzk F, Meister A, Brutovská R et al (2001). Reconstruction of reproductive diversity in *Hypericum perforatum* L. opens novel strategies to manage apomixis. *Plant J*, 26(3), 275-82.
27. Robson N.K.B (2002). Studies in the genus *Hypericum* L. (Guttiferae) 4(2). Section 9. *Hypericum sensu lato* (part 2): subsection 1. *Hypericum series 1*. *Hypericum*. *Bull. nat. Hist. Mus. Lond (Bot.)*, 32, 61–123.
28. Koch, M.A. et al (2013). *Evolution of cryptic gene pools in Hypericum perforatum: the influence of reproductive system and gene flow*. *Annals of botany*, 111(6): p. 1083-1094.
29. Crockett S, Eberhardt M, Kunert O et al (2010). *Hypericum* species in the Páramos of Central and South America: a special focus upon *H. irazuense* Kuntze ex N. Robson. *Phytochem rev*, 9(2), 255-269.
30. Nahrstedt A and Butterweck A (2010). Lessons Learned from Herbal Medicinal Products: The Example of St. John's Wort. *J. Nat. Prod.*, 73(5), 1015-1021.
31. Belkheir A.K, Gaid M, Liu B et al (2016). Benzophenone synthase and chalcone synthase accumulate in the mesophyll of *Hypericum perforatum* leaves at different developmental stages. *Front Plant Sci*, 7, 921-921.
32. Butterweck V and Schmidt M (2007), St. John's wort: role of active compounds for its mechanism of action and efficacy. *Wiener Medizinische Wochenschrift*, 157(13-14), 356-361.
33. Zorzetto C, Sánchez-Mateo C.C, Rabanal R.M et al (2015). Phytochemical analysis and in vitro biological activity of three *Hypericum* species from the Canary Islands (*Hypericum reflexum*, *Hypericum canariense* and *Hypericum grandifolium*). *Fitoterapia*, 100, 95-109.
34. Beerhues L (2006). Hyperforin. *Phytochemistry*, 67(20), 2201-2207.
35. Jendželovská Z, Jendželovský R, Kuchárová B et al (2016). Hypericin in the Light and in the Dark: Two Sides of the Same Coin. *Front Plant Sci*, 7, 560.

36. Tawaha K, Gharaibeh M, El-Elimat T et al (2010). Determination of hypericin and hyperforin content in selected Jordanian *Hypericum* species. *Ind. Crops Prod*, 32(3), 241-245.
37. Wright C.W, Gott M, Grayson B et al (2003). Correlation of hyperforin content of *Hypericum perforatum* (St John's Wort) extracts with their effects on alcohol drinking in C57Bl/6J Mice: A Preliminary study. *J Psychopharmacol*, 17(4), 403-408.
38. Cosmetic Ingredient Review Expert Pane (2001). Final report on the safety assessment of *Hypericum perforatum* extract and *Hypericum perforatum* oil. *Int J Toxicol*, 20(Suppl 2), 31-39.
39. Dorđević A.S (2015). Chemical composition of *Hypericum perforatum* L. essential oil. *Advanced technologies*, 4(1), 64-68.
40. Mohammadi V, Dehghani S and Larijani B (2016). Ovarian cancer risk and nonisoflavone flavonoids intake: A systematic review of epidemiological studies. *J Res Med Sci*, 21, 123-123.
41. Jürgenliemk G and Nahrstedt A (2002). Phenolic compounds from *Hypericum perforatum*. *Planta Med*, 68(1), 88-91.
42. Berghöfer R. and Hölzl J (1987). Biflavonoids in *Hypericum perforatum*; Part 1. Isolation of I3, II8-Biapigenin. *Planta Med*, 53(2), 216-217.
43. Tocci N, Gaid M, Kaftan F et al (2018). Exodermis and endodermis are the sites of xanthone biosynthesis in *Hypericum perforatum* roots. *New Phytol*, 217(3), 1099-1112.
44. Morshedloo M.R, Maggi A.E.F, Fattahi R et al (2015). Chemical characterization of the essential oil compositions from Iranian populations of *Hypericum perforatum* L. *Incl Crops and Prod*, 76, 565-573.
45. Zhao J, Liu W and Wang J.C (2015). Recent advances regarding constituents and bioactivities of plants from the genus *Hypericum*. *Chem Biodivers*, 12(3), 309-49.
46. Camas N, Radusiene J, Ivanauskas L (2014). Altitudinal changes in the content of bioactive substances in *Hypericum orientale* and *Hypericum pallens*. *Acta Physiologiae Plantarum*, 36(3), 675-686.

47. Crockett S.L, Kunert O, Pferschy-Wenzig E.M et al (2016). Phloroglucinol and Terpenoid Derivatives from *Hypericum cistifolium* and *H. galioides* (Hypericaceae). *Front. Plant Sci*, 7, 961-961.
48. You M, Kim H, Kook J.H et al (2018). St. John's Wort Regulates Proliferation and Apoptosis in MCF-7 Human Breast Cancer Cells by Inhibiting AMPK/mTOR and Activating the Mitochondrial Pathway. *Int J Mol Sci*, 19(4), 966.
49. Agostinis P, Vantieghem A, Merlevede W et al (2002). Hypericin in cancer treatment: more light on the way. *Int J Biochem Cell Biol*, 34(3), 221-241.
50. Huang N, Rizshsky L, Hauck C et al (2011). Identification of anti-inflammatory constituents in *Hypericum perforatum* and *Hypericum gentianoides* extracts using RAW 264.7 mouse macrophages. *Phytochemistry*, 72(16), 2015-2023.
51. Koeberle A, Rossi A, Bauer J et al (2011). Hyperforin, an anti-inflammatory constituent from st. John's wort, inhibits microsomal prostaglandin e2 synthase-1 and suppresses prostaglandin e2 formation in vivo. *Front Pharmacol*, 2(7).
52. Süntar I, Oyardı O and Akkol E.K (2016). Antimicrobial effect of the extracts from *Hypericum perforatum* against oral bacteria and biofilm formation. *Pharm Biol*, 54(6), 1065-1070.
53. Curtis J.D and Lersten N.R (1990). Internal secretory structures in *Hypericum* (Clusiaceae): *H. perforatum* L. and *H. balearicum* L. *New Phytologist*, 114(4), 571-580.
54. Lotocka B and Osinska E (2010). Shoot anatomy and secretory structures in *Hypericum* species (Hypericaceae). *J. Linn. Soc., Bot*, 163(1), 70-86.
55. Lu H, Liu W and Hu Z (1999). Studies on the relation between secretory structures and its secondary product in *Hypericum sampsonii*. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 19(6), 111-115.
56. Chen J.-J, Chen J.-H and Lin Y.-L (2014). Novel polyprenylated phloroglucinols from *Hypericum sampsonii*. *Molecules*, 19, 19836-19844.
57. Chiu N.Y and Chang K.H (1986). *The Illustrated Medicinal Plants of Taiwan II*, SMC Publishing Inc., Taipei.

58. Steiner L.F and Summerland S.A (1943). Xanthone as an Ovicide and Larvicide for the Codling Moth. *J. Econ. Entomol.*, 36(3), 435-439.
59. Shan T, Ma Q, Guo K et al (2011). Xanthones from mangosteen extracts as natural chemopreventive agents: potential anticancer drugs. *Curr Mol Med*, 11(8), 666-677.
60. Steinmetz K.A and Potter J.D (1996). Vegetables, fruit, and cancer prevention: a review. *J Am Diet Assoc*, 96(10), 1027-1039.
61. Yang J, Liu R.H and Halim L (2009). Antioxidant and antiproliferative activities of common edible nut seeds. *LWT - Food Science and Technology*, 42(1), 1-8.
62. Akao Y, Nakagawa Y, Iinuma M et al (2008). Anti-cancer effects of xanthones from pericarps of mangosteen. *Int J Mol Sci*, 9(3), 355-370.
63. Hu L.-H and Sim K.-Y (1998). Complex caged polyisoprenylated benzophenone derivatives, sampsoniones A and B, from *Hypericum sampsonii*. *Tetrahedron Lett*, 39(43), 7999-8002.
64. Hu L.-H and Sim K.-Y (1999). Cytotoxic polyprenylated benzoylphloroglucinol derivatives with an unusual adamantyl skeleton from *Hypericum sampsonii* (Guttiferae). *Org Lett*, 1(6), 879-882.
65. Hong D, Yn F, Hu L et al (2004). Sulfonated xanthones from *Hypericum sampsonii*. *Phytochemistry*, 65(18), 2595-2598.
66. Don M, Huang Y, Huang R et al (2004). New phenolic principles from *Hypericum sampsonii*. *Chem Pharm Bull*, 52(7), 866-869.
67. Ciochina R and Grossman R.B (2006). Polycyclic polyprenylated acylphloroglucinols. *Chem. Rev.*, 106(9), 3963-3986.
68. Xiao Z.Y, Mu Q, Shiu W.K.P et al (2007). Polyisoprenylated benzoylphloroglucinol derivatives from *Hypericum sampsonii*. *J Nat Prod*, 70(11), 1779-1782.
69. Zhu H, Chen C, Tong Q et al (2015). Hyperisampsins H–M, Cytotoxic Polycyclic Polyprenylated Acylphloroglucinols from *Hypericum sampsonii*. *Scientific Reports*, 5(1): p. 14772.

70. Tian W, Qiu Y, Chen H et al (2017). Chiral separation and absolute configurations of two pairs of racemic polyprenylated benzophenones from *Hypericum sampsonii*. *Fitoterapia*, 116, 39-44.
71. Hu L.-H. and K.-Y (2000). Sim, Sampsoniones A–M, a unique family of caged polyprenylated benzoylphloroglucinol derivatives, from *Hypericum sampsonii*. *Tetrahedron*, 56(10), 1379-1386.
72. Tian W, Yu Y, Yao X et al. (2014). Norsampsones A–D, four new decarbonyl polycyclic polyprenylated acylphloroglucinols from *Hypericum sampsonii*. *Org. Lett*, 16(13), 3448-3451.
73. Tian W, Qiu Y, Chen J et al (2017). Norsampsones E, an unprecedented decarbonyl polycyclic polyprenylated acylphloroglucinol with a homoadamantyl core from *Hypericum sampsonii*. *RSC Advances*, 7(53), 33113.
74. Chen Q, Di L, Zhang Y et al (2020). Chemical constituents with cytotoxic and anti-inflammatory activity in *Hypericum sampsonii* and the antitumor potential under the view of cancer-related inflammation. *J Ethnopharmacol*, 259, 112948.
75. Dung N.V, Vinh N.B, Thuan L.D et al (2019). Bioactive compounds from the aerial parts of *Hypericum sampsonii*. *Nat Prod Res*, 35(4), 646-648.
76. Shi J, Yan X, Liu Y et al (2010). Studies on Fractions with Antidepressant Activity from *Hypericum Sampsonii* Hance. *Journal of Liaoning University of Traditional Medicine*, 12(5), 7-9.
77. Zeng J, Sun D, Wang L et al (2006). *Hypericum sampsonii* induces apoptosis and nuclear export of retinoid X receptor-alpha. *Carcinogenesis*, 27(10), 1991-2000.
78. Jiangsu New Medical College (1977). *Dictionary of Chinese Crude Drugs*, Shanghai Scientific Technological Publishers, Shanghai.
79. Nguyễn Văn Thân (2000). *Kiểm nghiệm dược liệu bằng phương pháp hiển vi*, Nhà xuất bản Khoa học Kỹ thuật, Hà Nội.
80. Ngô Văn Thu (2006). *Bài giảng Dược liệu*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
81. Nguyễn Văn Đàn và Nguyễn Viết Tựu (1985). *Phương pháp nghiên cứu hóa*

học cây thuốc, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.

82. Trần Văn Sung (2002). *Phổ cộng hưởng từ hạt nhân trong hóa hữu cơ*, Nhà xuất bản Đại học Quốc gia Hà Nội, Hà Nội.
83. Vogel H.G (2008). *Drug discovery and evaluation Pharmacological assays*, 3rd edition, Springer, Berlin.
84. World Health Organization. Regional Office for the Western Pacific (1993). Research guidelines for evaluating the safety and efficacy of herbal medicines, *Working Group on the Safety and Efficacy of Herbal Medicine*, Manila, 5-9 October 1992, World Health Organization, 1-38.
85. Okawa M, Kinjo J, Nohara T et al (2001). DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical scavenging activity of flavonoids obtained from some medicinal plants. *Biol Pharm Bull*, 24(10), 1202-1205.
86. Hatzieremia S et al (2006). The effects of cardamonin on lipopolysaccharide-induced inflammatory protein production and MAP kinase and NFκB signalling pathways in monocytes/macrophages. *Br J Pharmacol*, 149(2), 188–198.
87. Ellman G, Courtney K.D, Andresjr V. et al (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7(2), 88-95.
88. Nathan C (1992). Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J*, 6(12), 3051-64.
89. Dirsch V.M, Stuppner H and Vollmar A.M (1998). The Griess assay: suitable for a bio-guided fractionation of anti-inflammatory plant extracts?. *Planta Med*, 65(5), 423-426.
90. Bahrani H, Mohamad J, Paydar M.J et al (2014). Isolation and characterisation of acetylcholinesterase inhibitors from *Aquilaria subintegra* for the treatment of Alzheimer's disease (AD). *Curr Alzheimer Res*, 11(2), 206-214.
91. Conti M, Malandrino S and Magistretti M.J (1992). Protective Activity of Silipide on Liver Damage in Rodents. *Japan J Pharmacol*, 60, 315-321.
92. Werawatganon D, Linlawan S, Thanapirom K et al (2014). Aloe vera attenuated liver injury in mice with acetaminophen-induced hepatitis. *BMC*

Complement Altern Med, 14, 229.

93. Lee B, Shim I, Lee H et al (2011). *Rehmannia glutinosa* ameliorates scopolamine-induced learning and memory impairment in rats. *J Microbiol Biotechnol*, 21(8), 874-883.
94. Falsafi S.K, Deli A, Höger H et al (2012). Scopolamine administration modulates muscarinic, nicotinic and NMDA receptor systems. *PLoS One*, 7(2), 75-82.
95. Xi-wen L, Jie L, Robson N.K.B et al (2007). Clusiaceae (Guttiferae). *Flora of China, Volume 13: Clusiaceae through Araliaceae*, Missouri Botanical Garden Press, St Louis, 1-47.
96. Catalano S, Luschi S, Flamini G et al (1996). A xanthone from *Senecio mikanioides* leaves. *Phytochemistry*, 42(6), 1605-1607.
97. Iinuma M, Tosa H, Toriyama N et al (1996). Six xanthones from *Calophyllum austroindicum*. *Phytochemistry*, 43(3), 681-685.
98. Liang B, Li H, Xu L et al (2007). Xanthones from the roots of *Cudrania fruticosa* Wight. *J Asian Nat Prod Res*, 9(4), 393-397.
99. Tanaka N, Kubota T, Kashiwada Y et al (2009). Petiolins F—I, Benzophenone Rhamnosides from *Hypericum pseudopetiolum* var. *kiusianum*. *Chem Pharm Bull*, 57(10), 1171-1173.
100. Shen C, Chang Y and Hott L (1993). Nuclear magnetic resonance studies of 5,7-dihydroxyflavonoids. *Phytochemistry*, 34(3), 843-845.
101. Machida K, Matsuoka E and Kikuchi M (2009). Five new glycosides from *Hypericum erectum* Thunb. *J Nat Med*, 63(2), 223-226.
102. Rodrigues E.D, Silva D.B, Oliveira D.C.R et al (2009). DOSY NMR applied to analysis of flavonoid glycosides from *Bidens sulphurea*. *Magn Reson Chem*, 47(12), 1095-1100.
103. Li W, Sun Y.N, Yan X.T et al (2013). Isolation of xanthones from adventitious roots of St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L.) and their antioxidant and cytotoxic activities. *Food Sci. Biotechnol*, 22(4), 945-949.
104. Wang H, Ye G, Ma C et al (2007). Identification and determination of four

- metabolites of mangiferin in rat urine. *J Pharm Biomed Anal*, 45(5), 793-798.
105. Britton M.M (2010). Magnetic resonance imaging of chemistry. *Chem Soc Rev*, 39(11), 4036-4043.
106. Siddiqui S, Hafeez F, Begum S et al (1988). Oleanderol, a New Pentacyclic Triterpene from the Leaves of *Nerium oleander*. *J Nat Prod*, 51(2), 229-233.
107. Faizi S, Ali M, Saleem R et al (2001). Complete ¹H and ¹³C NMR assignments of stigma-5-en-3-O-β-glucoside and its acetyl derivative. *Mag Reson Chem*, 39(7), 399-405.
108. Nürk N.M and Crockett S.L (2011). Morphological and Phytochemical Diversity among *Hypericum* Species of the Mediterranean Basin. *Med Aromat Plant Sci Biotechnol*, 5(Special Issue 1), 14-28.
109. Miura T, Ichiki H, Hashimoto I et al (2001). Antidiabetic activity of a xanthone compound, mangiferin. *Phytomedicine*, 8(2), 85-87.
110. Dar A, Faizi S, Naqvi S et al (2005). Analgesic and antioxidant activity of mangiferin and its derivatives: the structure activity relationship. *Biol Pharm Bull*, 28(4), 596-600.
111. Kitanov G.M and Nedialkov P.T (1998). Mangiferin and isomangiferin in some *Hypericum* species. *Biochem Syst Ecol*, 26(6), 647-653.
112. Çirak C, Radusiene J, Jakstas V et al (2017). Amentoflavone and Mangiferin in *Hypericum calycinum*, *Hypericum cardiophyllum* and *Hypericum bithynicum*. *RRJoHS*, 6(1), 10-13.
113. Chen C and Chen M (1985). Xanthenes from *Hypericum sampsonii*. *Heterocycles*, 23, 2543-2548.
114. Davis J.M, Murphy E.A and Carmichael M.D (2009). Effects of the dietary flavonoid quercetin upon performance and health. *Curr Sports Med Rep*, 8(4), 206-213.
115. Hakkinen S.H, Kärenlampi S.O, Heinonen I.M et al (1999). Content of the flavonols quercetin, myricetin, and kaempferol in 25 edible berries. *J Agric Food Chem*, 47(6), 2274-2279.
116. Williamson G and Manach C (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies. *Am J Clin Nutr*,

81(1 Suppl), 243S-255S.

117. Wiczowski W, Romaszko J, Bucinski A et al (2008). Quercetin from shallots (*Allium cepa* L. var. *aggregatum*) is more bioavailable than its glucosides. *J Nutr*, 138(5), 885-888.
118. Zeng H, Zhou P and G. Pei (2002). Studies on chemical constituents of *Hypericum sampsonii*. *Natural Product Research and Development*, 14(5), 4.
119. Gou C, Zheng Q.-M and Zheng H.-C (2005). Study of the chemical constituents of *Hypericum sampsonii*. *Pharmaceutical Care and Research*, 5(4), 341-344.
120. Horhammer L and Volz E (1955). [Isolation of hyperoside (quercetin-3-D-galactoside) from *Rumex acetosa*]. *Arch Pharm Ber Dtsch Pharm Ges*, 288(2), 58-60.
121. Chawla, R, Arora R, Sagar R.K (2005). 3-O- β -D-Galactopyranoside of Quercetin as an Active Principle from High Altitude *Podophyllum hexandrum* and Evaluation of its Radioprotective Properties. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 60(9-10), 728-738.
122. Joshi K.R, Devkota H.P, Watanabe T et al (2014). Phenolic compounds from the flowers of Nepalese medicinal plant *Aconogonon molle* and their DPPH free radical-scavenging activities. *Nat Prod Res*, 28(23), 208-210.
123. Wang W, Xu X, Chen X et al (2014). [Chemical constituents from the aerial part of *Sibiraea angustata*]. *Zhong Yao Cai*, 37(1), 57-60.
124. Wan L, Min Q, Wang Y et al (2013). Xanthone glycoside constituents of *Swertia kouitchensis* with α -glucosidase inhibitory activity. *J Nat Prod*, 76(7), 1248-1253.
125. Li W, Chan C, Leung H et al (1999). Xanthenes from *Polygala caudata*. *Phytochemistry*, 51(7), 953-958.
126. Lin Y, Chen W, Ko H et al (2008). Norepinephrine transporter inhibitors from *Polygala tenuifolia*. *J Food Drug Anas*, 16(3), 26-30.
127. Seo E, Kim N, Wani M.C et al (2002). Cytotoxic Prenylated Xanthenes and the Unusual Compounds Anthraquinobenzophenones from *Cratoxylum sumatranum*. *J Nat Prod*, 65(3), 299-305.

128. Raksat A, Laphookhieo S, Cheenpracha S et al (2014). Antibacterial compounds from the roots of *Cratoxylumformosum* spp. *pruniflorum*. *Nat Prod Commun*, 9(10), 1487-1489.
129. Yin Z, Wang Y, Ye W et al (2004). Chemical constituents of *Hypericum perforatum* (St. John's wort) growing in China. *Bioche Syst Ecol*, 32, 521-523.
130. Tocci N, Ferrari F, Santamaria A.R et al (2010). Chitosan enhances xanthone production in *Hypericum perforatum* subsp. *angustifolium* cell cultures. *Nat Prod Res*, 24(3), 286-293.
131. Negi J.S, Bisht V.K, Singh P et al (2013). Naturally Occurring Xanthenes: Chemistry and Biology. *J Appl Chem*, 2013, 621459.
132. Sichaem J, Tip-Pyang S and Siripong P (2018). Chemical Constituents from the Root Bark of *Calophyllum inophyllum*. *Nat Prod Commun*, 13(6), 727-729.
133. Rath G, Potterat O, Mavi S et al (1996). Xanthenes from *Hypericum roeperanum*. *Phytochemistry*, 43(2), 513-520.
134. Ramírez-González I, Amaro-Luis J.M and Bahsas A (2013). Xanthenes from aerial parts of *Hypericum laricifolium* Juss. *Nat Prod Commun*, 8(12), 1731-1732.
135. Xiao Z.Y, Shiu W.K.P, Zeng Y.H et al (2008). A Naturally Occurring Inhibitory Agent from *Hypericum sampsonii*. with Activity Against Multidrug-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Pharmaceutical biology*, 46(4), 250-253.
136. Pisha E, Chai H, Lee I.S et al (1995). Discovery of betulinic acid as a selective inhibitor of human melanoma that functions by induction of apoptosis. *Nat Med*, 1(10), 1046-1051.
137. Yogeewari P and Sriram D (2005). Betulinic acid and its derivatives: a review on their biological properties. *Curr Med Chem*, 12(6), 657-666.
138. Zhou C, Li J, Li C et al (2016). Improvement of betulinic acid biosynthesis in yeast employing multiple strategies. *BMC Biotechnology*, 16(1), 59.
139. Chen M, Wan C, Chen C et al (1988). Flavonoids from *Hypericum Nagasawai* Hayata. *Journal of the Chinese Chemical Society*, 35(2), 167-171.
140. Tao S.H and Wu F.E (2004). A new flavone from *Hypericum wightianum*. *J*

Asian Nat Prod Res, 6(4), 307-310.

141. Colovic M and Caccia S (2008). Liquid chromatography–tandem mass spectrometry of I3,II8-biapigenin, the major biflavone in *Hypericum perforatum* extracts. *J. Chromatogr*, 863(1), 74-79.
142. Zdunić G, Godevac D, Milenković M et al (2010). Anti-inflammatory and Gastroprotective Properties of *Hypericum Richeri* Oil Extracts. *Nat Prod Commun*, 5(8), 1215-1218.
143. Qiao Y, Shang J, Wang D et al (2018). Research of *Panax* spp. in kunming institute of botany, CAS. *Nat Prod Bioprospect*, 8(4), 245-263.
144. Lian Z, Zhang C, Li C et al (2003). [Studies on chemical constituents of *Choerospondias axillaris*]. *Zhong Yao Cai*, 26(1), 23-24.
145. Ji Y, Zhang R, Zhang C et al (2019). Cytotoxic Xanthones from *Hypericum stellatum*, an Ethnomedicine in Southwest China. *Molecules*, 24(19), 3568.
146. Tala M.F, Tchakam P.D, Wabo H.K et al (2013). Chemical Constituents, Antimicrobial and Cytotoxic Activities of *Hypericum riparium* (Guttiferae). *Rec Nat Prod*, 7, 65-68.
147. World Health Organization (2000), *General Guidelines for Methodologies on Research and Evaluation of Traditional Medicine*. Geneva: 28-31.
148. Litchfield J. T., Wilcoxon F. (1948), "A simplified method of evaluating dose - effect experiment", *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*: 99-113.
149. Ames, B. N., Shigenaga, M. K., Hagen, T. M. (1993), "Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90, 7915-7922.
150. Jaganath, I. B., Crozier, A. (2010), "Dietary flavonoids and phenolic compounds", *Plant Phenolics and Human Health: Biochemistry, Nutrition, and Pharmacology*, 1, 1-50.
151. Contreras-Guzmán E.S and Strong F.C (2020). Determination of Tocopherols (Vitamin E) by Reduction of Cupric Ion. *J Assoc Off Anal Chem*, 65(5), 1215-1221.

152. Tchakam P.D, Lunga P.K, Kowa T.K et al (2012). Antimicrobial and antioxidant activities of the extracts and compounds from the leaves of *Psorospermum aurantiacum* Engl. and *Hypericum lanceolatum* Lam. *BMC Complement Altern Med*, 12(1), 136.
153. Heinrich M, Lorenz P, Daniels M et al (2017). Lipid and Phenolic Constituents from Seeds of *Hypericum perforatum* L. and *Hypericum tetrapterum* Fr. and their Antioxidant Activity. *Chemistry Biodivers*, 14(8).
154. Ozkan E.E, Ozsoy N, Ozden T.Y et al (2018). Evaluation of Chemical Composition and In-vitro Biological Activities of Three Endemic *Hypericum* Species from Anatolia (*H. thymbrifolium*, *H. spectabile* and *H. pseudolaeve*). *Iran J Pharm Res*, 17(3), 1036-1046.
155. Duang X.Y, Wang Q, Zhou X.D et al (2010). Mangiferin: a possible strategy for periodontal disease to therapy. *Med Hypotheses*, 76(4), 486-488.
156. Ferrero-Miliani L, Nielsen O.H, Andersen P.S et al (2007). Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1beta generation. *Clin Exp Immunol*, 147(2), 227-235.
157. Amin, A. R., Attur, M., Abramson, S. B. (1999), "Nitric oxide synthase and cyclooxygenases: distribution, regulation, and intervention in arthritis", *Curr Opin Rheumatol*, 11, pp. 202-209.
158. Sharma, J. N., Al-Omran, A., Parvathy, S. S. (2007), "Role of nitric oxide in inflammatory diseases", *Inflammopharmacology*, 15, pp. 252-259.
159. Xin W.-B, Man X.-H, Zheng C.-J et al (2012). Prenylated phloroglucinol derivatives from *Hypericum sampsonii*. *Fitoterapia*, 83(8), 1540-1547.
160. Huang C.Y, Chang T.-C, Wu Y.-J et al (2020). Benzophenone and Benzoylphloroglucinol Derivatives from *Hypericum sampsonii* with Anti-Inflammatory Mechanism of Otogirin A. *Molecules*, 25(19).
161. Kapalka G.M (2010). Substances Involved in Neurotransmission. *Nutritional and Herbal Therapies for Children and Adolescents*, Elsevier, 71-99.
162. Colović M.B, Krstić D.Z, Lazarević-Pašti T.D et al (2013). Acetylcholinesterase

- inhibitors: pharmacology and toxicology. *Curr Neuropharmacol*, 11(3), 315-335.
163. Hariharapura R.C, Srinivasan R, Ashok G et al (2014). Investigation of the Antioxidant and Hepatoprotective Potential of *Hypericum mysorensense*. *Antioxidants* (Basel),3(3), 526-543.
164. Bayramoglu G, Bayramoglu A, Engur S et al (2014). The hepatoprotective effects of *Hypericum perforatum* L. on hepatic ischemia/reperfusion injury in rats. *Cytotechnology*, 66(3), 443-448.
165. Trofimiuk, E, Holownia A and Braszko J.J (2010). Activation of CREB by St. John's wort may diminish deleterious effects of aging on spatial memory. *Arch Pharm Res*, 33(3), 469-477.