

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

VIỆN DƯỢC LIỆU



NGUYỄN VĂN LĨNH

**NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN HÓA HỌC
VÀ MỘT SỐ TÁC DỤNG SINH HỌC CÂY TIÊN HẠC THẢO
(*AGRIMONIA PILOSA* LEDEB. VAR. *PILOSA*)**

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SỸ DƯỢC HỌC
Chuyên ngành: Dược liệu - Dược học cổ truyền
Mã số: 9720206

HÀ NỘI, NĂM 2019

Luận án này thực hiện tại: Viện Dược liệu - Bộ Y Tế

Người hướng dẫn khoa học:

- 1. GS.TS. Phạm Thanh Kỳ**
- 2. PGS.TS. Vũ Mạnh Hùng**

Phản biện 1:

Phản biện 2:

Phản biện 3:

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

Vào hồi ... giờ.... ngày... tháng... năm 201...

Có thể tìm hiểu luận án tại:

- Thư viện Quốc gia
- Thư viện Viện Dược liệu
- Thư viện trường Đại học Dược Hà Nội

CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. Nghiên cứu xây dựng tiêu chuẩn cơ sở của cao lỏng Tiên hạc thảo (*Agrimonia pilosa* Ledeb. var. *pilosa*) Tạp chí Y dược học cổ truyền quân sự Số 2, tập 4, ISSN 1859-3755, năm 2014.
2. Nghiên cứu độc tính bán trường diễn của cao lỏng phần rễ cây Tiên hạc thảo. Tạp chí Y dược học cổ truyền Số 2, tập 6, ISSN 1859-3755, năm 2016.
3. Nghiên cứu độc tính của cao lỏng phần trên mặt đất cây Tiên hạc thảo Tạp chí Dược học Số 488 – năm thứ 56, ISSN 0866-7861, 12/2016.
4. Hai hợp chất phenolic glycosid phân lập từ phần trên mặt đất cây Tiên hạc thảo (*Agrimonia pilosa* Ledeb. var. *pilosa*) Tạp chí Dược học Số 494 – năm thứ 57, ISSN 0866-7861, 6/2017.
5. Hai flavanol-glucosid phân lập từ phần trên mặt đất cây Tiên hạc thảo (*Agrimonia pilosa* Ledeb. var. *pilosa*) Tạp chí Dược học Số 495 – năm thứ 57, ISSN 0866 – 7861, 7/2017.
6. Phenolic Components from the Aerial Parts of *Agrimonia pilosa*. Natural product communications Vol. 12. Issue 7. Page 1079 -1080, 2017.
7. Lignan and flavonoids from aerial parts of *Agrimonia pilosa* Ledeb. Journal of Medicinal Materials Vol. 22, No.3, 2017 (pp.146-151).
8. Flavonoids and flavan-3-ol from aerial part of *Agrimonia pilosa* LEDEB. Journal of Multidisciplinary Engineering Science and Technology (JMEST) Vol. 4 Issue 10. October – 2017 ISSN : 2458-9403.

A. GIỚI THIỆU LUẬN ÁN

1. Đặt vấn đề

Việt Nam nằm trong vùng khí hậu nhiệt đới, có nguồn tài nguyên thực vật rất phong phú và đa dạng, trong đó có hơn 5.000 loài cây thuốc. Nhân dân ta từ lâu đã biết sử dụng cây cỏ để phòng và chữa bệnh nhưng cho tới nay mới có rất ít cây thuốc được nghiên cứu một cách hệ thống và đầy đủ, đưa ra dạng bào chế hiện đại sử dụng trong cộng đồng. Tuy nhiên còn nhiều cây thuốc vẫn còn sử dụng tùy theo từng địa phương, chưa được nghiên cứu hoặc nghiên cứu chưa hệ thống và đầy đủ, nhất là thành phần hóa học và tác dụng sinh học.

Tiên hạc thảo hay còn gọi là Long nha thảo *Agrimonia pilosa* Ledeb. var. *pilosa* là cây mọc tự nhiên ở một số tỉnh miền núi phía Bắc. Theo kinh nghiệm dân gian toàn cây được sắc uống trị thổ huyết, băng huyết, đại tiện ra máu, li, sốt rét, tràng nhạc, ung thũng. Tuy nhiên, việc sử dụng mới chỉ dừng lại ở kinh nghiệm, ở Việt Nam chưa có nhiều nghiên cứu về Tiên hạc thảo. Để xác minh cơ sở khoa học cho việc sử dụng Tiên hạc thảo làm thuốc, đề tài: "**Nghiên cứu thành phần hóa học, một số tác dụng sinh học cây Tiên hạc thảo (*Agrimonia pilosa* Ledeb.var. *pilosa*)**" được thực hiện với mục tiêu :

1. Nghiên cứu về đặc điểm thực vật để thẩm định tên khoa học và xác định được đặc điểm vi học của mẫu nghiên cứu.
2. Chiết xuất, phân lập và xác định cấu trúc hóa học các hợp chất phân lập được từ mẫu nghiên cứu.
3. Nghiên cứu độc tính và một số tác dụng sinh học trên thực nghiệm góp phần chứng minh tác dụng chữa bệnh của Tiên hạc thảo theo kinh nghiệm dân gian.

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 Tiên hạc thảo.

***Về hóa học**

- Định tính các nhóm chất trong dược liệu nghiên cứu.

- Chiết xuất phân lập một số hợp chất trong phần trên mặt đất và rễ 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 toàn phần.

- Đánh giá tác dụng chống viêm, chống oxy hóa, bảo vệ gan của dịch chiết phần trên mặt đất và rễ cây.

- Thử tác dụng ức chế một số dòng tế bào ung thư (in vitro) của các chất sạch đã phân lập được.

3. Ý nghĩa của luận án

Đây là lần đầu tiên loài Tiên hạc thảo mọc 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 Tiên hạc thảo ở Việt Nam 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.

- Lần đầu trình bày đầy đủ đặc điểm vi học góp phần nhận biết và tiêu chuẩn hóa dược liệu.

- Kết quả nghiên cứu về thành phần hóa học đã phát hiện 18 hợp chất lần đầu tiên phân lập từ loài *Agrimonia pilosa* Ledeb. var. *pilosa*. Trong đó có 2 hợp chất mới.

- 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, chống oxy hóa bảo vệ gan, 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 xác định đầy đủ tên khoa học của mẫu nghiên cứu, mô tả chi tiết đặc điểm thực vật, đặc điểm vi học góp phần tiêu chuẩn hóa và kiểm nghiệm dược liệu.

4.2. Về hóa học

- Kết quả định tính cho thấy phần trên mặt đất và phần rễ Tiên hạc thảo đều chứa các nhóm chất: tanin, chất béo, steroid, flavonoid và saponin. Trong đó flavonoid là nhóm chất chính.

- Đã phân lập và xác định cấu trúc hóa học 18 hợp chất (15 hợp chất từ phần trên mặt đất và 07 hợp chất từ rễ có 04 hợp chất trùng với phần trên mặt đất). Trong đó có 2 hợp chất mới, 7 hợp chất lần đầu tiên công bố phân lập từ chi *Agrimonia*, 01 hợp chất lần đầu tiên công bố từ loài *Agrimonia pilosa*.

4.3. Về độc tính và tác dụng sinh học

- Lần đầu tiên công bố Tiên hạc thảo không có độc tính cấp và không có độc tính bán trường diễn ở mức liều sử dụng và bằng đường uống

- Lần đầu tiên công bố: Cao lỏng phần trên mặt đất (CL1) và cao lỏng phần rễ (CL2) của Tiên hạc thảo liều 2,1g/kg và 4,2g/kg ttc đều có tác dụng làm giảm khối lượng u hạt rõ rệt so với nhóm chứng ($p < 0,05$) và đều có tác dụng chống viêm mạn tương đương với diclofenac 15mg/kg thể trọng chuột.

- Đã chứng minh Cao lỏng phần trên mặt đất CL1 và cao lỏng rễ CL2 của Tiên hạc thảo có tác dụng bảo vệ gan, chống oxy hóa trên mô hình gây tổn thương gan chuột bằng CCl_4 .

* Thử nghiệm khả năng ức chế sinh NO của 09 chất sạch phân lập được cho thấy chất BAP-4 thể hiện hoạt tính ức chế sinh NO ở mức yếu

với giá trị $IC_{50} = 91,07 \mu\text{g/ml}$. Các mẫu còn lại chưa thể hiện hoạt tính ở các nồng độ nghiên cứu.

Thử nghiệm đánh giá hoạt tính gây độc trên 3 dòng tế bào ung thư cho thấy cả 09 chất sạch được phân lập được từ cây Tiên hạc thảo đều không có tác dụng.

5. Bố cục của luận án gồm:

Luận án có 146 trang, gồm 4 chương, 52 bảng, 52 hình, 121 tài liệu tham khảo và 23 phụ lục. Các phần chính trong luận án: đặt vấn đề (2 trang), tổng quan (33 trang), nguyên, vật liệu và phương pháp nghiên cứu (24 trang), kết quả nghiên cứu (68 trang), bàn luận (17 trang), kết luận và kiến nghị (2 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 *Agrimonia* L. 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 Tiên hạc thảo có đầy đủ các bộ phận (rễ, thân, lá, hoa, quả, hạt) thu thập tại huyện Trùng Khánh, tỉnh Cao Bằng tháng 08 năm 2013.

Tiêu bản được lưu giữ tại Phòng tiêu bản Khoa tài nguyên dược liệu - Viện Dược liệu - NIMM (số hiệu TB-9965A, TB-9965B) và phòng Tiêu bản thực vật Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

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 dược liệu bằng phương pháp hiển vi.

- Định tính các nhóm chất bằng phản ứng hóa học đặc trưng.

- 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 của cao lỏng CL1, CL2 theo phương pháp của Litchfield – Wilcoxon.

- Thử độc tính bán trường diễn của cao lỏng CL1, CL2.

- Thử tác dụng chống viêm cấp và viêm mạn

- Thử tác dụng giảm đau trên mô hình gây đau bởi phiến nóng.

- Thử tác dụng bảo vệ gan, chống oxy hóa trên mô hình gây tổn thương gan cấp bằng CCl₄.

- Thử tác dụng gây độc tế bào ung thư *in vitro* của các chất sạch phân lập từ Tiên hạc thảo, đối với dòng tế bào ung thư gan: (Hep G2), ung thư vú (MCF-7) và dòng tế bào ung thư phổi (Lu-1).

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 *Agrimonia* L. của Li Chaoluan và cộng sự (2003) cho phép khẳng định các mẫu Tiên hạc thảo thu hái ở Trùng Khánh, Cao Bằng là *Agrimonia pilosa* Ledeb. var. *pilosa*, họ Rosaceae.

3.1.2. Đặc điểm vi học

***Vi phẫu lá:** phần gân chính phía trên hơi lõm, phía dưới lồi ngoài cùng là lớp biểu bì cấu tạo từ một hàng tế bào tròn, nhỏ xếp đều đặn, rải rác có lông che chở, sau biểu bì là mô dày. Bó libe gỗ gân chính gồm cung libe bao phía dưới mô gỗ. Rải rác có các tinh thể calci oxalat hình khối hoặc hình cầu gai, các tế bào mô mềm lớn, thành mỏng. Phần phiến lá có biểu bì giống phần gân lá, mô giậu thường không rõ các lớp tế bào.

*** Vi phẫu võ thân:** mặt cắt thân tròn, từ ngoài vào trong có lớp biểu bì tế bào nhỏ rải rác có lông che chở. Dưới biểu bì là mô dày cấu tạo từ 2-3 lớp tế bào nhỏ thành dày. Mô cứng tập hợp thành từng đám, các đám này tạo thành vòng gần liên tục. Mô mềm có các tế bào lớn, hình đa giác thành mỏng. Bó libe - gỗ bao gồm cung libe nằm ở phía trên mô gỗ. Mô mềm ruột là những tế bào to, hình đa giác, thành mỏng.

***Đặc điểm bột dược liệu:** Bột dược liệu có màu xám, mùi đặc biệt, vị nhạt. Soi dưới kính hiển vi thấy những mảnh biểu bì thân, lá, những mảnh mô mang tinh thể calci oxalat hình khối, hình cầu gai, những mảnh phiến lá thường mang các bó mạch dẫn và các tinh thể calci oxalat hình khối, mảnh mô mềm mang lông che chở hoặc lông tiết. Lông tiết có chân 2-3 tế bào, đầu cấu tạo từ 4-6 tế bào. Một số lông che chở bề mặt có các mụn lồi. Nhiều mảnh biểu bì mang lỗ khí. Rải rác có các tinh thể calci oxalat hình cầu gai, hình khối, những mảnh mạch và các tế bào mô cứng có thành dày.

3.2. Kết quả nghiên cứu về thành phần hóa học

3.2.1. Định tính các nhóm chất hữu cơ

Kết quả định tính kết luận cây Tiên hạc thảo có chứa các nhóm chất: tanin, chất béo, steroid, flavonoid và saponin.

3.2.2. Chiết xuất và phân lập các hợp chất

Phần trên mặt đất mẫu nghiên cứu (5kg) được nghiền nhỏ, ngâm chiết trong methanol (10L x 3 lần, mỗi lần 60 phút). Cát loại methanol được 700 g cặn chiết. Cặn chiết được chiết lần lượt bằng dichloromethan và ethyl acetat. Loại dung môi được cặn dichloromethan BAP-D (320 g), ethyl acetat BAP-E (80 g), cặn nước BAP-W (80 g) và phần không tan khi chiết BAP-S (200 g). Phần BAP-E (80 g) được phân tách trên cột sắc ký, được 7 phân đoạn từ BAP-1A đến BAP-1H. Phần BAP-1D (10 g) tiến hành sắc ký cột silica gel pha đảo được 7 phân đoạn là BAP-2A (200 mg), BAP-2B (300 mg), BAP-2C (500 mg), BAP-2D (2 g), BAP-2E (1 g), BAP-2G (1 g) và BAP-2H (2 g) tương ứng. BAP-2D tiến hành sắc ký trên cột silica gel pha thường được 3 phân đoạn nhỏ là BAP-3A (500 mg), BAP-3B (300 mg) và BAP-3C (1 g). BAP-3A tiến hành sắc ký trên cột silica gel pha đảo được chất sạch BAP-1 (50 mg). BAP-3B tiến hành sắc ký trên cột silica gel pha đảo được chất sạch BAP-2 (15 mg). BAP-2E tiến hành phân lập trên cột silica gel pha đảo được 3 phân đoạn BAP-4A (100 mg), BAP-4B (500 mg) và BAP-4C (300 mg). BAP-4A phân lập trên cột silica gel pha đảo được chất sạch BAP-6 (7 mg). BAP-4B tiến hành sắc ký trên cột silica gel pha đảo được chất sạch BAP-4 (10 mg) và BAP-4B1 (100 mg), BAP-4B2 (150 mg). Chất sạch BAP-5 (7 mg) thu được bằng cách tiến hành sắc ký lớp mỏng điều chế phân đoạn BAP-4B1. Chất sạch BAP-31 (7 mg) thu được bằng sắc ký cột pha thường từ phân đoạn BAP-4B2 (150 mg). BAP-2C được phân lập trên cột sephadex LH-20 được chất sạch BAP-8 (40 mg). BAP-2G tiến hành sắc ký trên cột silica gel pha đảo được 4 phân đoạn BAP-5A (150 mg), BAP-5B (200 mg), BAP-5C (200 mg) và BAP-5D (300 mg). BAP-5A tiến hành sắc ký trên cột silica gel pha đảo được chất sạch BAP-12 (8 mg). BAP-5D tiến hành sắc ký trên cột sephadex LH-20, được chất sạch BAP-13 (15 mg). Cặn chiết nước (BAP-

W = 80g) cho chạy qua cột dianion HP-20, được 3 phân đoạn: BAP-6A (5 g), BAP-6B (15 g) và BAP-6C (20 g). Phân đoạn BAP-6A (5g) được phân lập trên cột silica gel pha đảo được 3 phân đoạn là BAP-7A (1 g), BAP-7B (300 mg) và BAP-7C (1 g). Phân đoạn BAP-7A tiếp tục sắc ký trên cột silica gel pha thường, được chất sạch BAP-16 (16 mg). Phân đoạn BAP-7B được phân tách trên cột sephadex LH-20, được phân đoạn BAP-7B1 (30 mg). Chất sạch BAP-20 (5 mg) thu được bằng cách tinh chế phân đoạn BAP-7B1 trên bản mỏng điều chế. Phân đoạn BAP-7C tiến hành sắc ký cột silica gel pha đảo được phân đoạn BAP-7C1 (50 mg). Chất sạch BAP-18 (7 mg) thu được bằng cách tinh chế phân đoạn BAP-7C1 trên bản mỏng điều chế. Phân đoạn BAP-6B (15 g) được phân tách trên cột sắc ký silica gel pha thường, được 3 phân đoạn BAP-8A (1 g), BAP-8B (3 g) và BAP-8C (5 g). BAP-8A tiến hành sắc ký cột silica gel pha thường được phân đoạn BAP-8A1 (200 mg). BAP-8A1 tiến hành sắc ký trên cột sephadex LH-20, được chất sạch BAP-28 (7 mg). BAP-8B tiến hành sắc ký cột silica gel pha đảo được phân đoạn BAP-8B1 (300 mg). Chất sạch BAP-29 (7 mg) thu được bằng cách tinh chế phân đoạn BAP-8B1 trên cột sephadex LH20. BAP-8C tiến hành sắc ký cột silica gel pha thường, được phân đoạn BAP-8C1 (400 mg). BAP-8C1 tiến hành sắc ký trên cột pha đảo, được chất sạch BAP-30 (10 mg).

Chiết xuất và phân lập các hợp chất từ phần rễ

Mẫu rễ Tiên hạc thảo khô (3kg) được nghiền nhỏ, ngâm chiết trong methanol (5 L x 3 lần, mỗi lần 60 phút). Cát loại methanol thu được 300 g cặn chiết. Cặn chiết được chiết lần lượt bằng diclometan và ethyl acetat (mỗi loại 3 lần, mỗi lần 2 lít). Loại dung môi thu được cặn diclometan BARD (60 g), ethyl acetat BARE (52 g) và lớp nước BARW. Cặn chiết nước cho chạy qua cột Dianion HP-20, được 4 phân đoạn: BARW1 (6 g), BARW2 (12 g), BARW3 (8 g) và

BARW4 (15 g). Phân đoạn BARW2 tiến hành sắc ký cột silica gel pha đảo được 3 phân đoạn là BARW2A (3 g), BARW2B (2,5 g), BARW2C (4,3 g). Phân đoạn BARW2B tiếp tục phân tách trên cột sắc ký silica gel pha thường được 3 phân đoạn BARW3A (0,5 g), BARW3B (0,2 g) và BARW3C (1,2 g). Hợp chất BAR1 (10 mg) thu được sau khi tinh chế phân đoạn BARW3A trên cột sắc ký silica gel pha đảo. Hợp chất BAR2 (8 mg) thu được khi tiến hành tinh chế phân đoạn BARW3B trên cột Shephadex LH-20. Phân đoạn BARW2C được phân tách trên cột sắc ký sử dụng silica gel pha thường, được 3 phân đoạn chính là BARW4A (0,9 g), BARW4B (1,1 g) và BARW4C (1,3 g). Tinh chế BARW4A trên cột sắc ký pha thường được hợp chất BAR3 (11 mg). Hợp chất BAR4 (15 mg) thu được khi cho phân đoạn BARW4C qua cột sắc ký pha đảo. Cặn phân đoạn ethyl acetat được hòa tan bằng methanol, bổ sung silica gel pha thường tỉ lệ 1/1, trộn đều rồi cất loại dung môi đến khô, phân tách trên cột sắc ký silica gel pha thường, thu được 6 phân đoạn chính là BARE1, BARE2, BARE3, BARE4, BARE5, BARE6. Phân đoạn BARE1 (5,2 g) tiếp tục được phân tách thành 3 phân đoạn, BARE1A, BARE1B, BARE1C trên cột sắc ký silica gel pha thường. Phân đoạn BARE1A (1,2 g) được tinh chế trên cột sắc ký sử dụng silica gel pha thường thu được hợp chất BAR7 (40 mg). Hợp chất BAR9 (19 mg) thu được sau khi tinh chế phân đoạn BARE1C (0,9 g) trên cột sắc ký silica gel pha thường. BARE3 (4,8 g) được tách 4 phân đoạn nhỏ bằng cột sắc ký silica gel pha đảo BARE3A - BARE3D. Tinh chế BARE3C (0,8 g) trên cột sắc ký sử dụng silica gel pha thường, được hợp chất BAR6 (30 mg). Dựa trên kết quả đo phổ $^1\text{H-NMR}$ và $^{13}\text{C-NMR}$ cho thấy có 4 hợp chất phân lập được từ phần trên mặt đất trùng với 4 hợp chất phân lập được từ phần rễ cụ thể là BAR1

trùng với BAP-2, BAR2 trùng với BAP-8, BAR3 trùng với BAP-28 và BAR4 trùng với BAP-30.

Bằng phương pháp sắc ký cột từ phần trên mặt đất đã phân lập được 15 hợp chất ký hiệu là BAP-1, BAP-2, BAP-4, BAP-5, BAP-6, BAP-8, BAP-12, BAP-13, BAP-16, BAP-18, BAP-20, BAP-28, BAP-29, BAP-30, BAP-31. Từ phần rễ phân lập được 07 chất ký hiệu là BAR1, BAR2, BAR3, BAR4, BAR6, BAR7, BAR9, có 4 chất trùng với 4 chất đã phân lập ở phần trên mặt đất (BAR1 = BAP-2, BAR2 = BAP-8, BAR3 = BAP-28, BAR4 = BAP-30).

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

* **Hợp chất BAP-1 (Quercetin-3-O- β -D-galactopyranosid)** : thu được dạng chất bột, màu vàng. Phổ $^1\text{H-NMR}$ δ_{H} 7,66 (1H, dd, $J = 1,5, 8,5$ Hz), 7,53 (1H, brs) và 6,81 (1H, d, $J = 8,5\text{Hz}$); 6,38 (1H, s) và 6,18 (1H, s); 5,36 (1H, d, $J = 7,5$ Hz). Trên phổ $^{13}\text{C-NMR}$ và DEPT xuất hiện 21 tín hiệu carbon, bao gồm: 15 tín hiệu carbon đặc trưng cho một hợp chất flavonoid dạng quercetin (một tín hiệu carbon carbonyl tại δ_{C} 177,4; 9 tín hiệu carbon không liên kết trực tiếp với hydro; 5 tín hiệu carbon methin và 6 tín hiệu đặc trưng cho một đơn vị đường (một tín hiệu carbon anomer tại δ_{C} 101,8, 4 tín hiệu carbon oximethin và một tín hiệu carbon oxymethylen tại δ_{C} 60,1.

* **Hợp chất BAP-2 (=BAR-1) ((-)-Aromadendrin 3-O- β -D-glucopyranosid)**: thu được dưới dạng bột màu vàng. Phổ $^1\text{H-NMR}$: δ_{H} 7,34 (2H, d, $J = 8,5$ Hz) và 6,50 (2H, d, $J = 8,5$ Hz); δ_{H} 5,91 (2H, s) , δ_{H} 4,69 (1H, d, $J = 7,5$ Hz). Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ và HSQC xác định hợp chất BAP-2 có 21 tín hiệu C với 15 tín hiệu đặc trưng cho một hợp chất dạng flavonoid và 01 phân tử đường. Bao gồm δ_{C} ppm 83,4(C-2), 77,7(C-3), 196,4 (C-4), 165,5(C-5), 97,3(C-6), 169,2(C-7), 96,4(C-8), 164,1(C-9), 102,3(C-10), 128,5(C-1'), 130,5(C-2'), 115,9(C-3'), 159,0(C-4'),

115,9(C-5'), 130,5(C-6'), 104,6(C-1''), 75,5(C-2''), 77,9(C-3''), 71,6(C-4''), 77,8(C-5''), 62,9(C-6''). Cấu hình tuyệt đối tại vị trí C2 và C3 được xác định là (2*S*, 3*S*) dựa trên kết quả phân tích phổ lưỡng sắc tròn (CD) của hợp chất BAP-2 [CD (MeOH): $[\theta]^{25}(\text{nm})$ - 2.816 (320), + 4.036 (292), + 2.983 (230), - 4.910 (215)] .

* **Hợp chất BAP-4 (Naringenin-7-*O*- β -D-glucopyranosyd)**: Bột vô định hình màu vàng. Phổ $^1\text{H-NMR}$: 1,4 tại δ_{H} 7,34 (2H, d, $J = 8,5$ Hz) và 6,84 (2H, d, $J = 8,5$ Hz); δ_{H} 6,21 (1H, s) và 6,23 (1H, s); δ_{H} 5,00 (1H, d, $J = 7,5$ Hz). Phổ $^{13}\text{C-NMR}$, 80,6(C-2), 44,1(C-3), 198,5(C-4), 164,6(C-5), 98,0(C-6), 167,0(C-7), 96,9(C-8), 164,6(C-9), 105,0(C-10), 130,9(C-1'), 129,1(C-2', 6'), 116,4(C-3', 5'), 159,1(C-4'), 104,6(C-1''), 75,5(C-2''), 77,9(C-3''), 71,6(C-4''), 77,8(C-5''), 62,9(C-6''). Tương tác HMBC giữa 2 proton H-2'/H-6' (δ_{H} 7,34) với C-2 (δ_{C} 83,4)/ C-4' (δ_{C} 159,1); giữa proton H-2 (δ_{H} 5,40) với C-3(δ_{C} 44,1)/ C-4 (δ_{C} 198,5)/ C-1' (δ_{C} 130,9)/C-2',C-6'(δ_{C} 129,1) và giữa proton anome H-1'' (δ_{H} 5,00) với C-7 (δ_{C} 167,0) cho phép khẳng định đây là một hợp chất dạng flavanon với sự có mặt của phân tử đường glucose tại vị trí C-7.

* **Hợp chất BAP-5 (Leucosid)**: chất rắn màu vàng. Trên phổ khối lượng xuất hiện pic m/z 603,2 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, suy ra $M = 580$ tương ứng với công thức $\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{O}_{15}$. Phổ $^1\text{H-NMR}$: δ_{H} 8,09 (2H, d, $J = 8,5$ Hz), 6,91 (1H, d, $J = 8,5\text{Hz}$); 2 tín hiệu proton vòng thơm δ_{H} 6,41 (1H, s) và 6,22 (1H, s); 2 proton anome δ_{H} 5,46 (1H, d, $J = 7,5$ Hz) và 4,77 (1H, d, $J = 6,5$ Hz). Phổ $^{13}\text{C-NMR}$: 158,5(C-2), 135,0(C-3), 179,6(C-4), 160,0(C-5), 99,9(C-6), 162,2(C-7), 94,5(C-8), 158,5(C-9), 105,7(C-10), 122,8(C-1'), 132,3(C-2', 6'), 116,2(C-3', 5'), 161,5(C-4'), 100,9(C-1''), 82,5(C-2''), 78,1(C-3''), 71,1(C-4''), 77,1(C-5''), 62,4(C-6''), 105,5(C-1'''), 75,0(C-2'''), 78,4(C-3'''), 71,0(C-4'''), 66,7(C-5''')

* **Hợp chất BAP-6 (Agrimopilosid A (Hợp chất mới))**: thu được dưới dạng chất bột, màu trắng. Công thức phân tử được xác định là $C_{16}H_{24}O_7$, [M-H]⁻ tại m/z 327,1453 trên phổ khối lượng phân giải cao HR-ESI-MS (tính toán lý thuyết cho công thức [$C_{16}H_{23}O_7$]: 327,1444). Khối lượng phân tử $M = 328$. Phổ ¹H-NMR : δ_H 6,45 (1H, t, $J = 2,0$ Hz), 6,41 (1H, t, $J = 2,0$ Hz) và 6,33 (1H, t, $J = 2,0$ Hz). δ_H 4,86 (1H, d, $J = 7,5$ Hz); δ_H 1,20 (3H, d, $J = 7,0$ Hz) và 0,83 (1H, t, $J = 7,0$ Hz). Phổ ¹³C-NMR 151,4(C-1), 107,9(C-2), 160,1(C-3), 102,5(C-4), 159,3(C-5), 109,2(C-6), 43,2(C-7), 32,0(C-8), 12,6(C-9), 22,3(C-10), 102,2(C-1'), 74,9(C-2'), 78,1(C-3'), 71,4(C-4'), 78,1(C-5'), 62,5(C-6'), phổ HSQC cho phép xác định sự có mặt một nhóm *sec*-butyl. (δ_C 160,1 và 159,3) . Phổ HMBC cho thấy có sự tương tác của proton thuộc nhóm methyl H-10 (δ_H 1,20) với C-1(δ_C 151,4)/ C-7 (δ_C 43,2)/ C-8 (δ_C 32,0); từ proton H-7 (δ_H 2,49) tới C-1 (δ_C 151,4)/ C-2 (δ_C 107,9)/ C-6 (δ_C 109,2). H-2 (δ_H 6,45) và proton anome H-1' (δ_H 4,86) tới C-3 (δ_C 160,1). Cấu hình tuyệt đối của hợp chất BAP-6 được xác định là *7R* dựa vào phân tích số liệu phổ CD trên cả 2 dải phổ CD âm (negative CD bands) tại ¹B_b và ¹L_a ($\theta_{192} = -1,84$ và $\theta_{228} = -0,87$). Đối chiếu với các tài liệu đã công bố, xác định đây là hợp chất mới, đề nghị đặt tên là Agrimopilosid A.

* **Hợp chất BAP-8 = (BAR2) (2S, 3S(-)-glucodistylin)**: Chất bột màu vàng. Trên phổ ¹H-NMR : δ_H 5,91 (2H, s), 6,78 (1H, d, $J = 8,0$ Hz), 6,82 (1H, d, $J = 8,0$ Hz) và 6,99 (1H, s); δ_H 4,69 (1H, d, $J = 8,0$ Hz) . Phổ ¹³C-NMR 83,4(C-2), 77,8(C-3), 196,1(C-4), 165,5(C-5), 96,4(C-6), 169,1(C-7), 97,4(C-8), 164,0(C-9), 102,3(C-10), 128,9(C-1'), 116,3(C-2'), 145,9(C-3'), 146,9(C-4'), 116,0(C-5'), 121,2(C-6'), 104,6(C-1''), 75,4(C-2''), 77,8(C-3''), 71,4(C-4''), 77,8(C-5''), 62,8(C-6'').

* **Hợp chất BAP-12 (Isolariciresinol-3 α -O- β -D-glucopyranosid)**: chất bột màu trắng. Phổ ¹H-NMR : δ_H 6,80 (1H, d, $J = 2,0$ Hz), 6,76 (1H, d, $J = 8,0$ Hz) và 6,66 (1H, dd, $J = 2,0, 8,0$ Hz); δ_H 6,67 (1H, s) và 6,20 (1H,

s); δ_{H} 4,14 (1H, d, $J = 7,5$ Hz) và i δ_{H} 3,83 (3H, s) và 3,20 (3H, s). Phổ ^{13}C -NMR 33,9(C-1), 39,6(C-2), 65,3(C-2a), 46,0(C-3), 69,6(C-3a), 47,9(C-4), 117,4(C-5), 145,2(C-6), 147,2(C-7), 112,5(C-8), 129,2(C-9), 134,4(C-10), 138,7(C-1'), 114,4(C-2'), 148,9(C-3'), 145,9(C-4'), 116,1(C-5'), 123,2(C-6'), 105,2(C-1''), 75,2(C-2''), 78,2(C-3''), 71,7(C-4''), 77,9(C-5''), 62,8(C-6''), 56,4(C-7-OCH₃), 56,5(C-3'-OCH₃).

* **Hợp chất BAP-13 (Agrimopilosid B (hợp chất mới))**: chất bột, màu trắng. Công thức phân tử của BAP-13 được xác định là C₁₅H₂₂O₇ bởi sự xuất hiện của pic ion giả phân tử [M-H]⁻ tại m/z 313,1298 trên phổ khối lượng phân giải cao HR-ESI-MS (tính toán lý thuyết cho công thức [C₁₅H₂₁O₇]⁻: 313,1287). $M = 313$. Trên phổ ^1H -NMR của hợp chất BAP-13 xuất hiện tín hiệu của 3 proton vòng thơm thế 1,3,5 tại δ_{H} 6,37 (1H, t, $J = 2,0$ Hz), 6,41 (1H, t, $J = 2,0$ Hz), và 6,50 (1H, t, $J = 2,0$ Hz); một proton anomer δ_{H} 4,86 (1H, d, $J = 7,5$ Hz); 6 proton thuộc nhóm CH₃ δ_{H} 1,21 (6H, d, $J = 7,0$ Hz). Phổ ^{13}C -NMR 152,6(C-1), 107,3(C-2), 160,1(C-3), 102,5(C-4), 159,3(C-5), 108,6(C-6), 35,5(C-7), 24,2(C-8), 24,3(C-9), -(C-10), 102,2(C-1'), 74,9(C-2'), 78,1(C-3'), 71,4(C-4'), 78,1(C-5'), 62,5(C-6'). Đối chiếu với các tài liệu xác định đây là một hợp chất mới, đề nghị đặt tên là Agrimopilosid B.

* **Hợp chất BAP-16 (Vanilic acid-4-O- β -D-glucopyranosid)**: chất dạng dầu, không màu. Trên phổ khối lượng xuất hiện pic m/z 353 [M + Na]⁺, suy ra $M = 330$ tương ứng với công thức C₁₄H₁₈O₉.

Trên phổ ^1H -NMR xuất hiện 3 proton thơm: δ_{H} 7,64 (1H, s), 7,20 (1H, d, $J = 8,5$ Hz), 7,63 (1H, d, $J = 8,5$ Hz); δ_{H} 5,02 (1H, d, $J = 7,5$ Hz) và 3 proton của nhóm methoxy δ_{H} 3,91 s. Phổ ^{13}C -NMR 128,8(C-1), 114,5(C-2), 150,1(C-3), 151,2(C-4), 116,4(C-5), 124,5(C-6), 171,0(C-7), 102,1(C-1'), 74,8(C-2'), 77,8(C-3'), 71,3(C-4'), 78,2(C-5'), 62,4(C-6'), 56,7(C-3-OCH₃).

* **Hợp chất BAP-18 (Vanilloosid):** chất dạng dầu, không màu. Trên phổ khối lượng xuất hiện pic m/z 339 $[M + Na]^+$, suy ra $M = 316$ tương ứng với công thức $C_{14}H_{20}O_8$. Phổ 1H -NMR xuất hiện các tín hiệu của vòng thơm thế 1,3,4 tại δ_H 7,04 (1H, d, $J = 2,0$ Hz), 7,15 (1H, d, $J = 8,0$ Hz) và 6,90 (1H, dd, $J = 2,0, 8,0$ Hz, H-6); 01 proton anomer 4,89 (1H, d, $J = 7,5$ Hz), 01 nhóm methoxy δ_H 3,89 (3H, s) và 2 proton oxymetylen ở δ_H 4,56 (2H, brs). Phổ ^{13}C -NMR 137,8(C-1), 112,7(C-2), 150,9(C-3), 147,3(C-4), 118,0(C-5), 120,7(C-6), 65,0(C-7), 103,0(C-1'), 74,9(C-2'), 77,9(C-3'), 71,4(C-4'), 78,2(C-5'), 62,5(C-6'), 56,7(C-3-OCH₃),

* **Hợp chất BAP-20 (Adenosin):** dạng bột vô định hình, màu trắng. Kết quả phân tích phổ 1H , ^{13}C -NMR, DEPT, HMBC và HSQC cho thấy đây là hợp chất dạng amino acid có chứa phân tử đường. Trên phổ ^{13}C và DEPT xuất hiện 10 tín hiệu carbon với 3 tín hiệu carbon bậc 4, 5 tín hiệu carbon methin với 2 tín hiệu carbon olefin của nối đôi và một tín hiệu carbon oximetylen. Phổ ^{13}C -NMR: -(C-1), 152.3(C-2), -(C-3), 149.0(C-4), 119.3(C-5), 156.1(C-6), -(C-7), 139.9(C-8), 87.9(C-1'), 73.4(C-2'), 70.6(C-3'), 85.8(C-4'), 61.6(C-5'), (C-2'-OH).

* **Hợp chất BAP-28 = (BAR3) (Quercetin):** chất bột màu vàng. Trên phổ 1H -NMR xuất hiện tín hiệu 5 proton vòng thơm thuộc 2 hệ tương tác spin-spin ABX [tại δ_H 7,42 (1H, d, $J = 2,0$ Hz), δ_H 6,88 (1H, d, $J = 8,5$ Hz) và δ_H 7,64 (1H, dd, $J = 8,5; 2,0$ Hz)] và AX tại [δ_H 6,18 (1H, d, $J = 2,0$ Hz) và δ_H 6,38 (1H, d, $J = 2,0$ Hz)] . Phổ ^{13}C -NMR 147,9(C-2), 137,2(C-3), 177,3(C-4), 162,4(C-5), 99,2(C-6), 165,5(C-7), 94,4(C-8), 158,2(C-9), 104,5(C-10), 124,1(C-1'), 116,0(C-2'), 146,2(C-3'), 148,7(C-4'), 116,2(C-5'), 121,7(C-6').

* **Hợp chất BAP-29 (Kaempferol):** chất bột màu vàng. Trên phổ 1H -NMR của BAP-29 xuất hiện tín hiệu 6 proton vòng thơm tại δ_H 6,20

(1H, brs), δ_H 6,40 (1H, brs), 6,92 (2H, d, $J = 8,5$ Hz), 8,08 (2H, d, $J = 8,5$ Hz). Bên cạnh đó, trên phổ $^{13}\text{C-NMR}$ và DEPT xuất hiện tín hiệu của 15 carbon, trong đó có 6 carbon methin và 9 carbon không liên kết trực tiếp với hydro. Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ 148,1(C-2), 137,1(C-3), 177,3(C-4), 162,4(C-5), 99,3(C-6), 165,5(C-7), 94,5(C-8), 158,2(C-9), 104,5(C-10), 123,7(C-1'), 130,7(C-2'), 116,3(C-3'), 160,5(C-4'), 116,3(C-5'), 130,7(C-6').

* **Hợp chất BAP-30 = (BAR4) (Rutin):** chất bột màu vàng. Trên phổ $^1\text{H-NMR}$ của BAP-30 có 5 proton vòng thơm δ_H 7,69 (1H, brs), 7,65 (1H, brd, $J = 8,5$ Hz), 6,89 (1H, d, $J = 8,5$ Hz), 6,42 (1H, brs), 6,23 (1H, brs); 2 proton anomer δ_H 5,12 (1H, d, $J = 7,5$ Hz) và 4,54 (1H, brs); một nhóm methyl 1,14 (3H, d, $J = 6,0$ Hz). Phổ $^{13}\text{C-NMR}$: 158,5(C-2), 135,6(C-3), 179,4(C-4), 163,0(C-5), 99,9(C-6), 166,0(C-7), 94,9(C-8), 159,4(C-9), 105,6(C-10), 123,1(C-1'), 117,7(C-2'), 145,8(C-3'), 149,8(C-4'), 116,1(C-5'), 123,6(C-6'), 104,7(C-1''), 75,7(C-2''), 78,2(C-3''), 71,4(C-4''), 77,2(C-5''), 68,6(C-6''), 102,4(C-1'''), 72,3(C-2'''), 72,1(C-3'''), 73,9(C-4'''), 69,7(C-5'''), 17,9(C-6''').

* **Hợp chất BAP-31 ((+)-Catechin):** dạng tinh thể, màu vàng. Phổ $^1\text{H-NMR}$ xuất hiện tín hiệu của 5 proton vòng thơm, δ_H 5,94 (1H, d, $J = 2,5$ Hz, H-6), 5,87 (1H, d, $J = 2,5$ Hz, H-8) và 3 proton thuộc vòng thơm thế 1,3,4 tại δ_H 6,85 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-2'), 6,78 (1H, d, $J = 8,0$ Hz, H-5'), 6,73 (1H, dd, $J = 2,0, 8,0$ Hz, H-6'). 01 nhóm methin δ_H 4,58 (1H, d, $J = 7,5$ Hz, H-2) và 2 proton nhóm methylen 2,53 (1H, dd, $J = 8,0, 16,0$ Hz), 2,87 (1H, dd, $J = 5,0, 16,0$ Hz). Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ 82,9(C-2), 68,8(C-3), 28,5(C-4), 157,8(C-5), 96,3(C-6), 157,6(C-7), 95,5(C-8), 155,9(C-9), 100,8(C-10), 132,2(C-1'), 115,3(C-2'), 146,3(C-3'), 146,3(C-4'), 116,1(C-5'), 120,0(C-6').

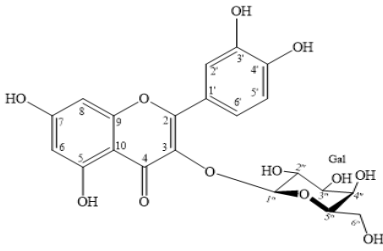
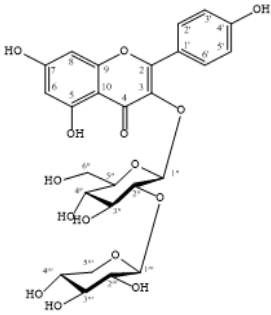
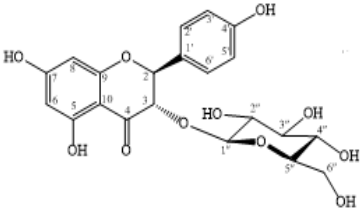
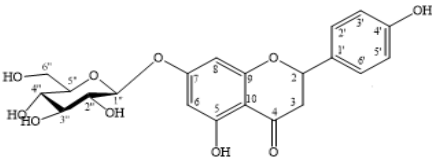
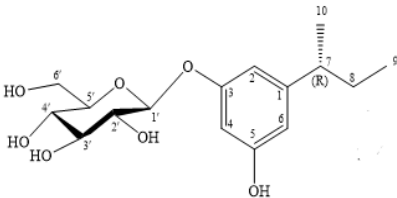
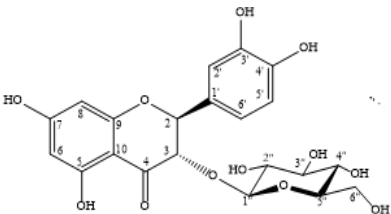
* **Hợp chất BAR7 (Agrimonolid)** : Hợp chất BAR7 thu được dưới dạng bột, màu vàng. Phổ $^1\text{H-NMR}$ của **BAR7** xuất hiện tín hiệu ABX tại δ_{H} 6,23 (1H, d, $J = 1,5$ Hz, H-5); 6,19 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-7); và một hệ A_2B_2 tại δ_{H} 6,85 (2H, d, $J = 8,5$ Hz, H-3' và H-5'); 7,15 (2H, d, $J = 8,5$ Hz, H-2' và H-6') . 01 nhóm methoxy, 3,71 (3H, s, OCH_3). Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ 169,3(C-1), 78,1(C-3), 32,1(C-4), 106,8(C-5), 164,5(C-6), 100,9(C-7), 163,4(C-8), 100,2(C-9), 142,2(C-10), 36,0(C-1''), 29,5(C-2''), 132,9(C-1'), 129,2(C-2'), 113,8(C-3'), 157,5(C-4'), 113,8(C-5'), 129,2(C-6'), 54,9(C-4'-OMe).

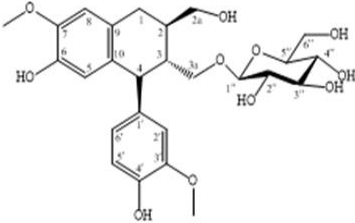
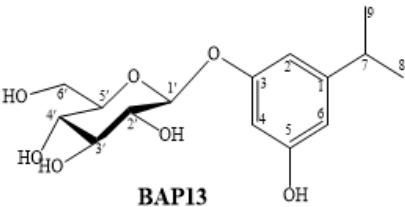
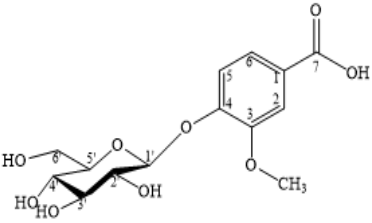
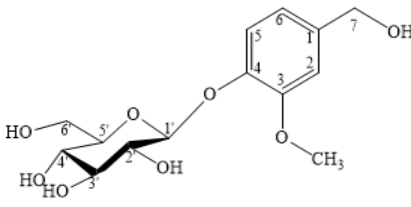
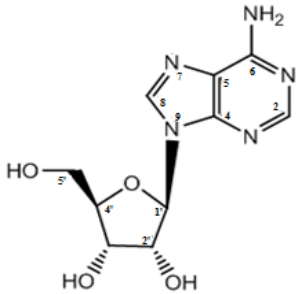
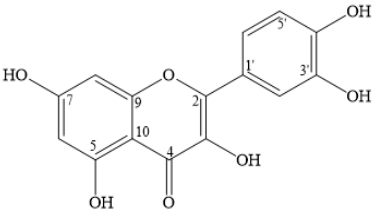
* **Hợp chất BAR6 (Agrimonolid-6-O- β -D-glucopyranosid)**: thu được dưới dạng bột vô định hình, không màu. $^1\text{H-NMR}$ xuất hiện một tín hiệu dạng ABX, 01 hệ A_2B_2 δ_{H} 6,49 (2H, s, H-5 và H-7); δ_{H} 6,85 (2H, d, $J = 8,5$ Hz, H-3' và H-5'); 7,16 (2H, d, $J = 8,5$ Hz, H-2' và H-6'); 01 proton anomer 4,97 (1H, d, $J = 7.0$ Hz), 3,71 (3H, s, OCH_3). Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ và DEPT 169,1(C-1), 78,4(C-3), 32,1(C-4), 107,2(C-5), 163,2(C-6), 101,7(C-7), 163,0(C-8), 102,5(C-9), 142,0(C-10), 35,9(C-1''), 29,5(C-2''), 132,8(C-1'), 129,2(C-2'), 113,8(C-3'), 157,5(C-4'), 113,8(C-5'), 129,2(C-6'), 55,0(C-4'-OMe), 99,7(C-Glc-1), 73,1(C-Glc-2), 76,4(C-Glc-3), 69,5(C-Glc-4), 77,1(C-Glc-5), 60,6(C-Glc-6).

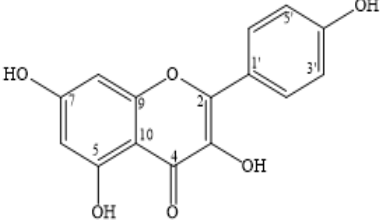
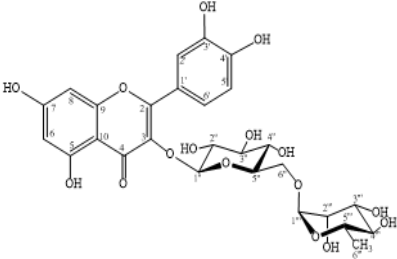
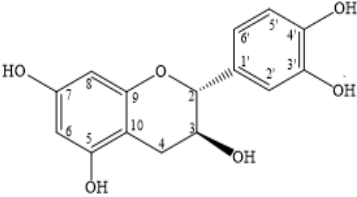
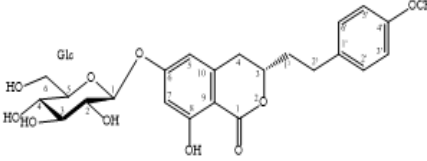
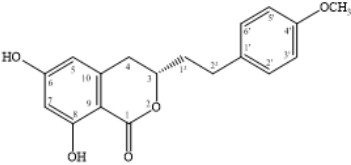
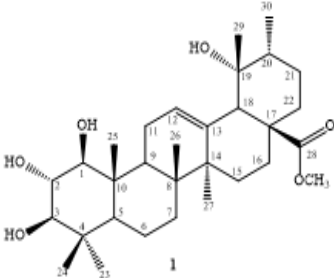
***Hợp chất BAR9 (1 β , 2 α , 3 β , 19 α -tetrahydroxyurs-12-en-28-oic acid)**: thu được dưới dạng bột, màu trắng. Phổ $^1\text{H-NMR}$ cho 7 tín hiệu methyl 0,79, 0,83, 1,02, 1,22, 1,28 và 1,01 và 0,95 (3H, d, $J = 6,5$ Hz). Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ 83,8(C-1), 73,6(C-2), 80,1(C-3), 39,0(C-4), 52,8(C-5), 18,1(C-6), 33,0(C-7), 41,3(C-8), 48,2(C-9), 43,0(C-10), 28,4(C-11), 130,2(C-12), 137,3(C-13), 40,6(C-14), 27,2(C-15), 26,2(C-16), 47,7(C-17), 53,3(C-18), 73,2(C-19), 41,3(C-20), 25,7(C-21), 37,8(C-

22), 28,6(C-23), 16,6(C-24), 12,6(C-25), 16,9(C-26), 24,5(C-27), nd(C-28), 27,2(C-29), 16,2(C-30), (C-COOMe).

Bảng tổng hợp công thức 18 chất phân lập được từ Tiên hạc thảo

<p>Hợp chất BAP-1: Quercetin-3-<i>O</i>-β-D-galactopyranosid</p> 	<p>Hợp chất BAP-5: Leucosid</p> 
<p>Hợp chất BAP-2 = BAR1 (-)-Aromadendrin-3-<i>O</i>-β-D-glucopyranosid</p> 	<p>Hợp chất BAP-4 Naringenin-7-<i>O</i>-β-D-glucopyranosid</p> 
<p>Hợp chất BAP-6: Agrimopilosid A (Hợp chất mới)</p> 	<p>Hợp chất BAP-8 = BAR2 2<i>S</i>, 3<i>S</i>-(-)-Glucodistylin</p> 

<p>Hợp chất BAP-12 Isolariciresinol-3α-O-β-D-glucopyranosid</p> 	<p>Hợp chất BAP-13 Agrimopilosid B (Hợp chất mới)</p>  <p>BAP13</p>
<p>Hợp chất BAP-16: Vanillic acid-4-O-β-D-glucopyranosid</p> 	<p>Hợp chất BAP-18: Vanillolosid</p> 
<p>Hợp chất BAP-20: Adenosin</p> 	<p>Hợp chất BAP-28 = BAR3 Quercetin</p> 

<p>Hợp chất BAP-29: Kaempferol</p> 	<p>Hợp chất BAP-30 = BAR4 Quercetin-3-<i>O</i>-rutinosid</p> 
<p>Hợp chất BAP-31 (+)-Catechin</p> 	<p>Hợp chất BAR6 Agrimonolid-6-<i>O</i>-β-<i>D</i>-glucopyranosid</p> 
<p>Hợp chất BAR7 Agrimonolid</p> 	<p>Hợp chất BAR9 $1\beta, 2\alpha, 3\beta, 19\alpha$-tetrahydroxyurs- 12-en-28-oic acid</p> 

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 phần trên mặt đất CL1 và cao lỏng phần rễ CL2

Ở lô thử chuột nhắt trắng đã uống cao lỏng ở mức liều thấp nhất tương đương 75,0g/kg thể trọng đến liều cao nhất tương đương 345,0g/kg thể trọng để đánh giá độc tính cấp của Tiên hạc thảo nhưng không có chuột nào chết, không xuất hiện triệu chứng bất thường nào, do đó chưa tìm thấy LD₅₀.

3.3.2. Về độc tính bán trường diễn

Kết quả nghiên cứu cho thấy ở các mức liều đã dùng, các cao lỏng CL1 và CL2 được cho thỏ uống liên tục trong 8 tuần không gây ảnh hưởng lên tình trạng chung và sự phát triển thể trọng của thỏ; không ảnh hưởng các sóng điện tim ở đạo trình DII của thỏ; 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 Tiên hạc thảo không có độc tính bán trường diễn, chứng tỏ dược liệu có tính an toàn cao khi sử dụng ở các mức liều và thời gian thử nghiệm dài ngày.

3.3.3. Tác dụng chống viêm

* Trên mô hình gây phù bàn chân chuột

Lô dùng cao lỏng CL1, CL2 liều cao (4,2g/kg thể trọng) có tác dụng ức chế phù bàn chân chuột tương đương với lô dùng Diclofenac liều 15mg/kg thể trọng ($p < 0,05$) (bảng 3.35).

* Trên mô hình gây u hạt bằng amiant

Cao lỏng phần trên mặt đất (CL1) và cao lỏng phần rễ (CL2) của Tiên hạc thảo liều 2,1g/kg và 4,2g/kg thể trọng chuột đều có tác dụng làm giảm khối lượng u hạt rõ rệt so với nhóm chứng ($p < 0,05$). Ở liều cao

CL1 và CL2 đều có tác dụng chống viêm mạn tương đương với diclofenac 15mg/kg thể trọng chuột (bảng 3.36).

3.3.4. Tác dụng giảm đau

* Trên mô hình gây phù viêm chân chuột bằng carrageenin cũng cho kết quả với liều 2,1g/kg thể trọng chuột và 4,2g/kg thể trọng chuột cao lỏng phần trên mặt đất (CL1) và cao lỏng phần rễ (CL2) đều có tác dụng giảm đau, làm tăng ngưỡng đau ($p < 0,05$) so với lô chứng bệnh lý, tác dụng giảm đau tương đương với diclofenac liều 15mg/kg thể trọng chuột (bảng 3.37).

* Với phương pháp Koster, gây đau bằng acid acetic Cao lỏng phần trên mặt đất (CL1) và cao lỏng phần rễ (CL2) với mức liều 3,6g dược liệu/kg và 7,2g dược liệu/kg thể trọng chuột đều làm giảm số cơn đau quặn ở chuột nhất so với lô chứng bệnh lý có ý nghĩa thống kê ($p < 0,01$) và có tác dụng giảm đau trên mô hình gây đau quặn tương đương với diclofenac liều 20mg/kg thể trọng chuột (bảng 3.38).

* Với phương pháp mâm nóng Cao lỏng phần trên mặt đất (CL1) và cao lỏng phần rễ (CL2) với liều 3,6g dược liệu/kg thể trọng chuột và liều 7,2g dược liệu/kg thể trọng chuột đều có thời gian đáp ứng đau của chuột dài hơn có ý nghĩa thống kê so với lô chứng bệnh lý ($p < 0,05$) (bảng 3.37). Như vậy, cao lỏng Tiên hạc thảo CL1 và CL2 ở cả 2 mức liều đều thể hiện tác dụng giảm đau trên mô hình gây đau bởi mâm nóng (bảng 3.39).

3.3.5. Tác dụng bảo vệ gan, chống oxy hóa

* *Bảo vệ gan:*
 Khi cho chuột uống cao lỏng phần trên mặt đất (CL1) và cao lỏng phần rễ (CL2) Tiên hạc thảo liều 3,6g/kg và liều 7,2g/kg liên tục trong 7 ngày trước khi gây độc đã hạn chế hoạt độ AST và ALT một cách rõ rệt, có ý nghĩa thống kê ($p < 0,01$) và có tác dụng bảo vệ tế bào gan tương đương silymarin liều 67mg/kg/24h (bảng 3.40).

Ở các lô gây độc gan có dùng CL1, CL2 ở 2 mức liều 3,6g/kg thể trọng chuột và 7,2g/kg thể trọng chuột đều giảm, sự khác biệt so với lô chứng sinh học có ý nghĩa thống kê với $p < 0,01$, và tương đương với lô dùng silymarin liều 67mg/kg (bảng 3.41).

* *Chống oxy hóa*: nghiên cứu đã cho thấy hàm lượng MDA gan chuột ở các lô gây độc bằng CCl_4 có dùng thuốc silymarin và CL1, CL2 ở 2 mức liều 3,6g/kg thể trọng chuột và 7,2g/kg thể trọng chuột đều giảm so với lô chứng gây độc, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,01$), tác dụng chống oxy hóa tương đương silymarin liều 67mg/kg.

3.3.6. Về tác dụng ức chế sinh NO và gây độc tế bào của các chất sạch chiết xuất từ Tiên hạc thảo.

09 chất sạch chiết xuất từ Tiên hạc thảo được khảo sát hoạt tính ức chế sinh NO và hoạt tính gây độc tế bào ung thư (Ung thư gan HepG2, ung thư vú MCF-7, ung thư phổi SK-LU-1). Kết quả cho thấy, chỉ có mẫu BAP-4 (Naringenin-7-O- β -D-glucopyranosid) thể hiện hoạt tính ức chế sinh NO ở mức yếu với giá trị $\text{IC}_{50} = 91,07 \mu\text{g/ml}$, các mẫu còn lại chưa thể hiện hoạt tính ở các nồng độ nghiên cứu. Với tác dụng gây độc tế bào ung thư (HepG2, MCF-7, SK-LU-1), các mẫu nghiên cứu chưa thể hiện hoạt tính ở các nồng độ nghiên cứu (0,8 $\mu\text{g/ml}$, 4 $\mu\text{g/ml}$, 20 $\mu\text{g/ml}$ và 100 $\mu\text{g/ml}$).

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 mô tả chi tiết có đầy đủ ảnh chụp kèm theo về đặc điểm hình thái thực vật xác định được tên khoa học của loài Tiên hạc thảo nghiên cứu thu hái ở huyện Trùng Khánh, Cao Bằng là: *Agriponia pilosa* Ledeb. var. *pilosa* thuộc họ **Rosaceae**.

- Đã xác định 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 phân lập và xác định cấu trúc hóa học 15 hợp chất từ phần trên mặt đất và 07 hợp chất từ rễ trong đó có 4 chất trùng với phần trên mặt đất loài *Agrimonia pilosa* Ledeb. var. *pilosa*.

* Trong 18 hợp chất đã phân lập có : 2 hợp chất mới là agrimopilosid A (BAP-6) và Agrimopilosid B (BAP-13); 7 hợp chất lần đầu tiên công bố phân lập từ chi *Agrimonia* là: Naringenin-7-*O*- β -D-glucopyranosid (BAP-4), Leucosid (BAP-5), 2*S*, 3*S*(-)-Glucodistylin (BAP-8 = BAR2), Isolariciresinol-3 α -*O*- β -D-glucopyranosid (BAP-12), Vanilic acid-4-*O*- β -D-glucopyranosid (BAP-16), Vanillolosid (BAP-18); Adenosin (BAP-20) và 01 hợp chất lần đầu tiên được phân lập từ loài *A. pilosa* là Quercetin-3-*O*- β -D-galactopyranosid (BAP-1). 08 hợp chất đã được công bố phân lập từ *Agrimonia pilosa* Ledeb là (-)-aromadendrin 3-*O*- β -D-glucopyranosid (BAP-2 = BAR1), quercetin (BAP28 = BAR3), kaempferol (BAP29), quercetin-3-*O*-rutinosid (BAP30 = BAR4), (+)-catechin (BAP31); agrimonolid-6-*O*- β -D-glucopyranosid (BAR6), agrimonolid (BAR7) và 1 β , 2 α , 3 β , 19 α -tetrahydroxyurs-12-en-28-oic acid (BAR9).

Kết quả nghiên cứu về thành phần hóa học đã góp phần làm phong phú thêm tri thức về hóa thực vật của chi *Agrimonia* L. nói chung và loài *Agrimonia pilosa* Ledeb. var. *pilosa* nói riêng.

3. Về độc tính và tác dụng sinh học.

* **Độc tính:** Cao lỏng phần trên mặt đất (CL1) cho chuột uống tối đa 360g dược liệu/kg và cao lỏng phần rễ (CL2) liều 345g/kg đều không quan sát thấy hiện tượng ngộ độc và không có chuột nào chết

sau 72 giờ theo dõi. Không xác định được liều LD₅₀.

* **Độc tính bán trường diễn** : Cao lỏng Tiên hạc thảo (CL1 và CL2) không thể hiện độc tính bán trường diễn trên mô hình thử nghiệm ở thỏ.

* **Chống viêm**: Các cao lỏng phần trên mặt đất CL1 và cao lỏng phần rễ CL2 của Tiên hạc thảo với các mức liều 2,1 và 4,2g/kg/ngày trên chuột đều thể hiện rõ tác dụng chống viêm cấp trên mô hình gây phù chân chuột bằng Carrageenin và tác dụng chống viêm mạn trên mô hình gây u hạt.

* **Tác dụng giảm đau** : Cao lỏng CL1 và CL2 của Tiên hạc thảo đều có tác dụng giảm đau trên tổ chức viêm, trên mô hình gây đau quặn và trên phiên nóng ở chuột nhắt trắng với liều thử nghiệm.

* **Chống oxy hóa, bảo vệ gan**: Các cao lỏng phần trên mặt đất (CL1) và cao lỏng phần rễ (CL2) của Tiên hạc thảo với các mức liều 3,6g và 7,2g/kg/ngày trên chuột nhắt trắng đều thể hiện rõ tác dụng chống oxy hóa (làm giảm MDA gan và phục hồi GSH gan) và bảo vệ gan (làm giảm AST, ALT, giảm trọng lượng tương đối của gan, giảm tổn thương mô bệnh gan so với lô chứng gây độc).

* **Tác dụng ức chế sinh NO và gây độc tế bào của 9 chất sạch**

Hợp chất Naringenin-7-*O*- β -D-glucopyranosid (BAP24) thể hiện hoạt tính ức chế sinh NO ở mức yếu với giá trị IC₅₀ = 91,07 μ g/ml. Còn 8 chất khác chưa thể hiện hoạt tính ức chế NO ở các nồng độ nghiên cứu.

09 chất sạch chưa thể hiện hoạt tính gây độc 3 dòng tế bào ung thư (HepG2, MCF-7, SK-LU-1) ở các nồng độ nghiên cứu (0,8 μ g/ml, 4 μ g/ml, 20 μ g/ml và 100 μ g/ml).

KIẾN NGHỊ

- Cần nghiên cứu dạng bào chế thích hợp từ Tiên hạc thảo để đánh giá tác dụng trên lâm sàng theo hướng chống viêm, giảm đau.

- Cần nghiên cứu xây dựng quy trình nhân giống và trồng, thu hái, sơ chế, bảo quản theo GACP để có nguyên liệu chất lượng cao, ổn định phục vụ cho sản xuất thuốc.