

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

VIỆN DƯỢC LIỆU



NGUYỄN THỊ PHƯƠNG

**NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN HÓA
HỌC VÀ TÁC DỤNG SINH HỌC CỦA
CÂY GỐI HẠC (*Leea rubra* Blume ex
Spreng., họ Leeaceae)**

CHUYÊN NGÀNH: Dược học cổ truyền

MÃ SỐ: 62 72 04 06

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ DƯỢC HỌC

HÀ NỘI - 2017

Công trình được hoàn thành tại:

- Khoa Hóa phân tích-Tiêu chuẩn (Viện Dược liệu).
- Khoa Dược lý sinh hóa (Viện Dược liệu)
- Bộ môn Dược lực (Trường Đại học Dược Hà Nội).
- Viện Hàn lâm Khoa học Công nghệ Việt Nam.
- Bộ môn Thực vật, Khoa Sinh học và Phòng thí nghiệm trọng điểm công nghệ enzym và protein (Trường Đại học Khoa học Tự nhiên-Đại học Quốc gia Hà Nội).

Người hướng dẫn khoa học:

- PGS.TSKH. Nguyễn Minh Khởi
- PGS.TS. Phương Thiện Thương

Phản biện 1:

Phản biện 2:

Phản biện 3:

Luận án sẽ được bảo vệ trước Hội đồng đánh giá luận án cấp Viện họp tại:

.....

vào hồigiờphút, ngày.....tháng.....năm.....

Có thể tìm hiểu Luận án tại thư viện:

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

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, TỪ VIẾT TẮT

APCI-MS: Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry (Phổ khối lượng ion hóa hóa học tại áp suất khí quyển)

BuOH: Butanol

COSY: Correlation Spectroscopy

COX: Cyclooxygenase (COX-1; COX-2).

CD: Circular Dichroism (Phổ lưỡng sắc tròn).

DEPT: Distortionless Enhancement by Polarization Transfer

DMSO: Dimethylsulfoxid

DPPH: 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl

ESI-MS: Electron Spray Ionization Mass Spectrometry (Phổ khối lượng ion hóa phun điện tử)

EtOAc: Ethyl acetat

EtOH: Ethanol

GHL: Cao ethanol chiết từ lá Gối hạc

GHR: Cao ethanol chiết từ rễ Gối hạc

GHT: Cao ethanol chiết từ thân Gối hạc

HIV: Human Immunodeficiency Virus

HMBC: Heteronuclear Multiple Bond Correlation

HPLC: High Performance Liquid Chromatography (Sắc ký lỏng hiệu năng cao)

HSQC: Heteronuclear Single Quantum Coherence

Hx: *n*-Hexan

IDMTC: Indomethacin

IC₅₀: Inhibitory Concentration 50% (Nồng độ ức chế 50%)

IR: InfraRed (Hồng ngoại)

L. rubra: *Leea rubra*

5-LOX: 5-Lipoxygenase

MeOH: Methanol

NMR: Nuclear Magnetic Resonance (Cộng hưởng từ hạt nhân)

NO: Nitrogen Oxide

NOESY: Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy

XO: Xanthin Oxidase

GIỚI THIỆU LUẬN ÁN

1. Tính cấp thiết của Luận án

Cây Gối hạc có tên khoa học là *Leea rubra* Blume ex Spreng., thuộc họ Gối hạc (Leeaceae) được sử dụng trong y học cổ truyền ở nhiều quốc gia như Việt Nam, Thái Lan, Ấn Độ... Ở nước ta, Gối hạc phân bố rộng khắp từ những cánh rừng Tây Bắc đến Tây Nguyên, cây được tìm thấy ở khu vực núi đá Hoà Bình, Ninh Bình, Lạng Sơn, Quảng Ninh, các tỉnh miền Trung, Tây Nguyên, đảo Phú Quốc (Kiên Giang). Rễ Gối hạc là vị thuốc nam được sử dụng trong y học cổ truyền để chữa sưng tấy, phong thấp sưng đầu gối. Ngoài ra, rễ sắc cho phụ nữ mới sinh giúp ăn uống ngon miệng, hạt trị giun đũa và sán sơ mít.

Hiện nay, vị thuốc Gối hạc được sử dụng rất phổ biến trong dân gian cũng như trong hệ thống các bệnh viện y học cổ truyền của Việt Nam để điều trị các bệnh đau nhức xương khớp, tê thấp, chữa sưng tấy (chúng bệnh có tỷ lệ người mắc khá cao ở nước ta). Vị Gối hạc cũng đang được xem xét đưa vào danh mục vị thuốc thiết yếu của Việt Nam. Mặc dù được sử dụng nhiều, cho đến nay vẫn chưa có công trình khoa học nào đi sâu nghiên cứu về thành phần hóa học cũng như tác dụng sinh học của cây thuốc Gối hạc ở nước ta cũng như trên thế giới.

Xuất phát từ tình hình thực tế trên, đề tài: “**Nghiên cứu thành phần hóa học và tác dụng sinh học của cây Gối hạc (*Leea rubra* Blume ex Spreng., họ Leeaceae)**” được thực hiện với 3 mục tiêu chính.

2. Mục tiêu của Luận án

2.1. Nghiên cứu về thực vật học: Mô tả đặc điểm hình thái và vi học của cây Gối hạc.

2.2. Nghiên cứu về thành phần hóa học: Định tính, phân lập và xác định cấu trúc hóa học các hợp chất từ cây Gối hạc.

2.3. Nghiên cứu về tác dụng sinh học: Đánh giá một số tác dụng sinh học của cao chiết và một số hợp chất phân lập từ cây Gối hạc.

3. Những đóng góp mới của Luận án

3.1. Về thực vật học

- Đã mô tả đặc điểm thực vật một cách chi tiết, lần đầu tiên có dữ liệu về phân tích hoa, quả, lá, hạt và đặc điểm vi học lá, thân, rễ của cây Gối hạc.

3.2. Về hóa học

- 10 hợp chất lần đầu tiên phân lập được từ chi *Leea*: europetin-3-O- α -L-rhamnopyranosid, rhamnetin-3-O- α -L-rhamnopyranosid, juglanin, artabotrysid B, arctiin, acid maslinic, lup-20(29)-en-3 β ,6 α -diol, huzhangosid D, stigmast-4-en-3,6-dion, goniotalamin.

- 18 chất lần đầu tiên được phân lập từ loài *Leea rubra* gồm: kaempferol, quercetin, europetin-3-*O*- α -L-rhamnopyranosid, rhamnetin-3-*O*- α -L-rhamnopyranosid, juglanin, artabotrysid B, acid protocatechuic, arctiin, β -sitosterol, daucosterol, acid ursolic, acid oleanolic, acid maslinic, β -amyrin và huzhangosid D.

- Các kết quả nghiên cứu cho thấy, thành phần hóa học trong của cây Gối hạc rất đa dạng. Các hợp chất thuộc nhiều nhóm khác nhau. Hai nhóm hoạt chất chính có trong cây Gối hạc là flavonoid (07 hợp chất) và triterpenoid (05 hợp chất).

- Định lượng được thành phần chính là acid gallic trong rễ, thân Gối hạc (hàm lượng lần lượt là 0,236 % và 0,116 %) ; định lượng đồng thời acid gallic và europetin-3-*O*- α -L-rhamnopyranosid trong lá Gối hạc (hàm lượng lần lượt là 0,142 % và 0,097 %) bằng HPLC.

3.3. Về tác dụng sinh học

- Lần đầu tiên tác dụng chữa các chứng viêm, đau theo kinh nghiệm dân gian của rễ Gối hạc được chứng minh trên thực nghiệm. Luận án cũng đã chứng minh lá Gối hạc có những tác dụng kể trên và có phần tốt hơn rễ, mở ra hướng nghiên cứu mới cho việc sử dụng lá thay thế rễ, góp phần khai thác bền vững dược liệu Gối hạc.

- Đã bước đầu chứng minh được cơ chế tác dụng của dược liệu Gối hạc thông qua con đường ức chế enzym liên quan đến viêm là LO và COX. Nghiên cứu này cũng đã phân lập được các hợp chất đã được chứng minh có tác dụng giảm đau, chống viêm (acid gallic, các flavonoid, acid maslinic...) từ Gối hạc.

- Thăm dò và xác định được tác dụng ức chế enzym protease HIV-1 của cao chiết từ lá, rễ và thân cây Gối hạc và hợp chất lup-20(29)-en-3 β ,6 α -diol phân lập từ thân Gối hạc.

4. Ý nghĩa của Luận án

- Các đặc điểm hình thái thực vật và vi học được mô tả là những dẫn liệu quan trọng giúp cho việc nghiên cứu, kiểm nghiệm, xác định "tính đúng" của dược liệu Gối hạc khi cần thiết.

- Kết quả nghiên cứu về hóa học đã phân lập, xác định cấu trúc của 21 hợp chất từ lá, thân và rễ của cây Gối hạc thu hái tại Việt Nam. Theo tra cứu tài liệu, có 18 hợp chất lần đầu tiên phân lập được từ loài *Leea rubra*. Trong số này có 10 hợp chất lần đầu tiên phân lập được từ chi *Leea*. Các kết quả nghiên cứu góp phần làm phong phú thêm tri thức về hóa thực vật học của chi *Leea* nói chung và loài *Leea rubra* nói riêng.

- Nghiên cứu đã tiến hành xây dựng phương pháp định lượng hai hợp chất acid gallic và hợp chất europetin-3-*O*- α -L-rhamnopyranosid trong rễ, thân, lá

cây Gối hạc. Các kết quả nghiên cứu là cơ sở khoa học, làm tiền đề cho việc xây dựng tiêu chuẩn và đánh giá chất lượng dược liệu Gối hạc sau này.

- Nghiên cứu đã chứng minh được tác dụng chống viêm, giảm đau theo kinh nghiệm dân gian của rễ Gối hạc trên *in vivo* cũng như tác dụng ức chế các enzym có liên quan đến viêm XO, LOX và COX để tìm cơ chế tác dụng. Luận án cũng đã chứng minh lá Gối hạc có hai tác dụng kể trên và có phần tốt hơn bộ phận rễ. Ngoài hai tác dụng chống viêm và giảm đau, tác dụng chống oxy hóa, tác dụng ức chế enzym xanthin oxidase, enzym protease HIV-1 của dược liệu Gối hạc đã được chứng minh trong nghiên cứu này cũng sẽ gợi ý về việc sử dụng Gối hạc cho những chứng bệnh liên quan giúp khai thác bền vững và tối đa công dụng của cây thuốc Gối hạc

5. Cấu trúc của luận án

Luận án gồm 4 chương, 42 bảng, 41 hình, 12 phụ lục, 192 tài liệu tham khảo. Luận án gồm 151 trang, gồm các phần chính: Đặt vấn đề (2 trang); Tổng quan (30 trang); Nguyên vật liệu, trang thiết bị và phương pháp nghiên cứu (17 trang); Kết quả nghiên cứu (71 trang); Bàn luận (28 trang); Kết luận và Kiến nghị (3 trang).

NỘI DUNG CỦA LUẬN ÁN

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN

1.1. THỰC VẬT HỌC

1.1.1. Chi *Leea* Royen ex L.

Chi *Leea* Royen ex L. là chi duy nhất thuộc họ Gối hạc (Leeaceae). Trước đây, chi *Leea* được xếp vào họ Nho (Vitaceae), đến năm 1829 được tách thành một họ riêng (họ Gối hạc). Cho đến nay, theo các nghiên cứu thì chi *Leea* có khoảng 34 loài, phân bố rộng khắp ở các vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới Châu Á, Châu Phi và Châu Úc. Ở Việt Nam, chi *Leea* hiện có 08 loài đã được phát hiện và mô tả.

1.1.2. Cây Gối hạc (*Leea rubra* Blume ex Spreng.)

- Cây Gối hạc hay còn gọi là Cây mễn, Bí đại, Cù rôi, Phi tử, Kim lê, Trúc vòng, Mạy chia (Tày), Co còn ma (Thái), Mía sèng (Dao) có tên khoa học là *Leea rubra* Blume ex Spreng.

- Phân bố: Trên thế giới, Gối hạc được tìm thấy ở nhiều quốc gia như Ấn Độ, Bangladesh, Myanmar, Campuchia, Lào, Thái Lan, Việt Nam, Singapore, khu vực Maleisia gồm: đảo Sumatra, Java thuộc Indonesia, Bornea, Philippin, New Guine và Bắc Australia. Ở Việt Nam, Gối hạc phân bố ở một số vùng như Hòa Bình, Vĩnh Phúc, Thái Nguyên, Đắk Lắk, Đắk Nông, Lâm Đồng, Đồng

Nai, Bà Rịa-Vũng Tàu, Hà Tiên, An Giang và Kiên Giang.

1.2. THÀNH PHẦN HÓA HỌC

1.2.1. Thành phần hóa học một số loài thuộc chi *Leea*

Thông qua việc tra cứu và phân tích các tài liệu đã công bố cho thấy, các hợp chất tinh khiết phân lập được từ các loài thuộc chi *Leea* chủ yếu thuộc các nhóm triterpenoid, flavonoid, các dẫn chất của acid benzoic và một số nhóm chất khác.

1.2.2. Thành phần hóa học của cây Gối hạc

Có rất ít các công trình nghiên cứu về thành phần hóa học của loài *Leea rubra* được công bố. Cho đến nay, mới chỉ phân lập được 04 hợp chất myricitrin, acid gallic, acid *p*-hydroxybenzoic và acid syringic từ loài này.

1.3. TÁC DỤNG SINH HỌC

1.3.1. Tác dụng sinh học của một số loài thuộc chi *Leea*

Cao chiết từ một số loài thuộc chi *Leea* có tác dụng kháng khuẩn, kháng nấm, trừ giun sán, tác dụng chống oxy hóa, độc tế bào, kháng u, chống tạo sỏi, tác dụng chống viêm, giảm đau.

1.3.2. Tác dụng sinh học của cây Gối hạc

Một số công trình nghiên cứu tác dụng sinh học của cây Gối hạc cho thấy, dược liệu này có tác dụng kháng khuẩn, chống oxy hóa.

CHƯƠNG 2. NGUYÊN VẬT LIỆU, TRANG THIẾT BỊ VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. NGUYÊN VẬT LIỆU NGHIÊN CỨU

- Cành Gối hạc có đủ các bộ phận (lá, hoa, quả) thu hái tại huyện Lạng Giang tỉnh Bắc Giang; huyện Thanh Trì, Hà Nội; Tam Đảo, Vĩnh Phúc năm 2011-2012. Tiêu bản mẫu cây được lưu tại Khoa Tài nguyên Dược liệu, Viện Dược liệu và Bảo tàng Sinh vật, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội.

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

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.2.1. Nghiên cứu về thực vật học

2.2.1.1. Mẫu tiêu bản thực vật

Mẫu được lấy vào 2 thời kỳ cây đang có hoa và khi có quả già.

2.2.1.2. Xác định tên khoa học

- Xác định tên khoa học theo phương pháp so sánh hình thái, được đối chiếu với các khoá phân loại của chi *Leea*, họ Leeaceae trong các tài liệu chuyên khảo về phân loại thực vật và đối chiếu với các mẫu tiêu bản có tên Gối hạc đã được xác định.

- Thẩm định lại kết quả bởi các chuyên gia phân loại thực vật.

2.2.1.3. Nghiên cứu giải phẫu

Theo phương pháp nghiên cứu hình thái giải phẫu thực vật, bao gồm các bộ phận thân (thân, lá, rễ). Các tiêu bản giải phẫu được làm theo phương pháp nhuộm kép (đỏ carmin và xanh methylen). Quan sát dưới kính hiển quang học và chụp ảnh bằng máy ảnh kỹ thuật số.

2.2.2. Nghiên cứu về hoá học

2.2.2.1. Phương pháp định tính

Bằng các phản ứng hóa học đặc trưng.

2.2.2.2. Phương pháp chiết xuất, phân lập các hợp chất

- Dược liệu được chiết bằng EtOH, phân đoạn bằng các dung môi có độ phân cực tăng dần gồm Hx, EtOAc, BuOH.

- Phân lập các chất bằng phương pháp sắc ký cột (chất hấp phụ là silica gel pha thường, pha đảo RP-18, Sephadex LH-20), sắc ký lỏng điều chế.

2.2.2.3. Phương pháp xác định cấu trúc hoá học các hợp chất

Xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất phân lập được dựa trên các thông số vật lý như hình thái, nhiệt độ nóng chảy; các phương pháp phổ: UV, IR, MS, CD, NMR ($^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, DEPT, NOESY, HMBC, HSQC, COSY).

2.2.2.4. Định lượng một số hợp chất chính phân lập được từ Gối hạc

Tiến hành định lượng một số chất chính phân lập được từ Gối hạc bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC).

2.2.3. Nghiên cứu tác dụng dược lý

- Mẫu nghiên cứu: Cao ethanol rễ, thân, lá cây Gối hạc.

- Đánh giá tác dụng chống oxy hóa: dọn gốc tự do DPPH và superoxid bằng phương pháp đo quang.

- Xác định hoạt tính ức chế hoạt động enzym XO bằng phương pháp đo quang.

- Đánh giá tác dụng ức chế sự hoạt động của enzym 5-LOX bằng phương pháp đo quang.

- Đánh giá tác dụng ức chế enzym cyclooxygenase (COX-1, COX-2) bằng phương pháp đo quang.

- Đánh giá tác dụng chống viêm cấp trên mô hình gây phù bàn chân chuột bằng carrageenan theo phương pháp Winter.

- Đánh giá tác dụng chống viêm mạn trên mô hình gây u hạt thực nghiệm bằng viên bông.

- Đánh giá tác dụng giảm đau trung ương bằng mô hình mâm nóng.

- Đánh giá tác dụng giảm đau ngoại vi trên mô hình gây đau quặn bằng acid acetic.

- Đánh giá hoạt tính ức chế enzym protease HIV-1 bằng phương pháp đo

quang mô tả bởi Richards và cộng sự.

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. THỰC VẬT HỌC

3.1.1. Xác định tên khoa học

Mô tả chi tiết và đầy đủ các bộ phận của cơ quan dinh dưỡng (lá, thân), cơ quan sinh sản (hoa, quả, hạt) của loài nghiên cứu đối chiếu với các khóa phân loại các loài thuộc chi *Leea* Royen ex L., họ Gối hạc (Leeaceae) trong các tài liệu chuyên khảo về phân loại thực vật và với các mẫu có tên khoa học lưu trữ tại Khoa Tài nguyên Dược liệu, Viện Dược liệu và Bảo tàng Sinh vật, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên. Kết quả các mẫu Gối hạc thu hái tại huyện Thanh Trì, Hà Nội và huyện Lạng Giang, Bắc Giang thuộc chi *Leea* và có tên khoa học là *Leea rubra* Blume ex Spreng., họ Gối hạc (Leeaceae). Kết quả nghiên cứu được thẩm định lại bởi các chuyên gia về phân loại thực vật của Trường Đại học Khoa học Tự nhiên và Viện Dược liệu.

3.1.2. Đặc điểm hình thái thực vật

Đặc điểm nổi bật: Thân và cành không có gai, rễ phình to thành củ, lá kép 2-3 lần lông chim, lá chét hình trứng ngược, tràng hoa và đài hoa có màu đỏ đậm đến vàng, tràng cao 2,7-3 mm. Nhị lép là 5 phiến nhỏ dạng màng màu vàng, xếp xen kẽ với cánh hoa và chụm vào nhau thành một ống đứng cao khoảng 1 mm, gian thùy của ống nhị lép sâu.

3.1.3. Đặc điểm vi học

3.1.3.1. Cấu tạo giải phẫu thân

Gôm: biểu bì hình chữ nhật xếp đều đặn; mô dày góc gồm 3-4 lớp tế bào. Mô mềm vỏ hình tròn hay bầu dục. Mô cứng tập trung thành từng đám, là những tế bào hình đa giác thành dày xếp khít nhau nằm sát lớp libe.

3.1.3.2. Cấu tạo giải phẫu lá

- Gân lá: Mặt trên và mặt dưới đều lồi, mặt trên có một chóp nhọn kéo dài, mặt dưới thường lõm hình chữ V. Biểu bì trên và dưới rải rác có lông che chở đơn bào. Trong tế bào mô mềm vỏ chứa nhiều tinh thể calci oxalat hình cầu gai; mô dày. Libe gỗ gồm 6 bó không đều xếp thành một vòng.

- Phiến lá: Biểu bì tế bào mang nhiều lỗ khí. Mô mềm giậu tế bào thẳng góc với biểu bì trên; mô mềm khuyết. Tinh thể calci oxalat hình cầu gai. Bó libe gỗ gồm 2-4 mạch gỗ ở trên, libe ở dưới.

3.1.3.3. Cấu tạo giải phẫu rễ

Phần libe-gỗ chiếm phần lớn thiết diện rễ. Gôm: lớp bản, mô mềm vỏ, tế bào mô cứng. Tinh thể calci oxalat hình cầu gai tập trung ở vùng mô mềm vỏ sát libe. Libe tạo thành vòng, libe cấp 2 tế bào hình chữ nhật, vách uốn lượn.

3.1.3.4. Đặc điểm bột thân

Bột màu lục xám, vị hơi đắng, mùi thơm nhẹ. Gồm: Mảnh bản, mảnh mô mềm, tế bào cứng. Tinh thể calci oxalat hình kim hay hình khối. Sợi có kích thước lớn, hình thoi dài, mảnh mạch vạch.

3.1.3.4. Đặc điểm bột lá

Gồm có: Mô giậu, mô mềm, bó sợi, lông che chở, mảnh biểu bì, tế bào mang lỗ khí, mạch điếm, mạch mạng và mạch vạch. Bó tinh thể calci oxalate, tinh thể calci oxalat hình cầu gai, tế bào cứng chứa bó tinh thể calci oxalat.

3.1.3.4. Đặc điểm bột rễ

Gồm có: Mảnh bản, mảnh mô mềm, bó sợi. Tinh thể calci oxalat hình kim. Mảnh mạch vạch, tế bào cứng, hạt tinh bột hình tròn hay hình thận.

3.2. THÀNH PHẦN HÓA HỌC

3.2.1. Định tính các nhóm chất hữu cơ

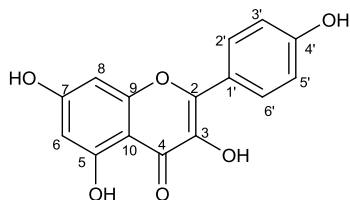
Các kết quả định tính bằng phản ứng ống nghiệm đặc trưng cho thấy trong lá Gối hạc có flavonoid, tanin, nhóm triterpenoid, sterol, carbohydrat và acid hữu cơ. Trong thân và rễ Gối hạc có chứa sterol, tanin, carbohydrat và acid hữu cơ.

3.2.2. Phân lập và xác định cấu trúc các hợp chất từ dược liệu Gối hạc

Bằng các phương pháp sắc ký đã tiến hành phân lập được 21 hợp chất (1-21) từ dịch chiết ethanol 96% lá và thân cây Gối hạc. Cấu trúc của các hợp chất được xác định dựa trên việc phân tích các dữ kiện phổ cũng như so sánh với các tài liệu đã công bố.

Chất số 1: Kaempferol

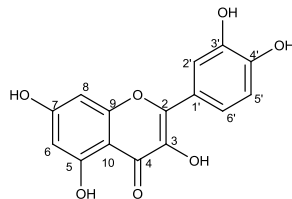
Bột màu vàng, nhiệt độ nóng chảy 274-276°C. Phổ IR (cm^{-1}): 3398; 2930; 1662; 1611; 1560; 1467; 1247; 1177; 1069. Phổ ESI-MS m/z : 285 [M-H]⁻. Phổ ¹H-NMR (CD_3OD ; 500 MHz): 6,20 (1H, d, $J=2,0$ Hz, H-6), 6,41 (1H, d, $J=2,0$ Hz, H-8), 8,09 (2H, d, $J=8,5$ Hz, H-2'; H-6'), 6,92 (2H, d, $J=8,5$ Hz, H-3'; H-5'). Phổ ¹³C-NMR (CD_3OD ; 125 MHz): 148,1 (C-2), 137,1 (C-3), 177,4 (C-4), 162,5 (C-5), 99,3 (C-6), 165,6 (C-7), 94,5 (C-8), 158,3 (C-9), 104,6 (C-10), 123,7 (C-1'), 130,7 (C-2'), 116,3 (C-3'), 160,5 (C-4'), 116,3 (C-5'), 130,7 (C-6').



Hình 3.11. Cấu trúc hóa học của hợp chất 1

Chất số 2: Quercetin

Bột màu vàng, nhiệt độ nóng chảy 310-312°C. Phổ IR (cm^{-1}): 3379; 2944; 1658; 1454; 1411; 1029. Phổ ESI-MS m/z : 301 [M-H]⁻. Phổ ¹H-NMR ($\text{DMSO}-d_6$; 500 MHz): 6,18 (1H, d, $J=2,0$ Hz, H-6), 6,40 (1H, d, $J=2,0$ Hz, H-8), 7,67 (1H, d, $J=2,0$



Hình 3.12. Cấu trúc hóa học của hợp chất 2

Hz, H-2'), 6,88 (1H, d, $J=8,5$ Hz, H-5'), 7,54 (1H, dd, $J=2,0$; 8,5 Hz, H-6'), 13,36 (1H, s, OH-5). **Phổ $^{13}\text{C-NMR}$** (DMSO- d_6 ; 125 MHz): 146,7 (C-2), 135,7 (C-3), 175,8 (C-4), 160,7 (C-5), 98,2 (C-6), 164,0 (C-7), 93,3 (C-8), 156,1 (C-9), 102,9 (C-10), 121,9 (C-1'), 115,0 (C-2'), 145,0 (C-3'), 147,7 (C-4'), 115,6 (C-5'), 119,9 (C-6').

Chất số 3: Myricitrin

Bột màu vàng, nhiệt độ nóng chảy 197-199°C. **Phổ IR** (cm^{-1}): 3402; 2918; 1656; 1605; 1499; 1457; 1291; 1039. **Phổ ESI-MS m/z** : 463 [M-H]⁻. **Phổ $^1\text{H-NMR}$** ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$; 500 MHz): 6,57 (1H, d, $J=2,0$ Hz, H-6), 6,66 (1H, d, $J=2,0$ Hz, H-8), 7,69 (2H, s, $J=2,0$ Hz, H-2'; H-6'), 6,19 (1H, br s, H-1''), 1,48 (3H, d, $J=6,5$ Hz, H-6'').

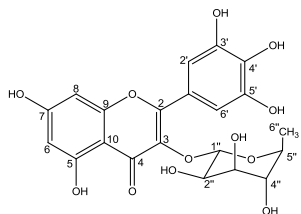
Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$; 125 MHz): 158,5 (C-2), 136,2 (C-3), 179,1 (C-4), 162,9 (C-5), 99,6 (C-6), 165,7 (C-7), 94,4 (C-8), 157,6 (C-9), 105,4 (C-10), 121,4 (C-1'), 109,5 (C-2'), 147,9 (C-3'), 138,9 (C-4'), 147,9 (C-5'), 109,5 (C-6'), 104,3 (C-1''), 71,9 (C-2''), 72,5 (C-3''), 73,4 (C-4''), 72,0 (C-5''), 18,4 (C-6'').

Chất số 4: Europetin-3-O- α -L-rhamnopyranosid

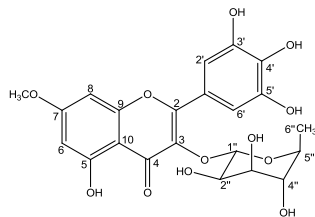
Bột màu vàng, nhiệt độ nóng chảy 186-188°C. **Phổ IR** (cm^{-1}): 3438; 2932; 1658; 1598; 1501; 1338; 1205; 1031. **Phổ ESI-MS m/z** : 477 [M-H]⁻. **Phổ $^1\text{H-NMR}$** (CD_3OD ; 500 MHz): 6,34 (1H, d, $J=2,0$ Hz, H-6), 6,55 (1H, d, $J=2,0$ Hz, H-8), 6,99 (2H, s, H-2'; H-6'), 3,89 (3H, s, 7-OCH₃), 5,35 (1H, d, $J=1,5$ Hz, H-1''), 0,98 (3H, d, $J=6,0$ Hz, H-6''). **Phổ $^{13}\text{C-NMR}$** (CD_3OD ; 125 MHz): 159,9 (C-2), 136,5 (C-3), 179,8 (C-4), 162,9 (C-5), 98,9 (C-6), 167,2 (C-7), 93,1 (C-8), 158,4 (C-9), 106,7 (C-10), 121,8 (C-1'), 109,6 (C-2'), 146,8 (C-3'), 138,0 (C-4'), 146,9 (C-5'), 109,7 (C-6'), 56,5 (7-OCH₃), 103,6 (C-1''), 71,9 (C-2''), 72,1 (C-3''), 73,4 (C-4''), 72,0 (C-5''), 17,7 (C-6'').

Chất số 5: Rhamnetin-3-O- α -L-rhamnopyranosid

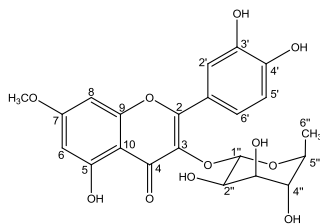
Bột màu vàng, nhiệt độ nóng chảy 177-179°C. **Phổ IR** (cm^{-1}): 3433; 2930; 1659; 1604; 1452; 1205; 1069. **Phổ ESI-MS m/z** : 461 [M-H]⁻. **Phổ $^1\text{H-NMR}$** ($\text{CD}_3\text{OD}+\text{CDCl}_3$; 500 MHz): 6,30 (1H,



Hình 3.13. Cấu trúc hóa học của hợp chất 3



Hình 3.14. Cấu trúc hóa học của hợp chất 4



Hình 3.15. Cấu trúc hóa học của hợp chất 5

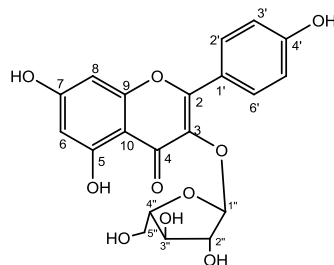
d, $J=2,0$ Hz, H-6), 6,49 (1H, d, $J=2,0$ Hz, H-8), 7,35 (1H, d, $J=2,0$ Hz, H-2'), 6,90 (1H, d, $J=2,0$ Hz, H-5'), 7,30 (1H, dd, $J=2,0; 8,0$ Hz, H-6'), 3,85 (3H, s, 7-OCH₃), 5,35 (1H, d, $J=1,5$ Hz, H-1''), 0,93 (3H, d, $J=6,5$ Hz, H-6''). **Phổ ¹³C-NMR** (CD₃OD+CDCl₃; 125 MHz): 158,1 (C-2), 136,1 (C-3), 179,4 (C-4), 162,5 (C-5), 98,7 (C-6), 166,7 (C-7), 92,9 (C-8), 159,2 (C-9), 106,6 (C-10), 122,5 (C-1'), 116,8 (C-2'), 145,8 (C-3'), 149,4 (C-4'), 116,1 (C-5'), 122,6 (C-6'), 56,3 (7-OCH₃), 103,1 (C-1''), 71,4 (C-2''), 71,8 (C-3''), 72,9 (C-4''), 71,6 (C-5''), 17,4 (C-6'').

Chất số 6: Juglanin

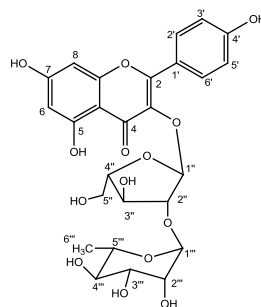
Bột màu vàng, nhiệt độ nóng chảy 179-181°C. **Phổ IR** (cm⁻¹): 3411; 2920; 1659; 1597; 1497; 1208; 1033. **Phổ ESI-MS** m/z : 417 [M-H]⁻. **Phổ ¹H-NMR** (C₅D₅N; 500 MHz): 6,71 (1H, d, $J=2,0$ Hz, H-6), 6,72 (1H, d, $J=2,0$ Hz, H-8), 8,36 (2H, dd, $J=2,0; 7,0$ Hz, H-2'; H-6'), 7,26 (2H, dd, $J=2,0; 7,5$ Hz, H-3'; H-5'), 6,50 (1H, br s, H-1''), 13,30 (1H, s, 5-OH). **Phổ ¹³C-NMR** (C₅D₅N; 125 MHz): 157,6 (C-2), 134,7 (C-3), 179,1 (C-4), 162,8 (C-5), 99,7 (C-6), 165,9 (C-7), 94,6 (C-8), 157,7 (C-9), 105,3 (C-10), 121,9 (C-1'), 131,6 (C-2'), 116,4 (C-3'), 161,6 (C-4'), 116,4 (C-5'), 131,6 (C-6'), 109,9 (C-1''), 83,5 (C-2''), 78,8 (C-3''), 88,6 (C-4''), 62,4 (C-5'').

Chất số 7: Artabotrysid B

Bột màu vàng, nhiệt độ nóng chảy 165-167°C. **Phổ IR** (cm⁻¹): 3402; 2924; 1659; 1614; 1512; 1183; 1090. **Phổ ESI-MS** m/z : 587 [M+Na]⁺. **Phổ ¹H-NMR** (CD₃OD; 500 MHz): 6,21 (1H, d, $J=2$ Hz, H-6), 6,41 (1H, br s, H-8), 7,98 (2H, dd, $J=2,0; 6,5$ Hz, H-2'; H-6'), 6,95 (2H, dd, $J=2,0; 7,0$ Hz, H-3'; H-5'), 5,70 (1H, br s, H-1''), 4,44 (1H, dd, 1,0; 2,5 Hz, H-2''), 3,61 (2H, m, H-5''), 4,97 (1H, d, $J=1,5$ Hz, H-1'''), 1,25 (3H, d, $J=6,0$ Hz, H-6'''). **Phổ ¹³C-NMR** (CD₃OD; 125 MHz): 158,6 (C-2), 134,8 (C-3), 179,8 (C-4), 161,6 (C-5), 100,1 (C-6), 166,5 (C-7), 94,9 (C-8), 159,0 (C-9), 105,2 (C-10), 122,7 (C-1'), 131,9 (C-2'), 116,6 (C-3'), 161,6 (C-4'), 116,6 (C-5'), 131,9 (C-6'), 107,9 (C-1''), 88,4 (C-2''), 77,2 (C-3''), 87,9 (C-4''), 62,5 (C-5''), 101,3 (C-1'''), 72,3 (C-2'''), 72,2 (C-3'''), 73,9 (C-4'''), 70,5 (C-5'''), 17,9 (C-6''').



Hình 3.16. Cấu trúc hóa học của hợp chất 6



Hình 3.17. Cấu trúc hóa học của hợp chất 7

Chất số 8: Acid gallic

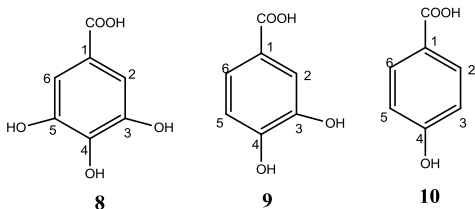
Tinh thể màu trắng, nhiệt độ nóng chảy 119-121°C. Phổ IR (cm^{-1}): 3285; 1704; 1618; 1540; 1445; 1248; 1027. Phổ ESI-MS m/z : 169 $[\text{M}-\text{H}]^-$. Phổ $^1\text{H-NMR}$ ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$; 500 MHz): 8,07 (2H, s, H-2, H-6). Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$; 125 MHz): 122,8 (C-1), 110,5 (C-2), 147,5 (C-3), 140,4 (C-4), 147,5 (C-5), 110,5 (C-6), 169,6 (COOH).

Chất số 9: Acid protocatechuic

Bột màu trắng, nhiệt độ nóng chảy 209-211°C. Phổ IR (cm^{-1}): 3369; 1678; 1600; 1469; 1301. Phổ ESI-MS m/z : 153 $[\text{M}-\text{H}]^-$. Phổ $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 ; 500 MHz): 7,33 (1H, d, $J=2,0$ Hz, H-2), 6,78 (1H, d, $J=8,0$ Hz, H-5), 7,28 (1H, dd, $J=2,0$; 8,0 Hz, H-6). Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 ; 125 MHz): 121,9 (C-1), 116,6 (C-2), 144,9 (C-3), 150,0 (C-4), 115,9 (C-5), 121,7 (C-6), 167,4 (COOH).

Chất số 10: Acid *p*-hydroxybenzoic

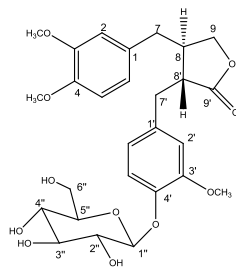
Bột màu trắng, nhiệt độ nóng chảy 211-213°C. Phổ IR (cm^{-1}): 3495; 1658; 1588; 1427; 1266; 1173. Phổ ESI-MS m/z : 137 $[\text{M}-\text{H}]^-$. Phổ $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD ; 500 MHz): 7,90 (2H, dd, $J=1,5$; 7,0 Hz, H-2; H-6), 6,84 (2H, dd, $J=1,5$; 7,0 Hz, H-3; H-5). Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD ; 125 MHz): 122,7 (C-1), 133,0 (C-2), 116,0 (C-3), 163,3 (C-4), 116,0 (C-5), 133,0 (C-6), 170,1 (COOH).



Hình 3.18. Cấu trúc hóa học của các hợp chất 8-10

Chất số 11: Arctiin

Bột màu trắng, nhiệt độ nóng chảy 112-114°C. Phổ IR (cm^{-1}): 3409; 2924; 1760; 1598; 1457; 1267; 1030. Phổ ESI-MS m/z : 557 $[\text{M}+\text{Na}]^+$. Phổ CD (MeOH, c 0,1): $\Delta\epsilon_{\text{min}}$ (231 nm) = -16,41, $\Delta\epsilon_{\text{min}}$ (276 nm) = -1,85. Phổ $^1\text{H-NMR}$ ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$; 500 MHz): 6,73 (1H, d, $J=1,5$ Hz, H-2), 6,88 (1H, d, $J=8$ Hz, H-5), 6,69 (1H, dd, $J=2,0$; 8,0 Hz, H-6), 6,98 (1H, d, $J=2,0$ Hz, H-2'), 7,52 (1H, d, $J=8,5$ Hz, H-5'), 6,83 (1H, dd, $J=2,0$; 8,0, H-6'), 5,61 (1H, d, $J=7,0$ Hz, H-1').



Hình 3.19. Cấu trúc hóa học của hợp chất 11

4,15 - 4,50 (5H, H-2"; H-3"; H-4"; H-5"; H-6"), 3,90 - 4,06 (2H, m, H-9), 3,03 (2H, m, H-7'), 2,69 - 2,80 (2H, m, H-7), 2,57 (1H, m, H-8'), 2,53 (1H, m, H-8). **Phổ $^{13}\text{C-NMR}$** ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$; 125 MHz): 132,6 (C-1), 112,7 (C-2), 150,3 (C-3), 148,7 (C-4), 114,3 (C-5), 121,2 (C-6), 37,9 (C-7), 41,6 (C-8), 71,3 (C-9), 131,6 (C-1'), 113,2 (C-2'), 150,1 (C-3'), 146,9 (C-4'), 116,4 (C-5'), 122,3 (C-6'), 34,6 (C-7'), 46,6 (C-8'), 178,9 (C-9'), 102,5 (C-1''), 74,8 (C-2''), 78,5 (C-3''), 71,4 (C-4''), 78,8 (C-5''), 62,3 (C-6''), 60,0 (3-OCH₃), 60,0 (3'-OCH₃), 55,9 (4'-OCH₃).

Chất số 12: β -sitosterol

Chất số 13: Daucosterol

Chất số 14: Acid ursolic

Bột màu trắng, nhiệt độ nóng chảy 260-262°C.

Phổ IR (cm^{-1}): 3419, 2931, 1693, 1458, 1247, 1097,

1038. Phổ APCI-MS m/z : 455 [M-H]⁻. **Phổ $^1\text{H-NMR}$**

($\text{CD}_3\text{OD}+\text{CDCl}_3$; 500 MHz): 5,14 (1H, t,

$J=4,0$ Hz, H-12), 3,07 (1H, dd, $J=4,5$; 11,0 Hz, H-

3), 2,11 (1H, d, $J=11,5$ Hz, H-18), 1,01 (3H, s, H-

27), 0,87 (3H, s, H-23), 0,86 (3H, s, H-25), 0,75

(3H, s, H-26), 0,68 (3H, s, H-24), 0,89 (3H, d,

$J=6,5$ Hz, H-29), 0,79 (3H, d, $J=6,5$ Hz, H-30).

Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{CD}_3\text{OD}+\text{CDCl}_3$; 125 MHz): 39,5 (C-1), 27,6 (C-2), 79,4 (C-3),

39,7 (C-4), 56,3 (C-5), 19,2 (C-6), 28,6 (C-7), 40,4 (C-8), 48,5 (C-9), 37,7 (C-

10), 24,1 (C-11), 126,5 (C-12), 139,2 (C-13), 42,9 (C-14), 34,0 (C-15), 25,1 (C-

16), 48,5 (C-17), 53,9 (C-18), 39,9 (C-19), 40,1 (C-20), 31,5 (C-21), 37,8 (C-

22), 28,9 (C-23), 17,5 (C-24), 16,2 (C-25), 15,9 (C-26), 24,1 (C-27), 181,4 (C-

28), 17,6 (C-29), 21,5 (C-30).

Chất số 15: Acid oleanolic

Bột màu trắng, nhiệt độ nóng chảy 307-

309°C. Phổ IR (cm^{-1}): 3426, 2934, 1697, 1169,

1034. Phổ ESI-MS m/z : 455 [M-H]⁻. **Phổ $^1\text{H-NMR}$**

($\text{CD}_3\text{OD}+\text{CDCl}_3$; 500 MHz): 3,17 (1H,

dd, $J=5,0$; 11,5 Hz, H-3), 5,26 (1H, t, $J=3,5$ Hz,

H-12), 2,85 (1H, dd, $J=4,0$; 14,0 Hz, H-18), 0,98

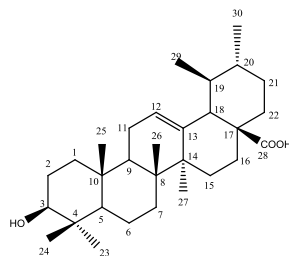
(3H, s, H-23), 0,78 (3H, s, H-24), 0,94 (3H, s,

H-25), 0,82 (3H, s, H-26), 1,17 (3H, s, H-27),

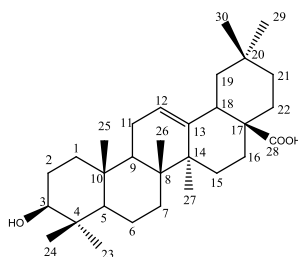
0,95 (3H, s, H-29), 0,91 (3H, s, H-30). **Phổ**

$^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{CD}_3\text{OD}+\text{CDCl}_3$; 125 MHz): δ_{C}

39,6 (C-1), 28,6 (C-2), 79,5 (C-3), 40,3 (C-4), 56,5 (C-5), 19,3 (C-6), 33,5 (C-



Hình 3.22. Cấu trúc hóa học của hợp chất 14



Hình 3.23. Cấu trúc hóa học của hợp chất 15

7), 40,3 (C-8), 48,7 (C-9), 37,9 (C-10), 23,9 (C-11), 123,4 (C-12), 144,9 (C-13), 42,4 (C-14), 28,6 (C-15), 24,0 (C-16), 47,0 (C-17), 42,7 (C-18), 47,4 (C-19), 31,4 (C-20), 34,7 (C-21), 33,8 (C-22), 28,6 (C-23), 16,2 (C-24), 15,8 (C-25), 17,6 (C-26), 26,4 (C-27), 181,6 (C-28), 33,5 (C-29), 24,3 (C-30).

Chất số 16: Acid maslinic

Bột màu trắng, nhiệt độ nóng chảy 246-248°C.

Phổ IR (cm⁻¹): 3454; 2930; 1691; 1616; 1270;

1048. Phổ ESI-MS *m/z*: 495 [M+Na]⁺. **Phổ ¹H-NMR**

(CD₃OD+CDCl₃; 500 MHz): 5,28 (1H, br s, H-12), 3,64 (1H, m, H-2), 2,95 (1H, d, *J*=9,5 Hz, H-3), 2,83 (1H, m, H-18), 1,15 (3H, s, H-27), 1,02

(3H, s, H-23), 0,99 (3H, s, H-25), 0,94 (3H, s, H-30), 0,91 (3H, s, H-29), 0,81 (3H, s, H-24), 0,80

(3H, s, H-26). **Phổ ¹³C-NMR** (CD₃OD+CDCl₃;

125 MHz): 46,1 (C-1), 68,2 (C-2), 83,1 (C-3),

38,9 (C-4), 55,0 (C-5), 18,0 (C-6), 33,6 (C-7), 39,0 (C-8), 47,4 (C-9), 37,9 (C-

10), 22,7 (C-11), 121,8 (C-12), 143,7 (C-13), 41,5 (C-14), 27,3 (C-15), 22,7 (C-

16), 46,0 (C-17), 41,0 (C-18), 45,7 (C-19), 30,3 (C-20), 33,4 (C-21), 32,3 (C-

22), 28,2 (C-23), 16,5 (C-24), 16,1 (C-25), 16,3 (C-26), 25,5 (C-27), 180,5 (C-

28), 32,7 (C-29), 23,2 (C-30).

Chất số 17: β-amyrin

Bột màu trắng, nhiệt độ nóng chảy 189-191°C.

Phổ IR (cm⁻¹): 3423; 2939; 1646; 1185; 1044. Phổ

APCI-MS *m/z*: 425 [M-H]⁻. **Phổ ¹H-NMR** (C₅D₅N;

500 MHz): 5,25 (1H, t, *J*=3,5 Hz, H-12), 3,44 (1H,

dd, *J*=5,5; 10,5 Hz, H-3), 1,24 (3H, s, H-27), 1,21

(3H, s, H-28), 1,05 (3H, s, H-26), 1,00 (3H, s, H-

24), 0,96 (3H, s, H-29), 0,90 (3H, s, H-23), 0,89

(3H, s, H-25), 0,91 (3H, s, H-30). **Phổ ¹³C-NMR**

(C₅D₅N; 125 MHz): 39,4 (C-1), 28,7 (C-2), 78,1

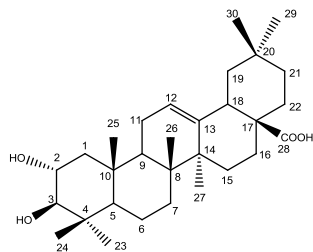
(C-3), 39,1 (C-4), 55,7 (C-5), 18,8 (C-6), 33,0 (C-7), 40,1 (C-8), 47,5 (C-9),

37,2 (C-10), 23,9 (C-11), 122,3 (C-12), 145,2 (C-13), 41,9 (C-14), 26,2 (C-15),

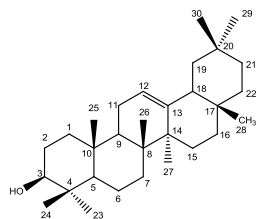
26,4 (C-16), 32,7 (C-17), 48,0 (C-18), 47,5 (C-19), 31,2 (C-20), 34,9 (C-21),

37,4 (C-22), 28,7 (C-23), 15,7 (C-24), 16,5 (C-25), 17,0 (C-26), 23,9 (C-27),

28,6 (C-28), 33,4 (C-29), 23,8 (C-30).



Hình 3.24. Cấu trúc hóa học của hợp chất 16



Hình 3.25. Cấu trúc hóa học của hợp chất 17

Chất số 18: lup-20(29)-en-3 β ,6 α -diol

Tinh thể màu trắng, nhiệt độ nóng chảy 147-149°C. Phổ IR (cm⁻¹): 3426; 2951; 1644; 1601; 1048. Phổ ESI-MS *m/z*: 441 [M-H]⁻.

Phổ ¹H-NMR (CDCl₃; 500 MHz): 4,69 (1H, br s, H-29), 4,57 (1H, br s, H-29), 3,17 (1H, dd, *J*=4,0; 11,0 Hz, H-3). Phổ ¹³C-NMR (CDCl₃; 125 MHz): 38,5 (C-1), 27,0 (C-2),

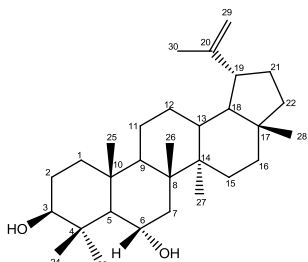
78,7 (C-3), 39,1 (C-4), 60,6 (C-5), 68,9 (C-6), 46,8 (C-7), 42,1 (C-8), 49,9 (C-9), 39,3 (C-10), 20,8 (C-11), 25,0 (C-12), 37,6 (C-

13), 43,0 (C-14), 27,4 (C-15), 35,5 (C-16), 42,9 (C-17), 48,2 (C-18), 47,9 (C-19), 150,8 (C-20), 29,8 (C-21), 39,9 (C-22), 30,9 (C-23), 15,5 (C-24), 17,2 (C-25), 17,5 (C-26), 14,5 (C-27), 18,0 (C-28), 109,4 (C-29), 19,3 (C-30).

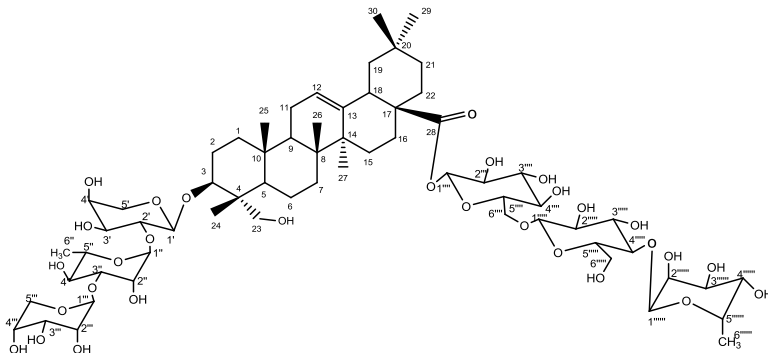
Chất số 19: Huzhangoside D

Bột màu trắng, nhiệt độ nóng chảy 220-224°C. Phổ IR (cm⁻¹): 3455; 2923; 1651; 1063. Phổ ESI-MS *m/z*: 1351 [M-H]⁻. Phổ ¹H-NMR (C₅D₅N; 500 MHz): 4,26 (1H, overlap, H-3), 3,90 (1H, m, H-23), 1,09 (3H, s, H-24), 0,92 (3H, s, H-25), 1,06 (3H, s, H-26), 1,15 (3H, s, H-27), 0,82 (3H, s, H-29), 0,84 (3H, s, H-30), 5,03 (1H, d, *J*=6,5 Hz, H-1'), 6,28 (1H, br s, H-1''), 1,51 (1H, d, *J*=6,5 Hz, H-6''), 5,90 (1H, d, *J*=4,5 Hz, H-1'''), 6,18 (1H, d, *J*=8,0 Hz, H-1'''), 4,94 (1H, d, *J*=7,5 Hz, H-1'''), 4,63 (1H, br s, H-1'''), 1,65 (1H, d, *J*=6,5 Hz, H-6''').

Phổ ¹³C-NMR (C₅D₅N; 125 MHz): 39,0 (C-1), 26,3 (C-2), 81,0 (C-3), 43,5 (C-4), 47,6 (C-5), 18,1 (C-6), 32,7 (C-7), 39,8 (C-8), 48,1 (C-9), 36,8 (C-10), 23,7 (C-11), 122,8 (C-12), 144,0 (C-13), 42,0 (C-14), 28,2 (C-15), 23,2 (C-16), 46,9 (C-17), 41,6 (C-18), 46,1 (C-19), 30,6 (C-20), 33,9 (C-21), 32,4 (C-22), 63,9 (C-23), 14,0 (C-24), 16,1 (C-25), 17,5 (C-26), 26,0 (C-27), 176,5 (C-28), 33,0 (C-29), 23,6 (C-30), 104,6 (C-1'), 75,0 (C-2'), 75,2 (C-3'), 69,7 (C-4'), 66,2 (C-5'), 101,2 (C-1''), 71,9 (C-2''), 81,1 (C-3''), 72,7 (C-4''), 69,6 (C-5''), 18,4 (C-6''), 104,5 (C-1'''), 72,6 (C-2'''), 68,9 (C-3'''), 70,1 (C-4'''), 65,1 (C-5'''), 95,5 (C-1'''), 73,8 (C-2'''), 78,5 (C-3'''), 70,7 (C-4'''), 77,9 (C-5'''), 69,0 (C-6'''), 104,5 (C-1'''), 75,2 (C-2'''), 76,4 (C-3'''), 78,2 (C-4'''), 77,0 (C-5'''), 61,2 (C-6'''), 102,6 (C-1'''), 72,5 (C-2'''), 72,7 (C-3'''), 73,8 (C-4'''), 70,2 (C-5'''), 18,3 (C-6''').



Hình 3.26. Cấu trúc hóa học của hợp chất 18



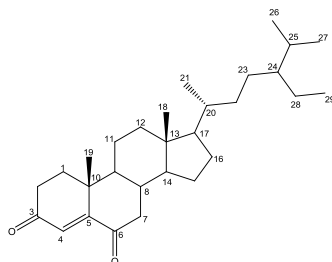
Hình 3.27A. Cấu trúc hóa học của hợp chất **19**

Chất số 20: Stigmast-4-en-3,6-dion

Tinh thể màu trắng, nhiệt độ nóng chảy 165-168°C. Phổ IR (cm^{-1}): 2966; 1685; 1604; 1245; 1127. Phổ ESI-MS m/z : 427 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Phổ $^1\text{H-NMR}$ ($\text{CDCl}_3+\text{DMSO-}d_6$; 500 MHz): 6,00 (1H, s, H-4), 0,72 (3H, s, H-18), 1,16 (3H, s, H-19), 0,94 (3H, d, $J=6,5$ Hz, H-25), 0,81 (3H, d, $J=7,0$ Hz, H-26), 0,83 (3H, d, $J=7,0$ Hz, H-27), 0,84 (3H, t, $J=7,0$ Hz, H-29).

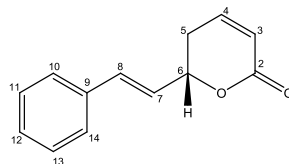
Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{CDCl}_3+\text{DMSO-}d_6$; 125 MHz): δ_{C} 35,3 (C-1), 33,9 (C-2), 199,2 (C-3), 125,1 (C-4), 161,2 (C-5), 201,9 (C-6), 46,6 (C-7), 34,0 (C-8), 50,5 (C-9), 39,7 (C-10), 20,8 (C-11), 39,1 (C-12), 42,5 (C-13), 56,3 (C-14), 29,8 (C-15), 23,9 (C-16), 55,7 (C-17), 12,1 (C-18), 17,5 (C-19), 35,9 (C-20), 18,8 (C-21), 33,8 (C-22), 25,9 (C-23), 29,1 (C-24), 45,7 (C-25), 19,2 (C-26), 20,0 (C-27), 23,0 (C-28), 11,9 (C-29).



Hình 3.28. Cấu trúc hóa học của hợp chất **20**

Chất số 21: Goniothalamin

Bột màu trắng, nhiệt độ nóng chảy 85-87°C. Phổ IR (cm^{-1}): 2968; 2919; 1721; 1651; 1455; 1276; 1114. Phổ APCI-MS m/z : 201 $[\text{M}+\text{H}]^+$. Phổ CD (MeOH, c 0,05): $\Delta\epsilon_{\text{max}}$ (257 nm)=5,97. **Phổ $^1\text{H-NMR}$** (CDCl_3 ; 500 MHz): 6,10 (1H, d, $J=9,5$ Hz, H-3), 6,92 (1H, dt, $J=3,5$; 8,5 Hz, H-4), 2,54 (2H, m, H-5), 5,08 (1H, m, H-6), 6,29 (1H, dd, $J=7,0$; 16,0 Hz, H-7), 6,73 (1H, d, $J=16,0$ Hz, H-8), 7,33 (5H, m, H-10; -11; -12; -13; -14). **Phổ $^{13}\text{C-NMR}$** (CDCl_3 ; 125 MHz): δ_{C} 163,8 (C-2), 121,7



Hình 3.29. Cấu trúc hóa học của hợp chất **21**

(C-3), 144,5 (C-4), 29,9 (C-5), 77,9 (C-6), 125,7 (C-7), 133,1 (C-8), 135,8 (C-9), 126,7 (C-10), 128,7 (C-11), 128,4 (C-12), 128,7 (C-13), 126,7 (C-14).

3.2.3. Định lượng các hợp chất chính trong dược liệu Gối hạc

Tiến hành phân tích, định lượng acid gallic (**8**) trong mẫu rễ, thân và định lượng đồng thời acid gallic; europetin-3-*O*- α -L-rhamnopyranosid (**4**) trong lá cây Gối hạc thu hái tại huyện Lạng Giang, tỉnh Bắc Giang. Kết quả cho thấy, hàm lượng trong rễ là cao nhất đạt 0,236%, tiếp là trong lá và trong thân lần lượt là 0,142% và 0,116%. Hàm lượng hợp chất europetin-3-*O*- α -L-rhamnopyranosid trong lá Gối hạc đạt 0,097%.

3.3. TÁC DỤNG SINH HỌC

3.3.1. Tác dụng chống oxy hóa

Bảng 3.25. Tác dụng chống oxy hóa *in vitro* của các mẫu chiết từ cây Gối hạc

Mẫu thử	Tác dụng dọn gốc IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)	
	DPPH	O ₂ ^{•-}
GHL	19,71 \pm 0,83	92,41 \pm 1,13
GHT	25,94 \pm 1,45	108,70 \pm 1,15
GHR	8,72 \pm 1,63	28,05 \pm 1,69
Myricitrin (3)	3,51 \pm 0,09	5,62 \pm 0,07
Europetin-3- <i>O</i> - α -L-rhamnopyranosid (4)	3,84 \pm 0,10	11,70 \pm 0,18
rhamnetin-3- <i>O</i> - α -L-rhamnopyranosid (5)	4,27 \pm 0,09	12,73 \pm 0,15
Juglanin (6)	4,62 \pm 0,14	13,62 \pm 0,19
Acid gallic (8)	0,80 \pm 0,05	1,74 \pm 0,06
Acid protocatechuic (9)	2,31 \pm 0,03	9,50 \pm 0,15
Acid <i>p</i> -hydroxybenzoic (10)	>50	>50
Quercetin ^a	2,14 \pm 0,03	4,11 \pm 0,08

a: Chất đối chứng dương

3.3.2. Hoạt tính ức chế hoạt động XO

Bảng 3.26. Tác dụng ức chế sự hoạt động enzym XO của Gối hạc

TT	Mẫu thử	IC ₅₀ ; $\mu\text{g/ml}$
1	GHL	100,50 \pm 1,39
2	GHT	40,95 \pm 2,12
3	GHR	18,39 \pm 0,96
4	Quercetin (2)	1,5 \pm 0,04
5	Acid gallic (8)	6,0 \pm 0,12
6	Europetin-3- <i>O</i> - α -L-rhamnopyranosid (4)	11,84 \pm 0,10
7	Allopurinol ^a	0,10 \pm 0,09

a: Chất đối chứng dương

3.3.3. Tác dụng chống viêm

3.3.3.1. Tác dụng ức chế sự hoạt động của enzym lipooxygenase (5-LOX)

Bảng 3.27. Tác dụng ức chế sự hoạt động 5- LOX của các mẫu chiết từ cây Gối hạc

TT	Mẫu thử	IC ₅₀ ; µg/ml
1	GHL	21,50 ± 1,04
2	GHT	24,95 ± 0,92
3	GHR	14,37 ± 0,86
4	Europetin-3- <i>O</i> - α -L-rhamnopyranosid (4)	3,21 ± 1,03
5	Acid gallic (8)	7,02 ± 0,33
6	Quercetin ^a	2,10 ± 0,91

a: Chất đối chứng dương

3.3.3.2. Tác dụng ức chế sự hoạt động của enzym cyclooxygenase (COX-1, COX-2)

Bảng 3.28. Hoạt tính ức chế enzym COX-1, COX-2 của các mẫu chiết từ cây Gối hạc

TT	Mẫu thử	IC ₅₀ (µg/ml)	
		Khả năng ức chế enzym COX-1	Khả năng ức chế enzym COX-2
1	GHL	35,35 ± 0,58	26,89 ± 0,26
2	GHR	40,78 ± 0,42	30,10 ± 0,31
3	Quercetin (2)	5,14 ± 0,11	1,37 ± 0,13
4	Diclofenac ^a	6,22 ± 0,39	2,80 ± 0,09

a: Chất đối chứng dương

3.3.3.3. Tác dụng chống viêm cấp của cao Gối hạc trên mô hình gây phù bàn chân chuột bằng carrageenan

Bảng 3.29. Ảnh hưởng của cao ethanol lá Gối hạc (GHL) và cao ethanol rễ Gối hạc (GHR) lên mức độ phù chân chuột (%) theo thời gian

Lô	n	Thông số	Thời điểm			
			Sau 1 giờ	Sau 3 giờ	Sau 5 giờ	Sau 7 giờ
Chứng	8	ΔV (%)	25,44±1,16	36,98±2,11	30,95±2,41	25,03±2,52
GHL (100mg/kg)	10	ΔV (%)	16,76±1,56*	24,39±3,50*	20,95±4,87	15,96±2,3
		I%	34,1	34,1	32,3	36,2
GHL (200mg/kg)	10	ΔV (%)	14,18±2,22*	20,37±2,66**	15,27±2,20**	21,73±3,00
		I%	44,3	44,9	50,7	13,2
GHR (100mg/kg)	10	ΔV (%)	17,06±1,75*	25,8±3,16*	21,73±3,33	22,99±2,69
		I%	32,9	30,2	29,8	8,2

GHR (200mg/kg)	10	ΔV (%)	19,19 \pm 1,99*	22,34 \pm 5,01**	22,34 \pm 4,10	25,54 \pm 3,55
		I%	24,6	39,6	27,8	—
IDMTC (10mg/kg)	8	ΔV (%)	13,36 \pm 1,85* *	10,1 \pm 1,69**	8,23 \pm 2,15* *	14,57 \pm 3,93*
		I%	47,5	72,7	73,4	41,8

*: $p < 0,05$ và **: $p < 0,01$ khi so sánh với lô chứng

Cao GHL liều 100 mg/kg có tác dụng ức chế phù bàn chân chuột tại các thời điểm 1 giờ và 3 giờ sau khi gây viêm, liều 200mg/kg có tác dụng ức chế phù bàn chân chuột tại các thời điểm 1 giờ, 3 giờ và 5 giờ sau khi gây viêm. Cao GHR liều 100 mg/kg có tác dụng ức chế phù bàn chân chuột tại các thời điểm 1 giờ và 3 giờ sau khi gây viêm, liều 200 mg/kg có tác dụng ức chế phù bàn chân chuột tại các thời điểm 1 giờ và 3 giờ sau khi gây viêm.

3.3.3.4. Tác dụng chống viêm mạn của cao Gối hạt trên mô hình gây u hạt thực nghiệm bằng bông

Bảng 3.30. Ảnh hưởng của cao ethanol GHL và cao ethanol GHR lên khối lượng u hạt trên chuột cống trắng

Lô	n	Thông số	Khối lượng u hạt tươi (mg)	Khối lượng u hạt khô (mg)
Chứng	8	TB	531,91 \pm 54,16	79,26 \pm 9,56
GHL (100mg/kg)	8	TB	372,94 \pm 35,21*	47,93 \pm 6,18**
		I%	29,9	40,1
GHL (200mg/kg)	8	TB	405,33 \pm 25,93*	59,69 \pm 3,50*
		I%	23,8	24,7
GHR (100mg/kg)	8	TB	574,25 \pm 57,59	71,76 \pm 7,29
		I%	-	9,5
GHR (200mg/kg)	8	TB	384,10 \pm 39,67*	57,24 \pm 7,18*
		I%	34,6	27,8
Prednisolon (5mg/kg)	8	TB	278,66 \pm 24,95 **	27,51 \pm 4,53**
		I%	47,6	65,3

*: $p < 0,05$ và **: $p < 0,01$ khi so sánh với lô chứng

Kết quả nghiên cứu cho thấy, cao GHL ở cả hai mức liều thử nghiệm đều làm giảm khối lượng u hạt tươi và khối lượng u hạt khô so với lô chứng. Cao GHR liều 100 mg/kg không thể hiện tác dụng chống viêm mạn nhưng liều 200 mg/kg làm giảm cả khối lượng u hạt tươi và u hạt khô so với chứng.

3.3.4. Tác dụng giảm đau

3.3.4.1. Tác dụng giảm đau trung ương của cao Gối hạc trên mô hình mâm nóng

Kết quả cho thấy, thời gian phản ứng với nhiệt độ của chuột uống cao ethanol lá và rễ Gối hạc ở tất cả các mức liều thử sau khi uống thuốc không khác biệt so với lô chứng. Lô chuột dùng codein mức liều 60 mg/kg có tác dụng kéo dài thời gian phản ứng với nhiệt độ của chuột so với lô chứng ($p < 0,01$).

3.3.4.2. Tác dụng giảm đau ngoại vi của cao Gối hạc trên mô hình gây đau quận bằng acid acetic

Bảng 3.32. Ảnh hưởng của cao ethanol lá Gối hạc (GHL) và cao rễ Gối hạc (GHR) đến số con quận đau của chuột nhắt trắng

Lô	n	Số cơn đau quận			Tổng số cơn đau quận
		0 – 10 phút	11 – 20 phút	21 – 30 phút	
Chứng	18	27 (21 – 39)	28 (24 – 35)	15 (12 – 21)	72 (55 – 96)
GHL 1 (100mg/kg)	18	17 (10 – 26)**	27 (15 – 34)	16 (11 – 24)	60 (35 – 84)
GHL 2 (200mg/kg)	18	17 (14 – 22)**	25 (19 – 29)*	12 (5 – 15)*	53 (39 – 64)**
GHL 3 (400mg/kg)	18	20 (10 – 34)*	23 (15 – 39)	15 (8 – 25)	56 (39 – 86)*
GHR 1 (100mg/kg)	20	19 (15 – 25)**	23 (19 – 29)*	13 (9 – 19)	54 (45 – 74)*
GHR 2 (200mg/kg)	18	23 (14 – 28)*	23 (18 – 29)*	13 (7 – 19)	59 (44 – 65)*
GHR 3 (400mg/kg)	20	18 (14 – 25)**	18 (14 – 25)**	12 (7 – 18)	55 (37 – 60)**
Indomethacin (10mg/kg)	20	14 (11 – 19)**	19 (14 – 27)**	10 (8 – 16)*	38 (34 – 65)**

*: $p < 0,05$ và **: $p < 0,01$ khi so sánh với lô chứng

3.3.5. Tác dụng ức chế enzym protease HIV-1

- Cao ethanol toàn phần lá và thân Gối hạc có tác dụng ức chế enzym protease HIV-1. Trong các cao phân đoạn, phân đoạn ethyl acetat của lá và thân cây Gối hạc và phân đoạn *n*-hexan lá Gối hạc có tác dụng tốt.

- Trong số các triterpen phân lập từ cây Gối hạc được thử nghiệm, hợp chất acid maslinic (**16**) có tác dụng ức chế enzym protease HIV-1 mạnh nhất ($IC_{50} = 4,3 \mu M$) sau đó đến acid ursolic (**14**) và lup-20(29)-en-3 β ,6 α -diol (**18**) với giá trị IC_{50} lần lượt là 6,2 μM và 33,1 μM . Hai hợp chất acid maslinic (**16**) và acid ursolic (**14**) được dùng làm đối chứng dương trong thí nghiệm này vì đã được chứng minh có tác dụng ức chế enzym protease HIV-1 trong các nghiên cứu trước đây. Các chất còn lại không có tác dụng hoặc có tác dụng yếu.

CHƯƠNG 4. BÀN LUẬN

4.1. VỀ THỰC VẬT HỌC

- Mẫu Gối hạc nghiên cứu có những đặc điểm chung của chi *Leea* Royen ex L. như cây bụi nhỏ; không có tua cuốn. Lá kép lông chim 2-3 lần, lá kèm dạng cánh ở mép cuống lá. Cụm hoa mọc ở đầu cành thành ngù, hoa lưỡng tính mẫu 5, nhị 5, đài dạng chuông, thùy đài hình tam giác, lá noãn 3 có vách ngăn, quả mọng, hạt có nội nhũ nhẵn. Ngoài ra, mẫu có những đặc điểm đặc trưng của loài *Leea rubra* Blume ex Spreng.: thân và cành không có gai, rễ phình to thành củ, lá kép 2-3 lần lông chim, lá chét hình trứng ngược, tràng hoa và đài hoa có màu đỏ đậm đến vàng, tràng cao 2,7-3 mm. Nhị lép là 5 phiến nhỏ dạng màng màu vàng, xếp xen kẽ với cánh hoa và chụm vào nhau thành một ống đứng cao khoảng 1 mm, gian thùy của ống nhị lép sâu.

- So sánh các đặc điểm chung của chi *Leea* cũng như đặc điểm đặc trưng của cây Gối hạc, với khóa phân loại chi *Leea* Royen ex L. của Van Welzen PC (thực vật chí Thái Lan) và Ridsdale CE (thực vật chí Malesiana) khẳng định mẫu nghiên cứu có tên khoa học là *Leea rubra* Blume ex Spreng.

- Đây là công trình đầu tiên mô tả đầy đủ cấu tạo giải phẫu và đặc điểm bột của lá, thân, rễ cây Gối hạc thu hái ở Việt Nam. Cùng với các đặc điểm hình thái của cây, lá, cụm hoa, hoa, quả, hạt thì các đặc điểm giải phẫu cũng là những dẫn liệu quan trọng giúp cho việc nghiên cứu kiểm nghiệm, thẩm định tính đúng của dược liệu Gối hạc khi cần thiết.

4.2. VỀ HÓA HỌC

- Đã phân lập được 21 hợp chất từ thân, lá của cây Gối hạc. Định tính bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng và HPLC so sánh với chất đối chiếu đã xác định sự có mặt 04 hợp chất từ thân và 03 hợp chất từ rễ. Mười tám hợp chất phân lập được từ lá (**1-17; 19**) bao gồm: kaempferol (**1**), quercetin (**2**), myricitrin (**3**), europetin-3-*O*- α -L-rhamnopyranosid (**4**), rhamnetin-3-*O*- α -L-rhamnopyranosid (**5**), juglanin (**6**), artabotrysid B (**7**), acid gallic (**8**), acid protocatechuic (**9**), acid *p*-hydroxybenzoic (**10**), arctiin (**11**), β -sitosterol (**12**), daucosterol (**13**), acid ursolic (**14**), acid oleanolic (**15**), acid maslinic (**16**), β -amyrin (**17**), huzhangosid D (**19**). Các hợp chất được biết có trong rễ bao gồm acid gallic (**8**), β -sitosterol (**12**), daucosterol (**13**). Các hợp chất có trong thân bao gồm acid gallic (**8**), acid protocatechuic (**9**), β -sitosterol (**12**), daucosterol (**13**), lup-20(29)-en-3 β ,6 α -diol (**18**), stigmast-4-en-3,6-dion (**20**), goniotalamin (**21**).

- Thành phần hóa học trong của cây Gối hạc rất đa dạng, thuộc nhiều nhóm khác nhau. Có 07 hợp chất flavonoid (**1-7**), 03 acid phenolic (**8-10**), 01 lignan glycosid (**11**), 03 phytosterol (**12-13, 20**), 05 triterpenoid (**14-18**), 01 saponin

triterpen (19), 01 styryldihydropyron (21). Hai nhóm hoạt chất chính có trong cây Gối hạc là flavonoid (07 hợp chất) và triterpenoid (05 hợp chất). Các hợp chất flavonoid trong cây Gối hạc đều thuộc nhóm flavonol. Các flavonoid glycosid được xác định là các flavonoid-*O*-glycosid với gốc đường được đính vào vị trí C-3 của khung aglycon. Các triterpenoid thuộc 03 khung cơ bản là ursan, olean và lupan.

- Đóng góp mới của luận án này: Có 18 hợp chất lần đầu tiên phân lập được từ loài *Leea rubra* gồm chất số: **1, 2, 4, 5, 6, 7, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21**. Trong số này có 10 hợp chất lần đầu tiên phân lập được từ chi *Leea* bao gồm các chất **4, 5, 6, 7, 11, 16, 18, 19, 20, 21**.

- Nghiên cứu về hóa học chỉ ra rằng trong lá cây Gối hạc có chứa rất nhiều hoạt chất đã được chứng minh là có tác dụng chống viêm, giảm đau. Điều này giúp định hướng cho việc thử hai tác dụng kể trên của lá Gối hạc. Các kết quả thu được sẽ tạo cơ sở khoa học cho việc sử dụng lá thay thế cho bộ phận dùng là rễ, góp phần khắc thác bền vững dược liệu Gối hạc.

4.3. VỀ TÁC DỤNG SINH HỌC

4.3.1. Về tác dụng chống oxy hóa

Các kết quả sàng lọc hoạt tính bước đầu cho thấy, cao Gối hạc cũng như một vài hợp chất phân lập được từ Gối hạc đều có khả năng chống oxy hóa *in vitro* tốt. Có thể thấy rằng Gối hạc là một nguyên liệu tiềm năng cho tác dụng chống oxy hóa. Đây là tiền đề, là cơ sở khoa học cho những nghiên cứu chuyên sâu tiếp theo về tác dụng oxy hóa, giúp mở ra các hướng nghiên cứu mới về tác dụng bảo vệ gan, tác dụng chống ung thư...của cây thuốc Gối hạc.

4.3.2. Về hoạt tính ức chế hoạt động XO

Cao ethanol rễ Gối hạc có hoạt tính ức chế hoạt động enzym XO mạnh nhất trong 03 mẫu cao nghiên cứu với giá trị IC_{50} là 18,39 $\mu\text{g/ml}$. Cao ethanol lá Gối hạc có tác dụng yếu với giá trị IC_{50} là 100,50 $\mu\text{g/ml}$. Hợp chất quercetin (2), acid gallic (8) và chất đối chứng dương allopurinol có hoạt tính ức chế mạnh hoạt động enzym XO với giá trị IC_{50} lần lượt là 1,50 $\mu\text{g/ml}$; 6,0 $\mu\text{g/ml}$ và 0,10 $\mu\text{g/ml}$. Đây là công trình đầu tiên nghiên cứu về tác dụng ức chế enzym XO của cây Gối hạc. Các kết quả giúp gợi mở hướng nghiên cứu thuốc mới từ rễ Gối hạc cho các bệnh chứng viêm, đau liên quan đến bệnh gout.

4.3.3. Về hoạt tính ức chế hoạt động enzym 5-lipoxygenase

Cao chiết ethanol của rễ, thân, lá Gối hạc đều có tác dụng ức chế enzym 5-LOX mạnh với giá trị IC_{50} lần lượt là 14,37; 24,95 và 21,50 $\mu\text{g/ml}$. Đối với các cao chiết từ dược liệu, khả năng ức chế 5-LOX được đánh giá thông qua giá trị IC_{50} : $IC_{50} < 10 \mu\text{g/ml}$ (tác dụng rất mạnh); $10 \mu\text{g/ml} < IC_{50} < 30 \mu\text{g/ml}$ (tác dụng mạnh); $31 \mu\text{g/ml} < IC_{50} < 50 \mu\text{g/ml}$ (tác dụng trung bình); $51 \mu\text{g/ml} < IC_{50} < 100$

µg/ml (tác dụng yếu). Như vậy, cao ethanol của cả rễ, thân và lá cây Gối hạc đều thể hiện tác dụng ức chế 5-LOX mạnh. Enzym LOX xúc tác cho sự hình thành các leukotrien đặc biệt là leukotrien B₄, một chất gây viêm khớp mạnh. Do đó, các kết quả nghiên cứu đã chứng minh tác dụng chữa thấp khớp theo kinh nghiệm dân gian của Gối hạc.

4.3.4. Về hoạt tính ức chế hoạt động COX

Hai mẫu cao GHL và GHR đều có tác dụng ức chế không chọn lọc trên cả 2 enzym COX-1, COX-2, khả năng ức chế COX-2 mạnh hơn COX-1. Giá trị IC₅₀ của cao GHL và GHR trên COX-1 lần lượt là 35,35 và 40,78 µg/ml và trên COX-2 lần lượt là 26,89 và 30,10 µg/ml. Kết quả nghiên cứu trên đây là cơ sở khoa học giúp chứng minh cơ chế tác dụng chống viêm, giảm đau của dược liệu Gối hạc trong dân gian. Ngoài ra, tác dụng tốt của cao ethanol lá Gối hạc cũng mở ra những hướng nghiên cứu mới cho việc sử dụng lá thay thế rễ trong điều trị các bệnh viêm khớp, đau khớp.

4.3.5. Về tác dụng giảm đau

- Kết quả nghiên cứu tác dụng giảm đau trung ương của hai mẫu cao Gối hạc trên mô hình mâm nóng với cả 3 mức liều không khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô chứng. Do vậy cao GHL và GHR ở cả 03 mức liều thử nghiệm không thể hiện tác dụng giảm đau theo cơ chế trung ương.

- Trong nghiên cứu đánh giá tác dụng giảm đau ngoại vi trên mô hình gây đau quận bằng acid acetic, các mẫu cao ethanol lá và rễ Gối hạc đều thể hiện tác dụng khá tốt, đặc biệt ở mức liều 200 mg/kg và 400 mg/kg (tính theo tổng số con quận đau trong 30 phút theo dõi). Acid acetic là nguyên nhân gián tiếp gây giải phóng các chất trung gian như bradykinin, serotonin, histamin, prostaglandin, chính những chất này gây ra đáp ứng đau quận. Cao Gối hạc đã được chứng minh trên *in vitro* có tác dụng ức chế một số enzym liên quan đến viêm như LO và COX. Như vậy, tác dụng giảm đau quận của các mẫu GHL và GHR có thể do sự ức chế sự hình thành các tác nhân gây viêm kể trên.

4.3.6. Về tác dụng chống viêm

- Trong nghiên cứu đánh giá tác dụng chống viêm cấp, các mẫu GHL và GHR ở hai mức liều thử nghiệm 100 mg/kg và 200 mg/kg đều thể hiện tác dụng giảm phù. Cao GHL liều 100 mg/kg có tác dụng ức chế phù bàn chân chuột tại các thời điểm 1 giờ và 3 giờ sau khi gây viêm, tỷ lệ ức chế phù bàn chân chuột so với chứng đều là 34,1% ($p < 0,01$) và $p < 0,05$). Cao lá Gối hạc liều 200 mg/kg có tác dụng ức chế phù bàn chân chuột tại các thời điểm 1 giờ, 3 giờ và 5 giờ sau khi gây viêm, tỷ lệ ức chế phù bàn chân chuột so với chứng lần lượt là 44,3% ($p < 0,01$), 44,9% ($p < 0,01$) và 50,7% ($p < 0,01$). Tuy nhiên, chỉ có mẫu GHL ở mức liều 200 mg/kg là có thể kéo dài tác dụng tới 5 giờ sau gây

viêm ($p < 0,01$). Với cùng mức liều 200 mg/kg thì GHL thể hiện tác dụng vượt trội hơn so với GHR ($p < 0,05$). Điều này mở ra một hướng mới trong việc sử dụng dược liệu Gối hạc. Bên cạnh sử dụng rễ như kinh nghiệm dân gian có thể hướng sang sử dụng lá để điều trị các bệnh liên quan đến viêm và đau.

- Trong nghiên cứu đánh giá tác dụng chống viêm mạn, cao GHL thể hiện tác dụng chống viêm mạn ở cả mức liều 100 mg/kg và 200 mg/kg với mức giảm khối lượng u hạt tươi và u hạt khô lần lượt là 29,9% ($p < 0,05$); 40,1% ($p < 0,01$) và 23,8% ; 24,7% ($p < 0,05$). Khi cùng sử dụng ở liều 100 mg/kg thì GHL thể hiện tác dụng vượt trội hơn so với GHR ($p < 0,01$ khi cân tươi, $p < 0,05$ khi khô). GHR khi dùng liều 100 mg/kg thì chưa thể hiện tác dụng chống viêm mạn, nhưng khi tăng mức liều lên 200 mg/kg thì đã thể hiện tác dụng chống viêm mạn khá tốt ($p < 0,05$). Thông qua các thử nghiệm đánh giá tác dụng giảm đau, chống viêm trên chuột đã chứng minh được tính khoa học của việc sử dụng rễ Gối hạc để chữa tiêu sưng, xung huyết và tê thấp, đau nhức xương khớp trong dân gian. Bên cạnh đó, cao chiết ethanol lá Gối hạc cũng thể hiện tác dụng tốt trong các thí nghiệm đánh giá tác dụng giảm đau ngoại vi, chống viêm cấp và chống viêm mạn (thậm chí còn tốt hơn so với cao ethanol rễ). Các kết quả này gợi mở ra những hướng mới trong nghiên cứu giúp khai thác hiệu quả dược liệu Gối hạc.

4.3.7. Về hoạt tính ức chế protease HIV-1

Cao ethanol toàn phần, cao phân đoạn ethyl acetat của lá, thân cây Gối hạc, cao phân đoạn *n*-hexan lá Gối hạc và 03 hợp chất bao gồm acid ursolic (**14**), acid maslinic (**16**), lup-20(29)-en-3 β ,6 α -diol (**18**) có tác dụng ức chế protease HIV-1 tốt. Như vậy có thể thấy rằng, lá và thân cây Gối hạc cũng như các hợp chất triterpenoid có trong thành phần là những nguồn nguyên liệu tiềm năng cho việc nghiên cứu, phát triển thuốc để điều trị HIV-AIDS.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

1. Về thực vật học

- Xác định được tên khoa học của cây Gối hạc thu hái tại Thanh Trì, Hà Nội và huyện Lạng Giang, tỉnh Bắc Giang là *Leea rubra* Blume ex Spreng., thuộc họ Gối hạc (Leeaceae).

- Đã mô tả được đặc điểm thực vật, phân tích lá, thân, rễ, hoa, quả, hạt và xác định đặc điểm giải phẫu lá, thân, rễ của cây Gối hạc phục vụ việc phân loại và xây dựng

2. Về hóa học

- Đã phân lập và xác định cấu trúc hóa học của 21 hợp chất (1-21) từ cây Gối hạc.

+ Các hợp chất được phân lập từ lá bao gồm: kaempferol (1), quercetin (2), myricitrin (3), europetin-3-*O*- α -L-rhamnopyranosid (4), rhamnetin-3-*O*- α -L-rhamnopyranosid (5), juglanin (6), artabotrysid B (7), acid gallic (8), acid protocatechuic (9), acid *p*-hydroxybenzoic (10), arctiin (11), β -sitosterol (12), daucosterol (13), acid ursolic (14), acid oleanolic (15), acid maslinic (16), β -amyrin (17), huzhangosid D (19).

+ Các hợp chất có trong rễ bao gồm acid gallic (8), β -sitosterol (12), daucosterol (13).

+ Các hợp chất có trong thân bao gồm acid gallic (8), acid protocatechuic (9), β -sitosterol (12), daucosterol (13), lup-20(29)-en-3 β ,6 α -diol (18), stigmast-4-en-3,6-dion (20), goniothalamine (21).

- 10 hợp chất lần đầu tiên phân lập được từ chi *Leea* gồm các chất số 4, 5, 6, 7, 11, 16, 18, 19, 20 và 21. Có 18 chất lần đầu tiên được phân lập từ loài *Leea rubra* bao gồm: 1, 2, 4, 5, 6, 7, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21.

Kết quả nghiên cứu về hóa học làm cơ sở để xây dựng các phương pháp định tính dấu vân tay, định lượng các hoạt chất trong dược liệu Gối hạc góp phần nhận dạng và kiểm soát chất lượng dược liệu.

- Đã xây dựng phương pháp định lượng acid gallic trong thân và rễ và định lượng đồng thời 2 chất acid gallic và europetin-3-*O*- α -L-rhamnopyranosid trong lá Gối hạc. Xác định được hàm lượng acid gallic (8) trong rễ, thân và lá Gối hạc lần lượt là 0,236%, 0,116% và 0,142%. Hàm lượng europetin-3-*O*- α -L-rhamnopyranosid (4) trong lá Gối hạc đạt 0,097%. Kết quả này cung cấp cơ sở khoa học cho việc nghiên cứu xây dựng tiêu chuẩn dược liệu Gối hạc.

3. Về tác dụng sinh học

- Cao GHR, GHL có tác dụng dọn gốc tự do DPPH với giá trị IC₅₀ lần lượt là 8,72 và 19,71 μ g/ml. Cao GHR có tác dụng dọn gốc tự do O₂^{•-} với giá trị IC₅₀ là 28,05 μ g/ml.

- Cao GHR có hoạt tính ức chế hoạt động của enzym xanthine oxidase với giá trị IC₅₀ là 18,39 μ g/ml.

- Cao Gối hạc có tác dụng ức chế một số enzym liên quan đến viêm:

+ Cao GHR, GHT, GHL đều có tác dụng ức chế sự hoạt động enzym 5-lipoxygenase với giá trị IC₅₀ lần lượt là 14,37; 24,95 và 21,50 μ g/ml.

+ Cao GHL và GHR có tác dụng ức chế sự hoạt động enzym COX-1 và COX-2 với giá trị IC₅₀ trên COX-1 lần lượt là 35,35 và 40,78 μ g/ml và trên COX-2 lần lượt là 26,89 và 30,10 μ g/ml.

Kết quả nghiên cứu góp phần tìm hiểu cơ chế tác dụng chống viêm của dược liệu Gối hạc thông qua con đường ức chế một số enzym liên quan đến viêm như XO, LOX, COX.

- Cao GHL, GHR có tác dụng giảm đau ngoại vi ở các mức liều 200 mg/kg và 400 mg/kg nhưng không có tác dụng giảm đau trung ương trên chuột nhắt trắng ở các mức liều trên.

- Cao GHL, GHR có tác dụng chống viêm cấp trên mô hình gây phù bàn chân chuột bằng carrageenan ở các mức liều 100 mg/kg và 200 mg/kg. Cao GHL có tác dụng chống viêm mạn trên mô hình gây u hạt thực nghiệm bằng bông ở cả hai mức liều thử nghiệm là 100 mg/kg và 200 mg/kg. Riêng cao GHR chỉ thể hiện tác dụng chống viêm mạn ở mức liều 200 mg/kg.

Các kết quả nghiên cứu đã chứng minh tác dụng chống viêm, giảm đau của dược liệu rễ Gối hạc trong dân gian, đặc biệt là trong bệnh viêm mạn. Nghiên cứu cũng cho thấy dược liệu lá Gối hạc cũng có tác dụng chống viêm, giảm đau và có phần nhỉnh hơn rễ, điều đó mở ra triển vọng thay thế dược liệu rễ bằng lá để điều trị chứng bệnh viêm, đau góp phần khai thác bền vững dược liệu Gối hạc.

- Cao ethanol toàn phần, cao phân đoạn ethyl acetat lá và thân cũng như cao phân đoạn *n*-hexan lá Gối hạc có hoạt tính ức chế enzym protease HIV-1. Ba hợp chất triterpen bao gồm acid ursolic (**14**), acid maslinic (**16**) và lup-20(29)-en-3 β ,6 α -diol (**18**) phân lập được từ lá và thân Gối hạc có tác dụng ức chế protease HIV-1 mạnh với giá trị IC₅₀ lần lượt là 6,2 μ M; 4,3 μ M và 33,1 μ M.

KIẾN NGHỊ

- Nghiên cứu độc tính cấp, độc tính trường diễn của cao chiết cây Gối hạc
- Nghiên cứu, phát triển chế phẩm thuốc mới từ lá và rễ Gối hạc với tác dụng chống viêm, giảm đau phục vụ chăm sóc sức khỏe cộng đồng.

CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN TIẾN SĨ DƯỢC HỌC

- 1. Nguyễn Thị Phương**, Trịnh Thị Nga, Ngô Quốc Luật, Nguyễn Minh Khởi, Phương Thiện Thương (2013), Nghiên cứu đặc điểm thực vật của cây gổi hạc, *Tạp chí Dược liệu*, 18(2), 118-123.
- 2. Nguyễn Thị Phương**, Vũ Văn Tuấn, Phương Thiện Thương, Nguyễn Minh Khởi. (2014), Flavonoid phân lập từ lá của cây gổi hạc tía, *Tạp chí Dược liệu*, 19(2), 110-115.
- 3. Nguyen Thi Phuong**, Vu Van Tuan, Pham Huy Bach, Nguyen Minh Khoi, Phuong Thien Thuong (2014), Triterpenes from the leaves of *Leea rubra* Blume ex Spreng., *Journal of Medicinal Materials*, 19(5), 307-310.
- 4. Nguyễn Thị Phương**, Vũ Văn Tuấn, Phương Thiện Thương, Phạm Giang Nam, Hoàng Văn Hùng, Nguyễn Minh Khởi (2015), Các hợp chất phenolic phân lập từ lá cây gổi hạc, *Tạp chí Dược liệu*, 20(6), 353-358.
- 5. Nguyễn Thị Phương**, Nguyễn Thùy Dương, Đậu Thị Giang, Nguyễn Minh Khởi, Phương Thiện Thương (2016), Nghiên cứu tác dụng giảm đau và chống viêm của cây Gổi hạc, *Tạp chí Dược học*, số 481, tr 34-37, 44.