

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

VIỆN DƯỢC LIỆU



Trần Thị Thuỳ Linh

**NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN HÓA HỌC VÀ MỘT SỐ
TÁC DỤNG SINH HỌC CỦA LOÀI TU HÙNG TẠI
(*Pogostemon auricularius* (L.) Hassk.),
HỌ HOA MÔI (Lamiaceae)**

Chuyên ngành: Dược liệu - Dược học cổ truyền
Mã số: 972.02.06

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ DƯỢC HỌC

Hà Nội, năm 2023

Công trình hoàn thành tại:

- Viện Dược liệu
- Trường Đại học Y Dược, Đại học Huế
- Viện Hóa học, Viện Công nghệ sinh học và Viện Hóa sinh biển (Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam)

Người hướng dẫn khoa học:

1. GS. TS. Nguyễn Thị Hoài
2. PGS. TS. Lê Việt Dũng

Phản biện 1:

Phản biện 2:

Phản biện 3:

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

Vào hồi ... giờ ... phút, ngày ... tháng ... năm 202...

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

Pogostemon Desf. là một chi lớn trong họ Hoa môi (Lamiaceae) được sử dụng trong Y học cổ truyền của nhiều nước, phần lớn ở các nước châu Á, để chữa đau bụng tiêu chảy, đau dạ dày, thấp khớp, cảm mạo, nhức đầu, hạ sốt, làm vết thương nhanh lên da non v.v. Thành phần hoá học của chi *Pogostemon* Desf. khá đa dạng với các nhóm hợp chất có hoạt tính sinh học như flavonoid, terpenoid, steroid v.v. Các nghiên cứu của Y học hiện đại đã cho thấy một số dịch chiết hay những hợp chất phân lập từ các loài thuộc chi *Pogostemon* Desf. chứa đựng nhiều hoạt tính sinh học tốt như kháng vi sinh vật, giảm đau, chống viêm, chống oxy hóa, gây độc tế bào ung thư v.v. Loài Tu hùg tai *Pogostemon auricularius* (L.) Hassk. được người dân sử dụng để chữa đau dạ dày, cảm sốt, viêm họng. Dịch chiết của loài đã thể hiện một số hoạt tính như kháng vi sinh vật, kháng viêm, làm tan huyết khối, ức chế enzym α -amylase, chống tiêu chảy. Ở nước ta, số lượng các nghiên cứu về thành phần hoá học và tác dụng sinh học của loài này trên thế giới cũng như ở Việt Nam còn khá khiêm tốn. Từ những lí do trên, đề tài: “**Nghiên cứu thành phần hóa học và một số tác dụng sinh học của loài Tu hùg tai (*Pogostemon auricularius* (L.) Hassk.), Họ Hoa môi (Lamiaceae)**”

2. Mục tiêu và nội dung của Luận án

2.1. Mục tiêu của Luận án

Mục tiêu 1. Xác định cấu trúc hóa học của một số hợp chất phân lập được từ phân đoạn có tác dụng chống viêm *in vitro*.

Mục tiêu 2. Đánh giá độc tính cấp của phân đoạn có tác dụng chống viêm *in vitro* và thử một số tác dụng sinh học của dịch chiết toàn phần, dịch chiết phân đoạn và một số hợp chất phân lập được

2.2. Nội dung của Luận án

➤ Về thực vật

- Mô tả đặc điểm hình thái, giám định tên khoa học mẫu nghiên cứu

➤ Về thành phần hóa học

- Định tính các nhóm chất trong dược liệu bằng phản ứng hóa học
- Chiết xuất và phân lập 11 hợp chất theo định hướng tác dụng sinh học

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

- Về độc tính và tác dụng sinh học

- Đánh giá tác dụng chống viêm *in vitro* ức chế sản sinh NO của cao chiết toàn phần, các cao phân đoạn và hợp chất tinh khiết. Đánh giá khả năng điều hoà cytokin (IL-6, IL-10, TNF- α).

- Đánh giá tác dụng gây độc tế bào ung thư, khả năng cảm ứng apoptosis và khả năng cảm ứng sinh caspase-3

- Xác định độc tính cấp của cao chiết chống viêm *in vitro* tốt nhất

3. Những đóng góp mới của Luận án

3.1. Về hóa học

Từ thân và lá loài *Pogostemon auricularius* (L.) Hassk. đã phân lập và xác định cấu trúc hóa học của 11 hợp chất, trong đó:

- 9 hợp chất mới, bao gồm 3 meroterpenoid (Pogostemin A-C), 5 dẫn xuất phloroglucinol (Pogostemonon A-D, Pogostemon D) và 1 triterpen (Pogostem).

- 2 hợp chất lần đầu tiên phân lập được từ loài *Pogostemon auricularius* (L.) Hassk. là diterpenoid (geranyllinalool) và sterol (stigmasterol).

3.2. Về độc tính cấp và tác dụng sinh học

Luận án là công bố đầu tiên về độc tính cấp của phân đoạn ethyl acetat của loài *Pogostemon auricularius* (L.) Hassk.

Luận án là công bố đầu tiên về:

- Tác dụng chống viêm ức chế sản sinh NO của các mẫu cao chiết methanol toàn phần, cao phân đoạn *n*-hexan, dicloromethan, ethyl acetat và cao chiết nước từ loài Tu húng tai.

- Tác dụng chống viêm ức chế sản sinh NO của 8 hợp chất mới được báo cáo. Khả năng điều hoà cytokin (IL-6, IL-10 và TNF- α) của Pogostemin C được báo cáo.

- Tác dụng gây độc tế bào ung thư trên các dòng: Hep-G2 (ung thư gan người), AGS (ung thư dạ dày người), KB (ung thư biểu mô người), LU-1 (ung thư phổi người) và SW-480 (ung thư ruột kết

người) của 8 hợp chất mới được báo cáo. Khả năng gây apoptosis, cảm ứng caspase-3 trên dòng tế bào LU-1 của Pogostemon A được báo cáo.

4. Ý nghĩa của luận án

Đây là lần đầu tiên loài Tu hùng tai 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 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.

- Kết quả nghiên cứu về thành phần hóa học: đã phân lập được 11 hợp chất ở các phân đoạn chiết khác nhau, trong đó có 9 hợp chất mới, 2 hợp chất lần đầu tiên công bố có trong loài *Pogostemon auricularius* (L.) Hassk. Kết quả nghiên cứu về thành phần hóa học đã giúp bổ sung tư liệu cho ngành hóa học các hợp chất thiên nhiên nói chung cũng như chi *Pogostemon* và loài *P. auricularius* nói riêng.

- Kết quả nghiên cứu về tác dụng sinh học chứng minh cao chiết ethyl acetat từ loài Tu hùng tai có tác dụng chống viêm ức chế sản sinh NO mạnh. Bên cạnh đó, một số hợp chất mới được tìm thấy cũng cho các tác dụng sinh học tốt như chống viêm ức chế sản sinh NO, điều hoà các cytokin, gây độc tế bào ung thư, cảm ứng caspase-3 và cảm ứng apoptosis.

5. Bố cục của luận án

Luận án có 123 trang, gồm 4 chương, 25 bảng, 33 hình, 181 tài liệu tham khảo và 3 phụ lục. Các phần chính trong luận án: Đặt vấn đề (2 trang), Tổng quan (27 trang), Nguyên vật liệu và phương pháp nghiên cứu (15 trang), Kết quả nghiên cứu (57 trang), Bàn luận (20 trang), Kết luận và kiến nghị (2 trang).

B. NỘI DUNG CỦA LUẬN ÁN

CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN

Đã tổng 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 *Pogostemon* Desf. và loài *P. auricularius* (L.) Hassk.

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

2.1. Nguyên vật liệu nghiên cứu

Nguyên liệu nghiên cứu là thân và lá của cây Tu hừng tại thu hái tại huyện Hương Hóa, tỉnh Quảng Trị (N16°44'38,9"; E107°14'51,1") vào tháng 5 năm 2016. Mẫu tiêu bản có đủ cơ quan sinh dưỡng (thân, lá, rễ) và cơ quan sinh sản (hoa) được lưu trữ tại Khoa Dược, Trường Đại học Y Dược - Đại học Huế với số hiệu mẫu là PA01.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Xác 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 cấu trúc các hợp chất phân lập được dựa trên các thông số vật lý và các phương pháp phổ HR-EI-MS, 1D và 2D NMR, CD kết hợp đối chiếu với tài liệu đã công bố.

- Đánh giá tác dụng chống viêm ức chế sản sinh NO của đại thực bào chuột RAW 264.7

- Đánh giá khả năng điều hoà cytokin IL-6, IL-10 và TNF- α

- Đánh giá khả năng gây độc tế bào bằng phương pháp nhuộm SRB

- Đánh giá khả năng cảm ứng apoptosis bằng thuốc nhuộm nhân tế bào Hoechst 33342 và trắc lưu tế bào

- Đánh giá khả năng cảm ứng sinh caspase-3

- Đánh giá độc tính cấp của cao chiết ethyl acetat theo hướng dẫn của Bộ Y tế Việt Nam.

CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Kết quả nghiên cứu về thực vật

3.1.1. Đặc điểm hình thái

Cây mọc hàng năm, bò rồi đứng, cao 40-100 m. Thân có tiết diện vuông, bề mặt phủ dày lông. Lá mọc đối; cuống lá phủ nhiều lông, dài 5-12 mm, lá phần trên gần như không cuống; phiến lá hình trứng, 2,5-7 × 1,5-3 cm, cả hai mặt đều phủ lông dài, đặc biệt là ở phần gân lá, gốc lá tròn hay tù, đôi khi hình nêm, mép xẻ răng cưa, đỉnh tù hay nhọn; gân bên 5-7 cặp, nổi rõ ở mặt dưới. Cụm hoa bông ở đỉnh cành, dài cỡ 3-12 cm, đường kính khoảng 1 cm khi hoa nở. Lá bắc hình trứng, khoảng 2 × 1-1,2 mm, có lông. Hoa gần như không cuống. Đài hình chuông, dài khoảng 1 mm, trên

chia 5 thùy hình tam giác, mép có lông. Tròng hoa màu trắng hay tím nhạt, dài khoảng 3 mm, nhẵn hay có lông rất thưa ở mặt ngoài, đỉnh chia 4 thùy gần bằng nhau. Nhị 4, thò, đỉnh ở ống tròng, dài khoảng 3 mm, phần dưới phủ lông dài, phần trên nhẵn. Bầu nhẵn, vòi nhụy nhẵn, dài khoảng 4 mm, xẻ 2 thùy ở đỉnh.

3.1.2. *Giám định tên khoa học*

Đã giám định tên khoa học của cây Tu hùng tai thu hái tại huyện Hướng Hóa, tỉnh Quảng Trị là *Pogostemon auricularius* (L.) Hassk., thuộc họ Lamiaceae.

3.2. **Kết quả nghiên cứu về hóa học**

3.2.1. *Định tính các nhóm hợp chất hữu cơ*

Kết quả cho thấy các nhóm hợp chất có trong loài Tu hùng tai gồm alkaloid, flavonoid, glycosid tim, saponin, axit hữu cơ, steroid, tanin, đường khử, chất béo và không có coumarin, anthranoid, axit amin.

3.2.2. *Chiết xuất, phân lập các hợp chất*

Phần trên mặt đất của loài Tu hùng tai được rửa sạch, thái nhỏ, phơi, sấy khô ở nhiệt độ 50-60°C, xay thành bột thô và tiến hành chiết xuất, phân lập các chất. Khối lượng được liệu khô đem chiết xuất là 2,5 kg. Dùng MeOH để làm ẩm toàn bộ lượng bột Tu hùng tai trong bình chiết, đậy kín và để yên để bột được thấm ẩm và trương nở hoàn toàn. Tiến hành ngâm chiết bằng cách thêm MeOH vừa đủ ngập và cách bề mặt được liệu khoảng 3 cm. Quá trình chiết xuất được tiến hành ở nhiệt độ phòng với 3 đợt chiết (3 × 10 L /7 ngày). Gộp các dịch chiết, cất thu hồi dung môi dưới áp suất giảm ở nhiệt độ 50-60°C thu được cao toàn phần MeOH (M, 207 g). Phân tán cao chiết toàn phần M trong 2 L nước cất, chiết phân bố lần lượt với các dung môi (2L × 5) có độ phân cực tăng dần là: n-hexan, diclorometan và ethyl acetat. Thu hồi dung môi dưới áp suất giảm, thu được các cao chiết phân đoạn tương ứng, ký hiệu là H (58 g), D (51 g), E (47 g) và W (41 g) là cao phần nước còn lại. Quá trình phân lập dựa trên sự định hướng hoạt tính chống viêm. Từ kết quả sàng lọc khả năng ức chế sản sinh NO, phân đoạn E có tác dụng tốt nhất được lựa chọn để thực hiện quá trình phân lập. Quá trình phân lập thu được 11 hợp chất.

3.2.3. *Xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất*

Dựa vào khối lượng phân giải cao (HR-ESI-MS), phổ cộng hưởng

từ hạt nhân một chiều, hai chiều (NMR) và đối chiếu với các tài liệu tham khảo, đã xác định được cấu trúc của 11 hợp chất.

* **Hợp chất PH16: (hợp chất mới)** dạng bột màu vàng. Phổ HR-ESI-MS: m/z 385,2735 $[M+H]^+$ cho công thức $C_{25}H_{37}O_3$ là 385,2743. Phổ 1H -NMR chỉ ra tín hiệu của nhóm methin olefin tại δ_H 5,98 (s, H-20) gợi ý sự hiện diện của nối đôi, tín hiệu hai nhóm olefin tại δ_H [4,91 (br.s, H-12a), 4,86 (br.s, H-12b)] được gán cho nối đôi ngoại vòng (exo-methylen), tín hiệu của 5 nhóm methyl được ghi nhận tại δ_H [1,23 (s, H₃-15), 1,20 (d, $J = 6,5$ Hz, H₃-25), 1,01 (s, H₃-13), 0,99 (s, H₃-14), 0,92 (t, $J = 7,5$ Hz, H₃-16)] và tín hiệu của 18 proton nhóm methin hoặc germinal methin trong khoảng dịch chuyển hoá học δ_H 2,64-1,51. Phổ ^{13}C -NMR và HSQC chỉ ra 25 tín hiệu carbon bao gồm carbon của nhóm carbonyl tại δ_C 180,3 (C-21), 2 nhóm carbon oxymethin tại δ_C [167,9 (C-19), 163,1 (C-23)], nhóm carbon mang oxi tại δ_C 88,0 (C-8); 2 nhóm carbon sp^2 bậc bốn tại δ_C [151,8 (C-1), 97,7 (C-22)], nhóm nối đôi ngoại vòng (exo-methylen) tại δ_C 110,7 (C-12); nhóm carbon sp^2 methin tại δ_C 110,0 (C-20), nhóm carbon sp^3 bậc bốn tại δ_C 34,0 (C-4), tín hiệu của 4 carbon sp^3 nhóm methin tại δ_C [53,7 (C-5), 41,3 (C-11), 39,2 (C-18), 34,3 (C-9)], 7 nhóm carbon sp^3 methylen tại δ_C [37,9 (C-7), 36,6 (C-3), 35,2 (C-2), 32,7 (C-10), 27,4 (C-17), 24,4 (C-24), 22,3 (C-6)] và 5 nhóm methyl tại δ_C [30,2 (C-13), 22,1 (C-14), 20,9 (C-15), 11,5 (C-16), 17,7 (C-25)].

Trên phổ COSY xuất hiện các tương tác giữa H-16 (δ_H 0,90)/H-17 (δ_H 1,68; 1,53)/H-18 (δ_H 2,47)/H-25 (δ_H 1,20) gợi ý trật tự liên kết C-16/C-17/C-18/C-25. Ngoài ra, phổ HMBC xuất hiện tương tác giữa H-17a (δ_H 1,68)/H-25 (δ_H 1,20) với C-19; các tương tác giữa H-20 (δ_H 5,98) với C-18/C-19/C-21/C-22 và H-24a (δ_H 2,64)/H-24b (δ_H 1,95) với C-21/C-22/C-23 gợi ý sự hiện diện của vòng γ -pyron với nhóm sec-butyl và nhóm methylen lần lượt tại C-19 và C-24. Tương tác HMBC giữa H-13 (δ_H 1,01)/H-14 (δ_H 0,99) và C-3 (δ_C 36,6)/C-4 (δ_C 34,0)/C-5 (δ_C 53,7) gợi ý sự có mặt của nhóm *gem*-dimethyl tại C-4. Tương tự, các tương tác HMBC

giữa H-12 (δ_H 4,86; 4,91) và C-1 (δ_C 151,8)/C-2 (δ_C 35,2)/C-11 (δ_C 41,3) gợi ý sự hiện diện của nhóm *exo*-metylen tại C-1.

Trên phổ COSY xuất hiện tương tác giữa H-7 (δ_H 2,12; 1,92)/H-6 (δ_H 1,78; 1,44)/H-5 (δ_H 1,90)/H-11 (δ_H 2,44)/H-10 (δ_H 1,69; 1,55)/H-9 (δ_H 2,02) cho phép thiết lập trật tự C-7/C-6/C-5/C-11/C-10/C-9. Tương tự, tương tác giữa H-2 (δ_H 2,41; 2,15)/H-3 (δ_H 1,70; 1,64) trên phổ COSY cho phép thiết lập trật tự giữa C-2/C-3.

Kết hợp dữ liệu phổ HMBC và phổ COSY cho phép thiết lập trật tự liên kết mạch carbon từ C-7 đến C-2, cũng như trật tự mạch liên kết giữa C-11 và C-2 qua C-1 và giữa C-5 và C-3 qua C-4. Các dữ liệu phổ này đã gợi ý sự hiện diện của vòng 4,4-dimethyl-1-methylenecyclohexane bao gồm C-1-C-5 và C-11-C-14 trong cấu trúc của **PH16**. Ngoài ra, các tương tác trên phổ HMBC giữa H-15 đến C-7/C-8/C-9; giữa H-10a (δ_H 1,55)/H-10b (δ_H 1,69) đến C-8/C-9 gợi ý mạch carbon C-7-C-8-C-9. Bên cạnh đó, các tương tác giữa H-10a/H-10b/H-9 đến C-24 và giữa H-24a/H-24b đến C-8/C-9/C-10 gợi ý mảnh cấu trúc 1-methylene-4,4,8-trimethylbicyclo[5.4.0]undecane gắn với C-22 của vòng γ -pyrone qua cầu nối C-24. Mặc dù còn thiếu bằng chứng trực tiếp về sự có mặt của vòng 3,4-dihydropyran bao gồm C-8-C-9 và C-22-C-24 tồn tại trong cấu trúc của hợp chất **PH16**, nhưng liên kết giữa C-8 và C-23 qua cầu oxy hình thành vòng C được đề nghị để phù hợp với công thức phân tử của hợp chất **PH16**. Ngoài ra, sự dịch chuyển về từ trường thấp của carbon methine C-8 tại δ_C 88,0 đã làm rõ sự có mặt của cầu nối ether giữa C-8 và C-23. Do đó, hợp chất **PH16** được xác định là một meroterpenoid mới với γ -pyron và khung bicyclo[5.4.0]undecane. Phần sesquiterpen của hợp chất **PH16** tương tự như ximonican được phân lập từ *Ximenia americana*.

Cấu hình tương đối của **PH16** được làm sáng tỏ dựa trên dữ liệu phổ NOESY và so sánh với dữ liệu NMR được báo cáo của ximonican. Khi so sánh dữ liệu ^{13}C -NMR của hợp chất **PH16** [δ_C tại 53,7 (C-5) và 41,3 (C-11)] và chất tham khảo ximonican [δ_C tại 52,01 (C-5) và 40,16 (C-11)] gợi ý vị trí *axial* giữa H-5 (δ_H 1,90)

và H-11 (δ_{H} 2,44) trong cấu trúc của hợp chất **PH16**. Bên cạnh đó, định hướng β của H-11, H-3b (δ_{H} 1,64), H-7b (δ_{H} 2,12), H-14, H-15, H-10b và H-24b được xác định dựa trên các tương tác NOESY của H-11/H-3b, H-11/H-7b, H-11/H-14, H-3b/H-14, H-7b/H-15, H-10b/H-15 và H-15/H-24b; trong khi định hướng α của H-5, H-9, H-13, H-10a, H-24a và H-3a (δ_{H} 1,70) được xác định dựa trên các tương tác NOESY của H-5/H-9, H-5/H-13, H-10a/H-24a và H-13/H-3a. Những dữ liệu phổ NOESY này đã chứng minh vòng cycloheptan (B) và dihydropyran (C) tồn tại dưới cấu dạng *trans*. Như vậy, hợp chất **PH16** là một meroterpenoid mới và được đặt tên là **Pogostemin A**.

* **Hợp chất PH15: (Hợp chất mới)** dạng bột màu vàng nhạt. Phổ HR-ESI-MS: m/z 385,2735 $[M+H]^+$ tương ứng với công thức $C_{25}H_{37}O_3$. Các dữ liệu phổ ^1H và ^{13}C -NMR của hợp chất **PH15** khá tương đồng với hợp chất **PH16**. Trên phổ ^1H xuất hiện tín hiệu nhóm methin olefin tại δ_{H} 6,00 (s, H-20) gợi ý sự hiện diện của nối đôi ba lần thế, tín hiệu hai nhóm olefin tại δ_{H} [4,82 (br.s, H-13a) và 4,75 (br.s, H-13b)] được gán cho proton của nối đôi ngoại vòng (*exo*-metylen) và tín hiệu của 5 nhóm methyl được ghi nhận tại δ_{H} [1,22 (dd, $J = 7,0$; 1,0 Hz, H₃-25), 1,15 (br.s, H₃-12), 1,00 (s, H₃-14), 1,00 (s, H₃-15), 0,90 (t, $J = 7,5$ Hz, H₃-16)]. Phổ ^{13}C -NMR và HSQC chỉ ra 25 tín hiệu carbon bao gồm nhóm carbonyl tại δ_{C} 180,2 (C-21), tín hiệu của 2 nhóm carbon oxymethin tại δ_{C} [168,0 (C-19) và 163,2 (C-23)], tín hiệu nhóm carbon no mang oxi tại δ_{C} 88,0 (C-4), tín hiệu của 2 nhóm carbon sp^2 bậc bốn tại δ_{C} [154,6 (C-8) và 98,0 (C-22)], nhóm carbon sp^3 bậc bốn tại δ_{C} 33,5 (C-11), tín hiệu của carbon nhóm đôi ngoại vòng (*exo*-metylen) tại δ_{C} 110,1 (C-13), nhóm carbon methin tại δ_{C} 110,0 (C-20), tín hiệu của 4 nhóm 4 carbon sp^3 nhóm methin tại δ_{C} [56,5 (C-1), 42,5 (C-9), 39,2 (C-18), 35,3 (C-5)], tín hiệu của 7 nhóm carbon sp^3 methylen tại δ_{C} [38,7 (C-3), 38,4 (C-10), 36,6 (C-7), 33,2 (C-6), 22,9 (C-2), 27,4 (C-17), 23,6 (C-24)] và 5 nhóm methyl tại δ_{C} [19,8 (C-12), 29,7 (C-14), 22,6 (C-15), 11,5 (C-16), 17,7 (C-25)].

Ngoài ra, các tương tác HMBC giữa H-14 (δ_H 1,00)/H-15 (δ_H 1,00) và C-10 (δ_C 38,4)/C-11 (δ_C 33,5)/C-1 (δ_C 56,5) gợi ý nhóm *gem*-dimethyl tại C-10. Tương tác HMBC giữa H-13 (δ_H 4,82; 4,75) và C-7 (δ_C 36,6)/C-8 (δ_C 154,6)/C-9 (δ_C 42,5) gợi ý nối đôi ngoại vòng (*exo*-metylen) tại C-8. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất **PH15** có nhiều điểm tương đồng với hợp chất **PH16**, đặc biệt sự hiện diện của vòng γ -pyron với nhóm *sec*-butyl tại C-19 trong cấu trúc **PH15**. Tuy nhiên, phần sesquiterpen trong hợp chất **PH15** tương tự như của hợp chất (1*R**,4*R**,9*S**)-11,11-dimethyl-8-methylenbicyclo[7.2.0]undecane-4-carboxylic acid được phân lập từ *Eremophila spathulata*. Như vậy, hợp chất **PH15** được gợi ý là một meroterpenoid với khung γ -pyron và caryophyllene được đặt tên là **Pogostemin B**.

* **Hợp chất PH4: (Hợp chất mới)** dạng bột màu vàng nhạt. Phổ HR-ESI-MS: m/z 397,2737 [M+H]⁺ tương ứng với công thức phân tử C₂₆H₃₇O₃. Các dữ liệu phổ ¹H và ¹³C-NMR của hợp chất **PH4** khá tương đồng với hợp chất **PH16** và **PH15**. Phổ ¹H-NMR xuất hiện tín hiệu của 4 proton olefin tại δ_H [5,91 (dq, J = 1,5; 7,0 Hz, H-17), 5,25 (dd, J = 1,5; 16,0 Hz, H-1), 5,11 (m, H-2) và 5,08 (m, H-9)], 7 nhóm methyl tại δ_H [1,97 (s, H₃-26), 1,94 (dd, J = 1,0; 1,5 Hz, H₃-25), 1,85 (dd, J = 1,0; 7,0 Hz, H₃-16), 1,66 (s, H₃-15), 1,07 (s, H₃-13), 1,07 (s, H₃-12) và 0,99 (s, H₃-14)] và 11 proton nhóm methin và germinal methin tại δ_H [2,92-1,25]. Phổ ¹³C-NMR và HSQC chỉ ra 26 tín hiệu carbon bao gồm tín hiệu đặc trưng của nhóm carbonyl tại δ_C 182,4 (C-21), 9 nhóm carbon không liên kết với hydro tại δ_C [164,2 (C-23), δ_C 162,0 (C-19), 137,8 (C-8), 129,5 (C-18), 117,9 (C-20), 98,0 (C-22); 89,5 (C-4) và δ_C 39,1 (C-11)], 4 nhóm carbon methin tại δ_C [144,7 (C-1), 133,3 (C-17), 124,1 (C-9) và 120,4 (C-2)], carbon sp³ nhóm methine tại δ_C 36,8 (C-5), tín hiệu của 5 nhóm methylen tại δ_C [38,7 (C-7), 43,0 (C-3), 30,8 (C-6), 42,4 (C-10), 23,3 (C-24)] và tín hiệu của 7 nhóm methyl tại δ_C [30,6 (C-13), 24,6 (C-12), 20,2 (C-15), 17,3 (C-14), 14,5 (C-25), 13,8 (C-16) và 11,8 (C-26)].

Mặc dù, dữ liệu phổ 1D -NMR (Bảng 3.4) khá tương đồng với hợp chất **PH16** và **PH15**, gợi ý hợp chất **PH4** chứa bộ khung γ -

pyron và sesquiterpen. Tuy nhiên dữ liệu phổ 2D -NMR của **PH4** ghi nhận sự có mặt có nhóm 1-methylprop-1-enyl với cấu hình *E* của liên kết đôi $\Delta 18$ thay thế nhóm sec-butyl (có trong phân tử **PH16** và **PH15**) được gắn vào vòng γ -pyron tại C-19 và những điểm khác biệt trong hợp phần sesquiterpenoid.

Bên cạnh đó, hằng số ghép $^3J_{1-2}$ giữa H-1 và H-2 là 16,0 Hz, cũng như các tương tác chính trên phổ NOESY giữa H-1 (δ_H 5,25) và H-3b (δ_H 2,44) đã đề nghị cấu hình *E* của liên kết đôi $\Delta 1$. Các tương tác của H-7b (δ_H 1,90)/H-9 (δ_H 5,08) và H-10a (δ_H 2,26)/H-10b (δ_H 1,80)/H-14 trên phổ NOESY đã xác nhận cấu hình *E* của liên kết đôi $\Delta 8$, tương tác giữa H-16(δ_H 1,85) và H-25(δ_H 1,94) gợi ý cấu hình *E* của liên kết đôi $\Delta 18$ Dựa vào những dữ liệu phổ trên, cấu trúc của **PH4** đã được làm sáng tỏ và được đặt tên là **Pogostemin C**.

* Hợp chất PH10: Pogostemonon B (Hợp chất mới) dạng bột màu trắng. Phổ HR-ESI-MS: m/z 405,1909 $[M+H]^+$ tương ứng với công thức phân tử $C_{22}H_{29}O_7$. Phổ 1H -NMR xuất hiện tín hiệu đặc trưng của 5 nhóm methyl tại δ_H [2,01 (s, H₃-14), 1,23 (d, $J = 7,0$ Hz, H₃-1'), 1,15 (d, $J = 6,5$ Hz, H₃-5''), 0,92 (t, $J = 7,5$ Hz, H₃-4'') và 0,91 (t, $J = 7,5$ Hz, H₃-4')], 2 tín hiệu proton sextet tại δ_H [2,54 (sextet, $J = 7,0$ Hz, H-2'), 3,98 (sextet, $J = 6,5$ Hz, H-2'')], proton olefin tại δ_H 6,08 (s, H-3) và proton nhóm methylen tại δ_H 3,63 (br s, H₂-7). Phổ ^{13}C -NMR và HSQC chỉ ra 22 tín hiệu carbon bao gồm 5 nhóm methyl, 3 nhóm methylen, 3 nhóm methin và 11 carbon không liên kết hydro. Trong đó, xuất hiện tín hiệu đặc trưng của 2 nhóm carbonyl tại δ_C 212,6 (C-1''), 171,3 (C-6) và tín hiệu của nhóm methyl gắn với vòng thơm tại δ_C 8,1 (C-14). Dựa vào các dữ liệu phổ 1D-NMR, hợp chất PH10 được đề xuất là một dẫn xuất của phloroglucinol. Trên phổ HMBC của hợp chất PH10 xuất hiện các tương tác giữa H-4'' (δ_H 0,92)/H-5'' (δ_H 1,15) và C-2'' (δ_C 47,0)/C-3'' (δ_C 28,3), giữa H-5'' và C-1'' (δ_C 212,6) gợi ý sự có mặt của nhóm 1-oxo-2-methylbutyl. Ngoài ra, tương tác HMBC giữa H-14 (δ_H 2,01) và C-11 (δ_C 162,4)/C-12 (δ_C 105,2)/C-13 (δ_C 161,3) gợi ý nhóm methyl gắn với nhân thơm tại C-12.

Sự dịch chuyển hóa học trên phổ ^{13}C -NMR của vòng pyron, cụ thể ở hợp chất PH10 [δ_C 169,5 (C-2), 102,2 (C-3), 169,5 (C-4), 103,0 (C-

5) và 171,3 (C-6)] tương tự như của hợp chất 6-(2-butyl)-3-ethyl-4-hydroxy-2-pyrone (còn gọi germicidin) [δ_C 165,9 (C-2), 99,6 (C-3), 167,2 (C-4), 104,7 (C-5) và 167,5 (C-6)] được phân lập từ phần dịch nổi của môi trường nuôi cấy *Streptomyces viridochromogenes*, điều này chỉ ra rằng phân tử PH10 chứa cấu trúc α -pyron. Ngoài ra, các tương tác trên phổ HMBC giữa H-7 (δ_H 3,63) và C-4 (δ_C 169,5)/C-5 (δ_C 103,0)/C-6 (δ_C 171,3), giữa H-3 (δ_H 6,08) và C-2 (δ_C 169,5)/C-5 mà không có tương tác với C-6 đã củng cố cho sự có mặt của vòng α -pyron trong PH10.

Bên cạnh đó, các tương tác trên phổ HMBC giữa H-1' (δ_H 1,23)/H-4' (δ_H 0,91) và C-2' (δ_C 40,9)/C-3' (δ_C 28,5), giữa H-1'/H-2' (δ_H 2,54)/H-3' (δ_H 1,58; 1,70) đến C-2 trong phổ HMBC cho phép xác định nhóm sec-butyl gắn vào vòng α -pyron tại vị trí C-2.

Liên kết giữa gốc phloroglucinol và vòng α -pyron qua cầu methylen (C(7)H₂) được thiết lập thông qua sự dịch chuyển mạnh về phía trường thấp của H₂-7 (δ_H 3,63). Đặc biệt, các tương tác trên phổ HMBC giữa proton của nhóm methylen (H₂-7) với C-4 (δ_C 169,5)/C-5 (δ_C 101,7)/C-6 (δ_C 170,7)/ C-8 (δ_C 106,5)/C-9 (δ_C 158,7)/C-13 (δ_C 161,3) cũng củng cố hơn sự hình thành cầu methylen giữa gốc phloroglucinol và vòng α -pyron. Dựa vào các dữ liệu phổ trên, hợp chất PH10 được xác định là một dẫn xuất phloroglucinol mới được đặt tên là Pogostemonon B.

* **Hợp chất PH19: (hợp chất mới)** dạng bột màu vàng nhạt. Phổ HR-ESI-MS xuất hiện pic ion giả phân tử tại m/z 441,1897 [M+Na]⁺ tính toán cho C₂₃H₃₀O₇Na là 441,1889. Các dữ liệu phổ ¹H và ¹³C-NMR của hợp chất **PH19** tại **Bảng 3.10** khá tương đồng với hợp chất **PH10**. Trong cấu trúc **PH19** xuất hiện tín hiệu của nhóm methyl singlet. Như vậy, cấu trúc của hợp chất **PH19** là một dẫn xuất phloroglucinol mới, đặt tên là **Pogostemonon D**.

* **Hợp chất PH13: (hợp chất mới)** thu được dưới dạng bột màu trắng. Phổ HR-ESI-MS: m/z 417,1906 [M+H]⁺ tương ứng với công thức phân tử C₂₃H₂₉O₇ Các dữ liệu phổ ¹H và ¹³C-NMR của hợp chất **PH13** tại **Bảng 3.10** khá tương đồng với hợp chất **PH19**. Tuy nhiên, dữ liệu phổ của hợp chất **PH13** xuất hiện tín hiệu của

mảnh cấu trúc 1-methylprop-1-enyl. Như vậy **PH13** là một dẫn xuất phloroglucinol mới, đặt lên là **Pogostemonon C**.

* **Hợp chất PH6: (hợp chất mới)** dạng bột màu vàng. Phổ HR-ESI-MS: m/z 417,1906 $[M+H]^+$ tương ứng với công thức phân tử $C_{23}H_{29}O_7$. Các dữ liệu phổ 1H và ^{13}C -NMR của hợp chất **PH6** tại **Bảng 3.10** khá tương đồng với hợp chất **PH13**. Điểm khác biệt là trong phân tử **PH6** xuất hiện tín hiệu của vòng γ -pyron. **PH6** được xác định là một dẫn xuất phloroglucinol mới được đặt lên là **Pogostemonon A**.

* **Hợp chất PH18: (hợp chất mới)** dạng bột màu trắng. Phổ HR-ESI-MS: m/z 415,1753 $[M+H]^+$ tương ứng với công thức phân tử $C_{23}H_{27}O_7$. Các dữ liệu phổ 1H và ^{13}C -NMR của hợp chất **PH18** tại **Bảng 3.10** khá tương đồng với hợp chất **PH13** cũng như các hợp chất **PH10**, **PH19**. Điểm khác biệt là trong phân tử **PH18** xuất hiện tín hiệu của bộ khung 2,3-dimethyl-4-chromanon. Dựa trên dữ liệu phổ, hợp chất **PH18** là một dẫn xuất của phloroglucinol mới, đặt tên là **Pogostemon D**.

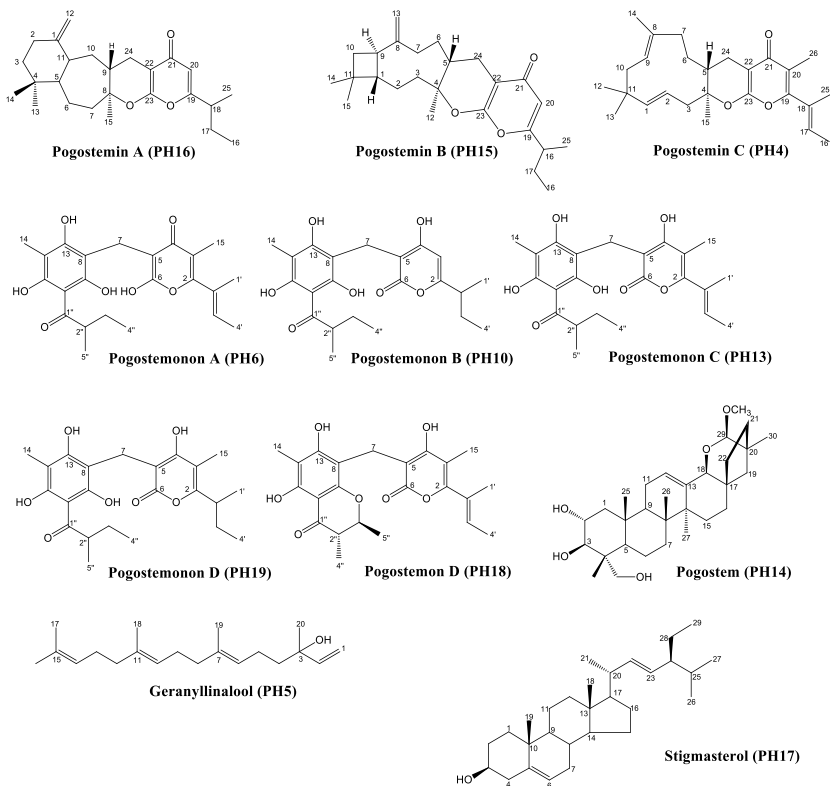
* **Hợp chất PH14: (hợp chất mới)** dạng bột màu trắng. Phổ HR-ESI-MS: m/z 523,3201 $[M+Cl]^-$ tương ứng với công thức phân tử $C_{30}H_{48}O_5Cl$. Phổ 1H -NMR chỉ ra tín hiệu đặc trưng của 5 nhóm methyl bậc ba tại δ_H 0,90-1,09, tín hiệu 10 nhóm methylen, đặc biệt sự xuất hiện của proton oxymethylen tại δ_H 3,68 (d, $J = 10,0$ Hz, H-23a), 3,44 (d, $J = 10,0$ Hz, H-23b). Phổ 1H -NMR còn thể hiện tín hiệu của 7 proton methin, trong đó có 3 tín hiệu proton oxymethin tại δ_H 3,76 (ddd, $J = 10,5; 10,0; 4,0$ Hz, H-2), 3,40 (d, $J = 10,0$ Hz, H-3), 4,08 (d, $J = 2,5$ Hz, H-18), 1 tín hiệu của proton dioxymethin tại δ_H 4,19 (s, H-29) và tín hiệu proton olefinic tại δ_H 5,77 (d, $J = 2,5$ Hz, H-12). Ngoài ra, phổ 1H -NMR còn cho thấy tín hiệu của nhóm methoxy tại δ_H 3,36 (s, H₃-28). Phổ ^{13}C -NMR và HSQC chỉ ra 30 tín hiệu carbon gợi ý cấu trúc olean-12-ene nor-triterpen. Độ dịch chuyển hóa học tại δ_C 69,0 (C-2), 80,9 (C-3), 49,7 (C-5), 47,6 (C-9), 118,8 (C-12), 74,6 (C-18) và tín hiệu acetal được ghi nhận tại δ_C 106,7 (C-29) gợi ý sự có mặt của 7 carbon methine. Bên cạnh đó, phổ ^{13}C -NMR còn cho thấy tín hiệu 10 carbon methylen bao gồm: 1 hydroxyl methylen

tại δ_C 71,1 (C-23), 1 nhóm methoxy tại δ_C 54,9 (C-28) và 7 carbon bậc bốn. So sánh dữ liệu phổ NMR của hợp chất **PH14** và hợp chất gomphoparvin B, nhóm acetal trong cấu trúc của cả 2 hợp chất này được gán vào vị trí C-29, cũng như vòng F được hình thành trên liên kết giữa C-18 và C-29 qua cầu nối oxy. Điều này còn được xác nhận dựa vào tương tác trên phổ HMBC của hợp chất **PH14**, tương tác giữa H-29 (δ_H 4,18, s) đến C-18 (δ_C 74,6). Bên cạnh đó, điểm khác biệt là sự xuất hiện của nhóm methoxy C-28 (δ_C 54,9) trong cấu trúc **PH14** thay vì nhóm hydroxyl cùng vị trí trong hợp chất gomphoparvin B, được xác nhận thông qua các tương tác trên phổ HMBC giữa δ_H 3,36 (3H, s) và C-29 (δ_C 106,7)/C-30 (δ_C 21,6). Cấu hình tương đối của **PH14** được xác định dựa vào dữ liệu phổ NOESY. Tín hiệu NOESY giữa H-2 (δ_H 3,76), H-24 (δ_H 0,90) và H-25 (δ_H 1,09) gợi ý sự định hướng β của các proton này. Ngược lại, các tín hiệu NOESY giữa H-27 và H-18, giữa H-18, H-29 và H-30 gợi ý định hướng α của các proton này. Bên cạnh đó, hằng số tương tác $J_{2-3} = 10,0$ Hz gợi ý cấu hình *trans*-diaxial giữa H-2 và H-3 cho phép xác định H-3 định hướng α . Như vậy, cấu trúc của hợp chất **PH14** là một triterpen mới được đặt tên là **Pogostem**.

* **Hợp chất PH5: Geranylinalool** được tách ở dạng dầu. Phổ $^1\text{H-NMR}$ chỉ ra tín hiệu đặc trưng 5 nhóm methyl singlet tại δ_H 1,68 (H₃-16); 1,60 (H₃-17/H₃-20); 1,59 (H₃-19) và 1,28 (H₃-18); 4 proton olefine tại δ_H 5,92 (dd, $J = 10,5, 17,0$ Hz, H-2); 5,14 (qt, $J = 1,0; 7,0$ Hz, H-6); 5,10 (m, H-10/H-14) và nhóm *exo*-metylen tại δ_H 5,22 (dd, $J = 1,0; 17,0$ Hz, H-1a) và 5,07 (dd, $J = 1,0, 10,5$ Hz, H-1b). Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ và HSQC chỉ ra tín hiệu của 20 carbon, gồm 5 nhóm methyl, 7 nhóm methylen, 4 nhóm methin và 4 carbon không liên kết hydro. Trong đó, 8 carbon lai hóa sp^2 tại δ_C 145,1 (C-2), 135,6 (C-7), 135,1 (C-11), 131,3 (C-15), 124,4 (C-6), 124,2 (C-14), 124,1 (C-10) và 111,7 (C-1) và 1 carbon bậc bốn tại δ_C 73,5 (C-3).

Bảng 3.10. Dữ liệu phổ của các dẫn xuất phloroglucinol PH10, PH19, PH6, PH13, PH18

| C | PH10 | | PH19 | | PH6 | | PH13 | | PH18 | |
|-----|------------|-------------------|------------|-------------------|------------|--------------------|------------|--------------------|------------|---------------------|
| | δ_C | δ_H | δ_C | δ_H | δ_C | δ_H | δ_C | δ_H | δ_C | δ_H |
| 2 | 169,5 | – | 164,6 | – | 160,0 | – | 161,4 | – | 160,5 | – |
| 3 | 102,2 | 6,08 br.s | 110,0 | – | 113,9 | – | 110,1 | – | 107,8 | – |
| 4 | 170,0 | – | 169,0 | – | 180,7 | – | 170,1 | – | 167,3 | – |
| 5 | 103,0 | – | 103,1 | – | 101,7 | – | 103,4 | – | 102,1 | – |
| 6 | 171,3 | – | 170,8 | – | 170,7 | – | 170,3 | – | 168,5 | – |
| 7 | 18,6 | 3,62 s | 18,6 | 3,68 s | 20,1 | 3,55 br.s | 18,8 | 3,66 s | 17,6 | 3,65 s |
| 8 | 106,5 | – | 106,5 | – | 106,3 | – | 106,4 | – | 103,6 | – |
| 9 | 158,7 | – | 159,4 | – | 170,7 | – | 159,4 | – | 154,6 | – |
| 10 | 106,7 | – | 106,4 | – | 109,5 | – | 106,5 | – | 101,1 | – |
| 11 | 162,4 | – | 160,8 | – | 162,7 | – | 160,9 | – | 160,5 | – |
| 12 | 105,2 | – | 105,3 | – | 104,7 | – | 105,3 | – | 107,4 | – |
| 13 | 161,3 | – | 160,8 | – | 163,0 | – | 161,3 | – | 163,1 | – |
| 14 | 8,1 | 2,01 s | 8,3 | 2,06 s | 7,9 | 1,98 s | 8,3 | 2,05 s | 7,4 | 2,06 s |
| 15 | – | – | 9,6 | 2,03 s | 12,1 | 1,93 s | 11,6 | 2,03 s | 11,4 | 2,00 s |
| 1' | 18,2 | 1,22 d (7,0) | 18,3 | 1,21 d (7,5) | 14,7 | 1,89 t (1,5) | 14,5 | 1,91 br.s | 14,5 | 1,88 s |
| 2' | 40,9 | 2,54 sextet (7,0) | 37,5 | 2,97 sextet (6,5) | 130,7 | – | 129,5 | – | 128,2 | – |
| 3' | 28,5 | 1,58 m; 1,70 m | 28,7 | 1,68 m; 1,60 m | 130,6 | 5,75 qq (1,5, 7,5) | 133,1 | 5,87 qq (1,5, 7,0) | 132,0 | 5,78 dq (1,5, 7,0) |
| 4' | 11,9 | 0,91 t (7,5) | 12,2 | 0,87 t (7,5) | 13,6 | 1,79 dq (1,0, 7,0) | 13,8 | 1,83 dq (1,0, 7,0) | 13,9 | 1,79 dq (0,5, 7,0) |
| 1'' | 212,6 | – | 212,8 | – | 212,4 | – | 212,6 | – | 197,3 | – |
| 2'' | 47,0 | 3,98 sextet (6,5) | 47,1 | 3,98 sextet (6,5) | 46,6 | 4,09 sextet (6,5) | 47,1 | 3,98 sextet (6,5) | 45,7 | 2,65 dq (12,0, 7,0) |
| 3'' | 28,3 | 1,84m; 1,39m | 28,2 | 1,85 m; 1,40 m | 28,3 | 1,84 m; 1,39 m | 28,2 | 1,85 m; 1,40 m | 80,4 | 4,36 dq (12,0, 6,5) |
| 4'' | 12,3 | 0,92 t (7,5) | 12,3 | 0,93 t (7,5) | 12,3 | 0,92 t (7,5) | 12,3 | 0,93 t (7,5) | 10,1 | 1,25 d (7,0) |
| 5'' | 17,3 | 1,15 d (6,5) | 17,1 | 1,16 d (6,5) | 17,5 | 1,15 d (6,5) | 17,2 | 1,16 d (6,5) | 19,4 | 1,66 d (6,5) |



Hình 4.1. Cấu trúc hóa học của 11 hợp chất phân lập được từ cây *Tu hùg tai*

* **Hợp chất PH17: Stigmasterol** dạng bột màu trắng. Phổ $^1\text{H-NMR}$ cho thấy tín hiệu 2 proton olefin mạch hở dạng $\text{HC}=\text{CH}$ ở δ_{H} 5,16 (dd, 1H, $J = 15,5; 3,5$ Hz, H-22) và 5,02 (dd, 1H, $J = 15,5; 9,0$ Hz, H-23) và 1 tín hiệu đặc trưng cho proton của liên kết đôi dạng $>\text{C}=\text{CH}$ ở C5 và C6 của khung stigmasteran ở δ_{H} 5,35 (br.d, $J = 4,5$ Hz, H-6); tín hiệu của một proton oxymethin tại δ_{H} 3,51 (m, 1H, H-3), tín hiệu 2 nhóm methyl bậc ba tại δ_{H} 0,70 (s, H₃-18) và 1,03 (s, H₃-19), 3 nhóm methyl bậc hai tại δ_{H} 0,81 (d, $J = 7,0$ Hz, H₃-27), 0,84 (d, $J = 7,0$ Hz, H₃-26) và 0,93 (d, $J = 6,5$ Hz, H₃-21) và 1 nhóm methyl bậc một tại δ_{H} 0,85 (t, $J = 7,5$ Hz, H₃-29). Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ thể hiện tín hiệu của 29 carbon, gồm 4 carbon olefin tại

δ_C 140,8 (C-5); 138,3 (C-22); 129,3 (C-23); và 121,7 (C-6) ppm, carbon nhóm oxymethin tại δ_C 71,9 (C-3) và 6 nhóm methyl. Đối chiếu với dữ kiện phổ NMR chất tham khảo, hợp chất **PH17** được xác định là stigmasterol

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

3.3.1. Hoạt tính chống viêm

3.3.1.1. Sàng lọc hoạt tính chống viêm ức chế sản sinh NO của các cao chiết

Mẫu thử trong nghiên cứu sàng lọc hoạt tính chống viêm là cao chiết toàn phần MeOH (M) và các cao chiết phân đoạn *n*-hexan (H), diclorometan (D), ethyl acetat (E), nước (W). Trước khi thử tác dụng ức chế sản sinh NO, các cao chiết được đánh giá khả năng gây độc đến sự phát triển của tế bào đại thực bào chuột RAW 264.7 ở các nồng độ thử nghiệm 100 và 20 $\mu\text{g/mL}$.

Bảng 3.14. Khả năng ảnh hưởng đến sự sống của tế bào đại thực bào chuột RAW 264.7 của các cao chiết

| Nồng độ ($\mu\text{g/mL}$) | % tế bào sống | | | | | |
|------------------------------|---------------|--------|-------|--------|-------|--------|
| | M | H | D | E | W | L-NMMA |
| 100 | 49,61 | 46,34 | 31,18 | 92,77 | 63,09 | 89,77 |
| 20 | 110,57 | 107,09 | 98,79 | 106,98 | 86,86 | 95,72 |

Tại mức liều 20 $\mu\text{g/mL}$, tất cả các mẫu cao chiết không ảnh hưởng đến sự phát triển bình thường của đại thực bào chuột, tỉ lệ tế bào sống là tương đối cao (86,86 - 110,57%). Tuy nhiên, ở liều cao 100 $\mu\text{g/mL}$, các cao chiết D, M và H là tương đối độc, có tỉ lệ tế bào sống sót trong khoảng 31,18 - 49,61%. Trong khi đó, cao chiết E có tỉ lệ tế bào sống sót cao 92,77%.

Bảng 3.15. Kết quả ức chế sản sinh NO của các cao chiết

| Mẫu nghiên cứu | IC ₅₀ \pm SD ($\mu\text{g/mL}$) |
|---------------------------|--|
| Cao chiết methanol | 60,54 \pm 2,66 |
| Cao chiết <i>n</i> -hexan | – |
| Cao chiết dicloromethan | 28,68 \pm 1,49 |
| Cao chiết ethyl acetat | 25,28 \pm 1,52 |
| Cao chiết nước | 64,73 \pm 1,84 |
| L-NMMA | 6,22 \pm 0,84 |

3.3.1.2. Hoạt tính chống viêm của các hợp chất tinh khiết

a. Hoạt tính ức chế sản sinh NO

Trước khi thử hoạt tính ức chế sản sinh NO, các hợp chất được đánh giá khả năng gây độc đến sự phát triển của tế bào đại thực bào chuột RAW 264.7 ở các nồng độ thử nghiệm 100 và 20 $\mu\text{g/mL}$.

Bảng 3.16. Khả năng ảnh hưởng đến sự sống của tế bào đại thực bào chuột RAW 264.7 của các hợp chất

| Nồng độ ($\mu\text{g/mL}$) | % tế bào sống | | |
|---------------------------------|----------------|----------------|----------------|
| | Pogostemin A | Pogostemin B | Pogostemin C |
| 100 | 21,55 | 95,4 | 28,9 |
| 20 | 42,94 | 99,1 | 71,3 |
| | Pogostemonon A | Pogostemonon B | Pogostemonon C |
| 100 | 37,69 | 105,94 | 32,98 |
| 20 | 94,22 | 104,16 | > 105,57 |
| | Pogostemonon D | Pogostemonon D | Pogostem |
| 100 | 37,54 | 104,75 | 40,73 |
| 20 | 89,48 | 102,16 | > 104,99 |

Bảng 3.17. Kết quả ức chế sản sinh NO của các hợp chất tinh khiết

| Tên hợp chất | IC ₅₀ \pm SD ($\mu\text{g/mL}$) | IC ₅₀ \pm SD (μM) |
|---------------------|---|---|
| Pogostemin B | 15,66 \pm 1,79 | 40,78 \pm 4,66 |
| Pogostemin C | 1,49 \pm 0,06 | 3,76 \pm 0,15 |
| Pogostemonon A | 12,06 \pm 0,79 | 28,99 \pm 1,90 |
| Pogostemonon B | – | – |
| Pogostemonon C | 11,14 \pm 1,7 | 26,77 \pm 4,09 |
| Pogostemonon D | – | – |
| Pogostemon D | 3,02 \pm 0,31 | 7,29 \pm 0,74 |
| Pogostem | – | – |
| L-NMMA | 6,22 \pm 0,84 | 33,04 \pm 4,46 |

Ở liều 100 $\mu\text{g/mL}$, chỉ các mẫu thử Pogostemin B, Pogostemonon B và Pogostemonon D có tỉ lệ tế bào sống cao trong khoảng là 95,4 - 105,94%, trong khi các mẫu thử còn lại tỉ

lệ tế bào thấp (< 50%). Tuy nhiên, tại mức liều 20 µg/mL, tỉ lệ tế bào sống sót ở tất cả các mẫu thử là tương đối cao.

Kết quả ức chế sản sinh NO của các hợp chất tinh khiết được mô tả tại bảng 3.17 cho thấy hợp chất pogostemin C và pogostemon D có khả năng ức chế mạnh với IC₅₀ lần lượt là 3,76 ± 0,15 và 7,29 ± 0,74 µM, mạnh hơn nhiều so chứng dương L-NMMA ở cùng điều kiện thử nghiệm. Ngoài ra, các mẫu thử khác như Pogostemonon A và Pogostemonon C cũng thể hiện hoạt tính tốt với IC₅₀ trong khoảng 26,77 - 28,99 µM. Các hợp chất còn lại cho ức chế sản sinh NO yếu hoặc chưa thể hiện hoạt tính trong điều kiện thử nghiệm này.

b. Khả năng điều hoà các cytokin

Bảng 3.18. Khả năng điều hoà các cytokin của hợp chất

Pogostemin C

| Nồng độ (µM) | Hàm lượng cytokin (pg/mL) | | |
|-----------------|---------------------------|------------------------|------------------------|
| | IL-6 | IL-10 | TNF-α |
| 50,5 | 130,97 ± 17,31 | 384,85* ± 30,94 | 428,44* ± 51,09 |
| 10,1 | 121,35 ± 18,02 | 232,77 ± 14,81 | 534,07 ± 37,99 |
| 2,02 | 111,06 ± 14,99 | 214,15 ± 13,08 | 609,82 ± 56,38 |
| 0,404 | 141,06 ± 18,36 | 209,97 ± 9,44 | 632,17 ± 49,84 |
| Chứng âm | 136,74 ± 8,65 | 218,81 ± 32,67 | 714,09 ± 57,29 |

Ghi chú: * Sai khác có ý nghĩa thống kê với $P < 0,05$

Pogostemin C có tác dụng ức chế sản sinh NO tốt nhất được lựa chọn tiếp tục đánh giá khả năng điều hoà trên các cytokin. Pogostemin C có khả năng kích thích sản sinh IL-10 và ức chế sản sinh TNF-α so với đối chứng không ủ mẫu ở mức có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$) ở nồng độ 50,5 µM.

3.3.2. Hoạt tính gây độc tế bào ung thư

3.3.2.1. Thử nghiệm gây độc tế bào

Các hợp chất phân lập từ phân đoạn cao E được đánh giá tác dụng gây độc tế bào - phương pháp sử dụng thuốc nhuộm SRB

Bảng 3.19. Kết quả gây độc tế bào của các hợp chất tinh khiết

| Tên hợp chất | IC ₅₀ ± SD (µM) | | | | |
|-------------------|----------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | Hep-G2 | AGS | KB | LU-1 | SW-480 |
| Pogostemin A | 30,56 ± 4,91 | 24,55 ± 2,78 | 22,08 ± 0,55 | 33,18 ± 2,29 | 18,75 ± 2,83 |
| Pogostemin B | 77,28 ± 8,58 | 91,72 ± 5,33 | 155,87 ± 12,17 | 138,03 ± 5,67 | 89,74 ± 5,88 |
| Pogostemin C | 144,06 ± 16,14 | 122,78 ± 7,75 | 147,58 ± 14,45 | 115,82 ± 7,82 | 100,34 ± 5,42 |
| Pogostemonon A | 95,57 ± 10,54 | 172,72 ± 14,74 | 128,58 ± 13,54 | 131,06 ± 4,83 | 105,84 ± 13,33 |
| Pogostemonon B | 162,47 ± 16,49 | 146,59 ± 10,98 | 193,87 ± 11,87 | 188,75 ± 19,51 | 180,44 ± 13,05 |
| Pogostemonon C | 219,87 ± 7,68 | 183,95 ± 14,89 | 232,22 ± 11,79 | 236,08 ± 21,47 | 177,9 ± 8,93 |
| Pogostemon D | - | - | - | - | - |
| Pogostem | 110,97 ± 10,7 | 107,69 ± 9,66 | 93,96 ± 11,56 | 134,7 ± 14,22 | 95,38 ± 8,66 |
| Ellipticin | 1,58 ± 0,12 | 1,66 ± 0,24 | 1,5 ± 0,16 | 1,7 ± 0,24 | 1,54 ± 0,16 |

Ghi chú: “-”: không có hoạt tính

3.3.2.2. Hoạt tính cảm ứng apoptosis

Pogostemin A thể hiện hoạt tính gây độc tế bào ung thư khá tốt được tiếp tục nghiên cứu khả năng cảm ứng apoptosis.

a. Phương pháp nhuộm nhân tế bào với Hoechst 33342

Bảng 3.20. Kết quả nhuộm tế bào bằng Hoechst 33342

| % tế bào apoptosis | | | | |
|----------------------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------|-----------------|
| Pogostemin A (13,02 µM) | Pogostemin A (26,04 µM) | Pogostemin A (52,08 µM) | Camptothecin (5µM) | Đối chứng âm |
| 4,50 | 6,54 | 34,30 | 28,57 | 5,19 |

Kết quả trên cho thấy, tại các nồng độ nghiên cứu, mẫu pogostemin A có khả năng gây ra sự cô đặc hoặc phân mảnh nhân tế bào với tỉ lệ từ 4,50% đến 34,30% và cao hơn so với đối chứng âm 5,19 %.

b. Kỹ thuật đếm tế bào dòng chảy

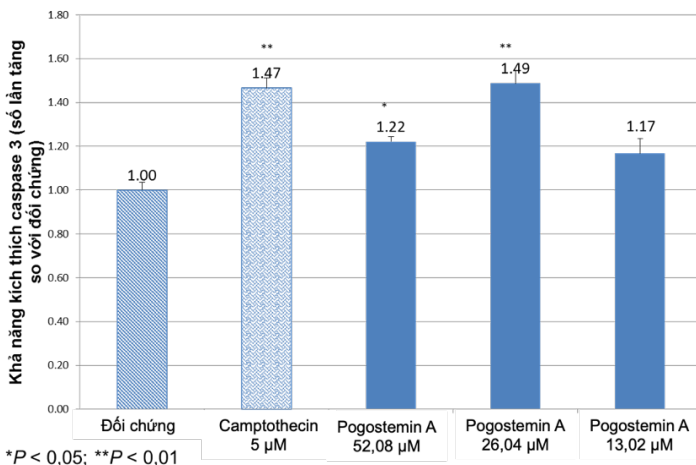
Bảng 3.21. Tỷ lệ tế bào apoptosis dưới tác động của pogostemin A

| Mẫu thí nghiệm | % tế bào sống | % tế bào apoptosis sớm | % tế bào apoptosis muộn | % tế bào hoại tử |
|----------------------------|---------------|------------------------|-------------------------|------------------|
| Đối chứng âm | 82,8 | 9,8 | 5,5 | 1,5 |
| Pogostemin A 52,08 μ M | 71,2 | 14,9 | 12,6 | 1,0 |
| Pogostemin A 26,04 μ M | 81,8 | 8,2 | 7,4 | 2,2 |
| Pogostemin A 13,02 μ M | 83,6 | 9,9 | 5,4 | 0,5 |
| Camptothecin 5 μ M | 74,4 | 12,7 | 10,7 | 2,0 |

Tỷ lệ tế bào apoptosis dưới tác động của Pogostemin A thông qua kỹ thuật đếm tế bào dòng chảy được thể hiện trong bảng 3.21 cho thấy mẫu Pogostemin A ở nồng độ 52,08 μ M có tỷ lệ tế bào apoptosis sớm và tỷ lệ tế bào apoptosis muộn đều tăng lên so với đối chứng. Ở mẫu đối chứng, tỷ lệ % tế bào chết do apoptosis sớm chỉ bằng 9,8% tuy nhiên quần thể tế bào này tăng lên đến 14,9% dưới tác động của Pogostemin A với nồng độ 52,08 μ M. Tỷ lệ tế bào chết do apoptosis muộn tăng lên đến 12,6% dưới tác động của Pogostemin A với nồng độ 52,08 μ M so với đối chứng âm 5,5%. Ở các nồng độ thấp hơn (26,04 và 13,02 μ M) sự thay đổi về số lượng tế bào apoptosis không rõ ràng. Như vậy, có thể thấy mẫu nghiên cứu đã thể hiện khả năng gây chết tế bào thông qua quá trình apoptosis.

c. Khả năng cảm ứng sản sinh caspase-3

Khả năng cảm ứng sản sinh caspase-3 của Pogostemin A được thể hiện ở hình 3.29. Kết quả cho thấy, Pogostemin A có khả năng kích thích tế bào LU-1 sản sinh caspase-3, điều này thể hiện rõ ở nồng độ 52,08 và 26,04 μ M với số lần kích thích tăng 1,22 và 1,49 lần so với đối chứng âm ($P < 0.05$).



Hình 3.29. Khả năng cảm ứng sản sinh caspase-3 của Pogostemin A trên dòng tế bào ung thư phổi LU-1

3.3.3. Độc tính cấp

Mẫu thử là cao chiết phân đoạn ethyl acetat (độ ẩm 7,5%) có tác dụng chống viêm *in vitro* tốt nhất được lựa chọn đánh giá độc tính cấp. Từ bảng 3.22 cho thấy LD₀ của cao chiết là 6,4 g/kg, liều LD₁₀₀ là 12,5 g/kg. Sử dụng phương pháp Behrens-Karber xác định được liều LD₅₀ của cao chiết ethyl acetat loài Tu hùng tai đường uống trên chuột nhắt trắng là 9,18 g/kg.

Bảng 3.22. Kết quả thử độc tính cấp của cao ethyl acetat Tu hùng tai.

| Lô thí nghiệm | Liều uống (g/kg) | n | Số chuột chết/lô | d | z | d × z |
|----------------------|------------------|----|------------------|------|-----|-------|
| 1 | 6,4 | 10 | 0 | | | |
| 2 | 8,0 | 10 | 3 | 1,60 | 1,5 | 2,40 |
| 3 | 9,5 | 10 | 7 | 1,50 | 5,0 | 7,50 |
| 4 | 11,0 | 10 | 7 | 1,50 | 7,0 | 10,50 |
| 5 | 12,5 | 10 | 10 | 1,50 | 8,5 | 12,75 |
| $\Sigma(d \times z)$ | | | | | | 33,15 |

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 thành phần hóa học của loài Tu hùng tai

Từ thân và lá loài Tu hùng tai đã phân lập và xác định cấu trúc hóa học của 11 hợp chất. Trong đó, có 9 hợp chất mới, bao gồm 3 meroterpenoid (Pogostemin A-C), 5 dẫn xuất phloroglucinol (Pogostemonon A-D, Pogostemon D) và 1 triterpen (Pogostem) và 2 hợp chất cũ là diterpenoid (geranyllinalool) và sterol (stigmasterol).

2. Về độc tính cấp và tác dụng sinh học loài Tu hùng tai

- Về tác dụng chống viêm *in vitro*:

+ Cao chiết ethyl acetat và diclorometan thể hiện hoạt tính ức chế sản sinh NO tốt với IC_{50} 25,28±1,52 và 28,68±1,49 $\mu\text{g/ml}$. Trong khi đó, mẫu cao *n*-hexan chưa thể hiện hoạt tính ở các nồng độ nghiên cứu. Các mẫu còn lại bao gồm cao methanol toàn phần và cao nước thể hiện mức hoạt tính khá và trung bình với IC_{50} trong khoảng 60,54 - 64,73 $\mu\text{g/ml}$.

+ Hợp chất Pogostemin C và Pogostemon D có khả năng ức chế sản sinh NO mạnh với IC_{50} lần lượt là 3,76 ± 0,15 và 7,29 ± 0,74 μM , mạnh hơn chứng dương L-NMMA ở cùng điều kiện thử nghiệm. Các mẫu thử khác như Pogostemonon A, Pogostemonon C và Pogostemin B thể hiện hoạt tính tốt với IC_{50} trong khoảng 26,77 - 40,78 μM .

+ Hợp chất Pogostemin C ở nồng độ 50,5 μM có khả năng cảm ứng sản sinh IL-10 và ức chế sản sinh TNF- α so với đối chứng không ủ mẫu ($P < 0,05$).

- Về tác dụng gây độc tế bào ung thư

+ Hợp chất Pogostemin A thể hiện hoạt tính trung bình trên 5 dòng tế bào thử nghiệm là Hep-G2, AGS, KB, LU-1 và SW-480 với IC_{50} trong khoảng 18,75 - 33,18 μM . Các hợp chất Pogostemin B-C, Pogostemonon A-C, Pogostemon D thể hiện mức hoạt tính yếu với IC_{50} trong khoảng 77,28 - 236,08 μM trên 5 dòng tế bào thử nghiệm.

+ Hợp chất Pogostemin A ở nồng độ 52,08 μM có khả năng cảm ứng apoptosis trên tế bào ung thư phổi LU-1, gây ra sự cô đặc hoặc phân mảnh nhân tế bào với tỉ lệ 34,30%; cảm ứng sản sinh caspase-3 với hàm lượng tăng 1,22 lần so với đối chứng âm ($P < 0,05$); tỉ lệ tế bào apoptosis sớm tăng 14,9% và đặc biệt tỉ lệ tế bào apoptosis muộn tăng 12,6% thông qua kỹ thuật đếm tế bào dòng chảy

- Đã xác định được liều LD_{50} của cao chiết ethyl acetat loài Tu hùng tai bằng đường uống trên chuột nhắt trắng là 9,18 mg/kg.

KIẾN NGHỊ

Các nghiên cứu của đề tài trên loài Tu hùng tai (*Pogostemon auricularius* (L.) Hassk.) đã dẫn đến việc phân lập và xác định nhiều hợp chất có cấu trúc lý thú và có hoạt tính sinh học tốt. Vì vậy, đề tài xin có kiến nghị sau:

- Tiếp tục nghiên cứu hoá thực vật và hoạt tính sinh học của các phân đoạn khác của loài Tu hùng tai.

- Tiếp tục nghiên cứu tác dụng chống viêm của cao chiết ethyl acetat trên động vật.

- Nghiên cứu sâu hơn về cơ chế tác dụng cũng như mối quan hệ cấu trúc hóa học và hoạt tính sinh học của các hoạt chất.

CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. **Linh Thuy Thi Tran**, Duc Viet Ho, Dung Viet Le, Tran Manh Hung, Hoai Thi Nguyen, Ain Raal (2018), Three new phloroglucinol derivatives from the aerial parts of *Pogostemon auricularius* and their cytotoxic activity, *Phytochemistry Letters*, 28, 88-92.
2. Hoai Thi Nguyen, **Linh Thuy Thi Tran**, Duc Viet Ho, Dung Viet Le, Ain Raal, Hiroyuki Morita (2018), Pogostemins A-C, three new cytotoxic meroterpenoids from *Pogostemon auricularius*, *Fitoterapia*, 130, 100-104.
3. Duc Viet Ho, **Linh Thuy Thi Tran**, Dung Viet Le, Hung Manh Tran, Nhan Trong Le, Anh Tuan Le, Hoai Thi Nguyen, and Ain Raal (2019) A new triterpene and a new phloroglucinol derivative from the aerial parts of *Pogostemon auricularius*, *Chemistry of Natural Compounds*, 55(5), 890-894.
4. **Linh Thuy Thi Tran**, Duc Viet Ho, Dung Viet Le, Kiem Van Phan, Hoai Thi Nguyen, Ain Raal (2019), Apoptosis-inducing effect of Pogostemin a isolated from the aerial parts of *Pogostemon auricularius* against the human lung cancer cells, *Journal of Biologically Active Products from Nature*, 9(5), 320-327.
5. **Linh Thuy Thi Tran**, Duc Viet Ho, Dung Viet Le, Hoai Thi Nguyen, Ain Raal (2020), The effect of *Pogostemon auricularius* fractions and its compounds on some proinflammatory and anti-inflammatory molecules in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages, *American Journal of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, 10(1), 25-31.
6. **Trần Thị Thùy Linh**, Hồ Việt Đức, Lê Việt Dũng, Lê Trọng Nhân, Trần Mạnh Hùng, Nguyễn Thị Hoài (2020), Chiết xuất, phân lập và xác định cấu trúc dẫn xuất phloroglucinol mới từ cây Tu hùng tai (*Pogostemon auricularius* (L.) Hassk. - Lamiaceae), Tạp chí Y Dược học, 6, tr. 56-61.