

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

VIỆN DƯỢC LIỆU



NGUYỄN TRUNG TƯỜNG

NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM THỰC VẬT,
THÀNH PHẦN HÓA HỌC
VÀ MỘT SỐ TÁC DỤNG SINH HỌC CỦA CÂY THUỐC THƯỢNG
(*Phaeanthus vietnamensis* Ban, họ Na – Annonaceae)

CHUYÊN NGÀNH: DƯỢC LIỆU - DƯỢC HỌC CỔ TRUYỀN

MÃ SỐ: 9720206

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ DƯỢC HỌC

HÀ NỘI, NĂM 2019

CÔNG TRÌNH HOÀN THÀNH TẠI:

Viện Dược liệu

Học viện Quân y

Viện Hóa sinh biển - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Người hướng dẫn khoa học:

1. GS. TS. Phạm Thanh Kỳ
2. TS. Nguyễn Xuân Nhiệm

Phản biện 1:

Phản biện 2:

Phản biện 3:

Luận án sẽ được bảo vệ trước Hội đồng chấm luận án cấp Viện tổ chức tại Viện Dược liệu.

Vào hồi.....giờ, ngày.....tháng.....năm

Có thể tìm đọc Luận án tại:

- Thư viện Quốc gia Hà Nội.
- Thư viện Viện Dược liệu

A. GIỚI THIỆU LUẬN ÁN

1. Tính cấp thiết của luận án

Việt Nam nằm trong vùng khí hậu nhiệt đới, có nguồn thực vật rất đa dạng và phong phú. Nhân dân ta từ lâu đã biết sử dụng cây cỏ để phòng và chữa bệnh, nhưng cho tới nay phần lớn các cây thuốc vẫn được sử dụng theo kinh nghiệm dân gian tùy theo từng địa phương, chưa được nghiên cứu một cách hệ thống đầy đủ, nhất là về thành phần hóa học và tác dụng sinh học.

Cây thuốc Thượng (*Phaeanthus vietnamensis* Ban) là 1 loài đặc hữu của Việt Nam, được phân bố tại các tỉnh Trung Bộ. Dân gian dùng nước của lá non nhỏ mắt chữa đau mắt đỏ; vỏ rễ, vỏ thân, lá đem nấu cao dán chỗ mụn nhọt sưng tấy; dùng chữa đau bụng, tiêu chảy, kiết lỵ, cầm máu vết thương ngoài da... Cho tới nay chưa có nhiều nghiên cứu về cây thuốc Thượng. Với mục đích nghiên cứu một cách hệ thống và đầy đủ, nhất là về thành phần hóa học và tác dụng sinh học của cây thuốc Thượng, luận án được thực hiện với tên: **“Nghiên cứu đặc điểm thực vật, thành phần hóa học và một số tác dụng sinh học của cây thuốc Thượng (*Phaeanthus vietnamensis* Ban, Họ Na-Annonaceae)”** với 3 mục tiêu:

- Thẩm định tên khoa học và xác định đặc điểm thực vật, đặc điểm vi học của mẫu nghiên cứu.
- Chiết xuất và phân lập một số chất trong các bộ phận của cây.
- Thử độc tính và một số tác dụng sinh học (chống viêm, giảm đau, gây độc một số dòng tế bào ung thư)

2. Nội dung của luận án:

* Về thực vật học:

- Mô tả đặc điểm hình thái thực vật, phân tích đặc điểm của cơ quan sinh sản (hoa, quả) để thẩm định tên khoa học của mẫu nghiên cứu.
- Xác định đặc điểm vi phẫu, bột dược liệu, nhằm tiêu chuẩn hóa dược liệu thuốc Thượng.

*** Về hóa học:**

- Chiết xuất phân lập một số hợp chất trong phần lá và thân cành của mẫu nghiên cứu.

- Xác định cấu trúc hóa học các hợp chất đã phân lập được.

*** Về tác dụng sinh học:**

- Thử độc tính cấp, độc tính bán trường diễn của dịch chiết phần lá và thân cành.

- Đánh giá tác dụng chống viêm, giảm đau của dịch chiết phần lá và thân cành.

- Đánh giá hoạt tính kháng viêm (*in vitro*) và tác dụng ức chế một số dòng tế bào ung thư (*in vitro*) của các hợp chất đã phân lập được.

3. Ý nghĩa của luận án:

Đây là lần đầu tiên loài thuốc Thượng mộc tự nhiên ở Việt Nam được nghiên cứu đầy đủ về thực vật, thành phần hóa học và tác dụng sinh học.

- Tên khoa học của mẫu nghiên cứu đã được xác định giúp cho các kết quả nghiên cứu về hóa học và tác dụng sinh học được khẳng định rõ nguồn gốc.

- Đặc điểm vi học lần đầu tiên công bố góp phần nhận biết và tiêu chuẩn hóa dược liệu.

- Kết quả nghiên cứu về thành phần hóa học: đã phân lập được 15 hợp chất ở các phân đoạn chiết khác nhau, trong đó có 3 hợp chất mới, 8 hợp chất lần đầu tiên phân lập được từ chi *Phaeanthus*, 2 hợp chất lần đầu tiên công bố có trong loài *P. vietnamensis* Ban. Kết quả nghiên cứu về thành phần hóa học đã góp phần làm phong phú thêm tri thức về hóa thực vật của chi *Phaeanthus* nói chung và loài *P. vietnamensis* Ban nói riêng.

- Kết quả nghiên cứu về độc tính và tác dụng sinh học chứng minh dược liệu ít độc, dược liệu có tác dụng chống viêm, giảm đau đã góp phần giải thích kinh nghiệm sử dụng của người dân địa phương, là cơ sở

khoa học mở ra triển vọng nghiên cứu đầy đủ hơn để có thể sử dụng rộng rãi dược liệu này trong cộng đồng.

4. Những đóng góp mới của luận án:

4.1. Về thực vật:

Đã thâm định tên khoa học của mẫu nghiên cứu, mô tả chi tiết đặc điểm thực vật, đặc điểm vi học góp phần nhận biết, tiêu chuẩn hóa và kiểm nghiệm dược liệu.

4.2. Về hóa học:

Đã phân lập và xác định cấu trúc hóa học 15 hợp chất (15 hợp chất từ phần lá và 6 hợp chất từ thân cành - trùng với phần lá). Trong đó có 3 hợp chất mới, 8 hợp chất lần đầu tiên công bố phân lập từ chi *Phaeanthus*, 2 hợp chất lần đầu tiên công bố từ loài *Phaeanthus vietnamensis* Ban.

4.3. Về độc tính và tác dụng sinh học:

- Lần đầu tiên công bố LD₅₀ của cao lỏng lá thuốc Thượng (CL1), chưa tìm được LD₅₀ của cao lỏng thân cành (CL2) ở liều cao nhất có thể cho chuột uống. Thuốc Thượng không có độc tính bán trường diễn ở mức liều sử dụng bằng đường uống

- Lần đầu tiên công bố:

Cao lỏng CL1 và CL2 với liều 1,4 g/kg và 2,8 g/kg đều có tác dụng chống viêm khớp, tương đương với thuốc tham chiếu indomethacin liều 10 mg/kg;

Cao lỏng CL1 và CL2 với liều 1,4 g/kg và 2,8 g/kg đều có tác dụng chống viêm cấp và viêm mạn, tương đương với thuốc tham chiếu diclofenac liều 15 mg/kg.

Cao lỏng CL1 và CL2 với liều 1,4 g/kg và 2,8 g/kg đều có tác dụng giảm đau trên tổ chức viêm, tương đương với thuốc tham chiếu diclofenac liều 15 mg/kg;

Cao lỏng CL1 và CL2 với liều 2,4 g/kg và 4,8 g/kg đều có tác dụng chống tác dụng giảm đau trên mô hình gây đau quặn, tương đương với

thuốc tham chiếu diclofenac liều 20 mg/kg;

Cao lỏng **CL1** và **CL2** với liều 2,4 g/kg và 4,8 g/kg có chiều hướng làm tăng thời gian phản ứng đau trên mô hình gây đau bởi mâm nóng tuy nhiên chưa có ý nghĩa thống kê.

Thử nghiệm khả năng ức chế sản sinh NO của 12 hợp chất được lựa chọn: hợp chất **PV6** (spathulenol) thể hiện khả năng ức chế mạnh sản sinh NO với giá trị IC_{50} là $15,7 \pm 1,2 \mu M$. Các hợp chất **PV2**, **PV8** và **PV9** thể hiện khả năng đáng kể ức chế sản sinh NO với giá trị IC_{50} từ 22,6 tới $25,3 \mu M$. Thử nghiệm đánh giá hoạt tính gây độc trên 4 dòng tế bào ung thư cho thấy: hợp chất **PV6** thể hiện hoạt tính yếu trên 3 dòng tế bào ung thư HepG-2, MCF-7, Jurkat.

5. Bố cục của luận án gồm:

Luận án có 140 trang, gồm 4 chương, 34 bảng, 56 hình, 106 tài liệu tham khảo và 105 phụ lục. Các phần chính trong luận án: đặt vấn đề (2 trang), tổng quan (22 trang), vật liệu và phương pháp nghiên cứu (25 trang), kết quả nghiên cứu (69 trang), bàn luận (19 trang), kết luận (2 trang), kiến nghị (1 trang).

B. NỘI DUNG CỦA LUẬN ÁN

CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN

Đã tập hợp và trình bày một cách hệ thống các kết quả nghiên cứu từ trước đến nay về thực vật, thành phần hóa học và tác dụng sinh học của chi *Phaeanthus* trên thế giới và ở Việt Nam.

CHƯƠNG 2: NGUYÊN, VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu:

Mẫu cây thuốc Thượng có đầy đủ các bộ phận (rễ, thân, lá, hoa, quả, hạt) thu thập ở xã Hòa Nhơn, huyện Hòa Vang, thành phố Đà Nẵng vào ngày 12/4/2015 và 16/6/2015.

Tiêu bản được lưu giữ tại Phòng tiêu bản, Viện Dược liệu - NIMM (số hiệu DL-130415) và Phòng Thực vật Dân tộc học, Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

(số hiệu PV 152206).

2.2. Phương pháp nghiên cứu:

- Thẩm định tên khoa học loài nghiên cứu trên cơ sở phân tích đặc điểm hình thái thực vật, so sánh với các tài liệu đã công bố của loài và các khóa phân loại thực vật.

- Xác định đặc điểm vi phẫu phần trên mặt đất, phần rễ và đặc điểm bột được liệu bằng phương pháp hiển vi.

- Xác định cấu trúc các hợp chất phân lập được dựa trên các thông số vật lý và các phương pháp phổ MS, NMR 1 chiều và 2 chiều.

- Thử độc tính cấp, độc tính bán trường diễn của cao lỏng **CL1**, **CL2** theo hướng dẫn của Bộ Y tế Việt Nam, WHO và OECD.

- Thử tác dụng chống viêm khớp (gây ra bởi CFA theo mô hình của Newbould); tác dụng chống viêm cấp (trên mô hình gây phù chân chuột bằng Carrageenan); tác dụng chống viêm mạn (trên mô hình gây u hạt của Ducrot).

- Thử tác dụng giảm đau tại tổ chức viêm (theo phương pháp nghiên cứu của Randall và Selitto); tác dụng giảm đau theo mô hình gây đau quặn (sử dụng acid acetic - Writhing Tests); tác dụng giảm đau trên mô hình gây đau bởi mâm nóng (Hotplate).

- Thử tác dụng gây độc tế bào ung thư *in vitro* của các hợp chất phân lập được đối với dòng tế bào ung thư gan (Hep G2), ung thư vú (MCF-7), ung thư phổi (Lu-1) và dòng tế bào lympho (Jurkat).

- Thử hoạt tính kháng viêm *in vitro* của các hợp chất phân lập được qua đánh giá hoạt tính ức chế sản sinh NO.

CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Kết quả nghiên cứu về thực vật:

3.1.1. Thẩm định tên khoa học:

Căn cứ vào khóa phân loại và bản mô tả các loài thuộc chi *Phaeanthus* của Mols & Kessler (2000) cho phép khẳng định các mẫu thuốc Thượng thu hái ở Hòa Vang, Đà Nẵng là *Phaeanthus vietnamensis* Ban, họ Annonaceace.

3.1.2. Đặc điểm vi học

* **Vi phẫu rễ:** Lớp bản bong tróc, uốn lượn, gồm nhiều lớp tế bào hình chữ nhật. Mô mềm vỏ gồm nhiều lớp tế bào hình bầu dục hay đa giác, có thành mỏng, chứa các bó libe. Bó sợi libe gồm các tế bào thành dày, kết tầng tạo thành chùy không đều. Gỗ cấp 2 gồm các tế bào hình đa giác tròn, thành dày, liên kết với nhau tạo thành các dải và bị ngăn cách bởi tia tủy. Tia tủy gồm 2-4 hàng tế bào hình chữ nhật, có thành hóa gỗ. Gỗ cấp 1 tạo thành cụm 2-3 bó mạch.

* **Vi phẫu thân:** Vi phẫu thân có thiết diện tròn. Bản gồm nhiều lớp tế bào hình chữ nhật, vách uốn lượn. Mô dày gồm các tế bào hình bầu dục hay đa giác, kích thước không đều. Mô mềm vỏ gồm các tế bào thành mỏng. Bó sợi libe nằm trên đầu các bó libe hoặc tạo thành các lớp sợi xen kẽ với mô mềm. Gỗ cấp 2 liên tục tạo thành các dải vòng đồng tâm, chiếm phần lớn diện tích vi phẫu; mạch gỗ hình đa giác tròn, kích thước không đều, thành dày, bị phân cắt bởi tia tủy. Tia tủy gồm 2-4 hàng tế bào hình chữ nhật, thành tế bào hóa gỗ. Gỗ cấp 1 tập trung thành cụm 2-3 bó, mỗi bó 2-3 mạch, nằm rải rác. Vùng mô mềm tủy gồm các tế bào đa giác hoặc gần tròn, kích thước không đều, sắp xếp lộn xộn.

*** Vi phẫu lá:**

Gân lá mặt trên hơi lõm, mặt dưới lồi rõ. Từ ngoài vào trong gồm có lớp biểu bì gồm 1 hàng tế bào có màng ngoài được phủ một lớp cutin mỏng, trên biểu bì rải rác có lông che chở đa bào; mô mềm gồm các tế bào hình đa giác không đều nhau, thành tế bào mỏng; bao xung quanh bó mạch của gân lá là mô cứng gồm các tế bào hóa gỗ có thành dày; mạch gỗ gồm các tế bào hình đa giác hoặc hình bầu dục kích thước không đều xếp chồng hoặc so le nhau. Libe gồm các đám tế bào nhỏ không liên tục, nằm xen giữa lớp tế bào mô cứng và gỗ. Mô mềm ruột gồm các tế bào hình đa giác hoặc gần tròn, ở giữa có khoảng gian bào nhỏ, đám tế bào ở tâm có thành tế bào dày hóa gỗ.

* Đặc điểm bột dược liệu:

Bột rễ: Bột rễ có màu ghi xám hơi vàng, nhiều xơ, mùi thơm nhẹ, vị đắng. Soi dưới kính hiển vi thấy: sợi gỗ và bó sợi; mảnh bản; lông hút; mảnh mạch điềm; mảnh mạch xoắn; tinh thể calci oxalat hình khối; các hạt tinh bột hình cầu, có rốn hạt phân nhánh, đơn lẻ hoặc chụm đôi, chụm ba hoặc chụm bốn, kích thước từ 30-50 μm .

Bột thân: Bột thân có màu ghi sáng hơi vàng, nhiều xơ, mùi thơm nhẹ, vị đắng. Soi dưới kính hiển vi thấy: mảnh mạch vạch; mảnh mạch điềm; mảnh mạch xoắn; hạt tinh bột hình cầu, có rốn hạt phân nhánh, kích thước 30-50 μm ; inulin dạng hình khối; mảnh vỏ (biểu bì) thân; sợi gỗ; mảnh màu nâu đỏ.

Bột lá: Bột lá có màu xanh đen, mùi thơm, vị đắng. Soi dưới kính hiển vi thấy: mảnh mô giậu; mảnh mạch xoắn; các hạt tinh bột hình cầu có rốn hạt phân nhánh, đường kính từ 30-50 μm ; mảnh màu nâu đỏ; mảnh mô mềm; tinh thể calci oxalat hình khối; biểu bì mang lỗ khí; inulin dạng hình khối; lông che chở đa bào.

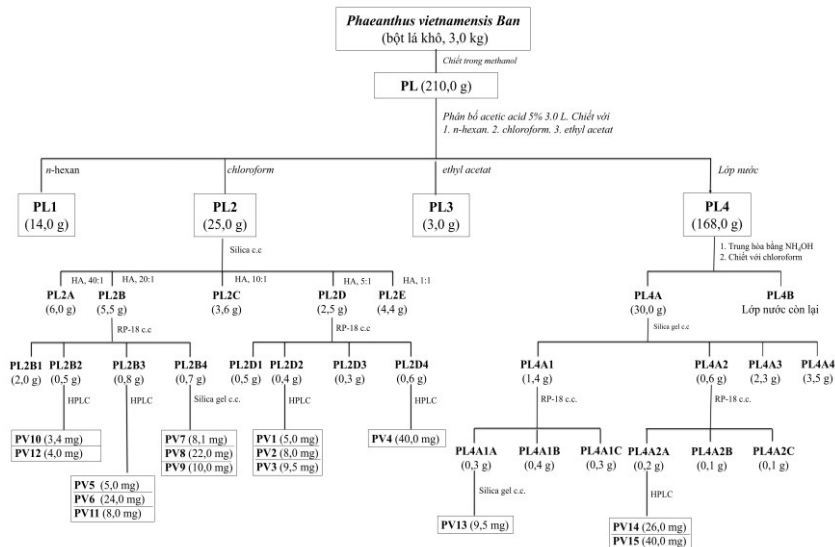
3.2. Kết quả nghiên cứu về thành phần hóa học:

3.2.1. Chiết xuất và phân lập các hợp chất:

Từ 3,0 kg lá khô cây thuốc Thượng được tiến hành chiết xuất và phân lập theo sơ đồ ở Hình 1, thu được 15 hợp chất, **PV1 - PV15**.

Từ 3,0 kg thân cành khô cây thuốc Thượng cũng được chiết xuất phân lập (tương tự như sơ đồ chiết xuất phân lập các chất từ lá) thu được 06 hợp chất, **TC1 - TC6**.

Căn cứ vào phổ $^1\text{H-NMR}$ cho thấy có 6 hợp chất phân lập được từ thân cành thuốc Thượng giống với 6 hợp chất đã phân lập được từ lá. Cụ thể: **TC1 = PV8**, **TC2 = PV13**, **TC3 = PV14**, **TC4 = PV15**, **TC5 = PV2**, **TC6 = PV3**.



Hình 1. Sơ đồ phân lập các chất từ lá cây thuốc Thương.

3.2.2. Xác định cấu trúc hóa học các chất phân lập được.

* **Hợp chất PV1: (7*S*,8*R*,8'*R*)-3,5,3',5'-tetramethoxy-4,4',7-trihydroxy-9,9'-epoxylignan (chất mới):** Bột màu trắng, vô định hình. Độ quay cực: $-10,0$ ($c=0,01$, CHCl_3). CTPT được xác định là $\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{O}_8$ dựa trên phổ khối lượng phân giải cao HR-ESI-MS tại m/z 443,1683 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (tính toán lí thuyết cho công thức $[\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{O}_8\text{Na}]^+$, 443,1676). Phổ $^1\text{H-NMR}$ của **PV1** cho biết sự có mặt của 2 cặp proton thơm tại δ_{H} 6,02 và 6,41 (2H, s) và 4 nhóm methoxy tại 3,70 (6H, s) và 3,81 (6H, s). Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ và HSQC cho thấy tín hiệu của 22 carbon, gồm có: 8 carbon không liên kết trực tiếp với hydro tại 131,2, 132,7, 134,3, 134,8, 146,8 \times 2 và 146,9 \times 2; 7 carbon methin tại 44,0, 51,8, 77,0, 103,0 \times 2 và 105,0 \times 2; 3 carbon methylen tại 40,1, 70,7 và 73,4; 4 carbon methyl tại 56,0 \times 2 và 56,2 \times 2. Dữ liệu phổ $^1\text{H-}$ và $^{13}\text{C-NMR}$ của **PV1** rất giống với của hợp chất (7*S*,8*R*,8'*R*)-3,3'-dimethoxy-9,9'-epoxylignan-4,4',7-triol (**PV1a**) ngoại trừ sự có mặt thêm 2 nhóm methoxy tại C-5 và C-5'. Tương tác HMBC giữa H-9 (δ_{H} 3,99) và C-7

(δ_C 77,0)/C-8 (δ_C 51,8)/C-8' (δ_C 44,0)/C-9' (δ_C 73,4); giữa H-7 (δ_H 4,33) và C-8 (δ_C 51,8)/C-9 (δ_C 70,7) gợi ý sự có mặt của vòng tetrahydrofuran trong **PV1** và nhóm hydroxyl tại C-7. Điều này cũng được xác nhận bởi tương tác COSY giữa H-7 (δ_H 4,33)/H-8 (δ_H 2,20)/H-9 (δ_H 3,99), cũng như H-7' (δ_H 2,19 và 2,42)/H-8' (δ_H 2,06)/H-9' (δ_H 3,48 và 3,89). Tương tác HMBC giữa H-2(6) (δ_H 6,41) và C-3(5) (δ_C 146,9)/C-4 (δ_C 134,3)/C-7 (δ_C 77,0); giữa nhóm methoxy (δ_H 3,81) và C-3(5) (δ_C 146,9) đã gợi ý vị trí của hai nhóm methoxy và một nhóm hydroxyl tại C-3, C-5, và C-4 của vòng benzen. Tương tự xác định được vị trí của 3,5-dimethoxy-4-hydroxybenzen tại C-7'. Cấu hình tuyệt đối của **PV1** được xác định dựa trên sự phân tích phổ NOESY và CD. Phổ CD của **PV1** cho thấy có hiệu ứng Cotton dương tại 208 nm, giống với của hợp chất ligalbumosid D (**PV1b**), cho phép kết luận cấu hình tại C-7 là *R*. Tương tác NOESY giữa H-7 (δ_H 4,33) và H-2/H-6 (δ_H 6,41) và H-8' (δ_H 2,06) cho phép xác định chúng cùng phía vòng tetrahydrofuran (cấu hình β). Từ các dữ liệu trên, hợp chất mới **PV1** được xác định là (7*S*,8*R*,8'*R*)-3,5,3',5'-tetramethoxy-4,4',7-trihydroxy-9,9'-epoxy lignan.

* **Hợp chất PV2=TC5: 8*R*,8'*R*-bishydroxyingenin**: Bột màu trắng, vô định hình. Độ quay cực: +30,6 ($c=0,1$, CHCl_3). HR-ESI-MS m/z tại 421,1853 [M-H^-] (tính toán lí thuyết cho công thức [$\text{C}_{22}\text{H}_{29}\text{O}_8$]), 421,1868 [M-H^-] và 457,1621 [M+Cl^-] (tính toán lí thuyết cho công thức [$\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{O}_8\text{Cl}$], 457,1635). $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ_H (ppm): 6,30 (1H, s, H-2; H-6), 2,50 (1H, dd, $J = 8,8; 13,6$ Hz, H-7), 1,88 (1H, m, H-8), 3,54 (1H, dd, $J = 5,6; 10,8$ Hz, H-9), 3,72 (3H, s, 3,5-OMe), 6,30 (1H, s, H-2'; H-6'), 2,50 (1H, dd, $J = 8,8; 13,6$ Hz, H-7'), 1,88 (1H, m, H-8'), 3,54 (1H, dd, $J = 5,6; 10,8$ Hz, H-9'), 3,72 (3H, s, 3',5'-OMe). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3OD) δ_C (ppm): 133,1 (C-1), 107,1 (C-2; C-6), 149,0 (C-3; C-5), 134,4 (C-4), 36,7 (C-7), 44,0 (C-8), 62,2 (C-9), 56,5 (3,5-OMe), 133,1 (C-1'), 107,1 (C-2'; C-6'), 149,0 (C-3'; C-5'), 134,4 (C-4'), 36,7 (C-7'), 44,0 (C-8'), 62,2 (C-9'), 56,5 (3',5'-OMe).

* **Hợp chất PV3=TC6: (+)-5,5'-dimethoxylariciresinol**: Tinh

thể không màu. Độ quay cực: +20,0 ($c=0,12$, MeOH). HR-ESI-MS tại m/z 419,1711 $[M-H]^-$ (tính toán lý thuyết cho công thức $[C_{22}H_{27}O_8]^-$, 419,1718). 1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ_H (ppm): 6,60 (1H, s, H-2; H-6), 4,75 (1H, d, $J = 6,8$ Hz, H-7), 2,36 (1H, m, H-8), 3,64 (1H, dd, $J = 6,4; 10,2$ Hz, H-9), 3,83 (1H, dd, $J = 8,0; 10,2$ Hz, H-9), 3,81 (3H, s, 3,5-OMe), 6,48 (1H, s, H-2'; H-6'), 2,47 (1H, dd, $J = 11,6; 13,2$ Hz, H-7'), 2,91 (1H, dd, $J = 4,8; 13,2$ Hz, H-7'), 2,72 (1H, m, H-8'), 3,73 (1H, dd, $J = 6,0; 8,4$ Hz, H-9'), 3,98 (1H, dd, $J = 6,4; 8,4$ Hz, H-9'), 3,72 (3H, s, 3',5'-OMe). ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) δ_C (ppm): 135,0 (C-1), 104,2 (C-2, C6), 149,2 (C-3, C-5), 135,9 (C-4), 84,2 (C-7), 54,2 (C-8), 60,5 (C-9), 56,7 (3,5-OMe), 132,8 (C-1'), 106,9 (C-2', C-6'), 149,3 (C-3', C-5'), 134,8 (C-4'), 34,2 (C-7'), 43,8 (C-8'), 73,5 (C-9'), 56,7 (3',5'-OMe).

* **Hợp chất PV4: (+)-pinoresinol**: Bột màu trắng, vô định hình. Độ quay cực: +69,0 ($c=0,1$, MeOH). 1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ_H (ppm): 6,92 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-2), 6,75 (1H, d, $J = 8,0$ Hz, H-5), 6,78 (1H, dd, $J = 2,0; 8,0$ Hz, H-6), 4,68 (1H, d, $J = 4,0$ Hz, H-7), 3,11 (1H, t, $J = 6,5$ Hz, H-8), 4,20 (1H, m, H-9), 3,80 (1H, d, $J = 4,0$ Hz, H-9), 3,83 (3H, s, 3-OMe), 6,92 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-2'), 6,75 (1H, d, $J = 8,0$ Hz, H-5'), 6,78 (1H, dd, $J = 2,0; 8,0$ Hz, H-6'), 4,68 (1H, d, $J = 4,0$ Hz, H-7'), 3,11 (1H, t, $J = 6,5$ Hz, H-8'), 4,20 (1H, m, H-9'), 3,80 (1H, d, $J = 4,0$ Hz, H-9'), 3,83 (3H, s, 3'-OMe). ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) δ_C (ppm): 133,8 (C-1), 111,1 (C-2), 149,1 (C-3), 147,3 (C-4), 116,1 (C-5), 120,0 (C-6), 87,5 (C-7), 55,4 (C-8), 72,6 (C-9), 56,4 (3-OMe), 133,8 (C-1'), 111,1 (C-2'), 149,1 (C-3'), 147,3 (C-4'), 116,1 (C-5'), 120,0 (C-6'), 87,5 (C-7'), 55,4 (C-8'), 72,6 (C-9'), 56,4 (3'-OMe).

* **Hợp chất PV5: 8 α -hydroxyoplop-11(12)-en-14-on (chất mới)**: Dạng dầu, không màu. Độ quay cực: -8,5 ($c=0,01$, $CHCl_3$). CTPT của **PV5** được xác định là $C_{15}H_{24}O_2$ dựa trên phổ HR-ESI-MS tại m/z 237,1857 $[M+H]^+$ (tính toán lý thuyết cho công thức $[C_{15}H_{25}O_2]^+$,

237,1849). Phổ $^1\text{H-NMR}$ của **PV5** cho biết sự có mặt của 2 proton olefin geminal tại δ_{H} 4,58 (s) và 4,69, 3 nhóm methyl tại δ_{H} 1,22 (s), 1,53 (s) và 2,09 (s). Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ và DEPT của **PV5** cho thấy tín hiệu của 15 carbon, bao gồm: 1 carbon carbonyl tại δ_{C} 211,9; 2 carbon không liên kết trực tiếp với hydro tại δ_{C} 72,8 và 148,8; 4 nhóm methin tại δ_{C} 47,0, 52,6, 55,5 và 56,1; 4 nhóm methylen tại δ_{C} 24,9, 28,2, 29,5 và 41,9; 3 nhóm methyl tại δ_{C} 18,3, 20,4 và 30,7. Phân tích số liệu phổ ^1H - và $^{13}\text{C-NMR}$ cho thấy hợp chất **PV5** có cấu trúc hóa học thuộc khung oplopan và giống với của *7\beta,8\alpha*-dihydroxyoplopan-11(12)-en-14-one (**PV5a**) ngoài trừ việc vắng mặt của nhóm hydroxyl tại C-7. Các liên kết trực tiếp C-H được xác định thông qua phân tích phổ HSQC. Tương tác HMBC giữa H-15 (δ_{H} 2,09) và C-3 (δ_{C} 55,5)/C-14 (δ_{C} 211,9); giữa H-12 (δ_{H} 4,58 và 4,69) và C-5 (δ_{C} 52,6)/C-11 (δ_{C} 148,8)/C-13 (δ_{C} 18,3) cho thấy sự có mặt của nhóm acetyl tại C-3 và nhóm isopropenyl tại C-5. Tương tác HMBC giữa H-10 (δ_{H} 1,22) và C-7 (δ_{C} 41,9)/C-8 (δ_{C} 72,8)/C-9 (δ_{H} 56,1) gợi ý vị trí của nhóm methyl và hydroxyl tại C-8. Thêm vào đó, cấu hình α của nhóm hydroxyl này được chứng minh bởi tương tác NOE giữa H-4 (δ_{H} 1,88) và H-10 (δ_{H} 1,22). Tương tác NOESY giữa H-3 (δ_{H} 2,61) và H-9 (δ_{H} 1,47); giữa H-3 (δ_{H} 2,61) và H-5 (δ_{H} 1,85) đã gợi ý H-3, H-5, H-9 là cùng phía (cấu hình α). Tương tác NOESY giữa H-13 (δ_{H} 1,53) và H-5 (δ_{H} 1,85) một lần nữa khẳng định cấu hình của H-5 là α . Từ đây, cấu trúc của **PV5** được xác định là *8\alpha*-hydroxyoplopan-11(12)-en-14-on. Tra cứu trên hệ thống Science Finder về cấu trúc của hợp chất này cho phép kết luận đây là hợp chất mới.

* **Hợp chất PV6: spathulenol**: Bột màu trắng, vô định hình. Độ quay cực: +60,0 ($c=0,1$, CHCl_3). HR-ESI-MS tại m/z 221,1896 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (tính toán lí thuyết cho công thức $[\text{C}_{15}\text{H}_{25}\text{O}]^+$, 221,1900). $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ_{H} (ppm): 2,18 (1H, m, H-1), 1,54 (1H, m, H-2), 1,93 (1H, m, H-2), 1,52 (1H, m, H-3), 1,75 (1H, m, H-3), 1,31 (1H, dd, $J = 10,4$; 10,8 Hz, H-5), 0,49 (1H, dd, $J = 9,6$; 10,8 Hz, H-6), 0,69 (1H, m, H-7), 1,02 (1H, m, H-8), 1,96 (1H, m, H-8), 2,39 (1H, dd, $J = 6,0$;

13,2 Hz, H-9), 2,04 (1H, dd, $J = 12,8$; 13,2 Hz, H-9), 1,04 (3H, s, H-12), 1,03 (3H, s, H-13), 1,23 (3H, s, H-14), 4,26 (1H, s, H-15), 4,67 (1H, s, H-15). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3OD) δ_{C} (ppm): 54,8 (C-1), 27,7 (C-2), 42,6 (C-3), 81,5 (C-4), 54,9 (C-5), 31,5 (C-6), 28,6 (C-7), 25,9 (C-8), 40,0 (C-9), 154,7 (C-10), 21,2 (C-11), 29,1 (C-12), 16,7 (C-13), 26,1 (C-14), 106,6 (C-15).

*** Hợp chất PV7: (1 α H,5 β H-aromandendrane-4 β ,10 α -diol):** Bột màu trắng, vô định hình. Độ quay cực: +35,0 ($c=0,1$, CHCl_3). $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ_{H} (ppm): 1,84 (1H, m, H-1), 1,65 (1H, m, H-2), 1,65 (1H, m, H-3), 1,17 (1H, m, H-5), 0,40 (1H, dd, $J = 10,0$; 10,0 Hz, H-6), 0,62 (1H, m, H-7), 0,88 (1H, m, H-8), 1,81 (1H, m, H-8), 1,49 (1H, dd, $J = 12,8$; 12,8 Hz, H-9), 1,72 (1H, dd, $J = 6,8$; 12,8 Hz, H-9), 1,01 (3H, s, H-12), 1,01 (3H, s, H-13), 1,23 (3H, s, H-14), 1,15 (3H, s, H-15). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ_{C} (ppm): 56,3 (C-1), 23,8 (C-2), 41,1 (C-3), 80,4 (C-4), 48,4 (C-5), 28,2 (C-6), 26,6 (C-7), 20,3 (C-8), 44,4 (C-9), 75,0 (C-10), 19,5 (C-11), 16,4 (C-12), 28,6 (C-13), 24,5 (C-14), 20,1 (C-15).

*** Hợp chất PV8=TC1: 1 α H,5 β H-aromandendrane-4 α ,10 α -diol:** Bột màu trắng, vô định hình. Độ quay cực: +31,0 ($c=0,1$, CHCl_3). $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ_{H} (ppm): 2,13 (1H, dt, $J = 4,8$; 10,8 Hz, H-1), 1,65 (1H, m, H-2), 1,88 (1H, m, H-2), 1,45 (1H, m, H-3), 1,68 (1H, m, H-3), 0,94 (1H, m, H-5), 0,63 (1H, t, $J = 9,6$ Hz, H-6), 0,65 (1H, m, H-7), 0,83 (1H, m, H-8), 1,81 (1H, m, H-8), 1,51 (1H, dd, $J = 12,8$; 12,8 Hz, H-9), 1,68 (1H, dd, $J = 4,8$; 12,8 Hz, H-9), 0,94 (3H, s, H-12), 1,02 (3H, s, H-13), 1,20 (3H, s, H-14), 1,06 (3H, s, H-15). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ_{C} (ppm): 54,5 (C-1), 23,7 (C-2), 40,2 (C-3), 80,2 (C-4), 47,5 (C-5), 24,9 (C-6), 26,1 (C-7), 20,3 (C-8), 44,1 (C-9), 75,5 (C-10), 18,9 (C-11), 16,4 (C-12), 28,8 (C-13), 25,6 (C-14), 19,6 (C-15).

*** Hợp chất PV9: 1 β H,5 β H-aromandendrane-4 α ,10 β -diol:** Bột màu trắng, vô định hình. Độ quay cực: +7,0 ($c=0,1$, CHCl_3). $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ_{H} (ppm): 2,47 (1H, m, H-1), 1,58 (1H, m, H-2), 1,71 (1H, m, H-2), 1,66 (1H, m, H-3), 1,82 (1H, m, H-3), 1,71 (1H, m,

H-5), 0,02 (1H, dd, $J = 6,0$; 9,6 Hz, H-6), 0,60 (1H, m, H-7), 1,37 (1H, m, H-8), 1,60 (1H, m, H-8), 1,59 (1H, m, H-9), 1,65 (1H, m, H-9), 1,02 (3H, s, H-12), 1,00 (3H, s, H-13), 1,31 (3H, s, H-14), 1,18 (3H, s, H-15). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ_{C} (ppm): 54,0 (C-1), 25,1 (C-2), 37,4 (C-3), 82,1 (C-4), 47,7 (C-5), 25,3 (C-6), 28,8 (C-7), 18,7 (C-8), 37,9 (C-9), 74,3 (C-10), 18,6 (C-11), 16,2 (C-12), 28,5 (C-13), 25,6 (C-14), 32,1 (C-15).

* **Hợp chất PV10: 3 α ,4 β -dihydroxybisabola-1,10-dien:** Bột màu trắng, vô định hình. Độ quay cực: -32,0 ($c=0,1$, CHCl_3). HR-ESI-MS tại m/z 237,1853 $[\text{M-H}]^-$ (tính toán lý thuyết cho công thức $[\text{C}_{15}\text{H}_{25}\text{O}_2]^-$, 237,1853). $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ_{H} (ppm): 5,59 (1H, br d, $J = 10,0$ Hz, H-1), 5,63 (1H, br d, $J = 10,0$ Hz, H-2), 3,76 (1H, br d, $J = 4,8$ Hz, H-4), 1,67 (1H, m, H-5), 1,79 (1H, m, H-5), 2,28 (1H, m, H-6), 1,58 (1H, m, H-7), 1,18 (1H, m, H-8), 1,38 (1H, m H-8), 1,92 (1H, m, H-9), 2,01 (1H, m, H-9), 5,07 (1H, t, $J = 6,4$ Hz, H-10), 1,58 (3H, s, H-12), 1,29 (3H, s, H-13), 0,86 (3H, d, $J = 6,8$ Hz, H-14), 1,66 (3H, s, H-15). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ_{C} (ppm): 131,7 (C-1), 133,2 (C-2), 70,6 (C-3), 73,5 (C-4), 27,4 (C-5), 36,5 (C-6), 36,2 (C-7), 34,2 (C-8), 25,9 (C-9), 124,4 (C-10), 131,4 (C-11), 17,7 (C-12), 23,8 (C-13), 16,1 (C-14), 25,7 (C-15).

* **Hợp chất PV11: nerolidol:** Bột màu trắng, vô định hình. Độ quay cực: +10,0 ($c=0,1$, CHCl_3). $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ_{H} (ppm): 5,05 (1H, dd, $J = 10,4$; 17,2 Hz, H-1), 5,20 (1H, dd, $J = 2,0$; 17,2 Hz, H-1), 5,82 (1H, ddd, $J = 2,0$; 10,4; 17,2 Hz, H-2), 1,50 (1H, m, H-4), 2,04 (1H, m, H-5), 5,12 (1H, m, H-6), 1,95 (1H, m, H-8), 1,98 (1H, m, H-9), 4,98 (1H, m, H-10), 1,58 (3H, s, H-12), 1,27 (3H, s, H-13), 1,58 (3H, s, H-14), 1,67 (3H, s, H-15). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ_{C} (ppm): 111,7 (C-1), 145,1 (C-2), 73,6 (C-3), 42,1 (C-4), 26,7 (C-5), 124,3 (C-6), 135,7 (C-7), 39,8 (C-8), 22,8 (C-9), 124,3 (C-10), 131,5 (C-11), 17,8 (C-12), 28,0 (C-13), 16,1 (C-14), 25,8 (C-15).

* **Hợp chất PV12: (1R,2S,4S)-2-E-cinnamoyloxy-4-acetyl-1-**

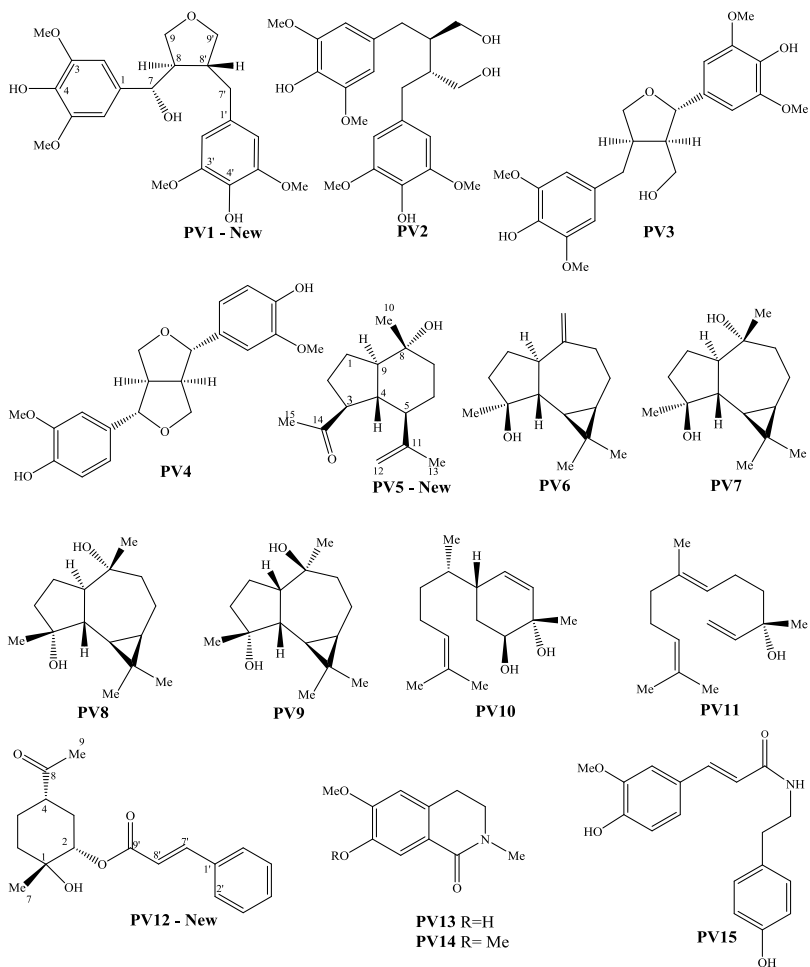
methylcyclohexan-1-ol (chất mới): Bột màu trắng, vô định hình. Độ quay cực: +25,5 ($c=0,01$, CHCl_3). CTPT của **PV12** được xác định là $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{O}_4$ dựa trên phổ khối lượng phân giải cao HR-ESI-MS tại m/z 325,1411 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (tính toán lí thuyết cho công thức $[\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{O}_4\text{Na}]^+$, 325,1410). Phổ $^1\text{H-NMR}$ của **PV12** cho biết sự có mặt của 5 proton thơm tại δ_{H} 7,37 (1H, t, $J = 8,0$ Hz), 7,38 (2H, t, $J = 8,0$ Hz), và 7,51 (2H, d, $J = 8,0$ Hz), gợi ý sự có mặt của 1 nhóm phenyl; 2 proton olefin có cấu hình E tại δ_{H} 6,46 (d, $J = 16,0$ Hz) và 7,70 (d, $J = 16,0$ Hz); một proton oxymethin tại δ_{H} 4,83 (dd, $J = 4,4, 11,6$ Hz); và 2 nhóm methyl tại 1,22 (3H, s) và 2,15 (3H, s). Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ của **PV12** cho thấy tín hiệu của 18 carbon, bao gồm: 2 carbon carbonyl, 2 carbon không liên kết trực tiếp với hydro, 9 nhóm methin, 3 nhóm methylen, và 2 nhóm methyl. Phân tích dữ liệu phổ $^1\text{H-}$ và $^{13}\text{C-NMR}$ của **PV12** xác định sự có mặt của 1 nhóm cinnamoyl và 1 nhóm *nor*-monoterpen. Tương tác HMBC giữa H-7 (δ_{H} 1,22) và C-1 (δ_{C} 70,1)/C-2 (δ_{C} 76,8)/C-6 (δ_{C} 36,7); giữa H-2 (δ_{H} 4,83) và C-1 (δ_{C} 70,1)/C-3 (δ_{C} 28,4)/C-7 (δ_{C} 27,0) xác định vị trí của nhóm methyl và nhóm hydroxyl tại C-1. Vị trí của nhóm acetyl được xác định bởi tương tác HMBC giữa H-9 (δ_{H} 2,15) và C-4 (δ_{C} 49,4)/C-8 (δ_{C} 209,5). Vị trí của nhóm cinnamoyloxy tại C-2 được xác định bởi tương tác HMBC giữa H-2 (δ_{H} 4,83) và carbonyl của nhóm cinnamoyloxy (δ_{C} 166,2). Cấu hình tuyệt đối của **PV12** đã được làm sáng tỏ bằng cách so sánh phổ CD thực nghiệm với các phổ tính toán của nó, cũng như dựa trên dữ liệu phổ NOESY. Hằng số ghép của H-2 và $\text{H}_{\alpha-3}$ ($J = 11,6$ Hz); H-2 và $\text{H}_{\epsilon-3}$ ($J = 4,4$ Hz), gợi ý cấu hình của H-2 là *axial*. Thêm vào đó, tương tác NOESY giữa H-2 (δ_{H} 4,83) và $\text{H}_{\epsilon-3}$ (δ_{H} 1,99)/H-4 (δ_{H} 2,48)/ $\text{H}_{\alpha-6}$ (δ_{H} 1,48) chứng minh cấu hình của nhóm hydroxyl tại C-1 là *axial* và nhóm acetyl là *equatorial*. Phổ ECD tính toán của hai phép đồng phân **PV12a** và **PV12b** được thể hiện trong hình 3.38b. Phổ CD của **PV12** thấy tương tự với **PV12a** chỉ ra cấu hình (1*R*,2*S*,4*S*) là của hợp chất **PV12**. Căn cứ vào phổ thực nghiệm, đối chiếu với chất tham khảo [86], hợp chất **PV12** được xác định là

(1R,2S,4S)-2-*E*-cinnamoyloxy-4-acetyl-1-methylcyclohexan-1-ol. Đây là hợp chất mới.

* **Hợp chất PV13=TC2: *N*-methylcorydaldin:** Bột màu vàng nhạt. HR-ESI-MS tại m/z 222,1113 $[M+H]^+$ (tính toán lí thuyết cho công thức $[C_{12}H_{16}NO_3]^+$, 222,1125). 1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ_H (ppm): 3,56 (1H, t, $J = 6,8$ Hz, H-3), 2,92 (1H, t, $J = 6,8$ Hz, H-4), 6,79 (1H, s, H-5), 7,44 (1H, s, H-8), 3,09 (3H, s, N-Me), 3,85 (3H, s, 6-OMe), 3,82 (3H, s, 7-OMe). ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) δ_C (ppm): 167,0 (C-1), 49,5 (C-3), 28,2 (C-4), 111,0 (C-5), 153,8 (C-6), 149,3 (C-7), 111,4 (C-8), 122,4 (C-9), 134,1 (C-10), 35,3 (N-Me), 56,5 (6-OMe), 56,5 (7-OMe).

* **Hợp chất PV14=TC3: thalifolin:** Bột màu vàng nhạt. HR-ESI-MS tại m/z 208,0968 $[M+H]^+$ (tính toán lí thuyết cho công thức $[C_{11}H_{14}NO_3]^+$, 208,0968). 1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ_H (ppm): 3,52 (1H, t, $J = 8,4$ Hz, H-3), 2,89 (1H, t, $J = 8,4$ Hz, H-4), 6,75 (1H, s, H-5), 7,33 (1H, s, H-8), 3,06 (3H, s, N-Me), 3,86 (3H, s, 6-OMe). ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) δ_C (ppm): 167,1 (C-1), 49,6 (C-3), 28,2 (C-4), 110,8 (C-5), 152,4 (C-6), 146,5 (C-7), 115,1 (C-8), 122,6 (C-9), 132,7 (C-10), 35,3 (N-Me), 56,4 (6-OMe).

* **Hợp chất PV15=TC4: moupinamid:** Bột màu vàng nhạt. HR-ESI-MS tại m/z 314,1370 $[M+H]^+$ (tính toán lí thuyết cho $[C_{18}H_{20}NO_4]^+$, 314,1387). 1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ_H (ppm): 7,07 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-2), 6,77 (1H, d, $J = 8,0$ Hz, H-5), 6,99 (1H, dd, $J = 2,0; 8,0$ Hz, H-6), 7,41 (1H, d, $J = 16,0$ Hz, H-7), 6,38 (1H, d, $J = 16,0$ Hz, H-8), 7,02 (1H, d, $J = 8,0$ Hz, H-2'; H-6'), 6,70 (1H, d, $J = 8,0$ Hz, H-3'; H-5'), 2,72 (1H, t, $J = 7,6$ Hz, H-7'), 3,44 (1H, t, $J = 7,6$ Hz, H-8'). ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) δ_C (ppm): 128,2 (C-1), 111,5 (C-2), 149,2 (C-3), 149,8 (C-4), 116,4 (C-5), 123,2 (C-6), 142,0 (C-7), 118,7 (C-8), 169,1 (C-9), 131,2 (C-1'), 130,7 (C-2'; C-6'), 116,2 (C-3'; C-5'), 156,9 (C-4'), 35,8 (C-7'), 42,5 (C-8').



Hình 2. Cấu trúc của 15 hợp chất phân lập được từ *Phaeanthus vietnamensis* Ban thu hái ở Đà Nẵng - Việt Nam.

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

3.3.1. Độc tính cấp theo đường uống của cao lỏng CL1, CL2

* **Độc tính cấp của cao lỏng CL1** (cao lỏng lá cây thuốc Thượng)

Bảng 1. Độc tính cấp theo đường uống của **CL1** trên chuột nhắt trắng
($n=12$).

TT Lô	Liều sử dụng (g /kg)	Số chuột chết*	% chuột chết*
1	75	0	0,0
2	90	1	8,3
3	105	3	25,0
4	120	3	25,0
5	135	5	41,7
6	150	7	58,3
7	165	8	66,7
8	180	10	83,3
9	195	11	91,7
10	210	12	100,0

*Số chuột chết đếm được sau khi uống **CL1** đến ngày thứ 3;

Các lô chuột được uống theo các mức liều tăng dần từ 75 đến 210 g được liệu /kg. Tính toán được giá trị LD_{50} của **CL1** theo đường uống trên chuột nhắt là: $LD_{50} = 135,63$ ($118,97 \div 154,62$) g/kg ở $p = 0,05$.

LD_{50} cao gấp khoảng 56 lần liều dự kiến có tác dụng (2,4 g/kg/ngày ở chuột nhắt), cho thấy cao chiết **CL1** là an toàn về độc tính cấp.

* **Độc tính cấp của cao lỏng CL2** (cao lỏng thân cành cây thuốc Thượng):

Các lô chuột được uống theo các mức liều tăng dần từ 250 đến 550 g/kg, trong đó liều 550 g/kg là liều tối đa có thể cho chuột uống. Theo dõi trong 3 ngày và cho đến thời điểm sau uống thuốc 7 ngày không có chuột thí nghiệm bị chết. Chưa xác định được LD_{50} của cao lỏng thân cành với liều tối đa chuột có thể dung nạp là 550 g/kg.

Bảng 2. Độc tính cấp theo đường uống của CL2 trên chuột nhắt trắng (n=12).

TT Lô	Liều sử dụng (g/kg)	Số chuột chết (sau 3 ngày)	Số chuột chết (sau 7 ngày)
1	250	0	0
2	350	0	0
3	450	0	0
4	550	0	0

3.3.2. Về độc tính bán trường diễn

Kết quả nghiên cứu cho thấy ở các mức liều 2 g và 4 g/kg/ngày, cao lỏng CL1 và CL2 được cho chuột cống uống liên tục trong 60 ngày không gây ảnh hưởng lên tình trạng chung và sự phát triển thể trọng của chuột cống; không ảnh hưởng các sóng điện tim chuột cống; không làm thay đổi các chỉ số huyết học (hồng cầu, huyết sắc tố, hematocrit, thể tích trung bình hồng cầu, bạch cầu, tiểu cầu); và các chỉ tiêu sinh hóa đánh giá chức năng gan, thận (hoạt độ các enzym AST, ALT trong máu, albumin huyết tương, cholesterol toàn phần trong máu, glucose máu, creatinin máu); không gây tổn thương mô bệnh học gan, lách, thận. Các kết quả này cho thấy dược liệu thuốc Thượng không có độc tính bán trường diễn.

3.3.3. Tác dụng chống viêm

**** Tác dụng chống viêm khớp*** (gây ra bởi CFA)

Đường kính khớp cổ chân chuột cống ở lô dùng thuốc tham chiếu indomethacin 10 mg/kg và các lô dùng CL1 và CL2 (1,4 g/kg và 2,8 g/kg) giảm có ý nghĩa thống kê so với lô chứng khi đánh giá tại các thời điểm ngày 7 ($p<0,05$), ngày 14 và 21 ($p_{CL1.1;CL2.1-LC}<0,05$; $p_{CD;CL1.2;CL2.2-LC}<0,01$), và ngày 28 ($p<0,01$).

- So sánh giữa lô dùng thuốc tham chiếu với các lô dùng CL1 và CL2, đường kính khớp cổ chân chuột cống tại các thời điểm đo là tương đương ($p>0,05$).

- **CL1** và **CL2** dùng ở mức liều cao có xu hướng làm giảm đường kính khớp cổ chân chuột cống nhiều hơn so với ở mức liều thấp tại tất cả các thời điểm đo, chứng tỏ có xu hướng tác dụng tăng theo mức liều, tuy nhiên sự khác biệt chưa đạt ý nghĩa thống kê ($p>0,05$).

Các kết quả trên cho thấy cao lỏng thuốc Thượng cả **CL1** và **CL2**, với các mức liều 1,4 g/kg và 2,8 g/kg đều có tác dụng chống viêm khớp, tương đương với thuốc tham chiếu indomethacin 10 mg/kg, khi thử nghiệm trên chuột cống trắng.

- Ở lô tham chiếu và các lô uống cao lỏng **CL1** và **CL2**, mức độ viêm giảm rõ rệt, các tế bào sụn có số lượng ít, không thấy xơ hóa, không có các tế bào viêm

*** Tác dụng chống viêm cấp** (Mô hình gây phù bàn chân chuột bằng carrageenan)

Tác dụng làm giảm độ phù chân chuột cống của các lô dùng cao lỏng **CL1** và **CL2** (các mức liều 1,4 g/kg và 2,8 g/kg) đều tăng khi liều dùng tăng (độ tăng thể tích bàn chân chuột cống ở lô dùng liều cao nhỏ hơn so với ở lô dùng liều thấp), tuy nhiên sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê ($p>0,05$) tại tất cả các thời điểm đo.

So với lô tham chiếu dùng diclofenac liều 15 mg/kg, độ tăng thể tích bàn chân chuột cống ở các lô dùng cao lỏng **CL1** và **CL2** (ở cả 2 mức liều) không có sự khác biệt có ý nghĩa ý nghĩa thống kê ($p>0,05$).

Giá trị của tỷ lệ % ức chế phù ở các lô dùng cao lỏng **CL1**, **CL2** và lô dùng thuốc tham chiếu diclofenac 15 mg/kg không khác nhau có ý nghĩa thống kê ($p>0,05$).

***Tác dụng chống viêm mạn** (Mô hình gây u hạt bằng amiant)

Cao lỏng **CL1**, **CL2** (ở 2 mức liều 1,4 g/kg và 2,8 g/kg) và diclofenac 15mg/kg đều làm giảm khối lượng u hạt khi so với lô chứng ($p<0,05$). Trọng lượng trung bình u hạt ở các lô dùng cao lỏng **CL1** và **CL2** liều cao dường như giảm hơn so với ở lô dùng liều thấp, tuy nhiên sự khác biệt này chưa có ý nghĩa thống kê ($p>0,05$). So sánh giữa các lô dùng **CL1**, **CL2** và diclofenac, tác dụng làm giảm khối lượng u hạt ở

các lô này khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p>0,05$).

3.3.4. Tác dụng giảm đau

*** Tác dụng giảm đau trên tổ chức viêm**

So với lô chứng, tại tất cả các thời điểm đo, các lô dùng cao lỏng **CL1** và **CL2** (cả 2 mức liều) cũng như lô dùng thuốc tham chiếu diclofenac 15 mg/kg đều thể hiện tác dụng giảm đau, làm tăng ngưỡng đau ($p<0,05$). Tác dụng giảm đau thể hiện rõ nhất ở thời điểm sau uống thuốc 60 phút. Ở tất cả các thời điểm đo, giá trị của tỷ lệ % tăng ngưỡng đau so với lô chứng ở lô dùng **CL1** và **CL2** liều 2 đều cao hơn so với ở lô dùng liều 1, tuy nhiên ngưỡng đau đo được chưa có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p>0,05$).

So sánh giữa các lô dùng **CL1**, **CL2** và diclofenac, ngưỡng đau không khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p>0,05$). Cao lỏng **CL1** và **CL2** dùng với các mức liều 1,4 g/kg, 2,8 g/kg có tác dụng giảm đau tương đương với thuốc tham chiếu diclofenac 15 mg/kg.

*** Tác dụng giảm đau trên mô hình gây đau quận**

So với lô chứng, các lô dùng cao lỏng **CL1**, **CL2** (cả liều 2,4 g/kg và 4,8 g/kg) và lô dùng thuốc diclofenac 20 mg/kg có thời gian xuất hiện đau lớn hơn và số cơn đau quận trong 25 phút sau tiêm acid acetic ít hơn có ý nghĩa thống kê ($p<0,01$). Cao lỏng **CL1**, **CL2** và thuốc diclofenac đều thể hiện rõ tác dụng giảm đau trên mô hình gây đau quận (chuột nhắt) thực nghiệm, làm số cơn đau quận giảm hơn so với lô chứng.

So sánh giữa các lô dùng **CL1**, **CL2** và diclofenac, số cơn đau quận không khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p>0,05$). **CL1** và **CL2** dùng với các mức liều trong nghiên cứu (2,4 g/kg và 4,8 g/kg) có tác dụng giảm đau tương đương với thuốc tham chiếu diclofenac 20 mg/kg.

*** Tác dụng giảm đau trên mô hình gây đau bởi mâm nóng (Hotplate).**

Thời gian đáp ứng đau của chuột nhắt ở lô dùng thuốc tham chiếu

(morphin liều 10 mg/kg) dài hơn có ý nghĩa thống kê so với các lô dùng cao lỏng **CL1** và **CL2** ở cả 2 mức liều ($p < 0,05$) và lô chứng ($p < 0,01$). Thời gian đáp ứng đau ở các lô dùng **CL1** và **CL2** (cả 2 mức liều) dài hơn chưa có ý nghĩa thống kê so với lô chứng ($p > 0,05$).

Thời gian đáp ứng đau của chuột nhất ở lô dùng thuốc tham chiếu (morphin liều 10 mg/kg) tại thời điểm sau dùng thuốc dài hơn so với trước dùng thuốc ($p < 0,01$).

Cao lỏng **CL1** và **CL2** (cả 2 mức liều) có chiều hướng làm tăng thời gian phản ứng đau trên mô hình gây đau bởi mâm nóng tuy nhiên chưa có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

3.3.5. Hoạt tính gây độc tế bào ung thư của các hợp chất phân lập được

Kết quả hoạt tính gây độc 04 dòng tế bào ung thư người, bao gồm HepG-2, dòng tế bào ung thư gan người; MCF-7, dòng tế bào ung thư vú người; LU-1, dòng tế bào ung thư phổi người; Jurkat, dòng tế bào lympho người. Kết quả cho thấy hợp chất **PV6** (spathulenol) thể hiện hoạt tính trên 3 dòng tế bào Jurkat, HepG2, MCF7 với IC_{50} từ 42,00-53,88 μM . Các hợp chất **PV2**, **PV3**, **PV4**, **PV7**, **PV13** và **PV15** không thể hiện hoạt tính ở các nồng độ nghiên cứu. Các hợp chất còn lại **PV1**, **PV5**, **PV8**, **PV9**, **PV10**, **PV11**, **PV14** thể hiện mức hoạt tính yếu.

3.3.6. Hoạt tính kháng viêm *in vitro* của các hợp chất phân lập được

Hợp chất **PV6** thể hiện khả năng ức chế mạnh sản sinh NO với giá trị IC_{50} là $15,7 \pm 1,2 \mu\text{M}$, mạnh hơn cả L-NMMA, một chất đối chứng dương, với giá trị IC_{50} là $22,1 \pm 1,2 \mu\text{M}$. Các hợp chất **PV2**, **PV8** và **PV9** thể hiện khả năng ức chế đáng kể NO với giá trị IC_{50} trong khoảng từ 22,6 tới 25,3 μM . Hợp chất **PV2** không có vòng epoxy thể hiện hoạt tính đáng kể nhất trong số các lignan **PV1-PV4**. Các sesquiterpen **PV5-PV11** được phát hiện là thành phần chính của *P. vietnamensis* Ban. Các hợp chất aromadendren (**PV6-PV9**) thể hiện hoạt tính ức chế sản

sinh NO mạnh nhất, đặc biệt là hợp chất **PV6** với liên kết đôi tại C-10/C-15.

Bảng 3. Tác dụng ức chế sản sinh NO của các hợp chất

Hợp chất	IC ₅₀ (μM)	% Tế bào sống sót
PV1	65,2±2,6	98,5±1,4
PV2	25,3±3,1	95,5±4,1
PV3	73,9±4,5	95,4±7,3
PV4	60,2±2,3	98,5±1,4
PV5	46,3±3,9	111,3±7,4
PV6	15,7±1,2	119,7±1,3
PV7	29,3±2,8	131,9±9,5
PV8	23,0±0,6	128,0±4,1
PV9	22,6±1,9	133,1±10,2
PV10	39,9±1,0	125,1±1,4
PV11	50,8±2,6	98,2±4,1
PV12	45,7±2,4	99,8±4,7
L-NMMA	22,1±1,2	95,5±4,1

CHƯƠNG 4: BÀN LUẬN

Đã có một số ý kiến bàn luận về giá trị khoa học và ý nghĩa thực tiễn về kết quả của Luận án.

KẾT LUẬN

1. Về thực vật

- Đã thẩm định được tên khoa học của mẫu nghiên cứu cây thuốc Thượng thu hái tại xã Hòa Nhơn, huyện Hòa Vang, thành phố Đà Nẵng là *Phaeanthus vietnamensis* Ban, thuộc họ Na-Annonaceae.

- Đã mô tả, phân tích đặc điểm hình thái thực vật, đặc điểm giải phẫu rễ, thân, lá và xác định được đặc điểm bột rễ, thân, lá cây thuốc Thượng.

2. Về thành phần hóa học

Đã chiết xuất, phân lập, xác định cấu trúc hóa học 15 hợp chất từ lá cây thuốc Thượng (*Phaeanthus vietnamensis* Ban) gồm: 7 hợp chất thuộc nhóm sesquiterpen, 4 hợp chất thuộc nhóm lignan, 3 hợp chất thuộc nhóm alkaloid, 1 hợp chất thuộc nhóm meroterpen.

Trong đó có: 3 hợp chất mới là (7*S*,8*R*,8'*R*)-3,5,3',5'-tetramethoxy-4,4',7-trihydroxy-9,9'-epoxylignan (**PV1**), 8*α*-hydroxyoplop-11(12)-en-14-on (**PV5**) và (1*R*,2*S*,4*S*)-2-*E*-cinnamoyloxy-4-acetyl-1-methylcyclohexan-1-ol (**PV12**); 8 hợp chất lần đầu tiên phân lập được từ chi *Phaeanthus* là: 8*R*,8'*R*-bishydroxyringenin (**PV2**), (+)-5,5'-dimethoxylariciresinol (**PV3**), spathulenol (**PV6**), 1*α*H,5*β*H-aromandendrane-4*β*,10*α*-diol (**PV7**), 1*α*H,5*β*H-aromandendrane-4*α*,10*α*-diol (**PV8**), 1*β*H,5*β*H-aromandendrane-4*α*,10*β*-diol (**PV9**), 3*α*,4*β*-dihydroxybisabola-1,10-dien (**PV10**), nerolidol (**PV11**); 2 hợp chất lần đầu tiên phân lập được từ loài *P. vietnamensis* Ban là thalifolin (**PV14**) và moupinamid (**PV15**).

3. Về độc tính và tác dụng sinh học.

* **Độc tính cấp:** Đã xác định được liều LD₅₀ của cao lỏng lá (**CL1**) bằng đường uống là 135,63 (118,97÷154,62) g/kg ở $p = 0,05$. Chưa xác định được LD₅₀ của cao lỏng thân cành (**CL2**) với liều tối đa chuột có thể dung nạp là 550 g/kg.

* **Độc tính bán trường diễn:** Cao lỏng lá (**CL1**), cao lỏng thân cành (**CL2**) cây thuốc Thượng an toàn ở các mức liều 2 g và 4 g/kg/ngày khi dùng trên chuột cống trong thời gian 60 ngày.

* **Chống viêm:** Cao lỏng **CL1** và **CL2** với các mức liều 1,4 g/kg và 2,8 g/kg đều có tác dụng chống viêm khớp, tương đương với thuốc tham chiếu indomethacin liều 10 mg/kg;

Cao lỏng **CL1** và **CL2** với các mức liều 1,4 g/kg và 2,8 g/kg đều có tác dụng chống viêm cấp và viêm mạn, tương đương với thuốc tham chiếu diclofenac liều 15 mg/kg.

* **Giảm đau:** Cao lỏng **CL1** và **CL2** với mức liều 1,4 g/kg và 2,8

g/kg đều có tác dụng giảm đau trên tổ chức viêm, tương đương với thuốc tham chiếu diclofenac liều 15 mg/kg;

Caolông **CL1** và **CL2** với các mức liều 2,4 g/kg và 4,8 g/kg đều có tác dụng giảm đau trên mô hình gây đau quặn, tương đương với thuốc tham chiếu diclofenac liều 20 mg/kg;

Caolông **CL1** và **CL2** với các mức liều 2,4 g/kg và 4,8 g/kg đều có chiều hướng làm tăng thời gian phản ứng đau trên mô hình gây đau bởi mâm nóng tuy nhiên chưa có ý nghĩa thống kê.

*** Tác dụng của các hợp chất phân lập từ cây thuốc Thượng:**

Trong số 14 hợp chất được thử hoạt tính gây độc 04 dòng tế bào ung thư (HepG-2, MCF-7, LU-1, Jurkat), hợp chất **PV6** (spathulenol) có hoạt tính trên 3 dòng tế bào: Jurkat (với $IC_{50}=42,00 \mu M$), HepG-2 (với $IC_{50}=44,64 \mu M$), MCF-7 (với $IC_{50}=53,88 \mu M$). Các hợp chất **PV1**, **PV5**, **PV8-PV11**, **PV14** thể hiện hoạt tính yếu với IC_{50} trong khoảng 109,11-186,72 μM .

Trong số 12 hợp chất được lựa chọn thử hoạt tính kháng viêm: hợp chất **PV6** (spathulenol) thể hiện khả năng ức chế mạnh sản sinh NO với giá trị IC_{50} là $15,7 \pm 1,2 \mu M$. Các hợp chất **PV2**, **PV8** và **PV9** thể hiện khả năng đáng kể ức chế sản sinh NO với giá trị IC_{50} từ 22,6 tới 25,3 μM .

KIẾN NGHỊ

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

- Nghiên cứu tạo ra chế phẩm thuốc từ lá, thân cành cây thuốc Thượng theo hướng chống viêm và giảm đau để chăm sóc sức khỏe cộng đồng.

CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ

1	Nguyễn Trung Tường, Phạm Thanh Kỳ, Nguyễn Xuân Nhiệm (2016), “Nghiên cứu đặc điểm hình thái và đặc điểm vi học loài thuốc Thượng (<i>Phaeanthus vietnamensis</i> Ban)”, Tạp chí Dược học, số 04/2016 (Số 480 năm 56), trang: 60-64.
2	Nguyễn Trung Tường, Nguyễn Hoàng Ngân, Phạm Thanh Kỳ, Nguyễn Xuân Nhiệm (2016), “Nghiên cứu tính an toàn của cao lỏng lá cây thuốc Thượng”, Tạp chí Dược học, số 05/2016 (Số 481 năm 56), trang: 38-40.
3	Nguyễn Trung Tường, Phạm Thanh Kỳ, Phan Văn Kiệm, Nguyễn Xuân Nhiệm (2016), “Các hợp chất alkaloid phân lập từ lá cây thuốc Thượng (<i>Phaeanthus vietnamensis</i> Ban)”, Tạp chí Khoa học và công nghệ Việt Nam, tập 9 số 10, trang: 16-19.
4	Nguyen Trung Tuong, Pham Thanh Ky, Tran Minh Ngoc, Do Thi Ha, Phan Van Kiem, Nguyen Xuan Nhiem (2017), “Sesquiterpenes from <i>Phaeanthus vietnamensis</i> Ban”, Journal of Medicinal Materials, 2017, Vol. 22, No. 3, 141-146.
5	Nguyen Xuan Nhiem, Nguyen Trung Tuong, Pham Thanh Ky, Lalita Subedi, Seon Ju Park, Tran Minh Ngoc, Pham Hai Yen, Bui Huu Tai, Tran Hong Quang, Phan Van Kiem, Sun Yeou Kim, Seung Hyun Kim (2017), “Chemical Components from <i>Phaeanthus vietnamensis</i> and Their Inhibitory NO Production in BV2 Cells”, Chem Biodivers. 2017 Aug;14(8). doi: 10.1002/cbdv.201700013. Epub 2017 Jul 14.