

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

VIỆN DƯỢC LIỆU

-----oOo-----



ĐỖ THỊ OANH

**NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM THỰC VẬT,
THÀNH PHẦN HÓA HỌC VÀ MỘT SỐ TÁC DỤNG SINH
HỌC CỦA LOÀI *CHLORANTHUS JAPONICUS* SIEB.
Ở VIỆT NAM**

Chuyên ngành : DƯỢC LIỆU - DƯỢC HỌC CỔ TRUYỀN

Mã số : 9720206

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ DƯỢC HỌC

Hà Nội, năm 2018

Công trình được hoàn thành tại: Bệnh viện YHCT Trung ương

Viện Dược liệu

Viện hóa học các hợp chất thiên nhiên

BM Dược lý – Trường Đại học Y Hà Nội

Người hướng dẫn khoa học: GS.TS Phạm Thanh Kỳ

Đại học Dược Hà Nội

PGS.TS. Lê Việt Dũng

Viện Dược liệu

Phản biện 1:

.....

Phản biện 2

.....

Phản biện 3:

.....

Luận án sẽ được bảo vệ trước Hội đồng đánh giá luận án tiến sĩ phiên chính thức tại : Viện Dược liệu,
Bộ Y tế, số 3B Quang Trung, Quận Hoàn Kiếm, Hà Nội.

Vào hồi..... giờ ngày..... tháng năm

Có thể tìm hiểu Luận án tại thư viện:

- Thư viện Quốc gia
- Thư viện Viện Dược liệu

MỞ ĐẦU

Việt Nam là quốc gia nằm trong vùng khí hậu nhiệt đới gió mùa, có nguồn dược liệu tự nhiên phong phú và đa dạng về chủng loại lẫn công dụng làm thuốc. Đồng thời, Việt Nam có một nền y học cổ truyền dân tộc lâu đời với các tri thức sử dụng các loại dược liệu, các bài thuốc có giá trị dùng để phòng bệnh và chữa bệnh.

Hiện nay, không chỉ Việt Nam mà trên thế giới, với xu hướng “trở về với thiên nhiên” nên việc sử dụng các thuốc có nguồn gốc từ dược liệu của người dân ngày càng gia tăng, vì ít có những tác dụng không mong muốn và giá thành phù hợp hơn. Để đảm bảo tính khoa học, hiệu quả, an toàn cho việc sử dụng các cây thuốc, các bài thuốc trong nhân dân thì việc nghiên cứu về chúng ngày càng được quan tâm.

Cây Sói nhật, còn gọi là Kim túc lan, Tứ khôi ngổa, Hom sam mường (Tày), có tên khoa học *Chloranthus japonicus* Sieb., thuộc họ Hoa Sói (Chloranthaceae). Cây có nguồn gốc ở vùng Đông Á, phân bố ở Triều Tiên, Nhật Bản, Đài Loan, Trung Quốc và Việt Nam. Ở Việt Nam, Sói nhật thường thấy ở các tỉnh vùng núi phía bắc như Cao Bằng, Lạng Sơn, Lào Cai, Hà Giang, Yên Bái, Tuyên Quang, Lai Châu, Sơn La, Hòa Bình... Ở các tỉnh phía nam, thấy ở Đà Lạt (Lâm Đồng), Ngọc Linh (Kon Tum) và Mang Yang (Gia Lai).

Theo Y học cổ truyền, Sói nhật có vị cay, đắng; tính ôn, có tác dụng tán hàn, khu phong, hoạt huyết, hành ứ, giải độc. Ở Trung Quốc cây được sử dụng trong việc điều trị đau nhức lưng gối, đòn ngã, mụn nhọt, bạch đới, cảm mạo. Ở Việt Nam, nhân dân ở một số địa phương dùng Sói nhật trong các trường hợp chữa kiết lỵ, đau lưng, đau mình, ứ huyết sưng đau do ngã hoặc bị đánh, lá tươi rửa sạch giã lấy nước bôi chữa bong...[3],[12],[13],[37]

Trên thế giới, đã có rất nhiều nghiên cứu về thành phần hóa học cũng như tác dụng sinh học của cây Sói nhật (*Chloranthus japonicus* Sieb.), tuy nhiên ở Việt Nam cho tới nay nghiên cứu về cây Sói nhật còn rất ít.

Để tìm hiểu thành phần hoá học cây Sói nhật mọc ở Việt Nam và góp phần làm sáng tỏ kinh nghiệm dân gian, tạo cơ sở khoa học khai thác nguồn dược liệu trong nước, luận án được thực hiện với tên: “**Nghiên cứu đặc điểm thực vật, thành phần hoá học và một số tác dụng sinh học của loài *Chloranthus japonicus* Sieb. ở Việt Nam**” với các mục tiêu sau:

- Xác định tên khoa học của mẫu nghiên cứu và xác định các đặc điểm vi học các bộ phận của cây để góp phần tiêu chuẩn hóa dược liệu.
- Chiết xuất, phân lập và xác định cấu trúc hóa học các hợp chất đã phân lập được từ dược liệu.
- Thử độc tính cấp, tác dụng chống viêm, chống oxy hóa, bảo vệ gan của cao chiết dược liệu và tác dụng ức chế enzym protease HIV – 1 của một số hợp chất tinh khiết đã phân lập được.

Những đóng góp mới của luận án:

Cây Sói nhật chưa có công trình nào công bố ở Việt Nam, cây Sói nhật thường dùng theo kinh nghiệm dân gian để chữa kiết lỵ, đau xương khớp, ứ huyết sưng đau do ngã hoặc bị đánh.... đó đó nghiên cứu sinh thực hiện đề tài này là cần thiết. Kết quả nghiên cứu là một đóng góp về mặt khoa học và có ý nghĩa thực tiễn.

+ Đã mô tả đầy đủ các đặc điểm hình thái thực vật có ảnh chụp cơ quan sinh trưởng, cơ quan sinh sản và giải phẫu rễ, thân, lá cây Sói nhật.

+ Đã chiết xuất, phân lập và xác định cấu trúc hóa học 14 hợp chất từ cây Sói nhật (*Chloranthus japonicus* Sieb.) thu hái ở Lâm Đồng, trong đó có 6 hợp chất lần đầu tiên phân lập từ chi *Chloranthus* Sw. và 5 hợp chất lần đầu tiên công bố phân lập từ loài *Chloranthus japonicus* Sieb.

- + Lần đầu tiên công bố về độc tính cấp của cao chiết phần trên mặt đất và phần rễ cây Sói nhật.
- + Đã chứng minh cao chiết phần trên mặt đất cây Sói nhật có tác dụng chống viêm cấp, cao chiết phần rễ không có tác dụng chống viêm cấp.
- + Cao chiết phần trên mặt đất và phần rễ đều có tác dụng chống viêm mạn ở mô hình thí nghiệm.
- + Cao chiết phần trên mặt đất và phần rễ đều có tác dụng bảo vệ gan trên mô hình gây tổn thương gan bằng PAR.
- + Lần đầu tiên công bố hợp chất $4\alpha,8\beta$ -dihydroxyeudesm-7(11)-en-12,8-olid có hoạt tính ức chế enzym protease HIV-1 với $IC_{50}=0,45\mu M$.
- + Bố cục của luận án: Luận án có 116 trang, với 51 bảng, 45 hình và 188 tài liệu tham khảo. Đặt vấn đề (02 trang), Chương 1: Tổng quan (35 trang), Chương 2: Nguyên vật liệu và phương pháp nghiên cứu (15 trang), Chương 3: Kết quả nghiên cứu (46 trang), Chương 4 : Bàn luận (18 trang), Kết luận và kiến nghị (02 trang)

CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN

Phần tổng quan đã tổng hợp các tài liệu nghiên cứu trong và ngoài nước liên quan đến các vấn đề chính sau:

- 1.1. VỊ TRÍ PHÂN LOẠI, ĐẶC ĐIỂM THỰC VẬT CỦA HỌ HOA SÓI (CHLORANTHACEAE) VÀ CHI *CHLORANTHUS*.
- 1.2. THÀNH PHẦN HOÁ HỌC CỦA CHI *CHLORANTHUS* SW.
- 1.3. TÁC DỤNG SINH HỌC CỦA CHI *CHLORANTHUS* SW.

CHƯƠNG 2: NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. NGUYÊN VẬT LIỆU NGHIÊN CỨU

2.1.1. Nguyên liệu nghiên cứu

Cây Sói nhật được thu hái vào hai mùa : mùa khô (tháng 1-2/2012) và mùa mưa (tháng 6 – 7/2012) tại Đà Lạt - Lâm Đồng.

Mẫu nghiên cứu về thực vật: Thu hái khi cây có hoa, ép tiêu bản.

Mẫu nghiên cứu về thành phần hóa học: Sau khi thu hái tiến hành làm sạch, tách riêng phần trên mặt đất và rễ, phơi rồi sấy khô trong tủ sấy ở nhiệt độ $50^{\circ}C$, sau đó được tán thành bột thô cho vào bao kín và bảo quản nơi khô mát.

Mẫu nghiên cứu về tác dụng sinh học: dịch chiết nước của phần trên mặt đất và dịch chiết nước rễ cây Sói nhật.

2.1.2. Động vật thí nghiệm

+ **Thử độc tính cấp:** Chuột nhắt trắng, chủng *Swiss*, cả hai giống, khỏe mạnh, trọng lượng 18 - 22g, do Học viện quân y cung cấp.

+ **Thử tác dụng chống viêm:**

Chuột cống trắng chủng *Wistar*, cả hai giống, khỏe mạnh, trọng lượng 150 - 180g; chuột nhắt trắng, chủng *Swiss*, cả hai giống, khỏe mạnh, trọng lượng 20 - 25g, do Học viện quân y cung cấp. Động vật thí nghiệm được nuôi trong điều kiện phòng thí nghiệm với đầy đủ thức ăn và nước uống tại Bộ môn Dược lý - Trường Đại học Y Hà Nội từ 3 – 7 ngày trước khi nghiên cứu và trong suốt thời gian nghiên cứu.

2.1.3. Thiết bị và hóa chất: Đã trình bày đầy đủ trong luận án chính.

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.2.1. Phương pháp nghiên cứu đặc điểm thực vật

Quan sát, thu thập thông tin (chụp ảnh và ghi chép) tại thực địa, đặc biệt là các đặc điểm của cây khi còn tươi. Thu mẫu tiêu bản cây mang hoa, quả vào thời gian phù hợp với mùa hoa (tháng 3 - 4) và quả (tháng 5 - 7). Mẫu nghiên cứu được ép, sấy khô, xử lý, bảo quản theo phương pháp làm tiêu bản mẫu khô. Mẫu tiêu bản được lưu giữ Phòng tiêu bản Khoa Tài nguyên, Viện Dược liệu (VDL).

2.2.2. Phương pháp nghiên cứu về hóa học

2.2.2.1. Định tính các nhóm chất hữu cơ có trong dược liệu

2.2.2.2. Chiết xuất

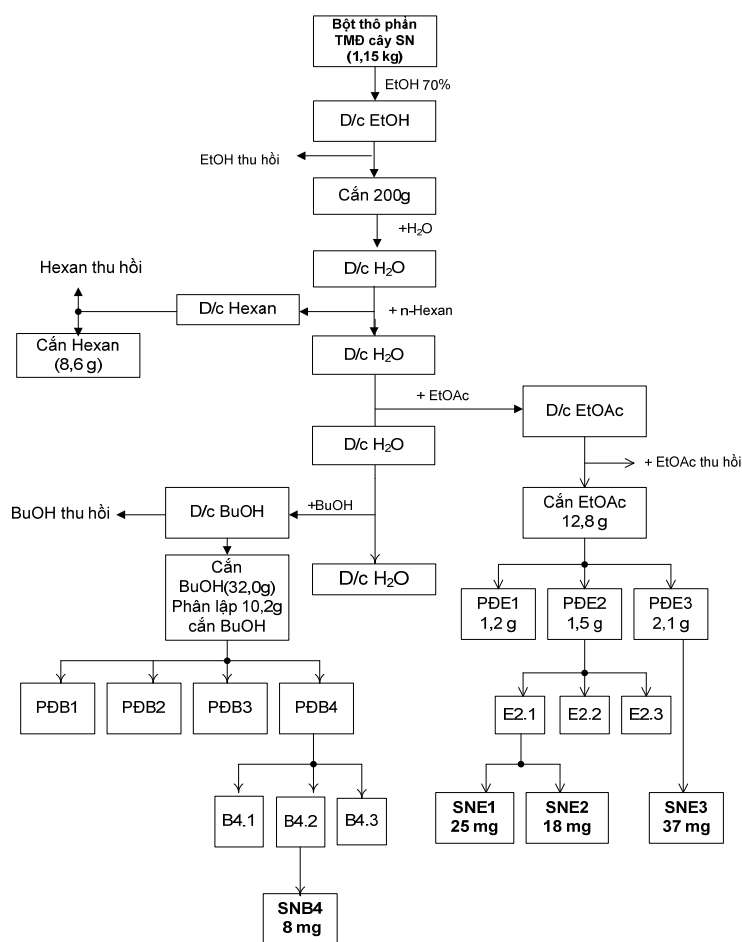
Chiết xuất các chất trong dược liệu theo phương pháp ngâm chiết với dung môi ethanol 70% ở nhiệt độ phòng.

Chiết phân đoạn dịch chiết toàn phần sau khi thu hồi dung môi, phân tán đều trong nước rồi lắc với dung môi có độ phân cực tăng dần, *n*-Hexan, EtOAc, *n*-Butanol.

2.2.2.3. Phân lập các chất

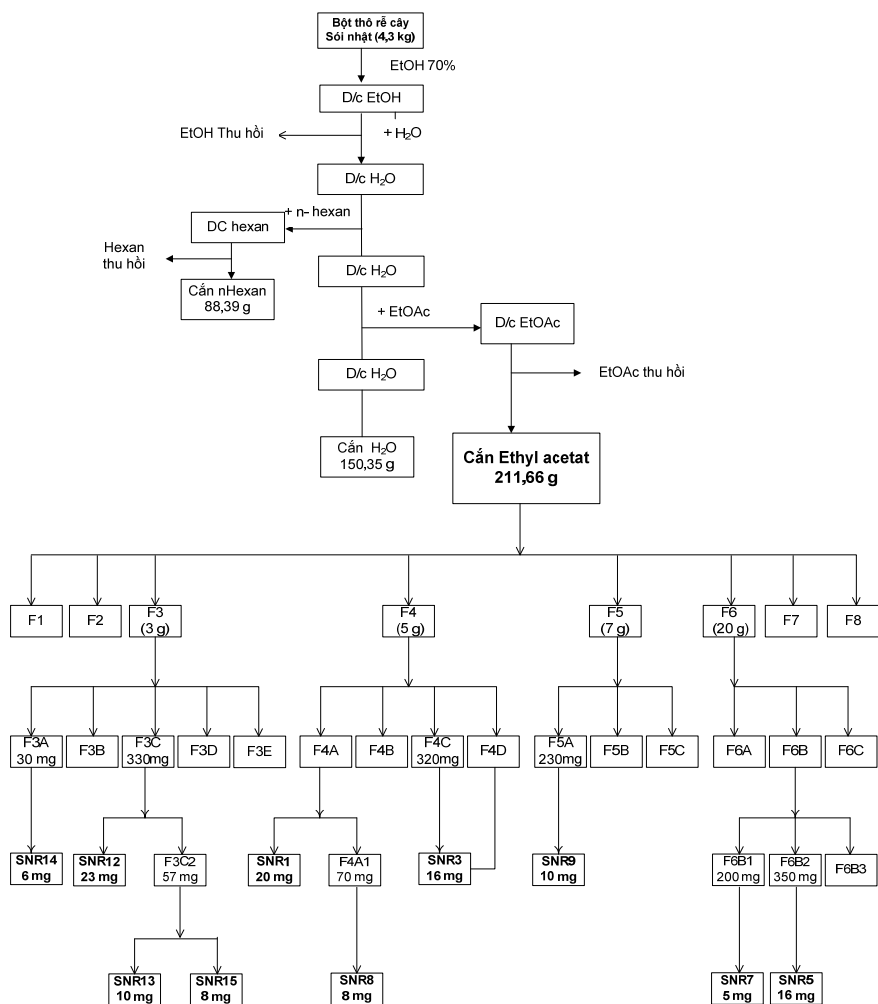
Phân lập các hợp chất trong cồn của các phân đoạn chiết bằng sắc ký cột và sắc ký lớp mỏng điều chế. Theo dõi các phân đoạn sắc ký cột bằng sắc ký lớp mỏng.

- *Chiết xuất và phân lập các hợp chất từ phần trên mặt đất*



Hình 2.2: Sơ đồ chiết xuất và phân lập các chất từ phần TMD cây Sói nhật

- Chiết xuất và phân lập các chất từ rễ:



Hình 2.3: Sơ đồ chiết xuất và phân lập các chất từ rễ cây Sói nhật

2.2.2.4. Xác định cấu trúc các hợp chất phân lập được

2.2.3. Phương pháp nghiên cứu tác dụng sinh học

Mẫu nghiên cứu: Cao lỏng chiết bằng nước từ phần trên mặt đất và rễ cây Sói nhật (chiết 3 lần) cô đặc đến tỷ lệ (1:4), ký hiệu là cao SN.

Liều thử: Liều dùng cho tất cả các thí nghiệm được lý được qui từ liều được liệu khô thường dùng trên người (rễ: 20g/ngày) và liều gấp 3 tính theo phương pháp ngoại suy liều tương đương có hiệu quả giữa người và động vật thí nghiệm.

2.2.3.1. Thử độc tính cấp

2.2.3.2. Nghiên cứu tác dụng chống viêm cấp và mạn tính

2.2.3.3. Nghiên cứu tác dụng bảo vệ gan và chống oxy hóa

2.2.3.4. Thử hoạt tính ức chế protease HIV-1 của chất tinh khiết đã phân lập được

CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VỀ THỰC VẬT

3.1.1. Thẩm định tên khoa học cây Sói nhật

Trong quá trình nghiên cứu về cây Sói nhật, mẫu cây đã được thu hái tại Tam Đảo - Vĩnh Phúc và Đà Lạt - Lâm Đồng. Các mẫu tiêu bản đã được xử lý và lưu trữ tại khoa Tài nguyên Viện Dược liệu (ký hiệu mẫu 9738, 9739).

Tên khoa học của mẫu nghiên cứu được thẩm định là *Chloranthus japonicus* Sieb. thuộc họ Hoa sói (Chloranthaceae).

3.1.2. Đặc điểm hình thái cây Sói nhật

Cây thảo, sống hàng năm, cao 30 – 50 cm. Rễ chùm, gồm rất nhiều rễ nhỏ. Thân cây mọc đứng, mảnh, hình trụ, nhẵn, không phân nhánh, có chia thành các đốt dài 8 -9 cm, có rãnh.

Lá mọc vòng 4 lá, cuống lá ngắn, dài khoảng 25 – 30 mm, phiến lá nguyên, hình bầu dục, kích thước 8 - 14 x 6 – 9 cm, gốc lá hơi thuôn, mép lá khía răng cưa nhỏ, ngọn lá nhọn, hai mặt lá nhẵn, mặt trên xanh đậm, mặt dưới xanh nhạt hơn, gân lá hình lông chim, gân chính nổi rõ, gân bên hình cung mờ, lá kèm mọc đối.

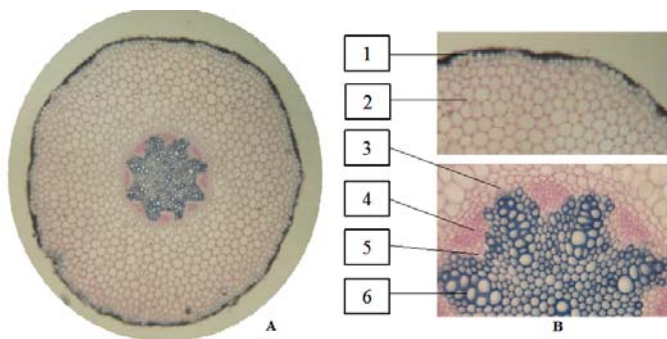
Cụm hoa mọc thành bông đơn, thẳng đứng ở ngọn thân, chiều dài cụm hoa 30 - 40 mm, hoa trần, màu vàng, rất thơm. Nhị 3, chỉ nhị tiêu giảm thành vảy nhỏ, nhị giữa gồm 2 bao phần, hai nhị bên mỗi nhị mang 1 bao phần. Bầu 1 ô, chứa 1 noãn treo, vòi nhụy ngắn.

Quả hạch cứng, nhỏ, hình quả lê, đường kính 3 - 6 mm, đựng 1 hạt. Hạt nhỏ, có nhiều nội nhũ.

3.1.3. Đặc điểm giải phẫu cây Sói nhật

3.1.3.1. Đặc điểm giải phẫu rễ

Mặt cắt rễ hình tròn, chia thành 2 phần: vỏ và trụ trung tâm. Từ ngoài vào trong quan sát thấy: Ngoài cùng là lớp bần (1) mỏng, gồm 1 - 2 hàng tế bào thành dày hóa gỗ, bắt màu xanh, có nhiều chỗ bị đứt, gãy. Mô mềm vỏ (2) cấu tạo từ những tế bào thành mỏng, xếp lộn xộn. Nội bì (3) là lớp tế bào trong cùng của phần vỏ, gồm 1 - 2 hàng tế bào xếp đều đặn vòng quanh trụ trung tâm. Bó libe (4) gồm những tế bào nhỏ, tụ lại thành từng đám hình trứng, đường kính 20 - 35 μm , xen kẽ các bó gỗ (6) theo hướng đồng tâm. Bó gỗ có các mạch gỗ to, nhỏ khác nhau, đường kính 10 - 20 μm . Tầng phát sinh libe - gỗ (5) nằm giữa phần libe và phần gỗ.



Hình 3.6: Đặc điểm vi phẫu rễ cây Sói nhật.

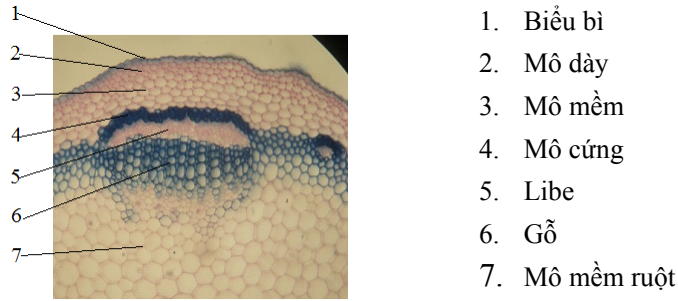
A. Hình ảnh chung. B. Cấu tạo chi tiết các bộ phận

(1. Bần, 2. Mô mềm vỏ, 3. Nội bì, 4. Libe, 5. Tầng phát sinh libe - gỗ, 6. Gỗ)

3.1.3.2. Đặc điểm giải phẫu thân

Mặt cắt ngang thân gần thành hình vuông. Ngoài cùng là lớp biểu bì (1) gồm một hàng tế bào xếp đều đặn, vách hóa cutin mỏng, bắt màu xanh. Sát lớp biểu bì là mô dày (2) gồm 2 - 3 hàng tế bào xếp thành vòng. Mô mềm vỏ (3) là các tế bào có kích thước lớn hơn tế bào mô dày, thành mỏng, bắt màu hồng nhạt, xếp lộn xộn. Các bó libe-gỗ xếp thành 1 vòng đồng tâm. Bao quanh mỗi bó libe-gỗ và nối các bó libe-gỗ là các tế bào mô cứng (4) có vách hóa gỗ dày 7 - 12 μm . Libe (5) là dạng mạch đơn, gần tròn, đường kính 20 - 40 μm .

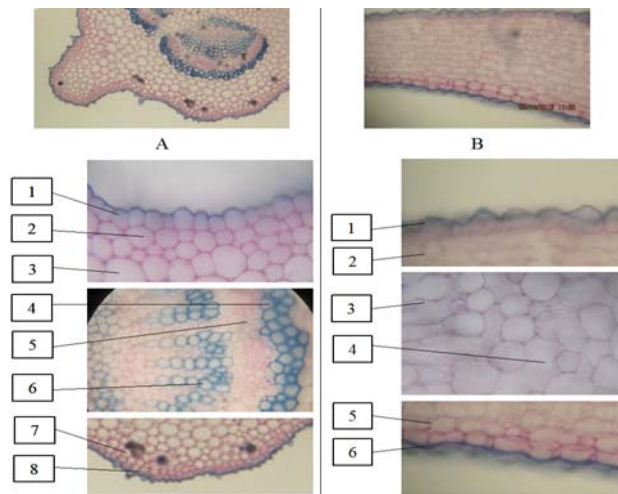
Gỗ (6) gồm các tế bào có thành mỏng, đường kính 10 - 20 μm . Vùng mô mềm ruột (7) gồm các tế bào đa giác, thành mỏng, bắt màu hồng nhạt, xếp sát nhau.



Hình 3.7: Đặc điểm vi phẫu thân cây Sói nhật

3.1.3.3. Đặc điểm giải phẫu lá

- *Phần gân chính:*



Hình 3.8: Đặc điểm vi phẫu lá cây Sói nhật

- A. Phần gân chính: 1. Biểu bì trên, 2. Mô dày trên, 3. Mô mềm, 4. Mô cứng, 5. Libe, 6. Gỗ, 7. Mô dày dưới, 8. Biểu bì dưới
- B. Phần phiến lá: 1. Biểu bì trên, 2. Hạ bì trên, 3. Mô mềm, 4. Mô khuyết, 5. Hạ bì dưới, 6. Biểu bì dưới

Gân lá phía trên lõm nhọn, phía dưới lồi, ở giữa gân chính lồi lên thành ụ. Biểu bì trên (1) và dưới (8) là lớp tế bào mỏng ở ngoài cùng phủ một lớp cutin, xếp đều đặn, phía ngoài biểu bì dưới rải rác có lông che chở đơn bào. Mô dày trên (2) và dưới (7) cấu tạo bởi các tế bào bắt màu hồng đậm, nằm sát biểu bì, có thành tế bào dày, xếp lộn xộn. Mô mềm (3) gồm các tế bào ở giữa lớp mô dày và bó libe - gỗ, kích thước lớn hơn tế bào mô dày, màu hồng nhạt, thành tế bào mỏng, rải rác có chứa các tinh thể calci oxalat hình cầu gai. Mô cứng (4) gồm các tế bào có màng hóa gỗ, bắt màu xanh, bao phía ngoài bó libe - gỗ, có 2 bó libe - gỗ. Các bó libe bắt màu hồng, xếp sát nhau tạo thành cung libe (5), mặt lõm hướng lên trên. Các bó gỗ (6) bắt màu xanh ở giữa tạo thành vòng đồng tâm.

- *Phần phiến lá:* Từ trên xuống dưới quan sát thấy:

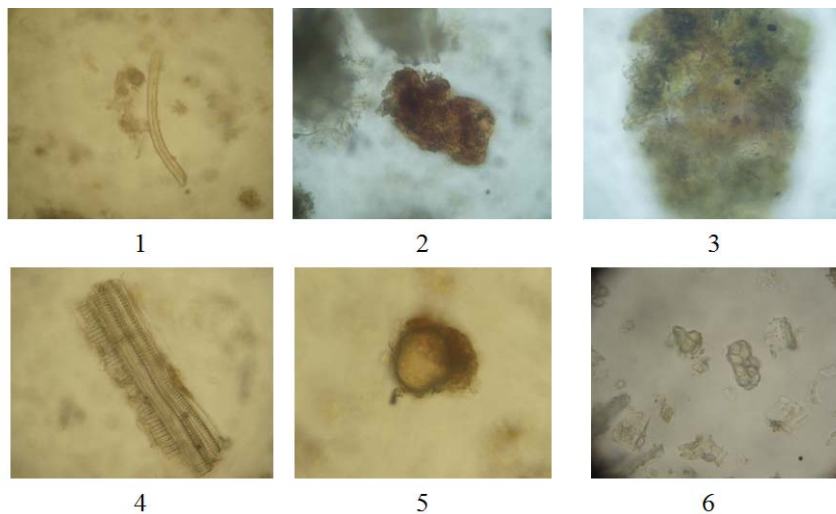
Biểu bì trên (1) hình đa giác, thành tế bào uốn khúc nhẹ, kích thước 40 – 60 x 100 – 130 μm . Hạ bì trên (2) gồm 1 lớp tế bào nằm ngay sát biểu bì, thành hơi dày, bắt màu hồng đậm hơn. Mô mềm (3) gồm các tế bào hình dạng khác nhau, có các tinh thể calci oxalat nằm rải rác. Mô khuyết (4) nằm giữa phần thịt lá. Hạ bì dưới (5) là 1-2 hàng tế bào nằm sát biểu bì dưới, bắt màu hồng đậm hơn mô mềm. Biểu bì dưới (6) hình đa

giác, thành tế bào uốn khúc, kích thước 40 - 50 x 60 - 100 μm , rải rác có các lỗ khí với kích thước 30 x 50 μm . Thành biểu bì hóa cutin mỏng.

3.1.3. Đặc điểm bột phần trên mặt đất và rễ cây Sói nhật

3.1.3.1. Đặc điểm bột phần trên mặt đất cây Sói nhật

Bột phần trên mặt đất cây Sói nhật có các đặc điểm (Hình 3.8): lông che chở đơn bào (1), đám tế bào mô cứng (2), mảnh mô mềm mang lỗ khí (3), mảnh mạch (4), hạt phấn (5), hạt tinh bột (6).

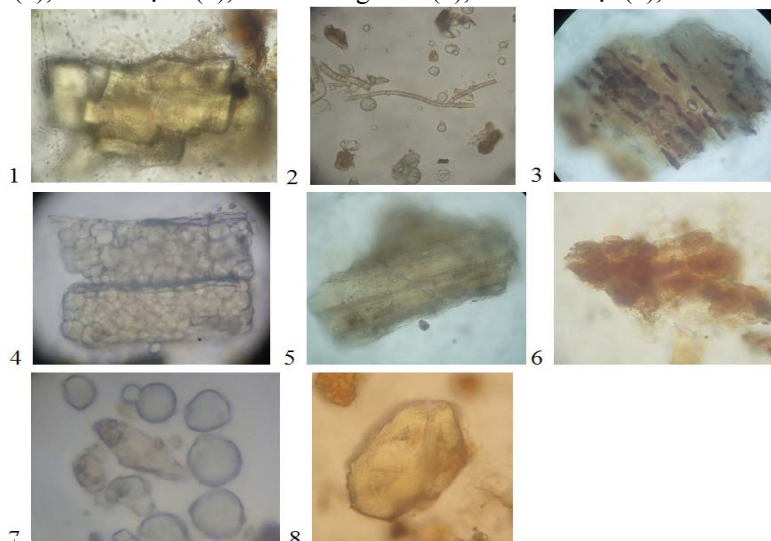


Hình 3.9: Đặc điểm bột phần trên mặt đất cây Sói nhật

1. Lông che chở, 2. Đám tế bào mô cứng, 3. Mảnh mô mềm mang lỗ khí,
4. Mảnh mạch, 5. Hạt phấn, 6. Tinh bột

3.1.3.1. Đặc điểm bột rễ cây Sói nhật

Bột rễ cây Sói nhật có các đặc điểm (Hình 3.7): mảnh bản (1), sợi gỗ (2), mảnh mạch vạch (3), mảnh mô mềm mang tinh bột (4), mảnh mạch (5), mảnh mang màu (6), đám tinh bột (7), tinh thể calci oxalat (8).



Hình 3.10 : Đặc điểm bột rễ cây Sói nhật

1. Mảnh bản, 2. Sợi gỗ, 3. Mảnh mạch vạch, 4. Mảnh mô mềm mang tinh bột,
5. Mảnh mạch, 6. Mảnh mang màu, 7. Đám tinh bột, 8. Tinh thể calci oxalat

3.2. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VỀ THÀNH PHẦN HÓA HỌC

3.2.1. Định tính các nhóm chất hữu cơ trong cây Sói nhật

Bằng các phản ứng hóa học cho thấy phần TMD cây Sói nhật, có chứa: flavonoid, saponin, chất béo, sterol, caroten, acid hữu cơ, polysaccharid, tinh dầu. Trong rễ có: flavonoid, saponin, coumarin, acid hữu cơ, steroid, caroten, polysaccharid và tinh dầu.

3.2.2. Kết quả chiết xuất và phân lập các chất

- Từ phần trên mặt đất đã phân lập được 4 hợp chất ký hiệu: SNE1(1), SNE2(2), SNE3(3), SNB4(4),

- Từ rễ đã phân lập được 10 hợp chất ký hiệu: SNR1(5), SNR3(6), SNR5(7), SNR7(8), SNR8(9), SNR9(10), SNR12(11), SNR13(12), SNR14(13), SNR15(14).

3.2.3. Nhận dạng các chất phân lập được

3.2.3.1. Nhận dạng các chất phân lập được từ phần trên mặt đất cây Sói nhật

Hợp chất 1 (SN1):

Hợp chất **1** thu được dưới dạng tinh thể hình kim không màu, nhiệt độ nóng chảy: 200-202°C; Phổ UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ (log ϵ): 275 nm (4,3); Phổ IR (cm^{-1}): 3366, 2943, 1764, 1650, 1278, 1113; Phổ ESI-MS (m/z) = 271 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; Phổ ^1H -NMR (CD_3OD , 500 MHz) và ^{13}C -NMR (CD_3OD , 125 MHz);

Phổ IR cho biết trong phân tử có các nhóm chức OH (dải hấp thụ có đỉnh 3366 cm^{-1}), C=O (1764 cm^{-1}), liên kết đôi C=C (1650 cm^{-1}) và liên kết C-O (1278; 1113 cm^{-1}).

Phổ ^1H -NMR cho biết có một proton olefin xuất hiện ở độ chuyển dịch (δ_{H}) là 5,61(ppm), có ba tín hiệu proton của nhóm methyl (CH_3) có δ_{H} lần lượt là 1,89 ppm; 1,26 ppm; và 1,10 ppm.

Phổ ^{13}C -NMR xuất hiện tín hiệu của 15 carbon, trong đó có bốn tín hiệu liên kết đôi C=C hay vòng thơm có δ_{C} từ 121,2 đến 151,4 ppm, bao gồm một nhóm CH và ba carbon bậc 4, chứng tỏ hợp chất **1** có hai liên kết đôi C=C trong phân tử. Tín hiệu của carbon thuộc nhóm C=O carbon tại δ_{C} 173,2 ppm, kết hợp với phổ IR có đỉnh hấp thụ 1764 cm^{-1} giúp khẳng định có vòng lacton trong cấu trúc **1**[65][144].

Phổ khối của **1** có pic khối lượng phân tử $m/z=271$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ cho biết **1** có công thức phân tử $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_3$.

Từ các dữ liệu phổ cho thấy, trong số 15 carbon, có hai nối đôi, một proton olefin, ba nhóm methyl, bốn nhóm methylen, một carbon bậc bốn (sp^3) liên kết với nguyên tử oxy (có δ_{C} 72,2 ppm) nên hợp chất **1** có cấu trúc một eudesm-7(11), 8(9)-dien-12,8-olide sesquiterpen[52]. So sánh với các dữ liệu trong tài liệu.[69], hợp chất **1** được xác định là **4 α -hydroxyeudesm-7(11),8(9)-dien-12,8-olid**, có tên là **shizukolidol**.

Hợp chất 2 (SN2):

Hợp chất **2** thu được dưới dạng tinh thể hình kim không màu, nhiệt độ nóng chảy: 204-207°C; Phổ UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ (log ϵ): 220 nm (3,72); Phổ IR (cm^{-1}): 3374, 2938, 1722, 1686, 1197, 1129; Phổ ESI-MS (m/z) = 289 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; Phổ ^1H -NMR (CD_3OD , 500 MHz) và ^{13}C -NMR (CD_3OD , 125 MHz):

Hợp chất **2** thu được có các phổ IR, phổ ^1H -NMR, và phổ ^{13}C -NMR tương tự như hợp chất **1**, điều này khẳng định rằng **2** cũng là một sesquiterpen lacton có cấu trúc gần giống với **1**. Sự khác nhau giữa **1** và **2** được thể hiện trong các phổ:

Phổ ^1H -NMR của **2** không thấy xuất hiện tín hiệu proton của liên kết đôi (H-9), phù hợp với phổ ^{13}C -NMR và DETP cho biết **2** có năm nhóm CH_2 (nhiều hơn một nhóm CH_2 so với **1**); ngoài ra, trên phổ ^{13}C -NMR của **2** chỉ có hai tín hiệu carbon liên kết đôi (C=C) tại δ_{C} 121,8 và δ_{C} 164,1ppm và vẫn có tín hiệu của vòng lacton. Vì vậy có thể khẳng định **2** có một liên kết C=C trong phân tử ở vị trí C-7 và C-11, thuộc vòng lacton.

Phổ ^{13}C -NMR và DETP của **2** còn có hai tín hiệu carbon sp^3 liên kết với nguyên tử oxy tại δ_{C} lần lượt là 72,9 (C-4) và 105,5 ppm. Kết hợp với phổ MS có pic khối lượng phân tử $m/z = 289$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ cho biết công thức phân tử của **2** là $(\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_4)$, tức là có thêm một nhóm OH được gắn vào vị trí số 8. Kết hợp phân tích dữ liệu phổ ở trên và tham khảo tài liệu [152] nhận danh **2** là **4 α ,8 β -dihydroxyeudesm-7(11)-en-12,8-olid**. Mặc dù đã được tìm thấy trong chi *Chloranthus*[135], [153], nhưng đây là lần đầu tiên hợp chất **2** được phân lập từ loài *C. japonicus*.

Bảng 3.2: Số liệu phổ ^1H (500 MHz) và ^{13}C -NMR (125 MHz) chất số 1-2

Vị trí	1		2	
	δ_{H} (số H; độ bội; $J=\text{Hz}$) ppm	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (số H; độ bội; $J=\text{Hz}$) ppm	δ_{C} (ppm)
1	1,43-1,87 (6H, <i>m</i>)	39,7	1,11 (1H; <i>m</i>) 1,41 (1H; <i>m</i>)	41,9
2		20,5	1,51-1,59 (2H; <i>m</i>)	20,6
3		43,6	1,63-1,69 (1H; <i>m</i>) 1,35-1,38 (1H; <i>m</i>)	43,5
4		72,2		72,9
5	1,82 (1H; <i>dd</i> ; 3,5; 13,5)	54,3	1,28 (1H; <i>dd</i> ; 2,5; 13,5)	55,6
6	3,09 (1H; <i>dd</i> ; 3,5; 17,0; $\text{H}\alpha$) 2,47 (1H; <i>t</i> ; 17,0; $\text{H}\beta$)	20,7	3,02 (1H; <i>dd</i> ; 2,5; 13,0; $\text{H}\alpha$) 2,26 (1H; <i>t</i> ; 13,0; $\text{H}\beta$)	22,5
7		149,4		164,1
8		151,4		105,5
9	5,61 (1H; <i>s</i>)	121,9	2,16 (1H; <i>d</i> ; 13,5; $\text{H}\beta$) 1,35 (1H; <i>m</i> ; $\text{H}\alpha$)	58,2
10		38,1		36,6
11		121,2		121,8
12		173,2		174,7
13	1,89 (3H; <i>d</i> ; 4,0)	8,2	1,82 (3H; <i>s</i>)	8,0
14	1,10 (3H; <i>s</i>)	19,8	1,21 (3H; <i>s</i>)	19,7
15	1,26 (3H; <i>s</i>)	22,4	1,19 (3H; <i>s</i>)	22,5

Hợp chất 3 (SN3):

Hợp chất **3** thu được dưới dạng tinh thể hình kim không màu; Phổ IR (cm^{-1}): 3461, 2947, 1731, 1678, 1105, 1022; Phổ ESI-MS (m/z) = 251 $[\text{M}+\text{H}]^+$; Phổ ^1H -NMR ($\text{C}_\text{D}_3\text{OD}$, 500 MHz) và ^{13}C -NMR ($\text{C}_\text{D}_3\text{OD}$, 125 MHz):

Phổ IR cho biết trong phân tử của **3** có các nhóm chức OH (dải hấp thụ có đỉnh 3461 cm^{-1}), C=O (1731 cm^{-1}), liên kết đôi C=C (1678 cm^{-1}) và liên kết C-O ($1105, 1022\text{ cm}^{-1}$).

Phổ ^1H -NMR cho biết **3** có một proton olefin xuất hiện ở độ chuyển dịch (δ_{H}) là 4,95 ppm, có ba tín hiệu xuất hiện dưới dạng pic đơn của ba nhóm methyl (CH_3) có δ_{H} lần lượt là 1,81 ppm; 1,21 ppm; và 1,12 ppm.

Phổ ^{13}C -NMR và DEPT cho biết có mười lăm tín hiệu carbon, trong đó có hai tín hiệu liên kết đôi C=C có δ_{C} lần lượt là 166,5 và 120,1 ppm. Tín hiệu của carbon thuộc nhóm C=O tại δ_{C} 177,4 ppm, kết hợp với phổ IR có đỉnh hấp thụ 1731 cm^{-1} giúp khẳng định có vòng lacton trong cấu trúc của **3** [135], [144]. Phổ khối có pic khối lượng phân tử $m/z=251$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ cho biết **3** có công thức phân tử $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_3$.

Như vậy, trong phân tử có mười lăm carbon và có vòng lacton nên hợp chất **3** được dự đoán là một sesquiterpen lacton. Các dữ liệu phổ cho thấy trong số mười lăm carbon, có một nối đôi, một proton olefin, ba nhóm methyl, năm nhóm methylen, hai carbon trong đó có một carbon bậc 3 và một carbon bậc 4 (sp^3) liên kết với nguyên tử oxy (có δ_C lần lượt là 80,0 ppm và 72,8 ppm). So sánh với các dữ liệu phổ trong tài liệu [153], hợp chất **3** được xác định là **4 α -hydroxy-5 α ,8 β (H)-eudesm-7(11)-en-8,12-olid**.

Hợp chất 4 (SN4):

Hợp chất **4** thu được dưới dạng bột màu trắng.

Phổ ^{13}C -NMR và phổ DEPT xuất hiện tín hiệu của mười chín nguyên tử carbon trong đó có 2 nguyên tử carbon có độ chuyển dịch nằm trong vùng liên kết đôi $C=C$ ($\delta_C = 125,1$ ppm và 138,5 ppm). Phổ 1H -NMR xuất hiện tín hiệu của một nhóm CH với $\delta_H = 4,4$ (1H; d; 7,5), ba tín hiệu của nhóm methyl với độ chuyển dịch lần lượt là δ_H 1,06 ppm; 1,07 ppm và 1,67 ppm.

Tất cả các dữ kiện phổ ở trên khẳng định **4** là hợp chất megastigman glucosid với phần đường là β -D-glucopyranosid[165]. So sánh dữ liệu phổ thực nghiệm thu được với các tài liệu đã công bố [111], [165], hợp chất **4** được xác định là **linarionosid A**, đây là hợp chất lần đầu tiên phân lập được từ chi *Chloranthus*.

Bảng 3.4: Số liệu phổ 1H (500 MHz) và ^{13}C -NMR (125 MHz) chất số 4

Vị trí C	4^a		Hợp chất linarionosid A ^a[165]	
	δ_H (số H, độ bội, $J=Hz$) ppm	δ_C (ppm)	δ_H (số H, độ bội, $J=Hz$) ppm	δ_C (ppm)
1		38,8		38,8
2	1,52 (1H, <i>m</i>) 1,84 (1H, <i>m</i>)	47,5	1,49 (1H, <i>t</i> , 12,0) 1,83 (1H, <i>ddd</i> , 2,4; 3,6; 12,0)	47,5
3	4,08 (1H, <i>m</i>)	73,3	4,04 (1H, <i>m</i>)	73,3
4	2,03 (1H, <i>m</i>) 2,37 (1H, <i>dd</i> , 5,0; 16,0)	39,8	2,01 (1H, <i>dd</i> , 9,6; 16,2) 2,33 (1H, <i>dd</i> , 4,8; 16,2)	39,8
5		125,1		125,1
6		138,5		138,5
7	1,94 (1H, <i>m</i>) 2,23 (1H, <i>m</i>)	25,5	1,93 (1H, <i>td</i> , 5,4; 12,0) 2,20 (1H, <i>td</i> , 5,4; 12,0)	25,5
8	1,50 (2H, <i>m</i>)	40,7	1,48 (2H, <i>m</i>)	40,7
9	3,70 (1H, <i>m</i>)	69,2	3,69 (1H, <i>t</i> , 6,0)	69,2
10	1,18 (3H, <i>d</i> , 6,5)	23,2	1,16 (3H, <i>d</i> , 6,0)	23,3
11	1,07 (3H, <i>s</i>)	28,8	1,04 (3H, <i>s</i>)	28,8
12	1,08 (3H, <i>s</i>)	30,3	1,05 (3H, <i>s</i>)	30,3
13	1,67 (3H, <i>s</i>)	20,0	1,64 (3H, <i>s</i>)	20,0
1'	4,44 (1H, <i>d</i> , 7,5)	102,3	4,41 (1H, <i>d</i> , 7,8)	102,3
2'	3,16 (1H, <i>m</i>)	75,2	3,15 (1H, <i>t</i> , 7,8)	75,2
3'	3,37 (1H, <i>m</i>)	78,2	3,35 (1H, <i>t</i> , 9,0)	78,1
4'	3,28 (1H, <i>m</i>)	71,7	3,27 (1H, <i>m</i>)	71,7
5'	3,28 (1H, <i>m</i>)	77,9	3,27 (1H, <i>m</i>)	77,9
6'	3,69 (1H, <i>m</i>) 3,85 (1H, <i>dd</i> , 2,0; 12,0)	62,7	3,67 (1H, <i>dd</i> , 5,4; 12,0) 3,85 (1H, <i>dd</i> , 2,4; 12,0)	62,8

3.2.3.2. Nhận dạng các chất phân lập được từ rễ cây Sỏi nhột

Hợp chất 5 (SNR1=SN1)

Hợp chất **5** thu được dưới dạng bột màu trắng. Trên phổ khối lượng MS xuất hiện pic m/z 425 ($[M+H]^+$) tương ứng với hợp chất có công thức phân tử $C_{21}H_{28}O_9$ ($M = 424$).

Trên phổ 1H -NMR nhận thấy tín hiệu cộng hưởng của một olefin proton δ_H 6,30, một anome proton δ_H 4,35, tín hiệu của hai nhóm methyl bậc 3 (δ_H 1,01; 1,88), tín hiệu xuất hiện ở vùng trường cao δ_H 0,77.

Các phân tích phổ ^{13}C -NMR, DEPT cho thấy tín hiệu của 21 nguyên tử carbon bao gồm: tín hiệu của sáu nguyên tử carbon bậc 4, chín nguyên tử carbon bậc 3, bốn nguyên tử carbon bậc 2, hai nhóm methyl. Trong đó 6 nguyên tử carbon đặc trưng cho một đơn vị đường và 15 nguyên tử carbon còn lại thuộc về phần aglycon. Cặp tín hiệu cộng hưởng xuất hiện ở vùng trường cao trên phổ 1D-NMR và tương tác trực tiếp của chúng quan sát được trên HSQC (H_2 -2, δ_H 0,77; 1,04/C-2; 12,58) đặc trưng cho sự có mặt của một vòng cyclopropan. Qua đó cho phép dự đoán hợp chất **5** có cấu trúc của một lindenane sesquiterpen.

Vị trí của liên kết đôi và các nhóm thế cũng được xác định dựa trên phân tích phổ hai chiều HMBC. Tương tác HMBC của H_3 -13 (δ_H 1,88) với C-7 (δ_C 151,68), C-11 (δ_C 123,13), và C-12 (δ_C 172,99) cho phép xác định liên kết đôi thứ nhất giữa C-7 và C-11. Tương tác HMBC của H_2 -15 (δ_H 3,68; 4,02) với C-3 (δ_C 29,74), C-4 (δ_C 79,69), C-5 (δ_C 67,16) đồng thời tương tác HMBC của H_3 -14 (δ_H 1,01) với C-1 (δ_C 27,24), C-5 (δ_C 67,16), C-9 (δ_C 122,93), C-10 (δ_C 40,09) đã cho thấy liên kết đôi C=C còn lại ở C-8/C-9 và nhóm hydroxyl thế tại C-4. Đơn vị đường liên kết với aglycon tại C-15 cũng được khẳng định qua tương tác HMBC giữa anome proton (δ_H 4,35) và C-15 (δ_C 73,15), H_2 -15 (δ_H 3,68; 4,02) và carbon anome (δ_C 104,54). Đồng thời đơn vị đường cũng được xác định là glucose qua độ chuyển dịch hóa học của các tín hiệu carbon của phần đường và so sánh với tài liệu [79]. Cấu trúc tương đối của hợp chất **5** được chỉ ra giống với hợp chất chloranosid A qua sự trùng khớp về độ chuyển dịch hóa học của các tín hiệu cộng hưởng nhận được trên phổ cộng hưởng từ hạt nhân một chiều của **5** và chloranosid A [109]. Như vậy cấu trúc hóa học của chất **5** được xác định là **chloranosid A**, một hợp chất đã phân lập từ rễ loài *Chloranthus glaber* Markino [109].

Bảng 3.5: Số liệu phổ 1H (500 MHz) và ^{13}C -NMR (125 MHz) hợp chất 5

No.	$^{\#}\delta_C$ [109] ppm	δ_C^a ppm	δ_H^a (mult., $J=Hz$) ppm	HMBC (H $\rightarrow$ C) ppm
1	29,7	27,24	1,75 (<i>dt</i> , 3,5; 8,0)	
2	12,6	12,58	0,77 (<i>m</i>) 1,04 (<i>m</i>)	1,3,4,10
3	27,2	29,74	1,55 (<i>m</i>)	
4	79,7	79,69	-	
5	67,2	67,16	2,68 (<i>dd</i> , 3,0; 14,0)	4, 6, 7, 9, 10, 14, 15
6	22,0	22,01	2,54 (<i>dd</i> , 14,0; 17,0) 2,86 (<i>dd</i> , 3,0; 17,0)	
7	150,7	151,68	-	
8	151,7	150,75	-	
9	122,9	122,93	6,30 (1H, <i>s</i>)	1, 5, 7, 8, 10, 14
10	42,1	40,09	-	
11	123,1	123,13	-	
12	173,0	172,99	-	
13	8,4	8,36	1,88 (<i>s</i>)	7, 11, 12
14	22,3	22,31	1,01 (<i>s</i>)	1, 5, 9, 10
15	73,1	73,15	3,68 (<i>d</i> , 11,0) 4,02 (<i>d</i> , 11,0)	1', 3, 4, 5

1'	104,5	104,54	4,35 (<i>d</i> , 8,0)	15
2'	75,3	75,28	3,41 (<i>t</i> , 8,0)	
3'	78,1	77,89	3,33*	
4'	71,7	71,74	3,27 (<i>t</i> , 8,5)	
5'	78,1	78,10	3,33*	
6'	62,8	62,82	3,90 (<i>d</i> , 11,0) 3,67 (<i>dd</i> , 6,0; 11,0)	

Hợp chất 6 (SNR3 = SN3):

Hợp chất **6** phân lập được dưới dạng chất rắn vô định hình màu vàng nhạt. Trên phổ khối lượng MS xuất hiện pic m/z 127 ($[M+H]^+$) tương ứng với hợp chất có công thức phân tử $C_6H_6O_3$ ($M = 126$).

Trên phổ 1H -NMR nhận thấy tín hiệu cộng hưởng đặc trưng cho proton của nhóm aldehyd tại δ_H 9,55 (s). Hai tín hiệu xuất hiện ở vùng hydro thơm δ_H 7,40 và 6,61 dưới dạng doublet và có hằng số tương tác spin-spin $J = 3,5$ Hz cho thấy sự có mặt của một cặp hydro thuộc hệ vòng 5 cạnh. Ngoài ra, trên phổ 1H -NMR của **6** còn nhận thấy tín hiệu của một nhóm hydroxymethyl dưới dạng singlet có độ chuyển dịch hóa học δ_H 4,63.

Phân tích phổ ^{13}C -NMR và DEPT cho thấy tín hiệu của sáu nguyên tử carbon bao gồm tín hiệu của một carbon thuộc nhóm aldehyd δ_C 179,44, hai nguyên tử carbon olefin không liên kết với hydro (δ_C 163,20; 152,02), hai nguyên tử carbon olefin bậc 3 (δ_C 124,74 và 110,88), và một nguyên tử carbon thuộc nhóm hydroxymethyl (δ_C 57,63). Từ các phân tích trên cho phép dự đoán cấu trúc hóa học của **6** là 5-(hydroxymethyl)furaldehyd. Hơn nữa các dữ liệu phổ NMR của **6** hoàn toàn tương đồng với 5-(hydroxymethyl)furaldehyd như thông báo trong tài liệu [118]. Qua đó xác định cấu trúc hóa học của **6** chính là **5-(hydroxymethyl)furaldehyd**.

Hợp chất 7 (SNR5 = SN5):

Hợp chất **7** phân lập được dưới dạng tinh thể hình kim màu trắng. Trên phổ khối lượng MS xuất hiện pic m/z 359 ($[M - H]^-$) tương ứng với hợp chất có công thức phân tử $C_{15}H_{20}O_{10}$ ($M = 360$).

Trên phổ 1H -NMR của **7** nhận thấy tín hiệu cộng hưởng của hydro thơm tại δ_H 7,22, tín hiệu đặc trưng cho nhóm methoxi δ_H 3,40, tín hiệu của anome proton δ_H 5,11 và các proton carbinol ở vùng δ_H 3,13 - 3,58 cho thấy sự có mặt của một đơn vị đường.

Các phân tích trên phổ ^{13}C -NMR, DEPT và phổ hai chiều HSQC nhận thấy tín hiệu của 15 nguyên tử carbon trong phân tử **7**. Trong đó, một tín hiệu của carbon carbonyl δ_C 167,07, hai carbon methoxi, sáu carbon thuộc đơn vị đường và sáu carbon thơm còn lại thuộc khung aglycon. Sự xuất hiện của các cặp tín hiệu cộng hưởng có độ chuyển dịch hóa học, và ảnh hưởng từ trường giống nhau quan sát được trên phổ 1H và ^{13}C -NMR của **7** cho phép dự đoán phần aglycon của hợp chất này có cấu trúc đối xứng. Tín hiệu singlet của hai proton thơm có độ chuyển dịch hóa học giống nhau cho thấy aglycon có cấu trúc của một nhân benzen bị thế dạng 1, 3, 4, 5. Tiếp đó, vị trí các nhóm thế được xác định dựa trên tương tác trên phổ hai chiều HMBC. Tương tác HMBC giữa H-2, H-6 (δ_H 7,22) với C-7 (δ_C 167,07) cho phép xác định nhóm carboxyl thế tại vị trí C-1. Dạng cấu trúc đối xứng của aglycon cho phép dự đoán nhóm methoxi thế tại vị trí C-3, C-5. Điều này phù hợp với tương tác HMBC quan sát thấy giữa proton của nhóm methoxi (δ_H 3,40) với C-3, C-5 (δ_C 152,24). Đơn vị đường thế tại vị trí C-4 được xác định nhờ tương tác HMBC giữa anome proton (δ_H 5,11) với C-4 (δ_C 138,09). Như vậy cấu trúc hóa học của **7** được xác định là **4-O- β -D-glucopyranosyl-3,5-dimethoxy-4-hydroxybenzoic acid** hay **acid glucosyringic** [41]

Bảng 3.6: Số liệu phổ ^1H (500 MHz) và ^{13}C -NMR (125 MHz) chất số 7

No.	$^{\#}\delta_{\text{C}}$ [41] (Pyr- d_5) ppm	$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$ ppm	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (mult., $J=\text{Hz}$) ppm	HMBC (H $\rightarrow$ C) ppm
1	123,82	126,18	-	
2	108,57	107,35	7,22 (s)	1, 3, 4, 5, 7
3	153,36	152,24	-	
4	139,63	138,09	-	
5	153,36	152,24	-	
6	108,57	107,35	7,22 (s)	
7	168,72	167,07	-	
3,5-OMe	56,49	56,38	3,80 (s)	3, 5
1'	104,18	102,01	5,11 (d, 7.0)	4
2'	76,07	74,20	3,22	
3'	78,51	76,63	3,22	
4'	71,59	69,91	3,13 (m)	
5'	79,02	77,37	3,05 (m)	
6'	62,57	60,82	3,39 (dd, 6,0; 11,5) 3,58 (brd, 11,5)	

Hợp chất 8 (SNR7 = SN7):

Hợp chất **8** phân lập được dưới dạng dầu, trong suốt.

Trên phổ cộng hưởng từ hạt nhân proton của **8** nhận thấy các tín hiệu cộng hưởng đặc trưng cho sự có mặt của một hệ tương tác spin ABX [δ_{H} 7,08 (d, 8,0), 7,00 (d, 1,5); 6,89 (dd, 1,5; 8,0)], tín hiệu của một nhóm hydroxymethyl δ_{H} 4,58 và các tín hiệu đặc trưng cho một đơn vị đường.

Phân tích phổ ^{13}C -NMR và DEPT nhận thấy sự có mặt của 14 nguyên tử carbon trong phân tử **8**. Trong đó sáu nguyên tử carbon thuộc về đơn vị đường, một tín hiệu của một nhóm methoxi, một tín hiệu của một nhóm hydroxymethyl và sáu tín hiệu carbon thơm. Qua đó cho thấy hợp chất **8** có cấu trúc dạng dẫn xuất phenylglycosid. Sự xuất hiện của hệ tương tác spin ABX trên phổ ^1H -NMR cho thấy **8** có cấu trúc của một nhân phenyl thể dạng 1,3,4. Tiếp đó, vị trí các nhóm thế được xác định dựa trên phân tích phổ hai chiều HMBC. Hydroxy thuộc nhóm hydroxymethyl có tương tác với C-1 (δ_{C} 136,99), C-2 (δ_{C} 111,53), C-6 (δ_{C} 120,02) cho phép xác định nhóm hydroxymethyl thế tại vị trí C-1. Tương tác HMBC giữa H-2 (δ_{H} 7,00), H-6 (δ_{H} 6,89) với C-4 (δ_{C} 145,73) cùng với tương tác HMBC của anome proton δ_{H} 4,84 với C-4 (δ_{C} 145,73) cho phép xác định đơn vị đường thế tại vị trí C-4. Qua đó chỉ ra rằng nhóm methoxi thế tại vị trí C-3. Điều này hoàn toàn phù hợp với tương tác HMBC quan sát thấy giữa proton của nhóm methoxi (δ_{H} 3,90) và C-3 (δ_{C} 149,51). Đơn vị đường được xác định là β -glucopyranose nhờ giá trị độ lớn của hằng số tương tác spin của anome proton $J = 7,5$ Hz, và độ chuyển dịch hóa học của các nguyên tử carbon trên phổ ^{13}C -NMR. Như vậy, cấu trúc hóa học của hợp chất **8** được xác định là **4-O- β -D-glucopyranosyl-3-methoxibenzyl** hay **vanillosid** một hợp chất đã được công bố phân lập từ loài *Phellodendron amurense* [173]

Bảng 3.7: Số liệu phổ ^1H (500 MHz) và ^{13}C -NMR (125 MHz) chất số 8

No.	$^*\delta_{\text{C}}$ [173]	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,c}}$ (mult., J in Hz)	HMBC (H $\rightarrow$ C)
1	137,5	136,99	-	
2	112,5	111,53	7,00 (d, 1,5)	3,4,6,7
3	150,4	149,51	-	

4	146,8	145,73	-	
5	117,9	117,23	7,08 (d, 8,0)	1,3,4
6	120,4	120,02	6,89 (dd, 1,5; 8,0)	2,4,5,7
7	64,9	64,35	4,58 (s)	1, 2, 6
1'	102,9	102,21	4,84 (d, 7,5)	4
2'	78,0	73,60	3,58 (t, 7,5)	
3'	77,7	76,34	3,53 (t, 7,5)	
4'	74,8	70,21	3,50 (t, 7,5)	
5'	71,3	76,71	3,42 (m)	
6'	62,5	61,82	3,77 (dd, 5,0; 12,5) 3,88 (dd, 3,0; 12,5)	
3-OMe	56,7	56,24	3,90 (s)	3

Hợp chất 9 (SNR8 = SN8):

Hợp chất **9** phân lập được dưới dạng bột màu trắng.

Trên phổ khối lượng MS xuất hiện pic m/z 427 ($[M+H]^+$) tương ứng với hợp chất có công thức phân tử $C_{21}H_{30}O_9$ ($M = 426$).

Trên phổ 1H -NMR nhận thấy tín hiệu cộng hưởng của một anome proton δ_H 4,33, tín hiệu của hai nhóm methyl bậc 3 (δ_H 1,04; 1,82), tín hiệu của một proton xuất hiện ở vùng trường cao δ_H 0,71.

Các phân tích phổ ^{13}C -NMR, DEPT cho thấy tín hiệu của 21 nguyên tử carbon bao gồm: tín hiệu của năm nguyên tử carbon bậc 4, chín nguyên tử carbon bậc 3, năm nguyên tử carbon bậc 2, hai nhóm methyl. Trong đó 6 nguyên tử carbon đặc trưng cho một đơn vị đường và 15 nguyên tử carbon còn lại thuộc về phần aglycon. Cặp tín hiệu cộng hưởng xuất hiện ở vùng trường cao trên phổ 1D-NMR và tương tác trực tiếp của chúng quan sát được trên HSQC (H_2 -2, δ_H 0,71; 1,02/C-2; 11,70) đặc trưng cho sự có mặt của một vòng cyclopropan. Qua đó cho phép dự đoán **9** có cấu trúc của một lindenane sesquiterpen.

Vị trí của liên kết đôi và các nhóm thế cũng được xác định dựa vào phân tích phổ 2 chiều HMBC. Tương tác HMBC của H_3 -13 (δ_H 1,82) và C-7 (δ_C 165,97), C-11 (δ_C 121,24), C-12 (δ_C 177,13) cho phép xác định liên kết đôi tại C-7/C-11 và nhóm carbonyl tại C-12. Proton H_2 -15 (δ_H 3,66; 3,96) tương tác với C-3 (δ_C 30,49), C-4 (δ_C 79,48), C-5 (δ_C 69,37), C-1' (δ_C 104,47) đã chỉ ra rằng nhóm hydroxyl thế tại vị trí C-4 và đơn vị đường thế tại C-15. Điều này cũng phù hợp với tương tác HMBC quan sát thấy giữa proton anome δ_H 4,33 và C-15 (δ_C 73,09). Đơn vị đường cũng được xác định là β -glucopyranose dựa trên độ lớn của hằng số tương tác spin của proton anome và độ chuyển dịch hóa học của các nguyên tử carbon thuộc đơn vị đường quan sát được trên phổ ^{13}C -NMR. Cuối cùng, cấu hình tương đối của **9** được xác định giống với hợp chất sarcaglabosid G dựa trên sự trùng khớp về các dữ kiện phổ một chiều của **9** và sarcaglabosid G [153]. Như vậy cấu trúc hóa học của **9** đã được xác định là **sarcaglabosid G**, một hợp chất đã phân lập được từ loài *Sarcandra glabra* [154].

Bảng 3.8: Số liệu phổ 1H (500 MHz) và ^{13}C -NMR (125 MHz) hợp chất 9

No.	δ_C [154] ppm	δ_C^a ppm	δ_H^a (mult., $J=Hz$) ppm	HMBC (H $\rightarrow$ C) ppm
1	28,3	27,78	1,45*	
2	12,2	11,70	1,02 (<i>m</i>) 0,71 (<i>m</i>)	1, 3, 4, 10
3	31,0	30,49	1,53 (<i>m</i>)	
4	80,0	79,48	-	

5	69,9	69,37	2,12 (<i>dd</i> , 2,5; 14,0)	4, 6, 7, 9, 10, 14, 15
6	26,0	24,49	2,33 (<i>t</i> , 14,0) 2,87 (<i>dd</i> , 2,5; 14,0)	5, 7, 8, 10, 11
7	166,5	165,97	-	
8	82,0	81,47	5,12 (<i>br t</i> , 8,5)	7, 9
9	49,0	48,49	1,45* 2,53 (<i>dd</i> , 7,0; 11,0)	5, 7, 8, 10, 14
10	40,8	40,26	-	
11	121,7	121,24	-	
12	177,6	177,13	-	
13	8,7	8,17	1,82 (<i>s</i>)	7, 11, 12
14	19,0	18,54	1,04 (<i>s</i>)	1, 5, 9, 10
15	73,6	73,09	3,66 (<i>d</i> , 11,0) 3,96 (<i>d</i> , 11,0)	3, 4, 5, 1'
1'	105,0	104,47	4,33 (<i>d</i> , 8,0)	15
2'	75,8	75,26	3,25 (<i>dd</i> , 8,0; 8,5)	
3'	78,6	77,90	3,40 (<i>t</i> , 8,5)	
4'	72,2	71,75	3,31*	
5'	78,4	78,08	3,31*	
6'	63,3	62,82	3,68 (<i>dd</i> , 5,0; 11,0) 3,91 (<i>dd</i> , 2,0, 11,0)	

Hợp chất 10 (SNR9 = SN9):

Hợp chất **10** phân lập được dưới dạng bột màu trắng. Trên phổ khối lượng MS xuất hiện pic m/z 417 ($[M+H\text{-glucose}]^+$) tương ứng với hợp chất có công thức phân tử $C_{27}H_{30}O_{14}$ ($M = 578$).

Phổ $^1H\text{-NMR}$ của **10** nhận thấy sự xuất hiện của các tín hiệu proton thơm δ_H 7,96; 6,92; 6,81; 6,34, tín hiệu của ba nhóm methoxy δ_H 3,79; 3,77, tín hiệu của proton anome δ_H 4,99 cùng với tín hiệu của các proton carbinol, hydroxymethylen δ_H 3,15-5,03.

Các phân tích trên phổ $^{13}C\text{-NMR}$ và DEPT nhận thấy tín hiệu của 27 nguyên tử carbon bao gồm 10 nguyên tử carbon không liên kết với hydro, 12 nguyên tử carbon CH, hai nguyên tử CH_2 và ba nguyên tử CH_3 . Trong đó ba tín hiệu thuộc về 3 nhóm methoxi, sáu tín hiệu thuộc về 1 đơn vị đường, 18 tín hiệu còn lại thuộc về phần aglycon. Qua đó cho phép dự đoán **10** là hợp chất dạng phenolic.

Ngoài ra, sự xuất hiện của các cặp tín hiệu cộng hưởng có ảnh hưởng của từ trường giống nhau quan sát được trên $1D\text{-NMR}$ (tín hiệu cộng hưởng của 3,5-MeO, H-2/H-6, C-2/C-6, C-3/C-5) cho thấy sự xuất hiện của 1 nhân benzen thể có cấu trúc đối xứng. Các tín hiệu δ_H 7,96 (*d*, $J = 9,5$ Hz), 6,34 (*d*, $J = 9,5$ Hz) và tương tác HMBC của chúng với carbon carbonyl δ_C 160,03 cho phép dự đoán sự có mặt của một dạng khung coumarin trong phân tử **10**.

Kết hợp so sánh các dữ kiện phổ $1D\text{-NMR}$ của **10** với hợp chất cleomiscosin C 4-O- β -D-glucopyranosid nhận thấy các dữ kiện phổ $1D\text{-NMR}$ của **10** hoàn toàn trùng khớp với hợp chất cleomiscosin C-4-O- β -D-glucopyranosid đã được công bố [86]. Như vậy, cấu trúc hóa học của **10** được xác định là **cleomiscosin C-4-O- β -D-glucopyranosid** hay **yinxiancaosid C**.

Hợp chất 11 (SNR12 = SN12):

Hợp chất **11** được phân lập dưới dạng chất lỏng không màu. Phổ khối lượng ESI-MS cho pic ion phân tử m/z 409 ($[M - H]^-$) tương ứng với hợp chất có công thức phân tử $C_{21}H_{30}O_8$ ($M = 410$).

Trên phổ 1H -NMR của **11** xuất hiện 5 tín hiệu của proton olefin tại δ_H 5,86 (1H, dd, $J = 18,0$; 10,5 Hz, H-1), 5,03 (1H, d, $J = 10,5$ Hz, H-2a), 5,01 (1H, brs, H-2b), 5,42 (1H, brs, H-3a) và 5,07 (1H, brs, H-3b). Bên cạnh đó cũng xuất hiện tín hiệu đặc trưng cho proton anome của phân tử đường tại δ_H 4,28 (1H, d, $J = 7,5$ Hz); các proton vùng đường trong khoảng δ_H từ 3,21 đến 3,89.

Phổ ^{13}C -NMR cho thấy tổng cộng 21 tín hiệu carbon trong đó có 5 tín hiệu carbon bậc 4 (C), 8 tín hiệu carbon methin (CH), 6 tín hiệu carbon methylene (CH_2) và 2 nhóm methyl (CH_3); trong đó có 2 tín hiệu carbon methylene đầu mạch ở độ dịch chuyển 112,62 (C-2) và 115,40 (C-3). Tín hiệu carbon anome của phân tử đường ở δ_C 104,23 (C-1'), và các tín hiệu carbon oximethin và carbon oximethin quan sát thấy tại 78,14 (C-3'), 77,94 (C-5'), 75,15 (C-2'), 71,65 (C-4') và 62,76 (C-6') cho phép khẳng định sự có mặt của 1 phân tử đường β -D-glucopyranosid. Ngoài ra còn xuất hiện nhóm tín hiệu δ_C 8,09 (C-13), 78,14 (C-8), 120,56 (C-11), 165,21 (C-7) và 177,26 (C-12) xác nhận sự có mặt của phần khung 3-methyl-5H-furan-2-on. Tiếp đó, vị trí các liên kết đôi và nhóm thế được ghép nối bằng phổ hai chiều HMBC. Trên phổ HMBC ta thấy các tương tác giữa tín hiệu proton H-1 (5,86) với carbon C-10 (41,97); giữa proton H-5 với các tín hiệu carbon C-4 (147,24), C-10 (41,97); proton H-9 với các tín hiệu carbon C-10 (41,97) và C-8 (79,74). Đặc biệt là xuất hiện tương tác đậm giữa proton anome H-1' (4,28) và C-15 (7,69) khẳng định đơn vị đường gắn trực tiếp với C-15 tại vị trí C-1'. Đồng thời đơn vị đường cũng được xác định là glucose qua độ dịch chuyển hóa học của các tín hiệu carbon của phần đường và so sánh với tài liệu [174]. Cuối cùng, so sánh độ dịch chuyển hóa học proton và carbon của **11** với chất số 3 trong TLTK [174] thấy hoàn toàn trùng khớp, do đó hợp chất **11** được nhận dạng là **sarcaglabosid C**, tên đầy đủ là **5 α ,8 β H-eleman-1,3,7(11)-trien-8 α ,12-olid-15-O- β -D-glucopyranosid**.

Hợp chất 12 (SNR13 = SN13):

Hợp chất **12** thu được dưới dạng chất rắn màu trắng. Phổ khối lượng ESI-MS của **12** cho pic ion giả phân tử m/z 402,7 ($[M+H_2O]^+$) cho phép dự đoán **12** có công thức phân tử là $C_{17}H_{20}O_{10}$.

Phổ 1H -NMR của **12** cho tín hiệu của 3 proton vòng thơm tại δ_H 6,41 (H-3, d, $J = 9,5$ Hz), 7,96 (H-4, d, $J = 9,5$) và 7,12 (s, H-5) gợi ý về một cấu trúc C6 - C3 dạng coumarin thế 3 vị trí. Tín hiệu của proton anome δ_H 5,16 (H-1', d, $J = 7,5$ Hz) và các proton vùng đường từ δ_H 3,07 - 3,61 cho thấy tồn tại một gốc đường β -D-glucopyranosyl. Ngoài ra còn cho thấy tín hiệu của hai nhóm methoxi ở δ_H 3,81 (H-11, s) và 3,90 (H-12, s).

Trên phổ ^{13}C -NMR và DEPT cho 7 tín hiệu của các carbon thơm xuất hiện trong khoảng từ 105,48 đến 149,37 ppm : 105,48 (C-5), 114,45 (C-10), 114,66 (C-3), 140,19 (C-8), 141,65 (C-7), 142,34 (C-9) và 144,32 (C-4). Bên cạnh đó còn thấy sự có mặt của một nhóm carbonyl ở δ_C 159,73 (C-2), một carbon anome ở δ_C 102,12 và tín hiệu của hai nhóm methoxi (δ_C 56,54 (C-11), δ_C 61,22 (C-12)). Ngoài ra còn thấy rõ tín hiệu của nhóm carbon vùng đường (δ_C 60,75-74,07).

Các dữ kiện phổ cộng hưởng từ hạt nhân 1H -NMR và ^{13}C -NMR ở trên cho phép dự đoán về một cấu trúc coumarin thế 3 vị trí (ở vòng C6), trong đó có 2 nhóm methoxi và một gốc đường β -D-glucopyranosyl. So sánh với số liệu của chất số 6, TLTK [119] ta thấy cấu trúc dự đoán về **12** chính là một phần của chất số 6: phần khung b và đường glucose: Chất số **12** được nhận dạng là **7-O- β -D-glucopyranosyl-6,8-dimethoxycoumarin**, hay còn gọi là **calycanthoside**.

Bảng 3.11: Số liệu phổ ^1H (500 MHz) và ^{13}C -NMR (125 MHz) hợp chất 12

No.	δ_{C} [119] ppm	DEPT	$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$ ppm	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (mult., $J = \text{Hz}$) ppm
1	-		-	-
2	159,7	C	159,73	
3	114,7	CH	114,66	6,41 (<i>d</i> , 9,5)
4	144,2	CH	144,32	7,96 (<i>d</i> , 9,5)
5	105,4	CH	105,48	7,12 (<i>s</i>)
6	149,4	C	149,37	-
7	141,6	C	141,65	-
8	140,3	C	140,19	-
9	142,3	C	142,34	-
10	114,7	C	114,45	-
11	56,4	CH ₃	56,54	3,81 (<i>s</i>)
12	61,3	CH ₃	61,22	3,90 (<i>s</i>)
1'	102,3	CH	102,12	5,16 (<i>d</i> , 7,5)
2'	73,9	CH	74,07	
3'	76,5	CH	76,44	
4'	70,0	CH	69,84	3,07 – 3,61
5'	75,9	CH	76,43	
6'	67,4	CH ₂	60,75	

Hợp chất 13 (SNR14 = SN14):

Hợp chất **13** được phân lập dưới dạng sáp màu trắng. Phổ khối lượng ESI-MS cho pic ion giả phân tử m/z 297,5 ($[\text{M}+\text{Cl}]^+$) cho phép dự đoán **13** có công thức phân tử $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{O}_4$.

Trên phổ ^1H -NMR nhận thấy tín hiệu cộng hưởng của một olefin proton δ_{H} 6,40 (1H, *s*), tín hiệu của một nhóm methyl δ_{H} 0,92 (3H, *s*), tín hiệu xuất hiện ở vùng trường cao δ_{H} 0,88 (ddd), 0,84 (ddd). Cặp tín hiệu cộng hưởng xuất hiện ở vùng trường cao này đặc trưng cho sự có mặt của một vòng cyclopropan.

Các phân tích phổ ^{13}C -NMR, DEPT cho thấy tín hiệu của 15 nguyên tử carbon bao gồm: tín hiệu của 5 nguyên tử carbon bậc 4, 5 nguyên tử carbon bậc 3, 4 nguyên tử carbon bậc 2, một nhóm methyl. Qua đó cho phép dự đoán chất **13** có cấu trúc của một lindenane sesquiterpen.

Ngoài ra, từ phổ DEPT xác định được 2 nhóm oxymethilen ở δ_{C} 55,08 (C-13) và 64,77 (C-15). Cuối cùng, cấu trúc tương đối của **13** giống với hợp chất shizukanolide F qua sự trùng khớp về độ chuyển dịch hóa học của các tín hiệu cộng hưởng nhận được trên phổ cộng hưởng từ hạt nhân một chiều của **13** và shizukanolid F [48]. Do đó cấu trúc hóa học của hợp chất **13** được xác định là **shizukanolid F**, một hợp chất đã được phân lập từ rễ loài *Chloranthus serratus* (Thunb.) Roem. et Schult. [73].

Hợp chất 14 (SNR15 = SN15):

Hợp chất **14** thu được dưới dạng chất rắn màu trắng. So sánh dữ kiện phổ của **14** và chất số **12** cho thấy có sự tương đồng về cấu trúc. Phổ khối lượng ESI-MS của **14** cho pic ion giả phân tử m/z 223,2 ($[\text{M}+\text{H}]^+$) cho phép dự đoán **14** có công thức phân tử là $\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{O}_5$.

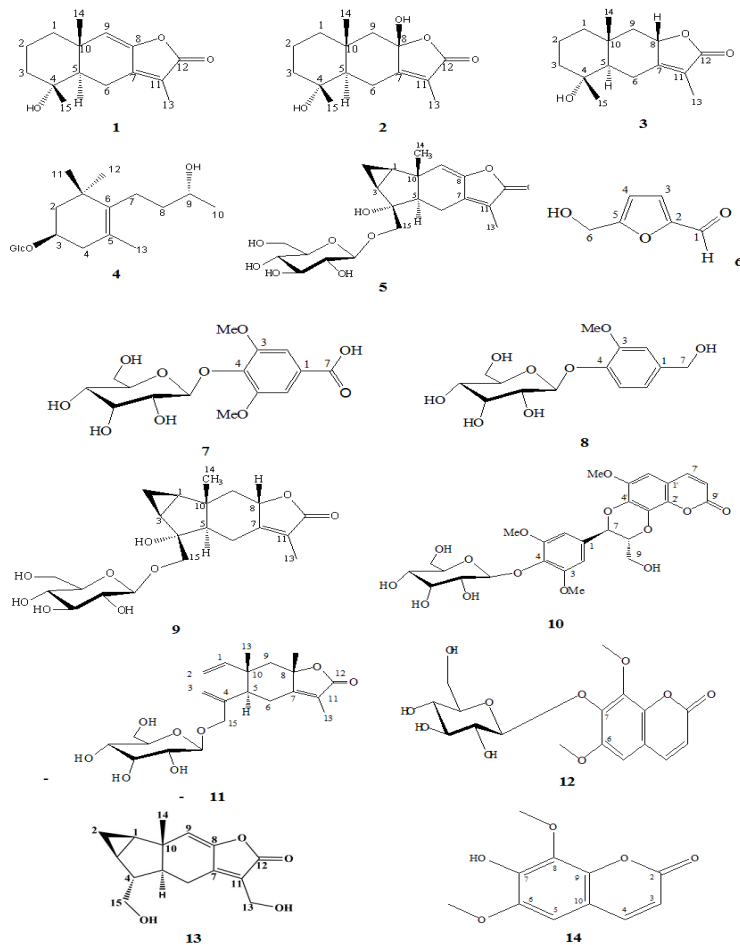
Phổ ^1H -NMR của **14** cho tín hiệu của 3 proton vòng thơm tại δ_{H} 6,31 (H-3, *d*, $J = 9,0$ Hz), 7,16 (H-4, *d*, $J = 9,5$ Hz) và 6,86 (*s*, H-5) gợi ý về một cấu trúc C6-C3 dạng coumarin thế 3 vị trí. Ngoài ra còn cho thấy tín hiệu của hai nhóm methoxy ở δ_{H} 3,78 (H-11, *s*) và 3,98 (H-12, *s*).

Trên phổ ^{13}C -NMR và DEPT cho tín hiệu của các carbon thơm xuất hiện trong khoảng từ 104,60 ppm đến 144,59 ppm : 104,60 (C-5), 110,69 (C-10), 112,43 (C-3), 135,39 (C-8), 144,32 (C-7), 144,59 (C-9)

và 144,59 (C-4). Bên cạnh đó còn thấy sự có mặt của một nhóm carbonyl ở δ_C 161,08 (C-2) và tín hiệu của hai nhóm methoxi (δ_C 56,28 (C-11), δ_C 60,86 (C-12)).

Các dữ kiện phổ cộng hưởng từ hạt nhân $^1\text{H-NMR}$ và $^{13}\text{C-NMR}$ ở trên cho phép dự đoán về một cấu trúc coumarin thế 3 vị trí (ở vòng C6), trong đó có 2 nhóm methoxi. So sánh số liệu phổ của chất số **14** với số liệu phổ công bố ở TLTK [65] thấy hoàn toàn tương đồng, do đó **14** được nhận dạng là **7-hydroxy-6,8-dimethoxycoumarin** hay còn gọi là **isofraxidin**.

Cấu trúc hóa học 14 hợp chất đã phân lập được từ cây Sói nhật:



3.3. ĐỘC TÍNH VÀ TÁC DỤNG SINH HỌC CỦA CÂY SÓI NHẬT

3.3.1. Độc tính cấp

3.3.1.1. Phần trên mặt đất cây Sói nhật

Chưa xác định được LD_{50} trên chuột nhắt trắng trên đường uống bằng phương pháp Litchfield – Wilcoxon. Theo WHO phần trên mặt đất của cây Sói nhật là dược liệu an toàn.

3.3.1.2. Phần rễ cây Sói nhật

LD_{50} của cao chiết rễ cây Sói nhật trên chuột nhắt trắng theo đường uống là:

$$\text{LD}_{50} = 202,18 (219,86 - 166,82) \text{ g/kg ttc}$$

3.3.2. Tác dụng chống viêm

3.3.2.1. Tác dụng chống viêm cấp

(1) Thử trên mô hình gây phù bần chân chuột bằng carrageenin

**Bảng 3.15 : Tác dụng chống viêm của cao SN (phần TMD) trên mô hình
gây phù chân chuột bằng carrageenin (n=10)**

Lô thí nghiệm	Sau 2 giờ (V ₁)		Sau 4 giờ (V ₂)		Sau 6 giờ (V ₃)		Sau 24 giờ (V ₄)	
	Độ phù (%)	% giảm phù so chứng	Độ phù (%)	% giảm phù so chứng	Độ phù (%)	% giảm phù so chứng	Độ phù (%)	% giảm phù so chứng
Lô 1: Đối chứng	37,3± 1,9		46,4±10,8		36,2± 6,7		17,7 ± 1,5	
Lô 2: Aspirin (200 mg/kg)	11,9± 3,9 p <0,001	68,2	16,9 ± 4,3 p <0,001	63,4	21,1 ± 3,7 p <0,001	41,55	10,1 ± 3,7 p <0,05	42,8
Lô 3: CaoSN 2,8 g dl/kg	28,6± 8,4 p > 0,05	23,3	45,6 ± 7,1 p > 0,05	1,7	35,1 ± 4,6 p > 0,05	2,98	17,1 ± 6,1 p > 0,05	3,7
Lô 4: Cao SN 8,4 g dl/kg	24,2± 9,2 p <0,05	35,2	41,9± 12,3 p > 0,05	9,7	28,1 ± 10,4 p > 0,05	22,35	16,9 ± 6,8 p > 0,05	4,4

**Bảng 3.16 : Tác dụng chống viêm của cao SN (phần rễ) trên mô hình
gây phù chân chuột bằng carrageenin (n=10)**

Lô thí nghiệm	Sau 2 giờ (V ₁)		Sau 4 giờ (V ₂)		Sau 6 giờ (V ₃)		Sau 24 giờ (V ₄)	
	Độ phù (%)	% giảm phù so chứng	Độ phù (%)	% giảm phù so chứng	Độ phù (%)	% giảm phù so chứng	Độ phù (%)	% giảm phù so chứng
Lô 1 Đối chứng	27,2 ± 2,3		49,9 ± 5,5		45,2 ± 5,2		24,8 ± 1,8	
Lô 2: Aspirin (200 mg/kg)	12,4 ± 1,6 p <0,001	54,5	21,6 ± 2,7 p <0,001	56,7	18,2 ± 4,2 p <0,001	59,8	15,1 ± 1,4 p <0,001	38,8
Lô 3: CaoSN 2,8 g dl/kg	23,1 ± 2,7 p > 0,05	15,2	47,3± 3,6 p > 0,05	5,1	42,6±3,4 p > 0,05	5,7	23,9± 2,1 p > 0,05	3,4
Lô 4 : CaoSN 8,4 g dl/kg	22,5 ± 3,6 p > 0,05	17,2	45,7 ± 4,4 p > 0,05	8,4	43,7 ± 3,7 p > 0,05	3,3	22,0 ± 3,6 p > 0,05	11,1

Cao SN (phần TMD) ở cả hai liều có xu hướng làm giảm phù chân chuột, nhưng không có ý nghĩa thống kê (p>0,05). Liều 8,4 g dl/kg có tác dụng làm giảm phù chân chuột ở thời điểm sau gây viêm 2h (p<0,05) nhưng không mạnh bằng aspirin 200 mg/kg. Cao SN (phần rễ): ở cả hai liều đều không thể hiện tác dụng chống viêm cấp.

(2) Tác dụng chống viêm cấp trên mô hình gây tràn dịch màng bụng

Bảng 3.17 : Ảnh hưởng của cao SN đến thể tích dịch rỉ viêm (phần TMD)

Lô	n	Thể tích dịch rỉ viêm (ml/100g)	p so lô1	p so lô2
Lô 1: Chứng sinh học	10	1,6 ± 0,6		
Lô 2: Aspirin (200 mg/kg)	10	0,7 ± 0,17	< 0,01	
Lô 3: Cao SN liều 2,8g dl /kg	10	1,6 ± 0,8	> 0,05	< 0,05
Lô 4 : Cao SN liều 8,4g dl/kg	10	2,0 ± 0,7	>0,05	< 0,001

Bảng 3.18: Ảnh hưởng của cao SN đến thể tích dịch rỉ viêm (phần rể)

Lô	n	Thể tích dịch rỉ viêm (ml/100g)	p so lô 1	p so lô 2
Lô 1: Chứng sinh học	10	2,2 ± 0,1		
Lô 2: Aspirin (200 mg/kg)	9	1,8 ± 0,2	< 0,05	
Lô 3: Cao SN liều 2,8g dl /kg	10	2,3 ± 0,2	> 0,05	> 0,05
Lô 4 : Cao SN liều 8,4g dl/kg	10	2,3 ± 0,2	> 0,05	< 0,05

Kết quả cho thấy aspirin liều 200 mg/kg làm giảm rõ rệt thể tích dịch rỉ viêm so với lô chứng ($p < 0,01$), cao Sói nhậ cả phần trên mặt đất và phần rể ở cả hai liều đều không làm giảm thể tích dịch rỉ viêm ($p > 0,05$).

Bảng 3.19: Ảnh hưởng của cao SN đến số lượng bạch cầu trong dịch rỉ viêm (phần TMD)

Lô	n	Số lượng bạch cầu (g/l)	p so lô 1	p so lô 2
Lô 1: Chứng sinh học	10	20,5 ± 7,8		
Lô 2: Aspirin (200 mg/kg)	10	18,3 ± 3,5	> 0,05	
Lô 3: Cao SN liều 2,8g dl /kg	10	22,3 ± 6,0	> 0,05	> 0,05
Lô 4 : Cao SN liều 8,4g dl/kg	10	13,4 ± 5,2	< 0,05	< 0,05

Bảng 3.20: Ảnh hưởng của cao SN đến số lượng bạch cầu trong dịch rỉ viêm (phần rể)

Lô	n	Số lượng bạch cầu (g/l)	p so lô 1	p so lô 2
Lô 1: Chứng sinh học	10	13,1 ± 0,9		
Lô 2: Aspirin (200 mg/kg)	9	11,5 ± 0,4	> 0,05	
Lô 3: Cao SN liều 2,8g dl /kg	10	12,2 ± 0,6	> 0,05	> 0,05
Lô 4 : Cao SN liều 8,4g dl/kg	10	12,4 ± 0,5	> 0,05	> 0,05

Cao Sói nhậ ở cả hai liều và aspirin liều 200 mg/kg đều không làm giảm số lượng bạch cầu trong dịch rỉ viêm so với lô chứng ($p > 0,05$). Tuy nhiên, cao Sói nhậ (phần TMD) ở liều cao 8,4 g dl/kg có tác dụng làm giảm số lượng bạch cầu trong dịch rỉ viêm so với lô chứng ($p < 0,05$).

Bảng 3.21: Ảnh hưởng của cao SN đến hàm lượng protein trong dịch rỉ viêm (phần TMD)

Lô	n	Hàm lượng protein (g/l)	p so lô 1	p so lô 2
Lô 1: Chứng sinh học	10	3,1 ± 0,4		
Lô 2: Aspirin (200 mg/kg)	10	2,8 ± 0,3	> 0,05	
Lô 3: Cao SN (2,8g dl /kg)	10	2,9 ± 0,3	> 0,05	> 0,05
Lô 4 : Cao SN (8,4g dl/kg)	10	3,1 ± 0,3	> 0,05	> 0,05

Bảng 3.22: Ảnh hưởng của cao Sói nhậ đến hàm lượng protein trong dịch rỉ viêm (phần rể)

Lô	n	Hàm lượng protein (g/l)	p so lô 1	p so lô 2
Lô 1: Chứng sinh học	10	4,4 ± 0,1		
Lô 2: Aspirin (200 mg/kg)	9	3,9 ± 0,1	< 0,05	
Lô 3: Cao SN (2,8g dl /kg)	10	4,2 ± 0,1	> 0,05	> 0,05
Lô 4 : Cao SN (8,4g dl/kg)	10	4,1 ± 0,1	> 0,05	> 0,05

Kết quả cho thấy cao Sói nhậ cả phần trên mặt đất và phần rể ở cả hai liều đều không làm giảm hàm lượng protein trong dịch rỉ viêm ($p > 0,05$).

3.3.2.2. Tác dụng chống viêm mạn

Bảng 3.23: Tác dụng của cao SN lên trọng lượng u hạt (phần TMD)

Lô	Trọng lượng u (mg)	% giảm so với chứng	p so lô1	p so lô2
Lô 1: Chứng sinh học	62,2 ± 17,2			
Lô 2: Methylprednisolon 20mg/kg	27,5 ± 10,8	55,7	<0,001	
Lô 3: Cao SN liều 4g dl/kg	46,5 ± 16,6	25,3	<0,05	<0,01
Lô 4: Cao SN 12g dl/kg	38,9 ± 14,4	37,5	<0,01	<0,05

Bảng 3.24: Tác dụng của cao SN lên trọng lượng u hạt (phần rễ)

Lô	Trọng lượng u (mg)	% giảm so với chứng	p so lô1	p so lô2
Lô 1: Chứng sinh học	69,7 ± 7,5			
Lô 2: Methylprednisolon 20mg/kg	31,0 ± 7,6	55,5	<0,001	
Lô 3: Cao SN liều 4g dl/kg	51,6 ± 3,2	25,9	<0,05	<0,05
Lô 4: Cao SN 12g dl/kg	49,2 ± 4,0	29,4	<0,05	<0,05

Kết quả cho thấy cao Sói nhật phân trên mặt đất và phần rễ ở cả hai liều 4 g dl và 12 g dl/kg đều có tác dụng làm giảm trọng lượng khối u hạt so với lô chứng ($p < 0,05$).

3.3.3. Tác dụng bảo vệ gan và chống oxy hóa

3.3.3.1. Tác dụng bảo vệ gan và chống oxy hóa của cao Sói nhật (phần TMD)

+ Ảnh hưởng của cao Sói nhật lên hoạt độ AST và ALT trong huyết thanh chuột

Bảng 3.25: Ảnh hưởng của cao SN (phần TMD) lên hoạt độ ALT trong huyết thanh chuột bị gây độc bằng paracetamol

Lô thí nghiệm	n	ALT (UI/L) ($\bar{X} \pm SD$)	p so với lô 1	p so với lô 2	p so với lô 3	p so với lô 4
Lô 1 (chứng sinh học)	10	58,4 ± 7,5				
Lô 2 (gây mô hình)	10	240,5 ± 69,6	< 0,001			
Lô 3 (silymarin 70 mg/kg)	10	179,9 ± 47,6	< 0,001	< 0,05		
Lô 4 (cao SN 4 g dl /kg)	10	157 ± 46,7	< 0,001	< 0,01	> 0,05	
Lô 5 (cao SN 12 g dl/kg)	10	119,4 ± 34,4	< 0,001	< 0,001	< 0,01	> 0,05

Bảng 3.26 : Ảnh hưởng của cao SN (phần TMD) lên hoạt độ AST trong huyết thanh chuột bị gây độc bằng paracetamol

Lô thí nghiệm	n	ALT (UI/L) ($\bar{X} \pm SD$)	p so với lô 1	p so với lô 2	p so với lô 3	p so với lô 4
Lô 1 (chứng sinh học)	10	206 ± 14,2				
Lô 2 (gây mô hình)	10	328,4 ± 31,7	< 0,001			
Lô 3 (silymarin 70 mg/kg)	10	225,1 ± 27,3	< 0,01	< 0,001		
Lô 4 (cao SN 4 g dl/kg)	10	259,1 ± 38,8	< 0,001	< 0,001	< 0,05	
Lô 5 (cao SN 12 g dl/kg)	10	280,7 ± 29,2	< 0,001	< 0,01	< 0,001	> 0,05

Kết quả cho thấy: Hoạt độ enzyme AST và ALT ở lô 2 (mô hình) tăng rõ rệt so với lô chứng sinh học ($p < 0,001$). Hoạt độ AST và ALT ở hai lô uống cao SN liều 4 g dl/kg và liều 12 g dl/kg và lô uống silymarin giảm rõ rệt so với lô 2 ($p < 0,05$ và $p < 0,001$), nhưng vẫn còn tăng cao so với lô chứng sinh học ($p < 0,001$).

+Tác dụng chống oxy hóa *in vivo*

Bảng 3.27: Ảnh hưởng của cao SN (phần TMD) lên hàm lượng MDA dịch đồng thể gan

Lô thí nghiệm	n	MDA ($\mu\text{g}/100 \text{ g gan}$) ($\bar{X} \pm \text{SD}$)	p so với lô 1	p so với lô 2
Lô 1 (chứng sinh học)	10	11,1 $\pm$ 0,8		
Lô 2 (gây mô hình)	10	12,7 $\pm$ 1,5	<0,01	
Lô 3 (silymarin 70 mg/kg)	10	12,2 $\pm$ 1,4	<0,05	>0,05
Lô 4 (cao SN 4 g dl/kg)	10	11,1 $\pm$ 0,8	>0,05	<0,05
Lô 5 (cao SN 12 g dl/kg)	10	11,6 $\pm$ 0,9	>0,05	>0,05

Kết quả cho thấy: Hàm lượng MDA dịch đồng thể gan ở lô 2 (lô mô hình gây độc bằng paracetamol) tăng rõ rệt so với lô chứng sinh học ($p < 0,01$). Lô uống silymarin không làm giảm hàm lượng MDA dịch đồng thể gan so với lô 2 ($p > 0,05$).

Hàm lượng MDA dịch đồng thể gan ở hai lô uống cao SN (phần TMD) liều 4 g dl/kg và 12 g dl/kg giảm thấp hơn so với lô 2 (mô hình), tuy nhiên sự khác biệt chỉ có ý nghĩa thống kê ở lô uống cao SN (phần TMD) liều 4 g dl/kg ($p < 0,05$).

3.3.3.2. Tác dụng bảo vệ gan và chống oxy hóa của cao Sói nhật (phần rễ)

+ Ảnh hưởng của cao Sói nhật lên hoạt độ AST và ALT trong huyết thanh chuột

Bảng 3.28: Ảnh hưởng của cao SN (phần rễ) lên hoạt độ ALT trong huyết thanh chuột bị gây tổn thương gan cấp bằng paracetamol

Lô thí nghiệm	n	ALT (UI/L) ($\bar{X} \pm \text{SD}$)	p so với lô 1	P So với lô 2	P so với lô 3	P so với lô 4
Lô 1 (chứng sinh học)	10	39,1 $\pm$ 4,8				
Lô 2 (gây mô hình)	10	310,9 $\pm$ 68,9	< 0,001			
Lô 3 (silymarin 70 mg/kg)	10	140,3 $\pm$ 38,1	< 0,05	< 0,05		
Lô 4 (cao SN 4 g dl/kg)	10	148,0 $\pm$ 27,5	< 0,01	< 0,05	> 0,05	
Lô 5 (cao SN 12 g dl/kg)	10	155,5 $\pm$ 25,3	< 0,001	< 0,05	> 0,05	> 0,05

Bảng 3.29: Ảnh hưởng của cao SN (phần rễ) lên hoạt độ AST trong huyết thanh chuột bị gây tổn thương gan cấp bằng paracetamol

Lô thí nghiệm	n	AST (UI/L) ($\bar{X} \pm \text{SD}$)	P so với lô 1	P so với lô 2	P so với lô 3	P so với lô 4
Lô 1 (chứng sinh học)	10	189,7 $\pm$ 16,6				
Lô 2 (gây mô hình)	10	448,7 $\pm$ 47,3	< 0,001			
Lô 3 (silymarin 70 mg/kg)	10	268,3 $\pm$ 36,0	> 0,05	< 0,01		
Lô 4 (cao SN 4 g dl/kg)	10	281,1 $\pm$ 36,1	< 0,05	< 0,05	> 0,05	
Lô 5 (cao SN 12 g dl/kg)	10	294,5 $\pm$ 36,9	< 0,05	< 0,05	> 0,05	> 0,05

Kết quả cho thấy: Hoạt độ enzyme ALT và AST ở lô gây mô hình (lô 2) tăng rõ rệt so với lô chứng sinh học ($p < 0,001$). Cao SN liều 4 g dl/kg và 12 g dl/kg đều có tác dụng ức chế rõ rệt sự tăng hoạt độ enzyme ALT và AST so với lô gây mô hình ($p < 0,05$). Tuy nhiên, không có sự khác biệt về sự giảm hoạt độ enzyme ALT và AST giữa lô điều trị cao SN liều 4 g dl/kg và lô 12 g dl/kg ttc.

+Tác dụng chống oxy hóa *in vivo*

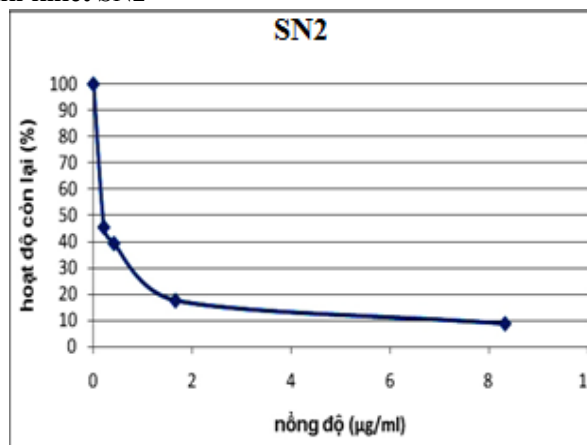
Bảng 3.30: Ảnh hưởng của cao SN (phần rễ) lên hàm lượng MDA dịch đồng thể gan

Lô thí nghiệm	n	MDA ($\mu\text{g}/100 \text{ g gan}$) ($\bar{X} \pm \text{SD}$)	P so với lô 1	
Lô 1 (chứng sinh học)	10	$127,0 \pm 2,5$		<0,01
Lô 2 (gây mô hình)	10	$147,0 \pm 4,5$	<0,01	
Lô 3 (silymarin 70 mg/kg)	10	$135,5 \pm 6,4$	>0,05	> 0,05
Lô 4 (cao SN 4 g dl/kg)	10	$142,9 \pm 4,8$	< 0,01	>0,05
Lô 5 (cao SN 12 g dl/kg)	10	$150,3 \pm 7,4$	< 0,01	> 0,05

Kết quả cho thấy: Hàm lượng MDA dịch đồng thể gan ở lô 2 tăng rõ rệt so với lô chứng sinh học ($p < 0,01$). Tuy nhiên, cả lô chuột bị tổn thương gan gây bởi paracetamol được uống silymarin (70 mg/kg) và uống cao SN (4 g dl và 12 g dl/kg) đều không có tác dụng làm giảm hàm lượng MDA dịch đồng thể gan so với lô 2.

3.3.4. Hoạt tính ức chế protease HIV-1 của chất tinh khiết SN2

Nồng độ SN2		Hoạt độ còn lại (%)
C (μM)	C ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	
0	0	100
0,5	0,21	45,557
1	0,416	39,307
1,9	0,833	53,700
3,8	1,66	17,624
9,5	4,16	23,894
1,9	8,33	8,779



Bảng 3.31: Hoạt tính ức chế enzyme protease HIV-1 của hợp chất SN2

Hình 3.38: Đồ thị thể hiện hoạt tính ức chế của SN2 đối với enzyme protease HIV-1

Kết quả cho thấy hợp chất SN2 (*4 α ,8 β -dihydroxyeudesm-7(11)-en-12,8-olid*) ức chế mạnh protease HIV-1 với nồng độ IC_{50} là 0,45 μM .

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

1. Về thực vật

- Khẳng định mẫu nghiên cứu trong luận án là cây Sói nhật có tên khoa học là *Chloranthus japonicus* Sieb., họ Hoa sói (Chloranthaceae).
- Đã mô tả đầy đủ các đặc điểm hình thái bên ngoài và giải phẫu rễ, thân, lá của cây Sói nhật.

1. Về thành phần hóa học

- Đã xác định được trong phần trên mặt đất cây Sói nhật có: flavonoid, saponin, acid hữu cơ, chất béo, steroid, caroten, polysaccharid và tinh dầu.
- Đã xác định được trong rễ cây Sói nhật có: flavonoid, saponin, coumarin, acid hữu cơ, steroid, caroten, polysaccharid và tinh dầu.
- Đã phân lập và xác định cấu trúc hóa học được 14 chất từ cây Sói nhật ở Việt Nam:

- **4 chất phân lập từ phần trên mặt đất:** shizukolidol (**1**), 4 α ,8 β -dihydroxyeudesm-7(11)-en-12,8-olid (**2**); 4 α -hydroxy-5 α ,8 β (H)-eudesm-7(11)-en-8,12-olid (**3**); linarionosid A (**4**);
- **10 chất phân lập từ rễ:** chloranosid A(**5**), 5-(hydroxymethyl)furaldehyd (**6**), acid glucosyringic (**7**), vanillosid (**8**), sarcaglabosid G (**9**), yinxiancaosid C(**10**), sacaglabosid C(**11**), calycanthosid (**12**), shizukanolid F (**13**), isofraxidin (**14**).

+ Các chất **2, 3, 11, 13, 14** là chất lần đầu tiên được phân lập từ loài *C. japonicus* Sieb.

+ Các chất **4, 6, 7, 8, 9, 12** là chất lần đầu tiên phân lập được từ chi *Chloranthus* Sw.

2. Về độc tính và tác dụng sinh học của cây Sói nhật

❖ **Độc tính cấp**

- Cao chiết nước phần trên mặt đất cây Sói nhật không có biểu hiện độc tính cấp ở liều 150 g dl/kg gấp 37,5 - 75 lần liều dùng trên lâm sàng.

- Đã xác định LD₅₀ của cao chiết nước rễ cây Sói nhật trên chuột nhắt trắng theo đường uống là: LD₅₀ = 202,18 (219,86 – 166,82) g/kg ttc.

❖ **Tác dụng chống viêm cấp**

+ Trên mô hình gây phù bàn chân chuột bằng carrageenin

Cao chiết phần trên mặt đất của cây Sói nhật ở cả hai liều 2,8 g dl và 8,4 g dl/kg có xu hướng làm giảm phù chân chuột nhưng chưa có ý nghĩa thống kê. Liều 8,4 g dl/kg có tác dụng làm giảm phù chân chuột ở thời điểm sau gây viêm 2h (p<0,05) nhưng không mạnh bằng aspirin 200 mg/kg.

Cao chiết rễ cây Sói nhật: ở cả hai liều 2,8 g dl và 8,4 g dl/kg đều không thể hiện tác dụng chống viêm cấp.

+ Trên mô hình gây tràn dịch màng bụng

Cao chiết phần trên mặt đất và phần rễ liều 2,8 g dl và 8,4 g dl/kg không làm giảm thể tích dịch rỉ viêm, số lượng bạch cầu trong dịch rỉ viêm và hàm lượng protein trong dịch rỉ viêm so với lô chứng, nhưng cao chiết Sói nhật phần trên mặt đất ở liều cao 8,4 g dl/kg làm giảm số lượng bạch cầu trong dịch rỉ viêm so với lô chứng (p < 0,05).

❖ **Tác dụng chống viêm mạn**

Cao chiết Sói nhật cả phần trên mặt đất và phần rễ ở cả hai liều 4 g dl và 12 g dl/kg đều có tác dụng làm giảm trọng lượng khối u hạt so với lô chứng (p < 0,05).

❖ **Tác dụng bảo vệ gan và chống oxy hóa**

Cao chiết phần trên mặt đất và phần rễ cây Sói nhật ở cả hai liều 4 g dl và 12 g dl/kg đều có tác dụng bảo vệ gan trên mô hình gây tổn thương gan cấp bằng PAR liều cao, thông qua việc làm giảm nồng độ AST và ALT. Tuy nhiên, không có sự khác biệt về sự giảm hoạt độ enzym ALT và AST giữa lô dùng liều 4 g dl/kg và lô 12 g dl/kg ttc,

Cao chiết phần trên mặt đất cây Sói nhật có tác dụng làm giảm hàm lượng MDA dịch đồng thể gan chuột, tuy nhiên sự khác biệt chỉ có ý nghĩa thống kê ở lô uống Sói nhật liều 4 g dl/kg (p< 0,05)

Cao chiết phần rễ cây Sói nhật không có tác dụng làm giảm MDA dịch đồng thể gan chuột bị gây độc bởi PAR.

❖ **Tác dụng ức chế enzym protease HIV-1**

Hợp chất 2 được phân lập từ phân đoạn cần ethylacetat phần trên mặt đất cây Sói nhật có hoạt tính ức chế enzym protease HIV-1 với giá trị IC₅₀ là 0,45 μ M.

KIẾN NGHỊ

- Tiếp tục nghiên cứu thành phần hoá học cây Sói nhật, chiết xuất, phân lập, xác định cấu trúc hoá học của các chất ở các phân đoạn chiết *n*-butanol và nước.
- Tiếp tục nghiên cứu một số tác dụng sinh học khác chưa được nghiên cứu để khẳng định giá trị sử dụng của dược liệu Sói nhật.

CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. Trần Thị Thu Hiền, Đỗ Thị Oanh, Phạm Thanh Kỳ, Phương Thiện Thương, (2014), “Sesquiterpen lacton phân lập từ cây Sói Nhật (*Chloranthus japonicus* Sieb.) thu hái tại Việt Nam”, *Tạp chí Dược học*, 8/2014, tr 39-42.
2. Đỗ Thị Oanh, Phạm Thanh Kỳ, Nguyễn Trọng Thông, Phạm Thị Vân Anh (2014), “Nghiên cứu tác dụng bảo vệ gan và chống oxy hóa của cao Sói nhật trên thực nghiệm”, *Tạp chí Dược học*, 10/2014, tr 26-29.
3. Đỗ Thị Oanh, Phạm Thanh Kỳ, Nguyễn Trọng Thông, Phạm Thị Vân Anh (2015), “Nghiên cứu tác dụng chống viêm cấp và mạn tính của cao Sói nhật trên thực nghiệm”, *Tạp chí Dược học*, 1/2015, tr 32-35.
4. Đỗ Thị Oanh, Phạm Thanh Kỳ, Lê Việt Dũng, “Ba Lindenane-sesquiterpen phân lập từ rễ cây Sói nhật (*Chloranthus japonicus* Sieb.) thu hái tại Việt Nam”, *Tạp chí Dược học*, 8/2015, tr 47-51.
5. Đỗ Thị Oanh, Phạm Thanh Kỳ, Lê Việt Dũng, “Hai coumarin phân lập từ cây Sói nhật (*Chloranthus japonicus* Sieb.) thu hái tại Việt Nam”, *Tạp chí Dược học*, 01/2016, tr 36-39.
6. Đỗ Thị Oanh, Phạm Thanh Kỳ, Lê Việt Dũng, Phương Thiện Thương, “Hai hợp chất phân lập từ phần trên mặt đất cây Sói nhật (*Chloranthus japonicus* Sieb.) thu hái tại Việt Nam”, *Tạp chí Dược học*, 04/2017, tr 29-31.
7. Đỗ Thị Oanh, Phạm Thanh Kỳ, Lê Việt Dũng, Phương Thiện Thương, “Các hợp chất phân lập từ phần rễ cây Sói nhật (*Chloranthus japonicus* Sieb.) thu hái tại Việt Nam”, *Tạp chí Dược liệu*, 01/2017 (22), tr 38-45.
8. Do Thi Oanh, Pham Thi Nguyet Hang, Le Viet Dung, Pham Thanh Ky, “Hepatoprotective and Anti-Inflammatory Effect of the Aqueous Extract from *Chloranthus japonicus* Sieb.”, *Journal of Medicinal Materials*, 2017, Vol. 22, No. 5.