

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

VIỆN DƯỢC LIỆU



BÙI THỊ BÌNH

NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN HÓA HỌC VÀ MỘT SỐ TÁC  
DỤNG SINH HỌC CỦA LOÀI *BELAMCANDA CHINENSIS* (L.)  
DC. THU HẢI TẠI VIỆT NAM

CHUYÊN NGÀNH: Dược liệu - Dược học cổ truyền

MÃ SỐ: 9720206

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ DƯỢC HỌC

HÀ NỘI - 2018

## **CÔNG TRÌNH ĐÃ HOÀN THÀNH TẠI:**

- Khoa Tài nguyên Dược liệu - Viện Dược liệu
- Phòng Thực vật - Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật
- Khoa Hóa Thực vật, Viện Dược liệu
- Khoa Dược - Đại học Quốc gia Chung Nam (Hàn Quốc)
- Khoa Dược - Đại học Quốc gia Seoul (Hàn Quốc)
- Trung tâm các phương pháp phổ ứng dụng, Viện Hóa học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam
- Khoa Khoa học Y khoa Thực nghiệm, Khoa Y, Đại học Lund, Thụy Điển
- Bộ môn Dược lý - Học viện Quân y

## **Người hướng dẫn khoa học:**

1. PGS.TS. Nguyễn Thị Bích Thu
2. PGS.TS. Đỗ Thị Hà

**Phản biện 1:** .....

**Phản biện 2:** .....

**Phản biện 3:** .....

Luận án sẽ được bảo vệ trước Hội đồng chấm luận án cấp Viện tổ chức tại Viện Dược liệu, vào hồi      giờ, ngày.....tháng.....năm.....

## **Có thể tìm hiểu Luận án tại thư viện:**

- Thư viện Quốc gia Việt Nam
- Thư viện Viện Dược liệu

## A. GIỚI THIỆU LUẬN ÁN

### 1. Đặt vấn đề

*Belamcanda* Adans là chi đơn loài với 1 loài duy nhất là *Belamcanda chinensis* (L.) DC. - Xạ can. Cây được trồng ở nhiều nước như Việt Nam, Ấn Độ, Triều Tiên,... Ở Việt Nam, Xạ can cũng được trồng ở các tỉnh Ninh Bình, Thanh Hóa, Lạng Sơn, Quảng Ninh.... Y học cổ truyền dùng thân rễ Xạ can làm thuốc thanh nhiệt giải độc, tán kết tiêu viêm, chỉ khái hóa đàm. Trong dân gian, Xạ can là cây thuốc quý trị các bệnh về họng như viêm amidan có mủ, ho nhiều đờm, khản tiếng. Nghiên cứu về thành phần hóa học của thân rễ *Belamcanda chinensis* cho thấy sự có mặt của các nhóm chất flavonoid, iridal, triterpen, các hợp chất phenolic với nhiều tác dụng sinh học như chống oxy hóa, chống đột biến gen, chống ung thư, chống viêm, cải thiện hệ nội tiết của phụ nữ giai đoạn tiền mãn kinh. Hạt của loài này cũng được phân tích thành phần hóa học trong một số công bố gần đây. Tuy nhiên, cho đến nay chỉ có 2 - 3 công trình công bố về phần trên mặt đất Xạ can. Như vậy, có thể thấy chưa có một nghiên cứu tổng thể nào về cơ chế tác dụng chống viêm của thân rễ và phần trên mặt đất, cũng như của những hợp chất phân lập từ hai bộ phận này của Xạ can. Xuất phát từ ý tưởng có thể tận dụng toàn cây Xạ can làm thuốc, đề tài đã tiến hành nghiên cứu về thành phần hóa học và một số tác dụng sinh học cây Xạ can với tiêu đề: "**Nghiên cứu thành phần hóa học và một số tác dụng sinh học của loài *Belamcanda chinensis* (L.) DC. thu hái tại Việt Nam**".

### 2. Mục tiêu và nội dung của Luận án

#### 2.1. Mục tiêu của Luận án

- Phân lập và xác định cấu trúc hóa học của một số hợp chất từ cây Xạ can.
- Nghiên cứu một số tác dụng sinh học của cao chiết và các hợp chất phân lập từ cây Xạ can.

#### 2.2. Nội dung của Luận án

##### ➤ Về thành phần hóa học

- Định tính các nhóm chất hữu cơ có trong thân rễ và phần trên mặt đất Xạ can.
- Chiết xuất, phân lập và xác định cấu trúc của một số hợp chất phân lập được từ thân rễ và phần trên mặt đất Xạ can.
- Xác định hàm lượng của một số hợp chất chính trong thân rễ Xạ can.

##### ➤ Về tác dụng sinh học

- Đánh giá hoạt tính chống viêm *in vitro* của cao chiết và các hợp chất phân lập từ thân rễ Xạ can trên dòng tế bào RAW264.7.
- Xác định hoạt tính chống viêm *in vivo* của cao thân rễ Xạ can.
- Sàng lọc tác dụng chống tăng sinh tế bào của cao chiết và các hợp chất phân lập từ phần trên mặt đất Xạ can trên dòng tế bào VSMC.

### **3. Những đóng góp mới của Luận án**

#### **3.1. Về hóa học**

- Đã xác định trong cây Xạ can có các nhóm chất hữu cơ như flavonoid, acid hữu cơ, acid amin, polysaccarid và đường khử.
- Đã phân lập và xác định được cấu trúc của 20 hợp chất (11 chất từ thân rễ và 9 chất từ phần trên mặt đất của Xạ can), trong đó có:
  - + 4 hợp chất mới trong tự nhiên: 6''-O-acetylembinin, 3''-O-acetylembinin, irigenin 3'-O- $\beta$ -D-glucopyranosid và 2'-O-acetyl-1,3-O-diferuloylsucrose.
  - + 6 hợp chất lần đầu tiên phân lập từ loài: isoswertisin, 2''-O- $\alpha$ -L-rhamnosyl-4'-O-methylisovitexin, embinin, (7R,8S)-dehydrodiconiferyl alcohol- $\gamma$ '-methyl ether, isorhamnetin-3-O-(6''-acetyl)- $\beta$ -D-glucopyranosid và 1,3-O-diferuloylsucrose.
- Đã xây dựng được phương pháp định lượng đồng thời 6 hợp chất chính phân lập từ thân rễ Xạ can bằng phương pháp HPLC và áp dụng để định lượng chúng trong 6 mẫu thân rễ Xạ can thu hái tại các tỉnh Nghệ An, Phú Thọ, Thái Bình, Thanh Hóa, Vĩnh Phúc và Yên Bái.

#### **3.2. Về tác dụng sinh học**

- Đã tìm kiếm được 2 hợp chất từ thân rễ của Xạ can có tiềm năng chống viêm (acetovanillon, (7R,8S)-dehydrodiconiferyl alcohol- $\gamma$ '-methyl ether) không thuộc nhóm chất chính của Xạ can và nghiên cứu về cơ chế phân tử của các hợp chất này.
- Lần đầu tiên nghiên cứu về tác dụng của cao methanol thân rễ Xạ can trên mô hình gây phù chân chuột bằng carrageenin và gây u hạt bằng amiant.
- Bước đầu sàng lọc tác dụng ức chế tăng sinh tế bào cơ trơn mạch máu của các cao chiết và các hợp chất phân lập từ phần trên mặt đất Xạ can.

### **4. Ý nghĩa của Luận án**

- Ý nghĩa khoa học: Các kết quả nghiên cứu của Luận án đã góp phần giải thích kinh nghiệm sử dụng dược liệu Xạ can trong dân gian; bổ sung thêm dữ liệu khoa học về hóa thực vật, dược lý học của cây Xạ can; làm tiền đề cho việc xây dựng tiêu chuẩn và đánh giá chất lượng dược liệu Xạ can sau này.
- Ý nghĩa thực tiễn: Làm cơ sở khoa học để phát triển nguồn nguyên liệu Xạ can làm thuốc.

### **5. Cấu trúc của luận án**

Luận án gồm 4 chương, 39 bảng, 61 hình, 3 sơ đồ, 21 phụ lục, 210 tài liệu tham khảo. Luận án gồm 173 trang, gồm các phần chính: Đặt vấn đề 2 trang; tổng quan 37 trang; đối tượng và phương pháp nghiên cứu 24 trang; kết quả nghiên cứu 87 trang; bàn luận 20 trang; kết luận và kiến nghị 3 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, thành phần hóa học, tác dụng dược lý, công dụng của loài *Belamcanda chinensis* L. (DC.), đồng thời cũng đã tổng quan về viêm và tăng sinh tế bào.

### CHƯƠNG 2: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### 2.1. Đối tượng nghiên cứu

Cây Xạ can có đủ các bộ phận thu hái tại Thanh Hoá năm 2011-2013 phục vụ cho mục đích chiết xuất, phân lập và thử tác dụng sinh học. Thân rễ Xạ can thu hái vào 8/2015 ở Phú Thọ, Thanh Hóa, Nghệ An, Thái Bình, Vĩnh Phúc, yên Bái phục vụ cho mục đích nghiên cứu định lượng.

Động vật, hóa chất, dung môi đạt tiêu chuẩn thí nghiệm.

#### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Xác định tên khoa học của cây nghiên cứu dựa trên cơ sở phân tích đặc điểm hình thái thực vật và so sánh đối chiếu với các khóa phân loại chi *Belamcanda*.
- Định tính các nhóm chất hữu cơ trong dược liệu bằng các phản ứng hóa học đặc trưng.
- Chiết xuất các chất trong dược liệu bằng phương pháp chiết hồi lưu với dung môi MeOH và EtOH 70%.
- Phân lập các chất bằng sắc ký cột (CC) pha thuận (silica gel 0,04 - 0,063 mm, Merck), pha đảo YMC RP-18 (30-50  $\mu$ m, Fuji Silysia Chemical Ltd.), Sephadex LH20, MCI gel (CHP20P, 75 - 150  $\mu$ m) và HPLC điều chế. Theo dõi các phân đoạn sắc ký bằng sắc ký lớp mỏng. Phát hiện chất bằng cách phun dung dịch  $H_2SO_4$  10% trong ethanol 96% và hơi nóng, soi dưới đèn tử ngoại ở hai bước sóng 254 nm và 366 nm.
- Xác định cấu trúc các hợp chất dựa trên tính chất vật lý (nhiệt độ nóng chảy, góc quay cực) và các phương pháp phổ: phổ hồng ngoại (IR), phổ tử ngoại (UV), phổ khối lượng (ESI-MS, HR-ESI-MS), phổ cộng hưởng từ hạt nhân một chiều ( $^1H$ -NMR,  $^{13}C$ -NMR và DEPT) và hai chiều (COSY, HMBC, HMQC và NOESY).
- Xây dựng phương pháp định lượng một số chất chính phân lập từ Xạ can bằng phương pháp HPLC.
- Đánh giá ảnh hưởng của mẫu thử đến khả năng sống sót của tế bào RAW264.7 bằng phương pháp MTT để xác định nồng độ thử.

- Đánh giá tác dụng chống viêm *in vitro* với các đích nghiên cứu là mức độ biểu hiện COX-2 và chất trung gian gây viêm PGE2 trên tế bào RAW264.7 với tác nhân kích thích là LPS, sử dụng các kỹ thuật Western blot, ELISA và định lượng RT-PCR để đo lường.
- Đánh giá tác dụng chống viêm cấp trên mô hình gây phù bàn chân chuột bằng carrageenin theo phương pháp Winter.
- Đánh giá tác dụng chống viêm mạn trên mô hình gây u hạt thực nghiệm bằng viên amiant của Meier và cộng sự, 1950.
- Sàng lọc tác dụng chống tăng sinh tế bào được tiến hành theo phương pháp từ bộ tăng sinh tế bào (11465007001, Sigma).

## CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

### 3.1. THÀNH PHẦN HÓA HỌC

#### 3.1.1. Định tính các nhóm chất hữu cơ

Định tính sự hiện diện các nhóm chất hữu cơ có trong phần thân rễ (TR) và phần trên mặt đất (PTMD) của cây Xạ can bằng các phản ứng hóa học với các thuốc thử đặc hiệu. Kết quả cho thấy thân rễ và phần trên mặt đất của Xạ can tương đối giống nhau và đều chứa các nhóm chất flavonoid, acid hữu cơ, acid amin, polysaccarid và đường khử.

#### 3.1.2. Chiết xuất và phân lập các hợp chất

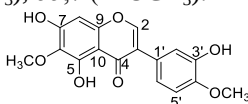
Chiết xuất và phân lập các hợp chất từ Xạ can được tiến hành như sơ đồ 3.1 và 3.2, thu được 11 hợp chất (BC1-BC11) từ thân rễ và 9 hợp chất (BC12-BC20) từ phần trên mặt đất của cây Xạ can.

#### 3.1.3. Xác định cấu trúc các hợp chất

##### 3.1.3.1. Thân rễ

##### Hợp chất BC1: Iristectorigenin A

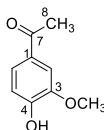
Bột màu vàng nhạt; nhiệt độ nóng chảy 239-240°C; UV  $\lambda_{\max}$  (MeOH): 216, 267 nm; IR  $\nu_{\max}$  (KBr): 3385,16 (OH), 2946,99 (CH), 1665,79 (C=O), 1580,06 và 1459,52 (aromatic, C=C), 1304,14, (C-O), 819,28  $\text{cm}^{-1}$ ; ESI-MS  $m/z$ : 329,4 [M-H]<sup>-</sup>. Phổ <sup>1</sup>H-NMR (800 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta_{\text{H}}$  13,05 (1H, s, 5-OH); 10,76 (1H, s, 7-OH); 9,15 (1H, s, 3'-OH); 8,35 (1H, s, H-2); 7,13 (1H, s, H-5'); 6,97 (1H, *d*, *J* = 9,0 Hz, H-6'); 6,83 (1H, *d*, *J* = 9,0 Hz, H-2'); 6,49 (1H, s, H-8); 3,80 (3H, s, 4'-OCH<sub>3</sub>); 3,75 (3H, s, 6-OCH<sub>3</sub>). Phổ <sup>13</sup>C-NMR (200 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta_{\text{C}}$  154,3 (C-2); 121,7 (C-3); 180,5 (C-4); 152,7 (C-5); 137,3 (C-6); 153,3 (C-7); 93,9 (C-8); 157,5 (C-9); 104,9 (C-10); 121,9 (C-1'); 115,3 (C-2'); 147,3 (C-3'); 146,7 (C-4'); 113,3 (C-5'); 121,6 (C-6'); 59,9 (6-OCH<sub>3</sub>); 55,7 (4'-OCH<sub>3</sub>).



Hình 3.1. Cấu trúc hóa học của hợp chất BC1

### Hợp chất BC2: Acetovanillon

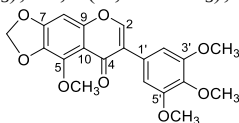
Tinh thể hình kim màu vàng nhạt, nhiệt độ nóng chảy 115-116°C; UV  $\lambda_{\max}$  (MeOH): 204, 229, 275 và 303 nm; IR  $\nu_{\max}$  (KBr): 3318,17 (OH); 2934,64 (C-H); 1659,79 (C=O); 1579,04; 1512,21; 1420,32 (aromatic C=C); 1292,23 (C-O) và 852,27  $\text{cm}^{-1}$ ; EI-MS  $m/z$ : 166,7  $[\text{M}]^+$ . Phổ  $^1\text{H}$ -NMR (900 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta_{\text{H}}$  7,51 (1H, *d*,  $J = 1,8$  Hz, H-2); 7,56 (1H, *dd*,  $J = 8,1$ ; 1,8 Hz, H-6); 6,85 (1H, *d*,  $J = 8,1$  Hz, H-5); 3,89 (3H, *s*, 3-OCH<sub>3</sub>); 2,52 (3H, *s*, 8-CH<sub>3</sub>). Phổ  $^{13}\text{C}$ -NMR (225 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta_{\text{C}}$  130,7 (C-1); 125,3 (C-2); 149,1 (C-3); 153,5 (C-4); 115,9 (C-5); 112,0 (C-6); 199,6 (C-7); 26,4 (8-CH<sub>3</sub>); 56,5 (3-OCH<sub>3</sub>).



Hình 3.2. Cấu trúc hóa học của hợp chất BC2

### Hợp chất BC3: Irisflorentin

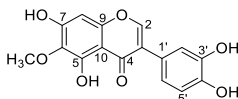
Bột màu vàng nhạt; nhiệt độ nóng chảy 167-168°C; UV  $\lambda_{\max}$  (MeOH): 267 và 323 nm; IR  $\nu_{\max}$  (KBr): 2946,99 (CH); 1660,22 (C=O); 1581,44 và 1473,77 (aromatic, C=C); 176,83 (C-O); 1137,65; 1040,49 và 846,17  $\text{cm}^{-1}$ ; EI-MS  $m/z$ : 386,7  $[\text{M}]^+$ . Phổ  $^1\text{H}$ -NMR (300 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta_{\text{H}}$  8,31 (1H, *s*, H-2); 7,02 (1H, *s*, H-8); 6,84 (2H, *s*, H-2', H-6'); 6,18 (2H, *s*, -OCH<sub>2</sub>O-); 3,91 (3H, *s*, 5-OCH<sub>3</sub>); 3,80 (6H, *s*, 3',5'-OCH<sub>3</sub>); 3,69 (3H, *s*, 4'-OCH<sub>3</sub>). Phổ  $^{13}\text{C}$ -NMR (75 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta_{\text{C}}$  152,0 (C-2); 124,1 (C-3); 173,7 (C-4); 153,9 (C-5); 135,9 (C-6); 140,5 (C-7); 93,6 (C-8); 152,5 (C-9); 113,2 (C-10); 127,5 (C-1'); 106,8 (C-2', C-6'); 152,6 (C-3', C-5'); 137,3 (C-4'); 102,6 (-OCH<sub>2</sub>O-); 60,8 (5-OCH<sub>3</sub>); 55,9 (3',5'-OCH<sub>3</sub>); 60,0 (4'-OCH<sub>3</sub>).



Hình 3.3. Cấu trúc hóa học của hợp chất BC3

### Hợp chất BC4: Irilin D

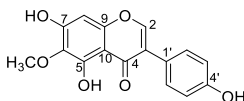
Bột màu vàng nhạt; UV  $\lambda_{\max}$  (MeOH): 213 và 267 nm; IR ( $\nu_{\max}$ ) KBr: 3378,09 (OH); 2968,19 (C-H); 1617,57 (C=O); 1470,23 (aromatic C=C); 1280 (C-O) và 878,21  $\text{cm}^{-1}$ ; EI-MS  $m/z$ : 316,33  $[\text{M}]^+$ . Phổ  $^1\text{H}$ -NMR (900 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta_{\text{H}}$  8,04 (1H, *s*, H-2); 7,02 (1H, *d*,  $J = 1,8$  Hz, H-2'); 6,85 (1H, *dd*,  $J = 8,1$ ; 1,8 Hz, H-6'); 6,82 (1H, *d*,  $J = 8,1$  Hz, H-5'); 6,44 (1H, *s*, H-8); 3,31 (3H, *s*, 6-OCH<sub>3</sub>). Phổ  $^{13}\text{C}$ -NMR (225 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta_{\text{C}}$  155,2 (C-2); 124,4 (C-3); 182,8 (C-4); 155,1 (C-5); 132,9 (C-6); 158,9 (C-7); (95,1 (C-8); 154,7 C-9); 106,8 (C-10); 123,9 (C-1'); 116,5 (C-2'); 146,9 (C-3'), 146,4 (C-4'); 117,6 (C-5'); 121,9 (C-6'); 61,1 (C-6).



**Hình 3.4.** Cấu trúc hóa học của hợp chất **BC4**

#### Hợp chất **BC5**: Tectorigenin

Bột màu vàng nhạt; nhiệt độ nóng chảy 237-238°C; UV  $\lambda_{\max}$  (MeOH): 213 và 266 nm; IR  $\nu_{\max}$  (KBr): 3336,20 (OH); 2943,62 (CH); 1620,51 (C=O); 1515,37 và 1457,26 (aromatic, C=C); 1374,25; 1252,51 (C-O); 1064,35 và 831,93  $\text{cm}^{-1}$ ; ESI-MS  $m/z$ : 301,3  $[\text{M}+\text{H}]^+$ . Phổ  $^1\text{H}$ -NMR (900 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta_{\text{H}}$  13,05 (1H, s, 5-OH); 10,75 (1H, s, 7-OH); 9,58 (1H, s, 4'-OH); 8,32 (1H, s, H-2); 7,37 (2H, d,  $J = 8,1$  Hz, H-2', H-6'); 6,82 (2H, d,  $J = 8,1$  Hz, H-3', H-5'); 6,49 (1H, s, H-8); 3,74 (3H, s, 6-OCH<sub>3</sub>). Phổ  $^{13}\text{C}$ -NMR (225 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta_{\text{C}}$  154,1 (C-2); 121,8 (C-3); 180,6 (C-4); 152,7 (C-5); 131,4 (C-6); 157,4 (C-7); 93,9 (C-8); 153,3 (C-9); 104,9 (C-10); 121,2 (C-1'); 130,2 (C-2', C-6'); 115,1 (C-3', C-5'); 157,5 (C-4'); 59,9 (6-OCH<sub>3</sub>).

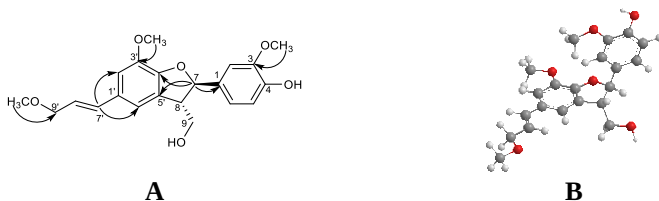


**Hình 3.5.** Cấu trúc hóa học của hợp chất **BC5**

#### Hợp chất **BC6**: (7*R*,8*S*)-dehydrodiconiferyl alcohol- $\gamma$ '-methyl ether (lần đầu tiên phân lập trên loài)

Bột màu nâu nhạt;  $[\alpha]_{\text{D}}^{25} - 23,2^\circ$  ( $c = 0,3$ ; MeOH); CD (MeOH,  $C = 1,5 \cdot 10^{-4}$  M)  $\Delta\epsilon$  (nm): -2,66 (184); -2,21 (198); +3,48 (218); +0,38 (288); IR  $\nu_{\max}$  (KBr): 3413,76 (OH cường độ mạnh); 3169,49 (C-H stretching); 2932,20 (liên kết C-H); 1657,19 (vinyllic C=C); 1617,80 (C=C; vòng thơm); 1460,24 ( $\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H}$  của nhóm OCH<sub>3</sub>); 1373,58; 1160,88 và 1026,96 (C-O) và 665 (=C-H vòng thơm)  $\text{cm}^{-1}$ ; ESI-MS  $m/z$ : 394,1  $[\text{M}+\text{H}_2\text{O}+4\text{H}]^+$ ; 803,4  $[2\text{M}+\text{C}_3\text{H}_6\text{O}]^+$ . Phổ  $^1\text{H}$ -NMR (900 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta_{\text{H}}$  6,99 (1H, br s; H-2'); 6,96 (1H, d,  $J = 1,8$  Hz, H-6'); 6,95 (1H, d,  $J = 1,8$  Hz, H-2); 6,83 (1H, dd,  $J = 8,1$ ; 1,8 Hz, H-6); 6,77 (1H, d,  $J = 8,1$  Hz, H-5); 6,57 (1H, d,  $J = 15,8$  Hz, H-7'); 6,17 (1H, dt,  $J = 15,8$ ; 6,3 Hz, H-8'); 5,53 (1H, d,  $J = 6,3$  Hz, H-7); 4,07 (2H, dd,  $J = 6,3$ ; 1,8 Hz, H-9'); 3,88 (3H, s, 3'-OCH<sub>3</sub>); 3,83 (1H, dd,  $J = 11,7$ ; 5,4 Hz H-9b); 3,81 (3H, s, 3-OCH<sub>3</sub>); 3,79 (1H, dd,  $J = 11,7$ ; 6,3 Hz, H-9a); 3,49 (1H, dd,  $J = 11,7$ ; 6,3 Hz, H-8); 3,35 (3H, s, 9'-OCH<sub>3</sub>). Phổ  $^{13}\text{C}$ -NMR (225 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta_{\text{C}}$  134,7 (C-1); 110,7 (C-2); 149,3 (C-3); 147,8 (C-4); 116,3 (C-5); 119,9 (C-6); 89,5 (C-7); 55,3 (C-8); 65,0 (C-9); 132,4 (C-1'); 112,3 (C-2'); 145,7 (C-3'); 149,6 (C-4'); 130,5 (C-5'); 116,8 (C-6'); 134,5 (C-7'); 124,4 (C-8'); 74,5 (C-9'); 56,9 (3-OCH<sub>3</sub>); 56,5 (3'-OCH<sub>3</sub>); 58,1 (9'-OCH<sub>3</sub>).

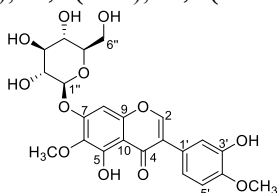




**Hình 3.6.** Cấu trúc hóa học, các tương tác HMBC (→) chính (**A**) và cấu trúc không gian (**B**) của hợp chất **BC6**

### Hợp chất **BC7**: Iristectorin **A**

Tinh thể hình kim màu trắng. Phổ  $^1\text{H-NMR}$  (900 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta_{\text{H}}$  12,95 (1H, s, 5-OH); 9,17 (1H, s, 3'-OH); 8,47 (1H, s, H-2); 7,16 (1H, d,  $J = 2,7$  Hz, H-2'); 7,01 (1H, dd,  $J = 8,1; 2,7$  Hz, H-6'); 6,89 (1H, s, H-8); 6,83 (1H, d,  $J = 8,1$  Hz, H-5'); 5,11 (1H, d,  $J = 7,2$  Hz, H-1''); 3,80 (3H, s, 4'-OCH<sub>3</sub>); 3,77 (3H, s, 6-OCH<sub>3</sub>); 3,72 (1H, 1H, dd,  $J = 5,4; 4,5$  Hz, H-4''); 3,48 (1H, m, H-6''a); 3,46 (1H, m, H-5''); 3,34 (1H, m, H-2''); 3,31 (1H, m, H-3''); 3,19 (1H, m, H-6''b). Phổ  $^{13}\text{C-NMR}$  (225 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta_{\text{C}}$  152,4 (C-2); 122,1 (C-3); 180,8 (C-4); 154,9 (C-5); 132,5 (C-6); 156,6 (C-7); 94,0 (C-8); 152,9 (C-9); 106,5 (C-10); 121,5 (C-1'); 113,3 (C-2'); 147,3 (C-3'); 146,8 (C-4'); 115,3 (C-5'); 121,7 (C-6'); 100,0 (C-1''); 73,0 (C-2''); 77,2 (C-3''); 69,5 (C-4''); 76,6 (C-5''); 60,7 (C-6''); 60,3 (6-OCH<sub>3</sub>); 55,8 (4'-OCH<sub>3</sub>).

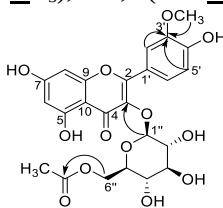


**Hình 3.7.** Cấu trúc hóa học của hợp chất **BC7**

### Hợp chất **BC8**: Isorhamnetin 3-O-(6''-acetyl-)- $\beta$ -D-glucopyranosid (lần đầu tiên phân lập từ loài)

Nhiệt độ nóng chảy 156-160°C; UV  $\lambda_{\text{max}}$  (MeOH): 255, 266 sh và 360 nm; IR  $\nu_{\text{max}}$  (KBr): 1722 và 1650 (CO)  $\text{cm}^{-1}$ ; ESI-MS  $m/z$ : 521,3  $[\text{M}+\text{H}]^+$ . Phổ  $^1\text{H-NMR}$  (900 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta_{\text{H}}$  7,89 (1H, d,  $J = 1,8$  Hz, H-2'); 7,60 (1H, dd,  $J = 8,1; 1,8$  Hz, H-6'); 6,88 (1H, d,  $J = 8,1$  Hz, H-5'); 6,41 (1H, d,  $J = 1,8$  Hz, H-6); 6,20 (1H, d,  $J = 1,8$  Hz, H-8); 5,23 (1H,  $J = 8,1$  Hz, H-1''); 4,14 (1H, dd,  $J = 13,8; 2,0$  Hz, H-6''); 4,11 (1H, dd,  $J = 13,8; 5,4$  Hz, H-6''); 3,95 (3H, s, 3'-OCH<sub>3</sub>); 3,84 (1H, m, H-5''); 3,89 (1H, m, H-4''); 3,48 (1H, m, H-3''); 3,44 (1H, m, H-2''); 1,82 (3H, s, 6''-OCOCH<sub>3</sub>). Phổ  $^{13}\text{C-NMR}$  (225 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta_{\text{C}}$  159,1 (C-2); 135,5 (C-3); 179,5 (C-4); 163,2 (C-5); 100,1 (C-6); 166,3 (C-7); 95,0 (C-8); 158,6 (C-9); 105,8 (C-10); 123,1 (C-1'); 114,6 (C-2'); 151,1 (C-3'); 148,5 (C-4'); 116,1 (C-5'); 124,1 (C-6'); 104,4 (C-1''); 75,7 (C-2''); 78,1 (C-3''); 71,5 (C-4''); 75,9 (C-5''); 64,3 (C-6'');

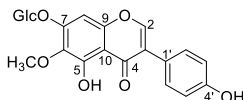
56,8 (3'-OCH<sub>3</sub>); 20,6 (6''-OCOCH<sub>3</sub>); 172,6 (6''-OCOCH<sub>3</sub>).



**Hình 3.8.** Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC (→) chính của hợp chất **BC8**

### Hợp chất BC9: Tectoridin

Bột vô định hình màu trắng; UV  $\lambda_{\max}$  (MeOH): 266 và 331 nm; IR  $\nu_{\max}$  (KBr): 3365,54 (OH cường độ mạnh); 2942,57 (liên kết C-H); 1655,44 (-C=O); 1616,58 (C=C, vòng thơm); 1461,14 (C<sub>sp</sub><sup>3</sup>-H của nhóm OCH<sub>3</sub>); 1362,69; 1284,97 và 1082,89 (C-O); 816,05; 665 (=C-H vòng thơm) cm<sup>-1</sup>; EI-MS  $m/z$ : 462,5 [M]<sup>+</sup>. Phổ <sup>1</sup>H-NMR (900 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta_{\text{H}}$  12,93 (1H, s, 5-OH); 9,61 (1H, s, 4'-OH); 8,44 (1H, s, H-2); 7,40 (2H, *d*, *J* = 8,1 Hz, H-2', H-6'); 6,83 (2H, *d*, *J* = 8,1 Hz, H-3', H-5'); 5,11 (1H, *d*, *J* = 8,1 Hz, H-1''); 3,75 (3H, s, 6-OCH<sub>3</sub>); 3,72 (1H, *m*, H-4''); 3,48 (1H, *m*, H-6''a); 3,46 (1H, *m*, H-5''); 3,34 (1H, *m*, H-2''); 3,31 (1H, *m*, H-3''); 3,19 (1H, *m*, H-6''b). Phổ <sup>13</sup>C-NMR (225 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta_{\text{C}}$  154,7 (C-2); 122,1 (C-3); 180,8 (C-4); 152,9 (C-5); 132,5 (C-6); 157,5 (C-7); 94,1 (C-8); 152,5 (C-9); 106,5 (C-10); 121,1 (C-1'); 130,2 (C-2', C-6'); 115,1 (C-3', C-5'); 156,6 (C-4'); 100,2 (C-1''); 73,2 (C-2''); 76,7 (C-3''); 69,7 (C-4''); 77,3 (C-5''); 60,7 (C-6''); 60,3 (C-6).

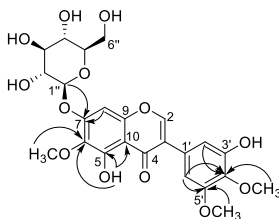


**Hình 3.9.** Cấu trúc hóa học của hợp chất **BC9**

### Hợp chất BC10, BC20: Iridin

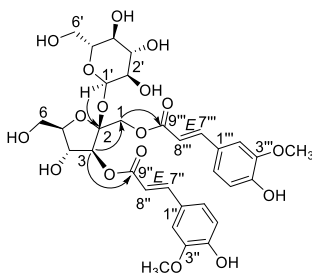
Bột vô định hình màu trắng; nhiệt độ nóng chảy 159-162°C; UV  $\lambda_{\max}$  (MeOH): 267, 242 và 457 nm. HR-ESI-MS  $m/z$ : 523,1443 [M+H]<sup>+</sup>. Phổ <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta_{\text{H}}$  12,91 (1H, s, 5-OH); 9,73 (1H, s, 3'-OH); 8,49 (1H, s, H-2); 6,89 (1H, s, H-8); 6,69 (1H, *d*, *J* = 2,0 Hz, H-6'); 6,73 (1H, *d*, *J* = 2,0 Hz, H-2''); 5,15 (1H, *d*, *J* = 7,5 Hz, H-1''); 3,80 (3H, s, 5'-OCH<sub>3</sub>); 3,77 (3H, s, 4'-OCH<sub>3</sub>); 3,72 (1H, *m*, H-4''); 3,69 (3H, s, 6-OCH<sub>3</sub>); 3,47 (1H, *m*, H-6''); 3,45 (1H, *m*, H-5''); 3,34 (1H, *m*, H-2''); 3,28 (1H, *m*, H-3''); 3,17 (1H, *m*, H-6''). Phổ <sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta_{\text{C}}$  155,4 (C-2); 122,0 (C-3); 180,5 (C-4); 152,9 (C-5); 132,6 (C-6); 156,7 (C-7); 94,1 (C-8); 152,4 (C-9); 106,5 (C-10); 125,9 (C-1'); 104,6 (C-2'); 150,3 (C-3'); 136,4 (C-4'); 152,9 (C-5'); 110,4 (C-6'); 100,1 (C-1''); 73,1 (C-2''); 76,7 (C-

3"); 69,7 (C-4"); 77,3 (C-5"); 60,7 (C-6"); 60,3 (6-OCH<sub>3</sub>); 59,9 (4'-OCH<sub>3</sub>); 55,8 (5'-OCH<sub>3</sub>).



**Hình 3.10.** Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC (→) chính của hợp chất **BC10**  
**Hợp chất 11: 1,3-O-diferuloylsucrose (lần đầu tiên phân lập từ loài)**

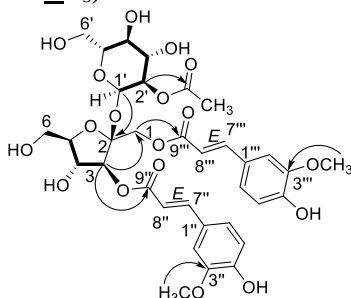
Phổ HR-ESI-MS  $m/z$ : 717,2018  $[M+Na]^+$ . Phổ <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta_H$  7,70 (1H, *d*,  $J$  = 15,8 Hz, H-7"); 7,65 (1H, *d*,  $J$  = 15,8 Hz, H-7"); 7,18 (1H, *d*,  $J$  = 1,8 Hz, H-2"); 7,16 (1H, *d*,  $J$  = 1,8 Hz, H-2"); 7,11 (1H, *dd*,  $J$  = 8,3; 1,8 Hz, H-6"); 7,06 (1H, *dd*,  $J$  = 8,3; 1,8 Hz, H-6"); 6,82 (1H, *d*,  $J$  = 8,3 Hz, H-5"); 6,77 (1H, *d*,  $J$  = 8,3 Hz, H-5"); 6,45 (1H, *d*,  $J$  = 15,0 Hz, H-8"); 6,38 (1H, *d*,  $J$  = 15,8 Hz, H-8"); 5,58 (1H, *d*,  $J$  = 5,4 Hz, H-3); 5,49 (1H, *d*,  $J$  = 3,6 Hz, H-1'); 4,45 (1H, *t*,  $J$  = 8,4 Hz, H-4); 4,34 (1H, *d*,  $J$  = 9,8 Hz, H-1); 4,29 (1H, *d*,  $J$  = 9,8 Hz, H-1); 3,98 (1H, *m*, H-2'); 3,94 (1H, *m*, H-6); 3,89 (1H, *m*, H-6); 3,88 (3"-OCH<sub>3</sub>); 3,85 (1H, *m*, H-5); 3,84 (3'''-OCH<sub>3</sub>); 3,81 (1H, *m*, H-5'); 3,77 (1H, *m*, H-3'); 3,64 (1H, *t*,  $J$  = 9,3 Hz, H-4'); 3,43 (1H, *dd*,  $J$  = 9,6; 3,5 Hz, H-6'); 3,39 (1H, *m*, H-6'). Phổ <sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta_C$  66,4 (C-1); 103,5 (C-2); 79,6 (C-3); 73,1 (C-4); 84,1 (C-5); 63,0 (C-6); 93,9 (C-1'); 73,3 (C-2'); 74,7 (C-3'); 71,5 (C-4'); 75,1 (C-5'); 62,6 (C-6'); 127,8 (C-1"); 112,3 (C-2"); 149,5 (C-3"); 150,9 (C-4"); 116,6 (C-5"); 124,4 (C-6"); 148,2 (C-7"); 115,0 (C-8"); 168,9 (C-9"); 56,7 (3"-OCH<sub>3</sub>); 127,8 (C-1"); 112,3 (C-2"); 149,5 (C-3"); 151,0 (C-4"); 116,6 (C-5"); 124,5 (C-6"); 147,6 (C-7"); 115,2 (C-8"); 168,6 (C-9"); 56,6 (3'''-OCH<sub>3</sub>).



**Hình 3.11.** Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC (→) chính của hợp chất **BC11**  
**Hợp chất BC12: 2'-O-acetyl-1,3-O-diferuloylsucrose (chất mới)**

Chất rắn màu vàng nhạt; UV  $\lambda_{max}$  (MeOH): 327.5, 263.5 nm; IR ( $\nu_{max}$ ): 3331, 1651, 1604 cm<sup>-1</sup>; HR-ESI-MS:  $m/z$  735,2176  $[M-H]^-$  (tính toán lý

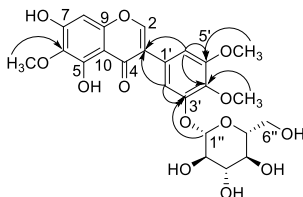
thuyết  $C_{34}H_{39}O_{18}$ ,  $M = 635,2136$ ). Phổ  $^1H$ -NMR ( $CD_3OD$ , 500 MHz): 7,71 (1H, d,  $J = 16,0$  Hz, H-7''); 7,65 (1H, d,  $J = 16,0$  Hz, H-7''); 7,23 (1H, d,  $J = 2,0$  Hz, H-2'''); 7,18 (1H, d,  $J = 2,0$  Hz, H-2''); 7,12 (1H, dd,  $J = 8,0$ ; 2,0 Hz, H-6''); 7,06 (1H, dd,  $J = 8,0$ ; 2,0 Hz, H-6''); 6,82 (1H, d,  $J = 8,0$  Hz, H-5''); 6,77 (1H, d,  $J = 8,0$  Hz, H-5''); 6,49 (1H, d,  $J = 16,0$  Hz, H-8''); 6,37 (1H, d,  $J = 16,0$  Hz, H-8''); 5,65 (1H, d,  $J = 3,5$  Hz, H-1'); 5,51 (1H, d,  $J = 8,0$  Hz, H-3); 4,64 (1H, d,  $J = 10,0$ ; 3,5 Hz, H-2'); 4,40 (1H, t,  $J = 8,0$  Hz, H-4); 4,29 (1H, d,  $J = 11,5$  Hz, H-1); 4,20 (1H, d,  $J = 11,5$  Hz, H-1); 3,95 (2H, m, H-5, H-5'); 3,89 (1H, m, H-6'); 3,86 (1H, m, H-3'); 3,83 (2H, m, H-6); 3,77 (1H, dd,  $J = 12,0$ ; 5,0 Hz, H-6'); 3,49 (1H, m, H-4'); 3,90 (3H, s, 3''-OCH<sub>3</sub>); 3,84 (3H, s, 3'''-OCH<sub>3</sub>); 2,11 (3H, s, 2'-OCOCH<sub>3</sub>). Phổ  $^{13}C$ -NMR (125 MHz,  $CD_3OD$ ): 66,4 (C-1); 103,4 (C-2); 79,8 (C-3); 73,4 (C-4); 84,0 (C-5); 63,1 (C-6); 91,2 (C-1'); 74,5 (C-2'); 72,3 (C-3'); 71,3 (C-4'); 74,5 (C-5'); 62,2 (C-6'); 127,6 (C-1''); 111,6 (C-2''); 149,4 (C-3''); 150,9 (C-4''); 116,5 (C-5''); 124,4 (C-6''); 147,5 (C-7''); 114,9 (C-8''); 168,4 (C-9''); 127,6 (C-1'''); 112,0 (C-2'''); 149,4 (C-3'''); 150,8 (C-4'''); 116,5 (C-5'''); 124,4 (C-6'''); 148,1 (C-7'''); 114,7 (C-8'''); 168,3 (C-9'''); 56,5 (3''-OCH<sub>3</sub>); 56,4 (3'''-OCH<sub>3</sub>); 172,8 (2'-OCOCH<sub>3</sub>); 21,2 (2'-OCOCH<sub>3</sub>).



**Hình 3.18.** Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC (→), COSY (---) chính của hợp chất **BC12**

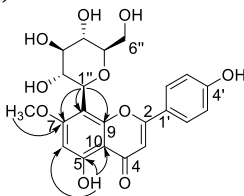
### Hợp chất **BC13**: Irogenin 3'-O- $\beta$ -glucopyranosid (chất mới)

Chất rắn màu vàng; UV  $\lambda_{max}$  (MeOH): 270, 244 nm; HR-ESI-MS:  $m/z$  521,1328 [M-H]<sup>-</sup> (tính toán lý thuyết  $C_{24}H_{25}O_{13}$ ,  $M = 521,1295$ ). Phổ  $^1H$ -NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta_H$  8,20 (1H, s, H-2); 7,03 (1H, d,  $J = 1,5$  Hz, H-2'); 6,99 (1H, d,  $J = 1,5$  Hz, H-6'); 6,45 (1H, s, H-8); 4,98 (1H, d,  $J = 7,5$  Hz, H-1''); 3,89 (3H, s, 5'-OCH<sub>3</sub>); 3,88 (3H, s, 6-OCH<sub>3</sub>); 3,87 (3H, s, 4'-OCH<sub>3</sub>). Phổ  $^{13}C$ -NMR (125 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta_C$  155,9 (C-2); 123,8 (C-3); 182,1 (C-4); 155,1 (C-5); 133,2 (C-6); 159,7 (C-7); 94,1 (C-8); 155,1 (C-9); 106,5 (C-10); 128,4 (C-1'); 111,7 (C-2'); 152,1 (C-3'); 140,0 (C-4'); 154 (C-5'); 109,2 (C-6'); 102,8 (C-1''); 75 (C-2''); 78,1 (C-3''); 71,5 (C-4''); 78,3 (C-5''); 62,7 (C-6''); 60,9 (6-OCH<sub>3</sub>); 61,6 (4'-OCH<sub>3</sub>); 56,7 (5'-OCH<sub>3</sub>).



**Hình 3.24.** Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC (→) chính của hợp chất **BC13**  
**Hợp chất BC14: Isoswertisin (lần đầu tiên phân lập từ loài)**

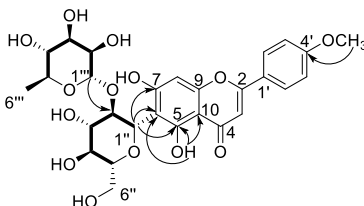
Chất rắn màu vàng; ESI-MS:  $m/z$  447,1  $[M+H]^+$  phù hợp với công thức phân tử  $C_{22}H_{22}O_{10}$  ( $M = 446,1$ ). Phổ  $^1H$ -NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta_H$  13,34 (1H, s, 5-OH); 8,04 (2H, d,  $J = 9,0$  Hz, H-2', H-6'); 6,90 (2H, d,  $J = 9,0$  Hz, H-3', H-5'); 6,82 (1H, s, H-3); 6,52 (1H, s, H-6); 4,72 (1H, d,  $J = 10,0$  Hz, H-1''); 3,88 (3H, s, 7-OCH<sub>3</sub>); 3,83 (1H, m, H-2''); 3,76 (1H, dd,  $J = 11,5; 3,5$  Hz, H-6''); 3,53 (1H, m, H-6''); 3,40 (1H, m, H-4''); 3,25 (2H, m, H-3'', H-5''). Phổ  $^{13}C$ -NMR (125 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta_C$  164,4 (C-2); 102,4 (C-3); 182,3 (C-4); 161,3 (C-5); 95 (C-6); 163,3 (C-7); 105,7 (C-8); 155,1 (C-9); 104,4 (C-10); 121,5 (C-1'); 129,1 (C-2', C-6'); 115,8 (C-3', C-5'); 161,3 (C-4'); 73,1 (C-1''); 70,8 (C-2''); 78,6 (C-3''); 70,5 (C-4''); 81,9 (C-5''); 61,2 (C-6''); 56,5 (7-OCH<sub>3</sub>).



**Hình 3.25.** Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC (→) chính của hợp chất **BC14**  
**Hợp chất BC15: 2''-O- $\alpha$ -L-rhamnosyl-4'-O-methylisovitexin (lần đầu tiên phân lập từ loài)**

Chất rắn màu vàng; ESI-MS:  $m/z$  593,2  $[M+H]^+$ . Phổ  $^1H$ -NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ ): 16,64 (1H, s, 5-OH); 7,87 (2H, d,  $J = 9,0$  Hz, H-2', H-6'); 6,80/6,81 (1H, s, H-8); 6,76/6,77 (2H, d,  $J = 9,0$  Hz, H-3', H-5'); 6,72/6,71 (1H, s, H-3); 5,06/4,97 (1H, d,  $J = 1,0$  Hz, H-1''); 4,64/4,66 (1H, d,  $J = 10,0$  Hz, H-1''); 4,35/4,17 (1H, t,  $J = 9,0$  Hz, H-2''); 3,70 (1H, m, H-6''); 3,58/3,61 (1H, m, H-2''); 3,36 (2H, m, H-3'', H-6''); 3,11 (3H, m, H-4'', H-5'', H-3''); 3,89/3,88 (3H, s, 4'-OCH<sub>3</sub>); 2,90 (1H, m, H-4''); 2,29/2,17 (1H, td/dp,  $J = 12,0; 6,0$  Hz, H-5''); 0,48/0,60 (1H, d,  $J = 6,0$  Hz, H-6''). Phổ  $^{13}C$ -NMR (125 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta_C$  162,8/164,5 (C-2); 103,4/101,5 (C-3); 182,0/181,6 (C-4); 161,1/159,3 (C-5); 109,7/109,5 (C-6); 163,0/164,4 (C-7); 90,2/91,1 (C-8); 156,7/156,9 (C-9); 104,7/1104,0 (C-10); 122,6/123,5 (C-1'); 128,1/128,5 (C-2', C-6'); 114,5/117,1 (C-3', C-5'); 162,2/164,4 (C-4'); 71,2/70,9 (C-1''); 75,3/76,2 (C-2''); 79,8 (C-3''); 70,5/70,9 (C-4''); 81,2/81,6

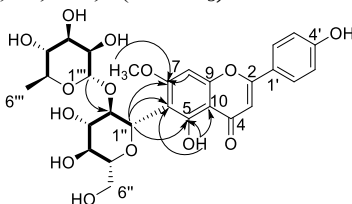
(C-5''); 61,5/61,7 (C-6''); 100,4/100,8 (C-1'''); 70,5/70,6 (C-2'''); 70,3/70,2 (C-3'''); 71,5/71,7 (C-4'''); 68,1/68,2 (C-5'''); 17,5/18,0 (C-6'''); 55,4/56,2 (4'-OCH<sub>3</sub>).



**Hình 3.26.** Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC (→), COSY (---) chính của hợp chất **BC15**

### Hợp chất BC16: 2''-O-rhamnosylswertisin

Chất rắn màu vàng; ESI-MS:  $m/z$  593,2 [M+H]<sup>+</sup>. Phổ <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ<sub>H</sub> 13,49 (1H, s, 5-OH); 7,95/7,93 (1H, *d*,  $J$  = 9,0 Hz, H-2', H-6'); 6,94 (1H, *d*,  $J$  = 9,0 Hz, H-3', H-5'); 6,82 (1H, s, H-3); 6,81/6,80 (1H, s, H-8); 5,10 (1H, *br s*, H-1'''); 4,69/4,71 (1H, *d*,  $J$  = 10,0 Hz, H-1''); 4,38/4,20 (1H, *t*,  $J$  = 9,5 Hz, H-2''); 3,89/3,88 (3H, s, 7-OCH<sub>3</sub>); 3,74 (1H, *m*, H-6''); 3,65 (1H, *m*, H-2''); 3,40 (2H, *m*, H-3'', H-6''); 3,11 (3H, *m*, H-4'', H-5'', H-3'''); 2,94 (1H, *t*,  $J$  = 9,0 Hz, H-4''); 2,18/2,31 (1H, *dt*,  $J$  = 15,0; 6,0 Hz, H-5''); 0,50/0,61 (1H, *d*,  $J$  = 6,0 Hz, H-6''). Phổ <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ<sub>C</sub> 163,6/164,1 (C-2); 103,1/103,3 (C-3); 182,6/182,2 (C-4); 160,6/159,6 (C-5); 110,1/109,9 (C-6); 165,1/164,2 (C-7); 90,6/91,4 (C-8); 157,2/157,3 (C-9); 105,1/104,4 (C-10); 121,1/121,2 (C-1'); 128,7 (C-2', C-6'); 116,4/116,4 (C-3', C-5'); 161,8/161,8 (C-4'); 71,4/71,2 (C-1''); 74,9/76,5 (C-2''); 80,2/80,1 (C-3''); 1,1/71,2 (C-4''); 81,7/81,8 (C-5''); 62,0 (C-6''); 100,6/101,1 (C-1'''); 70,9 (C-2'''); 70,7/70,5 (C-3'''); 71,9/72,0 (C-4'''); 68,5 (C-5''); 17,8/18,2 (C-6''); 56,8/56,5 (7-OCH<sub>3</sub>).

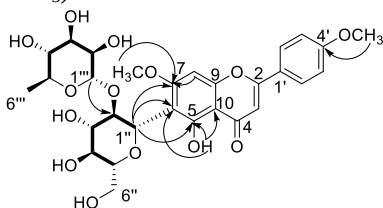


**Hình 3.27.** Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC (→), COSY (---) chính của hợp chất **BC16**

### Hợp chất BC17: Embinin (lần đầu tiên phân lập từ loài)

Chất rắn màu vàng; ESI-MS:  $m/z$  607,2 [M+H]<sup>+</sup>. Phổ <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ<sub>H</sub> 13,44 (1H, s, 5-OH); 8,08/8,07 (1H, *d*,  $J$  = 9,0 Hz, H-2', H-6'); 7,11 (1H, *d*,  $J$  = 9,0 Hz, H-3', H-5'); 6,86/6,87 (1H, s, H-8); 6,94/6,92 (1H, s, H-2); 5,00/5,09 (1H, *br s*, H-1'''); 4,67/4,69 (1H, *d*,  $J$  =

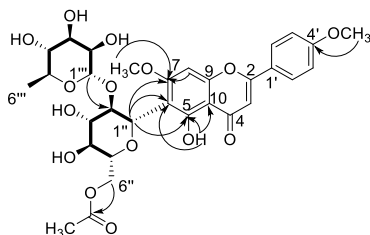
10,0 Hz, H-1'"); 4,37 (1H, *t*, *J* = 9,0 Hz, H-2'"); 3,90/3,89 (3H, *s*, 7-OCH<sub>3</sub>); 3,86 (3H, *s*, 4'-OCH<sub>3</sub>); 3,73 (1H, *m*, H-6'"); 3,63 (1H, *m*, H-2'"); 3,36 (2H, *m*, H-3'"; H-6'"); 3,13 (2H, *m*, H-4'"; H-5'"); 3,09 (1H, *m*, H-3'"); 2,92 (1H, *t*, *J* = 9,0 Hz, H-4'"); 2,18/2,29 (1H, *dq*, *J* = 12,0; 6,0 Hz, H-5'"); 0,49/0,61 (1H, *d*, *J* = 6,0 Hz, H-6'"). Phổ <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ<sub>C</sub> 163,4/163,4 (C-2); 103,7/103,8 (C-3); 182,4/182,0 (C-4); 160,4/159,3 (C-5); 110,0/109,8 (C-6); 163,5/165,0 (C-7); 90,5/91,4 (C-8); 156,9/157,1 (C-9); 105,0/104,3 (C-10); 122,6/122,7 (C-1'); 128,4 (C-2'; C-6'); 114,7/114,7 (C-3'; C-5'); 162,5 (C-4'); 71,2/71,0 (C-1'"); 74,7/76,2 (C-2'"); 80,0/79,8 (C-3'"); 70,9 (C-4'"); 81,6/81,7 (C-5'"); 61,8 (C-6'"); 100,4/100,9 (C-1'"); 70,7 (C-2'"); 70,5/70,3 (C-3'"); 71,7 (C-4'"); 68,3/68,3 (C-5'"); 17,6/18,1 (C-6'"); 56,6/56,3 (7-OCH<sub>3</sub>); 55,7 (4'-OCH<sub>3</sub>).



**Hình 3.28.** Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC (→), COSY (—) chính của hợp chất **BC17**

### Hợp chất **BC18**: 6''-O-acetylembinin (chất mới)

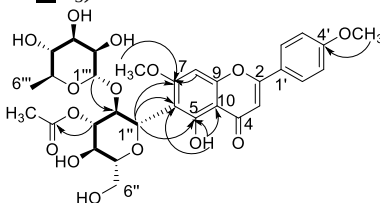
Chất rắn màu vàng; UV λ<sub>max</sub> (MeOH): 329, 273, 215,5 nm; IR (ν<sub>max</sub>): 3360, 1649, 1606, 1489 cm<sup>-1</sup>; HR-ESI-MS: *m/z* 647,1995 [M-H]<sup>-</sup> (tính toán lý thuyết C<sub>31</sub>H<sub>35</sub>O<sub>15</sub>, M = 647,1976). Phổ <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ<sub>H</sub> 13,43 (1H, *s*, 5-OH); 8,10 (2H, *d*, *J* = 9,0 Hz, H-2'; H-6'); 7,13 (2H, *d*, *J* = 9,0 Hz, H-3'; H-5'); 6,97/6,95 (1H, *s*, H-3); 6,88/6,89 (1H, *s*, H-8); 5,07 (1H, *d*, *J* = 1,0 Hz, H-1'"); 4,69/4,70 (1H, *d*, *J* = 10,0 Hz, H-1'"); 4,39 (1H, *m*, H-6'"); 4,32 (1H, *t*, 10,0 Hz, H-2'"); 3,91/3,90 (3H, *s*, 7-OCH<sub>3</sub>); 3,87 (3H, *s*, 4'-OCH<sub>3</sub>); 3,86 (1H, *m*, H-6'"); 3,59 (1H, *m*, H-4'"); 3,37 (1H, *m*, H-3'; H-5'"); 3,17 (1H, *m*, H-3'"); 3,06 (1H, *ddd*, *J* = 9,0; 6,0; 3,0 Hz, H-2'"); 2,90 (1H, *td*, *J* = 9,0; 4,5 Hz, H-4'"); 2,12/2,24 (1H, *dp*, *J* = 12,0; 6,0 Hz, H-5'"); 1,99 (3H, *s*, 6''-OCOCH<sub>3</sub>); 0,47 (3H, *d*, *J* = 6,0 Hz, H-6'"). Phổ <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ<sub>C</sub> 163,3 (C-2); 103,6/103,8 (C-3); 182,3/181,9 (C-4); 160,3/159,2 (C-5); 109,6/109,4 (C-6); 164,8/163,3 (C-7); 90,5/91,5 (C-8); 156,9/157,1 (C-9); 104,9/104,2 (C-10); 122,5/122,6 (C-1'); 128,4 (C-2'; C-6'); 114,7 (C-3'; C-5'); 162,5 (C-4'); 71,1/70,8 (C-1'"); 74,3/75,8 (C-2'"); 77,8 (C-3'"); 70,5 (C-4'"); 79,5/79,3 (C-5'"); 64,4/64,3 (C-6'"); 100,3/100,8 (C-1'"); 70,4 (C-2'"); 70,3/70,2 (C-3'"); 71,5/71,6 (C-4'"); 68,2 (C-5'"); 17,5/18,0 (C-6'"); 56,6/56,3 (7-OCH<sub>3</sub>); 55,6 (4-OCH<sub>3</sub>); 170,4 (6-OCOCH<sub>3</sub>); 20,7 (6-OCOCH<sub>3</sub>).



**Hình 3.18.** Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC (→), COSY (---) chính của hợp chất **BC18**

### Hợp chất BC19: 3''-O-acetylmbinin (chất mới)

Chất rắn màu vàng; UV  $\lambda_{\max}$  (MeOH): 331, 273, 214,5 nm; IR ( $\nu_{\max}$ ): 3381, 1649, 1602, 1489, 1442  $\text{cm}^{-1}$ ; HR-ESI-MS:  $m/z$  647,1999  $[\text{M}-\text{H}]^-$  (tính toán lý thuyết  $\text{C}_{31}\text{H}_{35}\text{O}_{15}$ ,  $M = 647,1976$ ). Phổ  $^1\text{H}$ -NMR (500 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta_{\text{H}}$  13,50 (1H, s, 5-OH); 8,06/8,04 (2H, d,  $J = 9,0$  Hz, H-2', H-6'); 7,10 (2H, d,  $J = 9,0$  Hz, H-3', H-5'); 6,92/6,90 (1H, s, H-8); 6,87 (1H, s, H-3); 4,79/4,80 (1H, d,  $J = 10,0$  Hz, H-1''); 4,97 (1H, t,  $J = 9,0$  Hz, H-3''); 4,58 (1H, br s, H-1'''); 4,50/4,33 (1H, t,  $J = 9,0$  Hz, H-2''); 3,91/3,90 (3H, s, 7-OCH<sub>3</sub>); 3,85 (3H, s, 4'-OCH<sub>3</sub>); 3,73 (1H, m, H-6''); 3,43 (1H, m, H-6''); 3,38 (1H, m, H-2'''); 3,31 (1H, m, H-4'', H-5''); 3,06/3,11 (1H, dd,  $J = 9,5$ ; 3,0 Hz, H-3''); 2,91 (1H, m, H-4'''); 2,23/2,37 (1H, m, H-5'''); 2,07/2,08 (3H, s, 3''-OCOCH<sub>3</sub>); 0,46 (3H, d,  $J = 6,0$  Hz, H-6''). Phổ  $^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ): 163,6 (C-2); 103,7/103,9 (C-3); 182,5/182,0 (C-4); 160,6/159,6 (C-5); 108,9/108,8 (C-6); 165,1/163,6 (C-7); 90,6/91,6 (C-8); 157,2/157,4 (C-9); 105,0/104,3 (C-10); 122,6 (C-1'); 125,5/125,8 (C-2', C-6'); 114,8 (C-3', C-5'); 162,7/162,6 (C-4'); 71,3/71,1 (C-1''); 74,1/75,9 (C-2''); 80,3/80,1 (C-3''); 68,4/68,5 (C-4''); 81,5 (C-5''); 61,4 (C-6''); 101,2/101,9 (C-1'''); 70,9/71,0 (C-2'''); 70,3/70,1 (C-3'''); 71,6/71,7 (C-4'''); 68,9/69,0 (C-5'''); 17,7/18,0 (C-6'''); 56,8/56,5 (7-OCH<sub>3</sub>); 55,7 (4'-OCH<sub>3</sub>); 170,3/170,2 (3''-OCOCH<sub>3</sub>); 21,2 (3''-OCOCH<sub>3</sub>).



**Hình 3.19.** Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC (→), COSY (---) chính của hợp chất **BC19**



### 3.1.3. Định lượng các hợp chất chính trong thân rễ Xạ can

**Bảng 3.1.** Kết quả định lượng các hợp chất trong Xạ can

| ST<br>T | Vùng thu<br>mẫu | Hàm lượng <sup>a</sup> (%) |                   |                   |                   |                |                |
|---------|-----------------|----------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|----------------|----------------|
|         |                 | BC1                        | BC3               | BC5               | BC7               | BC9            | BC10           |
| 1       | Nghệ An         | 0,33<br>±<br>0,01          | 0,63<br>±<br>0,02 | 1,65<br>±<br>0,03 | 0,24<br>±<br>0,01 | 4,19 ±<br>0,09 | 1,03 ±<br>0,02 |
| 2       | Phú Thọ         | 0,17<br>±<br>0,01          | 0,27<br>±<br>0,01 | 0,74<br>±<br>0,02 | 0,12<br>±<br>0,00 | 1,66 ±<br>0,02 | 0,50 ±<br>0,01 |
| 3       | Thái Bình       | 0,18<br>±<br>0,01          | 0,64<br>±<br>0,03 | 1,24<br>±<br>0,06 | 0,15<br>±<br>0,01 | 2,40 ±<br>0,05 | 1,14 ±<br>0,03 |
| 4       | Thanh Hóa       | 0,25<br>±<br>0,01          | 0,86<br>±<br>0,02 | 1,40<br>±<br>0,04 | 0,19<br>±<br>0,01 | 3,87 ±<br>0,12 | 0,73 ±<br>0,03 |
| 5       | Vĩnh Phúc       | 0,27<br>±<br>0,00          | 0,45<br>±<br>0,01 | 1,36<br>±<br>0,06 | 0,22<br>±<br>0,00 | 4,39 ±<br>0,04 | 1,06 ±<br>0,01 |
| 6       | Yên Bái         | 0,40<br>±<br>0,01          | 0,52<br>±<br>0,01 | 1,95<br>±<br>0,05 | 0,38<br>±<br>0,01 | 5,27 ±<br>0,08 | 1,41 ±<br>0,07 |

Ghi chú: <sup>a</sup>: n = 3

Kết quả định lượng cho thấy hàm lượng các chất phân tích có sự khác biệt lớn ở các mẫu thu ở các vùng khác nhau, ví dụ như hợp chất **BC9** (tectoridin) có hàm lượng dao động từ 1,66 - 5,27%, hợp chất **BC10** (iridin) từ 0,50 - 1,41% hay **BC5** (tectorigenin) từ 0,74 - 1,95%.

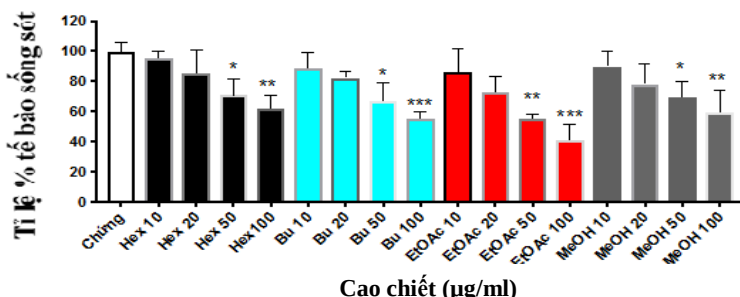
## 3.2. TÁC DỤNG SINH HỌC

### 3.2.1. Tác dụng chống viêm *in vitro* của thân rễ Xạ can

#### 3.2.1.1. Tác dụng chống viêm *in vitro* của cao chiết

❖ *Ảnh hưởng của cao chiết thân rễ Xạ can đến khả năng sống sót của tế bào RAW264.7*

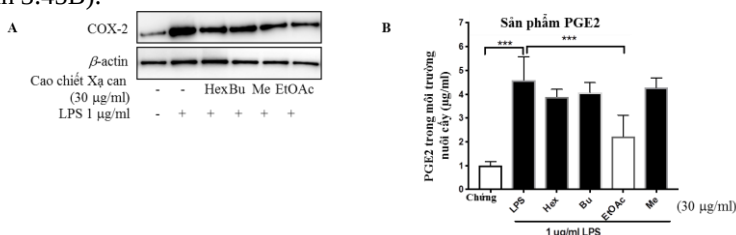
Ở nồng độ nhỏ hơn 50 µg/ml, các cao chiết từ phần thân rễ cây Xạ can hầu như không ảnh hưởng lớn đến tỷ lệ sống sót của các tế bào, tỷ lệ sống sót của tế bào trên 80% (hình 3.44).



**Hình 3.10.** Ảnh hưởng của cao chiết thân rễ Xạ can đến khả năng sống sót của tế bào RAW264.7

❖ *Đánh giá khả năng biểu hiện gen COX-2 và mức độ sản sinh PGE2 in vitro của các cao chiết từ thân rễ Xạ can*

Trong số cao methanol và 3 cao phân đoạn (*n*-hexan, ethyl acetat và *n*-butanol) của cao methanol, ethyl acetat (30 µg/ml) có tác dụng ức chế mạnh sự biểu hiện protein COX-2 gây ra bởi LPS trong tế bào RAW264.7 (hình 3.45A) và ức chế sản sinh PGE2 mạnh nhất ở nồng độ thử nghiệm (hình 3.45B).



**Hình 3.11.** Mức độ biểu hiện gen COX-2 giữa cao methanol và các cao phân đoạn thân rễ Xạ can

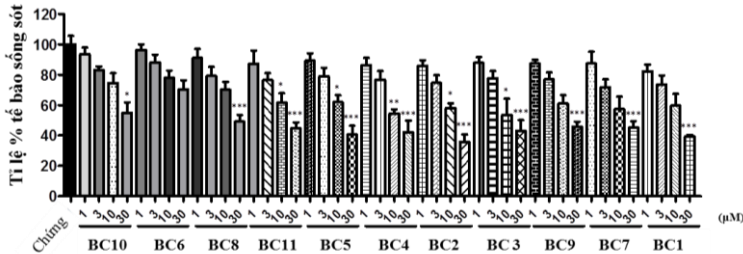
18 h sau khi tế bào được phơi nhiễm LPS (1 µg/ml) có hoặc không có phân đoạn trong tế bào RAW264.7. **(A)** Các mẫu được thu và ly giải để đánh giá hoạt tính trên biểu hiện gen COX-2 và các kháng thể β-actin. Những thay đổi tương đối trong biểu hiện của COX-2 được đánh giá bằng cách quét mật độ. **(B)** So sánh hoạt tính của bốn phân đoạn trên sản sinh PGE2 ở nồng độ 30 µg/ml. Tế bào RAW264.7 được nuôi cấy với 1 µg/ml LPS trong 24 giờ có hoặc không có cao chiết và hàm lượng PGE2 trong môi trường nuôi cấy được xác định bằng thí nghiệm PGE2-specific ELISA; (\*\*\*) mức ý nghĩa thống kê so sánh với mẫu đối chứng, \**p* < 0,05, # mức ý nghĩa thống kê so sánh với lô chỉ dùng chất kích thích viêm LPS, *n* = 3 - 5).

### 3.2.1.2. Tác dụng chống viêm in vitro của các hợp chất tinh khiết phân lập từ thân rễ Xạ can

❖ *Ảnh hưởng của các hợp chất tinh khiết phân lập từ thân rễ Xạ can đến khả năng sống sót của tế bào RAW264.7*

Ở nồng độ nhỏ hơn hoặc bằng 10 µM, các chất tinh khiết phân lập từ thân rễ Xạ can không gây độc tế bào, tỷ lệ tế bào RAW264.7 sống sót đều

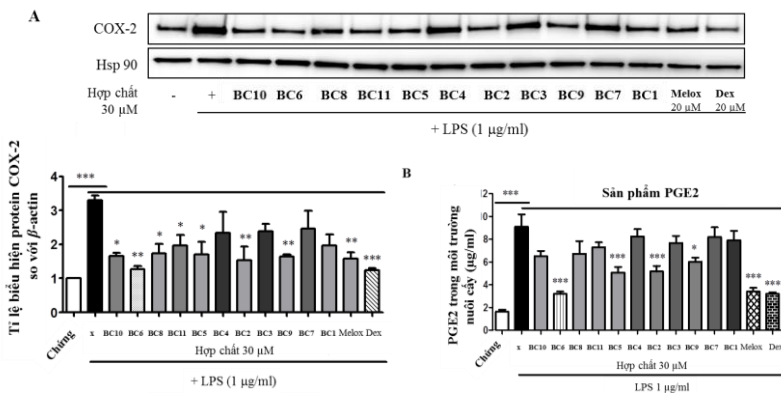
đạt trên 80%. Ở nồng độ lớn hơn 30  $\mu\text{M}$  thì một số hợp chất gây độc tế bào và giảm số lượng tế bào sống sót (hình 3.46).



**Hình 3.12.** Ảnh hưởng của các hợp chất tinh khiết phân lập từ thân rễ *Xạ can* đến khả năng sống sót của tế bào RAW264.7

❖ *Đánh giá khả năng biểu hiện gen COX-2 và mức độ sản sinh PGE2 in vitro của các hợp chất tinh khiết phân lập từ thân rễ *Xạ can**

Trong số 11 hợp chất phân lập từ phân đoạn ethyl acetat của thân rễ *Xạ can* **BC2**, **BC6**, **BC9** (30  $\mu\text{M}$ ) ức chế mạnh sự biểu hiện protein COX-2 gây ra bởi LPS trong tế bào RAW264.7 (Hình 3.47A). và **BC2**, **BC5**, **BC6** (30  $\mu\text{M}$ ) ức chế sản sinh PGE2 mạnh nhất ở nồng độ thử nghiệm (hình 3.47B). Do vậy trong nghiên cứu tiếp theo, hai hợp chất **BC2** và **BC6** được lựa chọn là chất tiềm năng cho các nghiên cứu sâu hơn trên cơ chế viêm *in vitro*.



**Hình 3.13.** Tác dụng chống viêm *in vitro* của các hợp chất từ thân rễ *Xạ can*  
(A) Mức độ ảnh hưởng của các hợp chất **BC1** - **BC11** phân lập từ thân rễ *xạ can* trên biểu hiện gen COX-2. 18 h sau khi tế bào được phơi nhiễm LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ ) có hoặc không có mặt chất thử nghiệm ở nồng độ 30  $\mu\text{M}$  trong các tế bào RAW264.7; các mẫu được thu và ly giải để đánh giá hoạt tính trên biểu hiện gen COX-2 và HSp-90. (B) So sánh hoạt tính của các chất phân lập được trên sản sinh PGE2 ở nồng độ 30  $\mu\text{M}$ . Các tế bào RAW264.7 được nuôi cấy với 1  $\mu\text{g/ml}$  LPS trong 24 tiếng, có hoặc không có mặt chất thử nghiệm và hàm lượng PGE2 trong môi trường nuôi cấy được xác định bằng thí nghiệm PGE2-specific ELISA (\*\*\*) mức ý nghĩa thống

kê so sánh với mẫu đối chứng, \* $p < 0,05$ , # mức ý nghĩa thống kê so sánh với lô chỉ dùng chất kích thích viêm LPS,  $n = 3 - 5$ ).

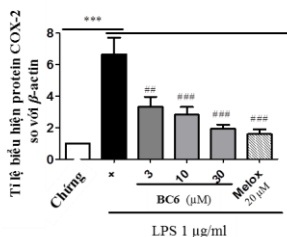
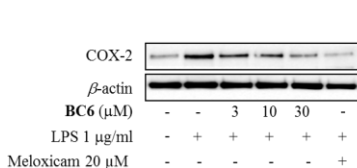
❖ *Nghiên cứu cơ chế chống viêm in vitro của một số hợp chất tiềm năng phân lập từ thân rễ Xạ can*

➤ Hợp chất **BC6**: (7R,8S)-dehydrodiconiferyl alcohol -  $\gamma$ -methyl ether

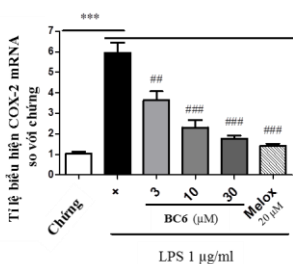
\* Tác dụng của hợp chất **BC6** trên biểu hiện của COX-2 và sản sinh PGE2 theo nồng độ

Ngoài ra, hợp chất **BC6** thể hiện tác dụng ở nồng độ 30  $\mu\text{M}$  đối với biểu hiện COX-2 do LPS gây ra tương đương meloxicam ở 20  $\mu\text{M}$ . Kết quả này được xác nhận bằng cách đo lượng PGE2. Hợp chất **BC6** ở nồng độ 30  $\mu\text{M}$  và meloxicam ở nồng độ 20  $\mu\text{M}$  đã làm giảm hoàn toàn mức lượng PGE2 (hình 3.48). Những dữ liệu này cho thấy hợp chất **BC6** ức chế sản xuất COX-2 và PGE2.

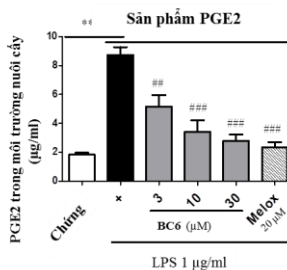
A



B



C

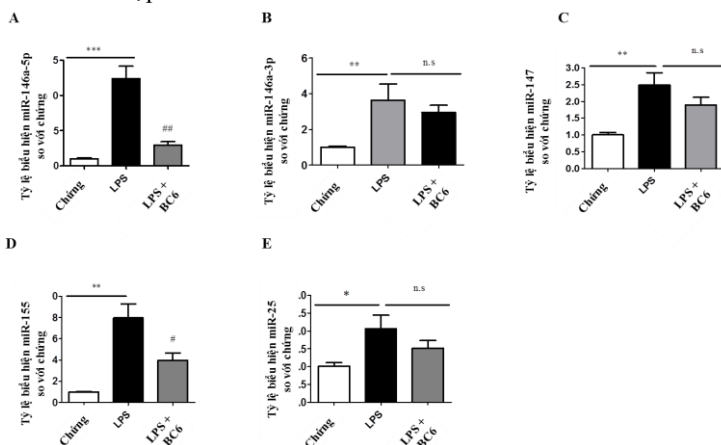


**Hình 3.14.** Tác dụng của hợp chất **BC6** trên biểu hiện COX-2 và sự sản sinh PGE2 phụ thuộc theo nồng độ

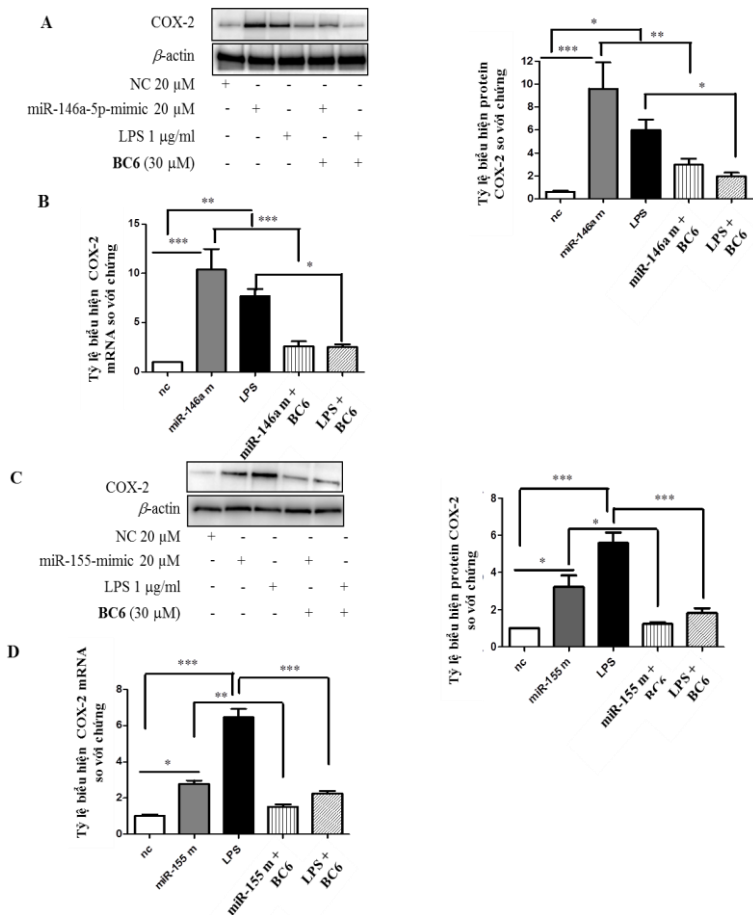
(A) Ảnh hưởng của hợp chất **BC6** đối với biểu hiện COX-2 phụ thuộc nồng độ (3 - 30  $\mu\text{M}$ ). 24 h sau khi tế bào được phơi nhiễm LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ ) có hoặc không có mặt hợp chất **BC6** trong các tế bào RAW264.7; các mẫu được thu và ly giải để đánh giá hoạt tính trên biểu hiện gen COX-2 và các kháng thể  $\beta$ -actin. (B) Biểu hiện của COX-2 được phân tích bằng qPCR. (C) Ảnh hưởng của hợp chất **BC6** trên sự sản sinh PGE2. Các tế bào RAW264.7 được nuôi cấy với 1  $\mu\text{g/ml}$  LPS trong 24 tiếng có hoặc không có hợp chất **BC6** và hàm lượng PGE2 trong môi trường được xác định bằng định bằng thí nghiệm PGE2-specific ELISA; (\*\*\*) mức ý nghĩa thống kê so sánh với mẫu đối chứng, \* $p < 0,05$ , # mức ý nghĩa thống kê so sánh với lô chỉ dùng chất kích thích viêm LPS,  $n = 3 - 5$ ).

\* Ảnh hưởng của hợp chất **BC6** trên biểu hiện miR-146a và miR-155

Hình 3.49 cho thấy miR-164a-5p, miR-164a-3p, miR-155, miR-25 và miR-147 đã tăng đáng kể khi xử lý bằng LPS trong điều kiện không có mặt của hợp chất **BC6**. Tuy nhiên, mức độ biểu hiện của miR-164a-5p và miR-155 giảm mạnh khi tế bào được xử lý đồng thời với hợp chất **BC6** và chất kích thích viêm LPS. Để xác nhận thông tin này, thử nghiệm được kiểm tra ảnh hưởng của miR-146a-5p mimic và miR155 mimic trên biểu hiện protein COX-2 và mRNA. Đúng như dự kiến, miR-146a-5p mimic và miR155 mimic làm giảm đáng kể biểu hiện của protein COX-2 và mRNA đồng thời việc tăng biểu hiện COX-2 bởi miR-146a-5p-mimic và miR-155 mimic đã bị suy giảm đáng kể khi có mặt của hợp chất **BC6** (Hình 3.50). Các kết quả này chỉ ra sự liên quan của miR-164a-5p và miR-155 trong việc giảm sự biểu hiện của COX-2 gây kích thích viêm bằng LPS trong các tế bào RAW264.7 bởi hợp chất **BC6**.



**Hình 3.15.** Mối liên quan giữa miR-146a và miR-155 khi ức chế COX-2 bằng **BC6** LPS làm tăng miRNAs (miR-146a-5p, miR-146-3p, miR-147, miR-155 và miR-25). Các tế bào RAW264.7 được xử lý bằng 1  $\mu$ g/ml LPS trong 24 giờ có hoặc không có **BC6** (10  $\mu$ M) và sau đó thu hoạch. miRNAs được chiết xuất và biểu hiện của miRNAs được phân tích bằng qPCR; (\*\*\*) mức ý nghĩa thống kê so sánh với mẫu đối chứng, \* $p < 0,05$ , # mức ý nghĩa thống kê so sánh với lô chỉ dùng chất kích thích viêm LPS,  $n = 3 - 5$ ).

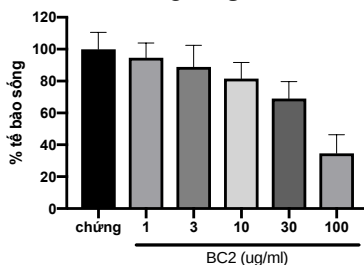


**Hình 3.16.** Vai trò của miR-146a và miR-155 đối với sự suy giảm biểu hiện COX-2 gây bởi LPS của hợp chất **BC6**

Các tế bào RAW264.7 được chuyển nạp với 20  $\mu$ M mẫu chứng âm, miR-146a mimic hoặc miR-155 mimic trong 12 giờ và sau đó kích thích viêm bởi có hoặc không có LPS và hợp chất **BC6** trong 18 giờ. Các tế bào khi đó được tập trung và ly giải để định lượng qPCR và phân tích Western blot (\* ý nghĩa thống kê so với mẫu đối chứng, \* $p < 0,05$ ; \* ý nghĩa thống kê so với lô dùng chất kích thích viêm LPS,  $n = 3 - 5$ ). (**A-B**) Vai trò của miR-146a mimic (miR-146a-m), hợp chất **BC6** trong điều kiện có hoặc không có mặt LPS trên biểu hiện protein COX-2 và COX-2 mRNA. (**C-D**) Vai trò của miR-155 mimic (miR-155-m), hợp chất **BC6** trong điều kiện có hoặc không có mặt LPS trên biểu hiện protein COX-2 và COX-2 mRNA.

➤ Hợp chất **BC2**: Acetovanillon

\* Ảnh hưởng của **BC2** đến khả năng sống sót của tế bào RAW264.7

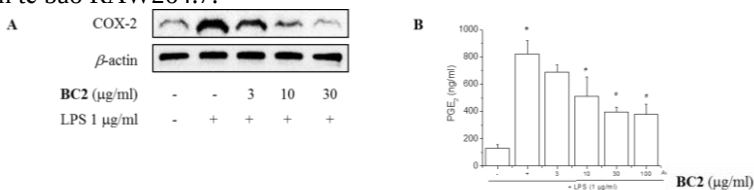


**Hình 3.17.** Ảnh hưởng của **BC2** đến khả năng sống sót của tế bào RAW264.7

Kết quả hình 3.51 cho thấy, ở nồng độ 30 µg/ml **BC2** ít ảnh hưởng đến khả năng sống sót của tế bào RAW264.7.

\* Tác dụng của **BC2** trên biểu hiện COX-2 và sản sinh PGE2

Kết quả ở hình 3.52A và 3.52B cho thấy tác dụng ức chế phụ thuộc nồng độ trên sự biểu hiện COX-2 và sự sản sinh PGE2 của acetovanillon trên tế bào RAW264.7.



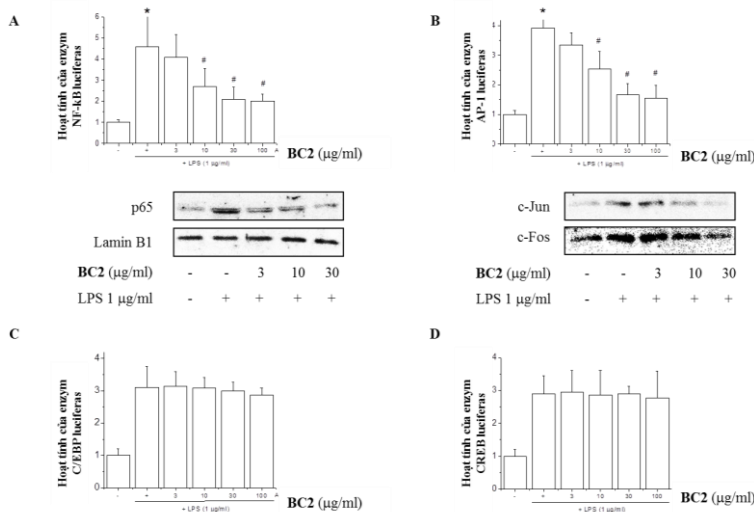
**Hình 3.18.** Tác dụng của **BC2** trên biểu hiện COX-2 và sản sinh PGE2 phụ thuộc nồng độ

(A) Ảnh hưởng của **BC2** đối với biểu hiện COX-2 phụ thuộc nồng độ (3 - 30 µg/ml). Tế bào RAW264.7 được xử lý với 1 µg/ml LPS trong 24 giờ có hoặc không có **BC2** và sau đó được tập trung và ly giải để đánh giá hoạt tính trên biểu hiện gen COX-2. (B) Ảnh hưởng của **BC2** lên sự sản sinh PGE2 phụ thuộc nồng độ (3 - 100 µg/ml). Các tế bào RAW264.7 được nuôi cấy với 1 µg/ml LPS trong 24 tiếng có hoặc không có **BC2** và hàm lượng PGE2 trong môi trường nuôi cấy được xác định bằng thí nghiệm PGE2-specific ELISA; (\* mức ý nghĩa thống kê so sánh với mẫu đối chứng, \* $p < 0,05$ , # mức ý nghĩa thống kê so sánh với lô chỉ dùng chất kích thích viêm LPS,  $n = 3 - 5$ ).

\* **BC2** ức chế sự kích hoạt NF-κB và AP-1 gây bởi LPS

Hình 3.53 cho thấy, khi xử lý với LPS (1 µg/ml, 18 h) **BC2** đã kích hoạt các hoạt động báo cáo của NF-κB, AP-1, CRE và C/EBP trong tế bào RAW264.7 và ức chế đáng kể các hoạt động của NF-κB, AP-1 nhưng không gây ức chế CRE và C/EBP. **BC2** đã ngăn chặn sự dịch chuyển hạt nhân của p65 gây bởi LPS ở thời điểm 1h sau khi bổ sung hợp chất **BC2** phụ thuộc theo nồng độ (3 - 30 µg/ml, 1 h) (hình 3.53A). Ngoài ra, các thành phần hoạt động AP-1, c-Jun và c-Fos đã bị ức chế bởi **BC2** phụ thuộc theo nồng độ 10 - 30 µg/ml (hình 3.53B). Hơn nữa, hoạt tính của C/EBPα/β

và CREB khi có mặt của chất kích thích viêm không bị ảnh hưởng bởi **BC2** (hình 3.53C và D). Các kết quả cho thấy **BC2** chủ yếu ức chế tác dụng hoạt động phiên mã của NF- $\kappa$ B, c-Jun và c-Fos/AP-1 và chúng có thể liên quan đến sự ức chế biểu hiện COX-2 và sản sinh PGE2.



**Hình 3.19.** Tác dụng của **BC2** trên sự biểu hiện NF- $\kappa$ B, AP-1, CREB và C/EBP gây kích thích viêm bởi LPS

(A). Sự kích hoạt của NF- $\kappa$ B và nồng độ protein của p65 bị ức chế bởi **BC2**. Các tế bào được chuyển nạp với plasmid pNF- $\kappa$ B-Luc và phân tích hoạt động của gen được thực hiện như mô tả trong phần phương pháp. Ngoài ra, các tế bào RAW264.7 được xử lý với 1  $\mu$ g/ml LPS trong 30 phút hoặc 1 h có hoặc không có **BC2** và protein hạt nhân p65 được phát hiện miễn dịch bằng kháng thể kháng p65. (B) **BC2** làm giảm sự kích hoạt AP-1 và nồng độ protein của c-Jun và c-Fos. Tương tự, các tế bào được chuyển nạp với plasmid AP1-Luc và phân tích hoạt động của gen được thực hiện như đã mô tả ở phần phương pháp. Hơn nữa, các tế bào RAW264.7 được xử lý với 1  $\mu$ g/ml LPS trong 30 phút hoặc 1 h có hoặc không có **BC2** và hạt nhân c-Jun hoặc protein c-Fos được phát hiện miễn dịch bằng cách sử dụng kháng thể kháng c-Jun, c-Fos. (C, D) Sự kích hoạt C/EBP và CREB bị ức chế bởi **BC2**. Tương tự, các tế bào được chuyển nạp với plasmid C/EBP-Luc hoặc plasmid CRE và phân tích hoạt động của gen được thực hiện như đã mô tả ở phần phương pháp (so với nhóm chứng, \* $p < 0,05$ ; so với nhóm được điều trị bằng LPS, # $p < 0,05$ ).



### 3.2.2. Tác dụng chống viêm *in vivo* của thân rễ Xạ can

#### 3.2.2.1. Kết quả nghiên cứu tác dụng chống viêm cấp

**Bảng 3.2.** Tác dụng chống viêm cấp của cao thân rễ Xạ can trên mô hình gây phù chân chuột bằng carrageenin (n=8)

| STT | Lô thử      | Liều dùng (mg/kg) | Thông số   | Thời điểm    |               |               |               |
|-----|-------------|-------------------|------------|--------------|---------------|---------------|---------------|
|     |             |                   |            | Sau 1 giờ    | Sau 3 giờ     | Sau 5 giờ     | Sau 7 giờ     |
| 1   | Chứng       | -                 | Độ phù %   | 40,43 ± 6,70 | 55,81 ± 13,28 | 59,77 ± 29,98 | 43,60 ± 12,68 |
| 2   | Diclofenac  | 15                | Độ phù %   | 22,87 ± 9,29 | 26,91 ± 10,22 | 29,68 ± 6,75  | 25,14 ± 6,62  |
|     |             |                   | % giảm phù | 43,44**      | 51,79**       | 50,75**       | 42,34*        |
| 3   | Cao thân rễ | 225               | Độ phù %   | 25,20 ± 8,50 | 29,40 ± 7,99  | 32,69 ± 7,53  | 28,61 ± 7,96  |
|     |             |                   | % giảm phù | 37,67**      | 47,33**       | 45,31**       | 34,38*        |
| 4   | Cao thân rễ | 450               | Độ phù %   | 23,44 ± 6,55 | 26,96 ± 5,03  | 30,09 ± 6,78  | 25,06 ± 4,97  |
|     |             |                   | % giảm phù | 42,02**      | 51,70**       | 49,67**       | 42,52*        |

\* so với lô 1: \* $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$

#### Nhận xét:

- Ở tất cả các lô, chân chuột phù to nhất tại thời điểm sau gây viêm phù 5 giờ và tại thời điểm sau gây viêm phù 7 giờ do thấy giảm dần.
- So với lô chứng sinh lý, độ phù của các lô dùng cao thân rễ Xạ can và lô dùng diclofenac giảm rõ ( $p_{-1} < 0,01$  sau tiêm carrageenin). Cao thân rễ Xạ can ở cả 2 mức liều (225 mg /kg và 450 mg/kg) đều thể hiện rõ tác dụng chống viêm trên mô hình gây phù viêm chân chuột công bằng carrageenin.
- So sánh giữa các lô cao thân rễ Xạ can liều 225 mg/kg và liều 450 mg/kg thấy tại tất cả các thời điểm sau gây viêm, độ phù ở lô dùng liều cao đều nhỏ hơn so với ở lô dùng liều thấp. Tác dụng chống viêm được đánh giá thông qua mức độ ức chế tăng thể tích phù viêm, do đó tác dụng chống viêm của cao thân rễ Xạ can có xu hướng đáp ứng tăng theo mức liều. Tuy nhiên, sự khác biệt chưa đạt ý nghĩa thống kê ( $p_{4,3} > 0,05$ ).
- So với lô diclofenac liều 15 mg/kg, độ phù ở các lô dùng cao thân rễ Xạ can tại các thời điểm 1 h, 3 h và 5 h cao hơn.

### 3.2.2.2. Kết quả nghiên cứu tác dụng chống viêm mạn

**Bảng 3.3.** Tác dụng chống viêm mạn của cao thân rễ Xạ can trên mô hình u hạt thực nghiệm

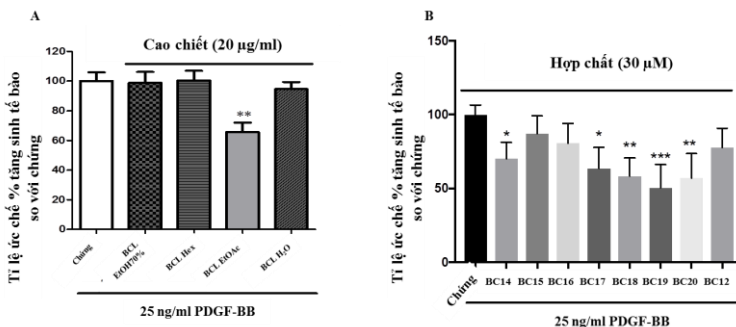
| ST T | Lô thử      | Liều dùng (mg/kg) | Khối lượng u hạt (mg) | % u giảm | <i>p</i>                             |
|------|-------------|-------------------|-----------------------|----------|--------------------------------------|
| 1    | Chứng       | -                 | 84,88 ± 4,10          | 0        | -                                    |
| 2    | Prednisolon | 3                 | 69,09 ± 3,07          | 18,60    | $p_{2,1} < 0,01$                     |
| 3    | Cao thân rễ | 225               | 76,02 ± 6,85          | 10,44    | $p_{3,1} > 0,05$<br>$p_{3,2} > 0,05$ |
| 4    |             | 450               | 72,57 ± 2,71          | 14,50    | $p_{4,1} < 0,05$<br>$p_{4,2} > 0,05$ |

#### Nhận xét:

Cả prednisolon liều 3 mg/kg và cao thân rễ Xạ can ở 2 mức liều đều làm giảm khối lượng u hạt khi so với lô chứng sinh lý ( $p < 0,01$ ). Khối lượng trung bình u hạt ở lô dùng cao thân rễ Xạ can liều 450 mg/kg là 72,57 mg thấp hơn so với lô dùng cao thân rễ Xạ can liều 225 mg/kg là 76,02 mg. Tuy nhiên sự khác biệt này chưa có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ). So với lô dùng prednisolon, tỷ lệ giảm khối lượng u hạt của 2 lô dùng cao thân rễ Xạ can thấp hơn.

### 3.2.3. Tác dụng ức chế tăng sinh tế bào cơ trơn thành mạch máu của phần trên mặt đất Xạ can

Tiến hành sàng lọc tác dụng của cao ethanol 70% (**BCL EtOH70%**), *n*-hexan (**BCL Hex**), ethyl acetat (**BCL EtOAc**) và cao phân đoạn nước (**BCL H<sub>2</sub>O**) của phần trên mặt đất Xạ can lên sự gia tăng của VSMC trong VSMC của người. Kết quả cho thấy **BCL EtOAc** ức chế đáng kể sự gia tăng của VSMCs ở nồng độ 20 µg/ml (hình 3.54A). Tám hợp chất (**BC12**, **BC14** - **BC20**) phân lập từ cao **BCL EtOAc** được tiếp tục sàng lọc tác dụng của chúng đối với sự tăng sinh của VSMC (hình 3.54B). Trong số các hợp chất này, hợp chất **BC14**, **BC17** - **BC20** cho thấy các tác dụng ức chế đáng kể, trong khi các hợp chất **BC15**, **BC16** và **BC12** biểu hiện tác dụng ức chế yếu đối với sự gia tăng của VSMC ở nồng độ 30 µM.



**Hình 3.20.** Tác dụng trên sự tăng sinh của tế bào VSMC của cao và các hợp chất phân lập từ phần trên mặt đất Xạ can

(A). Sự tăng sinh của tế bào VSMC của phần trên mặt đất Xạ can ở nồng độ 20 µg/ml của dịch chiết EtOH 70% ( **BCL EtOH70%**), phân đoạn *n*-hexan (**BCL Hex**), ethyl acetat (**BCL EtOAc**) và phân đoạn nước (**BCL H<sub>2</sub>O**). (B). Sự tăng sinh của tế bào VSMC của các hợp chất phân lập từ phần trên mặt đất Xạ can (**BC12**, **BC14** - **BC20**) ở nồng độ 30 µM.

## CHƯƠNG 4. BÀN LUẬN

### 4.1. VỀ ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

Xạ can hay còn gọi là Rẻ quạt (*Belamcanda chinensis* (L.) DC.) thuộc họ Lay đơn (Iridaceae) chi *Belamcanda*. Ở Việt Nam, họ La đơn có 8 chi, mỗi chi có một loài duy nhất, trong đó chi *Belamcanda* với đơn loài *Belamcanda chinensis* (L.) DC. (Xạ can, Rẻ quạt, Lưỡi đồng). Trên thế giới và ở Việt Nam, chi *Belamcanda* chỉ gồm một loài duy nhất là *Belamcanda chinensis* (L.) DC. (Xạ can). Năm 2005, dựa trên nghiên cứu về chuỗi phân tử ADN, loài *Belamcanda pampaninii* Lévillé và *B. chinensis* var. *taiwanensis* S. S. Ying được chuyển sang chi *Iris* và được coi là tên đồng nghĩa của *Iris domestica* [52]. Mẫu cây trong luận án được giám định tên khoa học là *Belamcada chinensis* (L.) DC. với tên đồng danh là *Ixia chinensis* L., *Belamcada chinensis* var. *taiwanensis* S. S. Ying, *B. pampaninii* H. Lesv., *B. punctata* Moench, *Pardanthus chinensis* (L.) Ker Gawl. và *Iris domestica* (L.) Goldblatt & Mabb. (Rẻ quạt, Xạ can, Lưỡi đồng), thuộc họ Iridaceae (La đơn, Lay ơn). Mặc dù loài *Belamcada chinensis* đã được chuyển sang chi *Iris* và là synonym của loài *Iris domestica* [52], tuy nhiên các nghiên cứu trước và sau 2005 đều chủ yếu lấy tên loài này là *Belamcada chinensis*, chỉ có một số ít nhóm nghiên cứu sử dụng tên *Iris domestica*. Do đó, trong luận án tác giả lấy tên khoa học của cây là *Belamcada chinensis* (L.) DC.. Việc giám định đúng tên khoa học của mẫu cây nghiên cứu giúp cho các công bố về nghiên cứu hóa học và tác dụng dược lý được rõ nguồn gốc.

## 4.2. VỀ HÓA HỌC

### 4.2.1. Định tính

Kết quả định tính bảng 3.1. có thể kết luận sơ bộ rằng trong thân rễ và phần trên mặt đất Xạ can đều có các nhóm chất flavonoid, acid hữu cơ, acid amin, polysaccharid và đường khử. Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu trước đây về thành phần hóa học của Xạ can với nhóm chất chính là flavonoid. Qua đó cũng có thể nhận thấy rằng, thành phần hóa học của thân rễ và phần trên mặt đất tương đối giống nhau khi định tính các nhóm chất hữu cơ bằng các phản ứng hóa học thường quy. Tuy nhiên, với kết quả định tính chưa đủ dữ liệu khoa học để chứng minh sự giống hay khác nhau về thành phần hóa học hay hoạt tính cũng như chứng minh cách sử dụng chủ yếu thân rễ từ loại dược liệu này trong dân gian.

### 4.2.2. Chiết xuất và phân lập

Từ cao ethyl acetat của thân rễ và phần trên mặt đất Xạ can đã phân lập được 20 hợp chất (bảng 3.21) trong đó có: 4 hợp chất được cho là mới trong tự nhiên, bao gồm: 2'-*O*-acetyl-1,3-*O*-diferuloylsucrose (**BC12**), irigenin 3'-*O*- $\beta$ -glucopyranosid (**BC13**), 6''-*O*-acetylembinin (**BC18**) và 3''-*O*-acetylembinin (**BC19**). Tuy nhiên các hợp chất này cần được thủy phân cắt đường để xác định cấu hình “D” và “L” của các gốc đường glucopyranosyl và rhamnopyranosyl; 6 hợp chất lần đầu tiên được phân lập từ loài Xạ can bao gồm: (7*R*,8*S*)-Dehydrodiconiferyl alcohol- $\gamma$ -methyl ether (**BC6**), isorhamnetin-3-*O*-(6''-acetyl-)- $\beta$ -D-glucopyranosid (**BC8**), 1,3-*O*-diferuloylsucrose (**BC11**), isoswertisin (**BC14**), 2''-*O*- $\alpha$ -L-rhamnosyl-4'-*O*-methylisovitexin (**BC15**) và embinin (**BC17**). Trong số 20 hợp chất này có: 15 hợp chất flavonoid thuộc 2 phân nhóm isoflavonoid và euflavonoid, 3 hợp chất phenolic, 1 hợp chất lignan.

Theo tổng quan tài liệu (Mục 1.2) cho thấy, từ năm 1982, các nước trên thế giới như Trung Quốc, Hàn Quốc đã bắt đầu nghiên cứu về thành phần hóa học của Xạ can. Ở Việt Nam chưa có nghiên cứu nào về hạt và lá Xạ can. Tuy nhiên, những nghiên cứu về thành phần hóa học của thân rễ Xạ can đã bắt đầu từ năm 2009 và đã phân lập được 9 hợp chất trong đó có 7 hợp chất isoflavan, 2 hợp chất flavanol và 2 hợp chất phenolic.

Theo kết quả chiết xuất và phân lập cho thấy có sự giống và khác nhau giữa thân rễ và phần trên mặt đất Xạ can. Cả hai phần này đều có các chất chính thuộc nhóm flavonoid, ngoài ra còn có dẫn xuất của đường disaccharid. Tuy nhiên, các flavonoid của thân rễ Xạ can chủ yếu thuộc khung isoflavonoid, trong khi đó, ở phần trên mặt đất nhóm chất này chủ yếu thuộc khung euflavonoid với các dạng C-glycosid. Bảng 1.1 cũng chỉ ra rằng, các flavonoid được phân lập từ phần trên mặt đất Xạ can như isovitexin, 2''-*O*-rhamnosylisovitexin, swertisin, 2''-*O*-rhamnosylswertisin [32], [185], [186] thuộc khung euflavonoid với các dạng C-glycosid. Như

vậy sự khác nhau giữa nhóm chất của thân rễ và phần trên mặt đất Xạ can có thể ảnh hưởng đến tác dụng sinh học của 2 phần này. Để chứng minh được điều đó, cần phải có những nghiên cứu sâu hơn và cụ thể hơn về mặt hóa học cũng như dược lý.

Tổng hợp kết quả của phần nghiên cứu về chiết xuất, phân lập và xác định cấu trúc của các hợp chất cho thấy có sự phù hợp với kết quả định tính và phù hợp với các nghiên cứu trong và ngoài nước với nhóm hoạt chất chính của thân rễ và phần trên mặt đất Xạ can là flavonoid. Bên cạnh đó việc tìm ra các hợp chất mới trong phần trên mặt đất của Xạ can là một trong những đóng góp mới của luận. Với các nghiên cứu về hoạt tính của các chất đã phân lập trong luận án đã góp phần giải thích tác dụng sinh học của cây Xạ can. Các nghiên cứu này cũng chỉ ra các hợp chất phân lập thuộc nhóm flavonoid cũng có trong thành phần của các loài thuộc chi *Iris*. Điều này cũng phù hợp về sự chuyển đổi của loài *Belamca chinensis* sang chi *Iris*.

#### 4.2.3. Định lượng

Kết quả định lượng cho thấy, trong sáu mẫu nghiên cứu, **BC9** (tectoridin) đều chiếm hàm lượng lớn nhất, trong khi **BC7** (iristectorin A) có hàm lượng thấp nhất. Kết quả này phù hợp với khối lượng của các hợp chất phân lập được từ thân rễ Xạ can (bảng 3.21). Ngoài ra, bảng 3.27 còn cho thấy, mẫu Yên Bái có tổng hàm lượng các chất cao nhất, trong khi mẫu Phú Thọ cho kết quả thấp nhất. Qua đó có thể định hướng việc thu mẫu Xạ can cho các nghiên cứu sau này. Kết quả định lượng còn chỉ ra sự thay đổi hàm lượng của mỗi chất phụ thuộc vào từng vùng thu hái.

Trên thế giới đã có một số nghiên cứu đánh giá hàm lượng các hợp chất chính trên thân rễ Xạ can. Các kết quả nghiên cứu này cũng cho thấy hàm lượng các hợp chất isoflavon trong Xạ can dao động nhiều, thay đổi phụ thuộc vùng thu hái [97], mùa thu hái [70]. Hiện nay, chuyên luận Xạ can của Dược điển Trung Quốc quy định thân rễ Xạ can không thấp hơn 0,1% irisflorentin (**BC3**) tính theo khối lượng dược liệu khô kiệt. Trong nghiên cứu này, kết quả định lượng 6 mẫu thân rễ Xạ can của chúng tôi cho thấy hàm lượng irisflorentin dao động từ 0,27 đến 0,86% tính theo khối lượng dược liệu khô kiệt, đều đạt chỉ tiêu về hàm lượng so với quy định của Dược điển Trung Quốc 2010.

Kết quả định lượng các hợp chất chính trong thân rễ Xạ can đều phù hợp với các công bố trên thế giới và quy định của Dược điển Trung Quốc về hàm lượng irisflorentin. Như vậy, bước đầu có thể xác định được vùng trồng trọt, nguồn nguyên liệu thu hái để xây dựng quy trình chiết xuất các hợp chất tinh khiết làm chất đối chiếu phục vụ trong công tác kiểm nghiệm dược liệu thân rễ Xạ can.

### 4.3. VỀ TÁC DỤNG SINH HỌC

#### 4.3.1. Tác dụng chống viêm *in vitro* của thân rễ Xạ can

Hiện nay, các mô hình chống viêm *in vitro* thường được sử dụng để sàng lọc hoặc tìm hiểu sâu về cơ chế tác dụng với các đích nghiên cứu là các chất trung gian trong đáp ứng viêm có bản chất là protein (COX-2, PGE2, iNOS) và các cytokin viêm (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ); NO và mức độ biểu hiện gen gây viêm của COX-2, iNOS (thông qua định lượng mRNA) [93], [118], [173]. Tế bào đại thực bào chuột thường được sử dụng trong các nghiên cứu này, phổ biến nhất là dòng tế bào RAW264.7 [66]. Tác nhân kích thích tế bào thường được sử dụng là lipopolysaccharid (LPS). Trong các nghiên cứu này, các kỹ thuật chính như Western blot, ELISA và định lượng RT-PCR được ứng dụng để đo lường [43], [61], [66]. Đây là các phương pháp phổ biến và có độ nhạy cao.

Tiến hành đánh giá tác dụng chống viêm *in vitro* của thân rễ Xạ can, luận án nghiên cứu trên sự biểu hiện gen của COX-2 và sự sản sinh PGE2 với chất kích thích viêm LPS và dòng tế bào đại thực bào RAW264.7 với kỹ thuật đo lường là Western blot, ELISA và định lượng RT-PCR.

##### 4.3.1.1. Tác dụng chống viêm *in vitro* của cao thân rễ Xạ can

Sàng lọc tác dụng chống viêm ở nồng độ 30  $\mu$ g/ml của cao MeOH và các cao phân đoạn của cao MeOH (*n*-hexan, EtOAc, *n*-BuOH) từ phần thân rễ Xạ can cho thấy, cao ethyl acetat ức chế mạnh sự biểu hiện protein COX-2 và sản sinh PGE2 gây kích thích viêm bởi LPS trên tế bào RAW264.7 mà không ảnh hưởng đến khả năng sống sót của tế bào này. Do đó cao ethyl acetat được lựa chọn để tiến hành phân lập nhằm tìm ra các hợp chất chống viêm tiềm năng.

##### 4.3.1.2. Tác dụng chống viêm *in vitro* của các hợp chất tinh khiết phân lập từ thân rễ Xạ can

Các hợp chất **BC2** (acetovanillon), **BC6** ((7R,8S)-dehydrodiconiferyl alcohol- $\gamma'$ -methyl ether) và **BC9** (tectordin) ở nồng độ 30  $\mu$ M thể hiện tác dụng ức chế đáng kể trên sự biểu hiện của COX-2 gây ra bởi LPS trên dòng tế bào RAW264.7. Các hợp chất tertorigenin (**BC5**), isorhamnetin-3-O-(6''-acetyl-)- $\beta$ -D-glucopyranosid (**BC8**), iridin (**BC10**) và 1,3-O-diferuloylsucrose (**BC11**) (30  $\mu$ M) thể hiện tác dụng yếu hơn. Đối với xét nghiệm ELISA, kết quả cho thấy các hợp chất **BC2**, **BC5** và **BC6** thể hiện hoạt tính ức chế mạnh đối với sự sản sinh PGE2. Hợp chất **BC9** cũng thể hiện tác dụng nhưng yếu hơn so với 3 hợp chất trên. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Shin Kuk Hyun (1999) [157]. Như vậy, đối với kết quả của 2 thí nghiệm có thể thấy cả 4 hợp chất **BC2**, **BC5**, **BC6** và **BC9** có tác dụng ức chế trên sự biểu hiện của COX-2 và sản sinh PGE2 trong tế bào RAW264.7 được gây viêm bởi LPS.

Hiện nay, trên thế giới đã có rất nhiều công bố về hoạt tính chống viêm của 2 hợp chất **BC5** và **BC9**. Như vậy có thể thấy, **BC5** và **BC9** - các flavonoid chính trong thân rễ Xạ can đóng vai trò quan trọng liên quan đến tác dụng chống viêm của dược liệu này.

Luận án đã chứng minh được được lý học phân tử của hợp chất **BC6** từ hoạt tính kháng viêm của cây Xạ can thông qua miR146a, miR-155/COX-2 trong đại thực bào RAW264.7 như là một phần của nghiên cứu về việc tìm kiếm các chất có tác dụng chống viêm từ các loại cây thuốc. Đây là nghiên cứu đầu tiên về tác dụng chống viêm của hợp chất này. Các kết quả này có thể cho phép tạo ra các tác nhân điều trị mới về các bệnh viêm nhiễm trong tương lai.

Ngoài hợp chất lignan (**BC6**) có tác dụng chống viêm tiềm năng, luận án cũng tìm ra một hợp chất chống viêm tiềm năng khác là acetovanillon - **BC2**. Hợp chất **BC2** có tác dụng ức chế mạnh COX-2 gây ra bởi LPS và mức độ sản sinh PGE2 và ức chế hoạt động phiên mã của NF-kB, c-Jun và c-Fos / AP-1. Tác dụng ức chế mạnh COX-2 của **BC2** có thể liên quan đến sự bất hoạt NF-kB. NF-kB là một trong những yếu tố phiên mã điều chỉnh sự phiên mã của nhiều gen liên quan đến viêm, sự ức chế yếu tố phiên mã này của **BC2** cung cấp một cách tiếp cận mới trong điều trị các bệnh viêm. Ngoài ra, **BC2** ức chế hoạt động của AP-1. Bên cạnh đó, **BC2** còn làm giảm nồng độ nhân của p65, c-Jun và c-Fos trong đại thực bào RAW264.7. Các kết quả này đã chứng minh rằng, NF-kB và AP-1 là các yếu tố cơ bản cần thiết để **BC2** ức chế sự biểu hiện của COX-2. Nghiên cứu trước đây cũng chỉ ra rằng sự ức chế COX-2 bởi acetovanillon trong các tế bào đơn nhân liên kết qua NF-kB [26]. Như vậy, luận án đã chứng minh và khẳng định sự ức chế COX-2 bởi acetovanillon trong tế bào RAW264.7 thông qua sự giảm điều hòa (down-regulation) của NF-kB và AP-1. Những kết quả này có ý nghĩa quan trọng trong việc làm sáng tỏ cơ chế dược lý của acetovanillon trong tế bào RAW264.7 và hợp chất này cũng có thể trở thành chất trị liệu để phòng ngừa hoặc điều trị các bệnh về viêm.

Như vậy, ngoài 2 hợp chất **BC5** và **BC9** đã được nghiên cứu sâu và rộng về tác dụng chống viêm, các hợp chất **BC2** và **BC6** cũng được nghiên cứu sâu về tác dụng chống viêm trong luận án này góp phần làm sáng tỏ cơ chế tác dụng của 2 hợp chất này.

Hợp chất **BC2** thuộc nhóm phenolic và hợp chất **BC6** thuộc nhóm lignan tuy không phải là nhóm hợp chất chính của Xạ can nhưng lại thể hiện hoạt tính chống viêm mạnh hơn so với các hợp chất flavonoid - thuộc nhóm chất chính trong loài này đã được nghiên cứu rất nhiều. Việc tìm ra hợp chất chống viêm không thuộc nhóm chất chính của Xạ can và nghiên cứu về cơ chế phân tử của các hợp chất này góp phần cung cấp dữ liệu khoa học mới về tác dụng dược lý của dược liệu này.

#### 4.4.2. Tác dụng chống viêm *in vivo* của thân rễ Xạ can

Hiện nay có rất nhiều mô hình nghiên cứu chống viêm *in vivo*. Trong các mô hình đó, mô hình gây phù bàn chân chuột là mô hình phổ biến và hầu hết các nghiên cứu tác dụng chống viêm *in vivo* đều sử dụng. Ở Việt Nam, mô hình gây phù bàn chân chuột là mô hình được áp dụng phổ biến ở trong nước với chất gây phù là carrageenin.

Để đánh giá tác dụng chống viêm *in vivo* của thân rễ Xạ can, chúng tôi tiến hành nghiên cứu tác dụng của cao methanol trên 2 mô hình gây phù bàn chân chuột bằng carrageenin và mô hình gây u hạt. Kết quả cho thấy, cả 2 mức liều (225 mg/kg và 450 mg/kg thể trọng chuột) đều có tác dụng chống viêm cấp và chống viêm mạn. Đối với tác dụng chống viêm *in vivo*, cao methanol thân rễ Xạ can liều 450 mg/kg thể trọng chuột mạnh hơn liều 225 mg/kg thể trọng chuột, tuy nhiên so sánh cả 2 liều với chứng dương thì chưa có ý nghĩa thống kê.

Trên thế giới, đã có nghiên cứu về tác dụng chống viêm *in vivo* của cao ethanol của Xạ can trên mô hình gây phù bàn chân chuột, tác dụng của tectorigenin và tectoridin ức chế viêm thông qua ức chế enzym hyaluronidase ở chuột thực nghiệm [193]. Ở Việt Nam, năm 2010, nhóm nghiên cứu thuộc Viện Hàn lâm khoa học Việt Nam đã tạo ra chế phẩm TECAN (thành phần chính là tectorigenin, tectoridin) và đánh giá một số tác dụng của chế phẩm này. Kết quả cho thấy, TECAN với liều 60 mg/kg thể trọng thể hiện tác dụng chống viêm cấp ở thời điểm 5 h, 6 h và 7 h sau khi gây viêm bằng carrageenin 1%, tác dụng này tương đương indomethacin 10 mg/kg thể trọng tại thời điểm 6 h và 7 h sau khi gây viêm [6].

Như vậy, khác với các nghiên cứu đã công bố về đối tượng thử nghiệm, trong nghiên cứu này, chúng tôi đánh giá tác dụng của cao methanol Xạ can trên động vật thực nghiệm và cho thấy tác dụng chống viêm *in vivo* của cao này ở hai mức liều 225 và 450 mg/kg thể trọng chuột.

#### 4.3.3. Tác dụng ức chế sự tăng sinh tế bào cơ trơn thành mạch máu của phần trên mặt đất Xạ can

Tiến hành sàng lọc tác dụng ức chế sự tăng sinh tế bào cơ trơn mạch máu của cao EtOH 70% và các các phân đoạn của cao này ở nồng độ 20 µg/ml cùng với 8 hợp chất phân lập từ phần trên mặt đất Xạ can ở nồng độ 30 µM. Kết quả cho thấy, cao ethyl acetat (20 µg/ml) và 5 hợp chất: isoswertisin (**BC14**), embinin (**BC17**), 6"-O-acetylembinin (**BC18**), 3"-O-acetylembinin (**BC19**) và iridin (**BC20**) (30 µM) phân lập từ cao này có tác dụng ức chế sự tăng sinh của tế bào VSMC. Trong số 5 hợp chất thể hiện hoạt tính có 2 hợp chất mới là 6"-O-acetylembinin và 3"-O-acetylembinin. Hợp chất 3"-O-acetylembinin thể hiện hoạt tính mạnh nhất trong số 8 hợp



chất được thử nghiệm. Kết quả này của nghiên cứu mở ra các nghiên cứu sâu hơn về tác dụng của dược liệu Xạ can trong nghiên cứu về tim mạch.

Hiện nay, ở Việt Nam đã có một công trình luận án về cây Xạ can: “Nghiên cứu thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của hai loài Sâm đại hành (*Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb.) và Xạ can (*Belamcanda chinensis* (L.) DC.) (họ La đơn (iridaceae))”. Tuy nhiên, so với luận án trước, luận án “Nghiên cứu thành phần hóa học và một số tác dụng sinh học của loài Xạ can (*Belamcanda chinensis* L. (DC.)) thu hái tại Việt Nam” có nhiều tính mới đặc biệt là các nghiên cứu về thành phần hóa học và tác dụng ức chế cơ trơn thành mạch máu của phần trên mặt đất. Bên cạnh đó, luận án cũng tìm ra được hai hợp chất khác có tác dụng chống viêm tiềm năng từ thân rễ Xạ can và nghiên cứu sâu về cơ chế chống viêm của hai hợp chất này trên tế bào RAW264.7. Tác dụng chống viêm cấp và mạn của cao MeOH thân rễ Xạ can cũng đã được đánh giá. Ngoài ra, luận án cũng đã xây dựng được phương pháp định lượng đồng thời 6 hợp chất chính phân lập từ thân rễ Xạ can trên sáu mẫu thân rễ Xạ can thu hái tại các vùng khác nhau. Do đó, hai luận án không trùng lặp nhau về tên và hướng nghiên cứu.

Kết quả nghiên cứu của luận án đã góp phần cung cấp những cơ sở dữ liệu khoa học về hóa thực vật và tác dụng sinh học, đồng thời chứng minh tác dụng chống viêm của dược liệu thân rễ Xạ can sử dụng trong dân gian và mở ra hướng nghiên cứu mới về tác dụng sinh học của phần trên mặt đất cây Xạ can.

## KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

### KẾT LUẬN

#### ➤ Về hóa học

- Đã xác định trong cây Xạ can có các nhóm chất hữu cơ như flavonoid, acid hữu cơ, acid amin, polysaccarid và đường khử.
- Đã phân lập và xác định cấu trúc của 20 hợp chất [11 chất từ phần thân rễ (**BC1** - **BC11**) và 9 chất từ phần trên mặt đất (**BC12** - **BC20**) trong đó có 4 chất mới (**BC12**, **BC13**, **BC18**, **BC19**) và 6 chất lần đầu tiên phân lập từ Xạ can (**BC6**, **BC8**, **BC11**, **BC14**, **BC15** và **BC17**)].
- Đã xây dựng được phương pháp định lượng đồng thời 6 hợp chất phân lập từ thân rễ Xạ can và xác định hàm lượng của chúng trong 6 mẫu thân rễ Xạ can thu hái tại các tỉnh Nghệ An, Phú Thọ, Thái Bình, Thanh Hóa, Vĩnh Phúc và Yên Bái. Các mẫu này đều đạt tiêu chuẩn của Dược điển Trung Quốc quy định về hàm lượng irisfloreantin trong dược liệu Xạ can không thấp hơn 0,1%. Hàm lượng của các hợp chất này dao động nhiều và thay đổi phụ thuộc vào từng mẫu thu hái: tectoridin (**BC9**) 1,66 - 5,27%, iristectorigenin A (**BC1**) 0,17 - 0,40%,

irisflorentin (**BC3**) 0,27 - 0,86%, tectorigenin (**BC5**) 0,74 - 1,95%, iristectorin A (**BC7**) 0,12 - 0,38% và iridin (**BC10**) 0,50 - 1,41%.

➤ **Về tác dụng sinh học**

- Ở nồng độ 30 µg/ml, phân đoạn ethyl acetat thân rễ Xạ can ức chế mạnh sự biểu hiện protein COX-2 gây ra bởi LPS và sản sinh PGE2.
- Ở nồng độ 30 µM, các hợp chất **BC2**, **BC6** và **BC9** có khả năng làm giảm đáng kể mức độ biểu hiện COX-2 do LPS gây ra ở các tế bào RAW246.7.
- Hai hợp chất **BC2** và **BC6** đã được đánh giá cơ chế chống viêm *in vitro* thông qua một số tín hiệu viêm trên tế bào RAW364.7. Hợp chất **BC6** ức chế biểu hiện gen COX-2 và ức chế sản sinh PGE2 phụ thuộc theo nồng độ (3, 10, 30 µM); ức chế biểu hiện gen miR-146a và miR-155 sau khi kích hoạt bởi LPS ở nồng độ 30 µM và gây ức chế biểu hiện COX-2 gây bởi LPS, miR-146a và miR-155. Hợp chất **BC2** ức chế biểu hiện gen COX-2 phụ thuộc theo nồng độ (3, 10, 30 µg/ml) và ức chế sản sinh PGE2 phụ thuộc theo nồng độ (3, 10, 30, 100 µg/ml). **BC2** có tác dụng ức chế một số tín hiệu liên quan đến cơ chế viêm NF-kB, AP-1, p65 và c-Jun phụ thuộc theo nồng độ.
- Ở cả 2 mức liều 225 và 450 mg/kg thể trọng chuột, cao MeOH thân rễ Xạ can đều thể hiện rõ tác dụng chống viêm trên mô hình gây phù viêm chân chuột cống bằng carrageenin và làm giảm khối lượng u hạt tươi khi so với lô chứng.
- Ở nồng độ 20 µg/ml cao ethyl acetat phần trên mặt đất Xạ can ức chế đáng kể sự tăng sinh của tế bào VSMC.
- Ở nồng độ 30 µM các hợp chất **BC14**, **BC17** - **BC20** có tác dụng ức chế đáng kể sự tăng sinh của tế bào VSMC.

**KIẾN NGHỊ**

- Nghiên cứu cơ chế chống viêm *in vitro* và một số mô hình chống viêm thực nghiệm của cao chiết và các hợp chất phân lập từ phần trên mặt đất của Xạ can.
- Nghiên cứu điều chế một số hợp chất chất chính làm chất đối chiếu phục vụ cho công tác kiểm nghiệm đảm bảo chất lượng dược liệu thân rễ Xạ can.

## CÁC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. **Binh B. T.**, Hien T. T., Chinh P. D., Thu N. T. B. (2016), “Anti-inflammatory effect of (7R,8S)-dehydrodiconiferyl alcohol-9’ $\gamma$ -methyl ether from the rhizome of *Belamcanda chinensis*”, *Biomedical and Pharmacology Journal*, 9(3), pp. 909-918.
2. Do Thi Ha, **Bui Thi Binh**, Nguyen Thi Thu, Nguyen Thi Bich Thu, Pham Ha Thanh Tung, Won Keun Oh (2018), “Four new compounds isolated from aerial part of *Belamcanda chinensis* (L.) DC. and their effect on vascular smooth muscle cells (VSMC) proliferation”, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, accepted.
3. **Bùi Thị Bình**, Đỗ Thị Hà, Nguyễn Thị Bích Thu (2014), “Neolignan và các isoflavonoid phân lập từ thân rễ Xạ can *Belamcanda chinensis* (L.) DC.”, *Tạp chí Dược học*, 456(54), tr. 49-55.
4. **Bui Thi Binh**, Tran Thi Hien, Dao Trong Tuan, Do Thi Ha, Nguyen Thi Bich Thu (2014), “Acetovanilone inhibits COX-2 expression and prostaglandin E2 production in RAW264.7 cells via NF-kB and AP-1 activity”, *Journal of Medicinal Materials*, 3(19), pp. 139-144.
5. **Bùi Thị Bình**, Nguyễn Thị Thu, Nguyễn Thị Bích Thu, Đỗ Thị Hà (2015), “Thành phần hóa học của phân đoạn ethyl acetat thân rễ Xạ can (*Belamcanda chinensis* (L.) DC.”, *Tạp chí Dược liệu*, 20(2).