BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO BỘ Y TẾ

VIỆN DƯỢC LIỆU

NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN HOÁ HỌC VÀ TÁC DỤNG THEO HƯỚNG ĐIỀU HÒA MIỄN DỊCH, CHỐNG VIÊM *IN VITRO* CỦA CÀNH, LÁ LOÀI NIỆT DÓ (*Wikstroemia indica* (L.) C.A.Mey.)

CHUYÊN NGÀNH: DƯỢC LIỆU - DƯỢC HỌC CỔ TRUYỀN
MÃ SỐ: 9720206

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ DƯỢC HỌC

HÀ NỘI, 2026

Công trình được hoàn thành tại:
Trung tâm Tài nguyên Dược liệu, Viện Dược liệu.
Khoa Hóa Phân tích - Tiêu chuẩn, Viện Dược liệu.
Bộ môn Dược liệu, Viện đào tạo Dươc – Học viện Quân y
Trung tâm phổ Cộng hưởng từ hạt nhân, Viện Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VAST).
Khoa Hóa, Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội.
Khoa Vi sinh học, Miễn dịch học và Glycobiology, Viện Xét nghiệm Y khoa, Đại học Lund, Thụy Điển.
Phòng Thử nghiệm Sinh học, Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.
Khoa Dược, Đại học Quốc gia Suncheon, Hàn Quốc.

A. GIỚI THIỆU LUẬN ÁN

1. Đặt vấn đề

Niệt dó (*Wikstroemia indica* (L.) C.A.Mey.) thuộc họ Trầm (Thymelaeaceae), là cây bụi nhỏ mọc hoang tại nhiều vùng trung du, miền núi ở Việt Nam. Theo y học dân gian, vỏ rễ và vỏ thân của cây thường dùng để chữa viêm hạch, hen suyễn, ho gà, viêm amidan, viêm tuyến mang tai; lá tươi dùng ngoài chữa nhọt, sưng tấy, vết thương, rắn cắn. Các nghiên cứu về dược lý cho thấy Niệt dó thể hiện một số hoạt tính sinh như kháng viêm, chống dị ứng, độc tế bào, chống ung thư, kháng HIV… Những công dụng theo Y học cổ truyền và tác dụng sinh học của Niệt dó có mối liên quan mật thiết đến quá trình viêm và hoạt động điều tiết miễn dịch của cơ thể. Thực tiễn cho thấy, những nghiên cứu về các tác nhân điều hòa và tăng cường miễn dịch mới đang là một hướng đi đầy triển vọng nhằm hỗ trợ, phòng và điều trị các bệnh liên quan đến viêm mạn tính, các bệnh tự miễn và ung thư. Bên cạnh đó, kết quả sàng lọc hoạt tính sinh học kháng ung thư và điều hòa miễn dịch của một số của cây dược liệu ở Việt Nam trong Đề tài Nghị định thư Việt Nam – Hàn Quốc (2019–2022) "**Nghiên cứu hoạt tính kháng ung thư và điều hòa miễn dịch của một số cây thuốc ở Việt Nam**" (Mã số: 09/2020/HĐ-NĐT) đã xác định Niệt dó là ứng viên tiềm năng cho các nghiên cứu tiếp theo về tác dụng điều hòa miễn dịch. Do đó, luận án "**Nghiên cứu thành phần hoá học và tác dụng theo hướng điều hòa miễn dịch, chống viêm *in vitro* của cành, lá loài Niệt dó (*Wikstroemia indica* (L.) C.A.Mey.)**" đã được thực hiện với mục tiêu là góp phần cung cấp các cơ sở khoa học nhằm nâng cao giá trị sử dụng của loài Niệt dó.

2. Mục tiêu và nội dung của luận án

2.1. Mục tiêu của luận án

+ Chiết xuất, phân lập và xác định được cấu trúc hóa học của một số hợp chất từ cành và lá của loài Niệt dó theo định hướng tác dụng sinh học.

+ Sàng lọc và đánh giá hoạt tính *in vitro* trên một số cytokin liên quan đến viêm và miễn dịch của một số hợp chất từ cành và lá Niệt dó.

2.2. Nội dung của luận án

2.2.1. Nghiên cứu về thành phần hoá học

+ Chiết xuất cao toàn phần EtOH 70% (**WIT**) và các cao phân đoạn *n*-hexan (**WIH**), ethyl acetat (**WIE**) và cắn nước (**WIW**) từ cành và lá Niệt dó.

+ Phân lập và xác định cấu trúc hóa học của một số hợp chất từ phân đoạn **WIE** và **WIW** của cành và lá Niệt dó.

2.2.2. Nghiên cứu hoạt tính in vitro trên một số cytokin liên quan đến viêm và miễn dịch

+ Sàng lọc khả năng ức chế sản sinh IL-1β và kích thích sản sinh IL-10 trên mô hình đại thực bào RAW 264.7 được kích thích bằng LPS của cao chiết (**WIT**, **WIH**, **WIE** và **WIW**) và một số hợp chất phân lập được từ phân đoạn **WIE** và **WIW** của cành và lá Niệt dó.

+ Đánh giá tác dụng ức chế sản sinh Foxp3, INF-γ và IL-17 trên dòng tế bào T CD4+ được kích thích bằng LPS của một số hợp chất phân lập được từ Niệt dó.

3. Những đóng góp mới của luận án

3.1. Về thành phần hóa học

Từ hai phân đoạn **WIE** và **WIW** đã phân lập và xác định được cấu trúc hóa học của 19 hợp chất**.** Trong số các hợp chất phân lập được có 02 hợp chất lignan mới được đề nghị gọi tên là *threo*-citrusin B (**WI14**) và isonitidanin-4-*O*-*β*-D-glucosid (**WI15**); 04 hợp chất lần đầu tiên phân lập được trong chi *Wikstroemia* bao gồm: **WI4** (adicardin), **WI10** (kaempferol 3-*O*-*α*-L-rhamnopyranosid), **WI12** (*erythro*-syringylglycerol-8-*O*-4'-sinapyl ether 4-*O*-*β*-D-glucopyranosid) và **WI13** (*erythro*-citrusin B); 05 hợp chất lần đầu tiên được phân lập từ loài *W. indica* bao gồm: **WI7** (wikstronutin), **WI16** ((7S^*,8R^*)-dehydrodiconiferyl alcohol 4-*O*-*β*-D-glucopyranosid), **WI17** ((7S^*,8R^*)-5-methoxydehydrodiconiferyl alcohol 4-*O*-*β*-D-glucopyranosid), **WI18** (pinoresinol di-*O*-*β*-D-glucopyranosid) và **WI19** (liriodendrin).

3.2. Về hoạt tính trên một số cytokin liên quan đến viêm và miễn dịch

+ Sàng lọc tác dụng sinh học *in vitro* của các loại cao chiết **WIT**, **WIH**, **WIE** và **WIW** dựa trên hai tín hiệu IL-1β và IL-10. Kết quả cho thấy phân đoạn **WIE** và phân đoạn **WIW** thể hiện tác dụng sinh học tốt hơn cao tổng **WIT** và phân đoạn **WIH**.

+ Sàng lọc 18/19 hợp chất phân lập được từ hai phân đoạn **WIE** và **WIW** dựa trên hai tín hiệu IL-1β và IL-10. Kết quả cho thấy ở cùng nồng độ 10 μM các hợp chất **WI3**, **WI5**, **WI7**, **WI8**, **WI9** và

WI19 được coi là các hợp chất tiềm năng và được lựa chọn cho các đánh giá sâu hơn về tác dụng sinh học.

+ Đánh giá tác dụng ức chế sản sinh IL-1β và kích thích sản sinh IL-10 trên dòng tế bào RAW 264.7 được kích thích bằng LPS với một số hợp chất phân lập được từ phân đoạn **WIE** và **WIW**. Trong đó, khả năng ức chế IL-1β của các hợp chất **WI3**, **WI5**, **WI7**, **WI8**, **WI9** và **WI19** với giá trị IC_{50} lần lượt là 6,4 ± 1,23; 31,1 ± 3,07; 19,98 ± 1,92; 14,88 ± 1,04; 18,80 ± 2,46 và 9,73 ± 1,26 μM.

+ Đánh giá tác dụng ức chế Foxp3, INF-γ và IL-17. của một số chất tiềm năng trên dòng tế bào T CD4+ được kích thích bằng LPS:

•Về khả năng ức chế Foxp3: Hợp chất **WI19** thể hiện tác dụng ức chế mạnh nhất với giá trị IC_{50} là 13,67 ± 1,85 μM, nhóm các hợp chất thể hiện tác dụng trung bình là **WI8**, **WI7** và **WI3** với giá trị IC_{50} lần lượt là 18,84 ± 1,16; 20,47 ± 3,04 và 23,38 ± 3,47 μM. Trong khi đó, **WI5** và **WI9** cho thấy khả năng ức chế Foxp3 yếu hơn các hợp chất còn lại với giá trị IC_{50} lần lượt là 43,45 ± 5,34 và 51,26 ± 6,72 μM.

•Về khả năng ức chế INF-γ: **WI3** thể hiện hoạt tính ức chế INF-γ mạnh hơn các chất tiềm năng còn lại với IC_{50} là 9,28 ± 1,23 μM. **WI5** và **WI7** thể hiện hoạt tính ức chế interferon này ở mức trung bình. Trong khi đó các hợp chất **WI8**, **WI9** và **WI19** cho thấy hoạt tính yếu hơn các hợp chất khác trong thử nghiệm.

•Về khả năng ức chế IL-17: Ba hợp chất **WI3**, **WI19** và **WI7** thể hiện tác dụng ức chế IL-17 mạnh hơn hợp chất tiềm năng còn lại với giá trị IC_{50} lần lượt là 12,62 ± 2,57; 14,50 ± 1,04 và 14,69 ± 2,13 μM. Các hợp chất còn lại thể hiện khả năng ức chế sản sinh IL-17 với IC_{50} là 18,41 ± 3,21; 22,92 ± 4,41 và 26,06 ± 3,83 μM cho các hợp chất lần lượt là **WI8**, **WI5** và **WI9**.

4. Ý nghĩa của luận án

+ Ý nghĩa khoa học: Các kết quả nghiên cứu của Luận án đã góp phần bổ sung thêm dữ liệu khoa học về thành phần hóa học và tác dụng sinh học của cao chiết và các hợp chất phân lập được từ Niệt dó trên một số cytokin liên quan đến viêm và miễn dịch, đồng thời làm cơ sở cho các nghiên cứu và ứng dụng của loài này trong tương lai.

+ Ý nghĩa thực tiễn: Làm tiền đề cho việc phát triển sản phẩm từ loài Niệt dó, vừa phục vụ nhu cầu chăm sóc sức khỏe cộng đồng, vừa góp phần vào công tác bảo tồn, khai thác, phát triển loài cây này.

5. Bố cục của luận án

Luận án gồm 4 chương, 32 bảng, 50 hình, 149 tài liệu tham khảo, 03 phụ lục. Các phần chính trong luận án có 130 trang, gồm: Đặt vấn đề: 02 trang, Tổng quan: 29 trang, Nguyên vật liệu và phương pháp nghiên cứu: 13 trang; Kết quả nghiên cứu: 62 trang; Bàn luận: 22 trang; Kết luận và kiến nghị: 02 trang.

B. NỘI DUNG CỦA LUẬN ÁN

CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN

Đã tổng hợp và trình bày có hệ thống các kết quả nghiên cứu từ trước đến nay về thực vật học, thành phần hóa học, tác dụng sinh học và công dụng của loài Niệt dó (*W. indica*) cũng như các thông tin sơ lược về viêm và đáp ứng miễn dịch (khái niệm, các cách thức đáp ứng miễn dịch). Vai trò của một số cytokin, Foxp3, đại thực bào và tế bào T CD4+ trong đáp ứng miễn dịch và phản ứng viêm.

CHƯƠNG 2: NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu nghiên cứu

Dược liệu dùng trong nghiên cứu bao gồm cành và lá của cây Niệt dó được thu hái tại xã Minh Đức, huyện Việt Yên, tỉnh Bắc Giang (địa chỉ sau sát nhập là phường Việt Yên, tỉnh Bắc Ninh) vào tháng 9 năm 2022. Mẫu xác định tên khoa học gồm đầy đủ các bộ phận (rễ, thân, lá và hoa) được ThS. Nguyễn Quỳnh Nga và ThS. Phan Văn Trường, Trung tâm Tài nguyên, Viện Dược liệu giám định tên khoa học là *Wikstroemia indica* (L.) C.A.Mey., họ Trầm (Thymelaeaceae). Tiêu bản được lưu tại Trung tâm Tài nguyên Dược liệu, Viện Dược liệu (số hiệu mẫu DV-080922).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

+ Chiết xuất cao toàn phần trong dược liệu bằng phương pháp chiết hồi lưu với ethanol 70% và chiết cao phân đoạn bằng phương pháp chiết lỏng - lỏng.

+ Phân lập các hợp chất bằng các phương pháp sắc ký cột hở kết hợp với theo dõi quá trình sắc ký bằng sắc ký lớp mỏng (TLC). Phát hiện sắc ký đồ TLC bằng thuốc thử (H_2SO_4 10%/EtOH) và quan sát dưới ánh sáng tử ngoại, bước sóng 254 và 366 nm. Tinh chế bằng phương pháp sắc ký lỏng bán điều chế (semi-preparative HPLC), kết hợp với phương pháp kết tinh bằng hệ dung môi thích hợp.

+ Cấu trúc hóa học của các các hợp chất phân lập được xác định dựa trên các phương pháp phổ, bao gồm: Phổ khối (ESI-MS, HR-ESI-MS/MS), phổ cộng hưởng từ hạt nhân một chiều (^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, ^{13}C-APT NMR) và phổ cộng hưởng từ hạt nhân 2 chiều (HMBC, HSQC, COSY…), phổ ECD lý thuyết và thực nghiệm kết hợp so sánh với tài liệu tham khảo.

+ Tính toán ECD lý thuyết thực hiện dựa trên các cấu dạng (conformer) cho mỗi đồng phân tiềm năng được tìm kiếm bằng phần mềm MAESTRO.

+ Xác định cấu hình tuyệt đối của đường theo phương của Tanaka và các cộng sự: Phần đường sau khi được thủy phân và làm phản ứng được phân tích bằng HPLC kết hợp so sánh và đối chiếu với mẫu đường chuẩn.

+ Đánh giá ảnh hưởng của cao chiết, chất chiết lên tế bào RAW 264.7 bằng phương pháp MTT.

+ Sàng lọc và đánh giá hoạt tính trên một số cytokin liên quan đến viêm và miễn dịch dựa trên giá trị nồng độ các cytokin được định lượng bằng phương pháp ELISA theo đúng hướng dẫn của từng bộ kit.

+ Số liệu có phân phối chuẩn và được trình bày dưới dạng số giá trị trung bình ± SEM và phân tích bằng phần mềm GraphPad Prism® 9.5.0. Phép thử *t*-test áp dụng để so sánh giữa 2 nhóm độc lập; phân tích phương sai một nhân tố (one-way ANOVA) kết hợp hậu kiểm Dunnett để so sánh giá trị trung bình của lô thử với lô chứng. Sự khác biệt giữa các lô đánh giá được coi là có ý nghĩa khi $p < 0,05$.

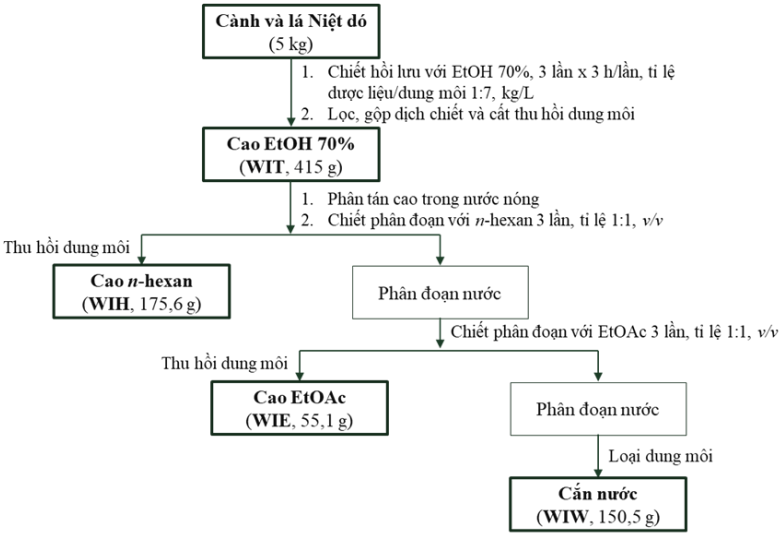
CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN HÓA HỌC

3.1.1. Chiết xuất và phân lập các hoạt chất

3.1.1.1. Chiết xuất

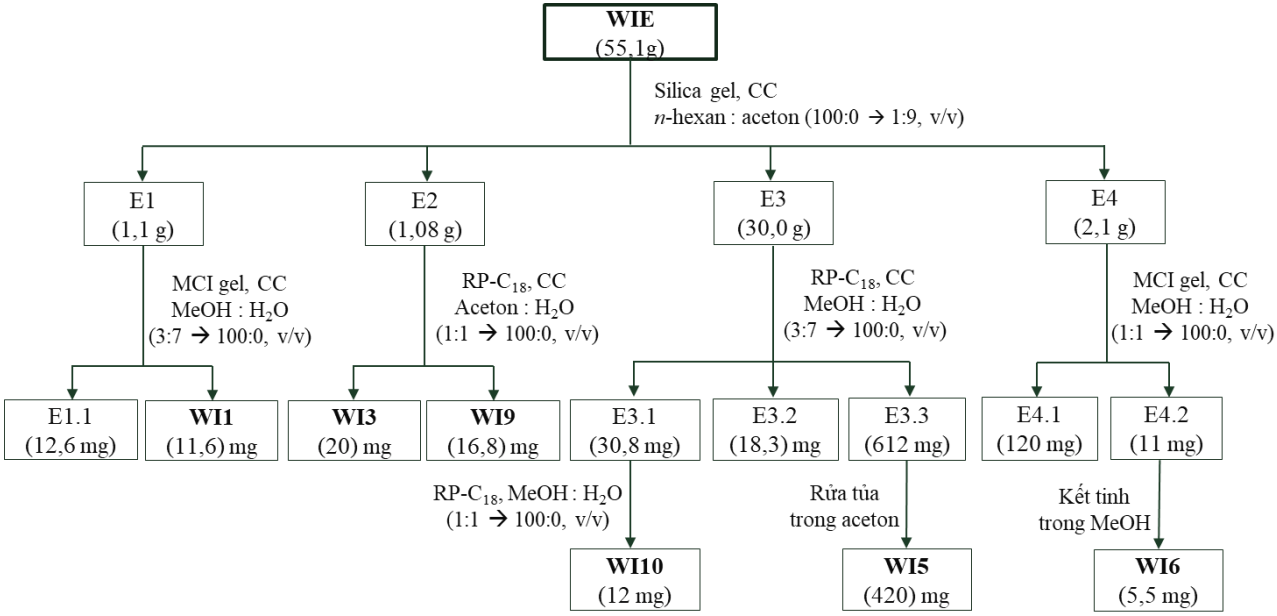
Từ 5,0 kg cành và là Niệt dó, bằng phương pháp chiết hồi lưu đã chiết xuất được 415 g cao **WIT** và bằng phương pháp chiết lỏng – lỏng thu được 175,6 g cao **WIH**, 55,1g cao **WIE** và 150,5 g cao **WIW** (**Hình 3.1**)



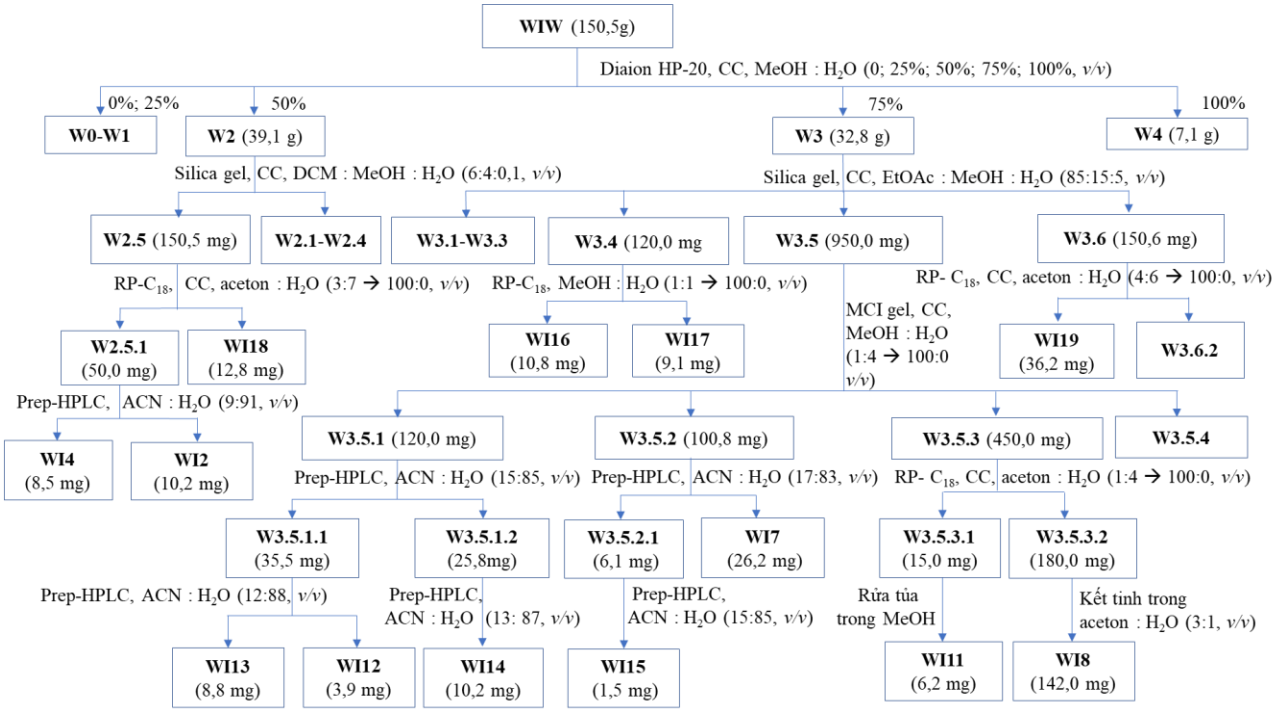
Hình 3.1. Sơ đồ tóm tắt quá trình chiết cao toàn phần và các cao phân đoạn từ cành và lá Niệt dó

3.1.1.2. Kết quả phân lập các hợp chất

Từ 55,1 cao **WIE** và 150,5 g cao **WIW**, bằng các phương pháp sắc ký kết hợp với phương pháp kết tinh đã phân lập được 19 hợp chất (**Hình 3.2** và **Hình 3.3**)



Hình 3.2. Sơ đồ tóm tắt quá trình phân lập các hợp chất từ cao EtOAc của cành và lá Niệt dó



Hình 3.3. Sơ đồ tóm tắt quá trình phân lập các hợp chất từ cao nước của cành và lá Niệt dó

3.1.2. Xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất phân lập được

Hợp chất WI1 (methyl 4-hydroxybenzoat): Dạng bột màu trắng, ESI-MS: *m/z* = 151,20 $[M–H]^-$. Phổ ^{1}H-NMR (600 MHz, CD_3OD) δ_H (ppm): 7,86 (2H, d, *J* = 8,4 Hz, H-2, H-6), 6,82 (2H, d, *J* = 8,4 Hz, H-3, H-5), 3,84 (3H, s, -OCH3). Phổ ^{13}C-NMR (125 MHz, CD_3OD) δ_C (ppm): 122,3 (C-1), 132,7 (C-2, C-6), 115,2 (C-3, C-5), 163,5 (C-4), 168,7 (C-7), 52,2 (-OCH_3).

Hợp chất WI3 (umbelliferon): Dạng tinh thể màu trắng ngà, ESI-MS: *m/z* 161,15 $[M–H]^-$. Phổ ^{1}H-NMR (600 MHz, aceton-d_6) δ_H (ppm): 6,15 (1H, d, *J* = 9,6 Hz, H-3), 7,85 (1H, d, *J* = 9,6 Hz, H-4), 7,48 (1H, d, *J* = 8,4 Hz, H-5), 6,82 (1H, dd, *J* = 8,4; 1,8 Hz, H-6), 6,74 (1H, d, *J* = 1,8 Hz, H-8). Phổ ^{13}C-NMR (150 MHz, aceton-d_6) δ_C (ppm): 162,3 (C-2), 112,6 (C-3), 144,9 (C-4), 112,6 (C-4a), 130,4 (C-5), 113,9 (C-6), 161,3 (C-7), 103,2 (C-8), 156,9 (C-8a).

Hợp chất WI2 (syringin): Dạng bột vô định hình không màu. Phổ ^{1}H-NMR (500 MHz, CD_3OD) δ_H (ppm): 6,78 (2H, s, H-3, H-5), 6,57 (1H, d, *J* = 15,9 Hz, H-7), 6,35 (1H, dt, *J* = 15,9; 5,6 Hz, H-8), 4,25 (1H, dd, *J* = 5,6; 1,4 Hz, H-9), 3,88 (6H, s, 2,6-OCH_3), 4,89 (1H, ovl, H-1'), 3,41–3,54 (3H, m, H-2', H-3', H-4'), 3,24 (1H, m, H-5'), 3,80 (1H, dd, *J* = 12,0; 2,3 Hz, H-6'a), 3,69 (1H, dd, *J* = 12,0; 5,1 Hz, H-6'b). Phổ ^{13}C-NMR (125 MHz, CD_3OD) δ_C (ppm): 135,9 (C-1), 154,4 (C-2, C-6), 105,5 (C-3, C-5), 135,3 (C-4), 131,3 (C-7), 130,1 (C-8), 63,6 (C-9), 57,1 (2,6-OCH_3), 105,4 (C-1'), 75,8 (C-2'), 78,4 (C-3'), 71,4 (C-4'), 77,9 (C-5'), 62,6 (C-6').

Hợp chất WI4 (adicardin): Dạng chất rắn màu trắng Phổ ^{1}H-NMR (500 MHz, CD_3OD) δ_H (ppm): 6,32 (1H, d, *J* = 9,5 Hz, H-3), 7,93 (1H, d, *J* = 9,5 Hz, H-4), 7,60 (1H, d, *J* = 8,6 Hz, H-5), 7,11 (1H, d, *J* = 8,6 Hz, H-6), 7,15 (1H, s, H-8), 5,00 (1H, ovl, H-1'), 3,72 (1H, m, H-2'), 3,51 (1H, m, H-3'), 3,36 (1H, m, H-4'), 3,99 (1H, m, H-5'), 4,07 (1H, m, H-6'a), 3,63 (1H, m, H-6'b), 5,00 (1H, ovl, H-1"), 3,52 (1H, m, H-2"), 4,07 (1H, m, H-4"a), 3,79 (1H, m, H-4"b), 3,63 (2H, m, H-5"). 13C-APT NMR (125 MHz, CD_3OD) δ_C (ppm): 162,0 (C-2), 112,9 (C-3), 144,3 (C-4), 113,9 (C-4a), 129,0 (C-5), 114,0 (C-6), 160,7 (C-7), 103,7 (C-8), 155,3 (C-8a), 100,6 (C-1'), 75,8 (C-2'), 73,4 (C-3'), 70,3 (C-4'), 76,9 (C-5'), 67,6 (C-6'), 109,8 (C-1"), 76,6 (C-2"), 79,1 (C-3"), 73,6 (C-4"), 64,2 (C-5").

Hợp chất WI5 (daphnoretin): Tinh thể màu vàng nhạt, ESI-MS: *m/z*: 351,15 $[M–H]^-$. Phổ ^{1}H-NMR (600 MHz, Aceton-d_6) δ_H

(ppm): 7,82 (1H, s, H-4), 7,21 (1H, s, H-5), 6,88 (1H, s, H-8), 3,89 (3H, s, 6-OCH_3), 6,31 (1H, d, J = 9,6 Hz, H-3'), 7,97 (1H, d, J = 9,6 Hz, H-4'), 7,68 (1H, d, J = 8,4 Hz, H-5'), 7,08 (1H, dd, J = 8,4; 2,4 Hz, H-6'), 7,06 (1H, d, J = 2,4 Hz, H-8'). Phổ ^{13}C-NMR (150 MHz, Aceton-d_6) δ_C (ppm): 161,0 (C-2), 137,0 (C-3), 131,5 (C-4), 111,1 (C-4a), 110,1 (C-5), 146,8 (C-6), 151,7 (C-7), 103,8 (C-8), 148,8 (C-8a), 56,6 (6-OCH_3), 160,5 (C-2'), 114,8 (C-3'), 144,3 (C-4'), 115,3 (C-4'a), 130,5 (C-5'), 114,1 (C-6'), 157,6 (C-7'), 104,7 (C-8'), 156,3 (C-8'a).

Hợp chất WI6 (daphnorin): Dạng chất rắn màu trắng. Phổ ^{1}H-NMR (600 MHz, DMSO-d_6) δ_H (ppm): 7,87 (1H, s, H-4), 7,24 (1H, s, H-5), 7,28 (1H, s, H-8), 3,81 (3H, s, 6-OCH_3), 6,38 (1H, d, J = 9,6 Hz, H-3'), 8,04 (1H, d, J = 9,6 Hz, H-4'), 7,72 (1H, d, J = 8,4 Hz, H-5'), 7,14 (1H, dd, J = 8,4; 2,4 Hz, H-6'), 7,22 (1H, d, J = 1,8 Hz, H-8'), 5,04 (1H, d, J = 5,4 Hz, H-1"), 3,32 (2H, m, H-2", H-3"), 3,18 (1H, m, H-4"), 3,43 (2H, m, H-5", H-6"b), 3,69 (1H, m, H-6"a). Phổ ^{13}C-NMR (150 MHz, DMSO-d_6) δ_C (ppm): 156,9 (C-2), 137,1 (C-3), 129,9 (C-4), 112,2 (C-4a), 109,5 (C-5), 146,4 (C-6), 149,1 (C-7), 103,0 (C-8), 146,7 (C-8a), 160,0 (C-2'), 114,0 (C-3'), 144,0 (C-4'), 114,6 (C-4'a), 129,9 (C-5'), 113,7 (C-6'), 159,4 (C-7'), 104,4 (C-8'), 155,0 (C-8'a), 99,7 (C-1"), 76,8 (C-2"), 73,1 (C-3"), 69,6 (C-4"), 77,1 (C-5"), 60,7 (C-6"), 56,1 (6-OCH_3).

Hợp chất WI7 (wikstronutin): Dangh bột vô định hình màu vàng nhạt, ESI-MS: m/z 639,48 $[M+Na]^+$. Phổ ^{1}H-NMR (500 MHz, CD_3OD) δ_H (ppm): 6,36 (1H, d, J = 9,5 Hz, H-3), 7,89 (2H, ovl, H-4, H-4'), 7,45 (1H, s, H-5), 7,48 (1H, s, H-8), 6,29 (1H, d, J = 9,5 Hz, H-3'), 7,57 (1H, d, J = 8,6 Hz, H-5'), 6,95 (1H, dd, J = 8,6; 2,2 Hz, H-6'), 6,83 (1H, d, J = 2,2 Hz, H-8'), 5,05 (1H, d, J = 7,8 Hz, H-1"), 3,29 (5H, trùng tín hiệu, H-2", H-3", H-4", H-2'", H-4'"), 3,77 (1H, m, H-5"), 4,07 (1H, d, J = 10,7 Hz, H-6"a), 3,64 (1H, m, H-6"b), 4,30 (1H, d, J = 7,0 Hz, H-1'"), 3,41 (1H, t, J = 9,1 Hz, H-3'"), 3,92 (1H, dd, J = 11,4; 5,4 Hz, H-5'"a), 3,17 (1H, t, J = 10,9 Hz, H-5'"b). Phổ ^{13}C-NMR (125 MHz, CD_3OD) δ_C (ppm): 163,0 (C-2), 115,4 (C-3), 145,5 (C-4), 114,5 (C-4a), 122,1 (C-5), 153,9 (C-6), 154,0 (C-7), 106,6 (C-8), 142,1 (C-8a), 162,9 (C-2'), 115,3 (C-3'), 145,0 (C-4'), 115,6 (C-4'a), 130,7 (C-5'), 114,9 (C-6'), 163,0 (C-7'), 105,1 (C-8'), 156,7 (C-8'a), 101,9 (C-1"), 74,6 (C-2"), 77,9 (C-3"), 71,0 (C-4"), 77,2 (C-5"), 70,7 (C-6"), 105,9 (C-1'"), 75,0 (C-2'"), 78,0 (C-3'"), 71,4 (C-4'"), 66,9 (C-5'").

Hợp chất WI8 (triumbelletin-7-*O*-*β*-D-glucosid): Dạng chất rắn vô định hình màu vàng nhạt, HR-ESI-MS: *m/z* 645,1150 [M+H. Phổ ^{1}H-NMR (500 MHz, CD_3OD) δ_H (ppm): 7,73 (1H, s, H-4), 7,52 (1H, d, *J* = 8,4 Hz, H-5), 7,42 (1H, d, *J* = 8,4 Hz, H-6), 6,30 (1H, d, *J* = 9,6 Hz, H-3'), 7,84 (2H, ovl, H-4', H-4''), 7,51 (1H, d, *J* = 8,4 Hz, H-5'), 6,94 (1H, d, *J* = 8,4 Hz, H-6'), 7,0 (1H, ovl, H-8'), 6,13 (1H, d, *J* = 9,6 Hz, H-3''), 7,61 (1H, d, *J* = 9,0 Hz, H-5''), 7,02 (1H, ovl, H-6''), 5,07 (1H, d, *J* = 7,8 Hz, H-1'''), 3,18 (1H, m, H-2'''), 3,42 (1H, m, H-3'''), 3,33 (1H, m, H-4'''), 3,47 (1H, m, H-5'''), 3,91 (1H, dd, *J* = 12,0; 2,4 Hz, H-6'''a), 3,68 (1H, dd, *J* = 12,0; 6,0 Hz, H-6'''b). Phổ ^{13}C-NMR (125 MHz, CD_3OD) δ_C (ppm): 159,0 (C-2), 138,8 (C-3), 130,9 (C-4), 115,4 (C-6), 159,4 (C-7), 111,9 (C-8), 151,8 (C-9), 115,1 (C-10), 160,8 (C-2'), 115,4 (C-3'), 146,1 (C-4'), 130,5 (C-5'), 114,9 (C-6'), 160,6 (C-7'), 106,1 (C-8'), 156,5 (C-9'), 116,4 (C-10'), 163,9 (C-2''), 113,5 (C-3''), 146,1 (C-4''), 130,5 (C-5''), 114,1 (C-6''), 162,7 (C-7''), 108,2 (C-8''), 154,9 (C-9''), 112,5 (C-10''), 102,6 (C-1'''), 74,7 (C-2'''), 78,2 (C-3'''), 71,2 (C-4'''), 78,3 (C-5'''), 62,6 (C-6''').

Hợp chất WI11 (yuankanin): Dạng bột vô định hình màu vàng nhạt. ESI-MS: *m/z* 601,46 $[M+Na]^+$. Phổ ^{1}H-NMR (600 MHz, CD_3OD) δ_H (ppm): 6,60 (1H, s, H-3), 6,92 (1H, d, *J* = 2,2 Hz, H-6), 6,95 (1H, d, *J* = 2,2 Hz, H-8), 7,86 (2H, d, *J* = 8,4 Hz, H-2', H-6'), 6,94 (2H, d, *J* = 8,4 Hz, H-3', H-5'), 3,97 (3H, s, -OMe), 4,87 (1H, d, *J* = 7,8 Hz, H-1''), 3,63 (1H, t, *J* = 8,4 Hz, H-2''), 3,35 (1H, t, *J* = 9,0 Hz, H-3''), 3,52 (1H, t, *J* = 9,0 Hz, H-4''), 3,53 (2H, ovl, H-5'', H-3'''), 4,15 (1H, dd, *J* = 12,0; 1,8 Hz, H-6''a), 3,72 (1H, m, H-6''b), 4,35 (1H, d, *J* = 7,2 Hz, H-1'''), 3,25 (1H, t, *J* = 8,4 Hz, H-2'''), 3,44 (1H, t, *J* = 9,0 Hz, H-4'''), 3,86 (1H, dd, *J* = 12,0; 6,6 Hz, H-5'''a), 3,22 (1H, t, *J* = 10,8 Hz, H-5'''b). Phổ ^{13}C-NMR (150 MHz, CD_3OD) δ_C (ppm): 162,6 (C-2), 106,8 (C-3), 180,3 (C-4), 159,6 (C-5), 104,4 (C-6), 164,5 (C-7), 97,2 (C-8), 160,7 (C-9), 110,3 (C-10), 123,0 (C-1'), 129,4 (C-2', C-6'), 117,1 (C-3', C-5'), 166,1 (C-4'), 56,8 (-OMe), 104,7 (C-1''), 74,7 (C-2''), 77,7 (C-3''), 71,1 (C-4''), 77,2 (C-5''), 70,5 (C-6''), 105,7 (C-1'''), 75,0 (C-2'''), 77,5 (C-3'''), 71,5 (C-4'''), 66,9 (C-5''').

Hợp chất WI12 (*erythro*-syringylglycerol-8-*O*-4'-sinapyl ether 4-*O*-*β*-D-glucopyranosid): Dạng bột màu trắng. Phổ ^{1}H-NMR (500 MHz, CD_3OD) δ_H (ppm): 6,77 (2H, s, H-2, H-6), 4,94 (1H, d, *J* = 5,7 Hz, H-7), 4,29 (1H, m, H-8), 3,93 (1H, dd, *J* = 12,1; 5,1 Hz, H-9a), 3,63 (1H, dd, *J* = 12,1; 3,5 Hz, H-9b), 6,74 (2H, s, H-2', H-6'),

6,56 (1H, d, J = 15,8 Hz, H-7'), 6,34 (1H, dd, J = 15,8; 5,6 Hz, H-8'), 4,25 (2H, dd, J = 5,6; 1,3 Hz, H-9'), 3,85 (6H, s, 3,5-OCH_3), 3,83 (6H, s, 3',5'-OCH_3), 4,81 (1H, d, J = 7,5 Hz, H-1"), 3,49 (1H, m, H-2"), 3,44 (1H, m, H-3"), 3,43 (1H, m, H-4"), 3,22 (1H, m, H-5"), 3,87 (1H, m, H-6"a), 3,69 (1H, m, H-6"b). Phổ ^{13}C-NMR (125 MHz, CD_3OD) δ_C (ppm): 139,5 (C-1), 106,0 (C-2, C-6), 153,8 (C-3, C-5), 135,5 (C-4), 74,0 (C-7), 87,1 (C-8), 61,6 (C-9), 134,7 (C-1'), 104,9 (C-2', C-6'), 154,5 (C-3', C-5'), 136,4 (C-4'), 131,3 (C-7'), 129,9 (C-8'), 63,6 (C-9'), 56,7 (3,5-OCH_3), 57,0 (3',5'-OCH_3), 105,7 (C-1"), 75,7 (C-2"), 77,8 (C-3"), 71,3 (C-4"), 78,3 (C-5"), 62,6 (C-6").

Hợp chất WI13 (*erythreo*-citrusin B): Dạng chất rắn màu trắng. Phổ ^{1}H-NMR (500 MHz, CD_3OD) δ_H (ppm): 7,07 (1H, d, J = 1,7 Hz, H-2) / 7,08 (1H, d, J = 1,7 Hz, H-2), 7,12 (1H, d, J = 8,3 Hz, H-5) / 7,13 (1H, d, J = 8,3 Hz, H-5), 6,91 (1H, m, H-6), 4,94 (1H, d, J = 5,3 Hz, H-7), 4,24 (1H, m, H-8), 3,89 (1H, dd, J = 12,1; 5,2 Hz, H-9a), 3,56 (1H, dd, J = 12,1; 5,2 Hz, H-9b), 6,72 (2H, s, H-2', H-6'), 6,54 (1H, d, J = 15,9 Hz, H-7'), 6,31 (1H, dd, J = 15,9; 5,6 Hz, H-8'), 4,22 (2H, dd, J = 5,6; 1,3 Hz, H-9'), 3,84 (3H, s, 3-OMe), 3,81 (6H, s, 3',5'-OMe), 4,88 (1H, ovl, H-1"), 3,48 (1H, ovl, H-2"), 3,39 (2H, ovl, H-3", H-4"), 3,46 (1H, ovl, H-5"), 3,87 (1H, ovl, H-6"a), 3,68 (1H, m, H-6"b). Phổ ^{13}C-NMR (125 MHz, CD_3OD) δ_C (ppm): 137,5 (C-1), 112,4 (C-2), 150,5 / 150,4 (C-3), 147,2 (C-4), 117,6 / 117,5 (C-5), 120,8 (C-6), 73,8 (C-7), 87,3 (C-8), 61,5 (C-9), 134,8 (C-1'), 104,9 (C-2'), 154,6 / 154,5 (C-3'), 136,3 (C-4'), 154,6 / 154,5 (C-5'), 104,9 (C-6'), 131,4 (C-7'), 129,9 (C-8'), 63,6 (C-9'), 56,6 (3-OMe), 56,6 (3',5'-OMe), 103,0 / 102,9 (C-1"), 74,9 (C-2"), 78,2 (C-3"), 71,3 (C-4"), 77,8 (C-5"), 62,5 (C-6").

Hợp chất WI9 (genkwanin): Dạng bột vô định hình màu vàng. Phổ ^{1}H-NMR (600 MHz, Aceton-d_6) δ_H (ppm): 6,67 (1H, s, H-3), 6,33 (1H, d, J = 1,8 Hz, H-6), 6,69 (1H, d, J = 1,8 Hz, H-8), 7,96 (2H, d, J = 9,0 Hz, H-2', H-6'), 7,30 (2H, d, J = 9,0 Hz, H-3', H-5'), 3,93 (3H, s, -OMe), 12,97 (1H, s, 5-OH). Phổ ^{13}C-NMR (150 MHz, Aceton-d_6) δ_C (ppm): 163,1 (C-2), 104,2 (C-3), 183,2 (C-4), 162,1 (C-5), 98,7 (C-6), 166,6 (C-7), 93,2 (C-8), 158,7 (C-9), 106,0 (C-10), 123,1 (C-1'), 129,3 (C-2', C-6'), 116,9 (C-3', C-5'), 165,4 (C-4'), 56,4 (-OMe).

Hợp chất WI10 (kaempferol 3-*O*-*α*-L-rhamnopyranosid): Dạng bột vô định hình màu vàng. Phổ ^{1}H-NMR (600 MHz, CD_3OD)

δ_H (ppm): 6,23 (1H, brs, H-6), 6,41 (1H, brs, H-8), 7,79 (2H, d, J = 8,4 Hz, H-2', H-6'), 6,96 (2H, d, J = 8,4 Hz, H-3', H-5'), 5,40 (1H, d, J = 1,2 Hz, H-1''), 4,24 (1H, brs, H-2''), 3,73 (1H, m, H-3''), 3,33–3,36 (2H, ovl, H-4'', H-5''), 0,94 (3H, d, J = 5,4 Hz, H-6''). Phổ ^{13}C-NMR (150 MHz, CD_3OD) δ_C (ppm): 159,3 (C-2), 136,2 (C-3), 179,7 (C-4), 163,2 (C-5), 99,9 (C-6), 166,0 (C-7), 94,8 (C-8), 158,6 (C-9), 105,9 (C-10), 122,7 (C-1'), 131,9 (C-2', C-6'), 116,6 (C-3', C-5'), 161,6 (C-4'), 103,5 (C-1''), 71,9 (C-2''), 72,2 (C-3''), 73,2 (C-4''), 72,0 (C-5''), 17,6 (C-6'').

Hợp chất WI13 (*threo*-citrusin B): Dạng chất rắn màu trắng; HR-ESI-MS/MS: *m/z* 586,2462 $[M+NH_4]^+$. Phổ ^{1}H-NMR (500 MHz, CD_3OD) δ_H (ppm): 7,12 (2H, ovl, H-2, H-5), 6,99 (1H, d, J = 8,2 Hz, H-6), 5,04 (1H, d, J = 6,3 Hz, H-7), 4,10 (1H, m, H-8), 3,78 (1H, dd, J = 12,2;4,1 Hz, H-9a), 3,35 (1H, m, H-9b), 6,74 (2H, s, H-2', H-6'), 6,54 (1H, d, J = 15,9 Hz, H-7'), 6,31 (1H, dd, J =15,9; 5,6 Hz, H-8'), 4,23 (2H, d, J = 5,5 Hz, H-9'), 3,86 (3H, s, 3-OMe), 3,86 (6H, s, 3',5'-OMe), 4,86 (1H, ovl, H-1''), 3,48 (1H, ovl, H-2''), 3,40 (2H, ovl, H-3'', H-4''), 3,49 (1H, ovl, H-5''), 3,88 (1H, ovl, H-6''a), 3,69 (1H, dd, J = 11,4;3,6 Hz, H-6''b). Phổ ^{13}C-NMR (125 MHz, CD3OD) δ_C (ppm): 137,2 / 137,1 (C-1), 112,6 / 112,5 (C-2), 150,5 (C-3), 147,4 (C-4), 117,7 (C-5), 120,8 (C-6), 74,2 / 74,1 (C-7), 88,7 (C-8), 61,8 (C-9), 134,8 (C-1'), 104,8 (C-2'), 154,3 (C-3'), 136,9 (C-4'), 154,3 (C-5'), 104,8 (C-6'), 131,3 (C-7'), 130,0 (C-8'), 63,6 (C-9'), 56,6 (3-OMe), 56,6 (3',5'-OMe), 103,0 / 102,9 (C-1''), 74,9 (C-2''), 78,2 (C-3''), 71,3 (C-4''), 77,8 (C-5''), 62,5 (C-6'').

Hợp chất WI15 (isonitidanin-4-*O*-*β*-D-glucosid): Dạng chất rắn màu trắng. HR-ESI-MS/MS: *m/z* 584,2335 $[M+NH_4]^+$. Phổ ^{1}H-NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ_H (ppm): 6,77 (2H, s, H-2, H-6), 4,92 (1H, d, J = 7,5 Hz, H-7), 4,13 (1H, m, H-8), 3,72 (1H, ovl, H-9a), 3,32 (1H, ovl, H-9b), 6,71 (1H, s, H-2'), 6,61 (1H, s, H-6'), 6,41 (1H, d, J = 15,5 Hz, H-7'), 6,25 (1H, dt, J = 15,5; 4,9 Hz, H-8'), 4,08 (2H, m, H-9'), 3,76 (6H, s, 3,5-OMe), 3,80 (3H, s, 3'-OMe), 4,97 (1H, ovl, H-1''), 3,20 (2H, m, H-2'', H-3''), 3,50 (1H, m, H-4''), 3,15 (1H, m, H-5''), 3,58 (1H, m, H-6''a), 3,37 (1H, m, H-6''b). Phổ ^{13}C-NMR (125 MHz, DMSO-d_6) δ_C (ppm): 125,1 (C-1), 106,0 (C-2, C-6), 152,6 (C-3, C-5), 134,7 (C-4), 75,6 (C-7), 77,5 (C-8), 60,0 (C-9), 129,2 (C-1'), 102,4 (C-2'), 148,6 (C-3'), 132,0 (C-4'), 144,7 (C-5'), 107,3 (C-6'), 128,5 (C-7'),

129,1 (C-8'), 61,5 (C-9'), 56,4 (3,5-OMe), 55,6 (3'-OMe), 102,4 (C-1"), 74,2 (C-2"), 76,5 (C-3"), 69,9 (C-4"), 77,2 (C-5"), 60,9 (C-6").

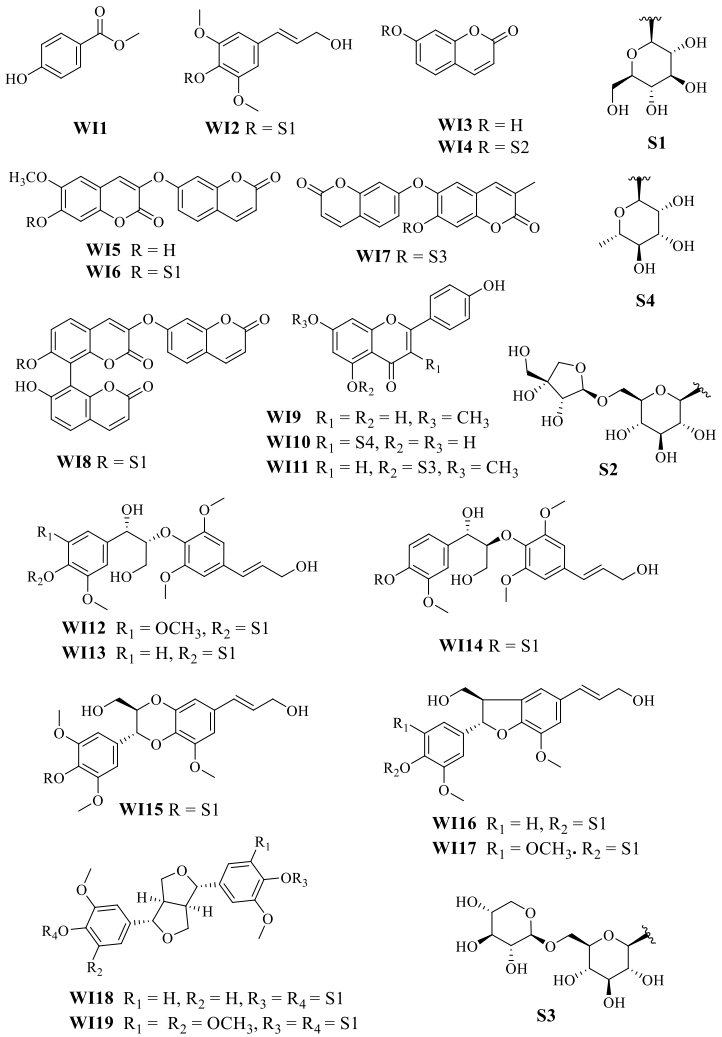
Hợp chất WI16 ((7*S,8*R**)-dehydrodiconiferyl alcohol 4-*O*-*β*-D-glucopyranosid)**: Dạng bột màu trắng. ESI-MS: *m/z* 543,49 $[M+Na]^+$. Phổ ^{1}H-NMR (500 MHz, CD_3OD) δ_H (ppm): 7,03 (1H, s, H-2), 7,14 (1H, d, *J* = 8,4 Hz, H-5), 6,93 (1H, dd, *J* = 8,6; 1,9 Hz, H-6), 5,58 (1H, d, *J* = 5,9 Hz, H-7), 3,48 (2H, ovl, H-8, H-2"), 3,78 (1H, m, H-9a), 3,87 (1H, m, H-9b), 6,95 (2H, s, H-2', H-6'), 6,53 (1H, d, *J* = 15,8 Hz, H-7'), 6,23 (1H, dt, *J* = 15,8; 5,8 Hz, H-8'), 4,20 (2H, d, *J* = 5,9 Hz, H-9'), 3,88 (3H, s, 3'-OMe), 3,83 (3H, s, 3-OMe), 4,90 (1H, ovl, H-1"), 3,40 (2H, ovl, H-3", H-4"), 3,48 (1H, ovl, H-5"), 3,85 (1H, ovl, H-6"a), 3,67 (1H, ovl, H-6"b). Phổ ^{13}C-NMR (125 MHz, CD_3OD) δ_C (ppm): 138,1 (C-1), 111,2 (C-2), 151,0 (C-3), 147,7 (C-4), 118,1 (C-5), 119,4 (C-6), 88,8 (C-7), 55,4 (C-8), 64,9 (C-9), 132,7 (C-1'), 112,2 (C-2'), 145,5 (C-3'), 149,2 (C-4'), 130,0 (C-5'), 116,5 (C-6'), 131,9 (C-7'), 127,7 (C-8'), 63,8 (C-9'), 56,8 (3'-OMe), 56,7 (3-OMe), 102,7 (C-1"), 74,9 (C-2"), 78,2 (C-3"), 71,3 (C-4"), 77,8 (C-5"), 62,5 (C-6").

Hợp chất WI17 ((7*S,8*R**)-5-methoxydehydrodiconiferyl alcohol 4-*O*-*β*-D-glucopyranosid)**: Dạng bột màu trắng. Phổ ^{1}H-NMR (500 MHz, CD_3OD) δ_H (ppm): 6,73 (4H, s, H-2, H-6), 5,59 (1H, d, *J* = 5,8 Hz, H-7), 3,47 (2H, ovl, H-8, H-2"), 3,80 (1H, m, H-9a), 3,87 (1H, m, H-9b), 6,95 (2H, br s, H-2', H-6'), 6,53 (1H, br d, *J* = 15,8 Hz, H-7'), 6,23 (1H, dt, *J* = 15,8; 5,9 Hz, H-8'), 4,19 (1H, br d, *J* = 5,9 Hz, H-9'), 3,81 (3H, s, 3'-OCH_3), 3,89 (6H, s, 3,5-OCH_3), 4,87 (1H, d, *J* = 7,6 Hz, H-1"), 3,20 (1H, m, H-3"), 3,41 (1H, dd, *J* = 9,12; 4,1 Hz, H-4"), 3,40 (1H, ovl, H-5"), 3,64 (1H, ovl, H-6"a), 3,78 (1H, ovl, H-6"b). Phổ ^{13}C-NMR (125 MHz, CD_3OD) δ_C (ppm): 135,8 (C-1), 104,5 (C-2, C-6), 154,5 (C-3, C-5), 140,1 (C-4), 88,9 (C-7), 55,5 (C-8), 65,1 (C-9), 132,9 (C-1'), 112,3 (C-2'), 145,6 (C-3'), 149,2 (C-4'), 130,0 (C-5'), 116,6 (C-6'), 132,0 (C-7'), 127,8 (C-8'), 63,9 (C-9'), 57,1 (3'-OCH_3), 56,9 (3,5-OCH_3), 105,3 (C-1"), 75,8 (C-2"), 78,4 (C-3"), 71,4 (C-4"), 77,9 (C-5"), 62,6 (C-6").

Hợp chất WI18 (pinoresinol di-O-*β*-D-glucopyranosid): Dạng bột màu trắng. Phổ ^{1}H-NMR (500 MHz, CD_3OD) δ_H (ppm): 7,03 (2H, d, *J* = 1,6 Hz, H-2, H-2'), 7,15 (2H, d, *J* = 8,4 Hz, H-5, H-5'), 6,92 (2H, dd, *J* = 8,4; 1,7 Hz, H-6, H-6'), 4,76 (2H, d, *J* = 3,7 Hz,

H-7, H-7'), 3,13 (2H, m, H-8, H-8'), 4,25 (2H, dd, J = 8,8; 6,7 Hz, H-9a, H-9'a), 3,89 (2H, m, H-9b, H-9'b), 3,87 (6H, s, 3,3'-OCH_3), 4,89 (2H, ovl, H-1", H-1'"), 3,49 (4H, ovl, H-2", H-2'", H-3", H-3'"), 3,40 (4H, ovl, H-4", H-4'", H-5", H-5'"), 3,88 (2H, m, H-6"a, H-6'"a), 3,69 (2H, dd, J = 11,5; 4,3 Hz, H-6"b, H-6'"b). Phổ ^{13}C-NMR (125 MHz, CD_3OD) δ_C (ppm): 137,4 (C-1, C-1'), 111,6 (C-2, C-2'), 151,0 (C-3, C-3'), 147,5 (C-4, C-4'), 118,0 (C-5, C-5'), 119,8 (C-6, C-6'), 87,1 (C-7, C-7'), 55,5 (C-8, C-8'), 72,8 (C-9, C-9'), 56,8 (3,3'-OCH_3), 102,8 (C-1", C-1'"), 74,9 (C-2", C-2'"), 77,8 (C-3", C-3'"), 71,3 (C-4", C-4'"), 78,2 (C-5", C-5'"), 62,5 (C-6", C-6'").

Hợp chất WI19 (liriodendrin): Dạng bột màu trắng. ESI-MS: *m/z* 765,73 $[M+Na]^+$. Phổ ^{1}H-NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ_H (ppm): 6,66 (4H, s, H-2, H-2', H-6, H-6'), 4,67 (2H, d, J = 3,3 Hz, H-7, H-7'), 3,09 (2H, m, H-8, H-8'), 4,20 (2H, m, H-9a, H-9'a), 3,83 (2H, dd, J = 9,1; 2,7 Hz, H-9b, H-9'b), 3,76 (12H, s, 3,3',5,5'-OCH_3), 4,88 (2H, ovl, H-1", H-1'"), 3,18 (4H, m, H-2", H-2'", H-3", H-3'"), 3,12 (2H, m, H-4", H-4'"), 3,02 (2H, m, H-5", H-5'"), 3,59 (2H, dd, J = 10,7; 3,8 Hz, H-6"a, H-6'"a), 3,40 (2H, m, H-6"b, H-6'"b). Phổ ^{13}C-NMR (125 MHz, DMSO-d_6) δ_C (ppm): 137,1 (C-1, C-1'), 104,3 (C-2, C-2', C-6, C-6'), 152,6 (C-3, C-3', C-5, C-5'), 133,7 (C-4, C-4'), 85,1 (C-7, C-7'), 53,6 (C-8, C-8'), 71,4 (C-9, C-9'), 56,4 (3,3',5,5'-OCH_3), 102,7 (C-1", C-1'"), 74,2 (C-2", C-2'"), 76,5 (C-3", C-3'"), 69,9 (C-4", C-4'"), 77,2 (C-5", C-5'"), 60,9 (C-6", C-6'").

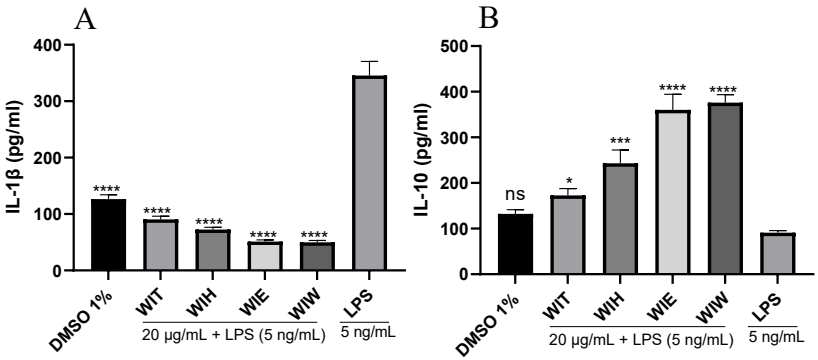


Hình 3.4. Cấu trúc hóa học của các hợp chất phân lập được từ Niệt dó

3.2. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU TÁC DỤNG SINH HỌC

3.2.1. Kết quả sàng lọc hoạt tính của cao chiết trên sản sinh IL-1β và IL-10

Các mẫu cao chiết **WIT**, **WIH**, **WIE** và **WIW** (ở nồng độ 20 µg/mL) được thử nghiệm trên mô hình tế bào RAW 264.7 kích thích bởi LPS (5 ng/mL) nhằm đánh giá khả năng ức chế sản sinh IL-1β và kích thích sản sinh IL-10. Kết quả thể hiện ở **Hình 3.4**.



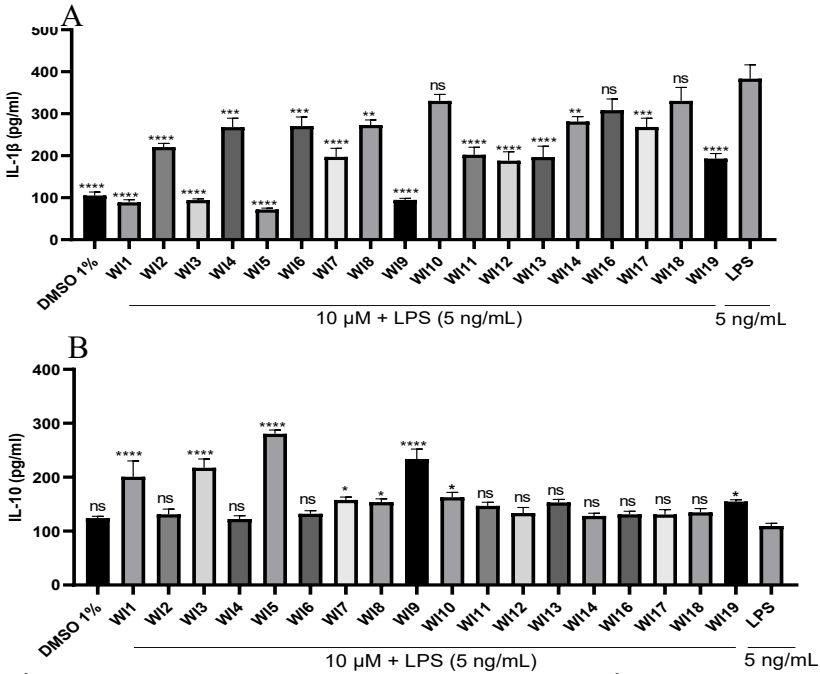
*Tế bào RAW 264.7 được ủ với các cao chiết Niệt dó ở nồng độ 20 µg/mL trong 24 giờ có hoặc không có LPS (5 ng/mL). Các nhóm đối chứng bao gồm: nhóm chứng âm (chỉ xử lý DMSO 1%) và nhóm đối chứng LPS (chỉ xử lý LPS 5 ng/mL). Định lượng các cytokin bằng phương pháp ELISA. Số liệu được biểu thị dưới dạng giá trị trung bình Mean ± SEM (n = 5); Phân tích thống kê bằng One-way ANOVA kết hợp kiểm định Dunnett's post-hoc test để so sánh các nhóm thử nghiệm với nhóm đối chứng LPS: ns, không có ý nghĩa thống kê; *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001 so với nhóm tế bào chỉ được xử lý bằng LPS.*

Hình 3.4. Hoạt tính ức chế sản sinh IL-1β và kích thích sản sinh IL-10 cao chiết cành và lá Niệt dó trên tế bào RAW264.7

Kết quả từ Hình 3.4 cho thấy hai phân đoạn **WIE** và **WIW** thể hiện hoạt tính sinh học vượt trội so với cao chiết tổng **WIT** và phân đoạn **WIH**. Do đó, **WIE** và **WIW** đã được lựa chọn để tiếp tục triển khai các nghiên cứu sâu hơn về thành phần hóa học cũng như tác dụng sinh học

3.2.2. Kết quả sàng lọc hoạt tính của các hợp chất phân lập được từ Niệt dó trên sản sinh IL-1β và IL-10

18 hợp chất phân lập được từ hai phân đoạn **WIE** và **WIW** ở nồng độ 10 µM được sử dụng để đánh giá hoạt tính ức chế sản sinh IL-1β và kích thích sản sinh viêm IL-10 trên mô hình tế bào RAW 264.7. Kết quả thực nghiệm được thể hiện chi tiết ở **Hình 3.5**



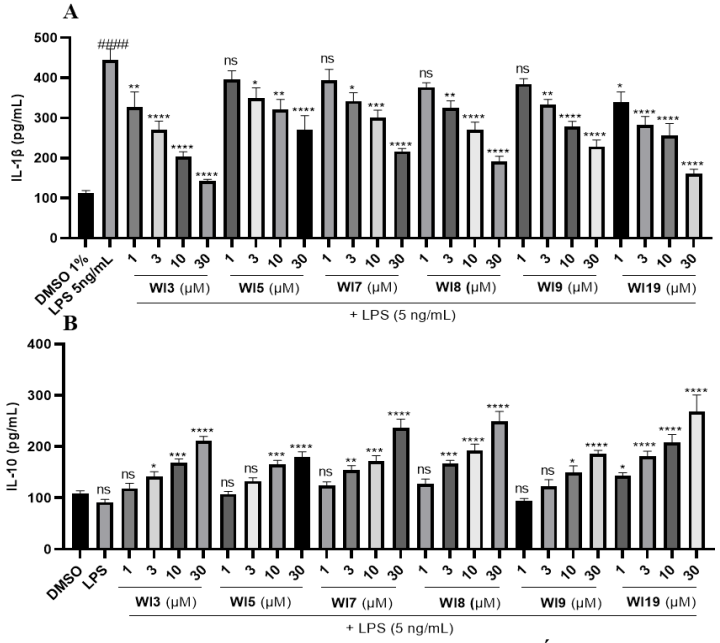
*Tế bào RAW 264.7 được ủ trong 24 giờ với các hợp chất (10 μM) có hoặc không có LPS (5 ng/mL). Các nhóm đối chứng bao gồm: nhóm chứng âm (chỉ xử lý DMSO 1%) và nhóm đối chứng LPS (chỉ xử lý LPS 5 ng/mL). Định lượng các cytokin bằng phương pháp ELISA. (**A**) Hoạt tính ức chế sản sinh IL-1β, (**B**) Hoạt tính kích khích sản sinh IL-10. Số liệu biểu thị dưới dạng giá trị trung bình Mean ± SEM (n = 5). Phân tích thống kê bằng One-way ANOVA kết hợp kiểm định Dunnett's post-hoc test để so sánh các nhóm thử nghiệm với nhóm LPS: ns: không có ý nghĩa thống kêns: không có ý nghĩa thống kê; *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,00, ****p < 0,0001 so với nhóm LPS.*

Hình 3.5. Sàng lọc hoạt tính ức chế sản sinh IL-1β và kích thích sản sinh IL-10 của các hợp chất phân lập từ Niệt dó trên tế bào RAW264.7

Kết quả từ Hình 3.5 cho thấy các hợp chất **WI3**, **WI5**, **WI7**, **WI8**, **WI9** và **WI19** thể hiện hoạt tính sinh học tốt hơn so với các hợp chất còn lại. Do đó, **WI3**, **WI5**, **WI7**, **WI8**, **WI9** và **WI19** đã được lựa chọn để tiếp tục triển khai các nghiên cứu sâu hơn về tác dụng sinh học

3.2.3. Kết quả đánh giá hoạt tính ức chế sản sinh IL-1β và kích thích sản sinh IL-10 của một số hợp chất phân lập từ Niệt dó.

Tế bào RAW 264.7 được ủ với LPS nồng độ 5 ng/mL và các hợp chất bao gồm **WI3**, **WI5**, **WI7**, **WI8**, **WI9** và **WI19** được sử dụng ở nồng các nồng độ 1, 3, 10 và 30 µM. Mẫu trắng chỉ chứa DMSO 1% trong khi mẫu chứng dương chỉ chứa LPS 5 ng/mL. Các mẫu được ủ 24 h, kết quả cho thấy ở **Hình 3.6** và **Bảng 3.1**.



*Tế bào RAW 264.7 được ủ trong 24 giờ với các hợp chất (1, 3, 10 và 30 µM) có hoặc không có LPS (5 ng/mL). Các nhóm đối chứng bao gồm: nhóm chứng âm (chỉ xử lý DMSO 1%) và nhóm đối chứng LPS (chỉ xử lý LPS 5 ng/mL). Định lượng các cytokin bằng phương pháp ELISA. (A) Hoạt tính ức chế sản sinh IL-1β, (B) Hoạt tính kích khích sản sinh IL-10. Số liệu biểu thị dưới dạng giá trị trung bình ± SEM (n = 5). Phân tích thống kê bằng One-way ANOVA kết hợp kiểm định Dunnett's post-hoc test để so sánh các nhóm thử nghiệm với nhóm LPS; ns: không có ý nghĩa thống kê; *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 so với nhóm LPS.*

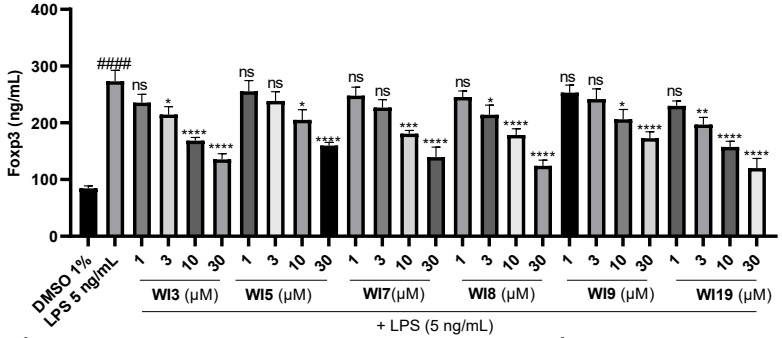
Hình 3.6. Hoạt tính ức chế sản sinh IL-1β và kích thích sản sinh IL-10 của một số hợp chất phân lập từ Niệt dó

Bảng 3.1. Giá trị IC_{50} của một số hợp chất phân lập từ Niệt dó trên ức chế sản sinh IL-1β

Hợp chất	WI3	WI5	WI7	WI8	WI9	WI19
IC_{50} ± SE (μM)	6,4 ± 1,23	31,1 ± 3,07	19,98 ± 1,92	14,88 ± 1,04	18,80 ± 2,46	9,73 ± 1,26

3.2.4. Kết quả đánh giá hoạt tính ức chế Foxp3 *in vitro* của một số hợp chất phân lập từ Niệt dó

Các hợp chất **WI3**, **WI5**, **WI7**, **WI8**, **WI9** và **WI19** được sử dụng để đánh giá khả năng ức chế biểu hiện của Foxp3 sản sinh trên dòng tế bào T CD4+ được kích thích bởi LPS (5 ng/ml). Các hợp chất thử nghiệm được ủ cùng tề bào T CD4+ và LPS ở các nồng độ là 1, 3, 10 và 30 μM. Kết quả được chỉ ra ở **Hình 3.7** và **Bảng 3.2**.



*Tế bào T CD4+ được ủ trong 24 giờ với các hợp chất (1, 3, 10 và 30 μM) có hoặc không có LPS (5 ng/mL). Các nhóm đối chứng bao gồm: nhóm chứng âm (chỉ xử lý DMSO 1%) và nhóm đối chứng LPS (chỉ xử lý LPS 5 ng/mL). Định lượng Foxp3 bằng phương pháp ELISA. Số liệu biểu thị dưới dạng giá trị trung bình ± SEM (n = 5). Phân tích thống kê bằng One-way ANOVA kết hợp kiểm định Dunnett's post-hoc test để so sánh các nhóm thử nghiệm với nhóm LPS; ns: không có ý nghĩa thống kê; *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 so với nhóm đối chứng LPS, ####p < 0,0001 so với nhóm DMSO.·*

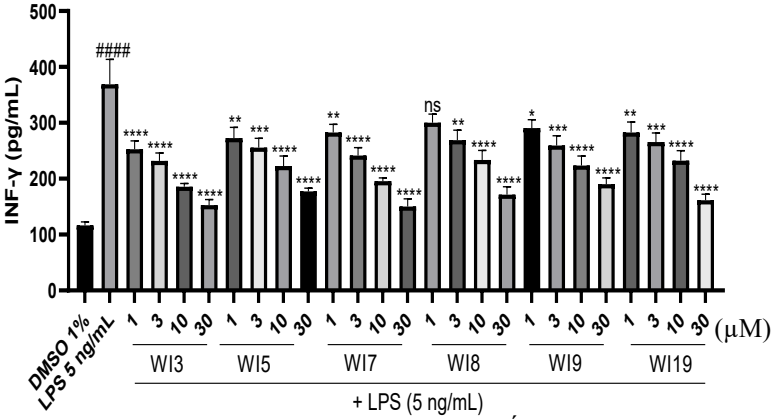
Hình 3.7. Hoạt tính ức chế Foxp3 của một số hợp chất phân lập được từ Niệt dó

Bảng 3.2. Giá trị IC_{50} của một số hợp chất phân lập từ Niệt dó trên ức chế Foxp3

Hợp chất	WI3	WI5	WI7	WI8	WI9	WI19
IC_{50} ± SE (μM)	23,38 ± 3,47	43,45 ± 5,34	20,47 ± 3,04	18,84 ± 1,16	51,26 ± 6,72	13,67 ± 1,85

3.2.5. Kết quả đánh giá hoạt tính ức chế INF-γ *in vitro* của một số hợp chất phân lập từ Niệt dó

Kết quả đánh giá hoạt tính ức chế INF-γ sản sinh trên tế bào T CD4+ được kích thích bằng LPS (5ng/mL) được chỉ ra ở **Hình 3.8** và **Bàng 3.3**.



*Tế bào T CD4+ được ủ trong 24 giờ với các hợp chất (1, 3, 10 và 30 μM) có hoặc không có LPS (5 ng/mL). Các nhóm đối chứng bao gồm: nhóm chứng âm (chỉ xử lý DMSO 1%) và nhóm đối chứng LPS (chỉ xử lý LPS 5 ng/mL). Định lượng INF-γ bằng phương pháp ELISA. Số liệu biểu thị dưới dạng giá trị trung bình ± SEM (n = 5). Phân tích thống kê bằng One-way ANOVA kết hợp kiểm định Dunnett's post-hoc test để so sánh các nhóm thử nghiệm với nhóm LPS; ns: không có ý nghĩa thống kê; *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 so với nhóm đối chứng LPS, ####p < 0,0001 so với nhóm DMSO.*

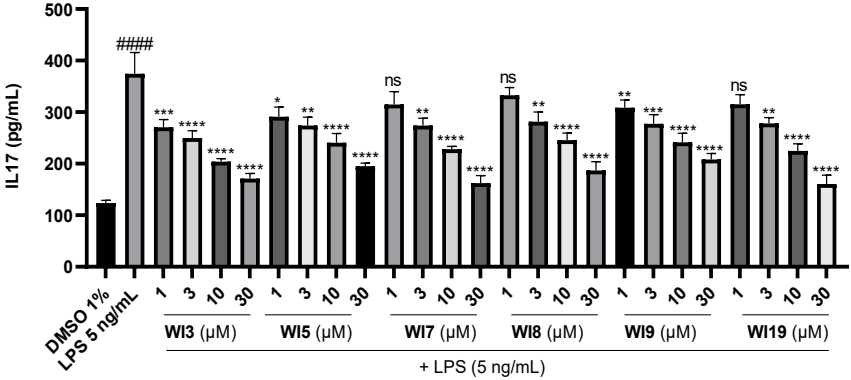
Hình 3.8. Hoạt tính ức chế sản sinh INF-γ của một số hợp chất phân lập từ Niệt dó

Bảng 3.3. Giá trị IC_{50} của một số hợp chất phân lập từ Niệt dó trên ức chế sản sinh INF-γ

Hợp chất	WI3	WI5	WI7	WI8	WI9	WI19
IC_{50} ± SE (μM)	9,28 ± 1,23	16,22 ± 2,14	9,57 ± 1,01	16,83 ± 2,15	18,50 ± 2,57	14,73 ± 1,49

3.2.6. Kết quả đánh giá hoạt tính ức chế sản sinh IL-17 *in vitro* của một số hợp chất phân lập từ Niệt dó

Kết quả đánh giá hoạt tính ức chế IL-17 sản sinh trên tế bào T CD4+ được kích thích bằng LPS (5ng/mL) được chỉ ra ở **Hình 3.9** và **Bàng 3.4**



*Tế bào T CD4+ được ủ trong 24 giờ với các hợp chất (1, 3, 10 và 30 μM) có hoặc không có LPS (5 ng/mL). Các nhóm đối chứng bao gồm: nhóm chứng âm (chỉ xử lý DMSO 1%) và nhóm đối chứng LPS (chỉ xử lý LPS 5 ng/mL). Định lượng IL-17 bằng phương pháp ELISA. Số liệu biểu thị dưới dạng giá trị trung bình ± SEM (n = 5)). Phân tích thống kê bằng One-way ANOVA kết hợp kiểm định Dunnett's post-hoc test để so sánh các nhóm thử nghiệm với nhóm LPS ns: không có ý nghĩa thống kê; *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 so với nhóm đối chứng LPS, ####p < 0,0001 so với nhóm DMSO.*

Hình 3.9. Hoạt tính ức chế sản sinh IL-17 của một số hợp chất phân lập từ Niệt dó

Bảng 3.4. Giá trị IC_{50} của một số hợp chất phân lập từ Niệt dó trên ức chế sản sinh IL-17

Hợp chất	WI3	WI5	WI7	WI8	WI9	WI19
IC_{50} ± SE (μM)	12,62 ± 2,57	22,92 ± 4,41	14,69 ± 2,13	18,41 ± 3,21	26,06 ± 3,83	14,50 ± 1,04

CHƯƠNG 4: BÀN LUẬN

Luận án đã nêu cơ sở của việc lựa chọn bộ phận cành và lá Niệt dó làm đối tượng nghiên cứu, đồng thời bàn luận về phương pháp chiết xuất cao toàn phần và thành phần hóa học của các hợp chất phân lập được từ 2 phân đoạn **WIE** và **WIW**. Bên cạnh đó, luận án cũng thảo luận về việc lựa chọn mô hình sàng lọc tác dụng sinh học và hoạt tính cao chiết và chất phân lập được trên các cytokin liên quan đến viêm và miễn dịch.

KẾT LUẬN

1. Về thành hóa học

Đã phân lập và xác định được cấu trúc của 19 hợp chất từ cao phân đoạn (**WIE**) và cắn nước (**WIW**) của cành và lá Niệt dó bao gồm:

- 05 hợp chất là các dẫn chất pheolic: methyl 4-hydroxybenzoat (**WI1**), syringin (**WI2**), genkwanin (**WI9**), kaempferol-3-*O*-rhamnosid (**WI10**) và yuankanin (**WI11**). Trong đó, kaempferol-3-*O*-rhamnosid là hợp chất lần đầu tiên phân lập được từ chi *Wikstroemia.*

- 06 hợp chất thuộc nhóm coumarin bao gồm: umbelliferon (**WI3**), adicardin (**WI4**), daphnoretin (**WI5**), daphnorin (**WI6**), wikstronutin (**WI7**) và triumbelletin-7-*O*-*β*-D-glucosid (**WI8**). Trong đó, adicardin lần đầu tiên phân lập được trong chi *Wiktroemia* và wikstronutin lần đầu tiên phân lập được trong loài Niệt dó (*W. indica*).

- 08 hợp chất có cấu trúc lignan bao gồm: 04 hợp chất lần đầu tiên phân lập được từ loài là (7S^*,8R^*)-dehydrodiconiferyl alcohol 4-*O*-*β*-D-glucopyranosid (**WI16**), (7S^*,8R^*)-5-

methoxydehydrodiconiferyl alcohol 4-*O*-*β*-D-glucopyranosid (**WI17**), pinoresinol di-*O*-*β*-D-glucopyranosid (**WI18**) và liriodendrin (**WI19**); 02 hợp chất lần đầu tiên phân lập được trong chi *Wikstroemia* là *erythro*-syringylglycerol-8-*O*-4'-sinapyl ether 4-*O*-*β*-D-glucopyranosid (**WI12**) và *erythro*-citrusin B (**WI13**); 02 hợp chất lignan mới bao gồm: *threo*-citrusin B (**WI14**) và isonitidanin-4-*O*-*β*-D-glucosid (**WI15**).

2. Về tác dụng sinh học

- Các cao phân đoạn có hoạt tính tốt trên trên hai tín hiệu IL-1β và IL-10 là **WIE** và **WIW**.

- Các hợp chất có hoạt tính tốt trên hai tín hiệu IL-1β và IL-10 bao gồm; umbelliferon (**WI3**), daphnoretin (**WI5**), wikstronutin (**WI7**), triumbelletin-7-*O*-*β*-D-glucosid (**WI8**), genkwanin (**WI9**) và liriodendrin (**WI19**).

- Hợp chất ức chế IL-1β sản sinh trên dòng tế bào RAW 264.7 mạnh hơn trong số các hợp chất được thử nghiệm bao gồm: Umbelliferon (**WI3**) với IC_{50} = 6,4 ± 1,23 μM và liriodendrin (**WI19**) với IC_{50} = 9,73 ± 1,26 μM.

- Hợp chất có hoạt tính ức chế INF-γ và IL-17 sản sinh trên dòng tế bào T CD4+ mạnh hơn so với các hợp chất khác là umbelliferon (**WI3**) với giá trị IC_{50} lần lượt là 9,28 ± 1,23 μM và 12,62 ± 2,57 μM.

- Hợp chất có hoạt tính ức chế Foxp3 sản sinh trên dòng tế bào T CD4+ mạnh hơn so với các hợp chất khác là liriodendrin (**WI19**) với giá trị IC_{50} là 13,67 ± 1,85 μM.

KIẾN NGHỊ

- Tiếp tục nghiên cứu sâu hơn về cơ chế chống viêm và điều hòa miễn dịch trên một số con đường tín hiệu cụ thể như MAPKs, TGF-β/Smad, NF-κB và PI3K/AKT của các hợp chất tiềm năng phân lập được từ Niệt dó.

- Nghiên cứu về độc bán trường diễn và độc tính trên sinh sản của cao tổng và các cao chiết tiềm năng từ Niệt dó.

- Nghiên cứu tác dụng chống viêm và điều hòa miễn dịch *in vivo* của cao chiết và các hợp chất tiềm năng phân lập được từ Niệt dó.

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ

1. Nguyen V.L, Cao V.A, Nguyen T.T, Tran T.H, Hoang V.D, Do T.H (2025), Lignans from the aerial parts of *Wikstroemia indica* (L.) C.A.Mey. and their effects on LPS-induced IL-1β and IL-10 cytokin production in RAW 264.7 macrophages, *Natural Product Research, doi.org/10.1080/14786419.2025.2575126*
2. Nguyen V.L, Cao V.A, Nguyen T.T, Tran T.H, Hoang V.D, Do T.H (2025), Anti-inflammatory and immunoregulatory activities *in vitro* of coumarins isolated from the twigs and leaves of *Wikstroemia indica* (L.) C.A.Mey, *Natural Product Sciences*, 31(4), 284-290.
3. Nguyen V.L, Nguyen V.T, Nguyen T.H.A, Vu T.D, Nguyen H.S, Tran T.H, Hoang V.D, Ngo T.D, Do T.H (2025). Phenolic constituents of twigs and leaves of *Wikstroemia indica* (L.) C.A.Mey. and their effects on LPS-induced IL-1β and IL-10 cytokin production in Raw 264.7 Cell, *Journal of Medicinal Materials*, 30(2), 67-73.