BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO BỘ Y TẾ

VIỆN DƯỢC LIỆU

TRẦN THỊ THÙY LINH

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

LUẬN ÁN TIẾN SĨ DƯỢC HỌC

HÀ NỘI, 2023

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO BỘ Y TẾ

VIỆN DƯỢC LIỆU

TRẦN THỊ THÙY LINH

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

LUẬN ÁN TIẾN SĨ DƯỢC HỌC

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

Người hướng dẫn khoa học:

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

HÀ NỘI – 2023

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan:

Đây là công trình nghiên cứu của riêng tôi dưới sự hướng dẫn khoa học của GS. TS. Nguyễn Thị Hoài và PGS. TS. Lê Việt Dũng. Các kết quả thu được trong luận án hoàn toàn trung thực và chưa được ai công bố trong bất kỳ công trình nào khác.

Tác giả luận án

Trần Thị Thùy Linh

LỜI CẢM ƠN

Trong quá trình nghiên cứu và hoàn thành luận án, tôi đã nhận được sự giúp đỡ vô cùng quý báu của các thầy cô giáo, các nhà khoa học thuộc nhiều lĩnh vực cùng đồng nghiệp, bạn bè và gia đình.

Trước hết, tôi xin bày tỏ lòng kính trọng và biết ơn sâu sắc tới **GS. TS. Nguyễn Thị Hoài** và **PGS. TS. Lê Việt Dũng**, những người Cô, Thầy đã trực tiếp hướng dẫn, hết lòng chỉ bảo tận tình và động viên tôi trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu khoa học.

Trong quá trình thực hiện luận án, tôi đã luôn nhận được sự giúp đỡ của các cơ quan, đơn vị và cá nhân. Tôi xin chân thành cảm ơn Ban lãnh đạo, các Khoa, Phòng và các đồng nghiệp tại Viện Dược liệu; Trường Đại học Y - Dược, Đại học Huế; Viện Hóa học, Viện Công nghệ sinh học, Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật thuộc Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã giúp đỡ, tạo điều kiện để giúp tôi trong suốt quá trình thực hiện nghiên cứu.

Tôi xin bày tỏ lòng cảm ơn chân thành tới PGS. TS. Phạm Thị Nguyệt Hằng - Viện Dược liệu, PGS. TS. Hồ Việt Đức - Trường Đại học Y - Dược, Đại học Huế, PGS. TS. Đỗ Thị Thảo - Viện Công nghệ sinh học, TS. Đặng Vũ Lương - Viện hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã giúp đỡ tôi trong quá trình nghiên cứu thực nghiệm và hoàn thiện luận án.

Cuối cùng xin cảm ơn sâu sắc tới những người thân yêu trong gia đình; cảm ơn những bạn bè thân thiết đã dành cho tôi những tình cảm, sự động viên, giúp đỡ trong suốt thời gian qua.

Tôi xin trân trọng cảm ơn !

Hà Nội, ngày…tháng…năm 2023

Tác giả luận án

Trần Thị Thùy Linh

MỤC LỤC

LỜI CẢM ƠN
MỤC LỤC
DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CHỮ VIẾT TẮT i
DANH MỤC CÁC BẢNG, BIỂU iv
DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ v
ĐẶT VẤN ĐỀ 1
Phần 1. TỔNG QUAN 3
1.1. Giới thiệu về chi *Pogostemon* Desf. 3
1.1.1. Vị trí phân loại 3
1.1.2. Khái quát về thực vật học 4
1.1.3. Thành phần hóa học 9
1.1.4. Hoạt tính sinh học 18
1.1.5. Công dụng trong Y học cổ truyền 24
1.2. Giới thiệu về loài *Pogostemon auricularius* (L.) Hassk. 25
1.2.1. Thành phần hóa học 26
1.2.2. Hoạt tính sinh học và độc tính 27
1.2.3. Công dụng trong Y học cổ truyền 28
Phần 2. ĐỐI TƯỢNG, NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU 30
2.1. Đối tượng nghiên cứu 30
2.2. Vật liệu nghiên cứu 30
2.2.1. Dung môi - Hóa chất 30
2.2.2. Trang thiết bị, dụng cụ 31
2.2.3. Động vật thực nghiệm 33
2.2.4. Tế bào thực nghiệm 33
2.3. Phương pháp nghiên cứu 33
2.3.1. Sơ đồ thiết kế nghiên cứu 33
2.3.2. Phương pháp nghiên cứu thực vật 34
2.3.3. Phương pháp nghiên cứu thành phần hóa học 34
2.3.4. Phương pháp nghiên cứu độc tính cấp và tác dụng sinh học 37
2.3.5. Phương pháp xử lý số liệu 44
Phần 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU 45
3.1. Kết quả giám định tên khoa học 45

3.1.1. Đặc điểm hình thái 45
3.1.2. Giám định tên khoa học 46
3.2. Kết quả nghiên cứu về thành phần hóa học 47
3.2.1. Kết quả định tính các nhóm hợp chất bằng phản ứng hóa học 47
3.2.2. Chiết xuất và phân lập các hợp chất 49
3.2.3. Xác định cấu trúc của hợp chất đã phân lập 53
3.3. Kết quả nghiên cứu về độc tính cấp và tác dụng sinh học 91
3.3.1. Hoạt tính chống viêm 91
3.3.2. Hoạt tính gây độc tế bào ung thư 95
3.3.3. Độc tính cấp 100
Phần 4. BÀN LUẬN 102
4.1. Về thực vật học 102
4.2. Về thành phần hóa học 104
4.2.1. Về kết quả định tính 105
4.2.2. Về kết quả chiết xuất, phân lập và xác định cấu trúc các hợp chất 105
4.3. Về độc tính cấp và hoạt tính sinh học 112
4.3.1. Tác dụng chống viêm 113
4.3.2. Tác dụng gây độc tế bào ung thư 116
4.3.3. Độc tính cấp 119
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ 122
TÀI LIỆU THAM KHẢO

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CHỮ VIẾT TẮT

Ký hiệu	Tiếng Anh	Diễn giải
^{1}H-NMR	Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân proton
^{13}C-NMR	Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân carbon 13
AGS	Human gastric carcinoma	Tế bào ung thư dạ dày người
Bcl-2	B-cell lymphoma 2	Protein lymphoma tế bào B-2
CC	Column Chromatography	Sắc ký cột
CD	Circular Dichroism Spectroscopy	Phổ lưỡng sắc tròn
CFS	Colony stimulating factor	Yếu tố kích thích tạo cụm
CMC	Carboxymethyl Cellulose	
COSY	Correlation Spectroscopy	Phổ tương tác hai chiều ^{1}H-^{1}H
COX-1	Cyclooxygenase-1	Enzym cyclooxygenase 1
COX-2	Cyclooxygenase-2	Enzym cyclooxygenase 2
CTPT		Công thức phân tử
DBE	Double bond equivalent	Giá trị tương đương liên kết đôi
DEVD-pNA	N-acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-p-Nitroanilide	Cơ chất DEVD-pNA
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium	
DMSO	Dimethylsulfoxide	
EtOAc	Ethyl acetate	
ECD	Electronic Circular Dichroism	Phổ lưỡng sắc tròn điện tử
FBS	Fetal bovine serum	Huyết thanh bào thai bò
HeLa	Human cervical carcinoma	Tế bào ung thư cổ tử cung người
Hep-G2	Human hepatocellular carcinoma	Tế bào ung thư gan người
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid	
HL-60	Human acute myelocytic leukemia	Tế bào ung thư bạch cầu người
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation	Phổ tương tác dị hạt nhân qua nhiều liên kết

HR-ESI-MS	High Resolution - Electron Spray Ionization - Mass Spectrometry	Phổ khối phân giải cao ion hóa phun mù điện tử
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence	Phổ tương tác dị hạt nhân qua một liên kết
IC_{50}	Inhibitory Concentration 50%	Nồng độ ức chế 50%
IL	Interleukine	
J (Hz)		Hằng số tương tác tính bằng Hz
KB	Human epidermoid carcinoma	Tế bào ung thư biểu mô người
LD_{50}	Lethal Dose 50	Liều gây chết 50%
L-NMMA	N^G-Methyl-L-arginin acetate	
LPS	Lipopolysaccharide	
LU-1	Human lung carcinoma	Tế bào ung thư phổi người
MBC	Minimum Bactericidal Concentration	Nồng độ diệt khuẩn tối thiểu
MeOH	Methanol	
MFC	Minimum Effective Concentration	Nồng độ hiệu quả tối thiểu
MIC	Minimum Inhibitory Concentration	Nồng độ ức chế tối thiểu
MMFF	Merck molecular force field	Trường lực phân tử Merck
MTP	Mitochondrial Permeability Transition	
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide	
NO	Nitric oxide	
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy	Phổ hiệu ứng hạt nhân Overhauser
OD	Optical Density	Mật độ quang
PBS	Phosphat buffered saline	
PI	Propidium iodide	
PHPLC	Preparative High Performance Liquid Chromatography	Sắc ký lỏng hiệu năng cao điều chế
PCM	Polarizable continuum model	Mô hình phân cực liên tục
RAW 264.7	Mouse macrophage	Đại thực bào chuột
SRB	Sulforhodamine B	
SW-480	Human colon adenocarcinoma	Tế bào ung thư ruột kết người

TCA	Acid tricloracetic	
TGF	Transforming growth factor	Yếu tố tăng trưởng chuyển dạng
TLC	Thin Layer Chromatography	Sắc ký bản mỏng
TDDFT	Time-dependent density-functional theory	Hàm mật độ phụ thuộc thời gian
TMB	3,3′,5,5′-Tetramethylbenzidine	
TMS	Tetramethylsilane	
TNF-α	Tumor Necrosis Factor	Yếu tố hoại tử khối u
TNFR1	Tumor Necrosis Factor Receptor 1	Thụ thể yếu tố hoại tử khối u 1
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan	

DANH MỤC CÁC BẢNG, BIỂU

Bảng 1.1. Phân bố của các loài thuộc chi *Pogostemon* Desf. ở Việt Nam.....4
Bảng 1.2. Khóa định loại các loài của chi *Pogostemon* Desf. ở Việt Nam 7
Bảng 1.3. Thành phần chính trong tinh dầu của một số loài thuộc chi *Pogostemon* Desf.....9
Bảng 3.1. Kết quả định tính các nhóm chất bằng phản ứng hóa học 47
Bảng 3.2. Số liệu phổ NMR của hợp chất **PH16** và chất tham khảo [δ (ppm), J (Hz)] 56
Bảng 3.3. Số liệu phổ NMR của hợp chất **PH15** và chất tham khảo [δ (ppm), J (Hz)] 60
Bảng 3.4. Số liệu phổ NMR của hợp chất **PH4** và chất tham khảo [δ (ppm), J (Hz)] 65
Bảng 3.5. Số liệu phổ NMR của hợp chất **PH10** [δ (ppm), J (Hz)].....68
Bảng 3.6. Số liệu phổ NMR của hợp chất **PH19** [δ (ppm), J (Hz)].....70
Bảng 3.7. Số liệu phổ NMR của hợp chất **PH13** [δ (ppm), J (Hz)].....72
Bảng 3.8. Số liệu phổ NMR của hợp chất **PH6** [δ (ppm), J (Hz)].....75
Bảng 3.9. Số liệu phổ NMR của hợp chất **PH18** [δ (ppm), J (Hz)].....79
Bảng 3.10. Số liệu phổ NMR của các dẫn xuất phloroglucinol của **PH10**, **PH19**, **PH13, PH6** và **PH18**.....80
Bảng 3.11. Số liệu phổ NMR của hợp chất **PH14** [δ (ppm), J (Hz)].....83
Bảng 3.12. Số liệu phổ NMR của hợp chất **PH5** và chất tham khảo [δ (ppm), J (Hz)] 86
Bảng 3.13. Số liệu phổ NMR của hợp chất **PH17** và chất tham khảo [δ (ppm), J (Hz)] 88
Bảng 3.14. Khả năng ảnh hưởng đến sự sống của tế bào đại thực bào chuột RAW 264.7 của các cao chiết.....92
Bảng 3.15. Kết quả ức chế sản sinh NO của các cao chiết 92
Bảng 3.16. Khả năng ảnh hưởng đến sự sống của tế bào đại thực bào chuột RAW 264.7 của các hợp chất 93
Bảng 3.17. Kết quả ức chế sản sinh NO của các hợp chất.....94
Bảng 3.18. Khả năng điều hoà các cytokin của hợp chất Pogostemin C 95
Bảng 3.19. Kết quả gây độc tế bào ung thư của các hợp chất.....96
Bảng 3.20. Kết quả nhuộm tế bào bằng Hoechst 33342 96
Bảng 3.21. Tỉ lệ tế bào apoptosis dưới tác động của Pogostemin A.....97
Bảng 3.22. Kết quả thử độc tính cấp của cao ethyl acetat Tu hùng tai. 101

DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ

Hình 1.1. Các hợp chất flavonoid được phân lập từ chi *Pogostemon* Desf. 13
Hình 1.2. Các hợp chất terpenoid được phân lập từ chi *Pogostemon* Desf. 15
Hình 1.3. Các hợp chất steroid và một số chất khác phân lập được từ chi *Pogostemon* Desf.17
Hình 2.1. Sơ đồ thiết kế nghiên cứu 34
Hình 3.1. Đặc điểm hình thái của loài Tu hùng tai 45
Hình 3.2. Đặc điểm cơ quan sinh sản của loài Tu hùng tai 46
Hình 3.3. Phần trên mặt đất của loài Tu hùng tai 47
Hình 3.4. Sơ đồ chiết xuất các phân đoạn từ phần trên mặt đất loài Tu hùng tai 49
Hình 3.5. Sơ đồ phân lập các hợp chất từ cao Ethy acetat 51
Hình 3.6. Cấu trúc hóa học của hợp chất **PH16** (a) và ximonican (b) 55
Hình 3.7. Các tương tác HMBC, COSY và NOESY chính của hợp chất **PH16** 57
Hình 3.8. Cấu trúc không gian và tương tác NOESY chính của hợp chất **PH16** 57
Hình 3.9. Cấu trúc hóa học của hợp chất **PH15** (a) và acid (1*R**,4*R**,9*S**)-11,11-dimethyl-8-methylenebicyclo[7.2.0]undecane-4-carboxylic (b) 59
Hình 3.10. Các tương tác HMBC (→) chính của hợp chất **PH15** 60
Hình 3.11. Cấu trúc hóa học của hợp chất **PH4** (a) và *α*-humulen (b) 64
Hình 3.12. Các tương tác HMBC, COSY và NOESY chính của hợp chất **PH4** 64
Hình 3.13. Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC (→) chính của hợp chất **PH10** 67
Hình 3.14. Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC (→) chính của hợp chất **PH19** 70
Hình 3.15. Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC (→) chính của hợp chất **PH13** 73
Hình 3.16. Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC (→) chính của hợp chất **PH6** 74
Hình 3.27. Phổ ECD tính toán lý thuyết và CD thực nghiệm của hợp chất **PH18** 77
Hình 3.18. Cấu trúc hóa học của hợp chất **PH18** 78
Hình 3.19. Cấu trúc hóa học, các tương tác HMBC và NOESY chính của hợp chất **PH18** .. 78
Hình 3.20. Cấu trúc hóa học của hợp chất **PH14** (a) và gomphoparvin B (b) 82
Hình 3.21. Các tương tác HMBC, COSY và NOESY chính của hợp chất **PH14** 83
Hình 3.22. Cấu trúc hóa học của hợp chất **PH5** 85
Hình 3.23. Cấu trúc hóa học của hợp chất **PH17** 87
Hình 3.24. Hình ảnh tế bào dưới tác động của Pogostemin A được nhuộm Hoechst 33342 ở các nồng độ khác nhau 97

Hình 3.25. Hình ảnh tác động của Pogostemin A đến quá trình apoptosis tế bào được phân tích bằng hệ thống đếm tế bào dòng chảy 98
Hình 3.26 Khả năng cảm ứng sản sinh caspase-3 của Pogostemin A trên dòng tế bào ung thư phổi LU-1 99
Hình 4.1. Cấu trúc hóa học của 11 hợp chất phân lập được từ cây Tu hùng tai 109
Hình 4.2. Phản ứng Diel-Alder, gợi ý sự tạo thành của hợp chất meroterpenoid..... 111
Hình 4.3. Cấu trúc hóa học của hợp chất Pogostemin C và α-humulen 116

ĐẶT VẤN ĐỀ

Pogostemon Desf. là một chi lớn trong họ Lamiaceae. Trên thế giới chi này ghi nhận có khoảng 96 loài, phân bố chủ yếu ở khu vực nhiệt đới và cận nhiệt đới. Ở Việt Nam, chi *Pogostemon* Desf. có khoảng 17 loài và 1 thứ, phân bố trên nhiều tỉnh khắp cả nước [1].

Thành phần hoá học của chi *Pogostemon* Desf. khá đa dạng với các nhóm hợp chất có hoạt tính sinh học như tinh dầu, flavonoid, terpenoid, steroid v.v. Nhiều loài trong chi *Pogostemon* Desf. đã được sử dụng trong Y học cổ truyền và Y học dân tộc của nhiều nước, phần lớn ở các nước châu Á, để chữa đau bụng tiêu chảy, đau dạ dày, thấp khớp, cảm mạo, nhức đầu, hạ sốt, làm vết thương nhanh lên da non v.v. [2]. Các nghiên cứu của Y học hiện đại đã cho thấy một số dịch chiết hay những hợp chất phân lập từ các loài thuộc chi *Pogostemon* Desf. chứa đựng nhiều hoạt tính sinh học tốt như kháng vi sinh vật, giảm đau, chống viêm, chống oxy hóa, gây độc tế bào ung thư v.v. [3], [4]. Như vậy, có thể thấy với số loài tương đối phong phú, chi *Pogostemon* Desf. có tiềm năng cho những nghiên cứu tìm kiếm các hoạt chất mới có tác dụng trị bệnh, nhằm định hướng phát triển các sản phẩm thuốc phục vụ sức khỏe con người.

Loài Tu hùng tai *Pogostemon auricularius* (L.) Hassk. trong những năm gần đây đã được các nhà khoa học nghiên cứu sàng lọc một số tác dụng sinh học. Dịch chiết của loài đã thể hiện một số hoạt tính như kháng vi sinh vật, kháng viêm, làm tan huyết khối, ức chế enzym α-amylase, chống tiêu chảy [5], [6]. Ngoài ra, Tu hùng tai còn được dùng trong Y học cổ truyền của nhiều nước. Ở nước ta, cây Tu hùng tai được người dân sử dụng để chữa đau dạ dày, cảm sốt, viêm họng [7], [8]. Cho đến nay, số lượng các nghiên cứu về thành phần hoá học và tác dụng sinh học của loài này trên thế giới cũng như ở Việt Nam còn khá khiêm tốn.

Từ những lí do trên, đề tài: **"Nghiên cứu thành phần hóa học và một số tác dụng sinh học của loài Tu hùng tai (*Pogostemon auricularius* (L.) Hassk.), họ Hoa môi (Lamiaceae)"** được thực hiện với hai mục tiêu:

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

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

Phần 1. TỔNG QUAN

1.1. Giới thiệu về chi *Pogostemon* Desf.

1.1.1. Vị trí phân loại

Theo Hệ thống phân loại thực vật học có hoa của Talkhajan (2009) và một số hệ thống khác, chi *Pogostemon* Desf. thuộc họ Lamiaceae (Hoa môi hay Bạc hà), bộ Hoa môi (Lamiales), phân lớp Hoa môi (Lamiidae), lớp Ngọc lan (Magnoliopsida), ngành Ngọc lan (Magnoliophyta) [2], [9], [10].

Chi *Pogostemon* Desf. được nhà thực vật học người Pháp René Louiche Desfontaines xác lập năm 1815 [11]. Các đại diện của chi *Pogostemon* Desf. có thể phân biệt với các loài khác trong họ bởi sự hiện diện của nhị hoa mang lông đơn sắc [12], [13], [14], [15]. Mối quan hệ giữa các loài trong chi *Pogostemon* Desf. và các loài thuộc chi *Dysophylla* Blume đã được tranh luận nhiều. Ban đầu, các loài trong chi *Pogostemon* thường bao gồm các loại thân thảo sống trên mặt đất với lá mọc đối, phiến lá rộng, cuống lá và thân cây đặc; trong khi các loài thuộc chi *Dysophylla* sống chủ yếu ở môi trường dưới nước và đầm lầy, lá mọc đối hoặc mọc vòng, không có cuống lá và thân cây rỗng [12], [16], [17], [18]. Như vậy, hiện nay các nhà thực vật học đã thống nhất được quan điểm giữa *Pogostemon* và *Dysophylla* là 2 chi độc lập với nhau. Tuy nhiên, một số loài trong chi *Dysophylla* có lá mọc đối, là đại diện trung gian giữa hai chi này và được cho rằng nên xếp sang chi *Pogostemon* [12], [19] và chi *Dysophylla* chỉ bao gồm những loài có lá mọc vòng [15], [18], [19], [20], [21]. Đặc biệt, các nghiên cứu về sinh học phân tử gần đây đã cho thấy một số loài trong chi *Dysophylla* cũng thuộc chi *Pogostemon* [22], [23].

Theo dữ liệu của "Plants of the World Online" [24] thu thập từ nhiều nguồn cơ sở khác nhau trên thế giới, đã thống kê được 143 tên loài thuộc chi *Pogostemon* Desf., trong đó, có 96 tên loài được chấp nhận; chủ yếu phân bố ở khu vực nhiệt đới và cận nhiệt đới châu Á và châu Phi [1], [25]. Ngoài ra, năm loài đã được xác định là đặc hữu của Châu Phi [12], [22] và tại Ấn Độ sự đa dạng của loài cao nhất [12].

1.1.2. Khái quát về thực vật học

Các loài thuộc chi *Pogostemon* Desf. thường là cây cỏ hay bụi nhỏ. Thân vuông hoặc gần tròn, nhẵn hay có lông. Lá mọc đối xếp chéo chữ thập hoặc xếp thành vòng 3-6 chiếc trên mỗi đốt. Cụm hoa dạng bông, hình chùm hay gần như hình cầu ở đỉnh cành do các xim co hợp thành. Hoa nhỏ, có cuống hoặc không cuống. Lá bắc tồn tại hay sớm rụng. Đài hình chuông, hình trứng hoặc hình ống, 5 thùy gần bằng nhau hay có cấu tạo 2 môi: môi trên 3 thùy, môi dưới 2 thùy. Tràng 4 thùy gần bằng nhau hoặc môi trên 3 thùy, môi dưới 1 thùy. Nhị 4, dài bằng nhau, chỉ nhị có lông ở giữa; bao phấn 1 ô. Bầu nhẵn; vòi nhụy xẻ 2 thùy ở đỉnh. Đĩa mật có thùy trước bằng. Quả nhẵn [1], [25].

Ở Việt Nam, Lamiaceae còn được gọi là họ Bạc hà hay họ Hoa môi, chi *Pogostemon* Desf. được gọi là chi Hoắc hương hay chi Tu hùng. Theo tác giả Vũ Xuân Phương (2000), hiện nay chi *Pogostemon* Desf. ở nước ta có 17 loài và 1 thứ [1]. Phân bố của các loài này ở Việt Nam được trình bày tại bảng 1.1 với tên khoa học được chấp nhận theo cơ sở dữ liệu trực tuyến các loài thực vật thế giới (WFO Plant List) [1], [26], [27].

Bảng 1.1. *Phân bố của các loài thuộc chi Pogostemon Desf. ở Việt Nam*

STT	Loài/Thứ	Tên Việt Nam	Phân bố
1	*P. auricularius* (L.) Hassk. Syn: *Dysophylla auricularia* (L.) Blume *Mentha auricularia* L.	Tu hùng tai, Cò cò	Lai Châu, Lào Cai, Sơn La, Cao Bằng, Lạng Sơn, Hà Tây, Quảng Trị, Thừa Thiên Huế, Đà Nẵng, Quảng Nam, Lâm Đồng, Ninh Thuận, Kiên Giang
1a	*P. auricularius* var. *giganteus (Doan) Phamh.* Syn: *Dysophylla auricularia* (L.) Blume	Chín tầng	Ninh Thuận

	var. *gigantea* Doan		
2	*P. cablin* (Blanco) Benth. Syn: *Mentha cablin* Blanco *P. patchouly* Pellet *P. javanicus* Back. Ex Adelb.	Hoắc hương	Vĩnh Phúc, Hà Nội, Hưng Yên, Thanh Hóa, Đồng Nai
3	*P. cruciatus* (Wall. Ex Benth.) Kuntze Syn: *Dysophylla cruciata* (Wall. Ex Benth.) Kuntze	Tu hùng chữ thập Hồng vĩ chữ thập	Đắc Lắc, Lâm Đồng
4	*P. glaber* Wall. Ex Benth.	Tu hùng nhẵn	Sơn La
5	*P. globulosus* (Doan) Phuong Syn: *Dysophylla globulosa* (Doan)	Tu hùng hình cầu Hồng vĩ hình cầu	Bến Tre
6	*P. litigiosus* Doan	Tu hùng tranh luận	Lâm Đồng
7	*P. menthoides* Blume Syn: *P. fragtenus* Miq.	Tu hùng dạng húng Tu hùng bạn	Lào Cai, Cao Bằng
8	*P. nanus* (Doan) Phuong Syn: *Dysophylla nana* Doan	Tu hùng lùn Hồng vĩ lùn	Bình Dương
9	*P. nelsonii* Doan	Tu hùng nelson	Côn Đảo
10	*P. parviflorus* Wall. Ex Benth. Syn: *P. pubescens* Benth.	Tu hùng hoa nhỏ	Lào Cai, Giai Lai, Lâm Đồng

11	*P. peguanus* (Prain) J. R. Press Syn: *Dysophylla peguana* Prain *Eustralis peguana* (Prain) Mur.	Tu hùng lá hẹp Hồng vĩ lá hẹp	Lâm Đồng, Đồng Nai, Kiên Giang
12	*P. pentagonus* (C. B. Clarke ex Hook. f.) Kuntze Syn: *P. pentagona* C. B. Clarke ex Hook. f.	Tu hùng năm góc Hồng vĩ năm góc	Lâm Đồng
13	*P. petelotii* (Doan) Phuong Syn: *Dysophylla petelotii* Doan	Hồng vĩ pételot	Thanh Hóa
14	*P. pumilus* (Grah.) J. R. Press Syn: *Dysophylla Pumila* (Grah.) Benth. *Mentha pumila* (Grah.)	Tu hùng thân mập Hồng vĩ thân mập	Ninh Bình, Thừa Thiên Huế, Đà Nẵng, Bình Dương
15	*P. purpurascens* Dalz.	Tu hùng hồng	Lâm Đồng
16	*P. quadrifolius* (Benth.) F. Muell. Syn: *P. quandrifolium* Kuntze *Dysophylla quandrifolia* (Wall. Ex) Benth. *Eustralis quadrifolia*	Hồng vĩ bốn mùa	Lai Châu, Sơn La

	Benth.		
17	*P. stellatus* (Lour.) Kuntze Syn: *Dysophylla stellata* (Lour.) Benth. *Mentha stellata* Lour.	Tu hùng hình sao Hồng vĩ hình sao	Phú Thọ, Hà Tây, Hòa Bình, Nghệ An, Quảng Bình, Thừa Thiên Huế, Kon Tum, Đắc Lắc, Đồng Nai

Như vậy, so với 96 loài thuộc chi *Pogostemon* Desf. trên thế giới, số loài được ghi nhận ở nước ta chiếm khoảng 18% và chưa thấy công bố về loài đặc hữu. Ngoài ra, tác giả Vũ Xuân Phương (2000) cũng đã xây dựng bộ khóa phân loại các loài thuộc chi này, bằng cách sử dụng các đặc điểm phân loại chính của lá và hoa [1]. Khóa phân loại các loài của chi *Pogostemon* Desf. ở Việt Nam được trình bày ở bảng 1.2 [1].

Bảng 1.2. *Khóa định loại các loài của chi Pogostemon Desf. ở Việt Nam*

1A. Lá mọc đối hay mọc thành vòng 3 lá. Tràng có các thùy bằng nhau hay thùy môi trên dài bằng hoặc dài hơn môi dưới

2A. Cụm hoa hình bông. Họng đài có vòng lông

3A. Đài 2 môi: môi trên 5 thùy rộng và ngắn, môi dưới 2 thùy nhọn. Lá vừa mọc đối vừa mọc thành vòng 3 ..... ***1. P. litigiosus***

3B. Đài 5 thùy gần bằng nhau. Lá mọc đối

4A. Miệng đài khép lại sau khi hoa nở. Lá bắc hình trứng ..... ***2. P. auricularius***

4B. Miệng đài mở rộng sau khi hoa nở. Lá bắc hình đường ..... ***3. P. menthoides***

2B. Cụm hoa dạng chùm, gồm các bông. Họng đài không có vòng lông

5A. Cây trồng, thường không có hoa, nếu có hoa thì đài dài hơn 5mm, có lông dày ở phía ngoài ..... ***4. P. cablin***

5B. Cây mọc hoang, đài nhỏ, dài không đến 5mm, nhẵn hay có lông thưa

6A. Lá bắc dài hơn đài.

7A. Thân vuông. Thân và lá nhẵn. Hoa tạt về một phía ..... ***5. P. nelsonii***

7B. Thân tròn. Thân và lá có lông áp sát. Hoa mọc thành vòng, không tạt về

một phía .....*6. P. parviflorus*

6B. Lá bắc ngắn hơn đài.

8A. Lá bắc hình trứng rộng. Toàn cây nhẵn ..... *7. P. glaber*

8B. Lá bắc hình trứng hẹp. Toàn cây có lông ..... *8. P. purpurascens*

1B. Lá mọc thành vòng 4-6 lá. Tràng gần như đều hoặc 2 môi với môi trên ngắn hơn hoặc bằng môi dưới

9A. Ống đài có 4 hay 5 góc rõ

10A. Ống đài có 5 góc và 5 rãnh dọc rõ .....*9. P. pentagonus*

10B. Ống đài có 4 góc

11A. Lá bắc dài hơn hoa. Nhị dài hơn tràng 2 lần. Lá hình bầu dục - hình đường .....*10. P. petelotii*

11B. Lá bắc ngắn hơn hoa. Nhị dài hơn tràng không đến 2 lần. Lá hình đường .....*11. P. peguanus*

9B. Ống đài tròn

12A. Cụm hoa dạng bông, hình trụ, gián đoạn ở phía dưới. Thân hóa gỗ ở gốc .....*12. P. quadrifolius*

12B. Cụm hoa dạng gần hình cầu hay hình bông rất ngắn, không gián đoạn. Thân cỏ

13A. Cỏ cao không tới 20cm. Các đốt ở thân ngắn hơn lá.....*13. P. nanus*

13B. Cỏ cao trên 20cm. Các đốt của thân thường dài hơn lá

14A. Thân có lông dài mọc ngược, áp sát..... *14. P. cruciatus*

14B. Thân thường nhẵn

15A. Đài có lông dày màu vàng ở phía ngoài, 5 thùy đài trải ra có dạng hình sao ..... *15. P. stellatus*

15B. Đài không có lông dày màu vàng ở phía ngoài, 5 thùy đài đứng

16A. Cụm hoa dạng bông ở đỉnh cành, dài 2-6 cm. Tràng có lông ở phía ngoài ..... *16. P. pumilus*

16B. Cụm hoa gần hình cầu, đường kính 5-10 mm. Tràng nhẵn..... ..... *17. P. globulosus*

1.1.3. Thành phần hóa học

Theo tổng quan tài liệu, về thực vật *Pogostemon* Desf. là một chi lớn trong họ Lamiaceae. Tuy nhiên, cho đến nay số loài được nghiên cứu về mặt hóa học cũng như hoạt tính sinh học còn ít. Tính đến nay, có khoảng 10 loài, bao gồm *P. auricularius*, *P. benghalensis, P. cablin*, *P. deccanensis*, *P. hirsutus*, *P. heyneanus*, *P. parviflorus*, *P. plectranthoides*, *P. purpurascens* và *P. travancoricus* đã được nghiên cứu về thành phần hóa học. Trong các loài này, *P. cablin* được nghiên cứu nhiều nhất. Ngoài thành phần tinh dầu, các nhóm chất chính của chi bao gồm là flavonoid, terpenoid, steroid. Bên cạnh đó, các hợp chất phenolic, phenylpropanoid glycosid, acid carboxylic, chromon… cũng được tìm thấy trong chi này.

1.1.3.1. Thành phần tinh dầu

Hàm lượng và thành phần tinh dầu của các loài được nghiên cứu trong chi *Pogostemon* Desf. khá phong phú, được nghiên cứu nhiều nhất là thành phần tinh dầu của lá loài *P. cablin* với các nhóm tác giả chủ yếu đến từ Trung Quốc và Ấn Độ. Bảng 1.3 trình bày một số thành phần chính trong tinh dầu của một số loài thuộc chi *Pogostemon* Desf..

Bảng 1.3. *Thành phần chính trong tinh dầu của một số loài thuộc chi Pogostemon Desf.*

STT	Tên loài	Bộ phận	Thành phần chính	TLTK
1	*P. auricularius*	Lá	*β*-panasinsene (41,72%), *α*-panasisene, 1,1,7,7a-tetramethyl-1a,2,3,5,6,7,7a,7b-octahydro-1H-cyclopropa[A]naphtalene	[28]
2	*P. benghalensis*	Lá	isomer cadinene (2,62%), elemol, *α*-bulnesene, *β*-elemene và germacrene D	[29], [30]
		Hoa	*trans*-caryophyllene (8,52%), germacrene B, *γ*-cadiuene, *β*-ocimene, *α*-elemene, oxid caryophyllene,	

			curzeren, *α*-humulene, *α*-guaiene và germacrene	
3	*P. cablin*	Lá	patchouli alcohol (32-40%), *α*-patchoulen, *β*-patchoulen, *α*-bulnesene, seychellene, norpatchoulenol, pogostone, eugenol và pogostol	[31], [32], [33]
4	*P. deccanensis*	Phần trên mặt đất	curzerene (26,39%), epicadinol (22,68%), *α*-caryophyllene, *β*-caryophyllene, α-cubebene, *β*-elemene, *γ*-cadinene và *α*-guaiene	[34]
5	*P. escholtzioides*	Lá	curzerene (46,1%), benzophenone germacrone và *α*-cadinol	[35]
6	*P. heyneanus*	Lá	acetophenone (51,0%), *β*-pinene, (E)-nerolidol, và patchouli alcohol	[36]
7	*P. hirsutus*	Lá	abietatriene (16,3%), dehydroabietal (3,5%), dehydroabietol (21%), *α*-pinene và *β*-pinene	[37]
8	*P. plectranthoides*	Lá	methyl heptenone, linalool, linalyl acetate, citronellol, geraniol, *α*-pinene, camphene, limonene, *β*-phellandrene, *γ*-terpinene, (E)-*β*-ocimene, germacrene D, germacrene B, *trans*-*β*-guaien, *β*-caryophyllene và *α*-humulene	[38], [39]
9	*P. travancoricus*	Lá	cadina-1,4-diene, calamenene, viridiflorene, seychellene, bicyclogermacrene, germacren B, pogostone, spathulenol và *cis*-calamenene	[40]

Tinh dầu của *P. cablin* với tên thương phẩm Patchouli, được chiết xuất từ lá với hàm lượng khoảng 1,5-4%, đã được lưu hành khá phổ biến trên thị trường. Trong đó patchoulol đóng vai trò tạo mùi thơm đặc trưng cho tinh dầu, có hàm lượng khoảng 32-40% trong thành phần tinh dầu [31], [32], [33].

Nghiên cứu loài *P. heyneanus*, tinh dầu của loài này cũng chứa nhiều sesquiterpen, tuy nhiên thành phần chính được báo cáo là acetophenon với hàm lượng 51%. Patchoulol cũng có mặt trong tinh dầu này nhưng chỉ chiếm khoảng 14% và không đóng vai trò tạo mùi thơm [36].

Thành phần tinh dầu trong lá của loài *P. plectranthoides* thu hái tại Pakistan khoảng 0,2% [39]. Thành phần chủ yếu là các monoterpen, sesquiterpen và hydrocarbon béo. Nghiên cứu gần đây (2020) trên loài *P. plectranthoides* thu hái tại Ấn Độ với tỉ lệ tinh dầu trong lá, thân và hoa lần lượt là 0,22; 1,0 và 0,2 %. Thành phần và tỉ lệ các hợp chất trong tinh dầu thu được từ các phần khác nhau của cây là khác nhau nhưng đều có chứa những nhóm chính như sesquiterpen, monoterpen và dẫn xuất phenyl [38].

Đối với loài *P. benghalensis*, tinh dầu có thể thu được từ lá hoặc hoa. Hàm lượng tinh dầu trong hoa (1,2%) cao hơn so với hàm lượng trong lá (0,7%). So sánh tinh dầu thu được từ lá và hoa của loài này, người ta cũng nhận thấy có sự khác nhau về thành phần và tỉ lệ [29], [30].

Loài *P. hirsutus* có thành phần tinh dầu chủ yếu lại là các diterpen và monoterpen. Trong đó, nhóm abietan diterpen chiếm 42,6% và được xem là thành phần chính [37].

Riêng đối với loài nghiên cứu *P. auricularius*, hàm lượng tinh dầu được các nhà khoa học Ấn Độ báo cáo khoảng 9,9%. Trên thế giới, cho đến nay, thành phần các hợp chất có trong tinh dầu này vẫn chưa được công bố [41]. Ở nước ta, Trần Huy Thái và cộng sự [28] đã khảo sát loài *P. auricularius* thu hái tại Phú Thọ, thu được hàm lượng tinh dầu khoảng 1,3%. Với phương pháp GC-MS, nhóm tác giả cũng đã xác định được 26 hợp chất có trong tinh dầu, với các thành phần chính là các sesquiterpen. Nghiên

cứu vào năm 2018 trên loài Tu hùng tai thu hái tại Đà Nẵng đã tìm thấy 213 hợp chất có mặt trong thành phần tinh dầu và chủ yếu là các sesquiterpen, diterpen [42].

Tóm lại, thành phần tinh dầu của các loài đã được nghiên cứu trong chi *Pogostemon* Desf. khá phong phú, đa dạng, được biết đến với nhiều công dụng trong hương liệu và mỹ phẩm [43], [44]. Đó cũng là lí do mà thành phần tinh dầu được quan tâm nghiên cứu từ rất sớm. Tuy nhiên, trong những năm gần đây, càng ngày càng có nhiều công bố về các nhóm chất khác được tìm thấy trong chi này.

1.1.3.2. Thành phần flavonoid

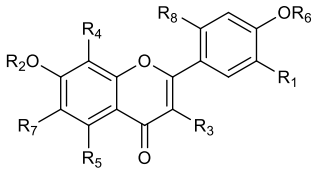
Flavonoid là nhóm chất được tìm thấy nhiều trong chi *Pogostemon* Desf., chủ yếu được phân lập từ loài *P. cablin*. Những flavonoid đầu tiên được phân lập vào năm 1981 bởi Itokawa và cộng sự [45]. Cho đến nay, đã có khoảng 37 flavonoid được phân lập từ loài các loài thuộc chi *Pogostemon* Desf., trong đó, chủ yếu thuộc các nhóm: flavon, flavanon, chalcon và một số flavonoid glycosid.

Về nhóm flavon, đã có 22 hợp chất được tìm thấy, bao gồm: pachypodol (**1**), ombuin (**2**), apigenin (**3**), rhamnetin (**4**), retusin (**5**), 5-hydroxy-3,4',7-trimethoxyflavon (**6**), 5-hydroxy-4',7-dimethoxyflavon (**7**), 3,3',4',5,7-pentahydroxyflavon (**8**), 3,5-dihydroxy-4',7-dimethoxyflavon (**9**), 4',5-dihydroxy-7'-methoxyflavon (**10**), acacetin (**11**), 3,5-dihydroxy-7,4'-dimethoxyflavon (**12**), 5-hydroxy-3,7,3',4'-tetramethoxyflavon (**13**), 5,4'-dihydroxy-7-methoxyflavon (**14**), 3,5,7,3',4'-pentahydroxyflavon (**15**), 5,7,4'-trihydroxyflavon (**16**), và 3,5,4'-trihydroxy-7-methoxyflavon (**17**), 5-hydroxy-3,7,4'-trimethoxyflavon (**18**), 5,4'-dihydroxy-3,7,3'-trimethoxyflavon (**19**) [45], [46], [47], [48], [49], apigenin (**20**), nepetin (**21**) [50]. Ngoài *P. cablin*, từ loài *P. purpurascens*, một flavon mới tại thời điểm công bố là purpurascenin (**22**) cũng đã được tìm thấy [51].

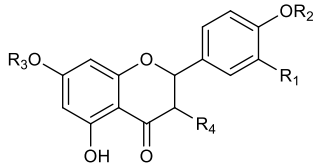
Bên cạnh đó, đã có 6 hợp chất flavanon được phân lập từ loài *P. cablin*, bao gồm: 5,7-dihydroxy-3',4'-dimethoxyflavanon (**23**), 4',5-dihydroxy-3',7-dimethoxyflavanon (**24**), 5-hydroxy-7,3',4'-trimethoxyflavanon (**25**), 4',5-dihydroxy-

3,3',7-trimethoxyflavanon (**26**), 3,5-dihydroxy-4',7-dimethoxyflavanon (**27**) và 5-hydroxy-3,7,3',4'-tetramethoxyflavanon (**28**) [47], [52].

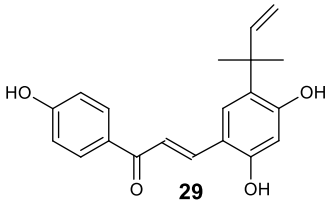
Ngoài ra, các nhà khoa học cũng đã phân lập được 1 chalcon là licochalcon A (**29**) và 8 flavonoid glycosid bao gồm apigetrin (**30**) apigenin 7-*O*-β-D (-6''-p-coumaroyl)-glucosid (**31**), isorhamnetin-3-*O*-*β*-D-galactosid (**32**), hyperosid (**33**), 3,5,8,3',4'-pentahydroxy-7-methoxyflavon-3-*O*-*β*-D-galactosid (**34**), isisolidon-7-*O*-*α*-L-rhamnopyranosid (**35**), tilianin (**36**) và agastachosid (**37**) [45], [48], [53], [54]. Cấu trúc các hợp chất flavonoid phân lập từ chi *Pogostemon* Desf. được trình bày ở hình 1.1.



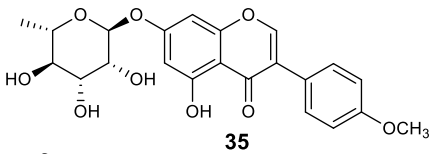
	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5	R_6	R_7	R_8
1	OCH_3	Me	OCH_3	H	OH	H	H	H
2	OH	H	H	H	OH	H	H	H
3	H	H	OCH_3	H	OH	H	H	H
4	OH	Me	OH	H	OH	H	H	H
5	OCH_3	Me	OCH_3	H	OH	Me	H	H
6	H	Me	OCH_3	H	OH	Me	H	H
7	H	Me	H	H	OH	Me	H	H
8	OH	H	OH	H	OH	H	H	H
9	H	Me	OH	H	OH	Me	H	H
10	H	Me	OH	H	OH	H	H	H
11	H	H	H	H	OH	Me	H	H
12	H	Me	OH	H	OH	Me	H	H
13	OCH_3	Me	H	H	OH	Me	OCH_3	H
14	H	Me	H	H	OH	H	H	H
15	OH	H	OH	H	OH	H	H	H
16	H	H	H	H	OH	H	H	H
17	H	Me	OH	H	OH	H	H	H
18	H	Me	OCH_3	H	OH	Me	H	H
19	OH	Me	OCH_3	H	OH	H	H	H
20	H	H	H	H	OH	H	H	H
21	OH	H	H	H	OH	H	OCH_3	H
22	OCH_3	Me	OCH_3	OCH_3	OH	Me	OCH_3	OCH_3
30	H	glc	H	H	OH	H	H	H
31	H	H	H	OH	H	glc-6-p-coum aroyl	H	H
32	OCH_3	H	O-gal	H	OH	Me	H	H
33	OH	H	O-gal	H	OH	Me	H	H
34	OH	Me	O-glc	OH	OH	Me	H	H



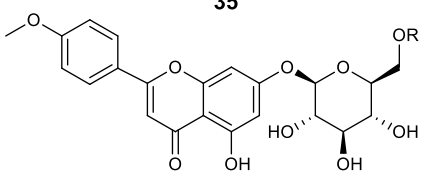
	R_1	R_2	R_3	R_4
23	OCH_3	Me	H	H
24	OCH_3	H	Me	H
25	OCH_3	Me	Me	H
26	OCH_3	H	Me	OCH_3
27	H	Me	Me	OH
28	OCH_3	Me	Me	OCH_3



29



35



36 R = H
37 R = $COCH_3$

Hình 1.1. *Các hợp chất flavonoid được phân lập từ chi Pogostemon Desf.*

Cho đến nay, trong chi *Pogostmon* Desf., đã phân lập được 37 flavonoid từ loài *P. cablin* và *P. purpurascens*. Các hợp chất được tìm thấy chủ yếu thuộc nhóm flavon với 21 chất. Bên cạnh đó, có nhiều hợp chất thuộc khung flavanon, chalcon và các flavonoid glycosid cũng đã được phân lập.

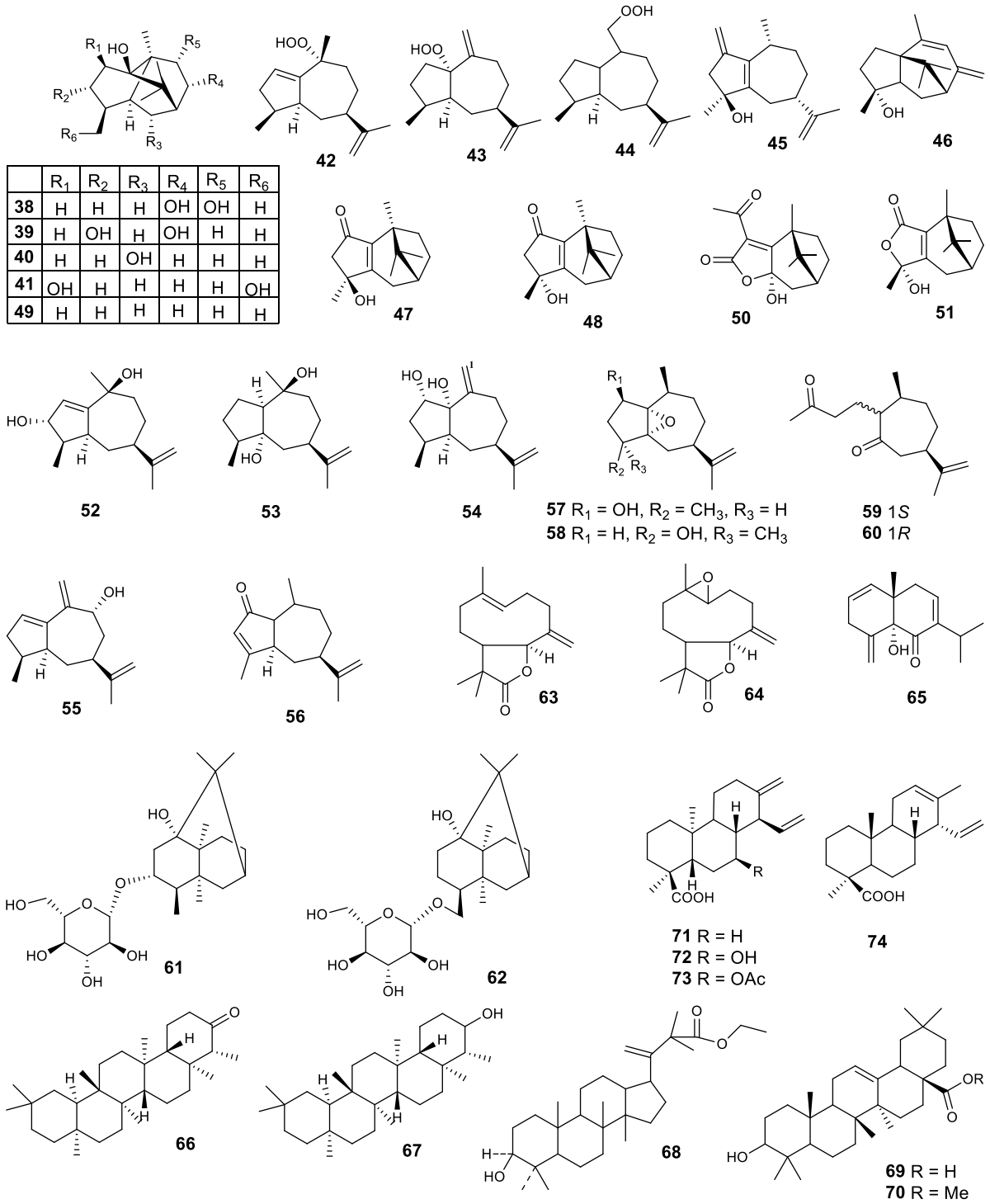
1.1.3.3. Thành phần terpenoid

Nhóm terpenoid được tìm thấy ở các loài thuộc chi *Pogostemon* Desf. như: *P. cablin*, *P. auricularius*, *P. parviflorus*, *P. pelectranthoides* với hơn 37 hợp chất đã được tìm thấy, trong đó, chủ yếu thuộc các nhóm sesquiterpen, sesquiterpen glycosid, triterpen và diterpen.

Về nhóm sesquiterpen và các glycosid, đã có 28 hợp chất được phân lập từ 3 loài bao gồm: *P. cablin*, *P. parviflorus*, *P. pelectranthoides*. Từ loài *P. cablin* đã tìm thấy 23 sesquiterpen bao gồm: 8*α*,9*α*-dihydroxypatchoulol (**38**), 3*α*,8*α*-dihydroxypatchoulol (**39**), 6*α*-hydroxypatchoulol (**40**), 2*β*,12-dihydroxypatchoulol (**41**) [55]; 10*α*-hydroperoxyguaia-1,11-dien (**42**), 1*α*-hydroperoxyguaia-10(15),11-dien (**43**), 15*α*-hydroperoxyguaia-1(10),11-dien (**44**) [56]; 2-keto-4*β*-hydroxyguai-1,11-dien (**45**), 8-keto-9(10)-*α*-patchoulen-4*α*-ol (**46**), 2-keto-1(5)-*β*-patchoulen-4*β*-ol (**47**), 2-keto-1(5)-*β*-patchoulen-4α-ol (**48**) và patchoulol (**49**) [57], pocahemiketals A-B (**50-51**) [58], (-)-(3*S*,4*R*,5*S*,7*R*,10*R*)-guaia-1(2),11(12)-dien-3,10-diol (**52**), (+)-(1*S*,4*S*,5*R*,7*R*,10*S*)-guaia-11(12)-en-5,10-diol (**53**), (+)-(1*S*,2*S*,4*S*,5*S*,7*R*)-guaia-10(15),11(12)-dien-1,2-diol (**54**), (-)-(4*S*,5*S*,7*S*,9*R*)-guaia-1(2),10(15),11(12)-trien-9-ol (**55**), (-)-(5*S*,7*R*)-guaia-1(10),3(4),11(12)-trien-2-on (**56**), (-)-(1*S*,2*R*,4*S*,5*R*,7*R*,10*S*)-guaia-1,5-epoxy-11(12)-en-2-ol (**57**), (-)-(1*R*,4*S*,5*R*,7*R*,10*S*)-guaia-1,5-epoxy-11(12)-en-4-ol (**58**), 7-epi-chabrolidion A (**59**), 1,7-di-epi-chabrolidione A (**60**) [59]. Đặc biệt trong 12 sesquiterpen này thì có 11 chất mới được công bố tại thời điểm nghiên cứu (**38-48**, **50-58**). Ngoài ra, cũng từ loài *P. cablin*, đã tìm thấy 2 sesquiterpen glycosid mới, bao gồm: 3α-hydroxypatchoulan 3-*O*-*β*-D-glucopyranosid (**61**) và 15-hydroxypatchoulol 15-*O*-*β*-D-glucopyranosid (**62**) [60].

Từ loài *P. parviflorus* các nhà khoa học đã phân lập được 2 hợp chất sesquiterpen là parvinolid (**63**) và epoxyparvinolid (**64**) [61]. Bên cạnh đó, nghiên cứu

trên loài *P. pelectranthoides* cũng đã tìm thấy một sesquiterpen mới có tên gọi là stemonolon (**65**) [62].



	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5	R_6
38	H	H	H	OH	OH	H
39	H	OH	H	OH	H	H
40	H	H	OH	H	H	H
41	OH	H	H	H	H	OH
49	H	H	H	H	H	H

Hình 1.2. *Các hợp chất terpenoid được phân lập từ chi Pogostemon Desf.*

Về nhóm triterpen, đã có 5 hợp chất được tìm thấy từ loài *P. cablin* và *P. parviflorus*. Từ loài *P. parviflorus* các nhà khoa học đã tách được 3 triterpen, bao gồm:

friedelin (**66**), friedelan-3-ol (**67**) và 25-carboethoxypogostemonol (**68**) [61], [63]. Bên cạnh đó, nghiên cứu hóa học loài *P. cablin* cũng đã tìm thấy các triterpen (**66**), (**67**) [53], acid oleanolic (**69**) và metyl oleanolat (**70**) [64].

Về nhóm diterpen, đã có 4 hợp chất diterpen mới được phân lập từ loài *P. auricularius* bao gồm: cleistanth-13,15-dien-19-oic (acid auricularic) (**71**) [65], 7-hydroxycleistanth-13,15-dien-18-oic (**72**), 7-acetoxycleistanth-13,15-dien-18-oic (**73**) và (4*R*,5*S*,8*R*,9*S*,10*S*,14*R*)-cleistanth-12,15-dien-19-oic (**74**) [66]. Đến nay, chưa có công bố nào thêm về thành phần hóa học của loài này.

Tóm lại, với 37 terpenoid phân lập từ chi *Pogostemon* Desf., nhóm sesquiterpen được tìm thấy nhiều nhất với 28 hợp chất. Ngoài ra, đã xác định 25 terpenoid là chất mới tại thời điểm công bố, bao gồm 21 sesquiterpen và 4 diterpen. Cấu trúc các hợp chất terpenoid phân lập từ chi *Pogostemon* Desf. được trình bày ở hình 1.2.

1.1.3.4. Thành phần steroid

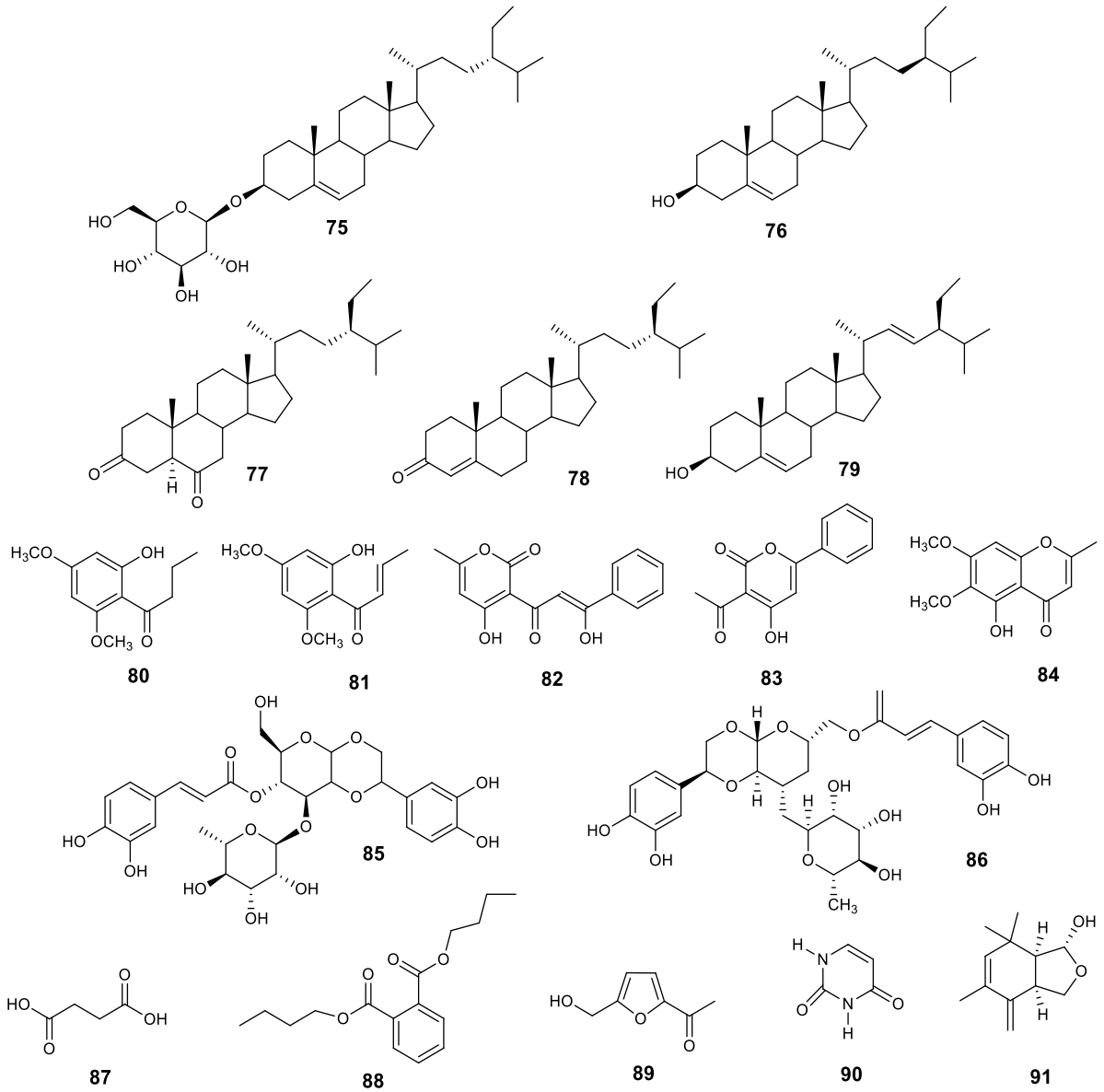
Nhóm steroid được tìm thấy ở hai loài *P. cablin* và *P. parviflorus*, trong đó chủ yếu là các phytosterol. Từ loài *P. cablin*, các nhà khoa học đã phân lập được 5 steroid bao gồm: daucosterol (**75**), *β*-sitosterol (**76**) [46], 5*α*-stigmast-3,6-dion (**77**), stigmast-4-ene-3-on (**78**), stigmasterol (**79**) [64]. Ngoài ra, hợp chất *β*-sitosterol (**76**) cũng được báo cáo tìm thấy trong loài *P. parviflorus* [61]. Cấu trúc các hợp chất steroid phân lập từ chi *Pogostemon* Desf. được trình bày ở hình 1.3.

1.1.3.5. Một số hợp chất khác

Ngoài 3 nhóm chất chính đã nêu là flavonoid, terpenoid và steroid, trong chi *Pogostemon* Desf. còn có một số hợp chất thuộc các nhóm khác như: phenolic, phenylpropanoid glycosid, acid carboxylic, chromon…

Các hợp chất phenolic được tìm thấy ở loài *P. stellatus* và *P. heyneanus*. Từ dịch chiết *n*-hexan của loài *P. stellatus* đã phân lập được 2 phenolic keton, bao gồm: 2'-hydroxy-4',6'-dimethoxybutyrophenon (**80**), 1-(2-hydroxy-4,6-dimethoxyphenyl) but-2-en-1-on (**81**) [67]. Bên cạnh đó, 2 phenolic mới là pogopyron A (**82**) và pogopyron B (**83**) đã được tìm thấy ở loài *P. heyneanus* [68].

Bên cạnh đó, một chromon mới đã được phân lập từ loài *P. stellatus* là 5-hydroxy-6,7-dimethoxy-2-methylchromon (stellatin) (**84**) [67]. Hai hợp chất phenylpropanoid glycosid được tìm thấy ở loài *P. cablin*, bao gồm: crenatosid (**85**), isocrenatosid (**86**) [69]. Cũng từ loài này, các nhà khoa học đã phân lập được một số hợp chất khác như acid carboxylic, aldehyd… bao gồm: acid succinic (**87**), acid dibutyl phthalat (**88**), 5-hydroxymethol-2-furfural (**89**), uracil (**90**) và tschimganical A (**91**) [48], [53], [64], [69]. Cấu trúc của các hợp chất này hiển thị ở hình 1.3.



Hình 1.3. *Các hợp chất steroid và một số chất khác phân lập được từ chi Pogostemon Desf.*

Ngoài ra, một số nghiên cứu định tính thành phần hóa học đã được thực hiện trên loài *P. auricularius* và *P. myosuroides*. Kết quả cho thấy các nhóm chất chính bao gồm: alcaloid, phenolic, tanin, flavonoid, glycosid tim, phytosterol, tinh dầu và chất béo được tìm thấy ở loài *P. auricularius* [41] và sự có mặt các nhóm chất flavonoid, phenolic, terpenoid, saponin và steroid ở loài *P. myosuroides* [70].

Như vậy, cho đến nay, có khoảng 10 loài trong số 96 loài của chi *Pogostemon* Desf. được nghiên cứu về thành phần hóa học, chiếm khoảng 10% số loài, qua đó cho thấy còn rất nhiều loài chưa được nghiên cứu. Các nghiên cứu tập trung chủ yếu của các tác giả ngoài nước như Trung Quốc, Ấn Độ, Mỹ, Bangladesh…

Thành phần hóa học của chi *Pogostemon* Desf. rất đa dạng với nhóm chất chính là tinh dầu và hơn 90 hợp chất khác được phân lập từ các loài đã nghiên cứu. Các hợp chất tìm thấy chủ yếu thuộc nhóm flavonoid, terpenoid, steroid. Đối tượng được nghiên cứu nhiều nhất là loài *P. cablin* với khoảng 77 hợp chất được phân lập. Đáng lưu ý, có nhiều hợp chất mới tại thời điểm công bố. Điều này cho thấy chi *Pogostemon* Desf. có triển vọng cung cấp các cấu trúc mới phục vụ cho quá trình nghiên cứu tìm kiếm các hợp chất có hoạt tính sinh học.

Riêng với loài nghiên cứu *P. auricularius*, số lượng các công bố trong và ngoài nước về thành phần hóa học còn rất ít, chỉ với 4 hợp chất được phân lập từ loài này.

1.1.4. Hoạt tính sinh học

Hoạt tính sinh học của các loài trong chi *Pogostemon* Desf. khá đa dạng và phong phú. Các tác dụng điển hình là kháng khuẩn, kháng nấm, kháng virus, giảm đau chống viêm, chống oxi hóa…

1.1.4.1. Tác dụng giảm đau và chống viêm

Trong chi *Pogostemon* Desf., hoạt tính giảm đau chống viêm được nghiên cứu trên 3 loài, đó là *P. cablin*, *P. stelltus* và *P. auricularius*.

Dịch chiết *n*-hexan và ethyl acetat của loài *P. stellatus* làm giảm sự phù nề trong mô hình gây phù tai chuột bằng 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetat (TPA) với liều 0,5 và 1 mg/tai. Ngoài ra, các dịch chiết này còn thể hiện hoạt tính ức chế COX-1 và COX-2 ở mức liều 50 mg/mL với phần trăm ức chế tương ứng là 85,42 và 57,38%;

71,79 và 89,27%. Hợp chất stellatin được phân lập từ dịch chiết *n*-hexan của loài này, đã thể hiện khả năng ức chế enzym COX-1 và COX-2 tương đối mạnh, giá trị IC_{50} lần lượt là 22,3 và 19,7 µM [71].

Dịch chiết methanol của *P. cablin* cũng được báo cáo tác dụng giảm đau trên mô hình gây đau quặn bằng acid acetic và hoạt tính kháng viêm trên mô hình gây phù chân chuột bằng carrageenan với liều 1 g/kg thể trọng chuột. Nghiên cứu sâu hơn về cơ chế, các nhà khoa học đã phát hiện được dịch chiết methanol có thể làm giảm malondialdehyde [72] trong phù nề chân chuột bằng cách tăng cường hoạt động của các enzym chống oxy hóa ở gan như superoxid dismutase, glutathion peroxidase, glutathion reductase và làm giảm hoạt động của enzym cyclooxygenase 2 và yếu tố gây hoại tử khối u (TNF-α) [73].

Ngoài ra, loài *P. auricularius* cũng đã được nghiên cứu hoạt tính chống viêm *in vitro*. Dịch chiết ethanol, các cao chiết phân đoạn *n*-hexan và cloroform đã ức chế sự ly giải hồng cầu tương đối mạnh so với chứng dương acid acetyl salicylic, điều đó được thể hiện qua các giá trị IC_{50} lần lượt là 34,09; 33,56; 35,23 và 45,23 µg/mL [6].

Dựa vào kết quả trên, ta thấy các loài trong chi *Pogostemon* Desf. là nguồn tiềm năng cho hoạt tính giảm đau chống viêm.

1.1.4.2. Tác dụng lên tế bào ung thư

Khả năng chống lại sự tăng sinh tế bào ung thư cổ tử cung HeLa của tinh dầu *P. cablin* đã được nghiên cứu bằng phương pháp MTP với giá trị IC_{50} là 12,2 µg/mL. Ngoài ra, patchoulol đã được chứng minh là một chất tiềm năng chống ung thư, thể hiện qua khả năng làm giảm sự tăng trưởng tế bào và làm tăng các chu trình apoptosis trong tế bào ung thư đại trực tràng người [3], [74].

Acid oleanolic được tìm thấy ở loài *P. cablin* có khả năng làm giảm tỉ lệ sống sót của tế bào ung thư máu người (HL-60) sau 12 giờ với liều > 50 µg/mL. Tuy nhiên, khi kết hợp điều trị acid oleanolic với chiếu xạ ion hóa thì lại làm tăng khả năng sống sót của chúng [74].

1.1.4.3. Tác dụng kháng khuẩn

Tinh dầu của loài *P. cablin* ức chế nhiều chủng vi khuẩn, bao gồm 6 chủng vi khuẩn Gram (-) *Acenitobacter baumanii*, *Aeromonas veronii*, *Escherichia coli*,

Klebsiella pneumonia, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteric* và 4 chủng vi khuẩn Gram (+) *Enterococcus faecalis*, *Staphyllococcus aureus* [75], *Bacillus* spp. và *Streptococcus* spp. [76]. Trong trường hợp sử dụng dịch chiết *n*-hexan từ loài *P. cablin* cũng cho thấy hoạt tính kháng khuẩn mạnh đối với *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* và *Enterobacter aerogenes* [77]. Ở Việt Nam, Vũ Thu Thủy và cộng sự đã báo cáo khả năng ức chế các chủng *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus* và *Escherichia coli* của dịch chiết methanol loài *P. cablin* với các giá trị MIC và MBC từ 125-250 µg/mL [78].

Hoạt tính kháng khuẩn của *P. auricularius* cũng đã được báo cáo. Dịch chiết ethanol và phân đoạn chloroform của loài đã thể hiện khả năng ức chế mạnh sự tăng trưởng của một số chủng vi khuẩn Gram (-) như *Shigella dysentariae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* và vi khuẩn Gram (+) *Bacillus subtilis*; hoạt tính ức chế trung bình với một số chủng vi khuẩn Gram (-) *Shigella sonnei*, *Salmonella typhi* và vi khuẩn Gram (+) *Bacillus megaterium*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* với đường kính vòng vô khuẩn trong khoảng 7-21 mm [6].

Các nghiên cứu sâu hơn về các thành phần chính trong tinh dầu cho thấy, pogoston và patchoulol có trong nhiều loài thuộc chi *Pogostemon* Desf. có tác dụng kháng khuẩn tốt [79]. Patchoulol ức chế chủ yếu 3 dòng vi khuẩn Gram (+) là *Staphylococcus*, *Streptococcus*, và *Enterococcus* và 3 dòng vi khuẩn Gram (-) là *Enterobacter*, *Pseudomonas* và *Acinetobacter* với các giá trị MIC tương ứng trong khoảng 1,5-200 µg/mL và 25-768 µg/mL. Đặc biệt, patchoulol đã thể hiện khả năng chống lại tụ cầu vàng kháng methicillin (MRSA) mạnh hơn levofloxacin. Ngoài ra, nghiên cứu *in vivo* trên chuột, patchoulol ức chế MRSA với liều 100 mg/kg qua đường tiêm phúc mạc. Hoạt tính kháng khuẩn của patchoulol được xem là tương đương với vancomycin hydrochloride [80]. Trong một nghiên cứu khác, patchoulol đã thể hiện hoạt tính kháng khuẩn chọn lọc với *Helicobacter pylori* mà không ảnh hưởng đến các vi khuẩn có lợi của hệ tiêu hóa. Đáng chú ý, tác dụng kháng khuẩn này vượt trội hơn amoxicillin, với giá trị MIC của patchoulol là 78 µg/mL [81].

Tóm lại, trong chi *Pogostemon* Desf., hoạt tính kháng khuẩn chỉ mới được nghiên cứu trên loài *P. cablin* và *P. auricularius*. Trong đó, thành phần tinh dầu, một

số dịch chiết của hai loài nghiên cứu được báo cáo tác dụng kháng khuẩn phổ rộng. Tác dụng tương đối mạnh trên các chủng Gram (+) cũng như một số chủng vi khuẩn kháng thuốc và yếu hơn trên Gram (-).

1.1.4.4. Tác dụng kháng nấm

Hoạt tính kháng nấm đã được nghiên cứu trên nhiều chủng với ba loài *P. cablin*, *P. parviflorus* và *P. auricularius*.

Dịch chiết ethanol của loài *P. parviflorus* đã được báo cáo khả năng ức chế sự tăng trưởng của một số chủng nấm bao gồm: *Microsporum*, *Trichophyton*, *Epidermophyton* với các giá trị MIC và MFC nằm trong khoảng 2,5-10 mg/mL [82]; và một số chủng nấm men *Candida* spp. bao gồm *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* và *C. dubliensis* với các giá trị MIC nằm trong khoảng 2,5-20 mg/mL [83].

Tinh dầu của loài *P. cablin* ức chế mạnh 12 loại nấm thuộc nhóm *Microsporum*, *Trichophyton* và *Epidermophyton* với các giá trị MIC từ 50-400 µg/mL [84]. Ngoài ra, dịch chiết tổng ethanol và các phân đoạn aceton, *n*-hexan của loài còn thể hiện hoạt tính trên chủng nấm *C. albicans* với tỉ lệ ức chế sự phát triển lần lượt là 78, 90 và 91% [85]. Tuy nhiên, trên các chủng nấm *Aspergillus* spp., hoạt tính của *P. cablin* được báo cáo tương đối yếu, với các giá trị MIC > 1500 ppm [86].

Dịch chiết ethanol và dịch phân đoạn chloroform của loài Tu hùng tai *P. auricularius* có khả năng ức chế mạnh một số chủng nấm như *Microsporum* sp., *Trichophyton* sp. và ức chế trung bình trên một số chủng khác như: *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *Pityrosporum ovale* và *Cryptococcus neoformans* với đường kính vòng vô khuẩn từ 7-21 mm [6].

Nghiên cứu sâu hơn thành phần chính trong tinh dầu *P. cablin* cho thấy pogoston có tác dụng kháng nấm tốt trên một số chủng *Candida* spp. với các giá trị MFC từ 50-400 µg/ml. Hơn thế nữa, khi so sánh với chứng dương voriconazol trên các chủng *C. albicans* đã kháng fluconazol, pogoston thể hiện tác dụng mạnh gần bằng voriconazol với các giá trị MIC từ 3,1-50 µg/mL. Đặc biệt, với đường dùng bôi ngoài da, pogoston ở liều 1-4 mg/kg cho hoạt tính ức chế nấm *C. vulvovaginal* mạnh hơn so với chứng dương voriconazol ở liều 4 mg/kg. Ngoài ra, pogoston hấp thu dễ dàng khi uống và có tính an toàn, liều gây chết chuột được xác định là 355 mg/kg, cao hơn

nhiều so với liều có tác dụng. Nghiên cứu này đã cho thấy pogoston có tiềm năng trong điều trị nhiễm *Candida*, đặc biệt là nấm *C. vulvovaginal* [87].

Tóm lại, trong chi *Pogostemon* Desf., hoạt tính kháng nấm đã được nghiên cứu với ba loài *P. cablin*, *P. parviflorus* và *P. auricularius*. Tuy nhiên, phổ tác dụng tương đối hẹp, chủ yếu tác dụng mạnh trên các chủng nấm da bao gồm: *Microsporum*, *Trichophyton, Epidermophyton* và một số chủng nấm men *Candida* spp.

1.1.4.5. Tác dụng kháng virus

Năm 2011, Peng và cộng sự đã báo cáo khả năng kháng virus cúm của dịch chiết loài *P. cablin* trên mô hình gây cúm ở chuột thông qua việc đánh giá các thông số ở phổi [88]. Ngoài ra, các nhà khoa học đã chứng minh dịch chiết methanol và ethyl acetat của *P. cablin* cho tác dụng tốt đối với virus coxsackie nhóm B, các giá trị IC_{50} lần lượt là 26,92 và 13,84 µg/mL [89].

Theo nghiên cứu vào năm 2012, patchoulol phân lập từ loài *P. cablin*, đã thể hiện hoạt tính ức chế virus cúm H1N1 đến 99,8% với giá trị IC_{50} là 2,6 µM [90]. Nghiên cứu của Wu và cộng sự (2013), patchoulol ức chế hoạt động của virus cúm A (H2N2) với giá trị IC_{50} là 4,0 µM. Trong mô hình *in vivo* gây cúm trên chuột, patchoulol cho thấy khả năng chống lại sự lây nhiễm virus ở liều 5 mg/kg/ngày [91]. Hợp chất này cũng đã thể hiện hoạt tính kháng virus H1N1 phụ thuộc liều với giá trị IC_{50} là 2,64 µM [90].

Tóm lại, các nghiên cứu về tác dụng kháng virus của chi *Pogostemon* Desf. chỉ mới tập trung vào loài *P. cablin*. Với hoạt tính mạnh trên nhiều chủng virus, loài *P. cablin* được nhiều nhà khoa học đánh giá là nguồn kháng virus tiềm năng [92].

1.1.4.6. Hoạt tính chống oxi hóa

Trong chi *Pogostemon* Desf., hoạt tính chống oxi hóa đã được nghiên cứu ở loài *P. stellatus* và *P.cablin*.

Dịch chiết ethyl acetat của loài *P. stellatus* có khả năng chống oxi hóa, bắt gốc tự do DPPH và ABTS với các giá trị IC_{50} tương ứng là: 34,11 và 16,29 µg/mL, hoạt tính này yếu hơn so với chứng dương Trolox với IC_{50} là 1,16 và 1,17 µg/mL và acid ascorbic với IC_{50} là 0,68 và 0,77 µg/mL [71].

Tinh dầu của loài *P. cablin* đã được báo cáo khả năng bắt gốc tự do DPPH. Tuy nhiên, hoạt tính này yếu hơn nhiều so với chứng dương butylated hydroxytoluen, thể hiện qua giá trị IC_{50} của tinh dầu và chứng dương lần lượt là 225 và 9,9 µg/mL [93].

Hoạt tính chống oxi hóa của chi *Pogostemon* Desf. được nghiên cứu còn khá ít. Tác dụng của các loài nêu trên là yếu hơn so với chứng dương trong các thử nghiệm.

1.1.4.7. Một số tác dụng sinh học khác

Dịch chiết *n*-hexan của lá cây *P. cablin* có khả năng chống nôn trên gà con. Patchoulol, pachypodol, pogostol và retusin có trong tinh dầu của loài này đã thể hiện khả năng chống nôn với mức liều từ 10-50 mg/kg [94]. Ngoài ra, tác dụng giảm ho, long đờm của loài này cũng đã được chứng minh trên mô hình gây ho ở chuột bằng amoniac và đo nồng độ phenol đỏ trong dịch rửa khí phế quản chuột [95].

Gần đây, năm 2016, nhóm nghiên cứu người Nhật Bản đã khảo sát sơ bộ tác dụng an thần của loài *P. cablin*. Các lô chuột thí nghiệm được hít dịch chiết *n*-hexan của loài với các nồng độ 0,01, 0,1 và 1 mg/lồng. Sau đó, chuột được tiến hành đo vận động. Kết quả nghiên cứu, dịch chiết *n*-hexan của loài *P. cablin* thể hiện hoạt tính an thần phụ thuộc vào liều nghiên cứu [96]. Ngoài ra, dịch chiết nước của loài *P. cablin* đã được báo cáo khả năng bảo vệ và duy trì sự linh hoạt của màng các tế bào biểu mô đường ruột bằng cách kiểm soát hàm lượng NO và các yếu tố hoại tử khối u có trong huyết thanh. Qua kết quả của nghiên cứu này, loài *P. cablin* có triển vọng trong việc bảo vệ đường tiêu hóa chống lại chấn thương hoặc phẫu thuật [97].

Patchoulol đã được báo cáo tác dụng bảo vệ trên mô hình gây tổn thương phổi cấp tính (ALI) ở chuột bằng lipopolysaccharide (LPS). Kết quả của nghiên cứu này đã chứng minh việc sử dụng patchoulol trước khi gây tổn thương phổi chuột làm tăng đáng kể tỷ lệ sống. Cụ thể, lô chuột bị gây tổn thương phổi bằng LPS có khả năng sống sót là 20%. Ở lô chuột được sử dụng patchoulol trong 5 ngày với liều 10, 20 và 40 mg/kg tỷ lệ sống tương ứng là 35, 40 và 55%. Ngoài ra, patchoulol còn làm giảm tổn thương mô bệnh học và hiện tượng phù phổi. Hơn nữa, patchoulol ức chế đáng kể biểu hiện của các yếu tố gây viêm như yếu tố hoại tử khối u (TNF-α) và interleukin 6 (IL 6) trên mô hình chuột gây tổn thương bằng LPS [98].

Dịch chiết loài *P. auricularius* đã được báo cáo tác dụng chống tiêu chảy, làm tan huyết khối và ức chế enzym α-amylase. Các hoạt tính sinh học của loài này được trình bày rõ ở mục 1.2.2.

Một số hoạt tính quan trọng của chi *Pogostemon* Desf. có thể kể đến là kháng khuẩn, kháng nấm, kháng virus, giảm đau chống viêm, chống oxy hóa. Đối tượng nghiên cứu chủ yếu là tinh dầu hoặc dịch chiết của các loài. Bên cạnh đó, một số hợp chất đã phân lập cũng được nghiên cứu sâu hơn về hoạt tính như pogoston hay patchoulol. Nhìn chung, các nghiên cứu về tác dụng sinh học của chi *Pogostemon* Desf. còn khá khiêm tốn, tuy nhiên đã góp phần giải thích được công dụng của một số loài trong Y học dân tộc và cho thấy tiềm năng lớn để phát triển thành thuốc hay thực phẩm chức năng của nhiều loài trong chi này.

1.1.5. Công dụng trong Y học cổ truyền

1.1.5.1. Đối với Y học cổ truyền thế giới

Các loài trong chi *Pogostemon* Desf. được tìm thấy ở nhiều nơi trên thế giới, đặc biệt là các nước nhiệt đới và cận nhiệt đới với nhiều công dụng khác nhau. Theo tổng quan tài liệu, có khoảng 12 trong tổng số 94 loài của chi này được sử dụng trong Y học cổ truyền và Y học dân tộc, bao gồm: *P. cablin*, *P. auricularius*, *P. parviflorus*, *P. elsholtzioides*, *P. amaranthoides*, *P. heyneanus*, *P. myosuroides*, *P. plechtranthoides*, *P. villosus*, *P. purpurascens*, *P. glaber* và *P. benghalensis*. Công dụng được tìm thấy nhiều nhất của các loài thuộc chi *Pogostemon* Desf. là giúp sát trùng, làm sạch vết thương, giải độc bò cạp và rắn cắn, chữa tiêu chảy, hạ sốt, giảm đau và chống viêm [2].

Trong 12 loài này, *P. cablin* được sử dụng phổ biến nhất ở Trung Quốc, Nhật Bản, Ấn Độ, Malaysia, Philipins v.v. với nhiều tác dụng [2]. Tinh dầu của loài này được dùng để điều trị cảm lạnh, chữa ngứa [99]. Các bộ phận khác như rễ cây được dùng chữa đau đầu và tiêu chảy; thân và lá có tác dụng chống nôn và trị nấm [2]. Đặc biệt, dược liệu này còn là thành phần của một số sản phẩm đông dược được dùng điều trị viêm [100], [101].

Theo Y học cổ truyền Ấn Độ, loài *P. parviflorus* được sử dụng để giúp cầm máu; rễ được sử dụng như thuốc bổ cho phụ nữ sau sinh, đặc biệt có thể chữa xuất

huyết tử cung [2]. Các loài *P. elsholtzioides*, *P. amaranthoides* và *P. heyneanus* còn được người dân Ấn Độ sử dụng trị ho và hen suyễn [2].

Ở Trung Quốc, loài *P. glaber* còn được dùng chữa ho ra máu, bế kinh và kinh nguyệt không đều, dùng giải nhiệt, lợi tiểu và làm thuốc bổ [7]. Tinh dầu *P. benghalensis* có công dụng làm mềm và săn da [2].

1.1.5.2. Đối với Y học cổ truyền nước ta

Một số loài thuộc chi *Pogostemon* Desf. đã được sử dụng làm thuốc ở nước ta. Hoắc hương (*P. cablin*) được người dân dùng để chữa đau bụng tiêu chảy, phong thấp, cảm mạo, làm thuốc bổ thần kinh và kích thích tiêu hóa. Trong phương thuốc Hoắc hương chính khí tán, Hoắc hương đóng vai trò là vị quân. Phương thuốc này được dùng trong trường hợp ngoại cảm, kém ăn, ngực bụng đầy tức kèm theo nôn và tiêu chảy, viêm ruột cấp có triệu chứng của biểu hàn nội thấp. Ngoài ra, tinh dầu Hoắc hương rất thơm và có giá trị kinh tế cao [1], [8].

Loài Tu hùng hoa nhỏ (*P. parviflorus*) lại được người dân sử dụng nhiều nhằm sát trùng các vết thương hay chữa rắn cắn [1], [8]. Loài nghiên cứu *P. auricularius* dùng phổ biến với công dụng chữa đau dạ dày, cảm sốt, viêm họng [7], [8] và được trình bày rõ ở mục 1.3.4.

Theo tổng quan tài liệu, có khoảng 8 loài trong số 96 loài của chi được nghiên cứu về thành phần hóa học và hoạt tính sinh học, qua đó cho thấy còn rất nhiều loài chưa được nghiên cứu. Vì vậy trong tương lai, hoá thực vật và hoạt tính sinh học của các loài trong chi *Pogostemon* Desf. cần được tiếp tục nghiên cứu sâu và rộng hơn nhằm khám phá các cấu trúc mới và hoạt tính mới, làm sáng tỏ cơ chế tác dụng cũng như mối quan hệ cấu trúc - hoạt tính của các hoạt chất, đóng góp vào kiến thức về hóa học các hợp chất thiên nhiên cũng như tìm kiếm các hợp chất có hoạt tính sinh học tốt hướng đến tác dụng điều trị.

1.2. Giới thiệu về loài *Pogostemon auricularius* (L.) Hassk.

Loài *Pogostemon auricularius* (L.) Hassk. (synonym: *Dysophylla auricularia* (L.) Blume, *Mentha auricularia* L.) thường được gọi là cây Tu hùng tai hay Cò cò [1], [24].

Pogostemon auricularius (L.) Hassk. thuộc họ Lamiaceae, bộ Hoa môi (Lamiales), phân lớp Hoa môi (Lamiidae), lớp Ngọc lan (Magnoliosida) và ngành Ngọc lan (Magnoliophyta) [2], [9], [10].

Tu hùng tai là thực vật ưa sáng và ẩm nên cây thường phân bố tự nhiên ở khu vực ven suối, bờ ruộng hoặc bãi hoang từ thấp đến độ cao khoảng 1000 m [1], [25]. Loài Tu hùng tai phân bố khá rộng, mọc tự nhiên ở Ấn Độ, Sri Lanka, Bangladesh, Trung Quốc, Đông Nam Á: Thái Lan, Indonesia, Campuchia, Myanmar, Việt Nam, Lào, Philippines và Malaysia. Cây ra hoa, kết quả từ tháng 4 đến tháng 11 [1], [25].

1.2.1. Thành phần hóa học

Cho đến nay, các nghiên cứu về loài Tu hùng tai trên thế giới cũng như trong nước ta còn khá khiêm tốn. Năm 1954, Arthur tiến hành khảo sát với 205 loài thực vật ở Bắc Borneo (Malaysia), đã ghi nhận thành phần alcaloid có trong lá của loài này [102]. Gần đây nhất, Kamaleswari và cộng sự (2016) đã công bố các nhóm chất chính có trong loài bao gồm: alcaloid, phenolic, tanin, flavonoid, glycosid tim, phytosterol, tinh dầu và chất béo; với hàm lượng tinh dầu trong lá của loài thu hái ở Ấn Độ khoảng 9,9% [41].

Nghiên cứu chiết xuất và phân lập đầu tiên của loài Tu hùng tai được công bố từ năm 1987. Nhóm tác giả đã tách được 4 diterpen mới tại thời điểm công bố bao gồm: cleistanth-13,15-dien-19-oic (acid auricularic) (**58**) [65], 7-hydroxycleistanth-13,15-dien-18-oic (**59**), 7-acetoxycleistanth-13,15-dien-18-oic (**60**) và (4*R*,5*S*,8*R*,9*S*,10*S*,14*R*)-cleistanth-12,15-dien-19-oic (**61**) [66]; cấu trúc của các diterpen này đã được thể hiện ở hình 1.2.

Cho đến nay, ở nước ta đã có hai nghiên cứu về loài Tu hùng tai. Nghiên cứu của Trần Huy Thái và cộng sự đã chỉ ra thành phần tinh dầu trong lá loài thu hái tại Phú Thọ khoảng 1,3 %. Bằng phương pháp GC-MS, nhóm tác giả đã xác định 26 hợp chất trong tinh dầu của loài bao gồm các thành phần chính: 1,1,7,7a-tetrametyl-1a,2,3,5,6,7,7a,7b-octahydro-1H-xyclopropa[A]naphthalen, *β*-panasinsen, *α*-panasisen [28]. Gần đây vào năm 2018 với loài Tu hùng tai thu hái tại Đà Nẵng đã tìm thấy 213 hợp chất, chủ yếu là các sesquiterpen, diterpen trong thành phần tinh dầu. Hàm lượng của thành phần chính được tìm thấy trong tinh dầu thân, lá và hoa tương ứng là *β*-

caryophyllen (20,7%; 31,5% và 30,8%), (*E*,*E*)-geranyl linalool (19,6%; 14,0% và 19,4%), *α*-humulen (8,9%; 14,1% và 14,0%), *α*-ylangen (4,4%; 6,8% và 8,6%) và cembren (3,2%; 5,8% và 4,3%) [42].

1.2.2. Hoạt tính sinh học và độc tính

Cho đến nay, đã có một số công trình nghiên cứu về tác dụng sinh học của loài Tu hùng tai.

1.2.2.1. Hoạt tính kháng viêm

Nghiên cứu của Nur và cộng sự vào năm 2015 đã cho thấy dịch chiết ethanol, các cao chiết phân đoạn *n*-hexan và cloroform đã ức chế sự ly giải hồng cầu tương đối mạnh so với chứng dương acid acetyl salicylic, điều đó được thể hiện qua các giá trị IC_{50} lần lượt là 34,09; 33,56; 35,23 và 45,23 µg/mL [6].

1.2.2.2. Hoạt tính kháng vi sinh vật

Cũng trong nghiên cứu của Nur và cộng sự, hoạt tính kháng khuẩn và kháng nấm của loài Tu hùng tai được đánh giá bằng phương pháp đo đường kính vòng vô khuẩn trên đĩa thạch. Dịch chiết ethanol và dịch phân đoạn cloroform của loài thể hiện khả năng ức chế mạnh sự tăng trưởng của một số chủng vi khuẩn, vi nấm như *Shigella dysentariae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Microsporum* sp., *Trichophyton* sp. và *Bacillus subtilis*; ức chế trung bình với một số chủng khác như: *Bacillus megaterium*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Shigeela sonnei*, *Salmonella typhi*, *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *Pityrosporum ovale* và *Cryptococcus neoformans*; với đường kính vòng vô khuẩn từ 7-21 mm [6].

1.2.2.3. Tác dụng làm tan huyết khối

Năm 2015, Nasir và cộng sự đã báo cáo khả năng làm tan huyết khối của dịch chiết methanol từ lá loài Tu hùng tai với hiệu lực làm tan huyết khối 42,23%, trong khi chứng dương streptokinase và chứng âm là nước có hiệu lực lần lượt là l75,18 và 15,82% [5].

1.2.2.4. Tác dụng chống tiêu chảy

Thử nghiệm thực hiện với mô hình gây tiêu chảy bằng magie sulfat trên chuột với liều 500 mg/kg. Dịch chiết ethanol, phân đoạn *n*-hexan và chloroform của loài Tu hùng tai làm giảm số lần đại tiện so với trường hợp không được dùng thuốc. Trong đó,

phân đoạn chloroform đã thể hiện hoạt tính mạnh gần bằng với chứng dương loperamid, số lần đại tiện giảm 58,31% so với chứng âm không dùng thuốc [6].

1.2.2.5. Khả năng ức chế enzym α-amylase

α-amylase là một enzym có vai trò xúc tác thủy phân tinh bột thành đường. Việc ức chế enzym này có thể giúp kiểm soát nồng độ glucose. Các phân đoạn *n*-hexan và cloroform của loài Tu hùng tai được ghi nhận có khả năng ức chế hoạt động enzym α-amylase. Tuy nhiên, tác dụng của hai phân đoạn này yếu hơn so với chứng dương là acarbose, điều này được thể hiện qua các giá trị IC_{50} tương ứng của phân đoạn *n*-hexan và cloroform lần lượt là 111,4 và 33,94 so với chứng dương là 7,19 µg/mL [6].

1.2.2.6. Độc tính

Bên cạnh các hoạt tính sinh học đã được báo cáo, độc tính của Tu hùng tai cũng đã được nghiên cứu để chứng minh tính an toàn của loài này trong định hướng sử dụng làm thuốc. Nur và cộng sự đã đánh giá độc tính cấp của dịch chiết toàn phần ethanol của loài trên chuột và xác định LD_{50} là 3,3 g/kg [6].

Như vậy, các nghiên cứu về hoạt tính sinh học của loài Tu hùng tai còn khá khiêm tốn. Dịch chiết tổng và dịch chiết phân đoạn của loài đã thể hiện tác dụng trên một số mô hình *in vitro* như: kháng viêm, kháng vi sinh vật, khả năng làm tan huyết khối, chống tiêu chảy và ức chế enzym α-amylase, tuy nhiên cơ chế tác dụng vẫn chưa được làm rõ. Ngoài ra, tính an toàn của cây thuốc này cũng đã được báo cáo [5], [6].

1.2.3. Công dụng trong Y học cổ truyền

1.2.3.1. Trên thế giới

Loài Tu hùng tai được tìm thấy ở nhiều nơi trên thế giới, đặc biệt là các nước nhiệt đới và cận nhiệt đới với nhiều công dụng khác nhau, tuy nhiên chủ yếu được dùng để sát khuẩn, giảm đau và chống viêm.

Theo Y học cổ truyền Bangladesh, Tu hùng tai được các bộ lạc Tanchongya - Kongmain sử dụng để sắc thành nước uống, điều trị bệnh uốn ván [103]. Ở Java, Indonesia, lá của cây được sử dụng để chữa đau dạ dày và các vấn đề về tiết niệu ở trẻ nhỏ. Tại Malaysia, người ta lấy toàn cây giã đắp lên bụng chữa đau bụng tiêu chảy và nước sắc toàn cây dùng rửa trị thấp khớp [7], [104]. Theo Y học cổ truyền Trung Quốc, loài này được dùng để trị mồ hôi trộm ở người già và trẻ em [7], [25]. Ở Ấn Độ,

tu hùng tai chủ yếu được sử dụng để chữa trị vết thương bị rắn cắn [105]. Nước sắc từ lá của loài còn có tác dụng hạ sốt [2].

1.2.3.2. Ở trong nước

Cây có tính mát, vị chát, với tác dụng tiêu viêm, giảm đau, làm lành vết thương, thường được sử dụng chữa cảm sốt, sốt rét, viêm họng, rắn cắn, lở ngứa ngoài da, eczema. Liều dùng của loài khoảng 12-24 g tươi hoặc 10-15 g khô, sử dụng dưới dạng thuốc sắc; khi dùng ngoài thì thường giã cây tươi và lấy dịch chiết đắp hoặc đun sôi để rửa [7]. Ngoài ra cây còn được dùng chữa đau dạ dày, rối loạn tiêu hóa, đau thận, tê thấp [1].

Tóm lại, theo tổng quan tình hình nghiên cứu trên thế giới, thành phần hóa học của loài Tu hùng tai đã xác định các nhóm chất tiềm năng như diterpen, flavonoid, tinh dầu, alcaloid, glycosid tim. Đặc biệt, đã phân lập được 4 diterpen mới tại thời điểm công bố. Các diterpen này chưa được tìm hiểu sâu về tác dụng sinh học, tuy nhiên, trong quá trình nghiên cứu về hợp chất thiên nhiên, người ta nhận thấy rằng nhóm diterpene thể hiện nhiều hoạt tính tốt như: kháng ung thư, tiểu đường, kháng khuẩn, kháng nấm, kháng virus, kháng viêm và một số tác dụng khác [106], [107], [108], [109], [110]. Điều này cho phép ta kỳ vọng về việc phát hiện các hợp chất mới có hoạt tính tốt trong thành phần của loài. Ở nước ta, loài Tu hùng tai phân bố khá rộng với nhiều công dụng trong Y học cổ truyền dân tộc. Tuy nhiên ,cho đến nay chỉ có hai nghiên cứu trên loài này về thành phần tinh dầu. Do đó, hoá thực vật và hoạt tính sinh học của loài Tu hùng tai cần được tiếp tục nghiên cứu sâu hơn và rộng hơn, nhằm đóng góp vào kiến thức hóa học các hợp chất thiên nhiên của chi này, đồng thời kiểm chứng, làm rõ các công dụng của cây thuốc cũng như tìm kiếm các hợp chất mới có hoạt tính sinh học. Vì vậy, đề tài: "Nghiên cứu thành phần hóa học và một số tác dụng sinh học của loài Tu hùng tai (*Pogostemon auricularius* L. (Hassk.) họ Lamiaceae" là cần thiết. Kết quả nghiên cứu của đề tài sẽ cung cấp những thông tin về thành phần hóa học của chi *Pogostemon* Desf. nói chung và loài Tu hùng tai thu hái ở Việt Nam nói riêng, đồng thời cũng góp phần đánh giá một số tác dụng sinh học của loài thu hái ở Việt Nam.

Phần 2. ĐỐI TƯỢNG, NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Nguyên liệu nghiên cứu là thân và lá của cây Tu hùng tai thu hái tại thôn Chênh Vênh, xã Hướng Phùng, huyện Hướng Hóa, tỉnh Quảng Trị (N16°44′38,9″; E107°14′51,1″) vào tháng 2 năm 2016. Tên khoa học được giám định bởi Tiến sĩ Nguyễn Thế Cường, Viện Sinh thái và tài nguyên sinh vật, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam là *Pogostemon auricularius* (L.) Hassk. (Phiếu giám định ngày 04/8/2016 của Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam - Phụ lục 1). Mẫu tiêu bản có đủ cơ quan sinh dưỡng và cơ quan sinh sản được lưu trữ tại Khoa Dược, Trường Đại học Y - Dược, Đại học Huế.

Cây Tu hùng tai thu hái tươi được sử dụng để nghiên cứu đặc điểm hình thái. Phần lớn nguyên liệu còn lại được rửa sạch, thái nhỏ, sấy khô ở 50-60°C, xay thành bột thô và bảo quản ở nơi khô thoáng để tiến hành các nghiên cứu về thành phần hóa học, độc tính cấp và tác dụng sinh học.

2.2. Vật liệu nghiên cứu

2.2.1. Dung môi - Hóa chất

- Các dung môi đạt tiêu chuẩn phân tích theo quy định của Dược điển Việt Nam V (methanol, ethanol, *n*-butanol, ethyl acetat, cloroform, dicloromethan, *n*-hexan).

- Các dung môi đạt tiêu chuẩn sử dụng cho máy sắc ký lỏng hiệu năng cao điều chế (PHPLC): methanol 99,9%, acetonitril 99,9% được sản xuất bởi hãng Merck - Đức.

- Các chất chuẩn dùng trong nghiên cứu tác dụng sinh học: Đối chứng dương: N^{G}-Methyl-L-arginin acetate ≥ 98% (L-NMMA), ellipticin ≥ 97%, camptothecin ≥ 90% chuẩn được sản xuất bởi hãng Sigma-Aldrich (Hoa Kỳ).

- Môi trường Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), thiazolyl blue tetrazolium bromid ≥ 97,5% (MTT), carrageenan, acid trichloracetic ≥ 99%, sulforhodamin B 75%, natri nitrit ≥ 99%, sulfanilamid ≥ 98%, N-1-napthylethylenediamin dihydrochlorid ≥ 98%, dimethyl sulfoxid ≥ 99,9% (DMSO),

lipopolysaccharid (LPS) từ *Escherichia coli*, phức hợp phức hợp Avidin-Biotin-Peroxidas, đệm Phosphat buffered saline (PBS), cơ chất 3,3′,5,5′-Tetramethylbenzidine ≥ 99% (TMB), thuốc thử Tris(hydroxymethyl)aminomethan 99,9% (Tris), 2'-[4-ethoxyphenyl]-5-[4-metyl-1-piperazinyl]-2,5'-bi-1H-benzimidazol trihydrochlorid trihydrat ≥ 97% (Hoechst 33342), cơ chất N-Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp p-nitroanilide ≥ 97% (DEVD-pNA) và bộ kit caspase-3 được sản xuất bởi hãng Sigma-Aldrich (Hoa Kỳ).

- Thuốc thử Griess (Promega Cooperation, WI, Hoa Kỳ).

- Huyết thanh bào thai bò (FBS) Gibco-brl (Hoa Kỳ).

- Trypsin EDTA và bộ kit Annexin V FITC/PI được sản xuất bởi hãng Invitrogen (Hoa Kỳ).

- Bộ định lượng interleukin 6, interleukin 10 và yếu tố hoại tử khối u (TNF-α) được sản xuất bởi hãng BioVision (Hoa Kỳ).

- Dung dịch nước muối đẳng trương tiệt trùng được sản xuất bởi hãng Ugo basile (Ý).

2.2.2. Trang thiết bị, dụng cụ

2.2.2.1. Trang thiết bị, dụng cụ sử dụng trong nghiên cứu hóa học

- Dụng cụ thủy tinh: cốc có mỏ, bình nón, đũa thủy tinh, ống nghiệm, bình định mức nhiều thể tích

- Sắc ký bản mỏng (TLC) được thực hiện trên bản mỏng trắng sẵn DC-Alufolien 60 F254 - Merck 1.05715 và RP-18 F254s - Merck (Đức).

- Micropipette Human 100, 200, 1000 µL (Đức).

- Sắc ký cột được tiến hành với chất hấp phụ là silica gel pha thường 60 N, spherical, 40-50 µm, Kanto Chemical Co., Inc., Tokyo (Nhật Bản), silica gel pha đảo RP-18 Fuji Silysia Chemical Ltd, Kasugai, Aichi (Nhật Bản) và sắc ký lọc qua gel Sephadex LH-20 Dowex® 50WX2-100, Sigma-Aldrich (Hoa Kỳ) tại Đại học Y - Dược, Đại học Huế.

- Sắc ký lỏng hiệu năng cao điều chế (PHPLC) được triển khai trên hệ thống máy Agilent Technologies 1260 Infinity II, serial DEAEW01659 (Agilent

Technologies, Hoa Kỳ), cột Zorbax SB-C18 (cỡ hạt 5 µm; 9,4 × 250 mm), đầu dò DAD tại Đại học Y - Dược, Đại học Huế.

- Hệ thống máy cô quay dung tích 20L Buchi Rotavapor R220 (Thụy Sĩ), hệ thống máy cô quay dung tích 1L Buchi Rotavapor R300 (Thụy Sĩ) tại Đại học Y - Dược, Đại học Huế.

- Máy thổi mẫu Eyela MG2200 (Nhật Bản) tại Đại học Y - Dược, Đại học Huế.

- Tủ sấy Memmert (Đức), Đức tại Đại học Y - Dược, Đại học Huế.

- Cân phân tích Sartorius CPA224S, độ chính xác 0,0001 g (Đức) tại Đại học Y - Dược, Đại học Huế.

- Phổ khối phân giải cao (HR-ESI-MS) được đo trên máy Agilent 6530 (Agilent, Hoa Kỳ) tại Viện Hóa sinh biển, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam và trên máy Bruker MicrOTOF-Q 10187 (Hoa Kỳ) tại Phòng Thí nghiệm phân tích trung tâm, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh.

- Phổ lưỡng sắc tròn (CD) được đo trên máy Jasco J-805 Spectropolarimeter (Nhật Bản) tại Viện Hóa sinh biển, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

- Phổ cộng hưởng từ hạt nhân một chiều (^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR) và hai chiều (HSQC, HMBC, COSY, NOESY) được đo trên máy Bruker AM500 FT-NMR Spectrometer (Hoa Kỳ) và máy Bruker Avance 500 (Hoa Kỳ) với TMS là chất chuẩn nội tại Viện Hoá học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

2.2.2.2. Trang thiết bị, dụng cụ sử dụng trong nghiên cứu tác dụng sinh học

- Buồng đếm tế bào (Fisher, Hoa kỳ), đĩa 96 giếng nhựa - Corning (Hoa Kỳ) tại Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm và Khoa học Việt Nam.

- Máy đọc ELISA 96 giếng - Bio-rad (Hoa Kỳ) tại Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm và Khoa học Việt Nam.

- Bể siêu âm Elmasonic S100H (Đức) tại Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm và Khoa học Việt Nam.

- Kính hiển vi huỳnh quang Axio Plan 2 – Carl Zeiss (Đức) tại Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm và Khoa học Việt Nam.

- Micropipette - Rainin (Nhật Bản) và Multi Channel Pipette - CAPP (Đức) tại Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm và Khoa học Việt Nam.

- Tủ lạnh - 80°C Sanyo (Nhật Bản) tại Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm và Khoa học Việt Nam.

- Cân phân tích HR-250AZ (Hàn Quốc) sai số 0,0001 g. Cân phân tích Satorius (Đức) sai số 0,001 g. Cân súc vật (Satorius - Đức) dùng để cân chuột tại Viện Dược liệu.

- Chuồng nhốt chuột, bình uống nước, kim đầu tù, xilanh, panh, kéo và các thiết bị cần thiết khác.

- Dụng cụ thủy tinh: cốc có mỏ, bình nón, đũa thủy tinh, ống nghiệm, bình định mức nhiều thể tích

2.2.3. Động vật thực nghiệm

- Chuột nhắt trắng chủng *Swiss albino* trưởng thành (trọng lượng từ 20-25 g) được sử dụng trong nghiên cứu này do Học viện Quân Y cung cấp.

- Mọi quy trình thí nghiệm tuân thủ chặt chẽ theo hướng dẫn chăm sóc và sử dụng động vật trong phòng thí nghiệm của Viện Dược liệu.

2.2.4. Tế bào thực nghiệm

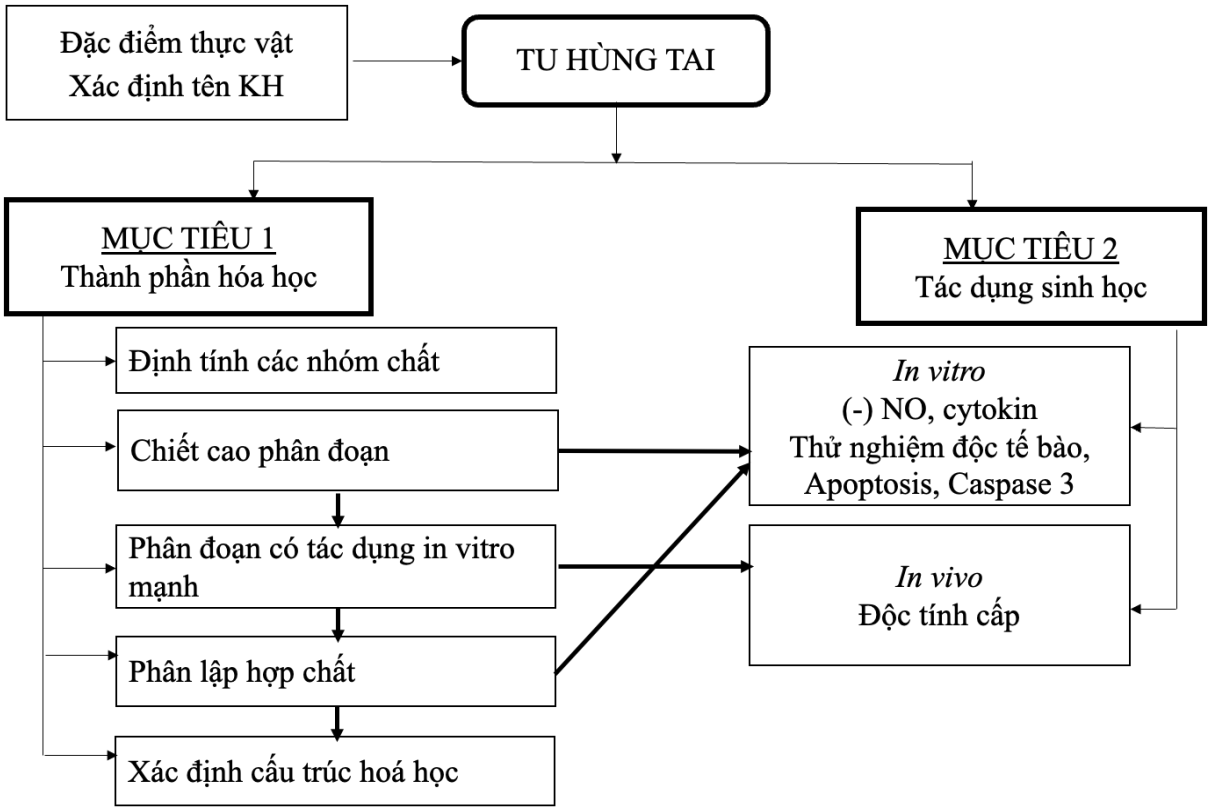
- Dòng tế bào RAW 264.7 được cung cấp bởi Domenico Delfino, Đại học Perugia, Ý.

- Dòng tế bào Hep-G2 (ung thư gan người), AGS (ung thư dạ dày người), KB (ung thư biểu mô người), LU-1 (ung thư phổi người) và SW-480 (ung thư ruột kết người) được cung cấp bởi J. M. Pezzuto, Đại học Hawaii, Mỹ và GS. Jeanette Maier, Đại học Milan, Ý.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Sơ đồ thiết kế nghiên cứu

Luận án được thiết kế nghiên cứu theo sơ đồ Hình 2.1.



Hình 2.1. *Sơ đồ thiết kế nghiên cứu*

2.3.2. Phương pháp nghiên cứu thực vật

2.3.2.1. Phân tích, mô tả hình thái thực vật

Quan sát, mô tả đặc điểm hình thái điều kiện sinh trưởng và phát triển của cây Tu hùng tai tại thực địa theo phương pháp ghi tại các tài liệu [111], [112]. Chụp ảnh, thu hái và làm tiêu bản mẫu khô. Mẫu tiêu bản khô với đầy đủ cơ quan sinh dưỡng (thân, lá và rễ) và cơ quan sinh sản (hoa) được lưu trữ.

2.3.2.2. Giám định tên khoa học

Giám định tên khoa học bằng phương pháp so sánh phân tích đặc điểm hình thái của cây, bộ phận sinh sản, so sánh với tiêu bản lưu trữ và tài liệu phân loại thực vật [1], [7], [25], [26] đồng thời so sánh với các tiêu bản lưu giữ tại Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam cùng với sự hỗ trợ của nhà khoa học chuyên ngành thực vật học.

2.3.3. Phương pháp nghiên cứu thành phần hóa học

Nghiên cứu thành phần hoá học được thực hiện tại tại Khoa Dược, Đại học Y - Dược, Đại học Huế.

2.3.3.1. Phương pháp định tính các nhóm hợp chất bằng phản ứng hóa học

Định tính các nhóm chất hữu cơ chính trong dịch chiết toàn phần theo các tài liệu [113], [114].

- Định tính glycosid tim: Phản ứng Liebermann - Burchard, phản ứng Baljet, phản ứng Legal và phản ứng Keller - Kiliani.

- Định tính flavonoid: phản ứng Cyanidin, phản ứng với NaOH, phản ứng với $FeCl_3$, phản ứng với hơi amoniac.

- Định tính saponin: hiện tượng tạo bọt, phản ứng Salkowski và phản ứng Liebermann - Burchard.

- Định tính coumarin: phản ứng mở đóng vòng lacton, phản ứng Diazo và phản ứng chuyển từ đồng phân *cis* sang đồng phân *trans* dưới tác dụng của tia tử ngoại.

- Định tính tanin: phản ứng với $FeCl_3$, phản ứng với dung dịch gelatin 1% và phản ứng với chì acetat.

- Định tính anthranoid: phản ứng Borntraeger và vi thăng hoa.

- Định tính alcaloid: phản ứng với thuốc thử Mayer, Dragendorff và Bouchardat.

- Định tính chất béo: vết mờ trên giấy lọc.

- Định tính steroid: phản ứng Liebermann.

- Định tính acid hữu cơ: phản ứng với tinh thể Na_2CO_3.

- Định tính acid amin: phản ứng với thuốc thử Ninhydrin.

- Định tính đường khử: phản ứng với thuốc thử Fehling.

2.3.3.2. Phương pháp chiết xuất và phân lập các hợp chất

a. Chiết xuất

Mẫu nghiên cứu thu hái tại huyện Hướng Hóa, tỉnh Quảng Trị được rửa sạch, thái nhỏ, sấy khô ở 50-60^oC, sau đó xay thành bột thô. Dịch chiết toàn phần thu được bằng cách sử dụng phương pháp ngâm bột thô dược liệu trong methanol ở nhiệt độ phòng, mỗi lần ngâm kéo dài 07 ngày, sau đó, thay methanol mới và tiến hành đợt chiết tiếp theo. Thỉnh thoảng khuấy trộn lớp bột dược liệu để gia tăng hiệu quả chiết.

Kết thúc 3 đợt chiết, dịch chiết được gộp lại và được tiến hành loại dung môi dưới áp suất thấp thu được cao toàn phần.

Phương pháp chiết xuất phân đoạn thực hiện bằng cách phân tán cao toàn phần trong nước rồi tiến hành chiết xuất phân bố lỏng-lỏng với các dung môi hữu cơ có độ phân cực tăng dần: *n*-hexan, dicloromethan, ethyl acetat. Loại dung môi thu được cao tương ứng của từng phân đoạn *n*-hexan, dicloromethan, ethyl acetat và phần nước còn lại [115], [116], [117], [118].

b. Phân lập

Quá trình phân lập các hợp chất tự nhiên phần lớn sử dụng phương pháp sắc ký cột hở và hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao điều chế. Sắc ký lớp mỏng silica gel pha thường (Merck, Kieselgel 60 F_{254}) hay pha đảo RP18 (Merck, RP-18 F_{254s}) được sử dụng để định hướng và theo dõi quá trình phân lập đồng thời giúp kiểm tra độ tinh khiết của hợp chất phân lập được [115], [116], [117], [118], [119].

- Sắc ký cột hấp phụ

Sắc ký hấp phụ với pha tĩnh là silica gel pha thường (Silica gel 60, 40-63 µm, Merck) và silica gel pha đảo YMC RP-18 (Silica gel 30-50 µm, FuJisilisa Chemical Ltd.). Quá trình phân tách phụ thuộc chủ yếu vào sự khác nhau về ái lực của phân tử các hợp chất phân tích với bề mặt pha tĩnh. Việc lựa chọn được pha tĩnh và pha động thích hợp sẽ tạo ra quá trình phân tách tối ưu, tối đa hóa lượng chất phân tích thu được [117], [119]. Phương pháp nhồi cột ướt được sử dụng chủ yếu đối với tất cả các loại sắc ký cột. Mẫu được nạp lên cột bằng các phương pháp nạp nạp mẫu ướt và nạp mẫu khô. Một số cột sắc ký bằng thuỷ tinh với các kích thước khác nhau như 3,3 × 65; 2,3 × 51; 1,5 × 70 và 0,8 × 80 cm thường được sử dụng tuỳ thuộc vào khối lượng và tính chất thô hay tương đối tinh sạch của cao phân tách.

- Sắc ký lọc gel

Pha tĩnh sử dụng là Sephadex LH-20 được cấu tạo bởi những hạt mà trên bề mặt của nó có những lỗ rỗng nhỏ, kích thước bằng nhau. Những chất phân tích có kích thước phân tử lớn sẽ không thể xâm nhập sâu vào mạng lưới các hạt pha tĩnh, những chất có kích thước phân tử trung bình sẽ xâm nhập mạng lưới ở một mức độ nhất định, trong khi đó các chất có kích thước phân tử nhỏ có thể xâm nhập một cách dễ dàng.

Chất có kích thước phân tử lớn nhất sẽ bị rửa giải ra khỏi cột đầu tiên và cứ tiếp tục như vậy. Quá trình phân tách phụ thuộc vào hình dạng và kích thước tiểu phân các chất phân tích trong hỗn hợp [117], [119]. Một số cột sắc ký bằng thuỷ tinh với các kích thước khác nhau như 1,8 × 130; 2 × 90 và 0,8 × 80 cm thường được sử dụng tuỳ thuộc vào khối lượng mẫu phân tích.

- Sắc ký lỏng hiệu năng cao điều chế

Nghiên cứu tiến hành phân lập các hợp chất với hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao điều chế (PHPLC) Agilent Technologies 1260 Infinity II, serial DEAEW01659 (Agilent Technologies, Hoa Kỳ), cột Zorbax SB-C18 (cỡ hạt 5 µm; 9,4 × 250 mm), đầu dò DAD. Thứ tự rửa giải các chất ra khỏi cột phụ thuộc vào hệ số phân bố của chúng với hai pha hay liên quan đến ái lực của các hợp chất với pha tĩnh và pha động. Thành phần pha động mang chất phân tích di chuyển qua cột cần được khảo sát và điều chỉnh để rửa giải các chất phân tích với thời gian hợp lý [117], [119], [120].

2.3.3.3. Phương pháp xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất

Cấu trúc hóa học của các hợp chất được xác định dựa vào dữ liệu phổ khối lượng phân giải cao (HR-ESI-MS), phổ cộng hưởng từ hạt nhân một chiều (^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR) và hai chiều (HMBC, HSQC, COSY, NOESY), phổ nhị sắc tròn (CD) và so sánh với các dữ liệu phổ đã công bố trong tài liệu tham khảo.

2.3.4. Phương pháp nghiên cứu độc tính cấp và tác dụng sinh học

2.3.4.1. Chuẩn bị mẫu thử

a. Sàng lọc tác dụng chống viêm ức chế sản sinh NO

Mẫu thử là cao chiết toàn phần methanol (M) và các cao chiết phân đoạn bao gồm: *n*-hexan (H), dicloromethan (D), ethyl acetat (E) và cao phần nước còn lại (W) được mô tả tại mục 2.3.3.2.

b. Độc tính cấp và nghiên cứu tác dụng sinh học

Dựa trên kết quả sàng lọc hoạt tính chống viêm *in vitro* của cao chiết toàn phần và cao chiết phân đoạn, cao chiết có tác dụng ức chế sản sinh NO mạnh nhất được tiếp tục tiến hành nghiên cứu độc tính cấp trên động vật thực nghiệm và xác định liều LD_{50}. Bên cạnh đó, các hợp chất tinh khiết phân lập từ phân đoạn có tác dụng chống viêm *in vitro* tốt

nhất sẽ được tiến hành nghiên cứu sâu hơn về tác dụng chống viêm ức chế sản sinh NO và tác dụng gây độc tế bào ung thư.

2.3.4.2. Nghiên cứu tác dụng chống viêm in vitro

a. Đánh giá tác dụng ức chế sản sinh NO của đại thực bào

Hoạt tính chống viêm được đánh giá qua khả năng ức chế sản sinh NO của tế bào đại thực bào chuột RAW 264.7 được kích thích bằng LPS. Nồng độ NO trong môi trường thực nghiệm được xác định thông qua phản ứng Griess. Phản ứng dựa trên sự tạo phức màu của NO trong thí nghiệm ở dạng nitrit với thuốc thử Griess. Đo sự thay đổi mật độ quang tại bước sóng 540 nm. Hoạt tính kháng viêm được tiến hành sau khi kiểm tra độc tính đối với tế bào bằng phương pháp so màu MTT [121], [122].

Tiến hành thí nghiệm:

- Mẫu thử:

+ Dịch chiết toàn phần MeOH (M) và các chiết xuất phân đoạn: *n*-hexan (H), dicloromethan (D), ethyl acetat (E) và nước (W).

+ Các hợp chất tinh khiết phân lập được từ phân đoạn có tác dụng chống viêm *in vitro* tốt nhất.

- Dòng tế bào: Tế bào đại thực bào chuột RAW 264.7

- Nuôi cấy tế bào: Dòng tế bào đại thực bào chuột RAW 264.7 được nuôi cấy trong môi trường DMEM với thành phần kèm theo gồm L-glutamin 2 mM, HEPES 10 mM và natri pyruvat 1 mM, ngoài ra bổ sung FBS 10%. Tế bào được cấy chuyển sau 3-5 ngày với tỉ lệ (1:3) và nuôi trong tủ nuôi cấy ở điều kiện 37°C, 5% CO_2 [122].

- Xác định khả năng gây độc tế bào bằng MTT [123]: Mẫu thử được đưa vào các giếng của khay 96 giếng để có nồng độ 100; 20 µg/mL. Sau khi điều chỉnh để có mật độ tế bào phù hợp, hút 180 mL tế bào vào các giếng của khay 96 giếng đã có mẫu thử. Trên cùng một đĩa thử, bố trí một số giếng để làm đối chứng không có mẫu thử, chỉ có dung môi pha mẫu là DMSO 10%. Khay thí nghiệm được đưa vào tủ ấm nuôi cấy trong thời gian 72 giờ với điều kiện 37°C và 5% CO_2. Sau 72 giờ, 10 µL MTT được cho vào mỗi giếng. Sau 4 giờ, loại bỏ môi trường, tinh thể formazan được hòa tan bằng 50 µL DMSO 100%. Giá trị OD đo ở bước sóng 540 nm bằng máy quang phổ. Lượng tế bào sống sót sẽ được tính theo công thức:

$$\% \text{ tế bào sống sót} = \frac{OD_{(\text{chất thử})} - OD_{(\text{đối chứng trắng})}}{OD_{(DMSO)} - OD_{(\text{đối chứng trắng})}} \times 100\ (\%)$$

- Xác định khả năng ức chế sản sinh NO của tế bào đại thực bào RAW 264.7: Tế bào RAW 264.7 được đưa vào đĩa 96 giếng ở nồng độ 2×10^5 tế bào/giếng và nuôi trong tủ ấm 24 giờ ở 37°C và 5% CO_2. Tiếp theo, môi trường nuôi cấy được loại bỏ, thay bằng môi trường DMEM không có FBS trong 3 giờ. Tế bào sau đó được ủ mẫu nghiên cứu ở các nồng độ 100; 20; 4 và 0,8 µg/mL trong 2 giờ trước khi được kích thích sản sinh yếu tố NO bằng 1 µg/mL LPS trong 24 giờ.

- Đối chứng âm là giếng không được ủ mẫu mà chỉ sử dụng dung dịch pha mẫu. Đối chứng dương được sử dụng L-NMMA ở các nồng độ 100; 20; 4 và 0,8 µg/mL.

- Nitrit (NO_2^-) được xem là chỉ thị cho việc tạo NO, sẽ được xác định nhờ bộ thuốc thử Griess. Cụ thể, 100 µL môi trường nuôi tế bào (ủ mẫu) được chuyển sang đĩa 96 mới và được thêm vào 100 µL thuốc thử Griess (50 µL of 1% (w/v) sulfanilamid trong 5% (v/v) acid phosphoric và 50 µL 0,1% (w/v) N-1-naphthylethylenediamin dihydrochlorid pha trong nước). Hỗn hợp này được ủ tiếp ở nhiệt độ phòng trong 10 phút và hàm lượng nitrit sẽ được đo bằng máy đọc đĩa 96 giếng ở bước sóng 540 nm.

- Môi trường DMEM không có FBS được sử dụng như giếng trắng. Hàm lượng nitrite của từng mẫu thí nghiệm được xác định nhờ vào đường cong hàm lượng chuẩn $NaNO_2$ và được so sánh % với mẫu chứng âm (LPS). Khả năng ức chế sản sinh NO của mẫu được xác định nhờ công thức :

$$\% \text{ Ức chế} = 100 - \frac{NO_{(\text{chất thử})} - NO_{(\text{đối chứng âm})}}{NO_{(\text{đối chứng dương})} - OD_{(\text{đối chứng âm})}} \times 100\ (\%)$$

- Phép thử được lặp lại 3 lần và lấy giá trị trung bình để đảm bảo tính chính xác. Phân tích số liệu, xây dựng đồ thị và tính toán giá trị IC_{50} (nồng độ ức chế 50% sự sản sinh NO) sẽ được xác định nhờ vào phần mềm máy tính TableCurve 2Dv4.

b. Đánh giá khả năng điều hoà cytokin

Tiến hành thí nghiệm

- Mẫu thử: Hợp chất tinh khiết phân lập được từ phân đoạn cao chiết có tác dụng chống viêm *in vitro* tốt nhất.

- Dòng tế bào: Tế bào đại thực bào chuột RAW 264.7

- Nuôi cấy tế bào: Dòng tế bào đại thực bào chuột RAW 264.7 được nuôi cấy trong môi trường DMEM với thành phần kèm theo gồm L-glutamin 2 mM, HEPES 10 mM và natri pyruvat 1 mM, ngoài ra bổ sung FBS 10%. Tế bào được cấy chuyển sau 3-5 ngày với tỉ lệ (1:3) và nuôi trong tủ ấm CO_2 ở điều kiện 37°C, 5% CO_2.

- Xác định tác động của mẫu thử đến sự tổng hợp các cytokin: Tế bào RAW 264.7 được đưa vào các giếng thí nghiệm của đĩa 96 giếng với lượng tế bào phù hợp (5×10^4 tế bào trong 190 µL môi trường) và ủ ở 37°C qua đêm cho tế bào ổn định. Mẫu thử (10 µL) pha trong DMSO 10% được đưa vào các giếng ở các nồng độ khác nhau. Đối chứng âm là giếng không có chất thử nhưng có tế bào (190 µL) và 10 µL DMSO 10%. Sau 2 giờ thêm LPS với nồng độ 1 µg/mL vào tất cả các giếng thí nghiệm. Sau 24 giờ, thu dịch nổi nuôi tế bào đã được thử chất để xác định sự có mặt của interleukin 6, interleukin 10 và TNF-α có trong môi trường nuôi cấy [124].

- Phương pháp xác định IL-6, IL-10 và TNF-α được thực hiện dựa trên bộ kit định lượng IL-6, IL-10, TNF-α và theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Cụ thể, thêm 100 µL mẫu thử (môi trường nuôi cấy) vào các giếng thí nghiệm và 100 µL dung môi làm đối chứng âm. Ủ bản ở 37°C trong 90 phút. Loại bỏ dịch nổi và thêm 100 µL kháng thể IL-6, IL-10, TNF-α gắn biotin vào các giếng thí nghiệm. Khay thí nghiệm được ủ ở 37°C trong 60 phút.

- Rửa khay thí nghiệm 5 lần bằng PBS 0,01 M, thêm 100 µL phức hợp Avidin-Biotin-Peroxidase vào các giếng thí nghiệm. Ủ khay thí nghiệm ở 37°C trong 30 phút. Rửa khay thí nghiệm 5 lần bằng PBS 0,01 M, thêm 90 µL cơ chất TMB vào các giếng thí nghiệm. Ủ khay thí nghiệm ở 37°C, tránh ánh sáng trong 20-25 phút, cuối cùng, thêm 100 µL dung dịch dừng phản ứng. Kết quả được đọc bằng máy Tecan GENios Promicroplate reader ở bước sóng 450 nm [124].

Tính toán kết quả

$$\% \text{ sinh cytokin} = [(OD_{mẫu} - OD_{blank})/(OD_{LPS} - OD_{blank})]$$

% ức chế sinh cytokin = 100% - [($OD_{mẫu}$ – OD_{blank})/(OD_{LPS} – OD_{blank})]

- Kết quả được trình bày dưới dạng TB±SD. Số liệu được phân tích bằng phần mềm GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego CA). Sai khác có ý nghĩa thống kê khi $P < 0,05$.

2.3.4.3. Đánh giá tác dụng gây độc một số dòng tế bào ung thư

- Chuẩn bị mẫu thử: các hợp chất tinh khiết phân lập được

- Các dòng tế bào: Hep-G2 (ung thư gan người), AGS (ung thư dạ dày người), KB (ung thư biểu mô người), LU-1 (ung thư phổi người) và SW-480 (ung thư ruột kết người).

- Nuôi cấy tế bào: Các dòng tế bào ung thư được nuôi cấy dưới dạng đơn lớp trong môi trường nuôi cấy DMEM với thành phần kèm theo gồm L-glutamin 2 mM, natri bicarbonat 1,5 g/L, glucose 4,5 g/L, HEPES 10 mM và natri pyruvat 1,0 mM, ngoài ra bổ sung FBS 10%. Tế bào được cấy chuyển sau 3-5 ngày với tỉ lệ (1:3) và nuôi trong tủ ấm ở điều kiện 37°C, 5% CO_2.

a. Phương pháp thử tác dụng gây độc tế bào ung thư với thuốc nhuộm SRB

Phương pháp thử độ độc tế bào *in vitro* [125] được Viện Ung thư Quốc gia Hoa Kỳ (National Cancer Institute - NCI) xác nhận là phép thử độ độc tế bào chuẩn nhằm sàng lọc, phát hiện các chất có khả năng kìm hãm sự phát triển hoặc diệt tế bào ung thư ở điều kiện *in vitro*. Phép thử này được thực hiện theo phương pháp của Monks [125] nhằm xác định hàm lượng tổng số protein tế bào dựa vào mật độ quang học (Optical Density - OD) đo được khi thành phần protein của tế bào được nhuộm bằng Sulforhodamine B (SRB). Giá trị OD máy đo được tỉ lệ thuận với lượng SRB gắn với phân tử protein, do đó lượng tế bào càng nhiều (lượng protein càng nhiều) thì giá trị OD càng lớn.

Tiến hành thí nghiệm:

- Mẫu thử (10 µL) pha trong DMSO 10% được đưa vào các giếng của khay 96 giếng để có nồng độ sàng lọc là 20 µg/mL. Chất thử có hoạt tính được xác định IC_{50} nhờ dải nồng độ 100; 20; 4 và 0,8 µg/mL. Tế bào thí nghiệm được trypsin hóa để làm rời tế bào và đếm trong buồng đếm để điều chỉnh mật độ cho phù hợp với thí nghiệm.

Thêm vào các giếng thí nghiệm lượng tế bào phù hợp (trong 190 µL môi trường) và để chúng phát triển trong vòng từ 3-5 ngày.

- Một khay 96 giếng khác không có chất thử nhưng có tế bào ung thư (180 µL) sẽ được sử dụng làm đối chứng ngày 0. Sau 1 giờ, đĩa đối chứng ngày 0 sẽ được cố định tế bào bằng acid Trichloracetic.

- Sau giai đoạn phát triển trong tủ ấm CO_2, tế bào được cố định vào đáy giếng bằng TCA trong 30 phút, được nhuộm bằng SRB trong 1 giờ ở 37°C. Loại bỏ SRB và các giếng thí nghiệm được rửa 3 lần bằng acid acetic 5% rồi để khô ở nhiệt độ phòng.

- Cuối cùng, sử dụng thước thử Tris 10 mM để hòa tan lượng SRB đã bám và nhuộm các phân tử protein, đưa lên máy lắc đĩa lắc nhẹ trong 10 phút và sử dụng máy đọc ELISA để đọc kết quả về hàm lượng màu của chất nhuộm SRB thông qua phổ hấp thụ ở bước sóng 515 nm.

Tính toán kết quả

- Khả năng sống sót của tế bào khi có mặt chất thử sẽ được xác định thông qua công thức sau:

$$\% \text{ Tế bào sống sót} = \frac{[OD_{(\text{chất thử})} - OD_{(\text{ngày } 0)}] \times 100}{[OD_{(\text{đối chứng âm})} - OD_{(\text{ngày } 0)}]}$$

$$\% \text{ Tế bào bị ức chế} = 100 - \% \text{ Tế bào sống sót}$$

- Các phép thử được lặp lại 3 lần để đảm bảo tính chính xác. Ellipticin được sử dụng làm chất đối chứng dương với các nồng độ thử nghiệm là 10; 2; 0,4 và 0,08 µg/mL. DMSO 10% luôn được sử dụng như đối chứng âm. Giá trị IC_{50} sẽ được xác định nhờ vào phần mềm máy tính TableCurve 2Dv4.

b. Nghiên cứu hoạt tính cảm ứng apoptosis

**) Phương pháp nhuộm nhân tế bào với Hoechst 33342*

Khả năng gây apoptosis của hoạt chất được xác định thông qua phương pháp nhuộm Hoechst 33342. Cụ thể, tế bào LU-1 được nuôi trong đĩa peptri 24 giờ ở 37°C sau đó được ủ với mẫu thí nghiệm. Camptothecin được dùng làm đối chứng dương, DMSO 10% được sử dụng làm đối chứng âm. Sau 24 giờ ủ mẫu, tế bào được cố định bằng formandehyd 4%. Sau 30 phút, tế bào được rửa lại bằng PBS và nhuộm bằng thuốc nhuộm Hoechst 33342 (0,5 µg/mL) trong 10 phút. Tế bào được quan sát bằng

kính hiển vi huỳnh quang ở bước sóng kích thích cực đại là 350 nm và bước sóng phản xạ cực đại là 461 nm. Xác định số lượng tế bào apoptosis trong ít nhất 200 tế bào quan sát được qua kính hiển vi. Tế bào apoptosis được xác định là những tế bào có nhân sáng hơn (do nhiễm sắc chất bị cô đặc) hay nhân bị phân chia thành mảnh nhỏ [126].

**) Phương pháp trắc lưu tế bào*

Thí nghiệm được thực hiện theo Kit Anexin V/cell của Invitrogen như sau: 1×10^6 tế bào được ủ với mẫu thử hoặc dung môi pha mẫu 24 giờ được thu vào ống falcon. Sau khi ly tâm loại bỏ môi trường, tế bào được rửa lại bằng PBS. Cặn tế bào được hòa lại trong 100 µL dung dịch đệm liên kết và bổ sung thêm 5µL Anexin V và 1 µL PI (100 µg/mL). Tiếp tục ủ tế bào trong 15 phút ở 37°C sau đó thêm vào các ống tế bào 400 µL dung dịch đệm liên kết. Tổng số 10 000 tế bào thuộc mỗi mẫu được phân tích bằng hệ thống đếm tế bào dòng chảy Novocyte để xác định tỉ lệ tế bào biểu hiện apoptosis [127].

**) Nghiên cứu khả năng cảm ứng sản sinh caspase-3*

Được thực hiện theo Kit phép thử so màu caspase-3 của Biovision theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Cụ thể, tế bào đã được cảm ứng với mẫu thử trong 24 giờ, sẽ được ly giải với 50 µL đệm ly giải trong 10 phút. Tiến hành ly tâm thu dịch tế bào. Xác định hàm lượng protein trong dịch tế bào bằng cách pha loãng protein với nồng độ 50 µg trong 50 µL dung dịch đệm ly giải cho mỗi phản ứng. Sau đó, cho 50 µL dung dịch đệm phản ứng và 5 µL cơ chất DEVD-pNA (nồng độ 200 µM) và ủ 37°C trong 1 giờ. Đọc kết quả trên máy đọc ở bước sóng 405 nm [128].

2.3.4.4. Nghiên cứu độc tính cấp

Nghiên cứu độc tính cấp và xác định liều LD_{50} trên chuột nhắt trắng bằng đường uống được tiến hành theo hướng dẫn khảo sát độc tính cấp của thuốc do Bộ Y tế ban hành và các tài liệu [129], [130]. LD_{50} được tính theo phương pháp Behrens-Karber. Nghiên cứu được tiến hành tại Khoa Dược lý - Sinh hóa, Viện Dược liệu.

Tiến hành thí nghiệm

- Chuột mua về được nuôi 3 ngày trước khi thí nghiệm để chuột thích nghi điều kiện thí nghiệm, cho ăn uống thoải mái. Trước khi thí nghiệm, cho chuột nhịn đói qua

đêm, để nước uống theo nhu cầu của chuột. Chuột được chia thành các lô thí nghiệm (mỗi lô 10 chuột), mỗi lô chuột được uống các mức liều khác nhau của mẫu thử.

- Đường dùng sản phẩm là đường uống, cho chuột uống bằng cách dùng kim tiêm có kim đầu tù để đưa mẫu thử một cách nhẹ nhàng vào dạ dày chuột.

- Chuẩn bị mẫu thử: Mẫu được cân một lượng chính xác rồi nghiền với một lượng chính xác dung dịch CMC 1% để đạt được nồng độ thích hợp cho chuột uống.

- Thời gian theo dõi: Sau khi được uống mẫu thử, chuột được cho ăn và uống đầy đủ. Theo dõi và quan sát các biểu hiện về hành vi, hoạt động, ăn uống, bài tiết của chuột và số chuột sống chết trong 3 ngày (72 giờ).

- Tìm liều tối đa mà không có chuột nào của lô thí nghiệm chết (LD_0) và liều tối thiểu để 100% chuột của lô thí nghiệm chết (LD_{100}). Thêm 2-3 liều trung gian giữa 2 liều nói trên để xác định LD_{50}.

Tính toán kết quả

$$LD_{50} = LD_{100} - [\ \sum(d \times z)/n\ ]$$

Trong đó:

d là hiệu số của hai liều kế tiếp

z là trung bình số chuột chết giữa 2 liều kế tiếp

n là số chuột trong 1 lô.

2.3.5. Phương pháp xử lý số liệu

Các số liệu nghiên cứu được xử lý thống kê theo phương pháp thống kê Y sinh học, sử dụng phần mềm Excel hoặc SPSS 16.0.

- Đánh giá, so sánh thống kê giữa các lô thí nghiệm bằng phương pháp t- test student hoặc Mann-Whitney test. Sự khác nhau có ý nghĩa thống kê khi $P < 0,05$.

- Giá trị IC_{50} tính toán trên phần mềm TableCurve 2Dv4 và GraphPad Prism 6.0.

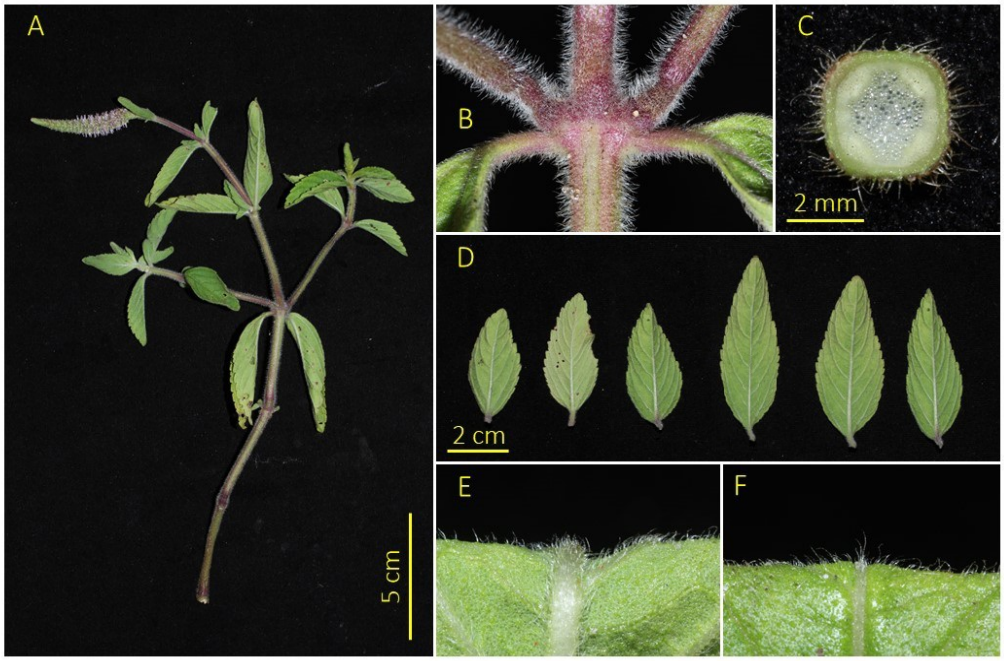
- Số liệu được thể hiện bằng giá trị trung bình và sai số SD hoặc SE.

Phần 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Kết quả giám định tên khoa học

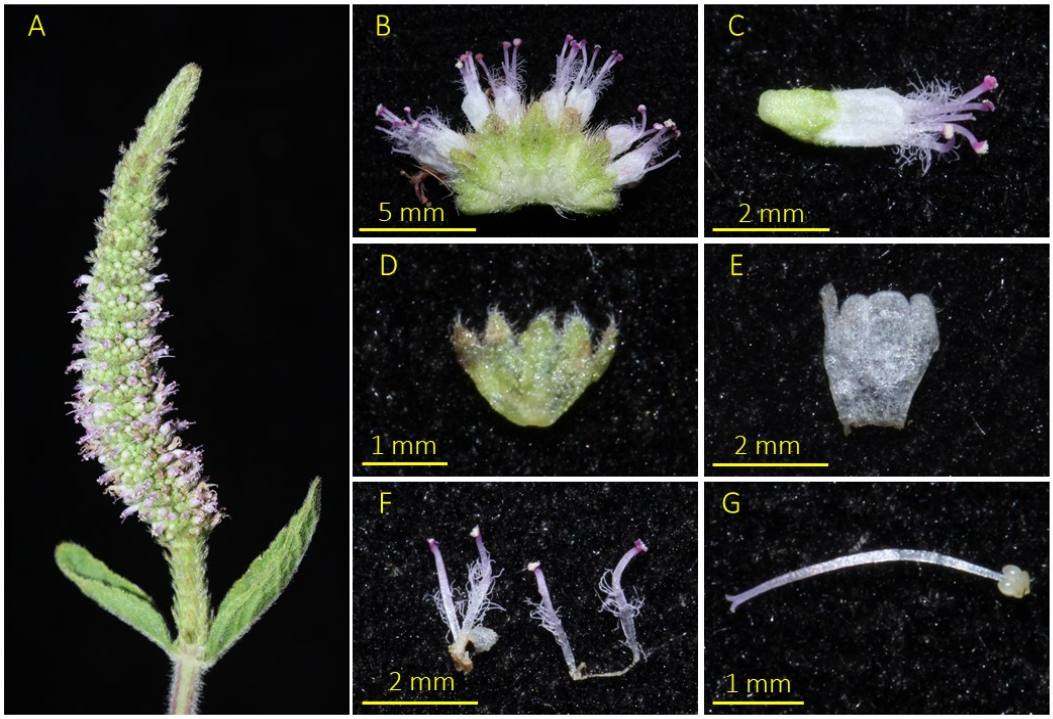
3.1.1. Đặc điểm hình thái

Cây mọc hàng năm, bò rồi đứng, cao 40-100 m. Thân có tiết diện vuông, bề mặt phủ dày lông. Lá mọc đối; cuống lá phủ nhiều lông, dài 5-12 mm, lá phần trên gần như không cuống; phiến lá hình trứng, 2,5-7 × 1,5-3 cm, cả hai mặt đều phủ lông dài, đặc biệt là ở phần gân lá, gốc lá tròn hay tù, đôi khi hình nêm, mép xẻ răng cưa, đỉnh tù hay nhọn; gân bên 5-7 cặp, nổi rõ ở mặt dưới. Cụm hoa bông ở đỉnh cành, dài cỡ 3-12 cm, đường kính khoảng 1 cm khi hoa nở. Lá bắc hình trứng, khoảng 2 × 1-1,2 mm, có lông. Hoa gần như không cuống. Đài hình chuông, dài khoảng 1 mm, trên chia 5 thùy hình tam giác, mép có lông. Tràng hoa màu trắng hay tím nhạt, dài khoảng 3 mm, nhẵn hay có lông rất thưa ở mặt ngoài, đỉnh chia 4 thùy gần bằng nhau. Nhị 4, thò, đính ở ống tràng, dài khoảng 3 mm, phần dưới phủ lông dài, phần trên nhẵn. Bầu nhẵn, vòi nhụy nhẵn, dài khoảng 4 mm, xẻ 2 thùy ở đỉnh.



Hình 3.1. *Đặc điểm hình thái của loài Tu hùng tai*

Ghi chú: (A) Cành mang hoa; (B) Bề mặt thân mang lông che chở; (C) Mặt cắt ngang thân; (D) Lá; (E) Mặt dưới lá; (F) Mặt trên lá.



Hình 3.2. *Đặc điểm cơ quan sinh sản của loài Tu hùng tai*

Ghi chú: (A) Cụm hoa; (B) Một phần cụm hoa; (C) Hoa nguyên vẹn; (D) Đài hoa; (E) Tràng hoa; (F) Bộ nhị; (G) Bộ nhụy.

3.1.2. Giám định tên khoa học

Mẫu tiêu bản thực vật có đầy đủ các bộ phận của cây Tu hùng tai được thu thập từ quần thể cây mọc tự nhiên vào tháng 2 năm 2016 tại thôn Chênh Vênh, xã Hướng Phùng, huyện Hướng Hóa tỉnh Quảng Trị (Phụ lục 2). Sau khi quan sát, phân tích các đặc điểm hình thái của mẫu nghiên cứu, đối chiếu với các tài liệu, khóa phân loại và mẫu tiêu bản lưu ở Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, tiến sĩ Nguyễn Thế Cường đã giám định tên khoa học của cây Tu hùng tai là *Pogostemon auricularius* (L.) Hassk. họ Bạc hà (Lamiaceae) (Phiếu giám định ngày 04/8/2016 của Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam - Phụ lục 1).

Hình 3.3. *Phần trên mặt đất của loài Tu hùng tai*

3.2. Kết quả nghiên cứu về thành phần hóa học

3.2.1. Kết quả định tính các nhóm hợp chất bằng phản ứng hóa học

Kết quả định tính các nhóm chất chính trong dịch chiết methanol của phần trên mặt đất cây Tu hùng tai được trình bày ở Bảng 3.1.

Bảng 3.1. *Kết quả định tính các nhóm chất bằng phản ứng hóa học*

STT	Nhóm chất	Phản ứng định tính	Kết quả	Kết luận
1	Glycosid tim	Phản ứng Liebermann-Burchard	+	Có
		Phản ứng Baljet	+	
		Phản ứng Legal	+	
		Phản ứng Keller-Killian	+	
2	Flavonoid	Phản ứng Cyanidin	++	Có
		Phản ứng với dung dịch NaOH 10%	++	
		Phản ứng với hơi amoniac	++	

STT	Nhóm chất	Phản ứng định tính	Kết quả	Kết luận
		Phản ứng với dung dịch $FeCl_3$ 5%	++	
3	Saponin	Hiện tượng tạo bọt	+	Có
		Phản ứng Salkowski	+	
		Phản ứng Liebermann-Burchard	+	
4	Coumarin	Phản ứng mở đóng vòng lacton	–	Không có
		Phản ứng Diazo hóa	–	
		Phản ứng chuyển đồng phân cis sang đồng phân trans dưới tác dụng của tia tử ngoại	–	
5	Tanin	Phản ứng với dung dịch $FeCl_3$ 5%	++	Có
		Phản ứng với chì acetat	++	
		Phản ứng với dung dịch gelatin 1%	++	
6	Anthranoid	Phản ứng Borntraeger	–	Không có
		Thử nghiệm vi thăng hoa	–	
7	Alcaloid	Phản ứng với thuốc thử Mayer	+	Có
		Phản ứng với thuốc thử Bouchardat	+	
		Phản ứng với thuốc thử Dragendorff	+	
8	Chất béo	Vết mờ trên giấy lọc	++	Có
9	Steroid	Phản ứng Liebermann	++	Có
10	Axit hữu cơ	Phản ứng với Na_2CO_3	+	Có
11	Đường khử	Thuốc thử Felling A,B	++	Có
12	Axit amin	Thuốc thử Ninhydrin	–	Không có

Ghi chú: (-) âm tính, (+) dương tính, (++) dương tính rõ

Nhận xét: Qua các phản ứng định tính hóa học đặc trưng đã sơ bộ xác định trong phần trên mặt đất của cây Tu hùng tai có alcaloid, flavonoid, glycosid tim, saponin, axit hữu cơ, steroid, tanin, đường khử, chất béo và không có coumarin, anthranoid, axit amin. Trong đó flavonoid, tanin, steroid và chất béo là các nhóm chất cho phản ứng dương tính rõ.

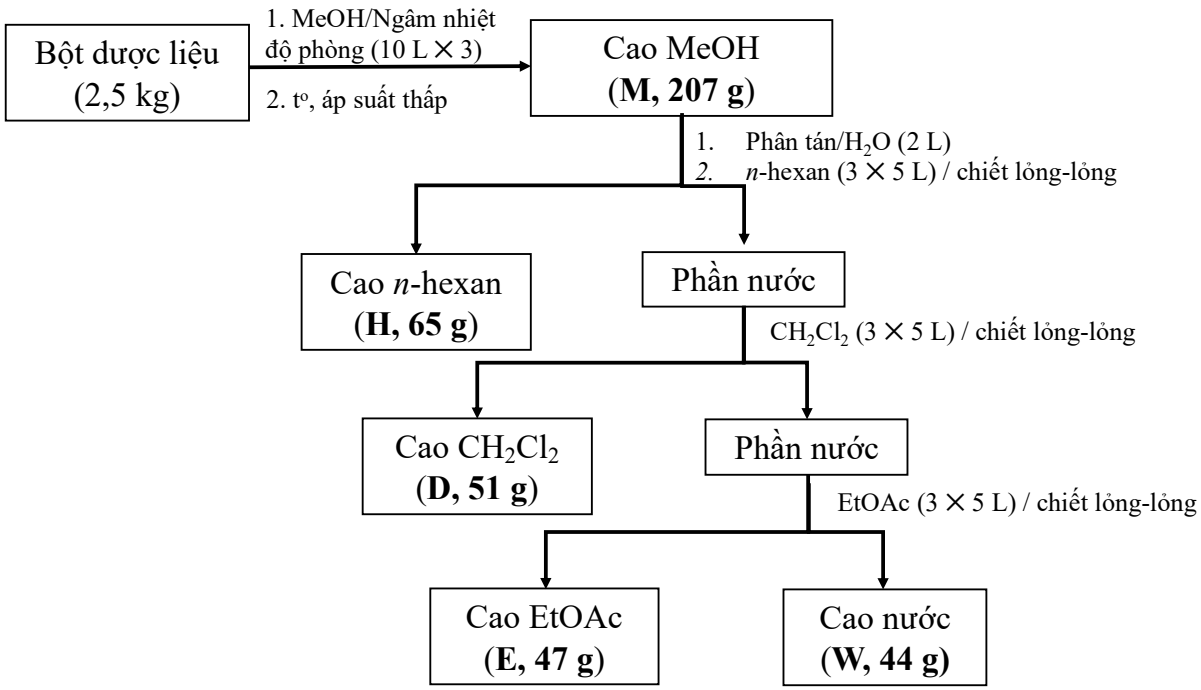
3.2.2. Chiết xuất và phân lập các hợp chất

3.2.2.1. Chiết xuất cao toàn phần

Phần trên mặt đất của loài Tu hùng tai được rửa sạch, thái nhỏ, phơi, sấy khô ở nhiệt độ 50-60°C, xay thành bột thô và tiến hành chiết xuất, phân lập các chất. Khối lượng dược liệu khô đem chiết xuất là 2,5 kg. Dùng MeOH để làm ẩm toàn bộ lượng bột Tu hùng tai trong bình chiết, đậy kín và để yên để bột được thấm ẩm và trương nở hoàn toàn. Tiến hành ngâm chiết bằng cách thêm MeOH vừa đủ ngập và cách bề mặt dược liệu khoảng 10 cm. Quá trình chiết xuất được tiến hành ở nhiệt độ phòng với 3 đợt chiết (3 × 10 L /7 ngày). Gộp các dịch chiết, cất thu hồi dung môi dưới áp suất giảm ở nhiệt độ 50-60°C thu được cao toàn phần MeOH (M, 207 g).

3.2.2.2. Chiết xuất các phân đoạn

Phân tán cao chiết toàn phần M trong 2 L nước cất, chiết phân bố lần lượt với các dung môi có độ phân cực tăng dần là: *n*-hexan, dicloromethan và ethyl acetat. Thu hồi dung môi dưới áp suất giảm, thu được các cao chiết phân đoạn tương ứng, ký hiệu là H (65 g), D (51 g), E (47 g) và W (44 g) là cao phần nước còn lại. Độ ẩm của các cao chiết M, H, D, E và W đo được lần lượt là 7,2; 6,8; 7,0; 7,5 và 7,3 %. Quá trình chiết xuất các phân đoạn từ phần trên mặt đất của loài Tu hùng tai được mô tả ở hình 3.4.



Hình 3.4. *Sơ đồ chiết xuất các phân đoạn từ phần trên mặt đất loài Tu hùng tai*

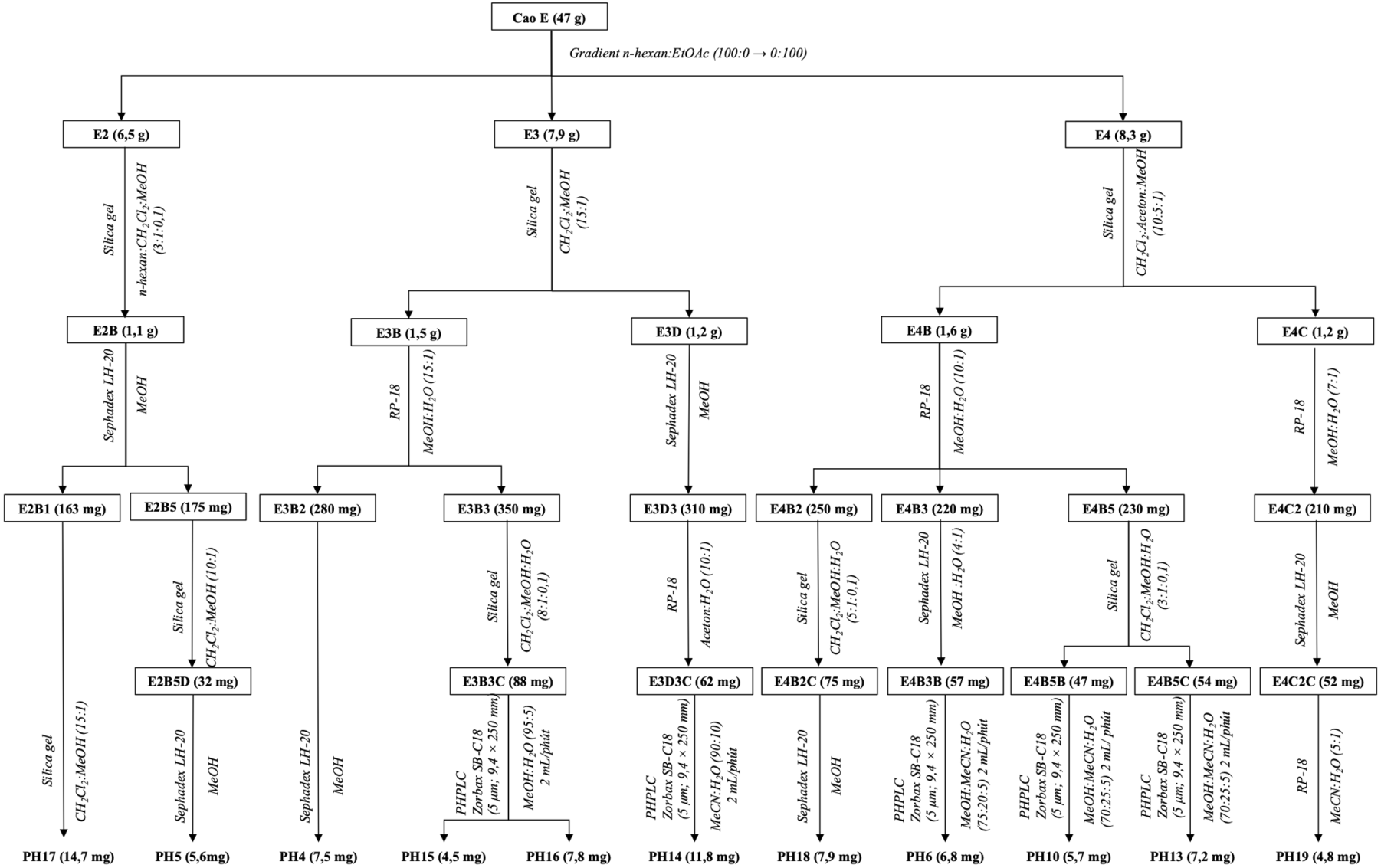
3.2.2.3. Quá trình phân lập các hợp chất từ phân đoạn ethyl acetat

Quá trình phân lập dựa trên sự định hướng hoạt tính chống viêm. Từ kết quả đánh giá khả năng ức chế sản sinh NO với chứng dương là L-NMMA, phân đoạn ethyl acetat có tác dụng tốt nhất được lựa chọn để thực hiện quá trình phân lập.

Phân đoạn ethyl acetat (E, 47 g) được triển khai trên sắc ký cột pha thường bằng phương pháp nạp mẫu khô. Dùng một lượng nhỏ dung môi MeOH vừa đủ để hòa tan cắn E trở lại, sau đó tẩm với một lượng tối thiểu silica gel pha thường tạo thành khối silica gel ẩm. Đưa khối silica gel ẩm này vào bình cô quay, cất thu hồi đến kiệt dung môi, thu được bột khô tơi. Bột khô tơi được nạp lên đầu cột sắc ký đã được nhồi silica gel pha thường bằng phương pháp nhồi cột ướt, trong quá trình nạp gõ nhẹ để bột phân bố đều. Triển khai cột bằng hệ dung môi rửa giải *n*-hexan-EtOAc gradient (100:0 → 0:100, v/v), thu được 6 phân đoạn, ký hiệu lần lượt E1–E6.

Phân đoạn E2 (6,5 g) được khai triển trên sắc ký silica gel pha thường, rửa giải bằng *n*-hexan-CH_2Cl_2-MeOH (3:1:0,1, v/v/v) thu được 5 phân đoạn (E2A–E2E). Phân đoạn E2B (1,1 g) được phân tách bằng sắc ký cột Sephadex LH-20 rửa giải bằng MeOH thu được 6 phân đoạn (E2B1–E2B6). Phân đoạn E2B5 (175 mg) được tinh chế trên cột sắc ký silica gel pha thường bằng dung môi CH_2Cl_2-MeOH (10:1, v/v) thu được 5 phân đoạn (E2B5A–E2B5E). Tiếp tục tinh chế phân đoạn E2B5D (32 mg) bằng sắc ký cột Sephadex LH-20 rửa giải bằng MeOH thu được hợp chất **PH5** (5,6 mg). Phân đoạn E2B1 (163 mg) được đưa lên cột sắc ký pha thường với hệ dung môi rửa giải là CH_2Cl_2-MeOH (15:1, v/v) thu được 6 phân đoạn (E2B1A– E2B1F). Tiến hành lọc rửa tinh thể trong phân đoạn E2B1C (27 mg) thu được hợp chất **PH17** (14,6 mg).

Phân đoạn E3 (7,9 g) được phân lập bằng sắc ký cột pha thường, sử dụng hệ dung môi pha động là CH_2Cl_2-MeOH (15:1, v/v) thu được 7 phân đoạn, kí hiệu là E3A–E3G. Phân đoạn E3B (1,5 g) tiếp tục được triển khai trên cột sắc ký pha đảo YMC-RP18 với hệ dung môi rửa giải là MeOH-H_2O (15:1, v/v), thu được 5 phân đoạn, ký hiệu là E3B1–E3B5. Kiểm tra 5 phân đoạn thu được bằng SKLM, phân đoạn E3B2 (280 mg) được tinh chế bằng cột sắc ký lọc gel Sephadex LH-20 với hệ dung môi rửa giải là MeOH thu được hợp chất **3**, kí hiệu là **PH4** (7,5 mg).



Hình 3.5. *Sơ đồ phân lập các hợp chất từ cao Ethyl acetat*

Phân đoạn E3B3 (350 mg) được tiếp tục phân lập bằng sắc ký cột pha thường, sử dụng hệ dung môi pha động là CH_2Cl_2-MeOH-H_2O (8:1:0,1, v/v/v) thu được 4 phân đoạn, kí hiệu là E3B3A–E3B3D. Tinh chế phân đoạn E3B3C (88 mg) bằng hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao điều chế, hệ dung môi rửa giải là MeOH-H_2O (95:5 ,v/v, 2 mL/phút) thu được hợp chất **PH16** (7,8 mg) và hợp chất **PH15** (4,5 mg).

Phân đoạn E3D (1,2 g) được phân tách bằng sắc ký cột Sephadex LH-20 với dung môi MeOH thu được 4 phân đoạn (E3D1–E3D4). Phân đoạn E3D3 (310 mg) được triển khai trên sắc ký pha đảo YMC RP-18, rửa giải với hệ aceton-H_2O (10:1, v/v) thu được 5 phân đoạn (E3D3A–E3D3E). Phân đoạn E3D3C (62 mg) được tinh chế bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao điều chế với hệ dung môi MeCN-H_2O (90:10, v/v; 2 mL/phút) thu được hợp chất **PH14** (11,8 mg).

Phân đoạn E4 (8,3 g) tiếp tục phân lập bằng sắc ký cột pha thường, sử dụng hệ dung môi pha động là CH_2Cl_2-aceton-MeOH (10:5:1, v/v/v) thu được 6 phân đoạn (E4A–E4F). Phân đoạn E4B (1,6 g) được phân tách bằng cột sắc ký pha đảo YMC RP-18 với hệ dung môi MeOH-H_2O (10:1, v/v) thu được 7 phân đoạn (E4B1–E4B7). Phân đoạn E4B3 (220 mg) được phân lập bằng sắc ký cột Sephadex LH-20 rửa giải bằng MeOH-H_2O (4:1, v/v) thu được 4 phân đoạn (E4B3A–E4B3D). Phân đoạn E4B3B (57 mg) được tinh chế bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao điều chế, hệ dung môi MeOH-MeCN-H_2O (75:20:5, v/v/v; 2 mL/phút) thu được hợp chất **PH6** (6,8 mg). Phân đoạn E4B5 (230 mg) được triển khai trên sắc ký cột silica gel pha thường với dung môi CH_2Cl_2-MeOH-H_2O (3:1:0,1, v/v/v) thu được 5 phân đoạn (E4B5A–E4B5E). Phân đoạn E4B5B (47 mg) tiếp tục được tinh chế bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao điều chế với hệ dung môi MeOH-MeCN-H_2O (70:25:5, v/v/v; 2 mL/phút) thu được hợp chất **PH10** (5,7 mg). Phân đoạn E4B5C (54 mg) cũng được tinh chế bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao điều chế với hệ MeOH-MeCN-H_2O (70:25:5, v/v/v; 2 mL/phút) thu được hợp chất **PH13** (7,2 mg). Phân đoạn E4B2 (250 mg) được phân tách trên cột sắc ký silica gel pha thường, rửa giải với hệ CH_2Cl_2-MeOH-H_2O (5:1:0.1, v/v/v) thu dược 5 phân đoạn (E4B2A–E4B2E). Phân đoạn E4B2C (75 mg) được tinh chế bằng cột Sephadex LH-20 rửa giải với MeOH thu được hợp chất **PH18** (7,9 mg).

Phân đoạn E4C (1,2 g) được phân tách bằng cột sắc ký pha đảo YMC RP-18 với hệ MeOH-H_2O (7:1, v/v) thu được 6 phân đoạn (E4C1–E4C6). Phân đoạn E4C2 (210 mg) được phân lập bằng sắc ký cột Sephadex LH-20 rửa giải bằng MeOH thu được 4 phân đoạn (E4C2A–E4C2D). Phân đoạn E4C2C (52 mg) được tinh chế bằng sắc ký pha đảo YMC RP-18 với hệ dung môi MeCN-H2O (5:1, v/v) thu được hợp chất **PH19** (4,8 mg).

Từ phân đoạn ethyl acetat đã phân lập được 11 hợp chất tinh khiết. Cấu trúc của các hợp chất được xác định dựa trên các dữ liệu phổ.

3.2.3. Xác định cấu trúc của hợp chất đã phân lập

3.2.3.1. Hợp chất PH16 (chất mới)

Hợp chất **PH16** được tách ra ở dạng bột vô định hình, màu vàng. Phổ ^{1}H-NMR (Bảng 3.2) của hợp chất này chỉ ra tín hiệu của nhóm methin olefin tại δ_H 5,98 (s, H-20) gợi ý sự hiện diện của nối đôi. Ngoài ra, tín hiệu hai nhóm olefin tại δ_H [4,91 (br.s, H-12a), 4,86 (br.s, H-12b)] được gán cho nối đôi ngoại vòng (*exo*-methylen), tín hiệu của 5 nhóm methyl được ghi nhận tại δ_H [1,23 (s, H_3-15), 1,20 (d, J = 6,5 Hz, H_3-25), 1,01 (s, H_3-13), 0,99 (s, H_3-14), 0,92 (t, J =7,5 Hz, H_3-16)] và tín hiệu của 18 proton nhóm methin hoặc germinal methin trong khoảng dịch chuyển hoá học δ_H 2,64-1,51.

Phổ ^{13}C-NMR (Bảng 3.2) và HSQC của hợp chất **PH16** chỉ ra 25 tín hiệu carbon bao gồm carbon của nhóm carbonyl tại δ_C 180,3 (C-21), 2 nhóm carbon oxymethin tại δ_C [167,9 (C-19), 163,1 (C-23)], nhóm carbon mang oxi tại δ_C 88,0 (C-8); 2 nhóm carbon sp^2 bậc bốn tại δ_C [151,8 (C-1), 97,7 (C-22)], nhóm nối đôi ngoại vòng (*exo*-methylen) tại δ_C 110,7 (C-12); nhóm carbon sp^2 methin tại δ_C 110,0 (C-20), nhóm carbon sp^3 bậc bốn tại δ_C 34,0 (C-4), tín hiệu của 4 carbon sp^3 nhóm methin tại δ_C [53,7 (C-5), 41,3 (C-11), 39,2 (C-18), 34,3 (C-9)], 7 nhóm carbon sp^3 methylen tại δ_C [37,9 (C-7), 36,6 (C-3), 35,2 (C-2), 32,7 (C-10), 27,4 (C-17), 24,4 (C-24), 22,3 (C-6)] và 5 nhóm methyl tại δ_C [30,2 (C-13), 22,1 (C-14), 20,9 (C-15), 11,5 (C-16), 17,7 (C-25)].

Trên phổ COSY xuất hiện các tương tác giữa H-16 (δ_H 0,90)/H-17 (δ_H 1,68; 1,53)/H-18 (δ_H 2,47)/H-25 (δ_H 1,20) gợi ý trật tự liên kết C-16/C-17/C-18/C-25. Ngoài ra, phổ HMBC xuất hiện tương tác giữa H-17a (δ_H 1,68)/H-25 (δ_H 1,20) với C-19; các

tương tác giữa H-20 (δ_H 5,98) với C-18/C-19/C-21/C-22 và H-24a (δ_H 2,64)/H-24b (δ_H 1,95) với C-21/C-22/C-23 gợi ý sự hiện diện của vòng γ-pyron với nhóm *sec*-butyl và nhóm methylen lần lượt tại C-19 và C-24.

Tương tác HMBC giữa H-13 (δ_H 1,01)/H-14 (δ_H 0,99) và C-3 (δ_C 36,6)/C-4 (δ_C 34,0)/C-5 (δ_C 53,7) gợi ý sự có mặt của nhóm *gem*-dimethyl tại C-4. Tương tự, các tương tác HMBC giữa H-12 (δ_H 4,86; 4,91) và C-1 (δ_C 151,8)/C-2 (δ_C 35,2)/C-11 (δ_C 41,3) gợi ý sự hiện diện của nhóm *exo*-methylene tại C-1.

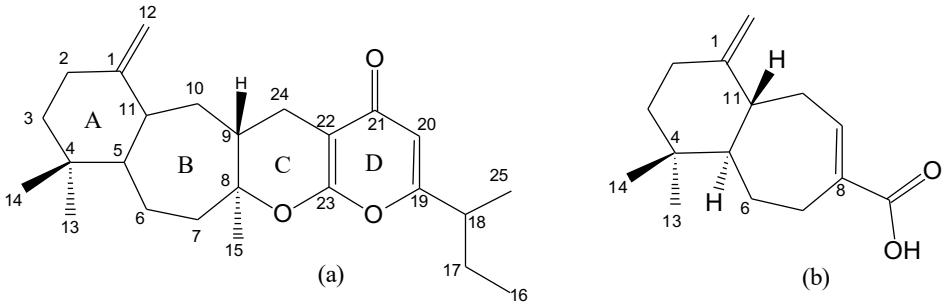
Trên phổ COSY xuất hiện tương tác giữa H-7 (δ_H 2,12; 1,92)/H-6 (δ_H 1,78; 1,44)/H-5 (δ_H 1,90)/H-11 (δ_H 2,44)/H-10 (δ_H 1,69; 1,55)/H-9 (δ_H 2,02) cho phép thiết lập trật tự C-7/C-6/C-5/C-11/C-10/C-9. Tương tự, tương tác giữa H-2 (δ_H 2,41; 2,15)/H-3 (δ_H 1,70; 1,64) trên phổ COSY cho phép thiết lập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

Kết hợp dữ liệu phổ HMBC và phổ COSY cho phép thiết lập trật tự liên kết mạch carbon từ C-7 đến C-2, cũng như trật tự mạch liên kết giữa C-11 và C-2 qua C-1 và giữa C-5 và C-3 qua C-4. Các dữ liệu phổ này đã gợi ý sự hiện diện của vòng 4,4-dimethyl-1-methylenecyclohexane bao gồm C-1-C-5 và C-11-C-14 trong cấu trúc của **PH16**. Ngoài ra, các tương tác trên phổ HMBC giữa H-15 đến C-7/C-8/C-9; giữa H-10a (δ_H 1,55)/H-10b (δ_H 1,69) đến C-8/C-9 gợi ý mạch carbon C-7-C-8-C-9. Bên cạnh đó, các tương tác giữa H-10a/H-10b/H-9 đến C-24 và giữa H-24a/H-24b đến C-8/C-9/C-10 gợi ý mảnh cấu trúc 1-methylene-4,4,8-trimethylbicyclo[5.4.0]undecane gắn với C-22 của vòng γ-pyrone qua cấu nối C-24.

Mặc dù còn thiếu bằng chứng trực tiếp về sự có mặt của vòng 3,4-dihydropyran bao gồm C-8-C-9 và C-22-C-24 tồn tại trong cấu trúc của hợp chất **PH16**, nhưng liên kết giữa C-8 và C-23 qua cầu oxy hình thành vòng C được đề nghị để phù hợp với công thức phân tử của hợp chất **PH16**. Ngoài ra, sự dịch chuyển về từ trường thấp của carbon methine C-8 tại δ_C 88,0 đã làm rõ sự có mặt của cầu nối ether giữa C-8 và C-23. Do đó, hợp chất **PH16** được xác định là một meroterpenoid mới với γ-pyron và khung bicyclo[5.4.0]undecane. Phần sesquiterpen của hợp chất **PH16** tương tự như ximonican với khung (*E*)-4,4-dimethyl-1-methyleneoctahydro-1*H*-benzo[7]-annulene được phân lập từ *Ximenia americana* [131].

Cấu hình tương đối của **PH16** được làm sáng tỏ dựa trên dữ liệu phổ NOESY và so sánh với dữ liệu NMR được báo cáo của ximonican. Khi so sánh dữ liệu ^{13}C-NMR của hợp chất **PH16** [δ_C tại 53,7 (C-5) và 41,3 (C-11)] và chất tham khảo ximonican [δ_C tại 52,01 (C-5) và 40,16 (C-11)] gợi ý vị trí *axial* giữa H-5 (δ_H 1,90) và H-11 (δ_H 2,44) trong cấu trúc của hợp chất **PH16**. Bên cạnh đó, định hướng β của H-11, H-3b (δ_H 1,64), H-7b (δ_H 2,12), H-14, H-15, H-10b và H-24b được xác định dựa trên các tương tác NOESY của H-11/H-3b, H-11/H-7b, H-11/H-14, H-3b/H-14, H-7b/H-15, H-10b/H-15 và H-15/H-24b; trong khi định hướng α của H-5, H-9, H-13, H-10a, H-24a và H-3a (δ_H 1,70) được xác định dựa trên các tương tác NOESY của H-5/H-9, H-5/H-13, H-10a/H-24a và H-13/H-3a. Những dữ liệu phổ NOESY này đã chứng minh vòng cycloheptan (B) và dihydropyran (C) tồn tại dưới cấu dạng *trans.*

Phổ HR-ESI-MS của hợp chất **PH16** cho pic ion giả phân tử tại *m/z* 385,2735 $[M+H]^+$ (tính toán lý thuyết cho công thức $C_{25}H_{37}O_3$ là 385,2743). Kết hợp với phổ ^{13}C–NMR cho phép kết luận **PH16** có công thức phân tử là $C_{25}H_{36}O_3$ (DBE = 8). Như vậy, hợp chất **PH16** là một meroterpenoid mới và được đặt tên là **Pogostemin A**.

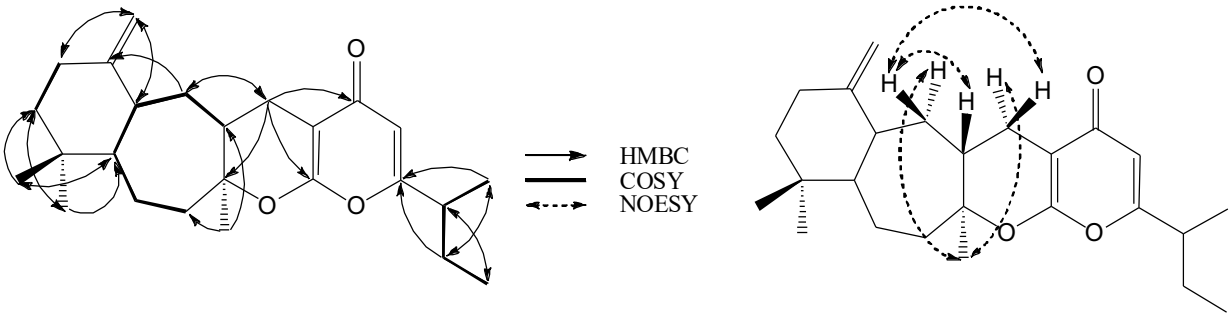


Hình 3.6. *Cấu trúc hóa học của hợp chất* ***PH16*** *(a) và Ximonican (b)*

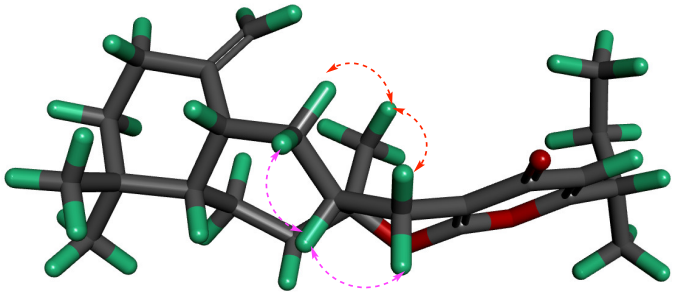
Bảng 3.2. *Số liệu phổ NMR của hợp chất* ***PH16*** *và chất tham khảo [δ (ppm), J (Hz)]*

C	***PH16***					***Ximonican*** [131]	
	δ_C[a,c]	δ_H[a,b]	**HMBC (H→C)**	**COSY (H→H)**	**NOESY (H→H)**	δ_C[a,c]	δ_H[a,b]
1	151,8	–				154,7	–
2	35,2	2,41 m; 2,15 m	C-1, C-3, C-4, C-11, C-12	H-3		34,2	2,45 m; 2,31 m
3	36,6	1,70 m; 1,64 m	C-1, C-2, C-4, C-5, C-13, C-14	H-2	H-11, H-14	40,3	1,74 dd (10,8; 8,9); 1,58 t (10,8)
4	34,0	–				33,97	–
5	53,7	1,90 m	C-1, C-3, C-4, C-6, C-7, C-10, C-11, C-13, C-14	H-6, H-11	H-9, H-13,	52,0	1,79-1,84 m
6	22,3	1,78 m; 1,44 m	C-4, C-5, C-7, C-8, C-11	H-5, H-7		27,4	1,68 m; 1,50 m
7	37,9	1,92 m; 2,12 m	C-5, C-6, C-8, C-9, C-15	H-6	H-11, H-15	23,8	2,45 m; 2,35 m;
8	88,0	–				132,3	–
9	34,3	2,02 m	C-7, C-8, C-10, C-11, C-15	H-10		145,0	7,01 t (8,2)
10	32,7	1,55 m; 1,69 m	C-1, C-5, C-8, C-9, C-11, C-24	H-9, H-11	H-24a,	28,6	2,50 m; 2,42 m;
11	41,3	2,44 m	C-1, C-2, C-4, C-5, C-6, C-9, C-10, C-12	H-5, H-10	H-3b, H-7b, H-14	40,2	2,50 q (9,2)
12	110,7	4,91 br.s; 4,86 br.s	C-1, C-2, C-11			111,6	4,87 s; 4,82 s
13	30,2	1,01 s	C-3, C-4, C-5		H-3a	30,0	1,01 s
14	22,1	0,99 s	C-3, C-4, C-5		H-3, H-11	22,9	0,97 s
15	20,9	1,23 s	C-7, C-8, C-9		H-7b, H-10b, H-24b	173,7	–
16	11,5	0,90 t (7,5)	C-17, C-18	H-17			
17	27,4	1,68 m; 1,53 m	C-16, C-18, C-19, C-25	H-16, H-18			
18	39,2	2,47 m	C-16, C-17, C-19, C-20, C-25	H-17, H-25			
19	167,9	–					
20	110,0	5,98 s	C-18, C-19, C-21, C-22				
21	180,3	–					
22	97,7	–					
23	163,1	–					
24	24,4	2,64 dd (3,5, 14,5); 1,95 m	C-8, C-9, C-10, C-21, C-22, C-23	H-9			
25	17,7	1,20 d (6,5)	C-17, C-18, C-19	H-18			

[a] *Đo trong* $CDCl_3$, [b]*500 MHz*, [c]*125MHz*



Hình 3.7. *Các tương tác HMBC, COSY và NOESY chính của hợp chất* ***PH16***



Hình 3.8. *Cấu trúc không gian và tương tác NOESY chính của hợp chất* ***PH16***

3.2.3.2. Hợp chất PH15: (Chất mới)

Hợp chất **PH15** được phân lập dưới dạng bột vô định hình màu vàng nhạt. Các dữ liệu phổ ^{1}H và ^{13}C-NMR của hợp chất **PH15** tại Bảng 3.3 khá tương đồng với hợp chất **PH16**. Trên phổ ^{1}H của **PH15** xuất hiện tín hiệu nhóm methin olefin tại δ_H 6,00 (s, H-20) gợi ý sự hiện diện của nối đôi ba lần thế, tín hiệu hai nhóm olefin tại δ_H [4,82 (br.s, H-13a) và 4,75 (br.s, H-13b)] được gán cho proton của nối đôi ngoại vòng (*exo*-methylen) và tín hiệu của 5 nhóm methyl được ghi nhận tại δ_H [1,22 (dd, J = 7,0; 1,0 Hz, H_3-25), 1,15 (br.s, H_3-12), 1,00 (s, H_3-14), 1,00 (s, H_3-15), 0,90 (t, J =7,5 Hz, H_3-16)].

Phổ ^{13}C-NMR (Bảng 3.3) và HSQC của hợp chất **PH15** chỉ ra 25 tín hiệu carbon bao gồm nhóm carbonyl tại δ_C 180,2 (C-21), tín hiệu của 2 nhóm carbon oxymethin tại δ_C [168,0 (C-19) và 163,2 (C-23)], tín hiệu nhóm carbon no mang oxi tại δ_C 88,0 (C-4), tín hiệu của 2 nhóm carbon sp^2 bậc bốn tại δ_C [154,6 (C-8) và 98,0 (C-22)], nhóm carbon sp^3 bậc bốn tại δ_C 33,5 (C-11), tín hiệu của carbon nhóm đôi ngoại vòng (*exo*-methylen) tại δ_C 110,1 (C-13), nhóm carbon methin tại δ_C 110,0 (C-

20), tín hiệu của 4 nhóm 4 carbon sp^3 nhóm methin tại δ_C [56,5 (C-1), 42,5 (C-9), 39,2 (C-18), 35,3 (C-5)], tín hiệu của 7 nhóm carbon sp^3 methylen tại δ_C [38,7 (C-3), 38,4 (C-10), 36,6 (C-7), 33,2 (C-6), 22,9 (C-2), 27,4 (C-17), 23,6 (C-24)] và 5 nhóm methyl tại δ_C [19,8 (C-12), 29,7 (C-14), 22,6 (C-15), 11,5 (C-16), 17,7 (C-25)].

Cấu trúc phẳng của hợp chất **PH15** được hoàn thiện với sự kết hợp dữ liệu phổ 1D-NMR và phổ 2D-NMR như: phổ HSQC và HMBC. Trên phổ HMBC xuất hiện tương tác giữa H-17 (δ_H 1,70; 1,54)/H-25 (δ_H 1,22) với C-19 (δ_C 168,0), các tương tác giữa H-20 (δ_H 6,00) với C-18/C-19/C-21/C-22 và giữa H-24 (δ_H 2,84; 1,93) với C-21/C-22/C-23 cho thấy sự xuất hiện của vòng γ-pyron với nhóm sec-butyl gắn tại C-19 và nhóm methylen gắn tại C-24.

Ngoài ra, các tương tác HMBC giữa H-14 (δ_H 1,00)/H-15 (δ_H 1,00) và C-10 (δ_C 38,4)/C-11 (δ_C 33,5)/C-1 (δ_C 56,5) gợi ý nhóm *gem*-dimethyl tại C-10. Tương tác HMBC giữa H-13 (δ_H 4,82; 4,75) và C-7 (δ_C 36,6)/C-8 (δ_C 154,6)/C-9 (δ_C 42,5) gợi ý nối đôi ngoại vòng (*exo*-methylen) tại C-8.

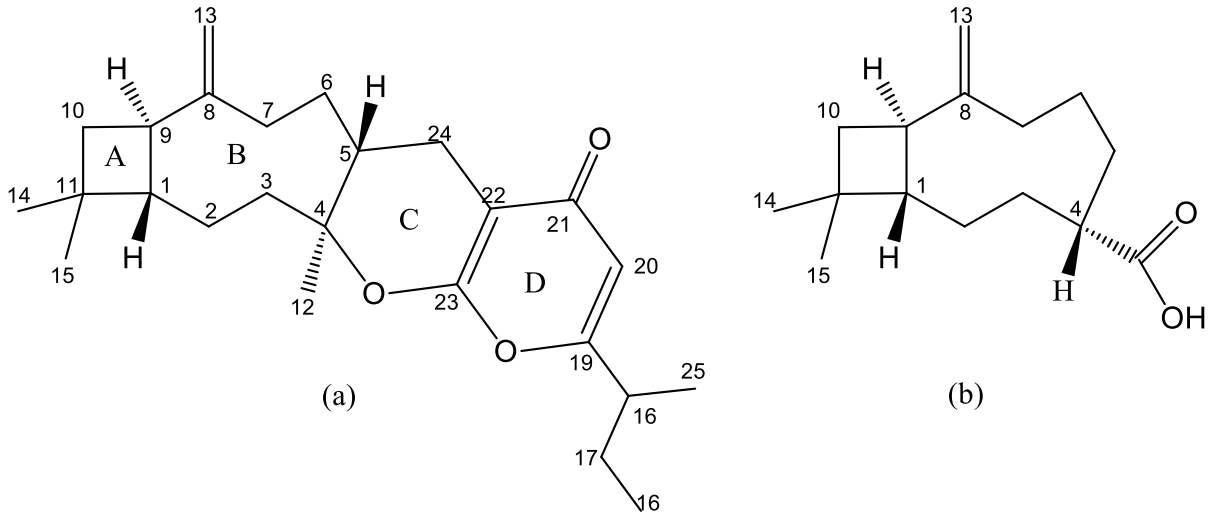
Dữ liệu phổ NMR của hợp chất **PH15** có nhiều điểm tương đồng với hợp chất **PH16**, đặc biệt sự hiện diện của vòng γ-pyron với nhóm sec-butyl tại C-19 trong cấu trúc **PH15**. Tuy nhiên, phần sesquiterpen trong hợp chất **PH15** tương tự như của hợp chất (1*R**,4*R**,9*S**)-11,11-dimethyl-8-methylenebicyclo[7.2.0]undecane-4-carboxylic acid được phân lập từ *Eremophila spathulata* [132]. Như vậy, hợp chất **PH15** được gợi ý là một meroterpenoid với khung γ-pyron và caryophyllen.

Các tương tác trên phổ HMBC của hợp chất **PH15** của H-2a (δ_H 1,58) với C-4 (δ_C 88,0)/C-9 (δ_C 42,5); tương tác giữa H-3a (δ_H 2,17)/H-3b (δ_H 1,79) với C-1 (δ_C 56,5); giữa H-5 (δ_H 2,05) với C-6 (δ_C 33,2)/C-7 (δ_C 36,6); giữa H-6 (δ_H 1,48) đến C-4/C-5 (δ_C 35,3)/C-7; giữa H-9 (δ_H 2,62) với C-1/C-8 (δ_C 154,6)/C-10 (δ_C 38,4); giữa H-10a (δ_H 1,78) đến C-1/C-13 (δ_C 110,1); giữa H-12 (δ_H 1,15) đến C-3 (δ_C 38,7)/C-4/C-5; giữa H-13a (δ_H 4,82)/H-13b (δ_H 4.75) với C-7/C-8/C-9 và giữa H-14/H-15 với C-1/C-10/C-11 (δ_C 33,5) đã chứng minh sự có mặt của vòng 8-methylene-4,11,11-trimethylbicyclo[7.2.0]undecan trong cấu trúc của hợp chất **PH15**. Bên cạnh đó, các tương tác giữa H-24a (δ_H 2,84) đến C-4/C-5/C-21/C-22/C-23 và giữa H-24b (δ_H 1,93) đến C-4/C-6/C-22/C-23 gợi ý sự gắn trực tiếp với vòng 19-s-butylpyrano[2,3-b]-21-pyranon tại C-4 và C-5.

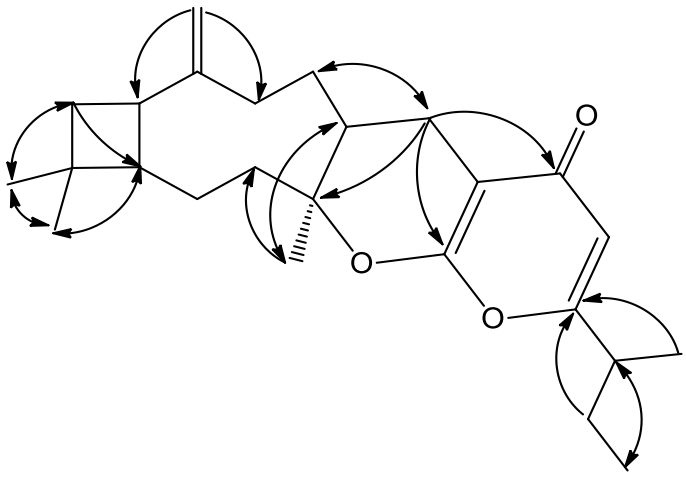
Tương tự hợp chất **PH16**, liên kết giữa C-4 và C-23 qua cầu oxy hình thành vòng C được đề nghị để phù hợp với công thức phân tử của hợp chất **PH16**. Thêm vào đó, sự dịch chuyển về từ trường thấp của carbon methin C-4 tại δ_C 88,0 đã làm rõ sự có mặt của cầu nối ether giữa C-4 và C-23.

Sự tương đồng về độ chuyển dịch hóa học trên phổ ^{13}C-NMR của C-4, C-5 của hợp chất **PH15** và C-8, C-9 của hợp chất **PH16** là gợi ý cấu dạng *trans* giữa vòng dihydropyran (C) và cyclononan (B). Cấu dạng *trans* giữa vòng cyclononan (B) và cyclobutan (A) được gợi ý dựa trên các hợp chất meroterpenoid tương tự đã tìm thấy trong tự nhiên [133], [134], [135]. Ngoài ra, cấu dạng *trans* giữa vòng cyclononan và cyclobutan còn được cũng cố bởi sự tương đồng độ dịch chuyển hóa học trong hợp chất **PH15** so với (1*R**,4*R**,9*S**)-11,11-dimethyl-8-methylenebicyclo[7.2.0]undecane-4-carboxylic acid [132] và sự khác biệt của nhóm methin C-1 (δ_C 56,5) ở **PH15** dịch chuyển về từ trường thấp so với C-10′ (δ_C 46,1) trong ginsenoyne L - phân tử có ngưng tụ *cis* giữa cyclononan và cyclobutan [136].

Phổ HR-ESI-MS xuất hiện pic ion giả phân tử tại *m/z* 385,2735 $[M+H]^+$ tương ứng với công thức $C_{25}H_{37}O_3$ (tính toán lý thuyết là M = 385,2743). Kết hợp với phổ ^{13}C-NMR cho phép kết luận **PH15** có công thức phân tử là $C_{25}H_{36}O_3$ (DBE = 8). Cấu trúc của **PH15** được đặt tên là **Pogostemin B**, công thức cấu tạo được thể hiện trong hình 3.9.



Hình 3.9. *Cấu trúc hóa học của hợp chất* ***PH15*** *(a) và (1R*,4R*,9S*)-11,11-dimethyl-8-methylenebicyclo[7.2.0]undecane-4-carboxylic acid (b)*



Hình 3.10. *Các tương tác HMBC (→) chính của hợp chất* ***PH15***

Bảng 3.3. *Số liệu phổ NMR của hợp chất* ***PH15*** *và chất tham khảo [δ (ppm), J (Hz)]*

C	***PH15***			***(1R*,4R*,9S*)-11,11-dimethyl-8-methylenebicyclo[7.2.0]undecane-4-carboxylic acid***
	δ_C[a,c]	δ_H[a,b]	**HMBC (H→C)**	δ_C[d,e]
1	56,5	1,60 m	C-2, C-3, C-8, C-9, C-10, C-11, C-14, C-15	57,0
2	22,9	1,58 m 1,54 m	C-1, C-3, C-4, C-9	27,3
3	38,7	2,17 dd (10,0, 15,5) 1,79 m	C-1, C-2, C-4, C-5, C-12	31,8
4	88,0	–		42,9
5	35,3	2,05 m	C-3, C-4, C-6, C-7, C-12, C-22, C-24	30,3
6	33,2	1,48 m	C-4, C-5, C-7, C-8, C-24	26,7
7	36,6	2,42 m 2,08 m	C-5, C-6, C-8, C-9, C-13	39,8
8	154,6	–		155,2
9	42,5	2,36 ddd (9,5, 9,0, 8,5)	C-1, C-2, C-7, C-8, C-10, C-11, C-13	45,3
10	38,4	1,78 m 1,69 m	C-1, C-9, C-11, C-14, C-15	39,7
11	33,5	–		34,1

12	19,8	1,15 br,s	C-3, C-4, C-5	180,9
13	110,1	4,82 br,s 4,75 br,s	C-7, C-8, C-9	110,1
14	29,7	1,00 s	C-1, C-10, C-11, C-15	21,8
15	22,6	1,00 s	C-1, C-10, C-11, C-14	30,0
16	11,5	0,92 t (7,5)	C-17, C-18	
17	27,4	1,54 m 1,70 m	C-16, C-18, C-19, C-25	
18	39,2	2,48 m	C-16, C-17, C-19, C-20, C-25	
19	168,0	–		
20	110,0	6,00 s	C-18, C-19, C-21, C-22	
21	180,2	–		
22	98,0	–		
23	163,2	–		
24	23,6	2,84 dd (5,0, 16,0); 1,93 dd (11,0, 16,0)	C-4, C-5, C-6, C-21, C-22, C-23	
25	17,7	1,22 dd (7,0, 1,0)	C-17, C-18, C-19	

[a] Đo trong $CDCl_3$, [b] 500 MHz, [c] 125MHz, [d] Đo trong CD_3OD, [e] 150 MHz

3.2.3.3. Hợp chất PH4: (Chất mới)

Hợp chất **PH4** được phân lập dưới dạng bột màu vàng nhạt. Các dữ liệu phổ ^{1}H và ^{13}C-NMR của hợp chất **PH4** tại Bảng 3.4 khá tương đồng với hợp chất **PH16** và **PH15**. Phổ ^{1}H-NMR của hợp chất **PH4** xuất hiện tín hiệu của 4 proton olefin tại δ_H [5,91 (dq, J = 1,5; 7,0 Hz, H-17), 5,25 (dd, J = 1,5; 16,0 Hz, H-1), 5,11 (m, H-2) và 5,08 (m, H-9)], 7 nhóm methyl tại δ_H [1,97 (s, H_3-26), 1,94 (dd, J = 1,0; 1,5 Hz, H_3-25), 1,85 (dd, J = 1,0; 7,0 Hz, H_3-16), 1,66 (s, H_3-15), 1,07 (s, H_3-13), 1,07 (s, H_3-12) và 0,99 (s, H_3-14)] và 11 proton nhóm methin và germinal methin tại δ_H [2,92-1,25].

Phổ ^{13}C-NMR (Bảng 3.4) và HSQC của hợp chất **PH4** chỉ ra 26 tín hiệu carbon bao gồm tín hiệu đặc trưng của nhóm carbonyl tại δ_C 182,4 (C-21), 9 nhóm carbon không liên kết với hydro tại δ_C [164,2 (C-23), δ_C 162,0 (C-19), 137,8 (C-8), 129,5 (C-18), 117,9 (C-20), 98,0 (C-22); 89,5 (C-4) và δ_C 39,1 (C-11)], 4 nhóm carbon methin tại δ_C [144,7 (C-1), 133,3 (C-17), 124,1 (C-9) và 120,4 (C-2)], carbon sp^3 nhóm

methine tại δ_C 36,8 (C-5), tín hiệu của 5 nhóm methylen tại δ_C [38,7 (C-7), 43,0 (C-3), 30,8 (C-6), 42,4 (C-10), 23,3 (C-24)] và tín hiệu của 7 nhóm methyl tại δ_C [30,6 (C-13), 24,6 (C-12), 20,2 (C-15), 17,3 (C-14), 14,5 (C-25), 13,8 (C-16) và 11,8 (C-26)].

Mặc dù, dữ liệu phổ 1D -NMR (Bảng 3.4) khá tương đồng với hợp chất **PH16** và **PH15**, gợi ý hợp chất **PH4** chứa bộ khung *γ*-pyron và sesquiterpen. Tuy nhiên dữ liệu phổ 2D -NMR của **PH4** ghi nhận sự có mặt có nhóm 1-methylprop-1-enyl với cấu hình E của liên kết đôi Δ18 thay thế nhóm sec-butyl (có trong phân tử **PH16** và **PH15**) được gắn vào vòng *γ*-pyron tại C-19 và những điểm khác biệt trong hợp phần sesquiterpenoid.

Cụ thể, trên phổ COSY, các tương tác giữa H-16 (δ_H 1,85)/H-17 (δ_H 5,91) gợi ý trật tự liên kết C-16/C-17. Ngoài ra, các tương tác HMBC giữa H_3-16 (δ_H 1,85)/H_3-25 (δ_H 1,94) với C-17 (δ_C 133,3)/C-18 (δ_C 129,5); tương tác giữa H-17(δ_H 5,91)/H-25 (δ_H 1,94) với C-19 (δ_C 162,0) cũng như tương tác NOESY của H_3-16/H_3-25 góp phần cũng cố hơn cho sự có mặt của mảnh cấu trúc 1-methylprop-1-enyl tại C-19 của vòng *γ*-pyron.

Bên cạnh đó, trên phổ HMBC xuất hiện tương tác giữa H_3-26 (δ_H 1,97) với C-19 (δ_C 162,0)/C-20 (δ_C 117,9)/C-21 (δ_C 182,4); giữa H-24 (δ_H 2,92; 1,95) với C-21 (δ_C 182,4)/C-22 (δ_C 98,0)/C-23 (δ_C 164,2) gợi ý sự có mặt của nhóm methyl tại C-20 và nhóm methylen tại C-24 của vòng *γ*-pyron.

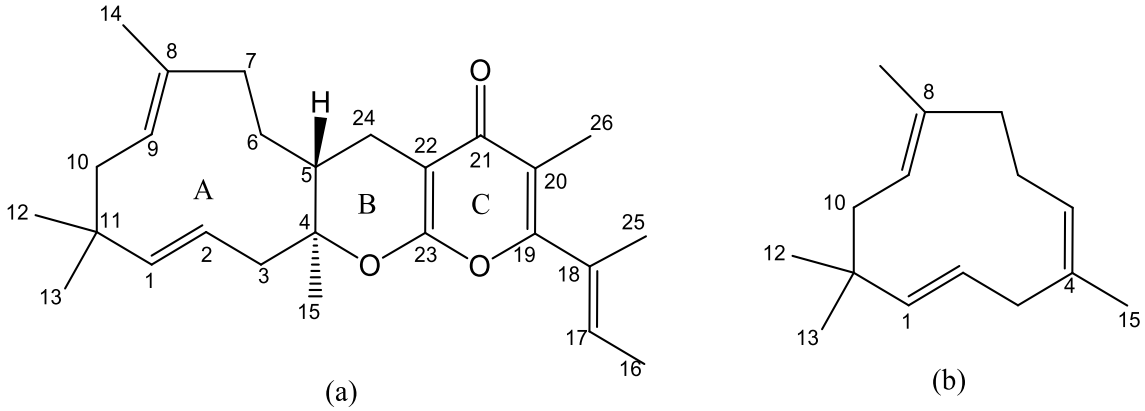
Các tương tác HMBC giữa H-12/H-13 với C-1 (δ_C 144,7)/C-10 (δ_C 42,4)/C-11 (δ_C 39,1) gợi ý nhóm *gem*-dimethyl tại C-11. Các tương tác HMBC giữa H-14 (δ_H 1,66) đến C-7 (δ_C 38,7)/C-8 (δ_C 137,8)/C-9 (δ_C 124,1) và giữa H-15 (δ_H 1,23) và C-3 (δ_C 43,0)/C-4 (δ_C 89,5)/C-5 (δ_C 36,8) gợi ý nhóm methyl C-14 và C-15 lần lượt tại vị trí C-8 và C-4.

Các tương tác trên phổ COSY giữa H-7 (δ_H 2,16; 1,90)/H-6 (δ_H 1,39; 1,25)/H-5 (δ_H 1,91) hay các tương tác giữa H-10 (δ_H 2,26; 1,89)/H-9 (δ_H 5,08) cho phép thiết lập trật tự C-7/C-6/C-5 và C-10/C-9. Tương tự, tương tác giữa H-1 (δ_H 5,25)/H-2 (δ_H 5,11)/H-3 (δ_H 2,59) trên phổ COSY cho phép xác định được vị trí của C-1/C-2/C-3. Dựa vào các dữ liệu phổ 2D NMR ở trên, cho thấy sự tồn tại của vòng 4,8,11,11-tetramethylcycloundeca-1,8-diene trong cấu trúc của hợp chất **PH4**.

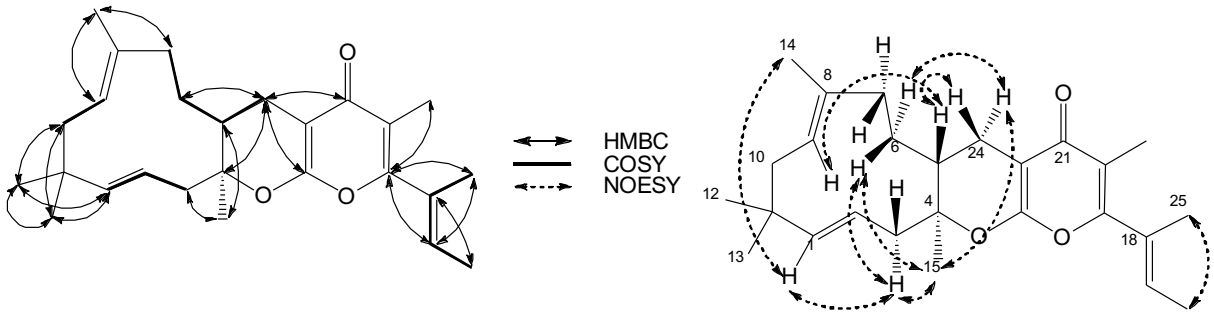
Bên cạnh đó, hằng số ghép $^3J_{1\text{-}2}$ giữa H-1 và H-2 là 16,0 Hz, cũng như các tương tác chính trên phổ NOESY giữa H-1 (δ_H 5,25) và H-3b (δ_H 2,44) đã đề nghị cấu hình *E* của liên kết đôi Δ1. Các tương tác của H-7b (δ_H 1,90)/H-9 (δ_H 5,08) và H-10a (δ_H 2,26)/H-10b (δ_H 1,80)/H-14 trên phổ NOESY đã xác nhận cấu hình *E* của liên kết đôi Δ8, tương tác giữa H-16(δ_H 1,85) và H-25(δ_H 1,94) gợi ý cấu hình *E* của liên kết đôi Δ18

Tương tự hợp chất **PH16** và **PH15**, liên kết giữa C-4 và C-23 qua cầu oxy hình thành vòng B được đề nghị để phù hợp với công thức phân tử của hợp chất **PH4**. Thêm vào đó, sự dịch chuyển về từ trường thấp của carbon methine C-4 tại δ_C 89,5 đã làm rõ sự có mặt của cầu nối ether giữa C-4 và C-23. Như vậy, cấu trúc của hợp chất **PH4** có chứa sesquiterpen là *α*-humulen [137] và mảnh cấu trúc này được gắn trực tiếp vào vòng pyrano[2,3-b]-21-pyranon tại C-4 và C-5. Dựa vào dịch chuyển hóa học trên phổ ^{13}C-NMR của C-4 và C-5 trong hợp chất **PH4** so sánh với **PH15** và các tương tác trên phổ NOESY giữa H-5/H-24a (δ_H 2,92); H-5/H-9; H-7b/H-9 và các tương tác giữa H-15/H-6a (δ_H 1,39); H-6a/H-14; H-14/H-7a; H-15/24b (δ_H 1,95) đề nghị cấu dạng *trans* giữa các vòng pyrano[2,3-b]-21-pyranon và *α*-humulen. Ngoài ra, các tương tác khác trên phổ NOESY giữa H-1/H-14; H-1/H-3b (δ_H 2,44); H-3b/H-6a (δ_H 1,39); H-3b/H-15, H-6a (δ_H 1,39)/H-15 và H-6b (δ_H 1,25)/H-24b gợi ý vị trí H-1 và nhóm methyl C-14 nằm trên cùng một mặt phẳng của khung *α*-humulen.

Phổ HR-ESI-MS xuất hiện pic ion giả phân tử tại *m/z* 397,2737 $[M+H]^+$ tương ứng với công thức phân tử $C_{26}H_{37}O_3$ (tính toán theo lý thuyết M = 397,2743) cho phép xác định CTPT của hợp chất **PH4** là $C_{26}H_{36}O_3$ (DBE = 9). Dựa vào những dữ liệu phổ trên, cấu trúc của **PH4** đã được làm sáng tỏ và được đặt tên là **Pogostemin C**.



Hình 3.11. *Cấu trúc hóa học của hợp chất* ***PH4*** *(a) và α-humulen (b)*



Hình 3.12. *Các tương tác HMBC, COSY và NOESY chính của hợp chất* ***PH4***

Bảng 3.4. *Số liệu phổ NMR của hợp chất* ***PH4*** *và chất tham khảo [δ (ppm), J (Hz)]*

C	*PH4*					*α-humulen*[137]
	$\delta_C^{a,c}$	$\delta_H^{a,b}$	HMBC (H→C)	COSY (H→H)	NOESY (H→H)	$\delta_C^{d,c}$
1	144,7	5,25 dd (1,5, 16,0)	C-2, C-3, C-10, C-11, C-12, C-13	H-2	H-3b, H-14	141,0
2	120,4	5,11 m	C-1, C-3, C-4, C-11	H-1, H-3		127,7
3	43,0	2,59 td (2,0, 14,5); 2,44 dd (10,5, 15,0)	C-1, C-2, C-4, C-5, C-15	H-2	H-1, H-6a, H-15	40,4
4	89,5	–				133,15
5	36,8	1,91 m	C-3, C-4, C-6, C-7, C-22, C-24	H-6, H-24	H-9, H-24a	125,0
6	30,8	1,39 dd (11,0, 13,5); 1,25 dd (6,5, 13,5)	C-4, C-5, C-7, C-8, C-24	H-5, H-7	H-14, H-15, H-24b	23,3
7	38,7	2,16 dd (7,5, 13,0); 1,90 m	C-5, C-6, C-8, C-9, C-14	H-6	H-9, H-14	39,7
8	137,8	–				139,2
9	124,1	5,08 m	C-7, C-8, C-10, C-11, C-14	H-10	H-5, H-7b	125,8
10	42,4	2,26 t (12,5); 1,80 dd (5,0, 12,5)	C-1, C-8, C-9, C-11, C-12, C-13	H-9	H-14	42,0
11	39,1	–				37,4
12	24,6	1,07 s	C-1, C-10, C-11, C-13			27,1
13	30,6	1,07 s	C-1, C-10, C-11, C-12			27,1
14	17,3	1,66 s	C-7, C-8, C-9		H-6a, H-7a, H-10a, H-10b	17,9
15	20,2	1,23 s	C-3, C-4, C-5		H-6a, H-24b	15,1
16	13,8	1,85 dd (1,0, 7,0)	C-17, C-18	H-17	H-25	
17	133,3	5,91 dq (1,5, 7,0)	C-16, C-18, C-19, C-25	H-16		
18	129,5	–				
19	162,0	–				
20	117,9	–				
21	182,4	–				
22	98,0	–				
23	164,2	–				
24	23,3	2,92 dd (4,5, 15,5); 1,95 m	C-4, C-5, C-6, C-21, C-22, C-23	H-5	H-5, H-15	
25	14,5	1,94 dd (1,0, 1,5)	C-17, C-18, C-19		H-16	
26	11,8	1,97 s	C-19, C-20, C-21			

[a]Đo trong CD_3OD, [b]500 MHz, [c]125MHz, [d]Đo trong $CDCl_3$

3.2.3.4. Hợp chất PH10: (Chất mới)

Hợp chất **PH10** thu được dưới dạng bột màu trắng. Phổ ^{1}H-NMR (Bảng 3.5) của hợp chất **PH10** xuất hiện tín hiệu đặc trưng của 5 nhóm methyl tại δ_H [2,01 (s, H_3-14), 1,23 (d, J = 7,0 Hz, H_3-1′), 1,15 (d, J = 6,5 Hz, H_3-5″), 0,92 (t, J = 7,5 Hz, H_3-4″) và 0,91 (t, J = 7,5 Hz, H_3-4′)], 2 tín hiệu proton sextet tại δ_H [2,54 (sextet, J = 7,0 Hz, H-2′), 3,98 (sextet, J = 6,5 Hz, H-2″)], proton olefin tại δ_H 6,08 (s, H-3) và proton nhóm methylen tại δ_H 3,63 (br s, H_2-7).

Phổ ^{13}C-NMR (Bảng 3.5) và HSQC của hợp chất **PH10** chỉ ra 22 tín hiệu carbon bao gồm 5 nhóm methyl, 3 nhóm methylen, 3 nhóm methin và 11 carbon không liên kết hydro. Trong đó, xuất hiện tín hiệu đặc trưng của 2 nhóm carbonyl tại δ_C 212,6 (C-1″), 171,3 (C-6) và tín hiệu của nhóm methyl gắn với vòng thơm tại δ_C 8,1 (C-14). Dựa vào các dữ liệu phổ 1D-NMR, hợp chất **PH10** được đề xuất là một dẫn xuất của phloroglucinol [138], [139].

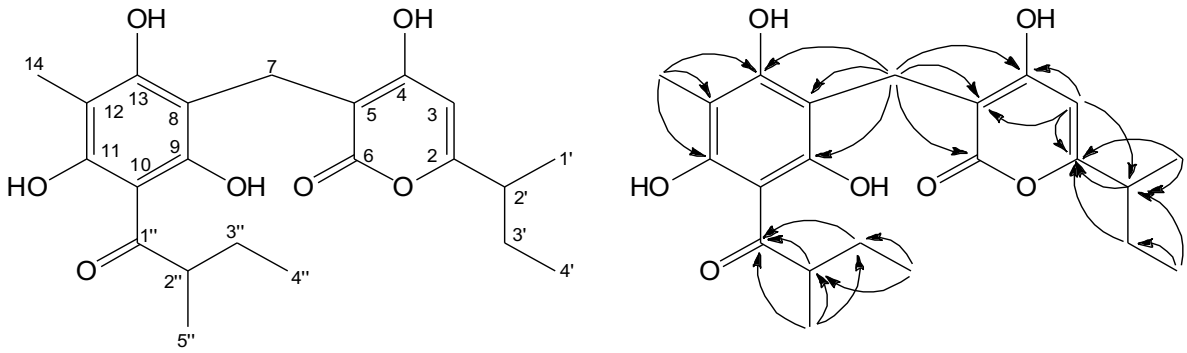
Trên phổ HMBC của hợp chất **PH10** xuất hiện các tương tác giữa H-4″ (δ_H 0,92)/H-5″ (δ_H 1,15) và C-2″ (δ_C 47,0)/C-3″ (δ_C 28,3), giữa H-5″ (δ_H 1,15)/H-3″ (δ_H 1,84; 1,39) /H-2″ (δ_H 3,98) và C-1″ (δ_C 212,6) gợi ý sự có mặt của nhóm 1-oxo-2-methylbutyl. Ngoài ra, tương tác HMBC giữa H-14 (δ_H 2,01) và C-11 (δ_C 162,4)/C-12 (δ_C 105,2)/C-13 (δ_C 161,3) gợi ý nhóm methyl (C-14) gắn với nhân thơm tại C-12 (Hình 3.13).

Sự dịch chuyển hóa học trên phổ ^{13}C-NMR của vòng pyron, cụ thể ở hợp chất **PH10** [δ_C 169,5 (C-2), 102,2 (C-3), 169,5 (C-4), 103,0 (C-5) và 171,3 (C-6)] tương tự như của hợp chất 6- (2-butyl)-3-ethyl-4-hydroxy-2-pyrone (còn gọi germicidin) [δ_C 165,9 (C-2), 99,6 (C-3), 167,2 (C-4), 104,7 (C-5) và 167,5 (C-6)] được phân lập từ phần dịch nổi của môi trường nuôi cấy *Streptomyces viridochromogenes* [140], điều này chỉ ra rằng phân tử **PH10** chứa cấu trúc α-pyron. Ngoài ra, các tương tác trên phổ HMBC giữa H-7 (δ_H 3,63) và C-4 (δ_C 169,5)/C-5 (δ_C 103,0)/C-6 (δ_C 171,3), giữa H-3 (δ_H 6,08) và C-2 (δ_C 169,5)/C-4/C-5 mà không có tương tác với C-6 đã cũng cố cho sự có mặt của vòng α-pyron trong **PH10** (Hình 3.13).

Ngoài ra, các tương tác trên phổ HMBC giữa H-1′ (δ_H 1,23)/H-4′ (δ_H 0,91) và C-2′ (δ_C 40,9)/C-3′ (δ_C 28,5) và giữa H-1′/H-2′ (δ_H 2,54)/H-3′ (δ_H 1,58; 1,70) đến C-2 cho phép gợi ý sự có mặt của nhóm *sec*-butyl và gắn vào vòng *α*-pyron tại vị trí C-2.

Liên kết giữa gốc phloroglucinol và vòng *α*-pyron qua cầu methylen ($C(7)H_2$) được thiết lập thông qua sự dịch chuyển mạnh về phía trường thấp của H_2-7 (δ_H 3,63) [141], [142]. Đặc biệt, các tương tác trên phổ HMBC giữa proton của nhóm methylen (H_2-7) với C-4 (δ_C 169,5)/C-5 (δ_C 101,7)/C-6 (δ_C 170,7)/ C-8 (δ_C 106,5)/C-9 (δ_C 158,7)/C-13 (δ_C 161,3) cũng cố hơn sự hình thành cầu methylen giữa gốc phloroglucinol và vòng *α*-pyron.

Phổ HR-ESI-MS xuất hiện pic ion giả phân tử tại *m/z* 405,1909 $[M+H]^+$ tương ứng với công thức phân tử $C_{22}H_{29}O_7$ (tính theo lý thuyết là M = 405,1913), công thức phân tử của hợp chất **PH10** là $C_{22}H_{28}O_7$ (DBE = 9). Dựa vào các dữ liệu phổ trên, hợp chất **PH10** được xác định là một dẫn xuất phloroglucinol mới được đặt lên là **Pogostemonon B**.



Hình 3.13. *Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC (→) chính của hợp chất* ***PH10***

Bảng 3.5. *Số liệu phổ NMR của hợp chất* ***PH10*** *[δ (ppm), J (Hz)]*

C	$\delta_C^{a,c}$	$\delta_H^{a,b}$	HMBC(H → C)
2	169,5	–	
3	102,2	6,08 br s	C-2, C-4, C-5, C-2′
4	169,5	–	
5	103,0	–	
6	171,3	–	
7	18,6	3,62 s	C-4, C-5, C-6, C-8, C-9, C-13
8	106,5	–	
9	158,7	–	
10	106,7	–	
11	162,4	–	
12	105,2	–	
13	161,3	–	
14	8,1	2,01 s	C-11, C-12, C-13
1′	18,2	1,22 d (7,0)	C-2, C-2′, C-3′
2′	40,9	2,54 sextet (7,0)	C-2, C-1′, C-3′, C-4′
3′	28,5	1,58 m; 1,70 m	C-2, C-1′, C-2′, C-4′
4′	11,9	0,91 t (7,5)	C-2′, C-3′
1″	212,6	–	
2″	47,0	3,98 sextet (6,5)	C-1″, C-3″, C-4″, C-5″
3″	28,3	1,84 m; 1,39 m	C-1″, C-2″, C-4″, C-5″
4″	12,3	0,92 t (7,5)	C-2″, C-3″
5″	17,3	1,15 d (6,5)	C-1″, C-2″, C-3″

[a] Đo trong CD_3OD, [b] 500 MHz, [c] 125MHz

3.2.3.5. Hợp chất PH19: (Chất mới)

Hợp chất **PH19** được tách ra ở dạng bột, màu vàng nhạt, tan tốt trong MeOH. Các dữ liệu phổ ^{1}H và ^{13}C-NMR của hợp chất **PH19** tại Bảng 3.6 khá tương đồng với hợp chất **PH10**. Trong cấu trúc **PH19** xuất hiện tín hiệu của nhóm methyl singlet.

Cụ thể, phổ ^{1}H-NMR của hợp chất **PH19** xuất hiện tín hiệu đặc trưng của 6 nhóm methyl tại δ_H [2,06 (s, H_3-14), 2,03 (s, H_3-15), 1,21 (d, J = 7,5 Hz, H_3-1′), 1,16 (d, J = 6,5 Hz, H_3-5″), 0,93 (t, J = 7,5 Hz, H_3-4″) và 0,87 (t, J = 7,5 Hz, H_3-4′), tín hiệu proton sextet tại δ_H 3,98 (sextet, J = 6,5 Hz, H-2″) và nhóm methylen tại δ_H 3,68 (s, H_2-7).

Phổ ^{13}C-NMR (Bảng 3.6) và HSQC của hợp chất **PH19** chỉ ra tín hiệu cộng hưởng của 23 carbon gồm 6 nhóm methyl, 3 nhóm methylen, 2 nhóm methin và 12 nguyên tử carbon không liên kết hydro. Trong đó, tín hiệu tại δ_C 212,8 (C-1″) và 170,8 (C-6) đặc trưng cho carbon carbonyl, các tín hiệu trên phổ ^{13}C-NMR tại δ_C 164,6 (C-2); 110,0 (C-3); 169,0 (C-4); 103,1 (C-5) và 170,8 (C-6) gợi ý sự hiện diện vòng *α*-pyron, tương tự như trong cấu trúc hợp chất **PH10**. Dựa vào các dữ liệu phổ 1D-NMR, hợp chất **PH19** được đề xuất là một dẫn xuất của phloroglucinol chứa vòng *α*-pyron [138], [139].

Tương tự với hợp chất **PH10**, phổ HMBC của hợp chất **PH19** xuất hiện các tương tác giữa H_3-4″ (δ_H 0,93)/H_3-5″ (δ_H 1,16) và C-2″ (δ_C 47,1)/C-3″ (δ_C 28,2), giữa H_3-5″ và C-1″ (δ_C 212,8) gợi ý sự có mặt của nhóm 1-oxo-2-methylbutyl. Ngoài ra, các tương tác HMBC giữa H_3-14 (δ_H 2,06) với C-11 (δ_C 160,8)/C-12 (δ_C 105,3)/C-13 (δ_C 160,8) gợi ý nhóm methyl (C-14) gán tại vị trí C-12 của nhân thơm. Hợp chất **PH19** là dẫn xuất phloroglucinol có gốc phloroglucinol liên kết với vòng *α* -pyron qua cầu methylen (C(7)H_2) được thiết lập thông qua sự dịch chuyển mạnh về phía trường thấp của H_2-7 (δ_H 3,68) [141], [142] và các tương tác HMBC giữa H_2-7 với C-4 (δ_C 169,0)/C-5 (δ_C 103,1)/C-6 (δ_C 170,8)/C-8 (δ_C 106,5)/C-9 (δ_C 159,4)/C-13 (δ_C 160,8) (Hình 3.14). Ngoài ra, các tương tác từ H_3-1′ (δ_H 1,21)/H_3-4′ (δ_H 0,87) đến C-2′ (δ_C 37,5)/C-3′ (δ_C 28,7), từ H_3-1′/H-2′ (δ_H 2,97)/H_2-3′ (δ_H 1,68; 1,60) đến C-2 trên phổ HMBC cho phép gắn nhóm *sec*-butyl vào tại C-2 của vòng *α*-pyron.

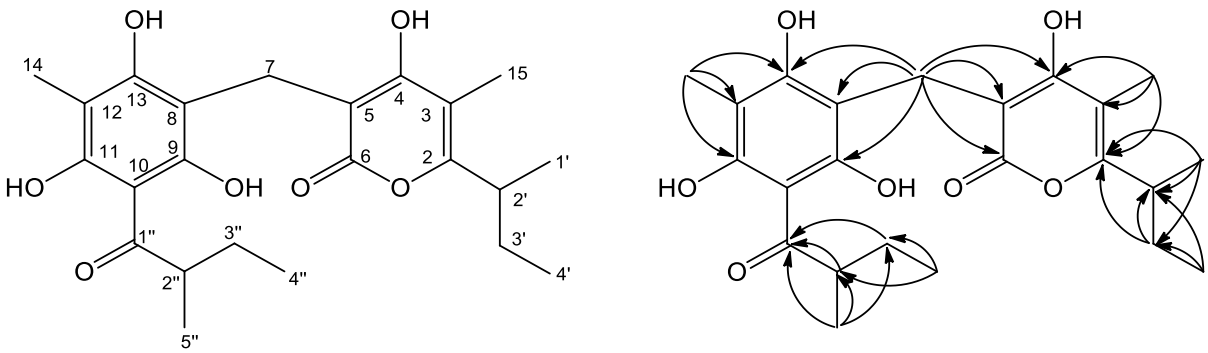
Điểm khác biệt giữa hợp chất **PH19** và **PH10** là trên phổ HMBC của **PH19** xuất hiện tương tác giữa giữa H_3-15 (δ_H 2,03) và C-2 (δ_C 164,6)/C-3 (δ_C 110,0)/C-4 (δ_C 169,0) gợi ý nhóm methyl còn lại (C-15) được gán tại C-3 của nhân *α*-pyron.

Phổ HR-ESI-MS xuất hiện pic ion giả phân tử tại *m/z* 441,1897 $[M+Na]^+$ (tính toán lý thuyết cho $C_{23}H_{30}O_7Na$ là 441,1889) đề nghị CTPT của hợp chất này là $C_{23}H_{30}O_7$ (DBE = 9). Phổ UV (MeOH) chỉ ra cực đại hấp thụ tại λ 295 nm. Dựa vào các dữ liệu phổ NMR, cấu trúc của hợp chất **PH19** được làm sáng tỏ, là một dẫn xuất phloroglucinol mới, đặt tên là **Pogostemonon D**.

Bảng 3.6. *Số liệu phổ NMR của hợp chất* ***PH19*** *[δ (ppm), J (Hz)]*

C	$\delta_C^{a,c}$	$\delta_H^{a,b}$	HMBC(H → C)
2	164,6	–	
3	110,0	–	
4	169,0	–	
5	103,1	–	
6	170,8	–	
7	18,6	3,68 s	C-4, C-5, C-6, C-8, C-9, C-13
8	106,5	–	
9	159,4	–	
10	106,4	–	
11	160,8	–	
12	105,3	–	
13	160,8	–	
14	8,3	2,06 s	C-11, C-12, C-13
15	9,6	2,03 s	C-2, C-3, C-4
1′	18,3	1,21 d (7,5)	C-2, C-2′, C-3′
2′	37,5	2,97 sextet (6,5)	C-2, C-1′, C-3′, C-4′
3′	28,7	1,68 m; 1,60 m	C-2, C-1′, C-2′, C-4′
4′	12,2	0,87 t (7,5)	C-2′, C-3′
1″	212,8	–	
2″	47,1	3,98 sextet (6,5)	C-1″, C-3″, C-4″, C-5″
3″	28,2	1,85 m; 1,40 m	C-1″, C-2″, C-4″, C-5″
4″	12,3	0,93 t (7.5)	C-2″, C-3″
5″	17,1	1,16 d (6,5)	C-1″, C-2″, C-3″

[a] Đo trong CD_3OD, [b]500 MHz, [c]125MHz



Hình 3.14. *Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC (→) chính của hợp chất* ***PH19***

3.2.3.6. Hợp chất PH13: (Chất mới)

Hợp chất **PH13** thu được dưới dạng bột màu trắng. Các dữ liệu phổ ^{1}H và ^{13}C-NMR của hợp chất **PH13** tại Bảng 3.7 khá tương đồng với hợp chất **PH19**. Tuy nhiên, dữ liệu phổ của hợp chất **PH13** xuất hiện tín hiệu của mảnh cấu trúc 1-methylprop-1-enyl.

Cụ thể, phổ ^{1}H-NMR (Bảng 3.7) chỉ ra tín hiệu đặc trưng của proton olefin tại δ_H 5,87 (dq, J = 1,5; 7,0 Hz, H-3′), tín hiệu proton sextet tại δ_H 3,98 (sextet, J = 6,5, H-2″), các tín hiệu proton của 6 nhóm methyl tại δ_H [2,05 (s, H_3-14), 2,03 (s, H_3-15), 1,91 (br s, H_3-1′), 1,83 (dq, J = 1,0; 7,0 Hz, H_3-4′), 1,16 (d, J = 6,5 Hz, H_3-5″) và 0,93 (t, J = 7,5 Hz, H_3-4″)], tín hiệu của proton nhóm methylen tại δ_H 3,66 (s, H_2-7).

Phổ ^{13}C-NMR (Bảng 3.7) và HSQC của hợp chất **PH13** xuất hiện 23 tín hiệu carbon bao gồm 6 nhóm methyl, 2 nhóm methylen, 2 nhóm methin và 13 carbon không liên kết với hydro. Trong đó, 2 tín hiệu đặc trưng của nhóm carbonyl tại δ_C 212,6 (C-1″) và 170,3 (C-6), các tín hiệu trên phổ ^{13}C-NMR tại δ_C 161,4 (C-2); 110,1 (C-3); 170,3 (C-4); 103,4 (C-5) và 170,3 (C-6) gợi ý sự hiện diện vòng α-pyron, tương tự như trong cấu trúc hợp chất **PH10** và **PH19**. Dựa vào các dữ liệu phổ 1D-NMR, hợp chất **PH13** được đề xuất là một dẫn xuất của phloroglucinol [138].

Dữ liệu phổ NMR của hợp chất **PH13** có nhiều điểm tương đồng với các dữ liệu của hợp chất **PH19**, đặc biệt là trong nhóm phloroglucinol. Cụ thể, phổ HMBC của hợp chất **PH13** có những điểm tương đồng với hợp chất **PH19** như các tương tác giữa H-4″ (δ_H 0,93)/H-5″ (δ_H 1,16) và C-2″ (δ_C 47,1)/C-3″ (δ_C 28,2), giữa H-5″ và C-1″ (δ_C 212,6) cho thấy sự hiện diện của nhóm 1-oxo-2-methylbutyl. Tương tác HMBC giữa H-14 (δ_H 2,05) và C-11 (δ_C 160,9)/C-12 (δ_C 105,3)/C-13 (δ_C 161,3) chứng tỏ có nhóm methyl gắn với nhân thơm tại C-12. Liên kết giữa gốc phloroglucinol và vòng α-pyron qua cầu methylen (C(7)H_2) được thiết lập thông qua sự dịch chuyển mạnh về phía trường thấp của H_2-7 (δ_H 3,66) [141], [142]. Vị trí nhóm methyl tại vị trí C-3 được thiết lập dựa trên tương tác HMBC giữa δ_H 2,03 (H_3-15 và C-2 (δ_C 161,4)/ C-3 (δ_C 110,1)/C-4 (δC 170,1).

Điểm khác biệt so với hợp chất **PH19** là trên phổ HMBC của **PH13** xuất hiện tương tác giữa H-1′ (δ_H 1,91)/H-4′ (δ_H 1,83) và C-2′ (δ_C 129,5)/C-3′ (δ_C 133,1) gợi ý sự

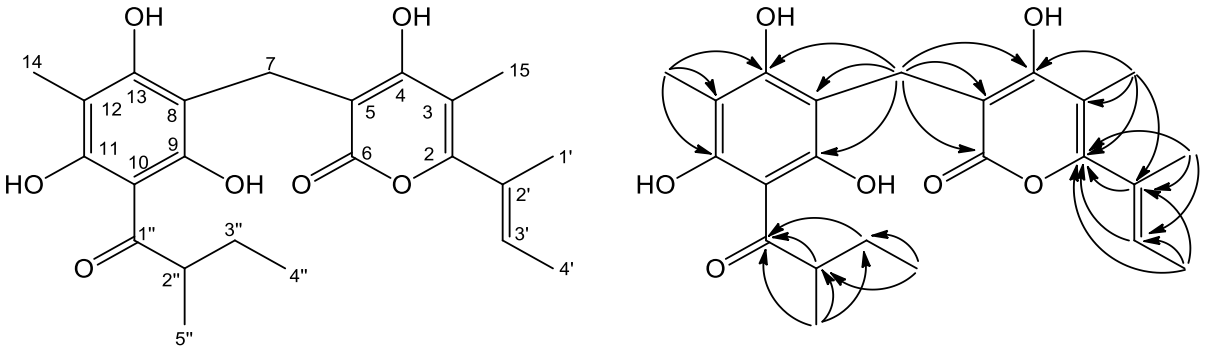
có mặt của mảnh cấu trúc 1-methylprop-1-enyl và các tương tác giữa H-1′ (δ_H 1,91)/H-3′ (δ_H 5,87) và C-2 (δ_C 161,4) cho phép xác định nhóm 1-methylprop-1-enyl liên kết với vòng α-pyron tại vị trí C-2.

Phổ HR-ESI-MS xuất hiện pic ion giả phân tử tại *m/z* 417,1906 $[M+H]^+$ tương ứng với công thức phân tử $C_{23}H_{29}O_7$ (tính theo lý thuyết là M = 417,1913), công thức phân tử của hợp chất **PH13** là $C_{23}H_{28}O_7$ (DBE = 10). Dựa vào các dữ liệu phổ trên, cấu trúc của **PH13** được xác định là một dẫn xuất phloroglucinol mới, đặt lên là **Pogostemonon C.**

Bảng 3.7. *Số liệu phổ NMR của hợp chất* ***PH13*** *[δ (ppm), J (Hz)]*

C	$\delta_C^{a,c}$	$\delta_H^{a,b}$	HMBC (H → C)
2	161,4	–	
3	110,1	–	
4	170,3	–	
5	103,4	–	
6	170,3	–	
7	18,8	3,66 s	C-4, C-5, C-6, C-8, C-9, C-13
8	106,4	–	
9	159,4	–	
10	106,5	–	
11	160,9	–	
12	105,3	–	
13	161,3	–	
14	8,3	2,05 s	C-11, C-12, C-13
15	11,6	2,03 s	C-2, C-3, C-4
1′	14,5	1,91 br s	C-2, C-2′, C-3′
2′	129,5	–	
3′	133,1	5,87 qq (1,5, 7,0)	C-2, C-1′, C-2′, C-4′
4′	13,8	1,83 dq (1,0; 7,0)	C-2′, C-3′
1″	212,6	–	
2″	47,1	3,98 sextet (6,5)	C-1″, C-3″, C-4″, C-5″
3″	28,2	1,85 m; 1,40 m	C-1″, C-2″, C-4″, C-5″
4″	12,3	0,93 t (7,5)	C-2″, C-3″
5″	17,2	1,16 d (6,5)	C-1″, C-2″, C-3″

[a] Đo trong CD_3OD, [b] 500 MHz, [c] 125MHz



Hình 3.15. *Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC (→) chính của hợp chất* ***PH13***

3.2.3.7. Hợp chất PH6: (Chất mới)

Hợp chất **PH6** thu được dưới dạng bột màu vàng. Các dữ liệu phổ ^{1}H và ^{13}C-NMR của hợp chất **PH6** tại Bảng 3.8 khá tương đồng với hợp chất **PH13**. Điểm khác biệt là trong phân tử **PH6** xuất hiện tín hiệu của vòng *γ*-pyron.

Cụ thể, phổ ^{1}H-NMR chỉ ra tín hiệu đặc trưng của proton olefin tại δ_H 5,75 (dq, J = 1,5; 7,0 Hz, H-3′), tín hiệu proton sextet tại δ_H 4,09 (sextet, J = 6,5 Hz, H-2″), các tín hiệu proton của 6 nhóm methyl tại δ_H [1,98 (s, H_3-14), 1,93 (s, H_3-15), 1,89 (t, J = 1,5 Hz, H_3-1′), 1,79 (dq, J =1,0; 7,0 Hz, H_3-4′), 1,15 (d, J = 6,5 Hz, H_3-5″) và 0,92 (t, J = 7,5 Hz, H_3-4″)], tín hiệu của proton nhóm methylen tại δ_H 3,55 (br.s, H_2-7) (Hình 3.16).

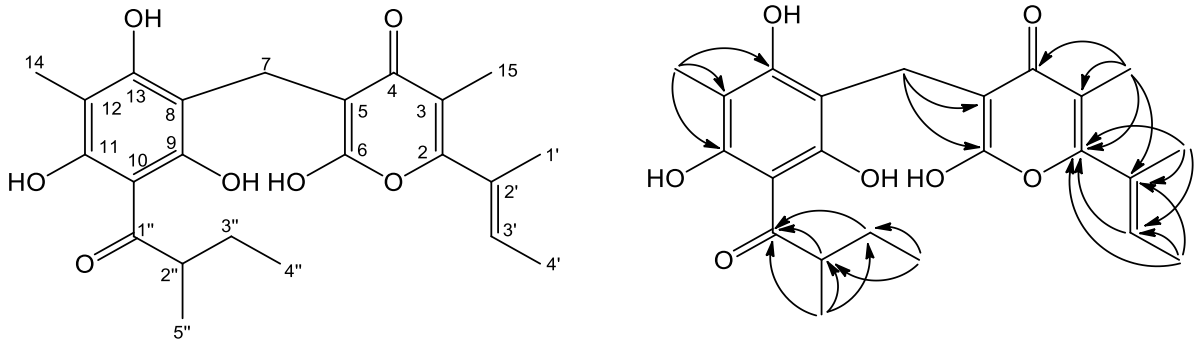
Phổ ^{13}C-NMR (Bảng 3.8) và HSQC của hợp chất **PH6** chỉ ra 23 tín hiệu carbon bao gồm 6 nhóm methyl, 2 nhóm methylen, 2 nhóm methin và 13 carbon không liên kết hydro. Trong đó, xuất hiện tín hiệu đặc trưng của 2 nhóm carbonyl tại δ_C 212,4 (C-1″) và 180,7 (C-4), tín hiệu của nhóm methyl gắn với vòng thơm tại δ_C 7,9 (C-14). Đặc biệt, tín hiệu carbonyl tại δ_C 180,7 (C-4) dịch chuyển về từ trường cao gợi ý sự có mặt của hệ enone trong hợp chất **PH6**. Dựa vào các dữ liệu phổ 1D-NMR, hợp chất **PH6** được đề xuất là một dẫn xuất của phloroglucinol chứa vòng *γ*-pyron. [138].

Tương tự hợp chất **PH13**, phổ HMBC của hợp chất **PH6** chỉ ra tương tác giữa H-4″ (δ_H 0,92)/H-5″ (δ_H 1,15) và C-2″ (δ_C 46,6)/C-3″ (δ_C 28,3), giữa H-5″ và C-1″ (δ_C 212,4) gợi ý sự xuất hiện của nhóm 1-oxo-2-methylbutyl. Tương tác HMBC giữa H-14(δ_H 1,98) và C-11 (δ_C 162,7)/C-12 (δ_C 104,7)/C-13 (δ_C 163,0) cho phép xác định vị trí của nhóm methyl liên kết tại C-12 của nhân thơm (Hình 3.16).

Ngoài ra, tương tác HMBC giữa H-1′ (δ_H 1,89)/H-4′ (δ_H 1,79) và C-2′ (δ_C 130,7)/C-3′ (δ_C 130,6) gợi ý sự có mặt của mảnh cấu trúc 1-methylprop-1-enyl và các tương tác giữa H-1′ (δ_H 1,89)/H-3′ (δ_H 5,75) và C-2 (δ_C 160,0) cho phép xác định nhóm 1-methylprop-1-enyl liên kết với γ-pyron tại vị trí C-2. Vị trí nhóm methyl tại vị trí C-3 được thiết lập dựa trên tương tác HMBC giữa δ_H 1,93 (H_3-15) và C-2 (δ_C 160,0)/ C-3 (δ_C 113,9)/C-4 (δ_C 180,7) (Hình 3.16).

Tương tự các dẫn xuất phloroglucinol khác như **PH10**, **PH19** và **PH13**, liên kết giữa gốc phloroglucinol và vòng γ-pyron qua cầu methylen (C(7)H_2) được thiết lập thông qua sự dịch chuyển mạnh về phía trường thấp của H_2-7 (δ_H 3,55) [141], [142]. Đặc biệt, trên phổ HMBC cho thấy tương tác khá yếu giữa proton của nhóm methylen (H_2-7) với C-5 (δ_C 101,7)/C-6 (δ_C 170,7). Điều nay có thể giải thích là do sự quay tự do xung quanh cầu methylen của hai hệ thống gốc phloroglucinol và vòng γ-pyron [139].

Phổ HR-ESI-MS xuất hiện pic ion giả phân tử tại *m/z* 417,1906 $[M+H]^+$ tương ứng với công thức phân tử $C_{23}H_{29}O_7$ (tính theo lý thuyết là M = 417,1913), công thức phân tử của hợp chất **PH6** là $C_{23}H_{28}O_7$ (DBE = 10). Do đó, hợp chất **PH6** được xác định là một dẫn xuất phloroglucinol mới được đặt lên là **Pogostemonon A**.



Hình 3.16. *Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC (→) chính của hợp chất* ***PH6***

Bảng 3.8. *Số liệu phổ NMR của hợp chất* ***PH6*** *[δ (ppm), J (Hz)]*

C	δ_C[a,c]	δ_H[a,b]	HMBC(H → C)
2	160,0	–	
3	113,9	–	
4	180,7	–	
5	101,7	–	
6	170,7	–	
7	20,1	3,55 br.s	C-5, C-6
8	106,3	–	
9	160	–	
10	109,5	–	
11	162,7	–	
12	104,7	–	
13	163,0	–	
14	7,9	1,98 s	C-11, C-12, C-13
15	12,1	1,93 s	C-2, C-3, C-4
1′	14,7	1,89 t (1,5)	C-2, C-2′, C-3′
2′	130,7	–	
3′	130,6	5,75 qq (1,5, 7,5)	C-2, C-1′, C-2′, C-4′
4′	13,6	1,79 dq (1,0, 7,0)	C-2′, C-3′
1″	212,4	–	
2″	46,6	4,09 sextet (6,5)	C-1″, C-3″, C-4″, C-5″
3″	28,3	1,84 m; 1,39 m	C-1″, C-2″, C-4″, C-5″
4″	12,3	0,92 t (7,5)	C-2″, C-3″
5″	17,5	1,15 d (6,5)	C-1″, C-2″, C-3″

[a] Đo trong CD_3OD, [b] 500 MHz, [c] 125MHz

3.2.3.8. Hợp chất PH18: (Chất mới)

Hợp chất **PH18** thu được dưới dạng bột màu trắng. Các dữ liệu phổ ^{1}H và ^{13}C-NMR của hợp chất **PH18** tại Bảng 3.9 khá tương đồng với hợp chất **PH13** cũng như các hợp chất **PH10**, **PH19**. Điểm khác biệt là trong phân tử **PH18** xuất hiện tín hiệu của bộ khung 2,3-dimethyl-4-chromanon.

Cụ thể, phổ ^{1}H-NMR (Bảng 3.9) chỉ ra tín hiệu đặc trưng của proton olefin tại δ_H 5,78 (dq, J = 1,5; 7,0 Hz, H-3'), tín hiệu proton của 6 nhóm methyl tại δ_H [2,06 (s, H_3-14), 2,00 (s, H_3-15), 1,88 (s, H_3-1'), 1,79 (dd, J = 0,5; 7,0 Hz, H_3-4'), 1,25 (d, J = 7,0 Hz, H_3-4") và 1,66 (d, J = 6,5 Hz, H_3-5")], tín hiệu của proton nhóm methylen tại

δ_H 3,65 (br.s, H_2-7). Đáng chú ý, tín hiệu proton tại δ_H 12,2 được gán cho nhóm chelated hydroxyl, tín hiệu cho 2 proton methin tại δ_H 2,65 (dq, J = 12,0; 7,0 Hz, H-2") và 4,36 (dq, J = 12,0; 6,5 Hz, H-3").

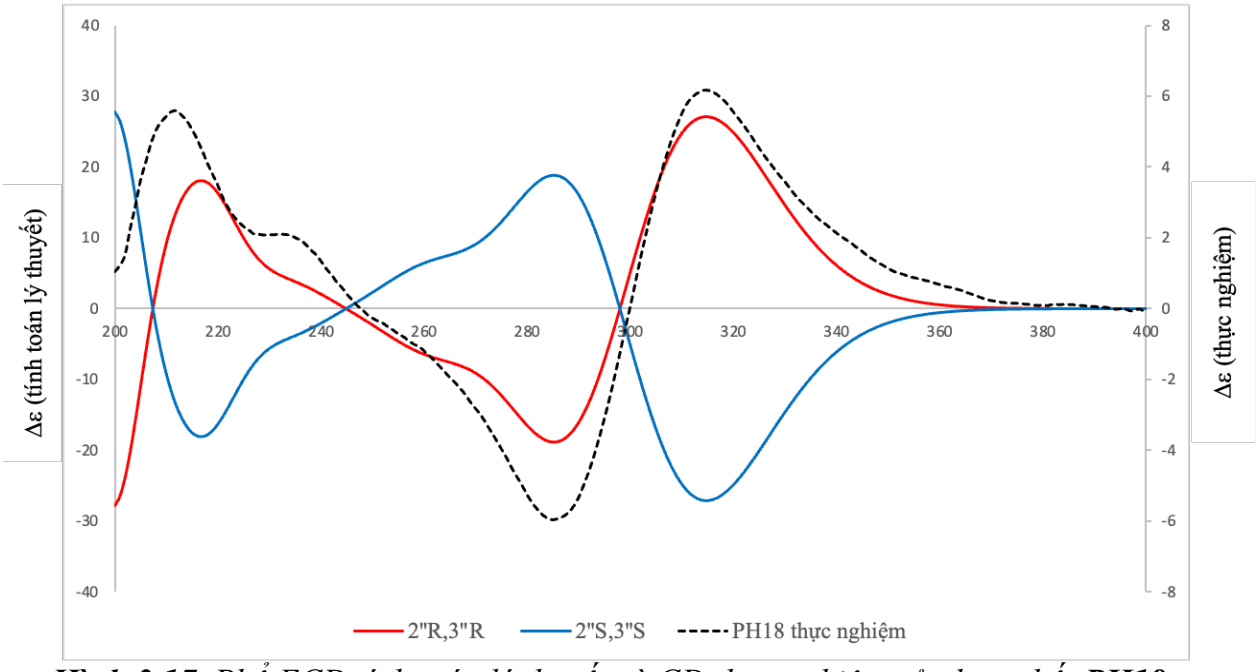
Phổ ^{13}C-NMR (Bảng 3.9) và HSQC của hợp chất **PH18** chỉ ra 23 tín hiệu carbon bao gồm 6 nhóm methyl, 1 nhóm methylen, 3 nhóm methin và 13 carbon không liên kết hydro. Trong đó, tín hiệu đặc trưng của 2 nhóm carbonyl tại δ_C 197,3 (C-1″) và 168,5 (C-6), 2 nhóm methyl gắn vào vòng thơm tại δ_C 7,40 (C-14) và 11,4 (C-15). Tín hiệu của carbon methylene tại δ_C 17,6 và tín hiệu proton của nó tại δ_H 3,65 (br.s, H_2-7) dịch chuyển về từ trường thấp gợi ý liên kết giữa gốc phloroglucinol và vòng α-pyron qua cầu methylen (C(7)H_2). Như vậy, **PH18** là một dẫn xuất của phloroglucinol [141], [142].

Trong các tín hiệu carbon của **PH18**, có 10 tín hiệu có thể gán cho khung γ-pyron trong hợp phần của một dẫn xuất phloroglucinol [138]. Tuy nhiên, so sánh với các gốc phloroglucinol [138], hợp chất **PH18** có nhóm oxymethin tại δ_C 80,4, gợi ý cho phản ứng đóng vòng ở C-3". Điều này được cũng cố dựa trên hằng số ghép giữa H-2" (2,65, dq, J = 12,0; 7,0 Hz) và H-3" (4,36, dq, J = 12,0; 6,5 Hz) và H_3-4" (1,25, d, J = 7,0 Hz) và H_3-5" (1,66, d, J = 6,5 Hz) và sự dịch chuyển về từ trường thấp của δ_C 154,6 (C-9). Ngoài ra, trên phổ HMBC ghi nhận các tương tác giữa δ_H 1,25 (H_3-4") và C-1" (δ_C 212,4)/ C-2" (δ_C 45,7)/ C-3" (δ_C 80,4), các tương tác giữa δ_H 1,66 (H_3-5") và C-2" (δ_C 45,7)/ C-3" (80,4), cũng như các tương tác giữa H-2" (δ_H 2,65)/H-3" (δ_H 4,36) và C-1" (δ_C 197,3). Dữ liệu phổ NMR gợi ý cho bộ khung 2,3-dimethyl-4-chromanon trong gốc phloroglucinol của hợp chất **PH18** [143].

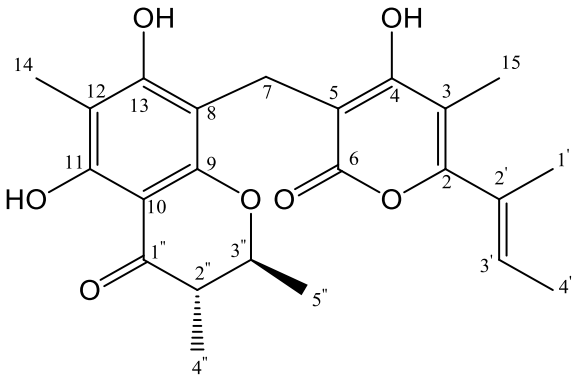
Cấu hình *trans* giữa H-2" và H-3" được xác nhận dựa trên hằng số ghép cặp giữa proton H-2" và H-3" là J = 12,0; 7,0 Hz và J = 12,0; 6,5 Hz, gợi ý cấu hình *diaxial* giữa H-2" và H-3". Cấu hình tuyệt đối 2"*R*, 3"*R* được xác nhận dựa trên cấu hình đã biết của hợp chất acid papuanic phân lập từ *Calophyllum papuanum* [144]. So sánh phổ CD của hợp chất **PH18** và phổ của *trans*-(2*R*,3*R*)-5,7-dihydroxy-2,3-dimethyl-4-chromanone phân lập từ *Helichrysum paronychioides* [143] nhận thấy sự tương đồng trong các đường cong. Do đó, gán cấu hình tuyệt đối của hợp chất này là 2"*R*, 3"*R*.

Bên cạnh đó, cấu hình tuyệt đối của hợp chất **PH18** được khẳng định lại với phương pháp tính toán phổ lưỡng sắc tròn điện tử (ECD) bằng chương trình Gaussian 09 [145]. Đầu tiên, các cấu dạng của cặp đồng phân 2"*R*, 3"*R* và 2"*S*, 3"*S* được phân tích bằng chương trình Spartan 14 với trường lực MMFF. Các cấu dạng có thông số Boltzmann trên 1% đã được lựa chọn để tính toán phổ ECD và được tối ưu hoá với hàm chức năng B3LYP/6-311G(d,p) bằng mô hình PCM. Tiếp theo, phổ ECD của các cấu dạng được tính toán với hàm mật độ phụ thuộc thời gian TDDFT bằng chương trình Gaussian 09 và được mô phỏng bằng công cụ SpecDis 1.71. Kết quả thu được tại hình 3.17 cho thấy phổ ECD tính toán cho đồng phân 2"*R*, 3"*R* phù hợp với dữ liệu CD thực nghiệm, trong khi phổ ECD tính toán cho cấu hình 2"*S*, 3"*S* cho kết quả đối xứng hoàn toàn. Điều này cho phép khẳng định cấu hình tuyệt đối 2"*R*, 3"*R* của hợp chất **PH18.**

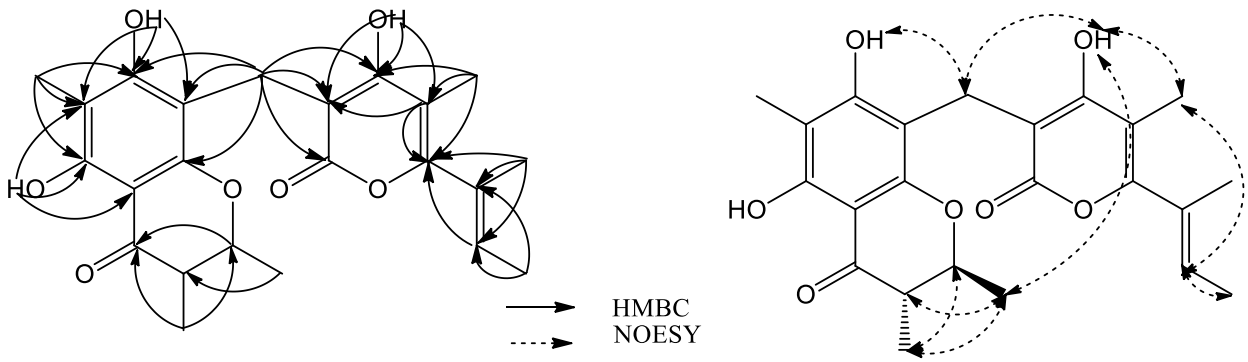
Phổ HR-ESI-MS xuất hiện pic ion giả phân tử tại *m/z* 415,1753 $[M + H]^+$ tương ứng với công thức phân tử $C_{23}H_{27}O_7$, (tính theo lý thuyết là M = 415,1757), do đó, công thức phân tử của hợp chất **PH18** là $C_{23}H_{26}O_7$ (DBE = 11). Dựa trên dữ liệu phổ ở trên, hợp chất **PH18** là một dẫn xuất của phloroglucinol mới, đặt tên là **Pogostemon D**.



Hình 3.17. *Phổ ECD tính toán lý thuyết và CD thực nghiệm của hợp chất* ***PH18***



Hình 3.18. *Cấu trúc hóa học của hợp chất* ***PH18***



Hình 3.19. *Các tương tác HMBC (→) và NOESY chính của hợp chất* ***PH18***

Bảng 3.9. *Số liệu phổ NMR của hợp chất* ***PH18*** *[δ (ppm), J (Hz)]*

C	δ_C	δ_H	HMBC (H → C)	NOESY (H → H)
2	160,5	–		
3	107,8	–		
4	167,3	–		
5	102,1	–		
6	168,5	–		
7	17,6	3,65 br.s	C-4, C-5, C-6, C-8, C-9, C-13	OH-13, OH-4
8	103,6	–		
9	154,6	–		
10	101,1	–		
11	160,5	–		
12	107,4	–		
13	163,1	–		
14	7,4	2,06 s	C-11, C-12, C-13	
15	11,4	2,00 s	C-2, C-3, C-4	OH-4, H-3′
1'	14,5	1,88 s	C-2, C-2′, C-3′	
2'	128,2	–		
3'	132,0	5,78 dq (1,5; 7,0)	C-2, C-1′, C-2′, C-4′	H-4′
4'	13,9	1,79 dd (0,5; 7,0)	C-2′, C-3′	H-3′
1"	197,3	–		
2"	45,7	2,65 dq (12,0; 7,0)	C-10, C-3″, C-4″, C-5″	H-5″
3"	80,4	4,36 dq (12,0; 6,5)	C-1″, C-2″, C-5″	H-4″
4"	10,1	1,25 d (7,0)	C-1″, C-2″, C-3″	H-3″
5"	19,4	1,66 d (6,5)	C-2″, C-3″	H-2″
OH-4	–	8,77 s	C-3, C-4, C-5	H-7, H-15, H-5″
OH-11	–	12,3 s	C-10, C-11, C-12	
OH-13	–	10,5 s	C-8, C-12, C-13	H-7

[a] Đo trong $CDCl_3$, [b]500 MHz, [c]125MHz

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

C	PH10		PH19		PH13		PH6		PH18	
	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H
2	169,5	–	164,6	–	161,4	–	160,0	–	160,5	–
3	102,2	6,08 br.s	110,0	–	110,1	–	113,9	–	107,8	–
4	170,0	–	169,0	–	170,1	–	180,7	–	167,3	–
5	103,0	–	103,1	–	103,4	–	101,7	–	102,1	–
6	171,3	–	170,8	–	170,3	–	170,7	–	168,5	–
7	18,6	3,62 s	18,6	3,68 s	18,8	3,66 s	20,1	3,55 br.s	17,6	3,65 s
8	106,5	–	106,5	–	106,4	–	106,3	–	103,6	–
9	158,7	–	159,4	–	159,4	–	170,7	–	154,6	–
10	106,7	–	106,4	–	106,5	–	109,5	–	101,1	–
11	162,4	–	160,8	–	160,9	–	162,7	–	160,5	–
12	105,2	–	105,3	–	105,3	–	104,7	–	107,4	–
13	161,3	–	160,8	–	161,3	–	163,0	–	163,1	–
14	8,1	2,01 s	8,3	2,06 s	8,3	2,05 s	7,9	1,98 s	7,4	2,06 s
15	–	–	9,6	2,03 s	11,6	2,03 s	12,1	1,93 s	11,4	2,00 s
1'	18,2	1,22 d (7,0)	18,3	1,21 d (7,5)	14,5	1,91 br.s	14,7	1,89 t (1,5)	14,5	1,88 s
2'	40,9	2,54 sextet (7,0)	37,5	2,97 sextet (6,5)	129,5	–	130,7	–	128,2	–
3'	28,5	1,58 m; 1,70 m	28,7	1,68 m; 1,60 m	133,1	5,87 qq (1,5, 7,0)	130,6	5,75 qq (1,5, 7,5)	132,0	5,78 dq (1,5, 7,0)
4'	11,9	0,91 t (7,5)	12,2	0,87 t (7,5)	13,8	1,83 dq (1,0, 7,0)	13,6	1,79 dq (1,0, 7,0)	13,9	1,79 dq (0,5, 7,0)
1''	212,6	–	212,8	–	212,6	–	212,4	–	197,3	–
2''	47,0	3,98 sextet (6,5)	47,1	3,98 sextet (6,5)	47,1	3,98 sextet (6,5)	46,6	4,09 sextet (6,5)	45,7	2,65 dq (12,0, 7,0)
3''	28,3	1,84m; 1,39m	28,2	1,85 m; 1,40 m	28,2	1,85 m; 1,40 m	28,3	1,84 m; 1,39 m	80,4	4,36 dq (12,0, 6,5)
4''	12,3	0,92 t (7,5)	12,3	0,93 t (7.5)	12,3	0,93 t (7,5)	12,3	0,92 t (7,5)	10,1	1,25 d (7,0)
5''	17,3	1,15 d (6,5)	17,1	1,16 d (6,5)	17,2	1,16 d (6,5)	17,5	1,15 d (6,5)	19,4	1,66 d (6,5)

3.2.3.9. Hợp chất PH14: (Chất mới)

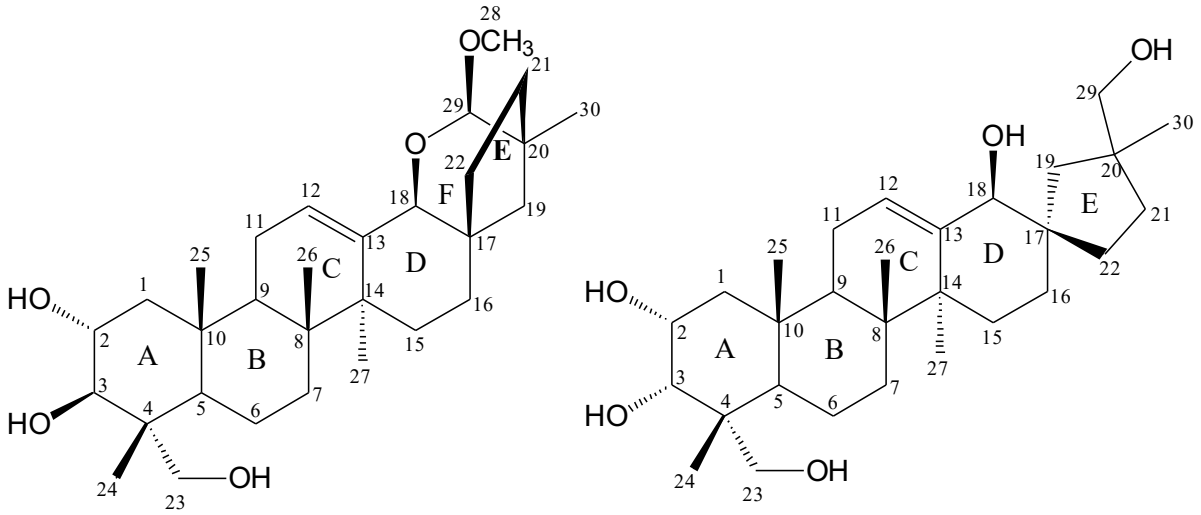
Hợp chất **PH14** thu được dưới dạng bột màu trắng. Phổ ^{1}H-NMR của hợp chất **PH14** chỉ ra tín hiệu đặc trưng của 5 nhóm methyl bậc ba tại δ_H 0,90-1,09, tín hiệu 10 nhóm methylen, đặc biệt sự xuất hiện của proton oxymethylen tại δ_H 3,68 (d, J = 10,0 Hz, H-23a), 3,44 (d, J = 10,0 Hz, H-23b). Phổ ^{1}H-NMR còn thể hiện tín hiệu của 7 proton methine, trong đó có 3 tín hiệu proton oxymethine tại δ_H 3,76 (ddd, J = 10,5; 10,0; 4,0 Hz, H-2), 3,40 (d, J = 10,0 Hz, H-3), 4,08 (d, J = 2,5 Hz, H-18), 1 tín hiệu của proton dioxymethine tại δ_H 4,19 (s, H-29) và tín hiệu proton olefinic tại δ_H 5,77 (d, J = 2,5 Hz, H-12). Ngoài ra, phổ ^{1}H-NMR còn cho thấy tín hiệu của nhóm methoxy tại δ_H 3,36 (s, H_3-28).

Trên phổ ^{13}C-NMR và HSQC của hợp chất **PH14** chỉ ra 30 tín hiệu carbon gợi ý cấu trúc olean-12-ene nor-triterpen. Độ dịch chuyển hóa học tại δ_C 69,0 (C-2), 80,9 (C-3), 49,7 (C-5), 47,6 (C-9), 118,8 (C-12), 74,6 (C-18) và tín hiệu acetal được ghi nhận tại δ_C 106,7 (C-29) gợi ý sự có mặt của 7 carbon methine. Bên cạnh đó, phổ ^{13}C-NMR còn cho thấy tín hiệu 10 carbon methylen bao gồm: 1 hydroxyl methylen tại δ_C 71,1 (C-23), 1 nhóm methoxy tại δ_C 54,9 (C-28) và 7 carbon bậc bốn. So sánh dữ liệu phổ NMR của hợp chất **PH14** và hợp chất gomphoparvin B được phân lập từ loài *Gomphostemma parviflorum* [146], nhóm acetal trong cấu trúc của cả 2 hợp chất này được gán vào vị trí C-29, cũng như vòng F được hình thành trên liên kết giữa C-18 và C-29 qua cầu nối oxy [146]. Điều này còn được xác nhận dựa vào tương tác trên phổ HMBC của hợp chất **PH14**, tương tác giữa H-29 (δ_H 4,18, s) đến C-18 (δ_C 74,6). Bên cạnh đó, điểm khác biệt là sự xuất hiện của nhóm methoxy C-28 (δ_C 54.9) trong cấu trúc **PH14** thay vì nhóm hydroxyl cùng vị trí trong hợp chất gomphoparvin B, được xác nhận thông qua các tương tác trên phổ HMBC giữa δ_H 3,36 (3H, s) và C-29 (δ_C 106,7)/C-30 (δ_C 21,6).

Cấu hình tương đối của **PH14** được xác định dựa vào dữ liệu phổ NOESY. Tín hiệu NOESY giữa H-2 (δ_H 3,76), H-24 (δ_H 0,90) và H-25 (δ_H 1,09) gợi ý sự định hướng β của các proton này. Ngược lại, các tín hiệu NOESY giữa H-27 và H-18, giữa H-18, H-29 và H-30 gợi ý định hướng α của các proton này. Bên cạnh đó, hằng số

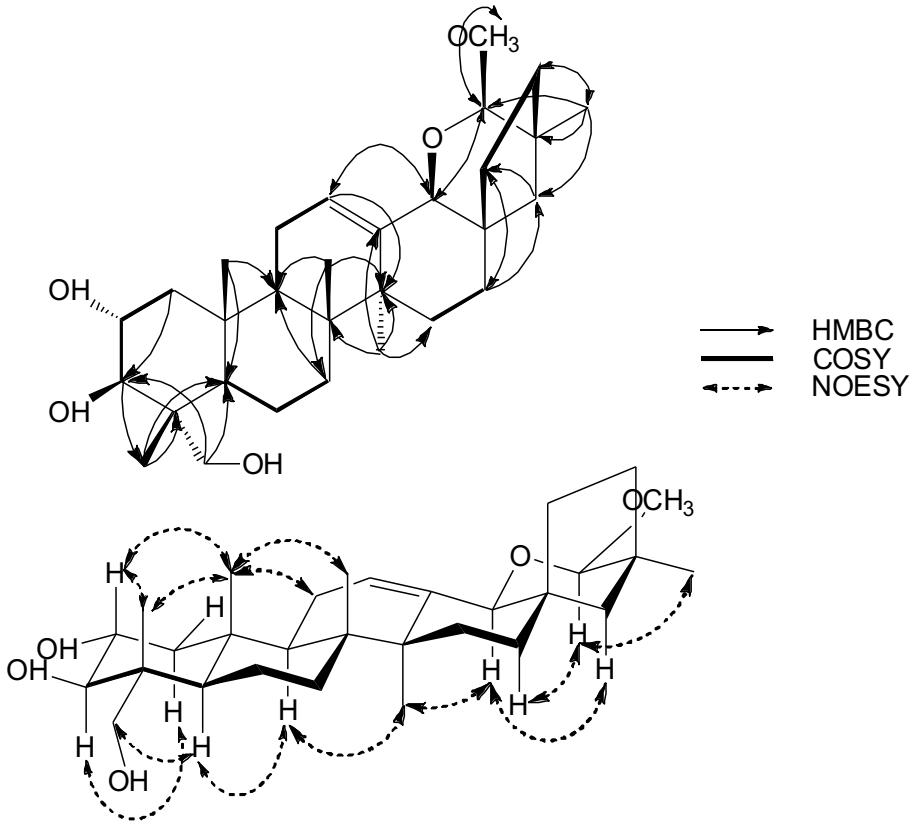
tương tác J_{2-3} = 10,0 Hz gợi ý cấu hình *trans*-diaxial giữa H-2 và H-3 cho phép xác định H-3 định hướng *α*.

Phổ HR-ESI-MS xuất hiện pic ion giả phân tử tại *m/z* 523,3201 $[M+Cl]^-$ tương ứng với công thức phân tử $C_{30}H_{48}O_5Cl$, (tính theo lý thuyết là M = 523,3190), do đó, công thức phân tử của hợp chất **PH14** là $C_{30}H_{48}O_5$ (DBE = 7). Dựa vào các dữ liệu phổ trên, cấu trúc của hợp chất **PH14** được đề xuất là (2*α*,3*β*,17*R**)-18-epoxy-29-methoxy-19(18→17)-abeo-28-norolean-12ene-2,3,23-triol, là một triterpen mới được đặt tên là **Pogostem**.



(a) (b)

Hình 3.20. *Cấu trúc hóa học của hợp chất* ***PH14*** *(a) và gomphoparvin B (b)*



Hình 3.21. *Các tương tác HMBC, COSY và NOESY chính của hợp chất* ***PH14***

Bảng 3.11. *Số liệu phổ NMR của hợp chất* ***PH14*** *[δ (ppm), J (Hz)]*

C	$\delta_C^{a,c}$	$\delta_H^{a,b}$	HMBC (H → C)	COSY (H → H)	NOESY (H → H)
1	46,8	2,06 dd (4,5, 12,5); 0,94*	C-2, C-3, C-5, C-10	H-2	H-3
2	69,0	3,76 ddd (10,5, 10,0, 4,0)	C-1, C-3, C-4, C-10	H-1, H-3	H-24, H-25
3	80,9	3,40 d (10,0)	C-1, C-2, C-4, C-5, C-23, C-24	H-2	H-1
4	42,6	–			
5	49,7	1,05*	C-1, C-3, C-4, C-6, C-7, C-9, C-10	H-6	H-9, H-23
6	18,5	1,40*	C-4, C-5, C-7, C-8, C-10	H-5, H-7	
7	33,7	1,51*; 1,40*	C-5, C-6, C-8, C-9, C-14	H-6	
8	39,6	–			
9	47,6	1,55*	C-1, C-5, C-7, C-8, C-10, C-11, C-12,	H-11	H-5, H-27

			C-14		
10	38,4	–			
11	23,1	1,96 m	C-8, C-9, C-10, C-12, C-13	H-9, H-12	H-12, H-25
12	118,6	5,77 quin (2,5)	C-9, C-11, C-13, C-14, C-18	H-9	H-11
13	138,6	–			
14	43,6	–			
15	27,3	1,59*; 1,03*	C-8, C-13, C-14, C-16, C-17, C-27,	H-16	
16	31,1	1,68*; 1,23 t (3,5)	C-14, C-15, C-17, C-18	H-15	H-19, H-29,
17	46,1	–			
18	74,6	4,08 d (2,5)	C-12, C-13, C-14, C-16, C-17	H-17	H-19, H-27
19	45,0	1,78 br d (11,0); 1,08*	C-16, C-17, C-18, C-20, C-21, C-22		H-18
20	44,1	–			
21	36,0	1,68*; 1,29 dd (4,5, 12,5)	C-17, C-19, C-20, C-22, C-29, C-30	H-22	
22	28,7	1,66*; 1,01*	C-16, C-17, C-18, C-19, C-20, C-21	H-21	
23	71,1	3,68 d (10,0); 3,44 d (10,0)	C-3, C-4, C-5, C-24		H-5
24	12,8	0,90 s	C-3, C-4, C-5, C-23		H-2
25	17,6	1,09 s	C-1, C-5, C-9, C-10		H-2, H-11, H-24, H-26
26	17,6	0,95 s	C-7, C-8, C-9, C-14		H-25
27	23,0	1,08 s	C-8, C-13, C-14, C-15		H-9, H-18
28	54,9	3,36 s	C-29		
29	106,7	4,18 s	C-18, C-19, C-20, C-21, C-28, C-30		H-16, H-30
30	21,6	0,96 s	C-19, C-20, C-21, C-29		H-19, H-29

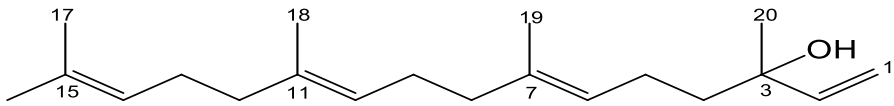
*[a] Đo trong CD_3OD, [b]500 MHz, [c]125MHz, * tín hiệu chập*

3.2.3.10. Hợp chất PH5

Hợp chất **PH5** được tách ở dạng dầu, không màu, tan tốt trong chloroform.

Phổ ^{1}H-NMR của hợp chất **PH5** chỉ ra tín hiệu đặc trưng 5 nhóm methyl singlet tại δ_H 1,68 (H_3-16); 1,60 (H_3-17/H_3-20); 1,59 (H_3-19) và 1,28 (H_3-18); 4 proton olefine tại δ_H 5,92 (dd, J = 10,5, 17,0 Hz, H-2); 5,14 (qt, J = 1,0; 7,0 Hz, H-6); 5,10 (m, H-10/H-14) và nhóm *exo*-methylene tại δ_H 5,22 (dd, J = 1,0; 17,0 Hz, H-1a) và 5,07 (dd, J = 1,0, 10,5 Hz, H-1b).

Phổ ^{13}C-NMR và HSQC của hợp chất **PH5** chỉ ra tín hiệu của 20 carbon, gồm 5 nhóm methyl, 7 nhóm methylen, 4 nhóm methin và 4 carbon không liên kết hydro. Trong đó, 8 carbon lai hóa sp^2 tại δ_C 145,1 (C-2), 135,6 (C-7), 135,1 (C-11), 131,3 (C-15), 124,4 (C-6), 124,2 (C-14), 124,1 (C-10) và 111,7 (C-1) và 1 carbon bậc bốn tại δ_C 73,5 (C-3). Số liệu phổ của hợp chất **PH5** được trình bày tại Bảng 3.3. Các dữ kiện phổ trên gợi ý hợp chất **PH5** là một diterpenoid. So sánh dữ kiện phổ NMR và chất tham khảo [147], hợp chất **PH5** được xác định là **Geranyllinalool** có CTPT là $C_{20}H_{34}O$ (Hình 3.22).



Hình 3.22. *Cấu trúc hóa học của hợp chất* ***PH5***

Bảng 3.12. *Số liệu phổ NMR của hợp chất* ***PH5*** *và chất tham khảo [δ (ppm), J (Hz)]*

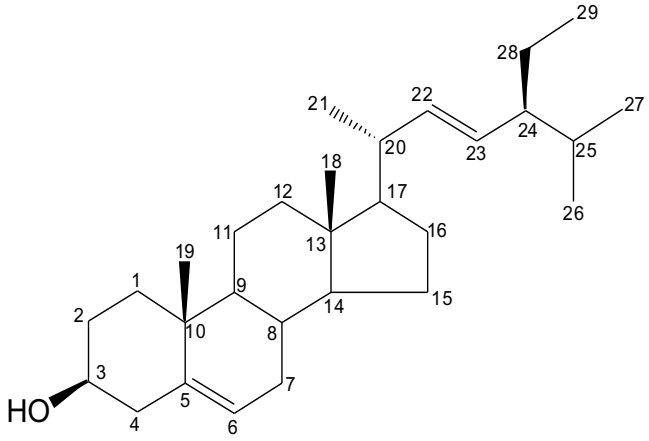
C	Geranyllinalool		PH5	
	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H
1	111,7	5,21 br d (17,3) 5,07 br d (10,7)	111,7	5,22 dd (1,0, 17,0) 5,07 dd (1,0, 10,5)
2	145,1	5,92 dd, (10,7, 17,3)	145,1	5,92 dd, (10,5, 17,0)
3	73,5	–	73,5	–
4	42,1	1,6 m	42,1	1,57 m
5	22,7		22,7	
6	124,4	5,17 br t (6,6)	124,4	5,14 qt (1,0; 7,0)
7	135,7	–	135,6	–
8	39,7		39,7	
9	26,6		26,6	
10	124,2	5,1 br t (6,6)	124,1	5,10 m*
11	135,1	–	135,1	–
12	39,7		39,7	
13	26,8		26,8	
14	124,3	5,1 br t (6,6)	124,2	5,10 m*
15	131,2	–	131,3	–
16	25,7	1,68 s	25,7	1,68 s
17	17,7	1,60 s	17,7	1,60*
18	27,9	1,28 s	27,9	1,28 s
19	16,0	1,56 s	16,0	1,59 s
20	16,0	1,59 s	16,0	1,60*

*[a] Đo trong $CDCl_3$, [b]500 MHz, [c]125MHz, * tín hiệu chập*

3.2.3.11. Hợp chất PH17

Hợp chất **PH17** được phân lập dưới dạng bột màu trắng. Phổ ^{1}H-NMR của **PH17** chỉ ra tín hiệu đặc trưng của 1 proton olefin tại δ_H 5,35 (br d, J = 4,5 Hz, H-6), 2 proton *trans* olefin tại δ_H 5,16 (dd, J = 15,5; 3,5 Hz, H-22); 5,02 (dd, J = 15,5; 9,0 Hz, H-23) và 1 proton thuộc nhóm oxymethin tại δ_H 3,51 (m, H-3). Ở vùng trường cao, tín hiệu của 2 nhóm methyl bậc ba tại δ_H 0,70 (s, H_3-18) và 1,03 (s, H_3-19), 3 nhóm methyl bậc hai tại δ_H 0,81 (d, J = 7,0 Hz, H_3-27), 0,84 (d, J = 7,0 Hz, H_3-26) và 0,93 (d, J = 6,5 Hz, H_3-21) và 1 nhóm methyl bậc một tại δ_H 0,85 (t, J = 7,5 Hz, H_3-29) cũng được ghi nhận. Các dữ kiện phổ trên gợi ý hợp chất **PH17** là một sterol. Đối

chiếu với dữ kiện phổ NMR chất tham khảo [148], hợp chất **PH17** được xác định là **Stigmasterol**, có CTPT là $C_{29}H_{48}O$. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất **PH17** và chất tham khảo được mô tả tại Bảng 3.10.



Hình 3.23. *Cấu trúc hóa học của hợp chất* ***PH17***

Bảng 3.13. *Số liệu phổ NMR của hợp chất* ***PH17*** *và chất tham khảo [δ (ppm), J (Hz)]*

C	Stigmasterol		PH17	
	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H
1	37,6		37,3	
2	31,9		31,7	
3	72,0	3,51 m	71,9	3,51 m
4	42,5	2,30 m 2,23 m	42,3	2,30 m 2,25 m
5	140,8	–	140,8	–
6	121,8	5,17 br.t (6,6)	121,7	5,35 br.d (4,5)
7	32,1	–	31,9	
8	32,2		31,9	
9	50,5		50,2	
10	36,5	–	36,6	–
11	21,2		21,1	
12	40,0		39,7	
13	42,2	–	42,2	–
14	57,1		56,9	
15	24,5		24,4	
16	28,9		28,9	
17	56,3		56,0	
18	12,2	0,70 s	12,3	0,70 s
19	19,5	1,01 s	19,4	1,03 s
20	40,4		40,5	
21	21,4	1,03 d (6,2)	21,2	0,93 d (6,5)
22	138,3	5,17 dd (12,5; 8,6)	138,3	5,16 dd (15,5; 3,5)
23	129,7	5,04 dd (12,5; 8,6)	129,3	5,02 dd (15,5; 9,0)
24	51,5		51,3	
25	32,2		31,9	
26	21,2	0,85 d (6,4)	21,1	0,84 d (7,0)
27	19,2	0,80 d (6,4)	19,0	0,81 d (7,0)
28	25,4		25,4	
29	12,2	0,81 t (7,3)	12,3	0,85 t (7,5)

*[a] Đo trong $CDCl_3$, [b]500 MHz, [c]125MHz, * tín hiệu chập*

3.2.3.12. Thông số và dữ kiện phổ của các hợp chất phân lập được

Như vậy, từ phần trên mặt đất của cây Tu hùng tai bằng các phương pháp sắc ký, luận án đã phân lập được 11 hợp chất bao gồm 3 hợp chất thuộc nhóm meroterpenoid (Pogostemin A-C), 5 hợp chất là dẫn xuất của phloroglucinol (Pogostemonon A-D, Pogostemon D), 1 hợp chất triterpen (Pogostem), 1 hợp chất diterpen (geranyllinalool) và 1 hợp chất steroid (stigmasterol). Trong 11 hợp chất này, có 9 hợp chất mới, lần đầu tiên được tìm thấy từ tự nhiên.

- *Hợp chất PH16:* Pogostemin A (hợp chất mới)

Chất bột màu vàng

Công thức phân tử: $C_{25}H_{36}O_3$

Khối lượng phân tử: 384,5600

Phổ HR-ESI-MS *m/z* 385,2735 $[M+H]^+$

Tính toán lý thuyết cho công thức: $C_{25}H_{37}O_3$ (M = 385,2743)

Số liệu phổ ^{1}H-NMR (500 MHz) và ^{13}C-NMR (125 MHz) xem ở Bảng 3.2.

- *Hợp chất PH15:* Pogostemin B (hợp chất mới)

Chất bột màu vàng nhạt

Công thức phân tử: $C_{25}H_{36}O_3$

Khối lượng phân tử: 384,5600

Phổ HR-ESI-MS *m/z* 385,2735 $[M+H]^+$

Tính toán lý thuyết cho công thức: $C_{25}H_{37}O_3$ (M = 385,2743)

Số liệu phổ ^{1}H-NMR (500 MHz) và ^{13}C-NMR (125 MHz) xem ở Bảng 3.3.

- *Hợp chất PH4:* Pogostemin C (hợp chất mới)

Chất bột màu vàng nhạt

Công thức phân tử: $C_{26}H_{36}O_3$

Khối lượng phân tử: 396,5710

Phổ HR-ESI-MS *m/z* 397,2737 $[M+H]^+$

Tính toán lý thuyết cho công thức: $C_{26}H_{37}O_3$ (M = 397,2743)

Số liệu phổ ^{1}H-NMR (500 MHz) và ^{13}C-NMR (125 MHz) xem ở Bảng 3.4.

- *Hợp chất PH10:* Pogostemonon B (hợp chất mới)

Chất bột màu trắng

Công thức phân tử: $C_{22}H_{28}O_7$

Khối lượng phân tử: 404,4590

Phổ HR-ESI-MS *m/z* 405,1909 $[M+H]^+$

Tính toán lý thuyết cho công thức: $C_{22}H_{29}O_7$ (M = 405,1913)

Số liệu phổ ^{1}H-NMR (500 MHz) và ^{13}C-NMR (125 MHz) xem ở Bảng 3.5.

- *Hợp chất PH19:* Pogostemonon D (hợp chất mới)

Chất bột màu vàng nhạt

Công thức phân tử: $C_{23}H_{30}O_7$

Khối lượng phân tử: 418,4860

Phổ HR-ESI-MS *m/z* 441,1897 $[M+Na]^+$

Tính toán lý thuyết cho công thức: $C_{23}H_{30}O_7Na$ (M = 441,1889)

Số liệu phổ ^{1}H-NMR (500 MHz) và ^{13}C-NMR (125 MHz) xem ở Bảng 3.6.

- *Hợp chất PH13:* Pogostemonon C (hợp chất mới)

Chất bột màu trắng

Công thức phân tử: $C_{23}H_{28}O_7$

Khối lượng phân tử: 416,4700

Phổ HR-ESI-MS m/z: 451,2838 [M+H]+

Tính toán lý thuyết cho công thức: $C_{23}H_{29}O_7$ (M = 417,1913)

Số liệu phổ ^{1}H-NMR (500 MHz) và ^{13}C-NMR (125 MHz) xem ở Bảng 3.7.

- *Hợp chất PH6:* Pogostemonon A (hợp chất mới)

Chất bột màu vàng

Công thức phân tử: $C_{23}H_{28}O_7$

Khối lượng phân tử: 416,4700

Phổ HR-ESI-MS *m/z* 417,1906 $[M+H]^+$

Tính toán lý thuyết cho công thức: $C_{23}H_{29}O_7$ (M = 417,1913)

Số liệu phổ ^{1}H-NMR (500 MHz) và ^{13}C-NMR (125 MHz) xem ở Bảng 3.8.

- *Hợp chất PH18:* Pogostemon D (hợp chất mới)

Chất bột màu trắng

Công thức phân tử: $C_{23}H_{26}O_7$

Khối lượng phân tử: 414,4540

Phổ HR-ESI-MS *m/z* 415,1753 $[M + H]^+$

Tính toán lý thuyết cho công thức: $C_{23}H_{27}O_7$ (M = 415,1757)

Số liệu phổ ^{1}H-NMR (500 MHz) và ^{13}C-NMR (125 MHz) xem ở Bảng 3.9.

- *Hợp chất PH14:* Pogostem (hợp chất mới)

Chất bột màu trắng

Công thức phân tử: $C_{30}H_{48}O_5$

Khối lượng phân tử: 488,3502

Phổ HR-ESI-MS *m/z* 523,3201 $[M+Cl]^-$

Tính toán lý thuyết cho công thức: $C_{30}H_{48}O_5Cl$ (M = 523,3190)

Số liệu phổ ^{1}H-NMR (500 MHz) và ^{13}C-NMR (125 MHz) xem ở Bảng 3.11.

- *Hợp chất PH5:* Geranyllinalool

Chất dầu không màu

Công thức phân tử: $C_{20}H_{34}O$

Khối lượng phân tử: 290,2610

Số liệu phổ ^{1}H-NMR (500 MHz) và ^{13}C-NMR (125 MHz) xem ở Bảng 3.12.

- *Hợp chất PH17:* Stigmasterol

Chất bột màu trắng

Công thức phân tử: $C_{29}H_{48}O$

Khối lượng phân tử: 412,7020

Số liệu phổ ^{1}H-NMR (500 MHz) và ^{13}C-NMR (125 MHz) xem ở Bảng 3.13.

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

3.3.1. Hoạt tính chống viêm

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

Mẫu thử trong nghiên cứu sàng lọc hoạt tính chống viêm là cao chiết toàn phần MeOH (M) và các cao chiết phân đoạn *n*-hexan (H), dicloromethan (D), ethyl acetat (E), nước (W) thu được từ phương pháp 3.2.2.1 và 3.2.2.2. Trước khi thử tác dụng ức chế sản sinh NO, các cao chiết được đánh giá khả năng gây độc đến sự phát triển của tế bào đại thực bào chuột RAW 264.7 ở các nồng độ thử nghiệm 100 và 20 µg/mL. Bảng 3.14 mô tả tỉ lệ tế bào sống tại các nồng độ thử nghiệm của các cao chiết.

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

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

Tại mức liều 20 µg/mL, tất cả các mẫu cao chiết không ảnh hưởng đến sự phát triển bình thường của đại thực bào chuột, tỉ lệ tế bào sống là tương đối cao (86,86 - 110,57%). Tuy nhiên, ở liều cao 100 µg/mL, các cao chiết D, M và H là tương đối độc, có tỉ lệ tế bào sống sót thấp, trong khoảng từ 31,18 - 49,61%. Trong khi đó, cao chiết ethyl acetat (E) và chứng dương L-NMMA có tỉ lệ tế bào sống sót cao, từ 89,77 - 92,77%.

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

Mẫu nghiên cứu	**IC_{50} ± SD (µg/mL)**
Cao chiết methanol	60,54 ± 2,66
Cao chiết *n*-hexan	–
Cao chiết dicloromethan	28,68 ± 1,49
Cao chiết ethyl acetat	**25,28 ± 1,52**
Cao chiết nước	64,73 ± 1,84
L-NMMA	6,22 ± 0,84

"–": không có hoạt tính

Tiến hành đánh giá hoạt tính chống viêm ức chế sản sinh NO của các cao chiết theo phương pháp đã mô tả tại 2.3.4.2 với dải nồng độ 100; 20; 4 và 0,8 µg/mL. Kết quả thí nghiệm được trình bày tại bảng 3.15 đã cho thấy mẫu cao chiết ethyl acetat và dicloromethan thể hiện hoạt tính tốt với IC_{50} lần lượt là 25,28 ± 1,52 và 28,68 ± 1,49 µg/mL. Trong khi đó, mẫu cao *n*-hexan chưa thể hiện hoạt tính ở các nồng độ nghiên

cứu. Các mẫu còn lại bao gồm cao methanol và cao nước thể hiện mức hoạt tính trung bình với IC_{50} trong khoảng 60,54 - 64,73 µg/mL. Đối chứng dương L-NMMA hoạt động ổn định trong thí nghiệm với IC_{50} là 6,22 ± 0,84 µg/mL. Tuy nhiên, vì cao chiết D, M ảnh hưởng nhiều đến tỉ lệ sống của đại thực bào chuột nên kết quả IC_{50} của cao D và M chỉ mang tính tương đối.

Kết quả tác dụng chống viêm ức chế sản sinh NO cho thấy cao chiết ethyl acetat ít gây độc với tế bào đại thực bào chuột và có khả năng ức chế sản sinh NO tốt nhất trong các mẫu thử. Do đó, cao ethyl acetat được chọn để tiếp tục nghiên cứu thành phần hóa học và độc tính cấp.

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

a. Hoạt tính ức chế sản sinh NO

Các hợp chất phân lập từ phân đoạn cao ethyl acetat được đánh giá tác dụng chống viêm *in vitro*, bao gồm 9 hợp chất tinh khiết là: Pogostemin A-C, Pogostemonon A-D, Pogostemon D và Pogostem. Trước khi thử hoạt tính ức chế sản sinh NO, các hợp chất được đánh giá khả năng gây độc đến sự phát triển của tế bào đại thực bào chuột RAW 264.7 ở các nồng độ thử nghiệm 100 và 20 µg/mL. Bảng 3.16 mô tả tỉ lệ tế bào sống tại các nồng độ thử nghiệm của các hợp chất.

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

Nồng độ (µg/mL)	**% tế bào sống**				
	Pogostemin A	**Pogostemin B**	**Pogostemin C**	**Pogostemon D**	**L-NMMA**
100	21,55	95,4	28,9	37,54	89,77
20	42,94	99,1	71,3	89,48	95,72
	Pogostemonon A	**Pogostemonon B**	**Pogostemonon C**	**Pogostemonon D**	**Pogostem**
100	37,69	105,94	32,98	104,75	40,73
20	94,22	104,16	> 105,57	102,16	> 104,99

Ở liều 100 µg/mL, chỉ các mẫu thử Pogostemin B, Pogostemonon B và Pogostemonon D có tỉ lệ tế bào sống cao trong khoảng là 95,4 - 105,94%, trong khi

các mẫu thử còn lại tỉ lệ tế bào thấp (< 50%). Tuy nhiên, tại mức liều 20 µg/mL, tỉ lệ tế bào sống sót ở tất cả các mẫu thử là tương đối cao (71,34 - 105,57%).

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

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

"–" không có hoạt tính

Các hợp chất tinh khiết có tỉ lệ sống cao tại nồng độ 20 µg/mL được tiếp tuc tiến hành đánh giá hoạt tính chống viêm ức chế sản sinh NO theo phương pháp đã mô tả tại 2.3.4.2 với dải nồng độ 20; 4; 0,8 và 0,16 µg/mL. Kết quả ức chế sản sinh NO của các hợp chất tinh khiết được mô tả tại bảng 3.17 cho thấy nhiều hợp chất thể hiện hoạt tính tốt. Đặc biệt, hợp chất pogostemin C và pogostemon D có khả năng ức chế mạnh với IC_{50} lần lượt là 3,76 ± 0,15và 7,29 ± 0,74 µM, mạnh hơn nhiều so chứng dương L-NMMA ở cùng điều kiện thử nghiệm. Ngoài ra, các mẫu thử khác như Pogostemonon A và Pogostemonon C cũng thể hiện hoạt tính tốt với IC_{50} trong khoảng 26,77 - 28,99 µM. Các hợp chất còn lại cho ức chế sản sinh NO yếu hoặc chưa thể hiện hoạt tính trong điều kiện thử nghiệm này. Đối chứng dương L-NMMA hoạt động ổn định trong thí nghiệm.

b. Khả năng điều hoà các cytokin

Hợp chất Pogostemin C có tác dụng ức chế sản sinh NO tốt nhất được lựa chọn tiếp tục đánh giá khả năng điều hoà trên các cytokin theo phương pháp tại mục 2.3.4.2, kết quả thu được trình bày tại bảng 3.18.

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

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

** Sai khác có ý nghĩa thống kê với P < 0,05*

Từ kết quả trên cho thấy, mẫu Pogostemin C có khả năng kích thích sản sinh IL-10 ở nồng độ 50,5 µM so với đối chứng âm không ủ mẫu nghiên cứu ở mức có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$). Tuy nhiên, ở các nồng độ còn lại mẫu chưa cho thấy khả năng này. Cũng tại nồng độ 50,5 µM, mẫu thử có khả năng ức chế sản sinh TNF-α so với đối chứng không ủ mẫu ở mức có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$). Tuy nhiên, ở các nồng độ còn lại mẫu chưa cho thấy khả năng này. Ngoài ra, mẫu Pogostemin C chưa cho thấy khả năng ức chế sản sinh IL-6 ở các nồng độ thử nghiệm.

3.3.2. Hoạt tính gây độc tế bào ung thư

3.3.2.1. Thử nghiệm gây độc tế bào

Các hợp chất phân lập từ phân đoạn cao ethyl acetat được đánh giá tác dụng gây độc tế bào - phương pháp sử dụng thuốc nhuộm SRB trên các dòng tế bào ung thư gan Hep-G2, ung thư dạy dày AGS, ung thư biểu mô KB, ung thư phổi LU-1 và ung thư ruột kết SW-480 theo mô tả tại mục 2.3.4.3. Kết quả thử nghiệm gây độc tế bào của các hợp chất tinh khiết được mô tả tại bảng 3.19.

Mẫu Pogostemin A thể hiện mức hoạt tính trung bình trên 5 dòng tế bào thực nghiệm với IC_{50} trong khoảng 18,75 - 33,18 µM. Mẫu Pogostemon D chưa thể hiện hoạt tính ở các nồng độ nghiên cứu. Các mẫu còn lại thể hiện mức hoạt tính yếu với IC_{50} trong khoảng 77,28 - 219,87 µM trên các dòng tế bào khác nhau. Đối chứng dương Ellipticin hoạt động ổn định trong thí nghiệm.

Bảng 3.19. *Kết quả gây độc tế bào ung thư của các hợp chất*

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

"–": không có hoạt tính

3.3.2.2. Hoạt tính cảm ứng apoptosis

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

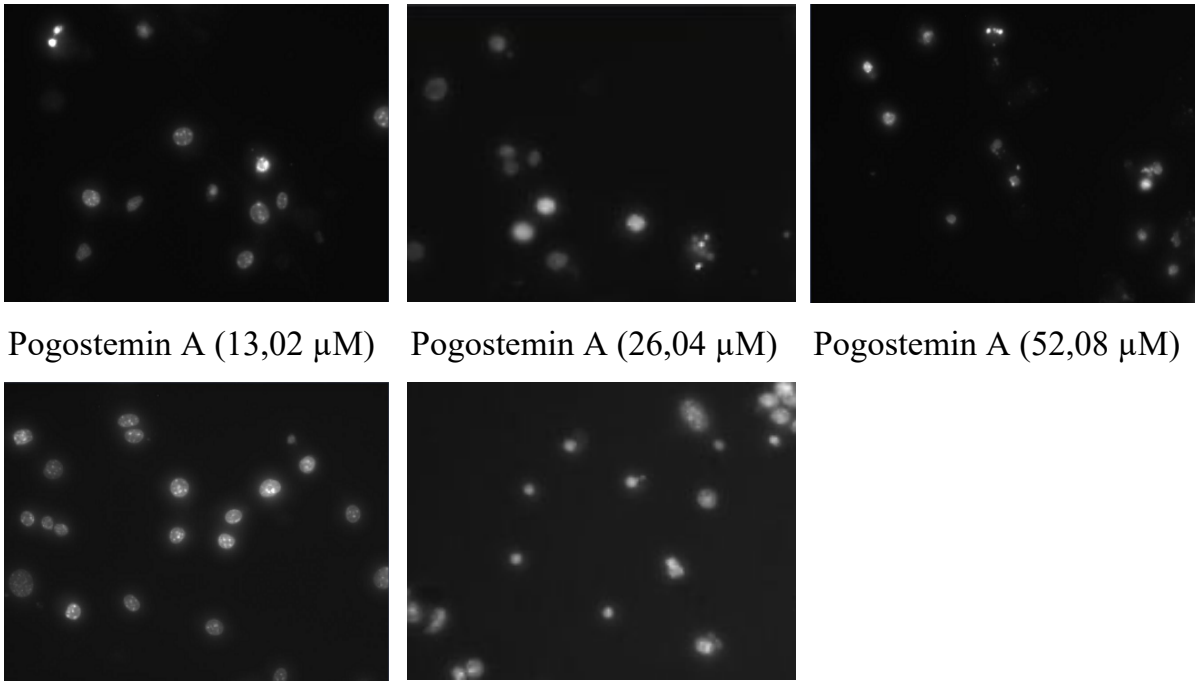
a. Phương pháp nhuộm nhân tế bào với Hoechst 33342

Kết quả sơ bộ về hoạt tính cảm ứng apoptosis trên dòng tế bào ung thư phổi người LU-1 của Pogostemin A thông qua phương pháp nhuộm Hoechst 33342 được trình bày tại bảng 3.20.

Bảng 3.20. *Kết quả nhuộm tế bào bằng Hoechst 33342*

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

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



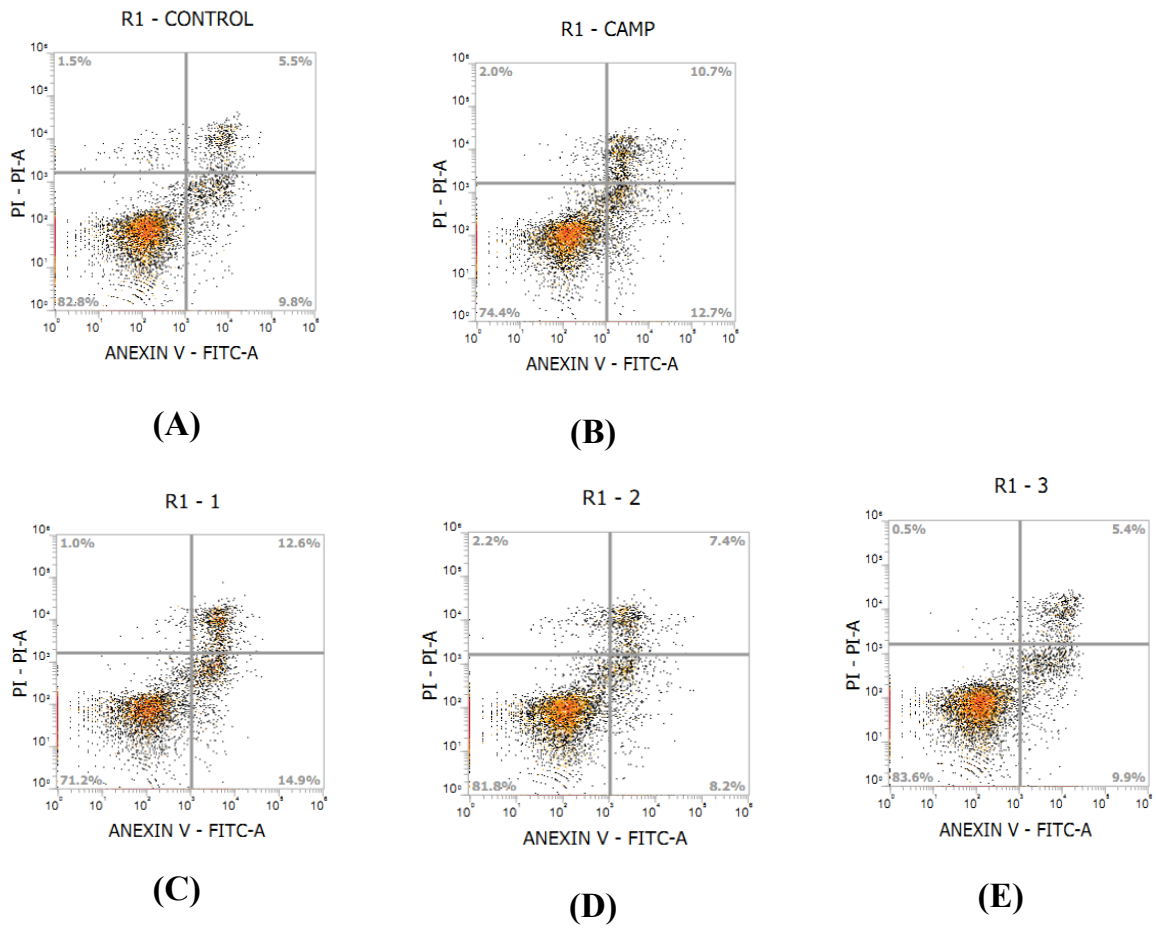
Hình 3.24. *Hình ảnh tế bào dưới tác động của Pogostemin A được nhuộm Hoechst 33342 ở các nồng độ khác nhau*

b. Kĩ thuật đếm tế bào dòng chảy

Tỉ lệ tế bào apoptosis dưới tác động của Pogostemin A thông qua kĩ thuật đếm tế bào dòng chảy được thể hiện trong hình 3.25 và bảng 3.21.

Bảng 3.21. *Tỉ lệ tế bào apoptosis dưới tác động của Pogostemin A*

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



Hình 3.25. *Hình ảnh tác động của Pogostemin A đến quá trình apoptosis tế bào được phân tích bằng hệ thống đếm tế bào dòng chảy*

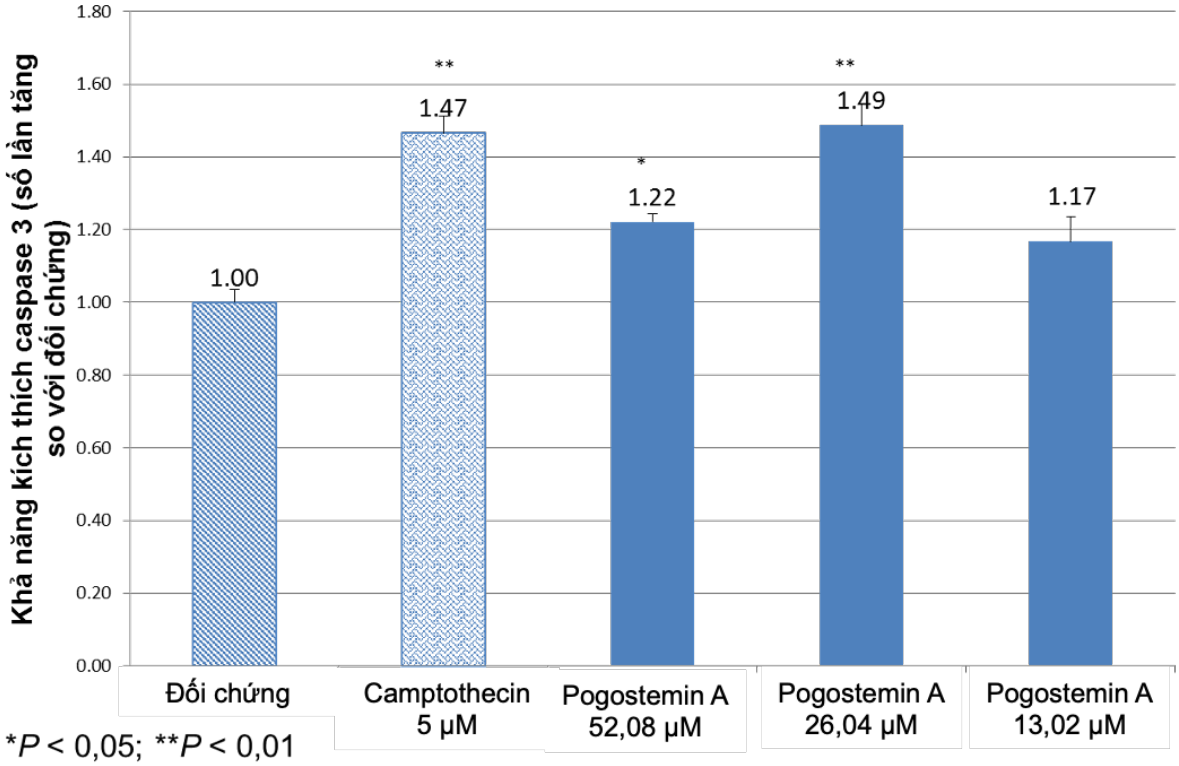
*Ghi chú: (**A**) Tế bào ủ với 0,5% DMSO, (**B**) Tế bào ủ với 5 µM Camptothecin, (**C-D-E**) Tế bào ủ với Pogostemin A với nồng độ 52,08; 26,04 và 13,02 µM trong 24h. Các mẫu thử được phân tích bằng hệ thống đếm tế bào dòng chảy. Trục x thể hiện mức độ nhuộm mầu FITC-Annexin V, trục y thể hiện mức độ nhuộm mầu PI theo đơn vị Log.*

Kết quả bảng 3.21 cho thấy mẫu Pogostemin A ở nồng độ 52,08 µM có tỉ lệ tế bào apoptosis sớm và tỉ lệ tế bào apoptosis muộn đều tăng lên so với đối chứng. Ở mẫu đối chứng, tỉ lệ % tế bào chết do apoptosis sớm chỉ bằng 9,8% tuy nhiên quần thể tế bào này tăng lên đến 14,9% dưới tác động của Pogostemin A với nồng độ 52,08 µM. Tỉ lệ tế bào chết do apoptosis muộn tăng lên đến 12,6% dưới tác động của Pogostemin A với nồng độ 52,08 µM so với đối chứng âm 5,5%. Ở các nồng độ thấp hơn (26,04 và 13,02 µM) sự thay đổi về số lượng tế bào apoptosis không rõ ràng. Như

vậy, có thể thấy mẫu nghiên cứu đã thể hiện khả năng gây chết tế bào thông qua quá trình apoptosis.

c. Khả năng cảm ứng sản sinh caspase-3

Khả năng cảm ứng sản sinh caspase-3 của Pogostemin A được thể hiện ở hình 3.26. Kết quả cho thấy, Pogostemin A có khả năng kích thích tế bào LU-1 sản sinh caspase-3, điều này thể hiện rõ ở nồng độ 52,08 và 26,04 µM với số lần kích thích tăng 1,22 và 1,49 lần so với đối chứng âm ($P < 0.05$).



Hình 3.26. *Khả năng cảm ứng sản sinh caspase-3 của Pogostemin A trên dòng tế bào ung thư phổi LU-1*

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

3.3.3. Độc tính cấp

Mẫu thử là cao chiết phân đoạn ethyl acetat (độ ẩm 7,5%) có tác dụng chống viêm *in vitro* tốt nhất được lựa chọn đánh giá độc tính cấp. Tiến hành pha mẫu thử như mô tả tại mục 2.3.4.4.

Kết quả thực hiện dò liều trong thử nghiệm độc tính cấp với việc sử dụng từng cặp 2 chuột cho thấy liều 9,5 g/kg gây chết 1 trong 2 chuột, đây là liều cơ sở để tiến hành thêm 5 liều nhằm xác định liều gây chết 50% động vật thực nghiệm (LD_{50}). Tiến hành nghiên cứu trên 5 lô chuột thí nghiệm, biểu hiện chuột trên các lô như sau:

- Lô chuột 1: chuột được cho uống với liều tương đương 6,4 g/kg, uống một lần duy nhất. Chuột không có biểu hiện bất thường nào sau khi uống mẫu, sau 72 giờ theo dõi không có chuột nào chết, tất cả chuột của lô thí nghiệm đều sống, khỏe mạnh.

- Lô chuột 2: chuột được cho uống với liều 8,0 g/kg cân nặng chuột, uống một lần duy nhất. Sau khi đa số chuột vẫn hoạt động bình thường, không thấy có biểu hiện khác lạ về hành vi cũng như ăn uống, nhưng sau khoảng 1 giờ thì có 3 chuột có biểu hiện ít vận động và chết sau khoảng 3 giờ. Mổ bụng chuột chết không phát hiện được sự bất thường về tim, gan, thận. Sau 72 giờ theo dõi, 7 chuột của lô thí nghiệm sống sót đều sống, khỏe mạnh.

- Lô chuột 3: chuột được cho uống với liều tương đương 9,5 g/kg cân nặng cơ thể chuột. Sau khi uống khoảng 1-2 giờ, một số chuột có biểu hiện ít vận động, có 7 chuột chết sau khi uống khoảng 2-5 giờ. Mổ bụng chuột chết không phát hiện được sự bất thường về tim, gan, thận. Sau 72 giờ theo dõi, 3 chuột của lô thí nghiệm sống sót đều sống, khỏe mạnh.

- Lô chuột 4: chuột được cho uống với liều tương đương 11,0 g/kg cân nặng cơ thể chuột. Sau uống khoảng 1 giờ, một số chuột có biểu hiện ít vận động, có 7 chuột chết sau khoảng 2-5 giờ uống. Mổ bụng chuột chết không phát hiện được sự bất thường về tim, gan, thận. Sau 72 giờ theo dõi, 3 chuột của lô thí nghiệm sống sót đều khỏe mạnh.

- Lô chuột 5: chuột được cho uống với liều tương đương 12,5 g/kg cân nặng cơ thể chuột. Sau khi uống nhiều chuột có biểu hiện ít vận động, không ăn uống, 10 chuột chết rải rác trong vòng 1-7 giờ sau. Mổ bụng chuột chết không phát hiện được sự bất

thường về tim, gan, thận. Liều uống, số chuột sống/chết của cao chiết được trình bày trong bảng 3.22.

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

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

Từ bảng 3.22 cho thấy LD_0 của cao chiết là 6,4 g/kg, liều LD_{100} là 12,5 g/kg. Sử dụng phương pháp Behrens-Karber xác định được liều LD_{50} của cao chiết ethyl acetat loài Tu hùng tai đường uống trên chuột nhắt trắng là 9,18 g/kg.

Phần 4. BÀN LUẬN

4.1. Về thực vật học

Trong số các họ thực vật bậc cao, họ Lamiaceae thu hút sự quan tâm của nhiều nhà khoa học trên thế giới vì tiềm năng to lớn của chúng trong nhiều lĩnh vực đời sống. Với khoảng hơn 200 chi và gần 8000 loài, họ Lamiaceae là họ thực vật lớn được biết đến như nguồn tinh dầu quan trọng phục vụ công nghiệp hương liệu: nước hoa, mỹ phẩm, thực phẩm. Nhiều loài thuộc họ Lamiaceae còn được sử dụng trong Y học cổ truyền để chữa các bệnh khác nhau [2].

Từ thế kỷ 18, họ Lamiaceae đã được khá nhiều tác giả nghiên cứu. Năm 1753, Linnaeus đặt tên cho 33 chi và 223 loài của họ này và xếp chúng vào 2 phân lớp, bao gồm: phân lớp 2 nhị (Diadria) và 4 nhị với 2 nhị dài và 2 nhị ngắn (Didynamia). Sau đó, một số tác giả khác như Adanson (1763) và Moench (1794) đã bổ sung thêm các taxon và xếp chúng theo cách xếp của Linnaeus. Tuy nhiên, đến năm 1789, chính thức được coi là một taxon riêng dưới tên gọi Labiatae Juss. Về sau, tác giả Lindley đã đặt tên khác cho họ này là Lamiaceae Lindl. (lấy từ tên chi *Lamium*). Theo luật Danh pháp hiện hành, họ này có thể dùng cả 2 tên Labiatae và Lamiaceae [1], [25].

Năm 1936, khi nghiên cứu họ Lamiaceae ở khu vực Đông Dương, Doãn Khắc Thịnh đã dựa trên hệ thống phân loại của Bentham (1876) và xếp họ Lamiaceae thành 7 tông, tuy nhiên cách phân chia này lại ít được sử dụng. Sau này, Vũ Xuân Phương đã dựa trên hệ thống của Melchior (1964) để sắp xếp các taxon. Theo tác giả, ở Việt Nam, họ Lamiaceae được biết đến với tên Hoa môi hay còn gọi là Bạc hà, gồm 5 phân họ với 11 tông và 14 phân tông [1]. Hệ thống này được xây dựng trên cơ sở nghiên cứu một vùng lãnh thổ rộng lớn nên đánh giá được mối quan hệ chủng loại của các taxon và có nhiều ưu điểm [1], [8].

Họ Lamiaceae với số loài đa dạng và phong phú phân bố khắp thế giới, nhưng tập trung chủ yếu ở vùng Địa Trung Hải. Ở Việt Nam, họ này có trên 40 chi, gần 150 loài. Trong đó, có 23 loài thường dùng làm thuốc, thuộc các chi như *Elsholtzia*, *Leonurus*, *Perilla*, *Pogostemon* v.v. [1], [25] và nhiều loài được dùng làm rau ăn, gia vị hay nước uống.

Họ Lamiaceae là một trong những họ dễ nhận biết ngoài thiên nhiên nhờ một số đặc điểm chính như cây thường có tinh dầu thơm, thân vuông, lá mọc đối (xếp chéo chữ thập), không có lá kèm, bao hoa thường có cấu tạo 2 môi, bầu xẻ sâu đến giữa hay đến gốc và quả bế tư. Nhận biết họ Lamiaceae thì dễ, song để phân biệt các taxon trong họ thì khá khó khăn vì chúng rất đa dạng. Tính đa dạng được thể hiện ngay trong cơ quan dinh dưỡng và đặc biệt ở cơ quan sinh sản [1], [25].

Chi *Pogostemon* Desf. là một chi lớn trong họ Lamiaceae và có thể phân biệt với các loài khác trong họ với đặc điểm của nhị hoa mang lông đơn sắc [12], [13], [14], [15]. Mối quan hệ giữa các loài trong chi *Pogostemon* Desf. và các loài thuộc chi *Dysophylla* Blume đã được tranh luận nhiều. Ban đầu, các loài trong chi *Pogostemon* thường bao gồm các loại thân thảo sống trên mặt đất với lá mọc đối, phiến lá rộng, cuống lá và thân cây đặc; trong khi các loài thuộc chi *Dysophylla* sống chủ yếu ở môi trường dưới nước và đầm lầy, lá mọc đối hoặc mọc vòng, không có cuống lá và thân cây rỗng [12], [16], [17], [18]. Tuy nhiên, một số loài trong chi *Dysophylla* bao gồm cả loài nghiên cứu Tu hùng tai là *D. auricularia* có lá mọc đối và được coi là đại diện trung gian giữa hai chi này [12], [19]. Một số tác giả [15], [18], [19], [20], [21] cho rằng những loài có lá mọc đối ở *Dysophylla* nên xếp sang chi *Pogostemon* và chi *Dysophylla* chỉ bao gồm những loài có lá mọc vòng. Đặc biệt, các nghiên cứu sinh học phân tử gần đây đã cho thấy các loài trong chi *Dysophylla* cũng thuộc chi *Pogostemon* [22], [23]. Do đó, loài Tu hùng tai ngoài danh pháp khoa học chính thống *Pogostemon auricularius* còn thường được biết đến với tên *Dysophylla auricularia*.

Trên thế giới đã được ghi nhận có khoảng 96 loài thuộc chi *Pogostemon* Desf., phân bố chủ yếu ở khu vực nhiệt đới và cận nhiệt đới [107]. Ở Việt Nam, chi này có khoảng 17 loài, chiếm khoảng 18% tổng số loài và chưa thấy công bố về loài đặc hữu.

Ngoài ra, tác giả Vũ Xuân Phương (2000) cũng đã xây dựng bộ khóa phân loại các loài thuộc chi này, bằng cách sử dụng các đặc điểm phân loại chính của lá và hoa [149]. Trên thực tế, quá trình giám định tên khoa học của loài nghiên cứu chủ yếu dựa vào tham khảo thông tin trong các tài liệu của Võ Văn Chi (2000) [7], Phạm Hoàng Hộ (2003) [26], thực vật chí Trung Quốc (1999) [25].

Mô tả về thực vật cho thấy hầu hết các đặc điểm hình thái của loài nghiên cứu phù hợp với các tài liệu đã công bố. Ngoài ra, cây Tu hùng tai có một số đặc điểm đặc trưng về hình thái có thể sử dụng để nhận biết so với các loài khác trong cùng chi *Pogostemon* Desf. như cuống lá phủ nhiều lông, phiến lá hình trứng cả hai mặt đều phủ lông dài, gốc lá tròn hay tù, đôi khi hình nêm, gân bên 5-7 cặp, nổi rõ ở mặt dưới, cụm hoa bông ở đỉnh cành, lá bắc hình trứng có lông, đài hình chuông, trên chia 5 thù hình tam giác, mép có lông. Tràng hoa màu trắng hay tím nhạt, nhị 4, đính ở ống tràng, phần dưới phủ lông dài, phần trên nhẵn, bầu nhẵn, vòi nhụy nhẵn.

Việc định danh khoa học cũng như các mô tả chi tiết về đặc điểm hình thái nhằm đảm bảo tính chính xác về mặt khoa học - đúng đối tượng nghiên cứu, từ đó làm cơ sở cho những nghiên cứu tiếp theo về loài này. Kết quả nghiên cứu đã giám định được tên khoa học của mẫu Tu hùng tai là *Pogostemon auricularius* (L.) Hassk., thuộc chi *Pogostemon* Desf., họ Lamiaceae.

4.2. Về thành phần hóa học

Theo tổng quan tài liệu, *Pogostemon* Desf. là một chi lớn trong họ Lamiaceae. Tuy nhiên, cho đến nay số loài được nghiên cứu về mặt hóa học cũng như hoạt tính sinh học còn ít. Tính đến nay, có khoảng 10 loài, bao gồm *P. heyneanus*, *P. cablin, P. hirsutus, P. benghalensis, P. plectranthoides*, *P. parviflorus*, *P. auricularius* và *P. purpurascens* đã được nghiên cứu về thành phần hóa học. Trong các loài này, *P. cablin* được nghiên cứu nhiều nhất.

Các nhóm chất chính tìm thấy từ chi *Pogostemon* Desf. là flavonoid, terpenoid, steroid. Tinh dầu của các loài trong chi *Pogostemon* Desf. chứa thành phần khá phong phú, đa dạng, được biết đến với nhiều công dụng trong hương liệu và mỹ phẩm [43], [44]. Đó cũng là lí do mà tinh dầu được quan tâm nghiên cứu từ rất sớm. Tuy nhiên, trong những năm gần đây, càng ngày càng có nhiều công bố về các hợp chất khác được tìm thấy trong chi này. Quá trình nghiên cứu phân lập các loài thuộc chi *Pogostemon* Desf. đã thu được hơn 90 hợp chất. Các hợp chất tìm thấy chủ yếu thuộc nhóm flavonoid, terpenoid, steroid. Đối tượng được nghiên cứu nhiều nhất là loài *P. cablin* với khoảng 77 hợp chất được phân lập. Đáng lưu ý, có nhiều hợp chất mới tại thời điểm công bố. Điều này cho thấy chi *Pogostemon* Desf. có triển vọng cung cấp

các cấu trúc mới phục vụ cho quá trình nghiên cứu tìm kiếm các hợp chất có hoạt tính sinh học. Riêng với loài nghiên cứu *P. auricularius*, số lượng các công bố trong và ngoài nước trước khi luận án được thực hiện về thành phần hóa học còn rất ít, chỉ với 4 hợp chất được phân lập.

Trên thế giới đã có một số nghiên cứu về thành phần hóa học của cây Tu hùng tai, tuy nhiên tại Việt Nam cho tới nay, chỉ có 2 nghiên cứu trên thành phần tinh dầu của loài này. Do đó, Tu hùng tai là dược liệu tiềm năng, cần được nghiên cứu sâu và đầy đủ về thành phần hóa học cũng như tác dụng sinh học nhằm tạo cơ sở cho việc khai thác và sử dụng nguồn dược liệu sẵn có trong nước. Luận án là công trình nghiên cứu đầu tiên về cây Tu hùng tai tại Việt Nam.

Hiện nay, trong lĩnh vực nghiên cứu hóa thực vật, phương pháp nghiên cứu phân lập hợp chất tự nhiên theo định hướng tác dụng sinh học được sử dụng khá phổ biến. Phương pháp này có ưu điểm là tìm kiếm các hợp chất có hoạt tính với xác suất thành công cao hơn đồng thời tiết kiệm được chi phí và thời gian nghiên cứu. Thực hiện sàng lọc các cao chiết phân đoạn cây Tu hùng tai với hoạt tính chống viêm *in vitro* - ức chế sản sinh NO, phân đoạn ethyl acetat cho hoạt tính tốt nhất được lựa chọn phân lập các hợp chất tinh khiết.

4.2.1. Về kết quả định tính

Kết quả định tính cho thấy thành phần hóa học các nhóm chất có trong dịch chiết methanol của loài Tu hùng tai là alcaloid, flavonoid, glycosid tim, saponin, acid hữu cơ, steroid, tanin, đường khử và chất béo. Các nhóm hợp chất được tìm thấy phù hợp với công bố trước đây về thành phần hóa học của một số loài thuộc chi *Pogostemon* Desf. nói chung cũng như loài nghiên cứu nói riêng [41].

4.2.2. Về kết quả chiết xuất, phân lập và xác định cấu trúc các hợp chất

Phần trên mặt đất của cây Tu hùng tai sau khi thu hái được chọn lọc, loại bỏ các phần sâu bệnh, nấm mốc, vàng héo, úa dập cũng như các loại thực vật ký sinh khác. Sau đó, rửa sạch với nước, để ráo, làm khô tự nhiên ở nơi thoáng mát. Tiến hành phơi, sấy khô ở 50-60°C. Việc phơi, sấy khô dược liệu nhằm mục đích để bảo quản dược liệu khỏi bị nhiễm nấm mốc, vi khuẩn, bị tác động bởi enzym và tránh các biến đổi hóa học có thể xảy ra như phản ứng thủy phân, oxy hóa, đồng phân hóa, trùng hợp… góp

phần đảm bảo chất lượng của dược liệu trong quá trình bảo quản. Khi phơi, sấy phải thường xuyên xới, đảo để toàn bộ lượng dược liệu được khô đều, không nên chất đống, dồn nén lên nhau vì có thể làm phát sinh nấm mốc.

Dược liệu khô được chia nhỏ bằng dao cầu và máy xay nghiền thành bột thô. Quá trình này làm vỡ màng tế bào thực vật, đồng thời làm tăng diện tích tiếp xúc giữa dung môi và dược liệu, giúp cho chất tan dễ thấm và khuếch tán vào dung môi, do đó chiết được lượng tối đa các hoạt chất. Khi xay dược liệu cần chú ý xay đến kích thước phù hợp, không quá mịn hay quá thô, đảm bảo khả năng và hiệu suất chiết. Nghiền mịn quá sẽ làm tăng các tạp chất trong quá trình chiết hoặc khó khăn cho quá trình lọc sau khi chiết. Nếu kích thước dược liệu quá to, diện tích tiếp xúc giữa dung môi và dược liệu nhỏ, hiệu quả chiết xuất sẽ giảm. Bột thô dược liệu được sử dụng để tiến hành chiết xuất, phân lập các hợp chất.

Bột dược liệu thô được chiết xuất bằng phương pháp ngâm trong dung môi thích hợp ở nhiệt độ phòng. Ưu điểm của phương pháp ngâm này là thiết bị đơn giản, không tốn kém năng lượng, dễ thực hiện, khá an toàn và phù hợp cho quá trình chiết xuất ban đầu với khối lượng dược liệu lớn. Việc thực hiện chiết xuất ở nhiệt độ phòng cũng có thuận lợi là ít làm biến đổi hoạt chất trong cây. Tuy nhiên, phương pháp này có nhược điểm là tốn khá nhiều thời gian, cần sử dụng một lượng dung môi lớn và một số hoạt chất không được chiết xuất hết do khả năng hòa tan kém ở nhiệt độ phòng. Trong quá trình ngâm, thỉnh thoảng có khuấy trộn để làm tăng tốc độ và hiệu suất của quá trình chiết.

Việc lựa chọn dung môi sử dụng chiết xuất đóng vai trò quan trọng, quyết định đến hiệu suất chiết. Trong nghiên cứu này, dung môi được sử dụng là MeOH với những ưu điểm như: dễ thấm qua màng tế bào thực vật, khả năng chiết được các hợp chất có độ phân cực mạnh, vừa và yếu. Ngoài ra, MeOH có khả năng bay hơi tốt do đó quá trình loại dung môi để thu lấy cao toàn phần được tiến hành nhanh chóng. Thực tế, quá trình chiết xuất thực hiện vào giai đoạn tháng 5-6, MeOH dễ bay hơi nên lượng dung môi được sử dụng cho mỗi đợt ngâm chiết là tương đối khá lớn.

Các hợp chất tự nhiên có trong cây khá đa dạng và có độ phân cực khác nhau. Do dung môi MeOH có khả năng chiết được cả các hợp chất có độ phân cực mạnh,

vừa và yếu nên cao MeOH toàn phần thu được sẽ có thành phần rất phức tạp. Khi đó, kĩ thuật chiết phân bố lỏng - lỏng lần lượt với các dung môi có độ phân cực tăng dần *n*-hexan, dicloromethan, ethyl acetat được áp dụng để phân chia sơ bộ cao chiết toàn phần thành những phân đoạn có tính phân cực khác nhau, giúp cho quá trình phân lập dễ dàng hơn. Quá trình chiết cao phân đoạn được thực hiện ở nhiệt độ phòng. Sự hình thành nhũ tương xảy ra trong quá trình chiết phân bố được xử lý bằng một số phương pháp như: dùng đũa thuỷ tinh khuấy nhẹ vào thành bình chỗ tiếp xúc giữa hai pha dung môi, thay đổi tỉ lệ hai pha dung môi bằng cách thêm pha hữu cơ, trong một số trường hợp cần phải để yên qua đêm để hai pha dung môi phân lớp.

Cao chiết toàn phần và các cao phân đoạn được tiến hành sàng lọc hoạt tính chống viêm ức chế sản sinh NO. Kết quả cho thấy cao chiết ethyl acetat cho tác dụng ức chế tốt nhất và khá an toàn với đại thực bào chuột. Do đó, cao chiết ethyl acetat được tiến hành phân lập các hợp chất theo định hướng tác dụng sinh học chống viêm.

Quá trình phân lập hợp từ phân đoạn ethyl acetat của cây Tu hùng tai được thực hiện qua nhiều giai đoạn, sử dụng các phương pháp sắc ký cột pha thường, sắc ký cột pha đảo và sắc ký lọc gel Sephadex LH-20 được phối hợp một cách linh hoạt. Các phân đoạn trước khi khai triển trên cột sắc ký đều được khảo sát bằng SKLM pha thường và/hoặc pha đảo với các hệ dung môi khác nhau. Dựa vào khả năng phân tách và độ đậm/nhạt của các vết chất trên sắc ký đồ mà lựa chọn những phân đoạn và hệ dung môi có khả năng tách tốt nhất để tiến hành sắc ký cột. Việc lựa chọn hệ dung môi rửa giải sẽ quyết định đến hiệu suất, chất lượng của quá trình phân lập bằng sắc ký cột sau này. Việc lựa chọn dung môi trên SKLM chủ yếu dựa vào thực nghiệm, chưa có một nguyên tắc cụ thể nào. Trong một số trường hợp, có thể tham khảo công bố khoa học nghiên cứu hoá thực vật của các loài trong chi *Pogostemon* để lựa chọn hệ dung môi pha động, giúp tiết kiệm thời gian khảo sát SKLM. Thông thường, sau khi tìm được hệ dung môi có khả năng tách tốt mẫu phân tích trên SKLM, cần thay đổi tỷ lệ các thành phần của hệ dung môi theo hướng làm giảm độ phân cực đối với sắc ký cột pha thường hoặc tăng độ phân cực đối với cột sắc ký pha đảo, nhằm giúp quá trình phân tách trên SKC tốt hơn. Ngoài ra, đối với một số phân đoạn tiềm năng với vết chất

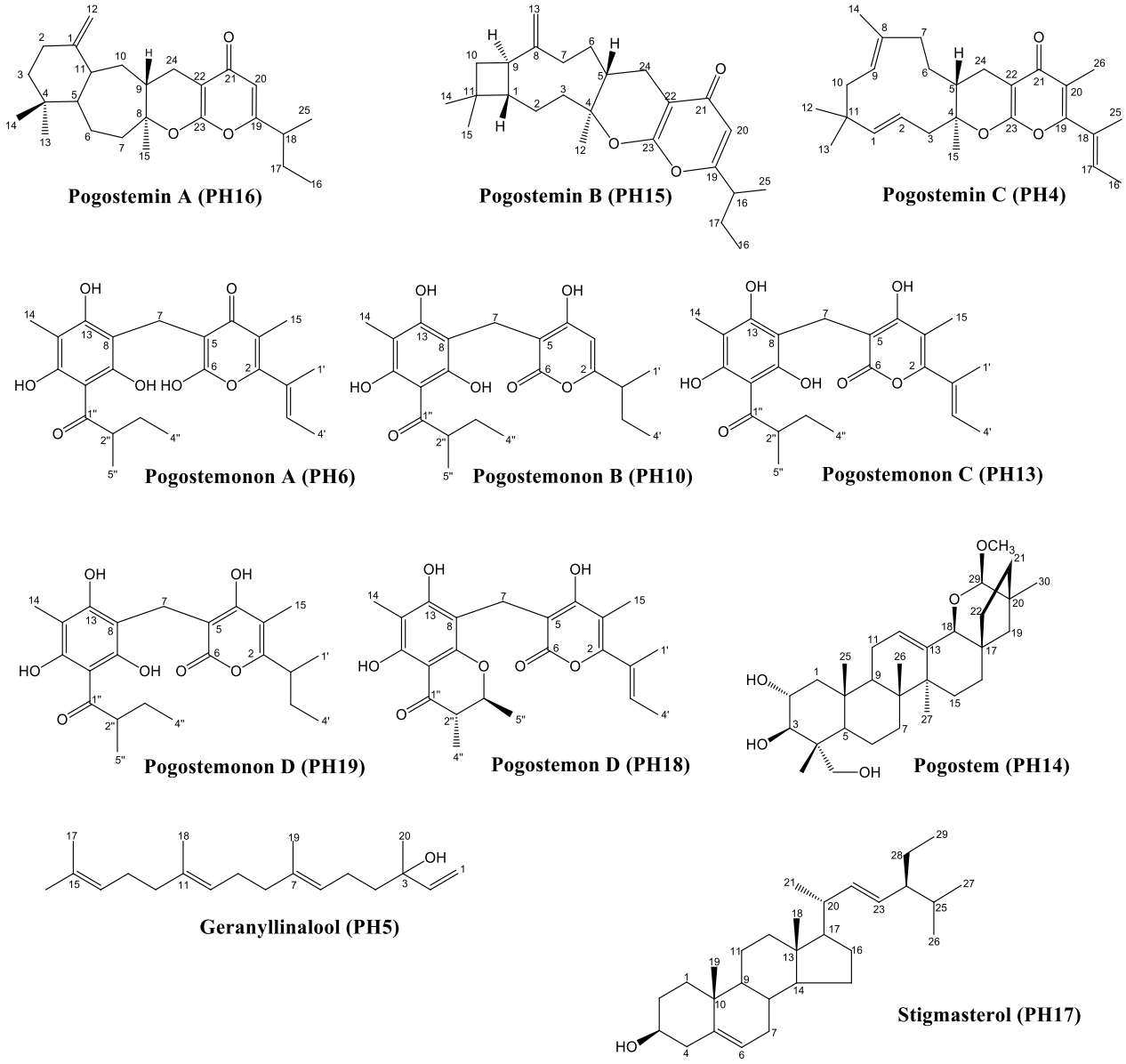
chính khá rõ nhưng khối lượng cao tương đối thấp, tiến hành phân lập và tinh chế bằng hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao điều chế.

Sắc ký cột được sử dụng lâu đời trong việc nghiên cứu các hợp chất tự nhiên. Ngoài việc lựa chọn hệ dung môi thích hợp, tỉ lệ pha tĩnh và khối lượng cao phân đoạn cũng như việc lựa chọn cột cũng ảnh hưởng đến hiệu quả phân tách. Nếu phân đoạn có khối lượng nhỏ được triển khai trên cột sắc ký quá lớn sẽ làm mất mẫu, lãng phí lượng silica gel cũng như dung môi khai triển và mất nhiều thời gian. Còn phân đoạn có khối lượng lớn khi triển khai trên cột quá nhỏ thì quá trình phân lập sẽ diễn ra không hiệu quả, cột bị quá tải và gây hiện tượng dồn chất. Trong nghiên cứu này, tỉ lệ silica gel pha tĩnh và mẫu thường nằm trong khoảng 60:1 - 80:1 nếu phân tách thô và 500:1 - 800:1 g trong trường hợp phân tách các phân đoạn tương đối tinh sạch.

Mẫu phân tích thường được hòa tan trong một lượng nhỏ dung môi pha động khởi đầu cho sắc ký cột sao cho dung dịch mẫu càng đậm đặc càng tốt và được đưa lên đầu cột. Trên thực tế, một số mẫu phân tích không thể hòa tan trong dung môi pha động khởi đầu đã được nạp vào cột dưới dạng bột khô tơi. Trong kỹ thuật này, mẫu được hòa tan trong một lượng nhỏ dung môi thích hợp mà nó hòa tan tốt, sau đó thêm vào dung dịch này lượng silica gel khoảng gấp 10 lần khối lượng mẫu phân tích. Hỗn hợp này được loại dung môi bằng máy cô quay chân không và thu lấy bột silica gel đã được tẩm đều mẫu phân tích. Sau đó bột silica gel khô tơi này được nạp lên đầu cột và tiến hành triển khai sắc ký cột.

Các hợp chất phân lập được càng tinh khiết việc xác định cấu trúc càng chính xác. Có thể kiểm tra độ tinh khiết của hợp chất bằng sắc ký lớp mỏng pha thường hay pha đảo với các hệ dung môi khác nhau.

Như vậy, từ phần trên mặt đất của cây Tu hùng tai, bằng các phương pháp sắc ký, luận án đã phân lập được 11 hợp chất sạch ký hiệu là PH4, PH5, PH6, PH10, PH13, PH14, PH15, PH16, PH17, PH18 và PH19. Dựa vào phổ khối lượng phân giải cao (HR-ESI-MS), phổ lưỡng sắc tròn (CD), phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) và đối chiếu với các tài liệu tham khảo, đã xác định được cấu trúc của 11 hợp chất và được trình bày ở hình 4.1.



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

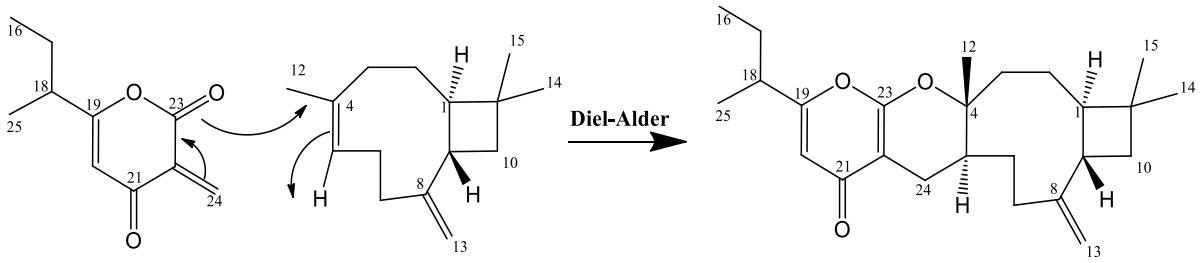
Đáng chú ý, trong 11 hợp chất phân lập được có 3 hợp chất thuộc nhóm meroterpenoid (Pogostemin A-C), 5 hợp chất là dẫn xuất của phloroglucinol (Pogostemonon A-D, Pogostemon D), 1 hợp chất triterpen (Pogostem), 1 hợp chất diterpen (geranyllinalool) và 1 hợp chất steroid (stigmasterol). Trong 11 hợp chất này, có 9 hợp chất mới, lần đầu tiên được tìm thấy từ tự nhiên, hai nhóm chất meroterpenoid và dẫn xuất của pyron phloroglucinol lần đầu được tìm thấy ở chi *Pogostemon* Desf.

4.2.2.1. Về các hợp chất meroterpenoid

Meroterpenoid là chất chuyển hóa thứ cấp tự nhiên với cấu trúc bắt nguồn từ terpenoid và polyketid. Chúng đã được phân lập từ nấm, sinh vật biển, động vật và thực vật với cấu trúc vô cùng đa dạng. Việc phân loại meroterpenoid chủ yếu dựa trên nguồn gốc sinh tổng hợp của chúng và có thể chia thành 2 nhóm chính: polyketid-terpenoid và non-polyketid-terpenoid. Mối quan tâm của các nhà nghiên cứu về meroterpenoid ngày càng tăng với nhiều báo cáo về cấu trúc của các hợp chất meroterpenoid mới và hoạt tính sinh học của chúng. Các hợp chất meroterpenoid đã được chứng minh có nhiều hoạt tính sinh học tiềm năng như chống viêm, kháng ung thư, kháng khuẩn kháng nấm, kháng ký sinh trùng sốt rét, ức chế enzym acetylcholinesterase v.v. [150], [151], [152], [153].

Quá trình phân lập và xác định cấu trúc đã thu được 3 hợp chất meroterpenoid mới, chưa được công bố và đặt tên là Pogostemin A-C. Trong cấu trúc của các hợp chất meroterpenoid này có sự xuất hiện của khung γ-pyron và khung sesquiterpen. Cụ thể, trong cấu trúc hợp chất Pogostemin A (PH16) có mặt khung ximonican là một khung sesquiterpen hiếm gặp trong tự nhiên. Cho đến nay, mới chỉ phân lập được 1 hợp chất có khung cấu trúc này từ loài *Ximenia americana* [131]. Hợp chất Pogostemin B (PH15) chứa khung caryophyllen. Caryophyllen là một thành phần sesquiterpen đã được tìm thấy trong tinh dầu Tu hùng tai [28] và một số loài thuộc chi *Pogostemon* Desf. như *P. cablin* [154] hay *P. patchouli* [155]. Xét về mặt cấu trúc, hợp chất Pogostemin C (PH4) có chứa khung α-humulen là sesquiterpen cũng đã được tìm thấy trong thành phần tinh dầu của loài Tu hùng tai [42] và nhiều loài thuộc chi *Pogostemon* Desf. như *P. plectranthoides* [38] và *P. benghalensis* [30].

Có thể thấy, cả 3 hợp chất meroterpenoid đã phân lập đều chứa khung sesquiterpen tồn tại trong tự nhiên. Từ đó cho phép dự đoán quá trình sinh tổng hợp giữa hợp phần chứa khung γ-pyron và thành phần sesquiterpen trong tinh dầu của loài Tu hùng tai qua phản ứng Diel-Alder (Hình 4.2). Trên thực tế, đã có nhiều công bố về sinh tổng hợp của nhóm chất meroterpenoid qua phản ứng hóa học này [156].



Caryophylladien

Hình 4.2. *Phản ứng Diel-Alder, gợi ý sự tạo thành của hợp chất meroterpenoid*

4.2.2.2. Về các dẫn xuất phloroglucinol

Dẫn xuất phloroglucinol thực chất là các hợp chất phenolic và được tìm thấy từ rất nhiều nguồn trong tự nhiên nhưng chủ yếu từ các loài thuộc chi *Hypericum* với hơn 500 hợp chất phân lập được. Các dẫn xuất phloroglucinol được biết đến với nhiều hoạt tính sinh học nổi trội như kháng virus, kháng ung thư, kháng khuẩn, đặc biệt là hoạt tính chống viêm v.v. [151], [157], [158]. Mặc dù là nhóm hợp chất phổ biến và mang nhiều hoạt tính sinh học, nhưng các thông tin về liên quan cấu trúc và tác dụng sinh học của phloroglucinol còn chưa được nghiên cứu nhiều.

Quá trình phân lập và xác định cấu trúc đã thu được 5 hợp chất là các dẫn xuất phloroglucinol mới chưa từng được công bố, đặt tên là pogostemonon A-D và pogostemon D. Trong cấu trúc của các hợp chất này đều có sự xuất hiện của khung pyron với sự chuyển cấu trúc α-pyron thành γ-pyron dựa trên sự tạo thành hệ enon α,β-không no. Theo tổng quan tài liệu, chưa có báo cáo về nhóm chất phloroglucinol này trong các loài thuộc chi *Pogostemon* Desf. Kết quả của luận án công bố đầu tiên về sự có mặt của nhóm dẫn xuất phloroglucinol trong thành phần hóa học của chi *Pogostemon* Desf.

4.2.2.3. Về hợp chất triterpen, diterpen và steroid

Hợp chất pogostem là một noroleanan triterpen lần đầu được phân lập từ tự nhiên. Tuy nhiên, bộ khung cấu trúc 28-noroleanan đã được tìm thấy từ một số loài ở trong và ngoài họ Lamiaceae như *Phlomoides umbrosa*, *Camellia japonica*, *Phlomis umbrosa*, *Leonurus japonicas*. Các hợp chất này đã được chứng minh có nhiều tác dụng sinh học tốt như kháng khuẩn, đặc biệt là kháng ung thư trên nhiều dòng tế bào với giá trị IC_{50} < 10 µg/mL [159], [160], [161], [162].

Hợp chất geranyllinalool là một diterpen có mặt trong thành phần tinh dầu của loài nghiên cứu *P. auricularius* [163]. Hợp chất stigmasterol là một steroid khá phổ biến và cũng được tìm thầy từ nhiều loài thuộc chi *Pogostemon* Desf. [64].

Tóm lại, quá trình phân lập đã thu được 11 hợp chất tinh khiết với 9 hợp chất mới lần đầu được tìm thấy từ tự nhiên. Các hợp chất tinh khiết được đánh giá tác dụng chống viêm *in vitro* - ức chế sản sinh NO và khả năng gây độc một số dòng tế bào ung thư.

4.3. Về độc tính cấp và hoạt tính sinh học

Theo tổng quan tài liệu, khoảng 10 loài trong số 94 loài của chi *Pogostemon* Desf. được nghiên cứu về thành phần hóa học, chiếm khoảng 10% số loài. Thành phần hoá học của chi khá đa dạng với các nhóm hợp chất có hoạt tính sinh học như tinh dầu, flavonoid, terpenoid, steroid v.v. Nhìn chung, nhóm tinh dầu, flavonoid hay terpenoid có nguồn gốc tự nhiên đã được báo cáo các tác dụng sinh học tốt như kháng khuẩn, kháng nấm, kháng virus, giảm đau, chống viêm, chống oxy hóa v.v. [164], [165], [166], [167].

Ngoài ra, các loài trong chi *Pogostemon* Desf. được biết đến với nhiều hoạt tính sinh học phong phú và đa dạng, điển hình là kháng khuẩn, kháng nấm, kháng virus, chống oxi hóa và đặc biệt là chống viêm v.v. Đối với tác dụng chống viêm, dịch chiết methanol của *P. cablin* đã được báo cáo khả năng làm giảm hoạt động của enzym cyclooxygenase 2 và yếu tố gây hoai tử khối u (TNF-α) trên mô hình gây phù chân chuột bằng carrageenan với liều 1 g/kg cân nặng cơ thể chuột [73]. Bên cạnh đó, patchoulol là thành phần chính của *P. cablin* đã được chứng minh có tác dụng làm tăng đáng kể tỷ lệ sống, giảm tổn thương mô bệnh học và hiện tượng phù phổi trên mô hình gây tổn thương phổi cấp tính bằng lipopolysaccharid ở chuột. Hơn nữa, patchoulol ức chế đáng kể biểu hiện của các yếu tố gây viêm như yếu tố hoại tử khối u (TNF-α) và interleukin (IL-6) trên mô hình chuột gây tổn thương bằng LPS [98]. Ngoài ra, hợp chất stellatin được phân lập từ dịch chiết *n*-hexan của *P. stellatus*, đã thể hiện khả năng ức chế enzym COX-1 và COX-2 tương đối mạnh, giá trị IC_{50} lần lượt là 22,3 và 19,7 μM [71]. Dịch chiết ethanol, phân đoạn *n*-hexan và cloroform của đối tượng nghiên cứu - *P. auricularius* đã thể hiện hoạt tính chống viêm tương đối mạnh

so với chứng dương acid acetyl salicylic, điều đó được thể hiện qua các giá trị IC_{50} lần lượt là 34,09; 33,56; 35,23 và 45,23 µg/mL [6]. Ngoài ra, trong Y học cổ truyền, các loài thuộc chi *Pogostemon* Desf. được sử dụng với nhiều công dụng liên quan đến hạ sốt, giảm đau, chống viêm v.v. [2], [7], [8], [25]. Loài Tu hùng tai thường được dùng chữa lành vết thương, đau dạ dày, đau thận, rối loạn tiêu hóa, sốt rét v.v. [168]. Bên cạnh đó, các nghiên cứu Y học hiện đại cũng đã chỉ ra tiềm năng của loài với nhiều tác dụng sinh học như giảm đau, chống viêm, kháng khuẩn, kháng nấm v.v. [5], [6]. Dựa vào tổng quan trên, có thể thấy các loài trong chi *Pogostemon* Desf. là nguồn tiềm năng cho hoạt tính chống viêm.

Như vậy, dựa vào các dữ liệu về công dụng trong YHCT cũng như một số kết quả nghiên cứu của một số loài cùng chi *Pogostemon* Desf, đề tài tiến hành nghiên cứu thành phần hóa học của loài Tu hùng tai theo định hướng tác dụng chống viêm.

4.3.1. Tác dụng chống viêm

Các mô hình *in vitro* thường được sử dụng để sàng lọc hoặc tìm hiểu sâu về cơ chế tác dụng của thuốc. Bệnh lý viêm liên quan đến nhiều cơ quan và nhiều quá trình trong cơ thể, ảnh hưởng đến nhiều thông số hóa sinh, nên có nhiều mô hình nghiên cứu *in vitro* dựa trên các thông số khác nhau nhằm đánh giá tác dụng chống viêm.

Luận án thực hiện sàng lọc hoạt tính chống viêm *in vitro* - ức chế sản sinh NO trên đại thực bào chuột. Đại thực bào và bạch cầu có vai trò quan trọng, là nơi sản sinh ra các chất gây viêm. Trong điều kiện bình thường, quá trình tổng hợp nitric oxyd (NO) cũng được xảy ra tại đại thực bào, nhờ enzym NOS-synthetase, NO được tổng hợp từ L-arginin có vai trò giúp cân bằng nội môi. Ngoài ra, NO còn làm hủy hoại protein và acid nhân. Trong điều kiện bị kích thích (sử dụng lipopolysaccharid - LPS) NO được tổng hợp nhiều hơn và gây ra tình trạng bệnh lý của viêm cũng như nhiều bệnh khác. Như vậy, nếu mẫu thử có tác dụng ức chế sản sinh NO trong đại thực bào sẽ giúp làm giảm tình trạng bệnh lý của viêm [169], [170].

Cao chiết toàn phần và các cao phân đoạn được sàng lọc hoạt tính chống viêm ức chế sản sinh NO. Kết quả cho thấy cao chiết ethyl acetat cho tác dụng ức chế tốt nhất và khá an toàn với đại thực bào chuột. Theo định hướng tác dụng sinh học chống viêm, cao chiết ethyl acetat được sử dụng tiến hành phân lập các hợp chất tinh khiết.

Bên cạnh đó, với 8 hợp chất tinh khiết được tiến hành đánh giá tác dụng chống viêm *in vitro*, có 7 hợp chất cho khả năng ức chế sản sinh NO từ trung bình đến mạnh. Như vậy, từ phân đoạn có tác dụng chống viêm *in vitro* tốt nhất đã phân lập được phần lớn hợp chất cho hoạt tính chống viêm. Cụ thể, hợp chất Pogostemin C, Pogostemonon A, Pogostemonon C và Pogostemon D thể hiện hoạt tính mạnh với IC_{50} trong khoảng 3,76 - 28,99 µM. Đáng chú ý, hợp chất Pogostemin C và Pogostemon D có khả năng ức chế sản sinh NO mạnh với các giá trị IC_{50} lần lượt là 3,76 ± 0,15 và 7,29 ± 0,74 µM; tác dụng này mạnh hơn chứng dương trong cùng thử nghiệm với IC_{50} là 33,04 µM.

Liên quan cấu trúc và tác dụng sinh học, nhận thấy các hợp chất có chứa nhóm 1-methylprop1-enyl gắn vào vòng pyron trong cấu trúc có khả năng chống viêm ức chế sản sinh mạnh hơn (Pogostemin C, Pogostemonon A, Pogostemonon C và Pogostemon D - hình 4.1). Điều này cho phép gợi ý hoạt tính chống viêm ức chế sản sinh NO có thể có liên quan đến liên kết đôi trong nhóm 1-methylprop1-enyl. Thực tế, vai trò của liên kết đôi trong một số hoạt tính khác cũng đã được chứng minh [171], [172].

Bên cạnh tác dụng chống viêm ức chế sản sinh NO, khả năng điều hoà cytokin của hợp chất Pogostemin C được tiếp tục nghiên cứu. Các cytokin là các protein hay glycoprotein hoà tan có trọng lượng phân tử thấp được sản xuất và phóng thích bởi nhiều tế bào do đáp ứng với dị nguyên. Các cytokin đóng vai trò truyền tin qua lại giữa các bạch cầu với nhau và giữa các bạch cầu với các tế bào khác để điều hoà chức năng đáp ứng viêm và miễn dịch (bẩm sinh và chuyên biệt) [173]. Đáp ứng viêm bình thường là sự điều hoà quá trình tập trung, kết dính, xuyên mạch, hoá hướng động, thực bào của các bạch cầu đa nhân trung tính và tiêu diệt các vi khuẩn xâm nhập. Các quá trình này được kiểm soát chặt chẽ thông qua sự điều hoà các cytokin tiền viêm và kháng viêm được phóng thích bởi các đại thực bào được hoạt hoá. Trong đáp ứng viêm, phản ứng viêm phụ thuộc vào nồng độ của các cytokin [174].

Trong đáp ứng viêm và miễn dịch, các cytokin được chia thành 3 loại khác nhau. Lymphokin: các cytokin được bài tiết bởi tế bào T và điều hoà đáp ứng miễn dịch; cytokin tiền viêm: các cytokin khuếch đại và duy trì quá trình viêm; cytokin

kháng viêm: cytokin điều hoà ngược (âm tính) đáp ứng viêm. Trong đó, một số cytokin được quan tâm nhiều như cytokin tiền viêm: TNF-*α*, IL-1β, IL-4, IL-6, IL-12 và các cytokine kháng viêm: TGF-β, IL-10 [175], [176].

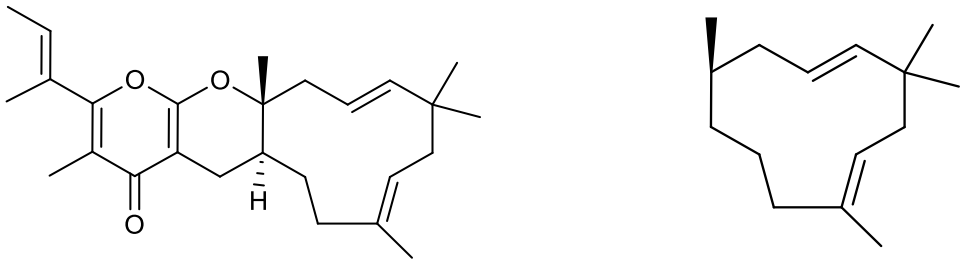
Yếu tố hoại tử khối u (TNF-α) là một cytokin quan trọng trong quá trình apoptosis cũng như trong sự sống của tế bào, quá trình viêm và miễn dịch trong cơ thể. TNF-α thúc đẩy quá trình viêm, tham gia vào quá trình giãn mạch, gây phù nề, hoạt hóa tế bào nội mô mạch máu mạnh và tăng tính thấm thành nội mạc. Cytokin tiền viêm này được sản xuất bởi đại thực bào, dưỡng bào, tế bào T v.v. [176].

Ngược lại, IL-10 là một cytokin kháng viêm ức chế cả tế bào Th1 và Th2 tổng hợp IgE cũng như làm ngắn đời sống của bạch cầu ưa acid [124]. IL-10 ức chế sản xuất TNF-α thông qua việc giảm tổng hợp cyclooxygenase 2, oxid nitric (iNOS) và giảm prostaglandin E2. Bên cạnh đó, IL-10 cũng ức chế sản xuất cytokin tiền viêm như IL-1, IL-6, IL-12 do đó ngăn chặn các biểu hiện của các kháng nguyên và các phân tử trong tế bào đơn nhân, đại thực bào, bạch cầu trung tính và tế bào T. IL-10 giúp tăng tính thấm thành mạch và tăng kali máu, đồng thời giảm triệu chứng sốt của tình trạng viêm [176].

IL-6 là cytokin đa chức năng trong vài trò điều hoà miễn dịch, tạo máu, phản ứng viêm bằng cách điều chỉnh tăng trưởng tế bào, kích hoạt gen, sự phát triển, sự sống còn và biệt hóa. IL-6 được tổng hợp và sản xuất bởi rất nhiều tế bào khác nhau như tế bào đơn nhân, đại thực bào, lympho T, lympho B, tế bào nội mô và nguyên bào sợi. Đặc biệt, IL-6 tham gia vào giai đoạn cấp của quá trình viêm, biệt hoá tế bào lympho B và sản xuất các globulin miễn dịch và tham gia quá trình biệt hoá của các tế bào lympho T. Ngoài ra, IL-6 có hiệu quả kháng viêm với khả năng ức chế giải phóng IL-1 và TNF-α từ đại thực bào [173]. Tocilizumab là một thuốc ức chế IL-6 được FDA chấp nhận để điều trị viêm khớp dạng thấp nặng và "kháng trị" từ đầu năm 2010 [174].

Luận án lựa chọn các cytokin IL-10, IL-6 và TNF-α nhằm đánh nghiên cứu sâu hơn ảnh hưởng của hợp chất Pogostemin C lên đáp ứng viêm. Ở nồng độ 50,5 μM, Pogostemin C có khả năng tăng sản sinh IL-10 và có khả năng ức chế sản sinh TNF-α so với đối chứng âm ở mức có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$), nhưng chưa biểu hiện rõ ràng ảnh hưởng đối với IL-6.

Xét về mặt cấu trúc, hợp chất Pogostemin C là một meroterpenoid với khung sesquiterpen là *α*-humulen. *α*-humulen đã được báo cáo có hoạt tính chống viêm tương tự với dexamethason, một steroid chống viêm phổ biến. Nghiên cứu được thực hiện với mô hình gây phù bàn chân chuột bằng carrageenan đã chỉ ra rằng *α*-humulen thể hiện tác dụng chống viêm hiệu quả ở liều từ 5-50 mg/kg so với chứng dương dexamethason là 0,5 mg/kg. Cũng trong nghiên cứu này, *α*-humulen được chứng minh có tác dụng giảm tỉ lệ TNF-α [177]. Ngoài ra, *α*-humulen còn có tác dụng giảm đau, chống viêm toàn thân hay cục bộ khi dùng đường uống, đường tiêm tĩnh mạch, bôi ngoài da hoặc ở dạng khí dung. Bên cạnh đó, *α*-humulen cho thấy tiềm năng trong việc điều trị các chứng bệnh viêm khớp, viêm bao hoạt dịch, đau xơ cơ v.v. Như vậy, có thể giải thích tác dụng chống viêm của Pogostemin C mạnh hơn nhiều so với các hợp chất khác có thể do cấu trúc có chứa khung *α*-humulen.



Hợp chất pogostemin C *α-humulen*

Hình 4.3. *Cấu trúc hóa học của hợp chất Pogostemin C và α-humulen*

4.3.2. Tác dụng gây độc tế bào ung thư

Bên cạnh tác dụng chống viêm, khả năng gây độc tế bào của các hợp chất mới cũng đã được nghiên cứu bằng phương pháp sử dụng thuốc nhuộm SRB. Kết quả cho thấy hợp chất Pogostemin A thể hiện hoạt tính ức chế tốt trên cả 5 dòng ung thư KB, LU-1, AGS, Hep-G2, SW-480 với giá trị IC_{50} trong khoảng 18,75 - 33,18 μM. Các hợp chất còn lại thể hiện hoạt tính trung bình hoặc yếu. Hợp chất Pogostemin A được tiếp tục đánh giá khả năng cảm ứng apoptosis với thuốc nhuộm Hoechst 33342, phương pháp trắc lưu tế bào với bộ Kit Annexin V/PI và khả năng cảm ứng sản sinh caspase-3.

Quá trình chết theo chương trình của tế bào (Apoptosis) được đặc trưng bởi các đặc điểm hình thái riêng biệt và cơ chế sinh hóa phụ thuộc năng lượng. Apoptosis được coi là một phần quan trọng trong sừng hoá tế bào thường, sự phát triển cũng như hoạt động của hệ thống miễn dịch, sự teo phụ thuộc vào hormon, sự phát triển phôi và chết tế bào do hóa chất gây ra. Nó là một chương trình tự chết được diễn ra tuần tự. Trong đó, các tế bào kích hoạt một số enzym nhất định làm phân rã nhân tế bào và tế bào chất. Như vậy, apoptosis là cần thiết cho sự phát triển và tồn tại của các sinh vật sống. Bất thường trong quá trình apoptosis có thể dẫn đến nhiều tình trạng bệnh lý như ung thư, thoái hóa thần kinh, tổn thương do thiếu máu cục bộ và rối loạn tự miễn. Enzym caspase đóng vai trò quan trọng trong cơ chế apoptosis. Hầu hết các kích thích nhằm kích hoạt apoptosis đều liên quan đến enzym caspase theo những cách khác nhau. Các caspase liên quan đến apoptosis được chia thành 2 nhóm là caspase ngược dòng (-2, -8, -9 và -10) và caspase xuôi dòng (-3, -6, -7 và -15) [178], [179], [180].

Có hai con đường apoptosis chính: con đường ngoại sinh hay còn gọi là con đường thụ thể chết và con đường nội sinh hay còn gọi là con đường ty thể. Các enzym caspase đóng vai trò quan trọng trong cơ chế apoptosis. Hiện nay đã có bằng chứng cho thấy hai con đường này có sự liên hệ với nhau và các phân tử sinh học trong một con đường có thể ảnh hưởng đến con đường kia. Hai con đường này hội tụ tại cùng một con đường thực thi (execution pathway) đều liên quan đến caspase-3. Con đường thực thi này bắt đầu từ việc caspase-3 phân cắt chất ức chế yếu tố phân mảnh DNA, dẫn đến sự phân mảnh DNA, thoái hóa các protein của khung tế bào và nhân, liên kết chéo của các protein, hình thành các thể apoptotic, biểu hiện các phối tử với các thụ thể của tế bào thực bào và cuối cùng là sự hấp thu của các tế bào thực bào. Ngoài ra, caspase-3 cùng với các caspase xuôi dòng gây ra sự phân cắt protein kinaza, protein tế bào, protein sửa chữa DNA và các tiểu đơn vị ức chế của họ endonuclease. Kết quả tạo ra những thay đổi hình thái trong quá trình chết theo chương trình của tế bào [178], [179], [180].

Apoptosis đặc trưng bởi sự thay đổi hình thái tế bào, sự ngưng tụ chất nhiễm sắc, sự phân cắt DNA và sự phân mảnh nhân. Hoechst 33342 là một chất nhuộm nhân tế bào dạng huỳnh quang, có thể thấm vào trong tế bào. Khi hoechst 33342 gắn với

phân tử ADN, dưới sự kích thích bởi nguồn ánh sáng cực tím, phức hợp này có thể phát ra ánh sáng huỳnh quang màu xanh. Cường độ cao nhất của ánh sáng huỳnh quang được thu nhận ở bước sáng 461 nm [126], [181]. Hoechst 33342 có tính thấm tốt nên có thể thấm vào và nhuộm nhân giai đoạn đầu của apotosis. Trong khi các chất nhuộm khác như propidium iodid (PI) hay ethidium bromid không thể thấm vào. Tuy nhiên, với các tế bào ở giai đoạn sau của apotosis, chất nhuộm PI có thể xâm nhập vào tế bào và nhuộm phân tử ADN. Do đó, thường kết hợp hoechst 33342 với propidium iodide để phân tích các giai đoạn của apotosis tế bào [126], [181].

Một trong những biểu hiện sớm của apoptosis đó là sự di chuyển của phosphatidylserine (PS) từ phía trong màng nguyên chất ra bề mặt tế bào. Annexin V là một protein gắn với phospholipid phụ thuộc vào ion Ca^{++} có ái lực mạnh với PS, vì vậy Annexin V được gắn với chất hiện mầu huỳnh quang FITC được sử dụng để xác định sự biểu hiện PS thông qua phương pháp đếm tế bào dòng chảy. Sự dịch chuyển của PS thường xảy ra trước khi màng tế bào bị phá hủy trong quá trình chết của tế bào do apoptosis hoặc hoại tử. Vì vậy nhuộm annexin V thường kết hợp với PI để xác định apoptosis sớm và muộn. Thông qua phương pháp này, những tế bào sống không nhuộm với bất kì loại mầu nhuộm nào. Tế bào biểu hiện apoptosis sớm bắt màu với FITC-annexin V, tế bào biểu hiện apoptosis muộn bắt mầu với cả FITC-annexin V và PI; tế bào chết do hoại tử chỉ bắt mầu với thuốc nhuộm PI [127].

Luận án đánh giá khả năng cảm ứng apoptosis của hợp chất pogostemin A qua cả 2 phương pháp nhuộm Hoechst 33342 và trắc lưu tế bào với Kit Annexin V/PI, đồng thời nghiên cứu khả năng cảm ứng sản sinh caspase-3. Kết quả cho thấy, ở nồng độ 52,08 µM, hợp chất Pogostemin A có khả năng cảm ứng apoptosis trên tế bào ung thư phổi LU-1 thông qua việc cô đặc hoặc phân mảnh nhân tế bào với tỉ lệ 34,30%. Cũng tại nồng độ này, Pogostemin A có khả năng cảm ứng sản sinh caspase-3 tăng 1,22 lần so với đối chứng âm ($P < 0.05$); tỉ lệ tế bào apoptosis sớm tăng 14,9% và đặc biệt là tỉ lệ apoptosis muộn tăng 12,6% thông qua kĩ thuật đếm tế bào dòng chảy.

4.3.3. Độc tính cấp

Độc tính cấp là độc tính xảy ra sau khi dùng mẫu thử một lần hoặc vài ba lần trong ngày. Nghiên cứu độc tính cấp nhằm cung cấp thông tin cho việc xếp loại mức độ độc của mẫu thử, dự đoán triệu chứng và dự kiến biện pháp điều trị ngộ độc cấp, thiết lập mức liều cho những thử nghiệm độc tính và tác dụng cũng như phạm vi an toàn của mẫu nghiên cứu tiếp theo. LD_{50} là một thông số quan trọng để đánh giá độc tính của mẫu nghiên cứu, cũng như căn cứ và được xác định trước khi bắt đầu nghiên cứu tác dụng sinh học trên động vật [129]. Cao ethyl acetat cho hoạt tính chống viêm ức chế NO khá tốt, khá an toàn với đại thực bào chuột được tiếp tục nghiên cứu độc tính cấp.

Sau khi tiến hành dò liều, thử nghiệm dược lý độc tính cấp trên chuột được tiến hành với 5 lô tương ứng 5 liều theo đường uống là 6,4; 8,0; 9,5; 11,0; 12,5 g/kg cân nặng chuột, nhằm xác định liều gây chết 50% động vật thực nghiệm (LD_{50}). Mặc dù các cá thể chuột được lựa chọn và chăm sóc, tiến hành thử nghiệm theo đúng tiêu chuẩn nhằm hạn chế những sai sót trong nghiên cứu, tuy nhiên từng cá thể chuột khác nhau có khả năng sống sót cũng như các biểu hiện khác nhau sau khi uống cao chiết. Nhìn chung, tỉ lệ chuột chết tăng dần theo liều nghiên cứu. Cụ thể, tại liều 8,0 g/kg cân nặng chuột có 3 chuột chết sau khoảng 3 giờ. Với liều tương đương 9,5 và 11,0 g/kg cân nặng cơ thể chuột, có 7 chuột chết sau khi uống khoảng 2-5 giờ. Với liều tương đương 12,5 g/kg cân nặng cơ thể chuột, 10 chuột chết rải rác trong vòng 1-7 giờ sau. Kết quả nghiên cứu đã xác định được liều LD_{50} của cao chiết ethyl acetat bằng đường uống là 9,18 g cao/kg cân nặng chuột. Đây là công bố đầu tiên về độc tính cấp của cao chiết ethyl acetat loài Tu hùng tai thu hái ở Việt Nam. Kết quả độc tính cấp của cao ethyl acetat Tu hùng tai có thể làm cơ sở cho các nghiên cứu tiếp theo trên động vật thực nghiệm.

So sánh giá trị LD_{50} của cao ethyl acetat trong nghiên cứu này và giá trị LD_{50} của cao methanol trong nghiên cứu trước đây của Nur và cộng sự là 3,3 g/kg [6], có thể thấy, cao ethyl acetat ít độc hơn cao toàn phần. Thật vậy, cũng trong luận án này, so sánh kết quả nghiên cứu ảnh hưởng đến sự phát triển bình thường tế bào đại thực bào chuột của cao toàn phần methanol và các cao chiết phân đoạn, tại nồng độ 100

µg/mL, cao ethyl acetat có tỉ lệ tế bào sống cao 92,77%, trong khi cao methanol cũng như các cao chiết *n*-hexan, dicloromethan và cao nước tương đối thấp trong khoảng 31,18 - 63,09% (phép thử MTT trong nghiên cứu chống viêm ức chế sản sinh NO, tại mục 3.3.1.1 - Bảng 3.14). Như vậy, quá trình chiết cao phân đoạn, nhiều hợp chất độc có thể được phân bố chủ yếu tại các phân đoạn khác như *n*-hexan, dicloromethan hoặc cao nước. Bên cạnh đó, trong số 11 hợp chất tìm thấy từ phân đoạn ethyl acetat, có 8 hợp chất được đánh giá ảnh hưởng đến sự sống của tế bào đại thực bào chuột RAW 264.7 (phép thử MTT trong nghiên cứu chống viêm ức chế sản sinh NO, tại mục 3.3.1.2 - Bảng 3.16). Cụ thể, ở liều 100 µg/mL, chỉ 3 hợp chất (Pogostemin B, Pogostemonon B và Pogostemonon D) có tỉ lệ tế bào sống cao trong khoảng là 95,4 - 105,94%, trong khi các mẫu thử còn lại tỉ lệ sông của tế bào thấp (< 50%). Tại mức liều thấp hơn là 20 µg/mL, tỉ lệ tế bào sống sót ở tất cả các mẫu chất là tương đối cao (71,34 - 105,57%). Như vậy, phần lớn các hợp chất phân lập từ phân đoạn ethyl acetat trong nghiên cứu này có gây độc và ảnh hưởng đến sự sống của tế bào đại thực bào chuột.

Nhìn chung, các kết quả nghiên cứu của đề tài trên loài Tu hùng tai đã dẫn đến việc phân lập và xác định nhiều hợp chất có cấu trúc lý thú và có hoạt tính sinh học tốt. Bên cạnh đó, luận án còn tồn tại nhiều hạn chế. Sắc ký lớp mỏng được sử dụng để kiểm tra độ tinh khiết của hợp chất trước khi được tiến hành gửi đo phổ xác định cấu trúc, nhưng quá trình thực nghiệm đã bỏ qua bước chụp ảnh SKLM của các hợp chất phân lập được. Vì vậy, luận án đã thiếu sót trong việc cung cấp SKLM làm minh chứng độ tinh khiết của các hợp chất. Mặc dù, các hợp chất thu được chủ yếu dạng bột có thể đánh giá độ tinh khiết qua điểm chảy. Tuy nhiên, với khối lượng các hợp chất mới thu được tương đối thấp và điều kiện thực tế phòng nghiên cứu còn hạn chế, nghiên cứu đã ưu tiên tập trung các dữ liệu quan trọng, cần thiết cho việc xác định cấu trúc và đánh giá hoạt tính sinh học của hợp chất nên đã không thể tiến hành đo các thông số vật lý như điểm chảy hay góc quay cực. Cũng vì lí do đó, một số hợp chất mới trong luận án tạm dừng lại ở việc xác định các cấu trúc phẳng vì thiếu dữ liệu phổ NOESY hay CD nhằm xác định cấu hình không gian.

Tóm lại, quá trình thực hiện đề tài đã mang lại những điểm mới về thành phần hóa học với 9 hợp chất mới lần đầu được tìm thấy trong tự nhiên. Bên cạnh đó, một số tác dụng sinh học quan trọng như tác dụng chống viêm, gây độc tế bào ung thư của cao chiết toàn phần, các cao phân đoạn cũng như các hợp chất tinh khiết đã được báo cáo. Đặc biệt, một số hợp chất tiềm năng cũng đã được nghiên cứu sâu hơn về tác dụng sinh học.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

1. Về thành phần hóa học của loài Tu hùng tai

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

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

- Về tác dụng chống viêm *in vitro:*

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

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

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

- Về tác dụng gây độc tế bào ung thư

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

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

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

KIẾN NGHỊ

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

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

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

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

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ

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

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Vũ Xuân Phương (2000), *Thực vật chí Việt Nam - Tập 2*, NXB Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội, 200-220.
2. Umberto Q (2012), *CRC World Dictionary of Medicinal and Poisonous Plants: Common Names, Scientific Names, Eponyms, Synonyms, and Etymology*, CRC Press, 3014-3016.
3. Jeong JB, Choi J, Lou Z, Jiang X, Lee SH (2013), "Patchouli alcohol, an essential oil of *Pogostemon cablin*, exhibits anti-tumorigenic activity in human colorectal cancer cells", *International Immunopharmacology*, 16(2), 184-190.
4. Swamy MK, Sinniah UR (2015), "A Comprehensive Review on the Phytochemical Constituents and Pharmacological Activities of *Pogostemon cablin* Benth.: An Aromatic Medicinal Plant of Industrial Importance", *Molecules*, 20(5), 8521-8547.
5. Nasir UR, Hasan I, Karim N, et al. (2015), "Phytochemical, Cytotoxic and Thrombolytic Activity of Methanolic Extract of *Dysophylla auricularia* leaves", *American Journal of PharmTech Research*, 5(2), 465-476.
6. Nur T, Islam MT, Alam S, et al. (2015), "Pharmacological investigations of organic crude fractions of *Dysophylla auricularia*", *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*, 15(3), 207-215.
7. Võ Văn Chi (2000), *Từ điển cây thuốc Việt Nam tập I*, NXB Y học, 255-256, 943-944, 1123-1125.
8. Đỗ Tất Lợi (2006), *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, NXB Y học, 374-375.
9. Syeda ST, Khanam M, Husain SZ (1995), "A micromorphological study of *Pogostemon* Desf. species (Lamiaceae) from Bangladesh", *Pakistan Journal of Botany*, 27(1), 73-82.
10. Takhatajan (2009), *Flowering Plants*, Springer, 573.
11. Desfontaine RL (1815), "Pogostemon Desfontaines", *Mémoires du Museum national d'histoire naturelle*, 2, 154.
12. Bhatti GR, Ingrouille M (1997), "Systematics of *Pogostemon* (Labiatae). ", *Bulletin of the Natural History Museum, London (Botany)*, (27), 77–147.

13. Hasskarl JC (1842), "Plantarum genera et species novae aut reformatae javenses. ", *Flora 25* Beibl. 2(1-2), 1-32.
14. Kuntze O (1891), *Revisio Generum Plantarum*, 2. A. Felix, Leipzig, 371-1011.
15. Press JR (1982), "Taxonomic studies in the Labiatae tribe Pogostemoneae", *Bulletin of the British Museum (Natural History), Botany* 10, 1-89.
16. El-Gazzar A, Watson L (1967), "Consequences of an escape from floral minutiae and floristics in certain Labiatae", *Taxon*, 16, 186-189.
17. Li HW (1994), *Labiatae. In: Wang, W.T. (Ed.) Vascular Plants of the Hengduan Moutains* 2. Science Press, Beijing,, 1656–1740.
18. Wu CY, Huang YC (1977), *Pogostemon and Dysophylla. In: Wu, C.Y. & Li, H.W. (Eds.) Flora Reipublicae Popularis Sinicae 66*, Science Press, Beijing, 366-387.
19. Li HW (1975), "Some changes of botanical name in Chinese Labiatae (Continued)", *Acta Phytotaxonomica Sinica* 13, 72-95.
20. Hooker JD (1885), *Labiatae. In: Hooker, J.D. (Ed.) The Flora of British India*, 4. Macmillan, London, 604-705.
21. Li HW, Hedge IC (1994), *Pogostemon and Dysopylla. In: Wu, Z.Y. & Raven, P.H. (Eds.) Flora of China 17*, Science Press, Beijing & Missouri Botanical Garden Press, St. Louis, 260-266.
22. Bendiksby M, Thorbek L, Scheen A-C, Lindqvist C, Ryding O (2011), "An updated phylogeny and classification of Lamiaceae subfamily Lamioideae", *Taxon*, 60(2), 471-484.
23. Yao G, Deng YF, Ge XJ (2013), "Validation of the name *Pogostemon petelotii* (Lamiaceae)", *Phytotaxa*, 81(1), 38-44.
24. Plants of the World Online (2022), Facilitated by the Royal Botanic Garden, Kew Science. Published on the Internet; https://powo.science.kew.org (Truy cập lần cuối ngày 31/1/2023)
25. Wu ZY, Raven PH (1999), *Flora of China*, Science Press, Beijing, and Missouri Botanical Garden Press, St. Louis, 258-264.
26.Phạm Hoàng Hộ (2003), *Cây cỏ Việt Nam quyển 2*, NXB Trẻ, TP Hồ Chí Minh, 858.

27. WFO Plant List (2022), "World Flora Online Plant List.", Published on the Internet; https://wfoplantlist.org/plant-list (Truy cập lần cuối ngày 31/1/2023)
28. Trần Huy Thái, Nguyễn Quang Hưng, Minh ĐT, Hồng PT (2006), "Thành phần hóa học của tinh dầu Tu hùng tai *Pogostemon auricularius* (L.) Hassk. của Việt Nam", *Tạp chí Sinh học*, 28(3), 93-95.
29. Dhakal D, Susan J, Durga DP (2014), "Chemical Composition of the Essential Oil of *Pogostemon benghalensis* (Burm.f.) Kuntze from Nepal", *Natural Product Communications*, 9(0), 1-2.
30. Nazrul M, Islam B, Varshney VK, et al. (2011), "Composition of essential oil of the leaf and inflorescence of *Pogostemon benghalensis* (Burm.f.) Kuntze", *International Research Journal Plant Science*, 2(9), 271-275.
31. Akhila A, R. T (1984), "Chemical component of patchouli oil", *Fitoterapia*, 55, 363.
32. Hikino H, Ito K, Takemoto T (1968), "Structure of pogostol", *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 16, 1608-1610.
33. Ling G LQ, Puzhu C. (1992), "Study on chemical constituents of volatile oil from *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth.", *Nat Prod Res Dev* 2, 5.
34. Kumar V, Shriram V, Bhagat R, et al. (2019), "Phytochemical profile, anti-oxidant, anti-inflammatory, and anti-proliferative activities of *Pogostemon deccanensis* essential oils", *3 Biotech*, 9(1), 31.
35. Hemphill JC, 3rd, Greenberg SM, Anderson CS, et al. (2015), "Guidelines for the Management of Spontaneous Intracerebral Hemorrhage: A Guideline for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association", *Stroke*, 46(7), 2032-2060.
36. Murugan R, Mallavarapu GR, Padmashree KV, Rao RR, Livingstone C (2010), "Volatile oil composition of *Pogostemon heyneanus* and comparison of its composition with patchouli oil", *Natural Product Communications*, 5(12), 1961-1964.
37. Murugan R, Mallavarapu GR, Sudha V, Brindha P (2013), "*Pogostemon hirsutus* oil, rich in abietane diterpenes", *Natural Product Communications*, 8(12), 1771-1772.

38. Joshi RK (2020), "Volatile constituents of leaf, stem and flower of the traditional shrub *Pogostemon plectranthoides* Desf. from the Western Ghats, India", *Nat Prod Res*, 1-3.
39. Thapa RK, Vashist VN, Atal CK, Gupta R (1971), "The essential oil of *Pogostemon plectranthoides*", *Planta Medica*, 20(1), 67-69.
40. Murugan R, Mallavarapu GR (2012), "Composition of the essential oil of *Pogostemon travancoricus* var. *travancoricus*," *Nat Prod Commun*, 7(1), 87-88.
41. Kamaleswari K, Nandagopalan V (2016), "Phytochemical screening of *Pogostemon auricularis* (L.) Hassk. of Lamiaceae", *Bioscience Discovery*, 7(1), 7-10.
42. Satyal P, Chuong N, Pham T, et al. (2018), "Chemical Composition of the Essential Oils of Pogostemon auricularius , a Vietnamese Medicinal Plant", *Natural Product Communications*, 13, 617-620.
43. De Guzman CC, M.A. Villanueva, R.C. Torres, R.A. Regros, W.C. Cosico and E.G. Aragones (1997), *Production and processing of citronella, patchouli, and ilang-ilang.*, Department of Science and Technology, Philippines, 135-185.
44. Wijesekera ROB (1986), *Practical manual on the essential oils industry*, United Nations Industrial Development Organization, Vienna, Austria, 173.
45. Itokawa H, Suto K, Takeya K (1981), "Studies on a novel p-coumaroyl glucoside of apigenin and on other flavonoids isolated from patchouli", *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 29, 254-256.
46. Guan L, Quan LH, Xu LZ, Cong PZ (1994), "Chemical constituents of *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth", *China Journal of Chinese Materia Medica*, 19(6), 355-356, 383.
47. Li P, Yin ZQ, Li SL, et al. (2014), "Simultaneous determination of eight flavonoids and pogostone in *Pogostemon cablin* by high performance liquid chromatography", *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 37, 1771-1784.

48. Wang D, Yin Z, Zhang Q, et al. (2010), "Nonvolatile chemical constituents from *Pogostemon cablin*", *China Journal of Chinese Materia Medica*, 35(20), 2704-2707.
49. Zhang G, Ma X, Su J (2001), "Flavonoid compounds in *Pogostemon cablin*", *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 32(10), 871-874.
50. Liu F, Cao W, Deng C, et al. (2016), "Polyphenolic glycosides isolated from *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth. as novel influenza neuraminidase inhibitors", *Chem Cent J*, 10, 51.
51. Patwardhan SA, Gtipta AS (1981), "An octamethoxyflavone from *Pogostemon purpurascens*", *Phytochemistry*, 20(6), 1458-1459.
52. Li K, Zhang H, Xie H, et al. (2011), "Preparative isolation and purification of five flavonoids from *Pogostemon cablin* Benth. by high-speed countercurrent chromatography and preparative high-performance liquid chromatography ", *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 34(15), 1617-1629.
53. Huang L, Mu S, Zhang J, et al. (2009), "Chemical constituents from involatile moiety of *Pogostemon cablin*", *China Journal of Chinese Materia Medica*, 34(4), 410-413.
54. Park EJ, Hae Ran Park, Ji Suk Lee and Jinwoong Kim (1998), "Licochalcone A: an inducer of cell differentiation and cytotoxic agent from *Pogostemon cablin*", *Planta Medica* 64(5), 464--466.
55. Zhou L, Xu M, Yang C-R, Wang Y-F, Zhang Y-J (2011), "New Patchoulol-Type Sesquiterpenoids from *Pogostemon cablin*", *Helvetica Chimica Acta*, 94(2), 218-223.
56. Kiuchi F, Matsuo K, Ito M, Qui TK, Honda G (2004), "New Sesquiterpene Hydroperoxides with Trypanocidal Activity from *Pogostemon cablin*", *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 52(12), 1495-1496.
57. Li F, Li C-J, Ma J, et al. (2013), "Four new sesquiterpenes from the stems of *Pogostemon cablin*", *Fitoterapia*, 86, 183-187.

58. Zhu H, Zhou QM, Peng C, et al. (2017), "Pocahemiketals A and B, two new hemiketals with unprecedented sesquiterpenoid skeletons from *Pogostemon cablin*", *Fitoterapia*, 120, 67-71.
59. Zhou QM, Chen MH, Li XH, et al. (2018), "Absolute Configurations and Bioactivities of Guaiane-Type Sesquiterpenoids Isolated from *Pogostemon cablin*", *J Nat Prod*, 81(9), 1919-1927.
60. Ding W-B, Lin L-D, Liu M-F, Wei X-Y (2011), "Two new sesquiterpene glycosides from *Pogostemon cablin*", *Journal of Asian Natural Products Research*, 13(7), 599-603.
61. Nanda B, Patwardhan SA, Gupta AS (1985), "Epoxyparvinolide, a secocaryophyllanolide from *Pogostemon parviflorus*", *Phytochemistry*, 24(11), 2735-2736.
62. Phadnis AP, Patwardhan SA, Gupta AS, et al. (1984), "Stemonolone, a new sesquiterpenoid from *Pogostemon plectranthoides* (Desf)", *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, 937-939.
63. Biren KH, Khaidem IS (2000), "Chemical investigation of *Pogostemon parviflorus* Benth: Part I", *Indian Journal of Chemistry*, 39B, 799-800.
64. Zhou QM, Peng C, Li XH, et al. (2013), "Study on constituents of the aerial parts of *Pogostemon cablin*", *Journal of Chinese Medicinal Materials*, 36, 915-918.
65. Prakash OR, R; Agarwal, S; Hussaini, Fa; Shoeb, A (1987), "Stereostructure of auricularic acid, a cleistanthane diterpenoid from *Pogostemon auricularis* Hassk", *Tetrahedron Letters*, 28(6), 685-686.
66. Hussaini FA, Roy R, Shoeb A, et al. (1993), "Structure and configuration of a new cleistanthane diterpenoid from *Pogostemon auricularis*", *Natural Product Letters*, 3(1), 71-77.
67. Joshi BS, Ravindranath KR (1977), "Isolation and identification of two phenolic ketones and a chromone from *Dysophylla stellata* Benth.", *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, (4), 433-436.
68. Purushothaman KK, A. S (1984), "Structures of pogopyrone A and pogopyrone B", *Indian Journal Of Pharmaceutical Sciences*, 46(1), 48.

69. Kongkathip N, Sam-ang P, Kongkathip B, et al. (2009), "Development of Patchouli extraction with quality control and isolation of active compounds with antibacterial activity", *Kasetsart Journal (Natural Science)*, 43, 519-525.

70. Savithramma N, Rao ML, Prabha B (2011), "Phytochemical Studies of *Dysophylla myosuroides* (Roth.) Benth. In. Wall, and *Talinum cuneifolium* (Vahl.) Willd", *Research Journal of Phytochemistry*, 5(3), 163-169.

71. Gautam R, Srivastava A, Jachak SM, Saklani A (2010), "Anti-inflammatory, cyclooxygenase (COX)-2, COX-1 inhibitory and antioxidant effects of *Dysophylla stellata* Benth", *Fitoterapia*, 81(1), 45-49.

72. Muradula K., Misar AV, Dave V, Joshi M, Mujumdar AM (2007), "Anti-inflammatory activity of *Dalbergia lanceolaria* Bark ethanol extract in mice and rats", *Journal of Ethnopharmacology*, 112(2), 300-304.

73. Lu T-C, Liao J-C, Huang T-H, et al. (2011), "Analgesic and Anti-Inflammatory Activities of the Methanol Extract from *Pogostemon cablin*", *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011, 9.

74. Yu J, Qi Y, Luo G, Duan HQ, Zhou J (2012), "Extraction and analysis of the essential oil in *Pogostemon cablin* by enzymatic hydrolysis and inhibitory activity against Hela cell proliferation", *Journal of Chinese Medicinal Materials*, 35(5), 796-799.

75. Hammer KA, Carson CF, Riley TV (1999), "Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts", *Journal of Applied Microbiology*, 86, 985-990.

76. Karimi A (2014), "Characterization and Antimicrobial Activity of Patchouli Essential Oil Extracted From *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth. (Lamiaceae)", *Advances in Environmental Biology*, 8, 2301-2309.

77. Pullagummi C, Rao NB, Singh BCS, et al. (2014), "Comparitive studies on antibacterial activity of Patchouli (*Pogostemon cablin* (Blanco) Benth) and Geranium (*Pelargonium graveolens*) aromatic medicinal plants", *African Journal of Biotechnology*, 13, 2379-2384.

78. Vu TT, Kim H, Tran VK, et al. (2016), "In vitro antibacterial activity of selected medicinal plants traditionally used in Vietnam against human pathogenic bacteria", *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 16, 32.

79. Osawa K, Matsumoto T, Maruyama T, et al. (1990), "Studies of the antibacterial activity of plant extracts and their constituents against periodontopathic bacteria", *The Bulletin of Tokyo Dental College*, 31(1), 17-21.

80. Wan F, Peng F, Xiong L, et al. (2016), "*In vitro* and *in vivo* antibacterial activity of patchouli alcohol from *Pogostemon cablin*", *Chinese Journal of Integrative Medicine*, 1-6.

81. Yu XD, Xie JH, Wang YH, et al. (2015), "Selective antibacterial activity of patchouli alcohol against *Helicobacter pylori* based on inhibition of urease", *Phytotherapy Research*, 29(1), 67-72.

82. Sadeghi-Nejad B, Sadhu Deokule S (2010), "Antidermatophytic Activity of *Pogostemon parviflorus* Benth", *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 9(3), 279-285.

83. Shahla N, Batool S-N (2011), "Screening of *Pogostemon parviflorus* Benth. for anti-*Candida* activity", *African Journal of Microbiology Research*, 5(6), 657-660.

84. Yang D, Chaumont J, Millet J (2009), "Antifungal activity of the essential oils from *Agastache rugosa* and *Pogostemon cablin* against dermatophytes and opportunistic fungi", *Chinese Pharmaceutical Journal*, 35, 9-11.

85. Liu Q, Luyten W, Pellens K, et al. (2012), "Antifungal activity in plants from Chinese traditional and folk medicine", *Journal of Ethnopharmacology*, 143(3), 772-778.

86. Kocevski D, Du M, Kan J, et al. (2013), "Antifungal effect of *Allium tuberosum*, *Cinnamomum cassia*, and *Pogostemon cablin* essential oils and their components against population of *Aspergillus* species", *Journal of Food Science*, 78(5), M731-737.

87. Li YC, Liang HC, Chen HM, et al. (2012), "Anti-*Candida albicans* activity and pharmacokinetics of pogostone isolated from Pogostemonis Herba", *Phytomedicine*, 20(1), 77-83.

88. Peng S, Li G, Qing Z (2011), "Effect of different extract parts of *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth on in vivo anti-influenza virus", *Lishizhen Medicine And Materia Medica Research*, 22, 2578-2579.

89. Gao X, Xiong S, Wang Y (2009), "Preliminary study on anti-coxsackievirus CVB3 activity of three effective parts from *Pogostemon cablin in vitro*", *The Journal of Chinese Medicine & Traditional Chinese Medicine*, 32, 761-764.
90. Kiyohara H, Ichino C, Kawamura Y, et al. (2012), "Patchouli alcohol: in vitro direct anti-influenza virus sesquiterpene in *Pogostemon cablin* Benth", *Journal of Natural Medicines*, 66(1), 55-61.
91. Wu H, Li B, Wang X, Jin M, Wang G (2011), "Inhibitory effect and eossible mechanism of action of patchouli alcohol against Influenza A (H2N2) Virus", *Molecules*, 16(8), 6489.
92. Chen M, Zhang J, Lai Y, et al. (2013), "Analysis of *Pogostemon cablin* from pharmaceutical research to market performances", *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 22(2), 245-257.
93. Hussain A, Anwar F, Iqbal T (2011), "Antioxidant attributes of four Lamiaceae essential oils", *Pakistan Journal of Botany*, 43, 1315-1321.
94. Yang Y, Kinoshita K, Koyama K, et al. (1999), "Anti-emetic principles of *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth", *Phytomedicine*, 6(2), 89-93.
95. Liu Y, Mao Y (2007), "Experimental studies on antitussive, expectorant and antiasthmatic effects of the extract from *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth", *Lishizhen Medicine and Materia Medica Research*, 18, 1920-1921.
96. Ito K, Akahoshi Y, Ito M, Kaneko S (2016), "Sedative effects of inhaled essential oil components of traditional fragrance *Pogostemon cablin* leaves and their structure–activity relationships", *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 6(2), 140-145.
97. Xie Y-C, Tang F (2009), "Protective effect of *Pogostemon cablin* on membrane fluidity of intestinal epithelia cell in ischemia/ reperfusion rats after ischemia/reperfusion", *Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine*, 29(7), 639-641.
98. Su Z, Liao J, Liu Y, et al. (2016), "Protective effects of patchouli alcohol isolated from *Pogostemon cablin* on lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice", *Experimental and Therapeutic Medicine*, 11(2), 674-682.

99. Commission CP (2010), *Pharmacopoeia of the People's Republic of China*, Chemical Industry Press, Beijing, China, 42-46.

100. Xian YF, Suo J, Huang XD, et al. (2007), "A pharmacological study on anti-inflammatory effects of refined Huodan recipe", *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae*, 13, 54-56.

101. Zhang D, Xiao LY, Cheng YW, et al. (1998), "Pharmacological action of Baoji Pill", *Traditional Chinese Drug Research & Clinical Pharmacology*, 9, 212-214.

102. Arthur HR (1954), "A phytochemical survey of some plants of North Borneo", *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 6(1), 66-72.

103. Mohammed Yusuf, MA Wahab, Md Yousuf, Jasim Uddin Chowdhury, Begum J (2007), "Some tribal medicinal plants of Chittagong Hill Tracts, Bangladesh", *Bangladesh J. Plant Taxon.*, 14(2), 117-128.

104. Valkenburg JLCH, Bunyapraphatsara N (2001), *Plant Resources of South-East Asia. Medicinal and poisonous plants, 2*, Backhuys Publishers, Leiden, 443-445.

105. Sen P, Dollo M, Choudhury MD, Choudhury D (2008), "Documentation of traditional herbal knowledge of Khamptis of Arunachal Pradesh.", *Indian Journal of Traditional Knowledge*, 7(3), 438-442.

106. Johnson JJ (2011), "Carnosol: a promising anti-cancer and anti-inflammatory agent", *Cancer Lettes*, 305(1), 1-7.

107. Marthanda Murthy M, Subramanyam M, Hima Bindu M, Annapurna J (2005), "Antimicrobial activity of clerodane diterpenoids from *Polyalthia longifolia* seeds", *Fitoterapia*, 76(3-4), 336-339.

108. Nagarajan A, Brindha P (2012), "Diterpenes-A Review on Therapeutic uses with special emphasis on Antidiabetic Activity", *Journal of Pharmacy Research*, 5(8), 4530-4540.

109. Pereira HS, Leão-Ferreira LR, Moussatché N, et al. (2004), "Antiviral activity of diterpenes isolated from the Brazilian marine alga Dictyota menstrualis against human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)", *Antiviral Research*, 64(1), 69-76.

110. Politi M, Braca A, De Tommasi N, et al. (2003), "Antimicrobial diterpenes from the seeds of *Cephalotaxus harringtonia* var. *drupacea*", *Planta Medica*, 69(5), 468-470.

111. Bộ môn Thực vật (1997), *Thực vật dược - Phân loại thực vật*, Trường Đại học Dược Hà Nội.

112. Bộ môn Thực vật (2004), *Thực tập thực vật và nhận biết cây thuốc*, Trường Đại học Dược Hà Nội.

113. Bộ môn Dược liệu (2006), *Thực tập Dược liệu - Phần Hóa học*, Trường Đại học Dược Hà Nội, 9-31.

114. Phạm Thanh Kỳ (2007), *Dược liệu học*, Nhà xuất bản Y học.

115. Bộ môn Dược liệu (2012), *Phương pháp nghiên cứu dược liệu*, trường Đại học Y Dược TP. Hồ Chí Minh, TP. Hồ Chí Minh, 1-6.

116. Nguyễn văn Đàn, Nguyễn Viết Tựu (1985), *Phương pháp nghiên cứu hóa học cây thuốc*, Nxb Y học, TP. Hồ Chí Minh, 19-23, 43-52, 58-74, 243-283.

117. Nguyễn Kim Phi Phụng (2007), *Phương pháp cô lập hợp chất hữu cơ*, Nxb Đại học Quốc gia TP. Hồ Chí Minh, TP. Hồ Chí Minh.

118. Nguyễn Duy Thuần (2006), *Chiết xuất dược liệu – Nghiên cứu thuốc từ thảo dược (Giáo trình sau Đại học)*, Hà Nội, 199-222.

119. Nguyễn Thị Hoài (2018), *Phương pháp nghiên cứu dược liệu. Tập 1: Các phương pháp sắc ký dùng trong nghiên cứu hóa học cây thuốc*, NXB Đại học Huế.

120. Bộ Y tế (2012), *Hóa phân tích - tập 2*, Nxb Y học, Hà Nội, 168-200.

121. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, et al. (1982), "Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids", *Anal Biochem*, 126, 131-138.

122. Joo T, Sowndhararajan K, Hong S, et al. (2014), "Inhibition of nitric oxide production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells by stem bark of *Ulmus pumila* L", *Saudi Journal of Biological Sciences*, 21(5), 427-35.

123. Mosmann T (1983), "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays", *J Immunol Methods*, 65(1-2), 55-63.

124. Zhu J, Luo C, Wang P, et al. (2013), "Saikosaponin A mediates the inflammatory response by inhibiting the MAPK and NF-κB pathways in LPS stimulated RAW 264.7 cells. ", *Experimental and Therapeutic Medicine*, 5, 1345-1350.

125. Monks A, Scudiero D, Skehan P, et al. (1991), "Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines", *J Natl Cancer Inst*, 83(11), 757-766.

126. Allen S, Sotos J, Sylte MJ, Czuprynski CJ (2001), "Use of Hoechst 33342 staining to detect apoptotic changes in bovine mononuclear phagocytes infected with *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis. ", *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 8(2), 460-464.

127. Darzynkiewicz Z, Bruno S, Del Bino G, et al. (1992), "Features of apoptotic cells measured by flow cytometry", *Cytometry*, 13(8), 795-808.

128. Scott CW, Sobotka-Briner C, Wilkins DE, et al. (2003), "Novel small molecule inhibitors of caspase-3 block cellular and biochemical features of apoptosis", *Journal of Pharmacololgy and Experimental Therapeutics*, 304(1), 433-440.

129. Đỗ Trung Đàm (2014), *Phương pháp xác định độc tính của thuốc*, Nxb Y học – Hà Nội

130. Viện Dược liệu (2008), *Phương pháp nghiên cứu tác dụng dược lý của thuốc từ thảo dược*, NXB Khoa học và Kỹ thuật, 352-368.

131. Moˆnica R. S. de Arau´jo, Francisco J. Q. Monte, Braz-Filho R (2009), "A New Sesquiterpene from *Ximenia americana* Linn.", *Helvetica Chimica Acta*, 92(1), 127-132.

132. Emilie KB, Louise K, Chi N, et al. (2022), "Isolation and structure elucidation of caryophyllane sesquiterpenoids from leaves of *Eremophila spathulata*", *Phytochemistry Letters*, 47(2022), 156-163.

133. Fu H-Z, Luo Y-M, Li C-J, Yang J-Z, Zhang D-M (2010), "Psidials A−C, Three Unusual Meroterpenoids from the Leaves of Psidium guajava L", *Organic Letters*, 12(4), 656-659.

134. Shao M, Wang Y, Liu Z, et al. (2010), "Psiguadials A and B, Two Novel Meroterpenoids with Unusual Skeletons from the Leaves of Psidium guajava", *Organic Letters*, 12(21), 5040-5043.

135. Yang X-L, Hsieh K-L, Liu J-K (2007), "Guajadial: An Unusual Meroterpenoid from Guava Leaves *Psidium guajava*", *Organic Letters*, 9(24), 5135-5138.

136. Hirakura K, Sugama K, Morita M, et al. (2000), "Three Diels-Alder type adducts, ginsenoynes L, M, and N, from the roots of *Panax ginseng* ", *Heterocycles*, 53, 2451-2457.

137. Randriamiharisoa R, Gaydou EM, Faure R, Bianchini JP (1986), "Carbon-13 NMR spectra of five sesquiterpenes isolated from Ylang Ylang essential oil", *Magnetic Resonance in Chemistry*, 24(3), 275-276.

138. Ishiguro K, Yamaki M, Kashihara M, Takagi S (1987), "Saroaspidin A, B, and C: additional antibiotic compounds from Hypericum japonicum", *Planta Medica*, 53(5), 415-417.

139. Appendino G, Ottino M, Marquez N, et al. (2007), "Arzanol, an Anti-inflammatory and Anti-HIV-1 Phloroglucinol α-Pyrone from *Helichrysum italicum* ssp. microphyllum", *Journal of Natural Products*, 70(4), 608-612.

140. Petersen F, Zähner H, Metzger JW, Freund S, Hummel RP (1993), "Germicidin, an autoregulative germination inhibitor of *Streptomyces viridochromogenes* NRRL B-1551", *J Antibiot (Tokyo)*, 46(7), 1126-1138.

141. Bohlmann F, Abraham W-R, Robinson H, King RM (1980), "A new labdane derivative and geranylphloroglucinols from *Achyrocline alata*", *Phytochemistry*, 19(11), 2475-2477.

142. Hänsel R, Cybulski E-M, Çubukçu B, et al. (1980), "Neue pyron-derivate aus *Helichrysum-arten*", *Phytochemistry*, 19(4), 639-644.

143. Mutanyatta-Comar J, Phale OJK, Abegaz BM, Croft K (2006), "Phloroglucinol derivatives and flavones from *Helichrysum paronychioides* ", *Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia*, 20(1), 61-68.

144. George HS, Karl DS (1968), "*Calophyllum* products. III. Structure of blancoic acids ", *The Journal of Organic Chemistry*, 33(11), 4185–4190.

145. Frisch M, Trucks G, Schlegel H, et al. (2009), *Gaussian 09, Revision A.02*, Gaussian, Inc., Wallingford CT.

146. Wang Q, Luo SD, Ju P, Wang YF (2007), "Two Novel Nortriterpenoids from *Gomphostemma parviflorum*", *Helvetica Chimica Acta*, 90(7), 1360-1365.

147. Svatos A, Urbanová K, Valterová I (2002), "The First Synthesis of Geranyllinalool Enantiomers", *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, 67.

148. Forgo P, Kover KE (2004), "Gradient enhanced selective experiments in the 1H NMR chemical shift assignment of the skeleton and side-chain resonances of stigmasterol, a phytosterol derivative", *Steroids*, 69(1), 43-50.

149. Nazrul Islam Bhuiyan Md, Varshney VK, Varshney SC, Tomar A, Akter4 F (2011), "Composition of essential oil of the leaf and inflorescence of *Pogostemon benghalensis* (Burm.f.) Kuntze", *International Research Journal Plant Science*, 2(9), 271-275.

150. Gozari M, Alborz M, El-Seedi HR, Jassbi AR (2021), "Chemistry, biosynthesis and biological activity of terpenoids and meroterpenoids in bacteria and fungi isolated from different marine habitats", *Eur J Med Chem*, 210, 112957.

151. Huang J-W, Li C-J, Yang J-Z, et al. (2021), "Guajamers A—I, Rearranged Polycyclic Phloroglucinol Meroterpenoids from *Psidium guajava* Leaves and Their Antibacterial Activity", *Chinese Journal of Chemistry*, 39(5), 1129-1137.

152. Long Y, Cui H, Liu X, et al. (2017), "Acetylcholinesterase Inhibitory Meroterpenoid from a Mangrove Endophytic Fungus *Aspergillus* sp. 16-5c", *Molecules*, 22(5).

153. Russo D, Milella L (2020), *Chapter 14 - Analysis of meroterpenoids*, Elsevier.

154. Manoj G, Manohar SH, Murthy HN (2012), "Chemical constituents, antioxidant and antimocrobial activity of essential oil of *Pogostemon paniculatus* (Willd.)", *Natural Product Research*, 26(22), 2152-2154.

155. Prakash O, Joshi S, Shukla AK, Pant AK (2007), "Sesquiterpenoid Rich Essential Oil from the Leaves of Pogostemon patchouli Pellet Grown Organically Under Tarai Conditions", *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 10(2), 157-161.

156. Chen S, Liu Z, Tan H, et al. (2020), "Photeroids A and B, unique phenol–sesquiterpene meroterpenoids from the deep-sea-derived fungus *Phomopsis tersa*", *Organic & Biomolecular Chemistry*, 18(4), 642-645.

157. Crockett SL, Wenzig E-M, Kunert O, Bauer R (2008), "Anti-inflammatory phloroglucinol derivatives from *Hypericum empetrifolium*", *Phytochemistry letters*, 1(1), 37-43.

158. Su J-C, Wang S, Cheng W, et al. (2018), "Phloroglucinol Derivatives with Unusual Skeletons from *Cleistocalyx operculatus* and Their in Vitro Antiviral Activity", *The Journal of Organic Chemistry*, 83(15), 8522-8532.

159. Le DD, Nguyen DH, Zhao BT, et al. (2018), "28-Noroleanane-derived spirocyclic triterpenoids and iridoid glucosides from the roots of *Phlomoides umbrosa* (Turcz.) Kamelin & Makhm with their cytotoxic effects", *Phytochemistry*, 153, 138-146.

160. Liu P, Yao Z, Zhang W, Takaishi Y, Duan HQ (2008), "Novel Nortriterpenes from *Phlomis umbrosa*", *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 56(7), 951-955.

161. Nakamura S, Moriura T, Park S, et al. (2012), "Melanogenesis inhibitory and fibroblast proliferation accelerating effects of noroleanane- and oleanane-type triterpene oligoglycosides from the flower buds of *Camellia japonica*", *J Nat Prod*, 75(8), 1425-1430.

162. Zheng Y, Yan H, Han J, Tan N (2012), "[A new C-28 nortriterpenoid from fruits of *Leonurus japonicus*]", *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 37(14), 2088-1091.

163. Satyal P, Chuong NTH, Pham VT, et al. (2018), "Chemical Composition of the Essential Oils of *Pogostemon auricularius*, a Vietnamese Medicinal Plant", *Natural Product Communications*, 13(5), 1934578X1801300524.

164. Chávez-González ML, Rodríguez-Herrera R, Aguilar CN (2016), *Chapter 11 - Essential Oils: A Natural Alternative to Combat Antibiotics Resistance*, Academic Press, 227-237.

165. Ludwiczuk A, Skalicka-Woźniak K, Georgiev MI (2017), *Chapter 11 - Terpenoids*, Academic Press, Boston, 233-266.

166. Rungqu P, Oyedeji O, Nkeh-Chungag B, et al. (2016), "Anti-inflammatory activity of the essential oils of *Cymbopogon validus* (Stapf) Stapf ex Burtt Davy from Eastern Cape, South Africa", *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 9(5), 426-431.

167. Wang T-y, Li Q, Bi K-s (2018), "Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate", *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 13(1), 12-23.

168. Liou SS, Shieh WL, Cheng TH, Won SJ, Lin CN (1993), "γ-Pyrone Compounds as Potential Anti-cancer Drugs", *Journal of pharmacy and pharmacology*, 45(9), 791-794.

169. Đỗ Trung Đàm (2017), *Thuốc giảm đau chống viêm và các phương pháp nghiên cứu tác dụng dược lý*, Nhà xuất bản Y học, 113-117, 427-605.

170. Jean-Marc C, Mervyn S (2018), *Inflammation: From Molecular and Cellular Mechanisms to the Clinic*, Wiley-VCH, 1-10, 1661-1677.

171. Stojanovic M, Dzambaski Z, Bondzic B, Aleksic J, Baranac-Stojanovic M (2014), "4-Oxothiazolidines with Exocyclic C=C Double Bond(s): Synthesis, Structure, Reactions and Biological Activity", *Current Organic Chemistry*, 18(9), 1108-1148.

172. Kong Q, Ren X, Qi J, et al. (2019), "Carbon-Carbon Double Bond and Resorcinol in Resveratrol and Its Analogues: What Is the Characteristic Structure in Quenching Singlet Oxygen?", *Biomolecules*, 9(7).

173. Parton M, Gore M, Eisen T (2006), "Role of cytokine therapy in 2006 and beyond for metastatic renal cell cancer", *J Clin Oncol*, 24(35), 5584-5592.

174. Stenvinkel P, Ketteler M, Johnson RJ, et al. (2005), "IL-10, IL-6, and TNF-α: Central factors in the altered cytokine network of uremia—The good, the bad, and the ugly", *Kidney International*, 67(4), 1216-1233.

175. Opal SM, DePalo VA (2000), "Anti-inflammatory cytokines", *Chest*, 117(4), 1162-1172.

176. Su D-L, Lu Z-M, Shen M-N, Li X, Sun L-Y (2012), "Roles of Pro- and Anti-Inflammatory Cytokines in the Pathogenesis of SLE", *J Biomedicine and Biotechnology*, 2012, 347141.

177. Elizabeth SF, F. Passos G, Medeiros R, et al. (2007), "Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (−)-*trans*-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*", *European Journal of Pharmacology*, 569, 228-236.

178. Sankari SL, Masthan KM, Babu NA, Bhattacharjee T, Elumalai M (2012), "Apoptosis in cancer-an update", *Asian Pac J Cancer Prev*, 13(10), 4873-4878.
179. Pfeffer CM, Singh ATK (2018), "Apoptosis: A Target for Anticancer Therapy", *Int J Mol Sci*, 19(2).
180. Fulda S (2015), "Targeting apoptosis for anticancer therapy", *Semin Cancer Biol*, 31, 84-88.
181. Durand RE (1982), "Use of Hoechst 33342 for cell selection from multicell systems", *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 30(2), 117-122.

DANH MỤC CÁC PHỤ LỤC CỦA LUẬN ÁN

		Trang
PHỤ LỤC 1	**Phiếu giám định tên khoa học**	**PL 1**
PHỤ LỤC 2	**Hình ảnh mẫu tiêu bản Tu hùng tai - *Pogostemon auricularius***	**PL-2**
PHỤ LỤC 3	**Phổ của các hợp chất tinh khiết phân lập được từ loài *Pogostemon auricularius***	**PL 3**
	Phụ lục 3.1. Phổ của hợp chất PH16	**PL 4**
	Phụ lục 3.2. Phổ của hợp chất PH15	**PL 18**
	Phụ lục 3.3. Phổ của hợp chất PH4	**PL 28**
	Phụ lục 3.4. Phổ của hợp chất PH10	**PL 44**
	Phụ lục 3.5. Phổ của hợp chất PH19	**PL 53**
	Phụ lục 3.6. Phổ của hợp chất PH13	**PL 64**
	Phụ lục 3.7. Phổ của hợp chất PH6	**PL 73**
	Phụ lục 3.8. Phổ của hợp chất PH18	**PL 81**
	Phụ lục 3.9. Phổ của hợp chất PH14	**PL 93**
	Phụ lục 3.10. Phổ của hợp chất PH5	**PL 108**
	Phụ lục 3.11. Phổ của hợp chất PH17	**PL 113**

PHỤ LỤC 1
Phiếu giám định tên khoa học

VIỆN SINH THÁI VÀ
TÀI NGUYÊN SINH VẬT
PHÒNG THỰC VẬT

CỘNG HOÀ XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập - Tự do - Hạnh phúc

Hà Nội, ngày 04 tháng 08 năm 2016

Kính gửi: TS. Nguyễn Thị Hoài, Khoa Y Dược, Trường Đại học Y Dược Huế

Phòng Thực vật, Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật nhận được Đề nghị giám định mẫu thực vật, ngày 08/04/2016 của
Y Dược, Trường Đại học Y Dược Huế, có gửi theo mẫu vật và toàn bộ thông tin liên quan đến mẫu vật.

Địa điểm thu mẫu: huyện Hướng Hóa, tỉnh Quảng Trị; thời gian thu mẫu: tháng 02/2016; người thu: Lê Tuấn Anh, Trung tâm Khoa học và Công nghệ Quảng Trị.

Đại diện của Phòng Thực vật, Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật đã tiến hành giám định mẫu trên. Người giám định: TS. Nguyễn Thế Cường. Kết thúc giám định, đại diện của Phòng Thực vật, Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật có kết luận giám định sau:

Mẫu mang số 01 có tên khoa học là *Pogostemon auricularius* (L.) Hassk. (Tu hùng tai), thuộc họ Bạc hà (Lamiaceae)

Mẫu mang số 02 có tên khoa học là *Huperzia phlegmaria* (L.) Rothm. (Thông đất râu), thuộc họ Thông đất (Lycopodiaceae)

Xin gửi kết luận giám định tới TS. Nguyễn Thị Hoài, Khoa Y Dược,

Xác nhận của Viện Sinh thái & TNSV
PHÓ VIỆN TRƯỞNG

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM
VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT

Trương Xuân Lam

Người giám định

Nguyễn Thế Cường

PHỤ LỤC 2

Hình ảnh mẫu tiêu bản Tu hùng tai - *Pogostemon auricularius*

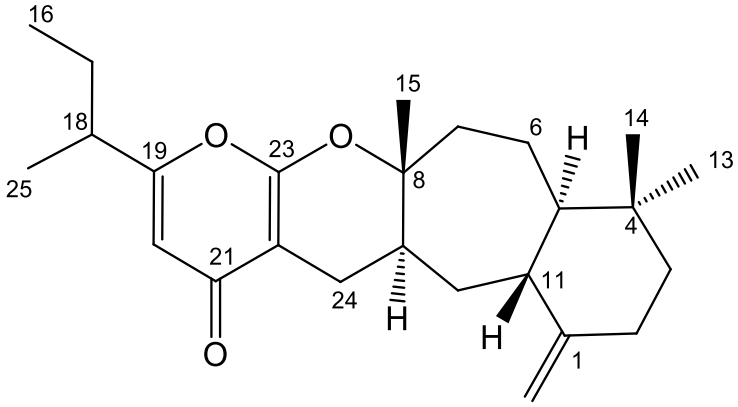
PHỤ LỤC 3

Phổ của các hợp chất tinh khiết phân lập được từ loài *Pogostemon auricularius*

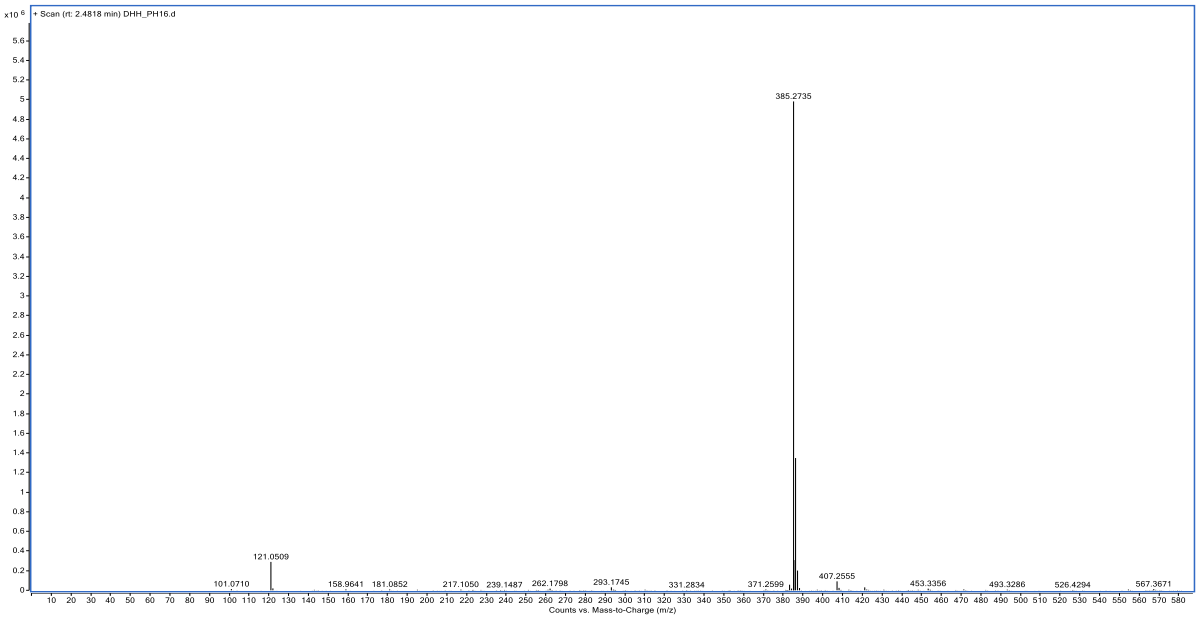
Phụ lục 3.1. Phổ của hợp chất PH16
(Pogostemin A)

CTPT: $C_{25}H_{36}O_3$

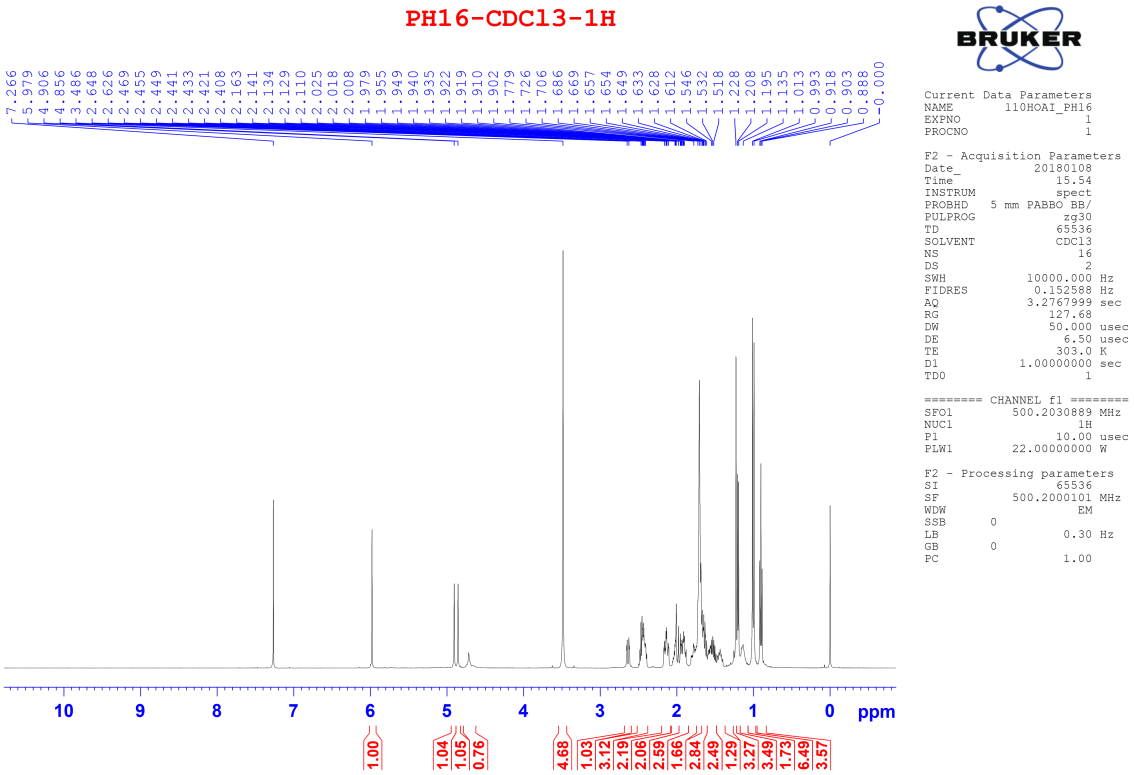
KLPT: 384,5600



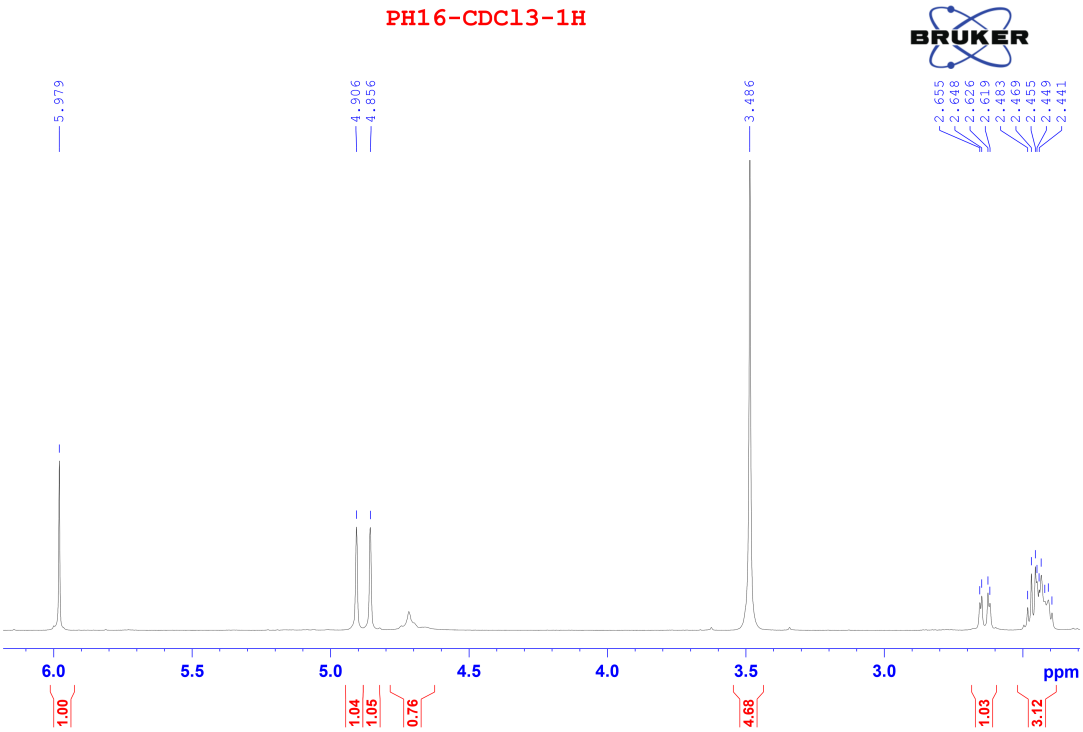
- Phổ HR-ESI-MS
- Phổ ^{1}H-NMR
- Phổ ^{13}C-NMR
- Phổ HMBC
- Phổ HSQC
- Phổ COSY
- Phổ NOESY



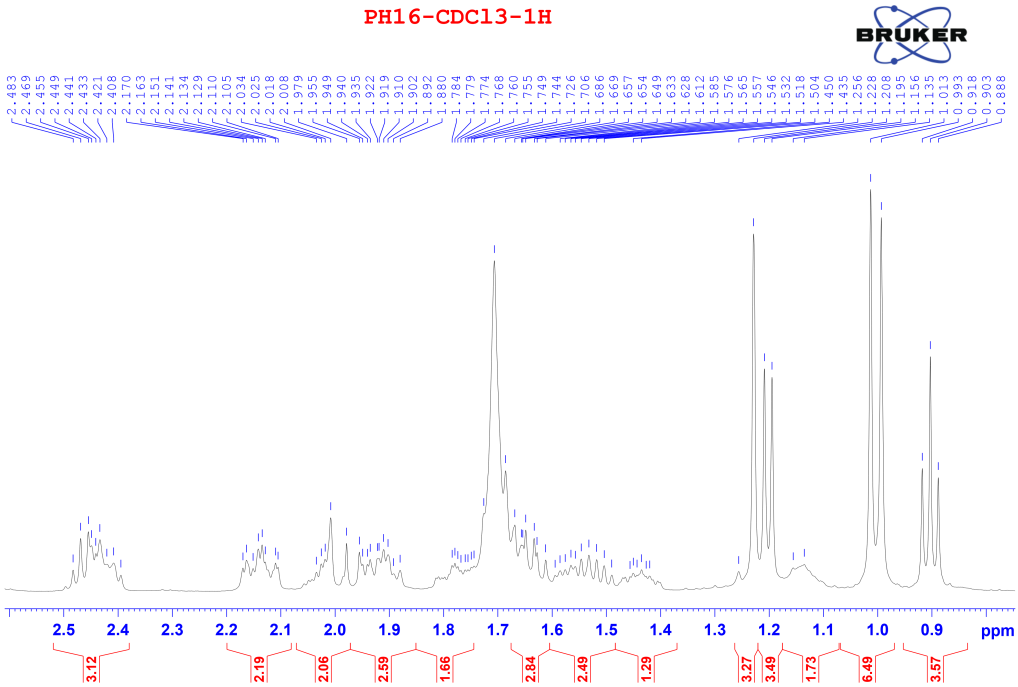
Phổ HR-ESI-MS của hợp chất PH16



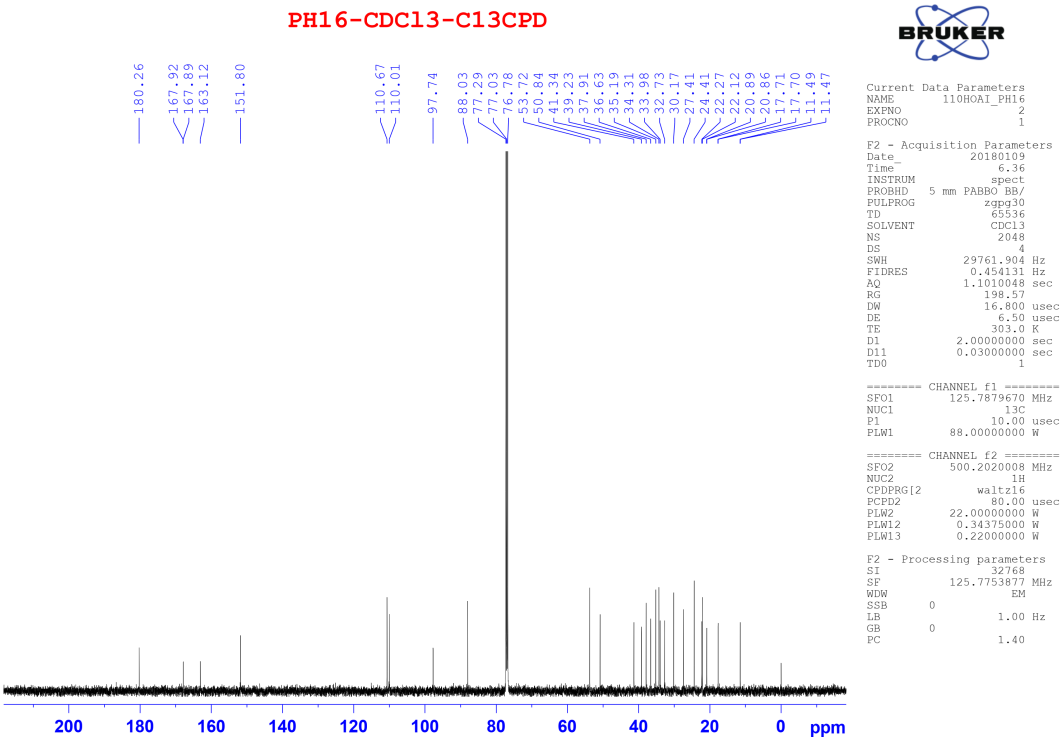
Phổ ^{1}H-NMR của hợp chất PH16



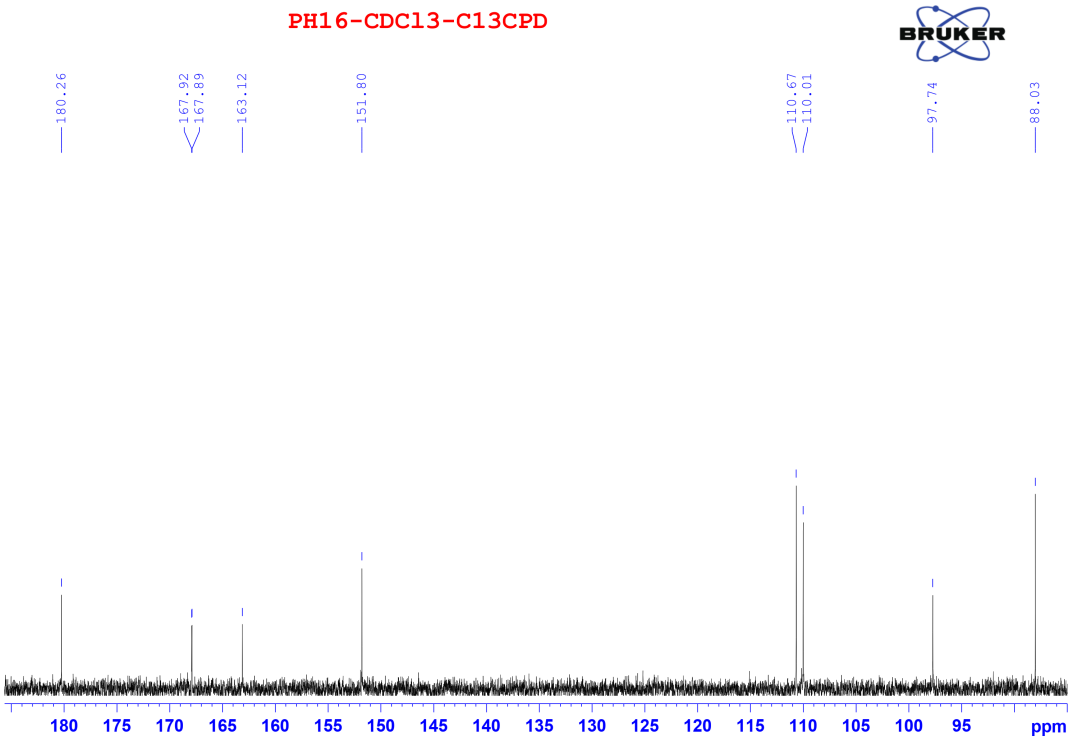
Phổ ^{1}H-NMR của hợp chất PH16



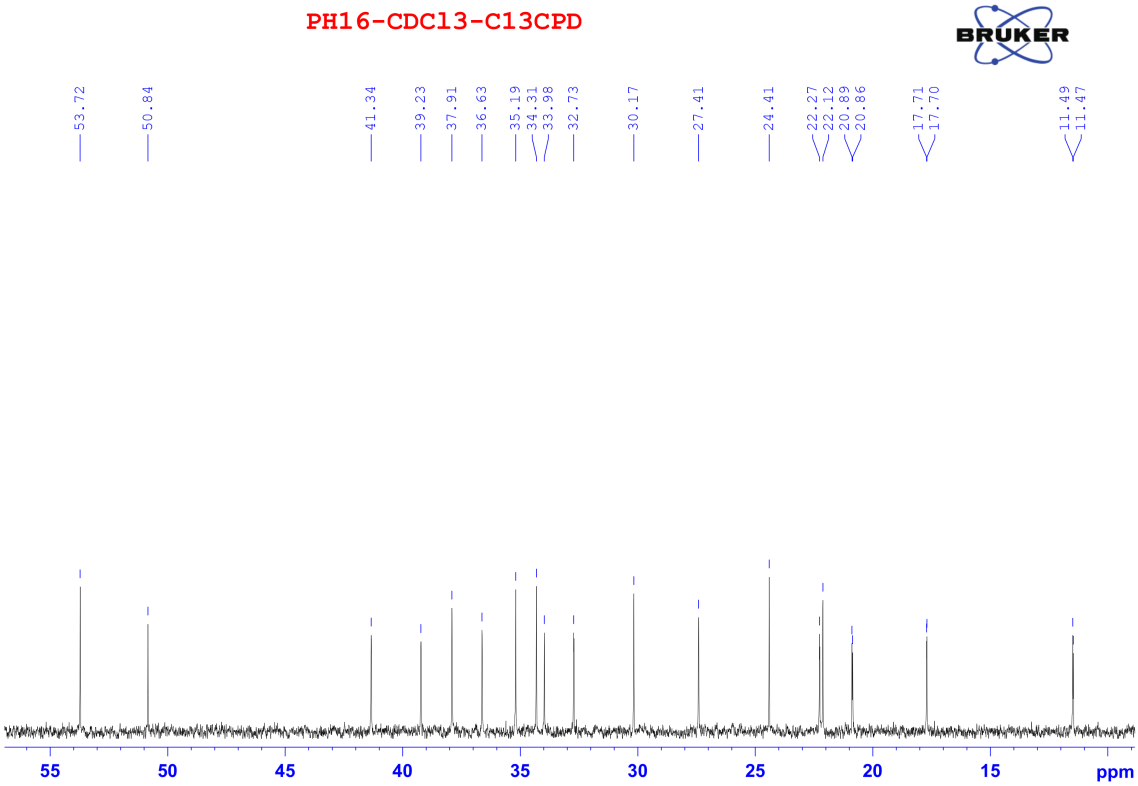
Phổ ^{1}H-NMR của hợp chất PH16



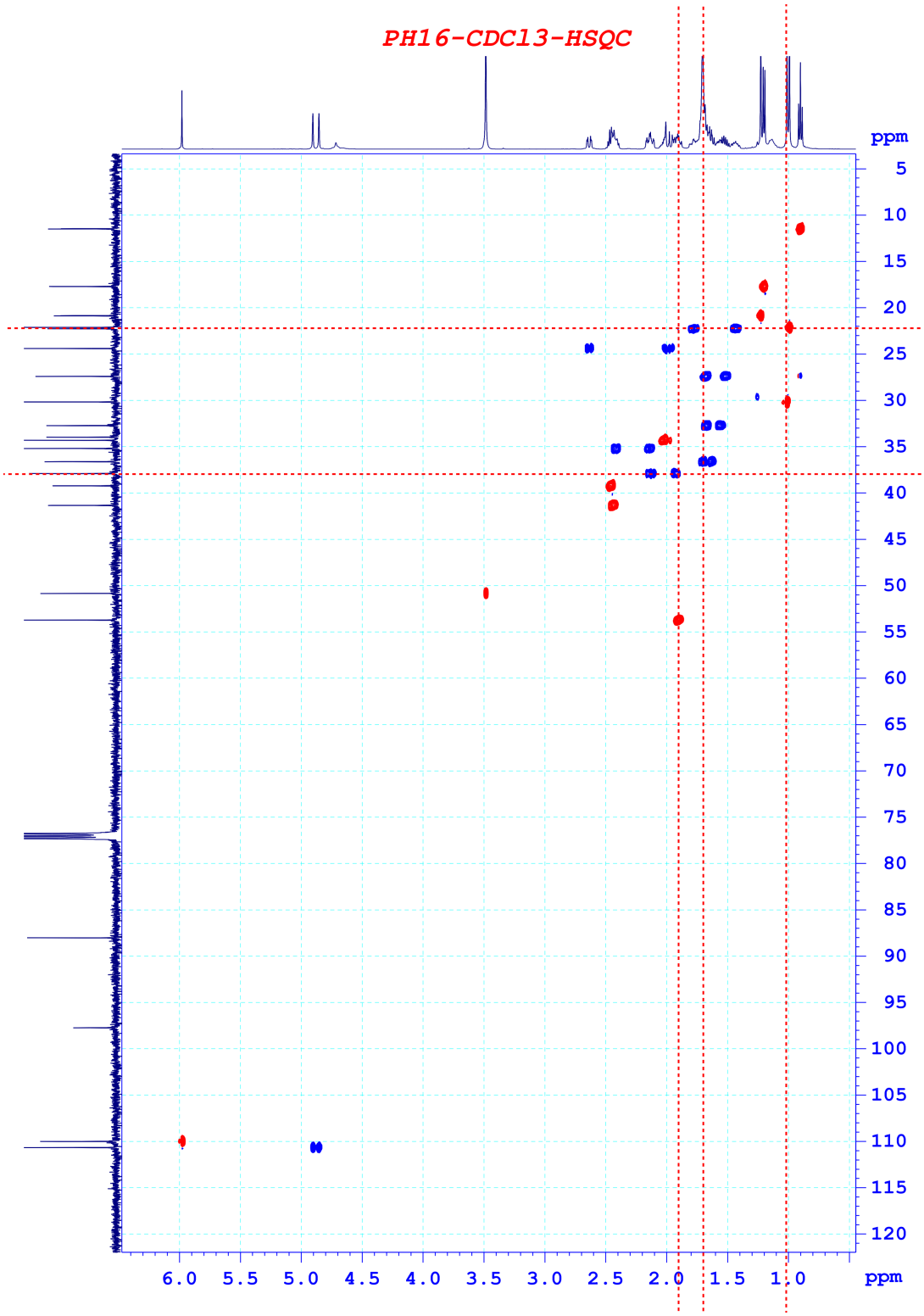
Phổ ^{13}C-NMR của hợp chất PH16



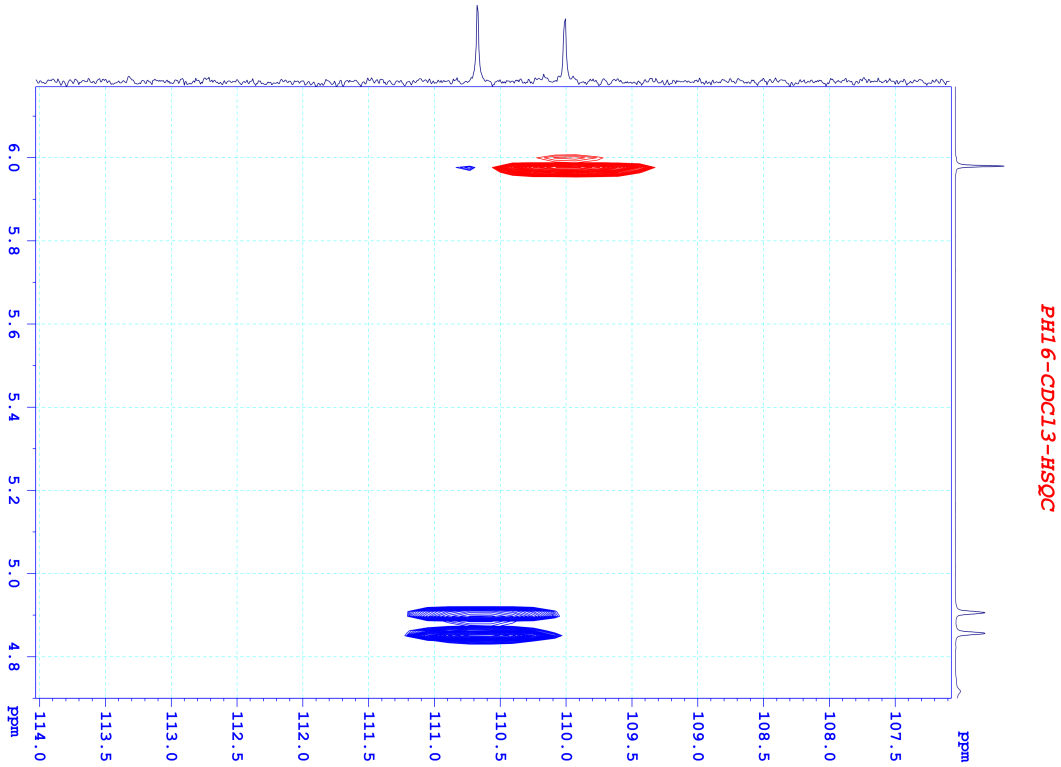
Phổ ^{13}C-NMR của hợp chất PH16



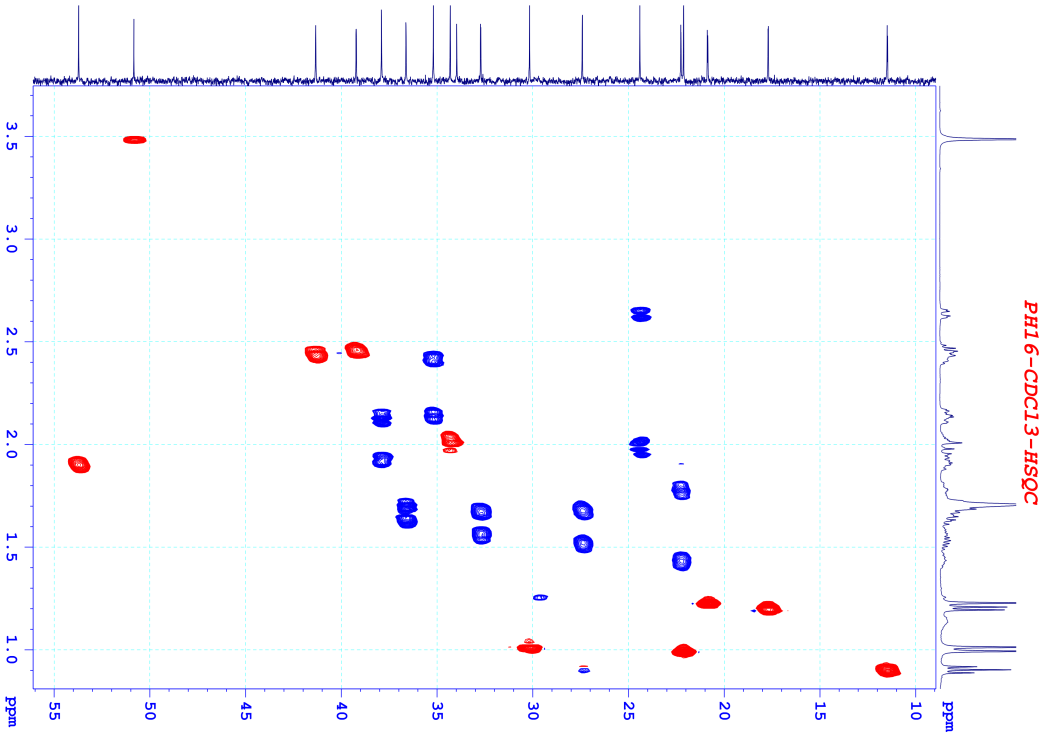
Phổ ^{13}C-NMR của hợp chất PH16



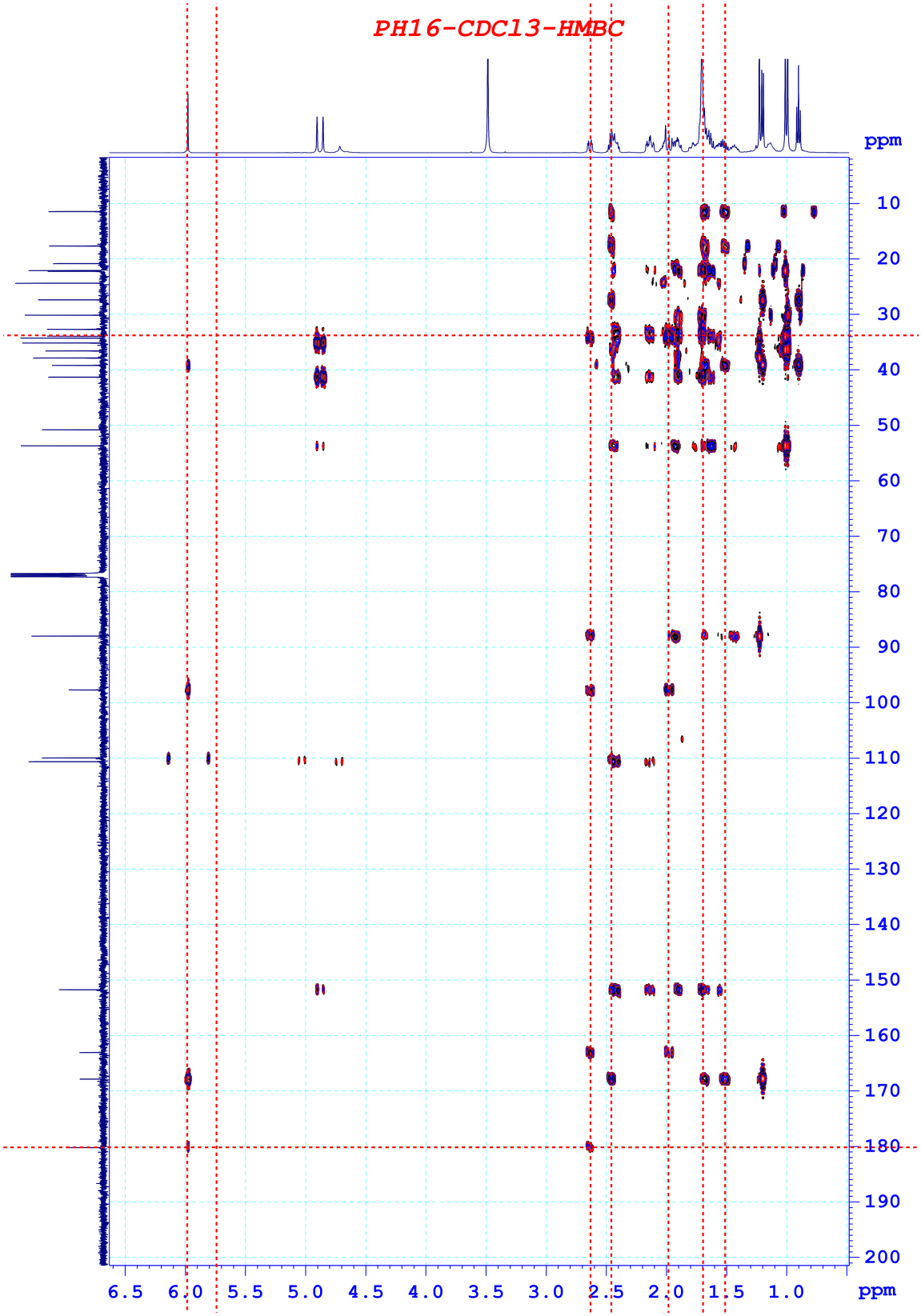
Phổ HSQC của hợp chất PH16



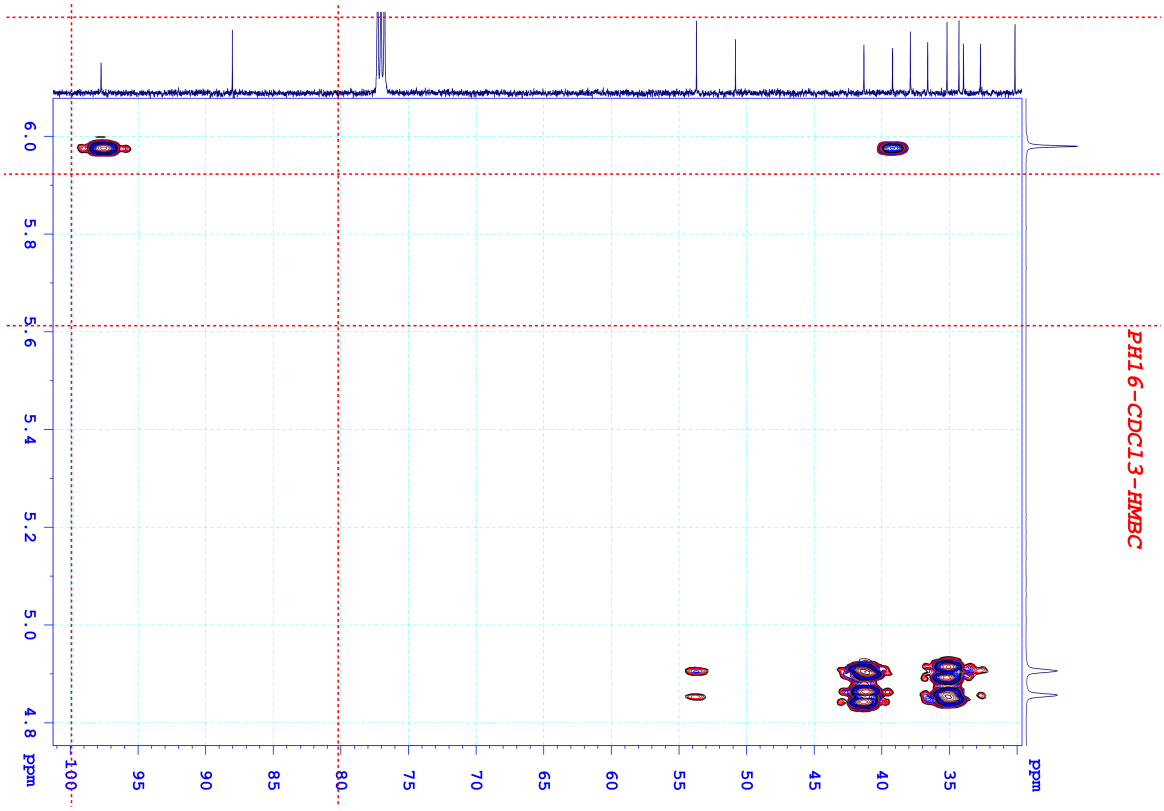
Phổ HSQC của hợp chất PH16



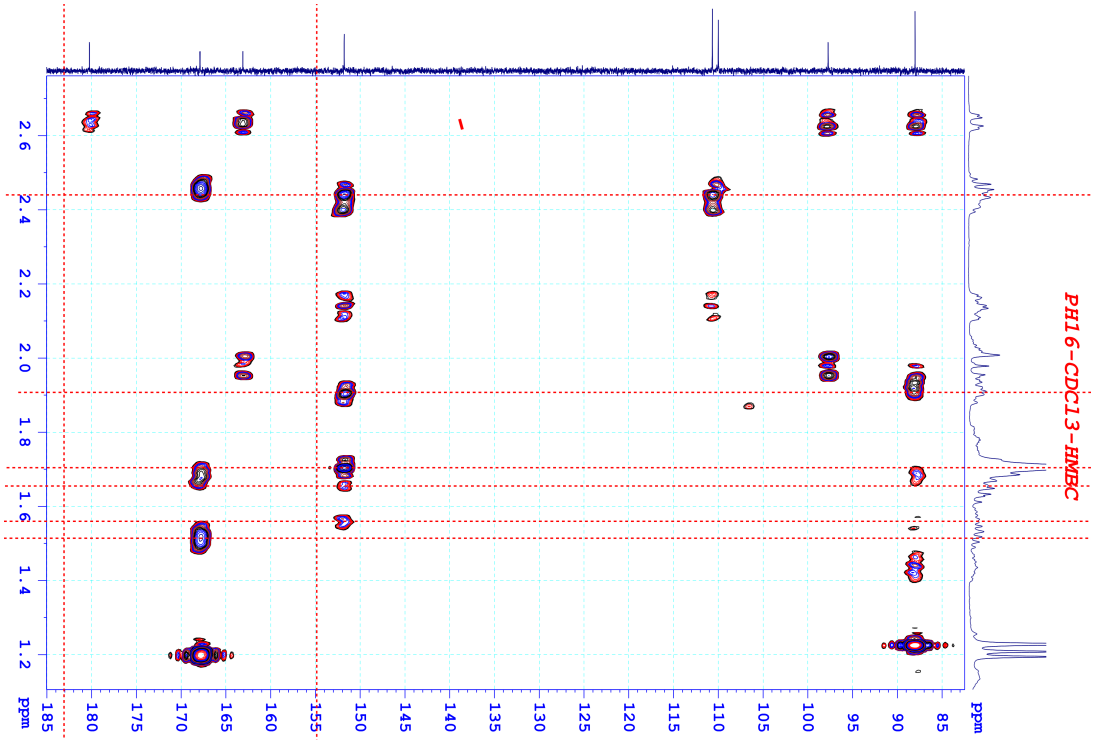
Phổ HSQC của hợp chất PH16



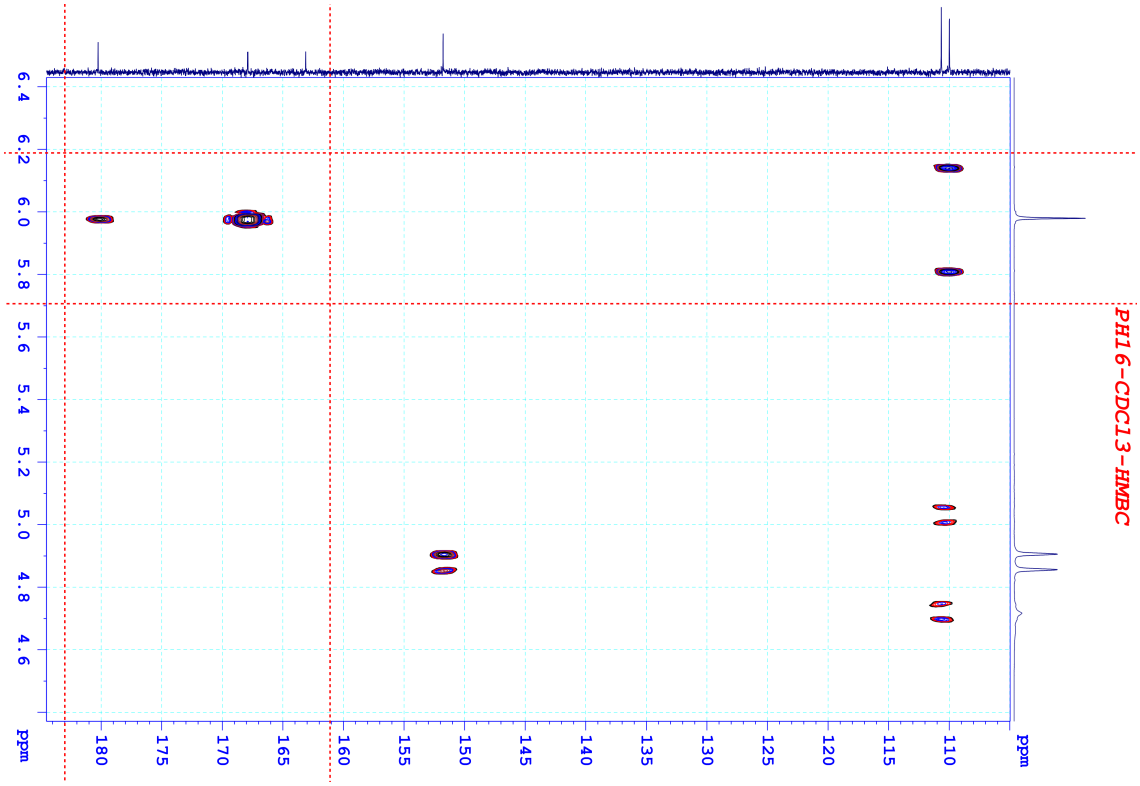
Phổ HMBC của hợp chất PH16



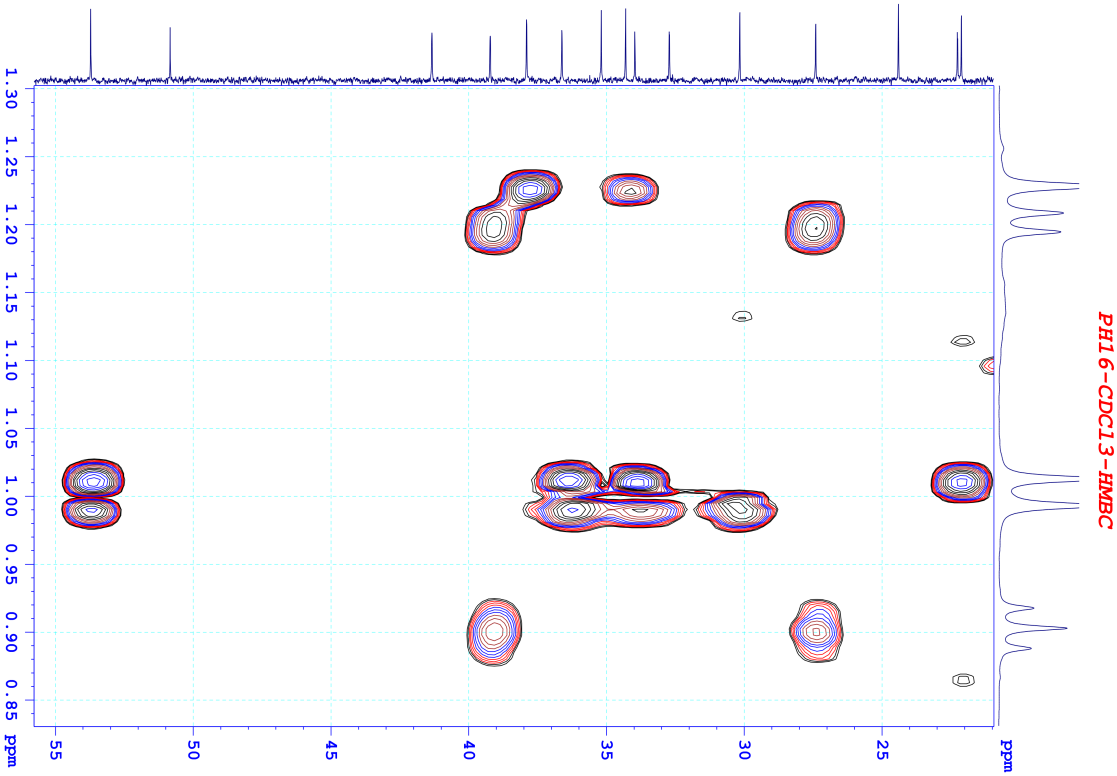
Phổ HMBC của hợp chất PH16



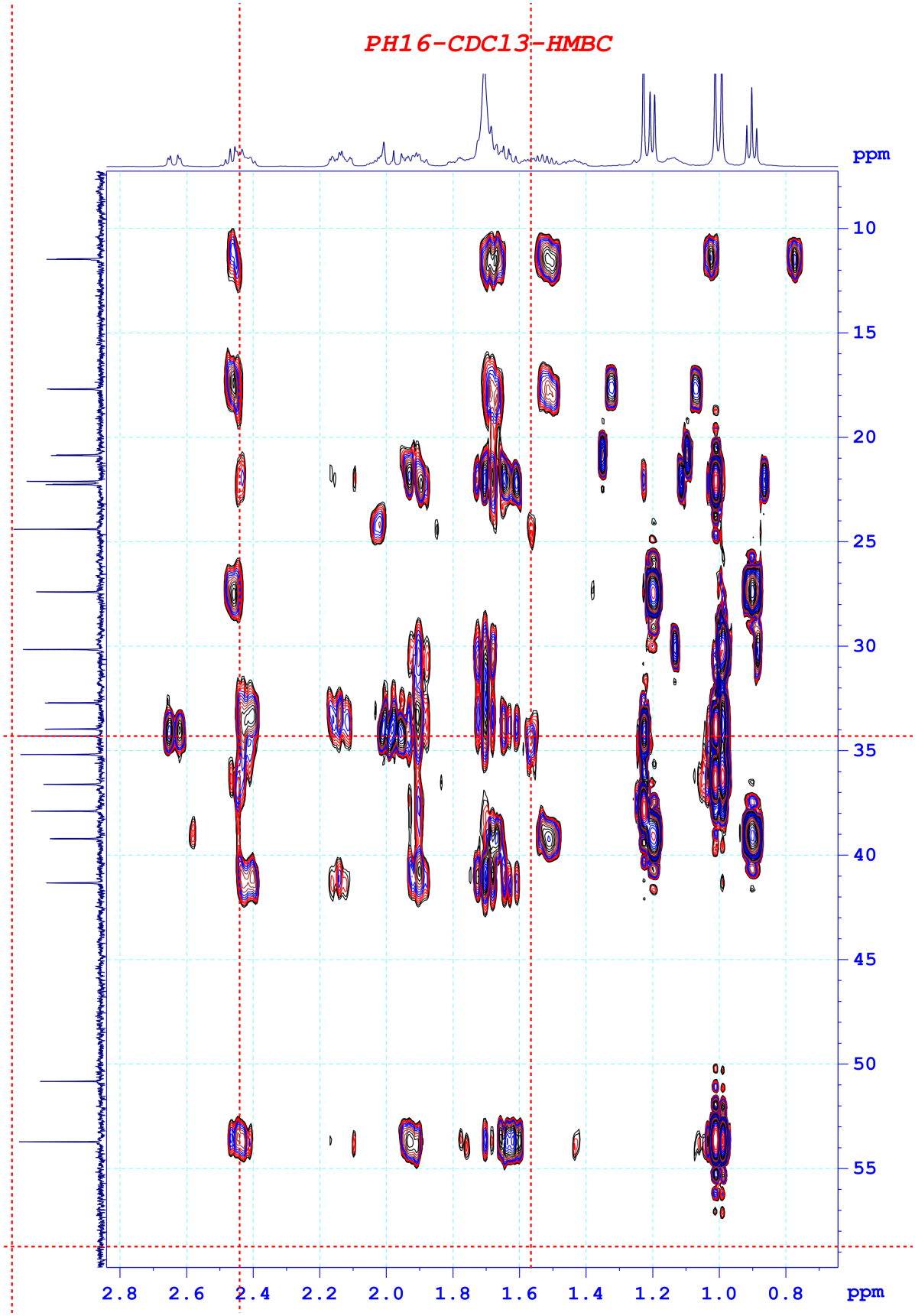
Phổ HMBC của hợp chất PH16



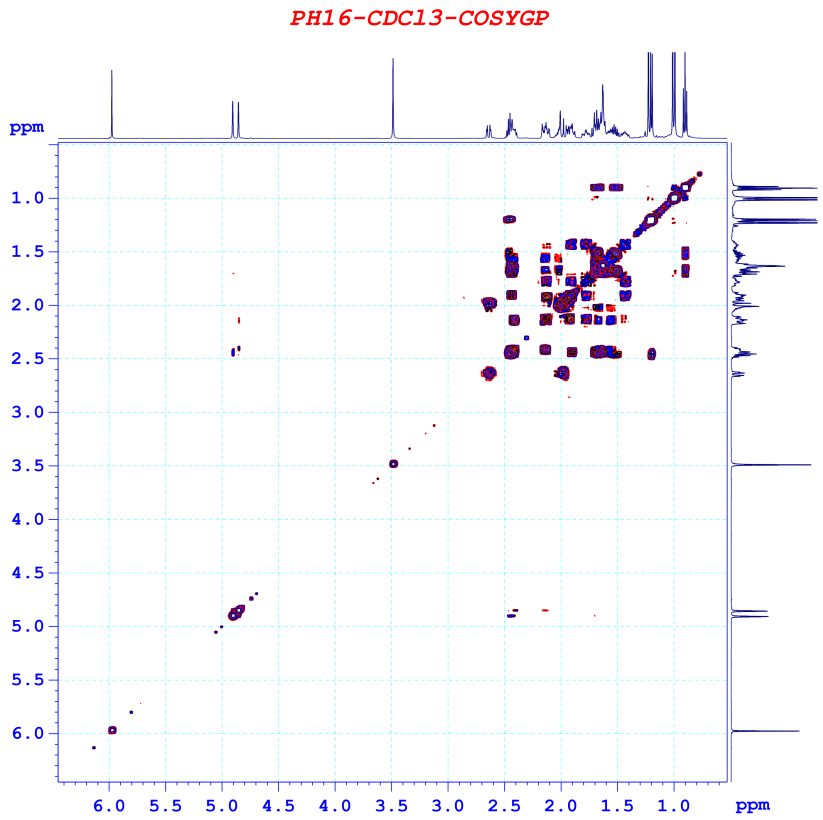
Phổ HMBC của hợp chất PH16



Phổ HMBC của hợp chất PH16

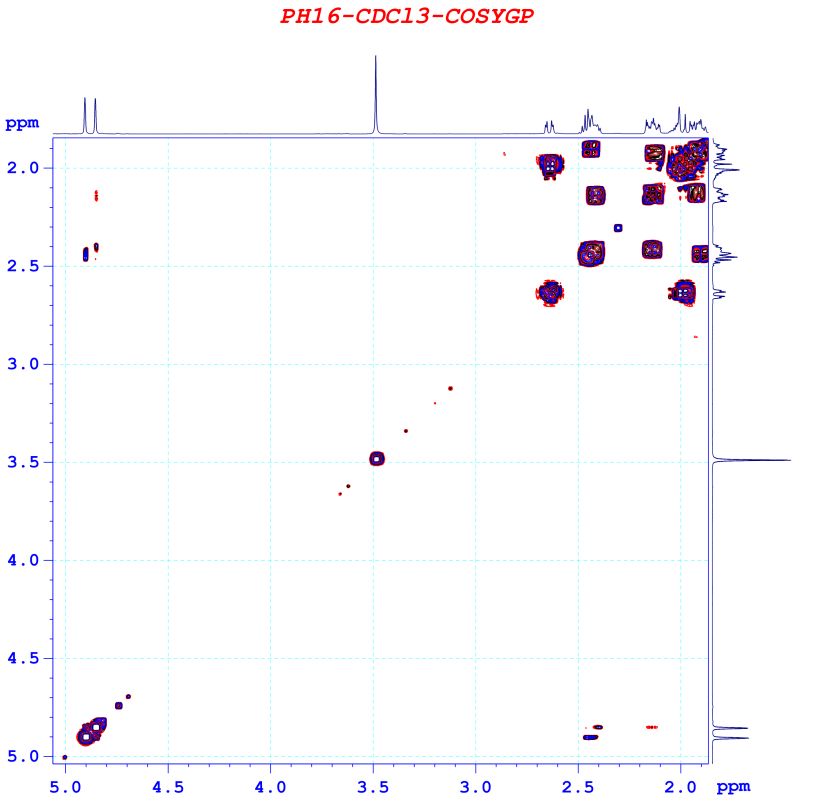


Phổ HMBC của hợp chất PH16



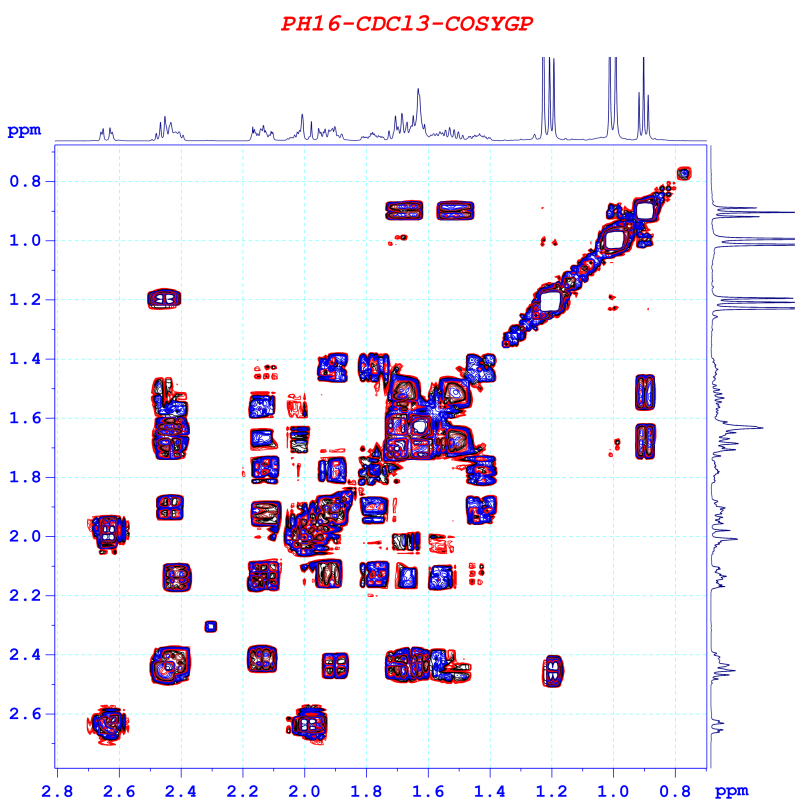

```
Current Data Parameters
NAME          110HOAI_PH16
EXPNO                    5
PROCNO                   1

F2 - Acquisition Parameters
Date_              20180114
Time                   5.40
INSTRUM               spect
PROBHD    5 mm PABBO BB/
PULPROG        cosygpppqf
TD                     2048
SOLVENT               CDCl3
NS                        4
DS                        8
SWH               3521.127 Hz
FIDRES            1.719300 Hz
AQ               0.2908160 sec
RG                    64.21
DW                  142.000 usec
DE                     6.50 usec
TE                    303.0 K
D0               0.00000300 sec
D1               1.86237395 sec
D11              0.03000000 sec
D12              0.00002000 sec
D13              0.00000400 sec
D16              0.00020000 sec
IN0              0.00028400 sec

======== CHANNEL f1 ========
SFO1            500.2014802 MHz
NUC1                      1H
P0                     10.00 usec
P1                     10.00 usec
P17                 2500.00 usec
PLW1            22.00000000 W
PLW10            3.25440001 W

====== GRADIENT CHANNEL =====
GPNAM[1]        SMSQ10.100
GPZ1                   10.00 %
P16                  1000.00 usec

F1 - Acquisition parameters
TD                       128
SFO1                500.2015 MHz
FIDRES             55.017605 Hz
SW                      7.039 ppm
FnMODE                     QF

F2 - Processing parameters
SI                       1024
SF               500.20001 35 MHz
WDW                     QSINE
SSB        0
LB         0 Hz
GB         0
PC                       1.40

F1 - Processing parameters
SI                       1024
MC2                        QF
SF               500.2000131 MHz
WDW                     QSINE
SSB        0
LB         0 Hz
GB         0
```

Phổ COSY của hợp chất PH16



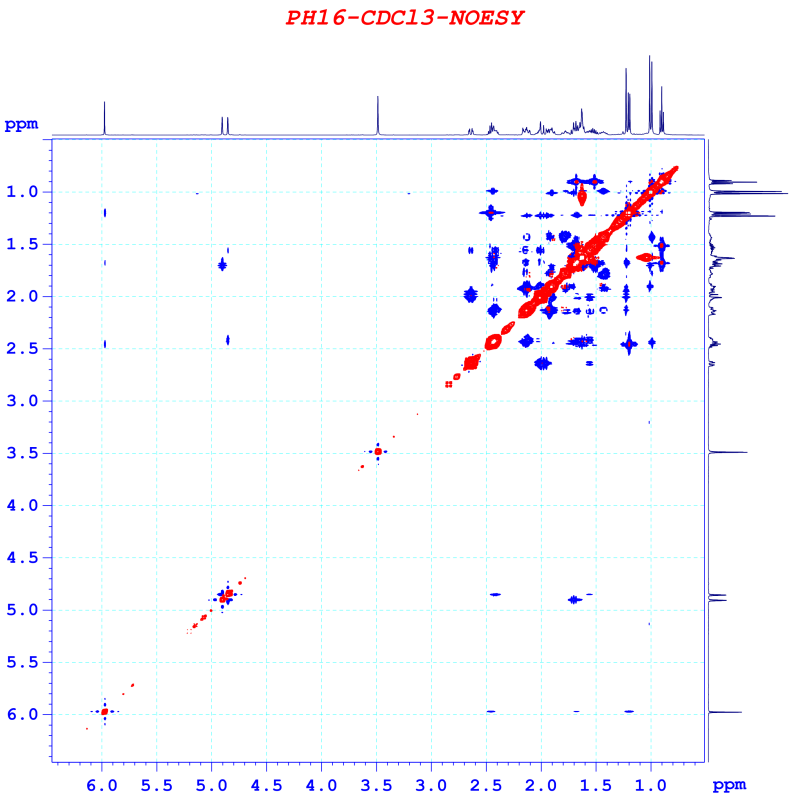

```
Current Data Parameters
NAME          110HOAI_PH16
EXPNO                    5
PROCNO                   1

F2 - Acquisition Parameters
Date_              20180114
Time                   5.40
INSTRUM               spect
PROBHD    5 mm PABBO BB/
PULPROG        cosygpppqf
TD                     2048
SOLVENT               CDCl3
NS                        4
DS                        8
SWH               3521.127 Hz
FIDRES            1.719300 Hz
AQ               0.2908160 sec
RG                    64.21
DW                  142.000 usec
DE                     6.50 usec
TE                    303.0 K
D0               0.00000300 sec
D1               1.86237395 sec
D11              0.03000000 sec
D12              0.00002000 sec
D13              0.00000400 sec
D16              0.00020000 sec
IN0              0.00028400 sec

======== CHANNEL f1 ========
SFO1            500.2014802 MHz
NUC1                      1H
P0                     10.00 usec
P1                     10.00 usec
P17                 2500.00 usec
PLW1            22.00000000 W
PLW10            3.25440001 W

====== GRADIENT CHANNEL =====
GPNAM[1]        SMSQ10.100
GPZ1                   10.00 %
P16                  1000.00 usec

F1 - Acquisition parameters
TD                       128
SFO1                500.2015 MHz
FIDRES             55.017605 Hz
SW                      7.039 ppm
FnMODE                     QF

F2 - Processing parameters
SI                       1024
SF               500.2000135 MHz
WDW                     QSINE
SSB        0
LB         0 Hz
GB         0
PC                       1.40

F1 - Processing parameters
SI                       1024
MC2                        QF
SF               500.2000131 MHz
WDW                     QSINE
SSB        0
LB         0 Hz
GB         0
```

Phổ COSY của hợp chất PH16



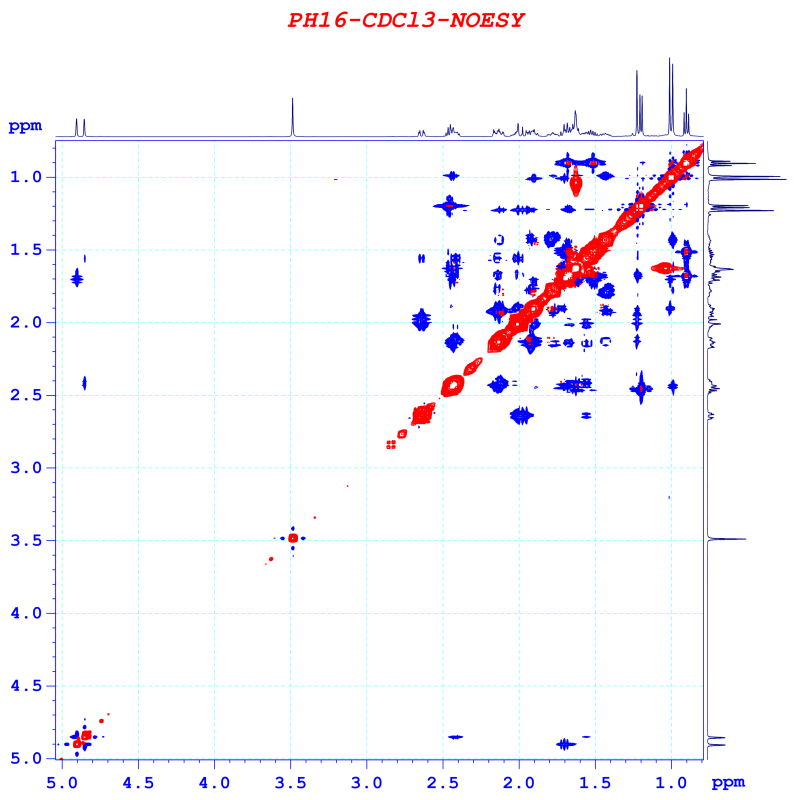

```
Current Data Parameters
NAME          110HOAI_PH16
EXPNO                    5
PROCNO                   1

F2 - Acquisition Parameters
Date_               20180114
Time                    5.40
INSTRUM                spect
PROBHD    5 mm PABBO BB/
PULPROG        cosygpppqf
TD                      2048
SOLVENT               CDCl3
NS                        4
DS                        8
SWH                3521.127 Hz
FIDRES             1.719300 Hz
AQ                0.2908160 sec
RG                    64.21
DW                  142.000 usec
DE                     6.50 usec
TE                    303.0 K
D0                0.00000300 sec
D1                1.86237395 sec
D11               0.03000000 sec
D12               0.00002000 sec
D13               0.00000400 sec
D16               0.00020000 sec
IN0               0.00028400 sec

======== CHANNEL f1 ========
SFO1             500.2014802 MHz
NUC1                       1H
P0                      10.00 usec
P1                      10.00 usec
P17                   2500.00 usec
PLW1            22.00000000 W
PLW10            3.25440001 W

====== GRADIENT CHANNEL =====
GPNAM[1]       SMSQ10.100
GPZ1                 10.00 %
P16                1000.00 usec

F1 - Acquisition parameters
TD                       128
SFO1                500.2015 MHz
FIDRES             55.017605 Hz
SW                     7.039 ppm
FnMODE                    QF

F2 - Processing parameters
SI                       1024
SF               500.2000135 MHz
WDW                     QSINE
SSB        0
LB         0 Hz
GB         0
PC                       1.40

F1 - Processing parameters
SI                       1024
MC2                        QF
SF               500.2000131 MHz
WDW                     QSINE
SSB        0
LB         0 Hz
GB         0
```

Phổ COSY của hợp chất PH16



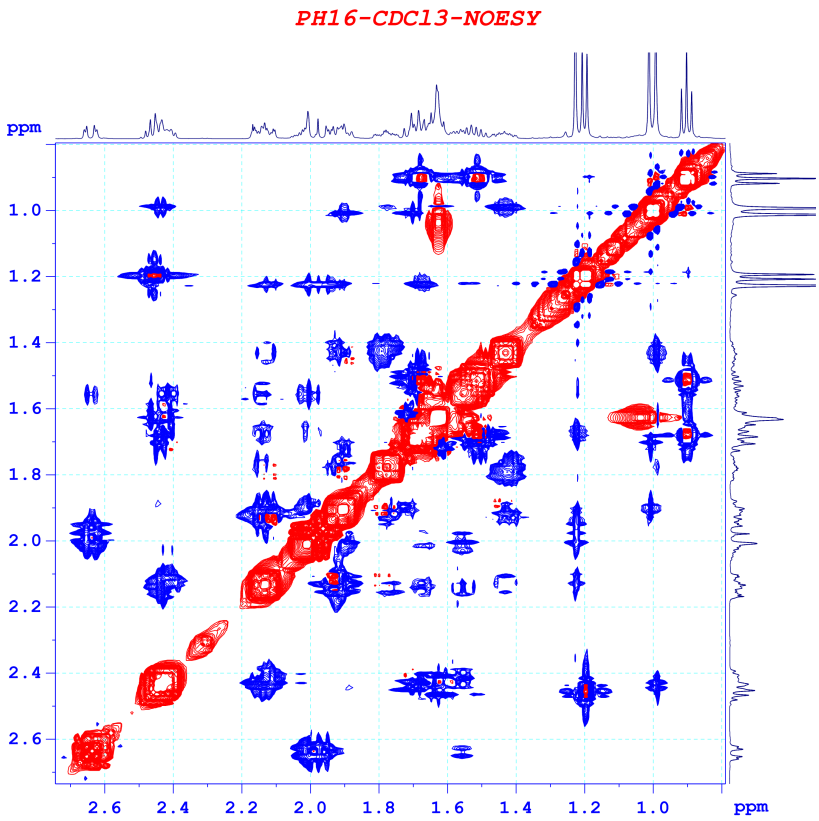

```
Current Data Parameters
NAME          110HOAI_PH16
EXPNO                    6
PROCNO                   1

F2 - Acquisition Parameters
Date_               20180114
Time                    6.01
INSTRUM                spect
PROBHD    5 mm PABBO BB/
PULPROG        noesygpphpp
TD                      2048
SOLVENT               CDCl3
NS                        8
DS                       32
SWH                3521.127 Hz
FIDRES             1.719300 Hz
AQ                0.2908160 sec
RG                    64.21
DW                  142.000 usec
DE                     6.50 usec
TE                    303.0 K
D0                0.00012927 sec
D1                1.91398394 sec
D8                0.30000001 sec
D11               0.03000000 sec
D12               0.00002000 sec
D16               0.00020000 sec
IN0               0.00028400 sec

======== CHANNEL f1 ========
SFO1             500.2014802 MHz
NUC1                       1H
P1                      10.00 usec
P2                      20.00 usec
P17                   2500.00 usec
PLW1            22.00000000 W
PLW10            3.25440001 W

====== GRADIENT CHANNEL =====
GPNAM[1]       SMSQ10.100
GPZ1                 40.00 %
P16                1000.00 usec

F1 - Acquisition parameters
TD                       256
SFO1                500.2015 MHz
FIDRES             27.508802 Hz
SW                     7.039 ppm
FnMODE          States-TPPI

F2 - Processing parameters
SI                       1024
SF               500.2000119 MHz
WDW                     QSINE
SSB                         2
LB         0 Hz
GB         0
PC                       1.00

F1 - Processing parameters
SI                       1024
MC2             States-TPPI
SF               500.2000116 MHz
WDW                     QSINE
SSB                         2
LB         0 Hz
GB         0
```

Phổ NOESY của hợp chất PH16



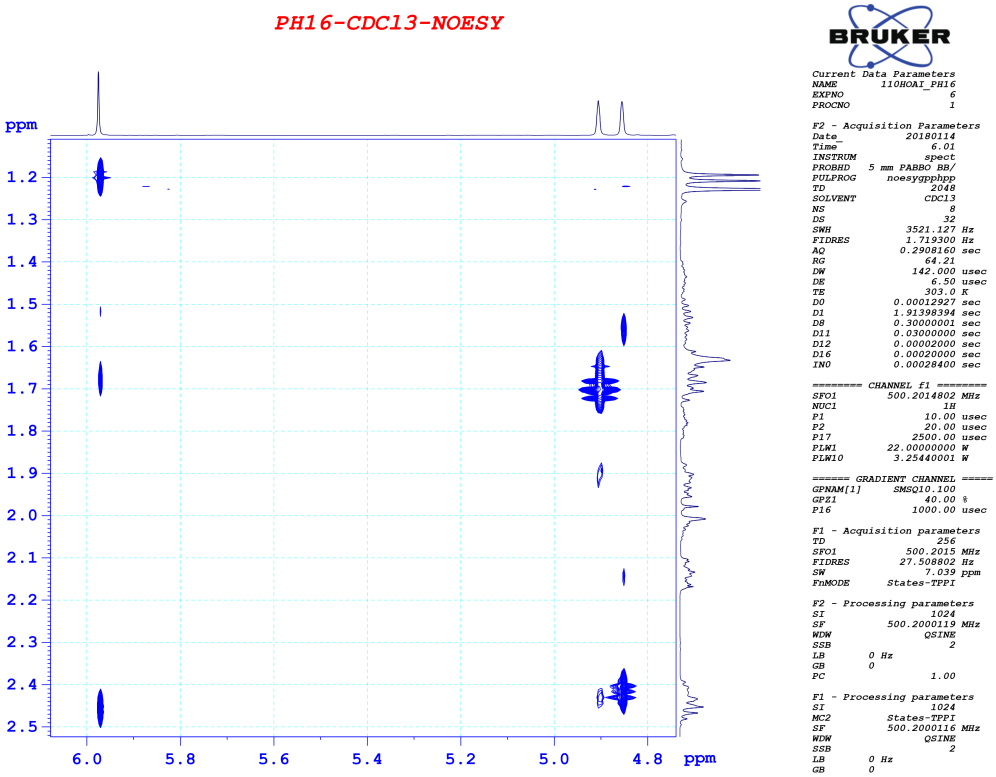

```
Current Data Parameters
NAME          110HOAI_PH16
EXPNO                    6
PROCNO                   1

F2 - Acquisition Parameters
Date_              20180114
Time                   6.01
INSTRUM               spect
PROBHD    5 mm PABBO BB/
PULPROG      noesygpphpp
TD                     2048
SOLVENT               CDCl3
NS                        8
DS                       32
SWH               3521.127 Hz
FIDRES            1.719300 Hz
AQ               0.2908160 sec
RG                    64.21
DW                  142.000 usec
DE                     6.50 usec
TE                    303.0 K
D0               0.00012927 sec
D1               1.91398394 sec
D8               0.30000001 sec
D11              0.03000000 sec
D12              0.00002000 sec
D16              0.00020000 sec
IN0              0.00028400 sec

======== CHANNEL f1 ========
SFO1            500.2014802 MHz
NUC1                      1H
P1                     10.00 usec
P2                     20.00 usec
P17                  2500.00 usec
PLW1            22.00000000 W
PLW10            3.25440001 W

====== GRADIENT CHANNEL =====
GPNAM[1]         SMSQ10.100
GPZ1                  40.00 %
P16                 1000.00 usec

F1 - Acquisition parameters
TD                       256
SFO1               500.2015 MHz
FIDRES            27.508802 Hz
SW                     7.039 ppm
FnMODE          States-TPPI

F2 - Processing parameters
SI                       1024
SF              500.2000119 MHz
WDW                     QSINE
SSB                         2
LB          0 Hz
GB          0
PC                      1.00

F1 - Processing parameters
SI                       1024
MC2             States-TPPI
SF              500.2000116 MHz
WDW                     QSINE
SSB                         2
LB          0 Hz
GB          0
```

Phổ NOESY của hợp chất PH16




```
Current Data Parameters
NAME          110HOAI_PH16
EXPNO                    6
PROCNO                   1

F2 - Acquisition Parameters
Date_              20180114
Time                   6.01
INSTRUM               spect
PROBHD    5 mm PABBO BB/
PULPROG      noesygpphpp
TD                     2048
SOLVENT               CDCl3
NS                        8
DS                       32
SWH               3521.127 Hz
FIDRES            1.719300 Hz
AQ               0.2908160 sec
RG                    64.21
DW                  142.000 usec
DE                     6.50 usec
TE                    303.0 K
D0               0.00012927 sec
D1               1.91398394 sec
D8               0.30000001 sec
D11              0.03000000 sec
D12              0.00002000 sec
D16              0.00020000 sec
IN0              0.00028400 sec

======== CHANNEL f1 ========
SFO1            500.2014802 MHz
NUC1                      1H
P1                     10.00 usec
P2                     20.00 usec
P17                  2500.00 usec
PLW1            22.00000000 W
PLW10            3.25440001 W

====== GRADIENT CHANNEL =====
GPNAM[1]         SMSQ10.100
GPZ1                  40.00 %
P16                 1000.00 usec

F1 - Acquisition parameters
TD                       256
SFO1               500.2015 MHz
FIDRES            27.508802 Hz
SW                     7.039 ppm
FnMODE          States-TPPI

F2 - Processing parameters
SI                       1024
SF              500.2000119 MHz
WDW                     QSINE
SSB                         2
LB          0 Hz
GB          0
PC                      1.00

F1 - Processing parameters
SI                       1024
MC2             States-TPPI
SF              500.2000116 MHz
WDW                     QSINE
SSB                         2
LB          0 Hz
GB          0
```

Phổ NOESY của hợp chất PH16

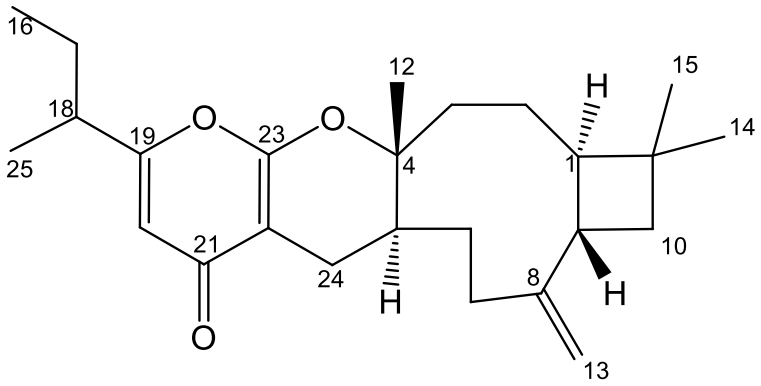


Phổ NOESY của hợp chất PH16

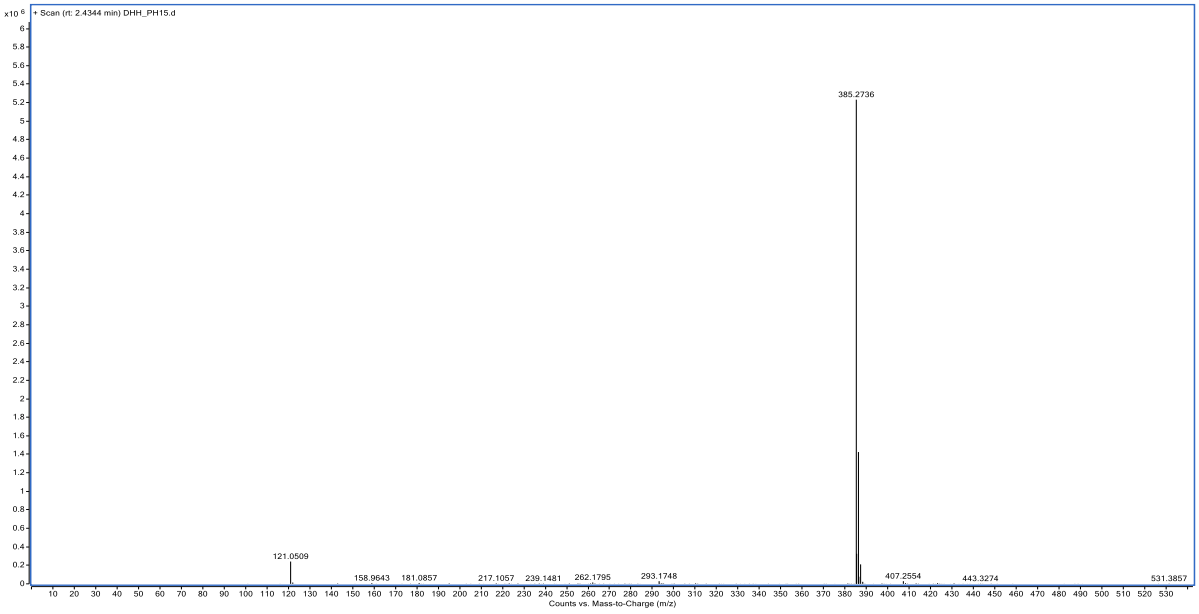
Phụ lục 3.2. Phổ của hợp chất PH15
(Pogostemin B)

CTPT: $C_{25}H_{36}O_3$

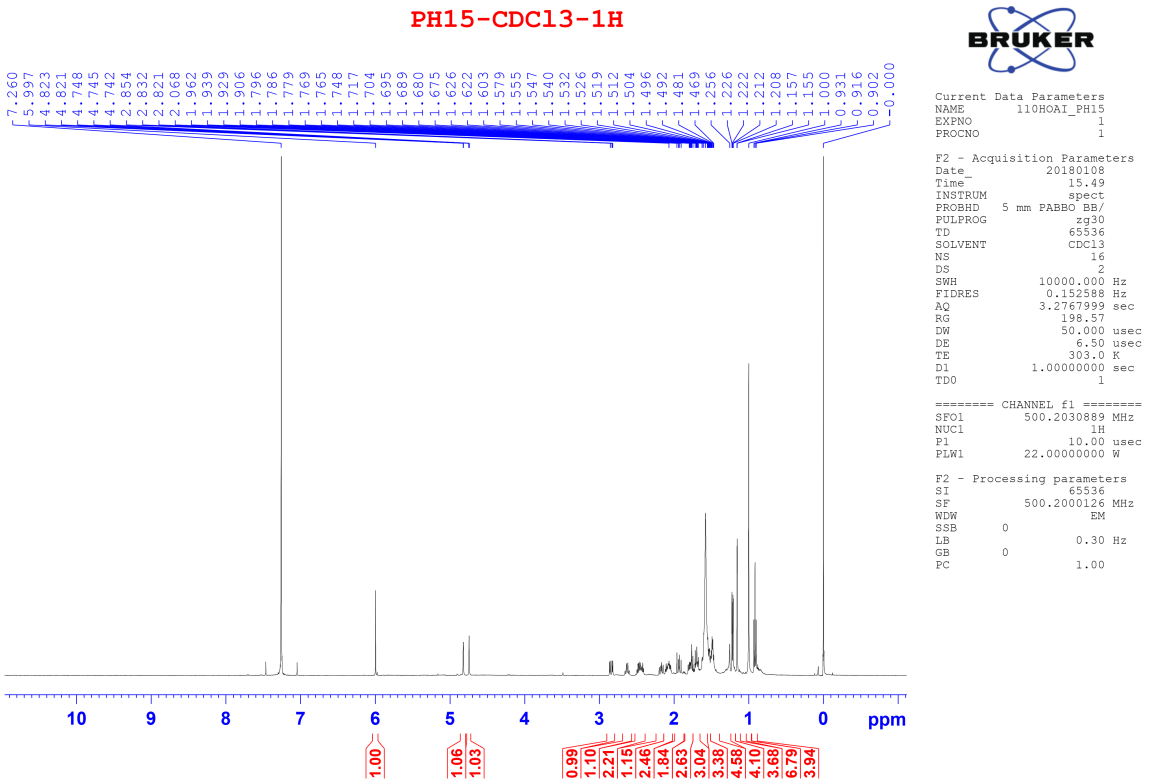
KLPT: 384,5600



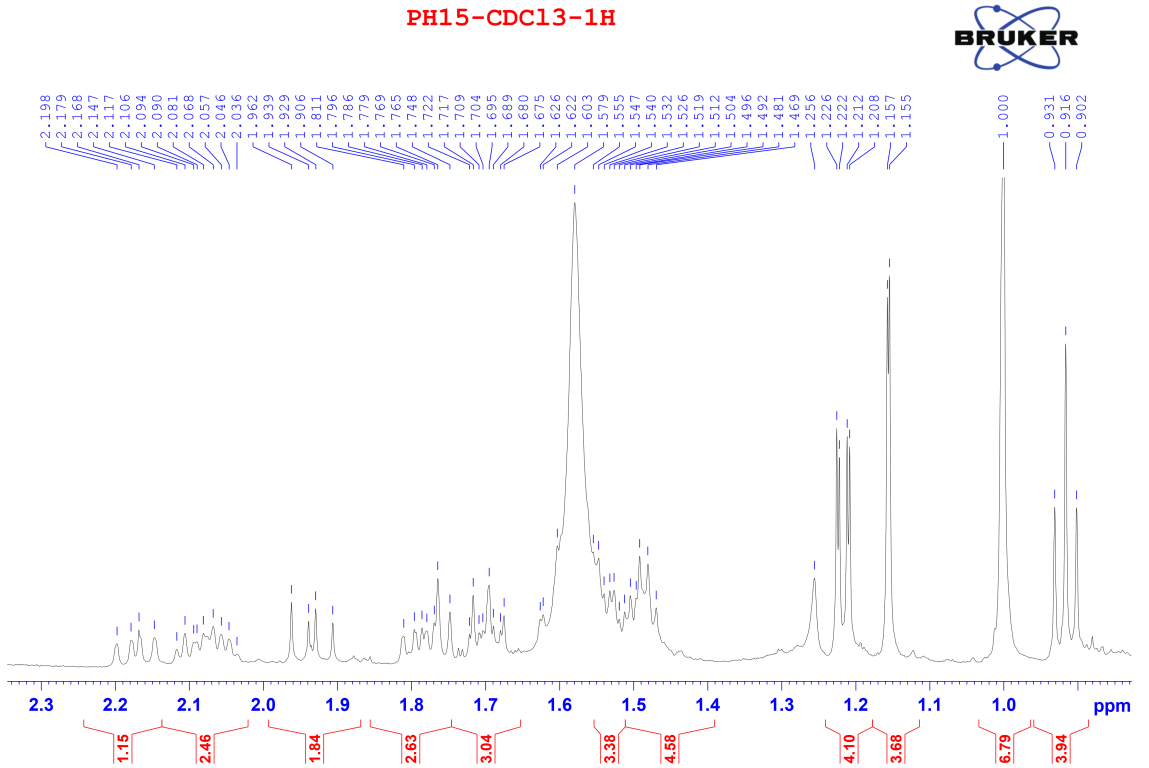
- Phổ HR-ESI-MS
- Phổ ^{1}H-NMR
- Phổ ^{13}C-NMR
- Phổ HMBC
- Phổ HSQC



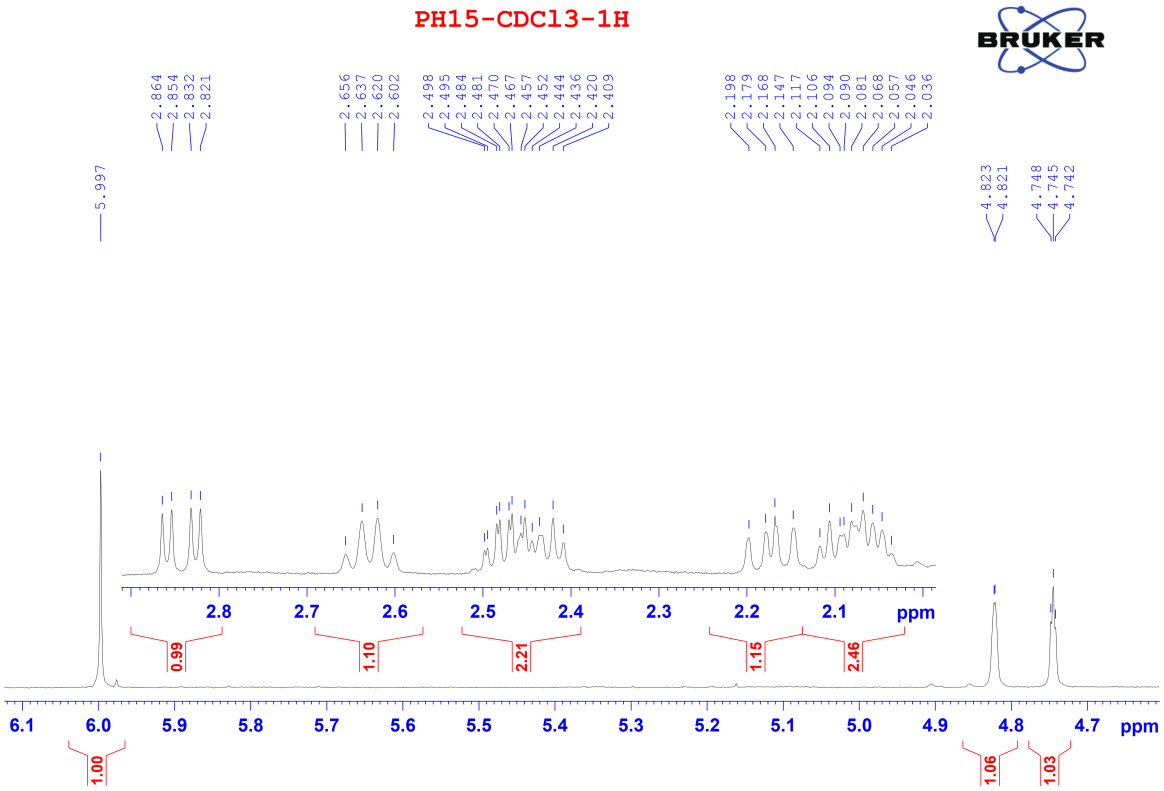
Phổ HR-ESI-MS của hợp chất PH15



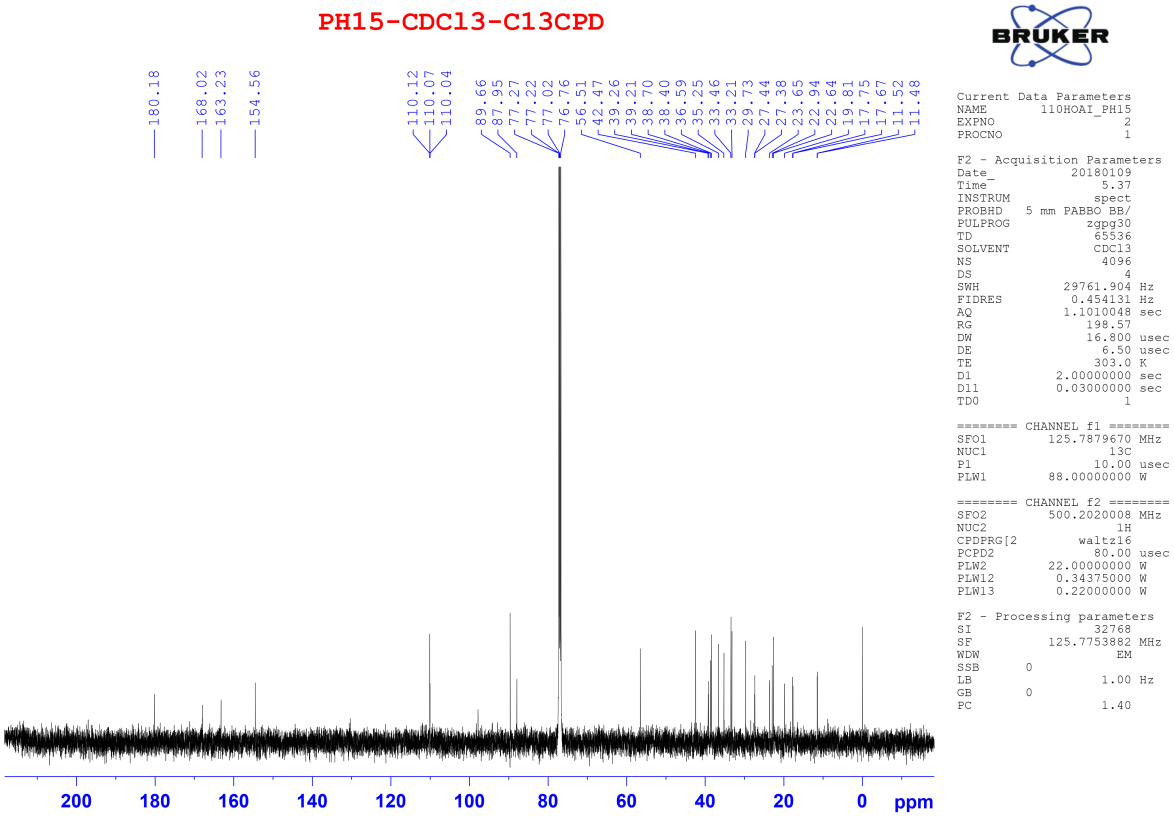
Phổ ^{1}H-NMR của hợp chất PH15



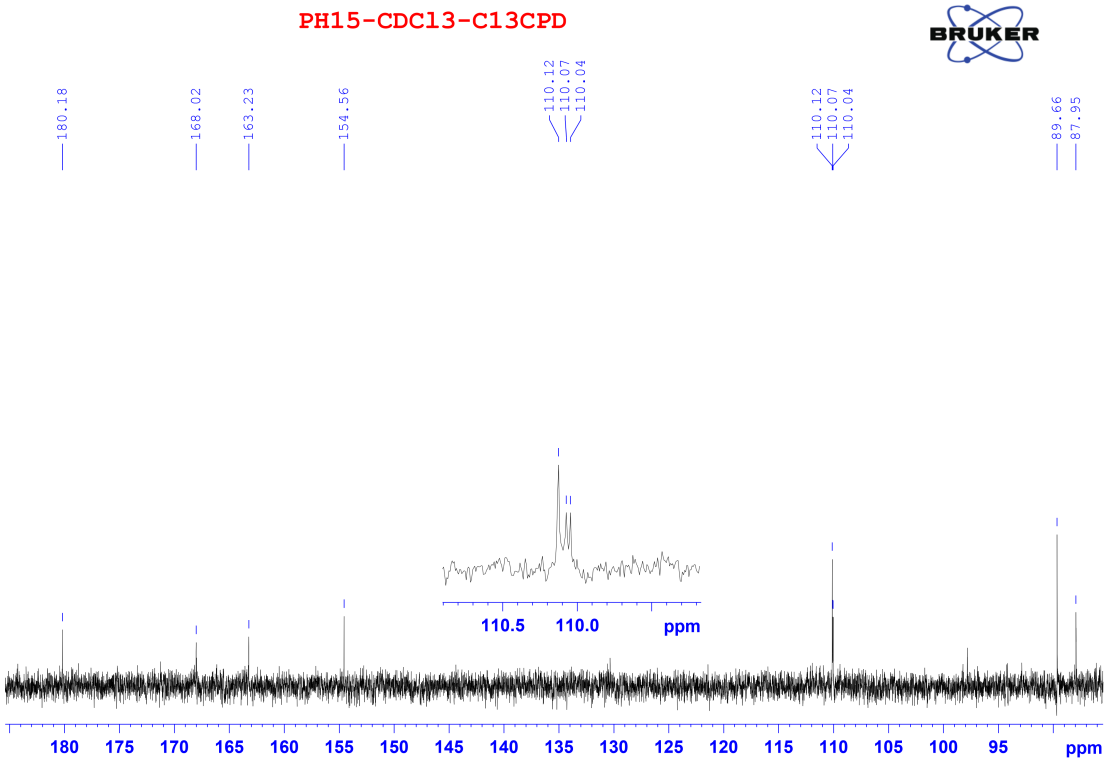
Phổ ^{1}H-NMR của hợp chất PH15



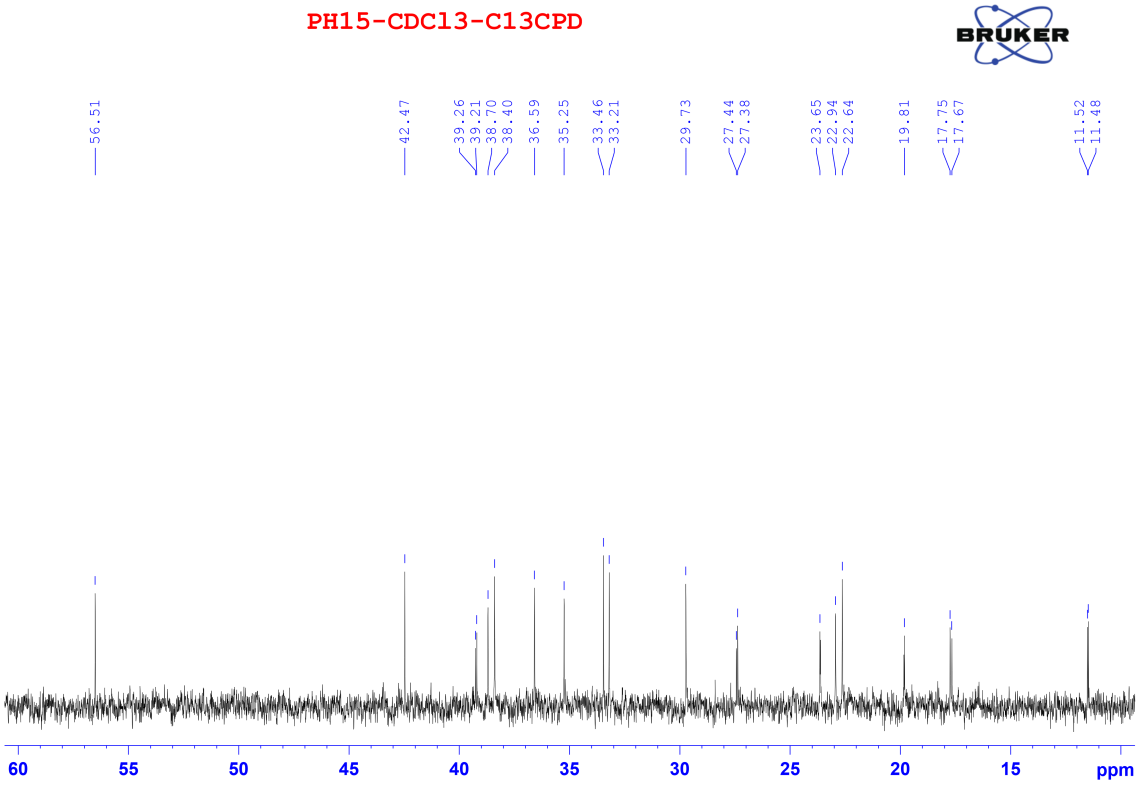
Phổ ^{1}H-NMR của hợp chất PH15



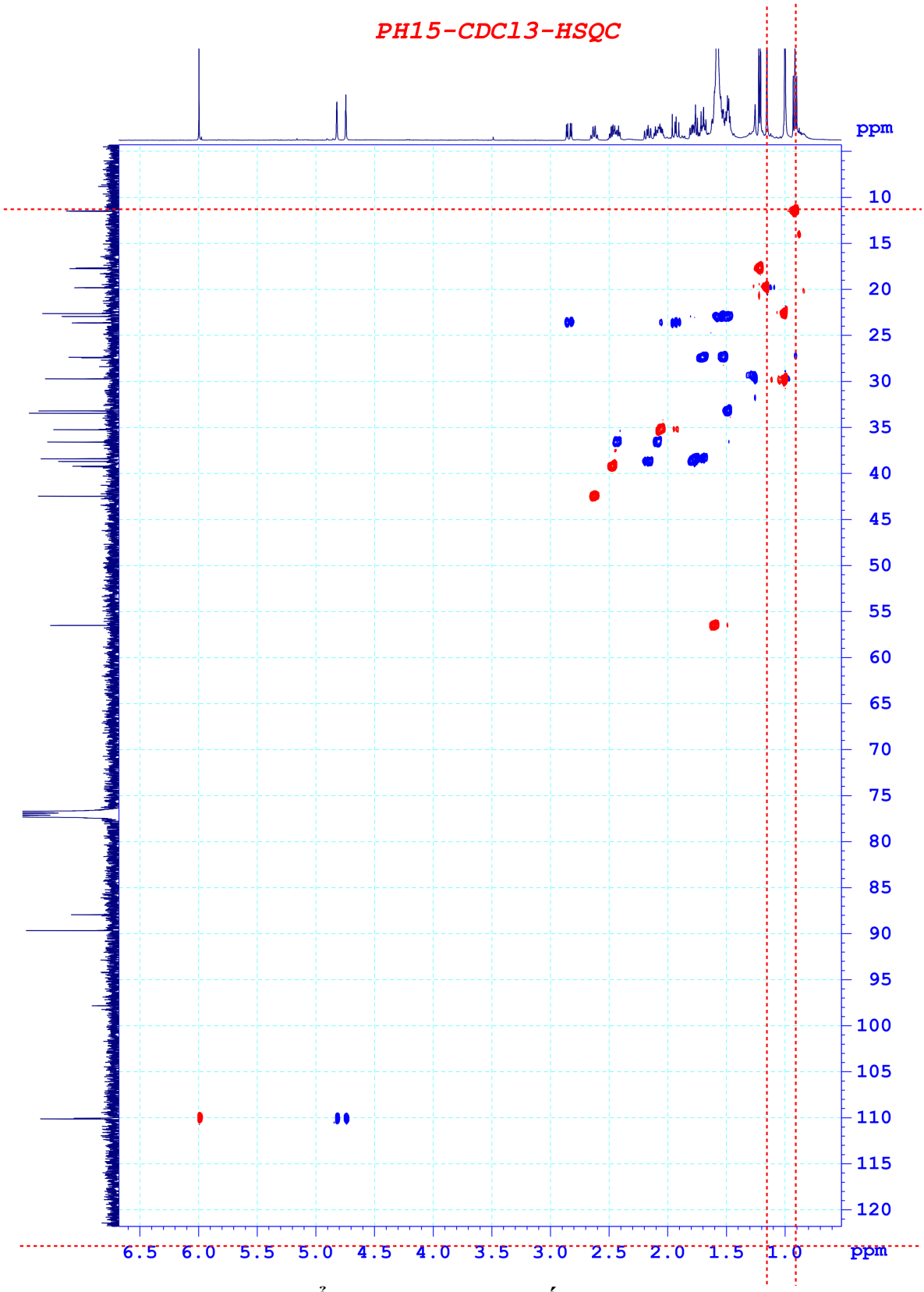
Phổ ^{13}C-NMR của hợp chất PH15



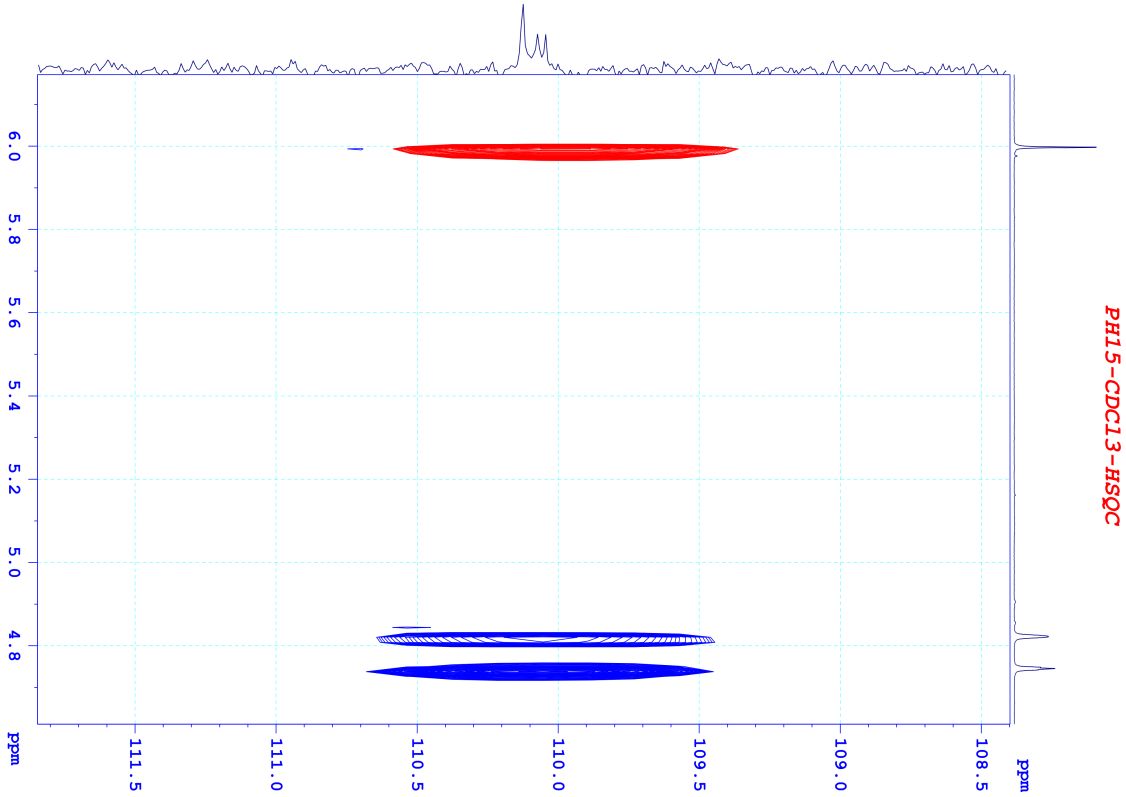
Phổ ^{13}C-NMR của hợp chất PH15



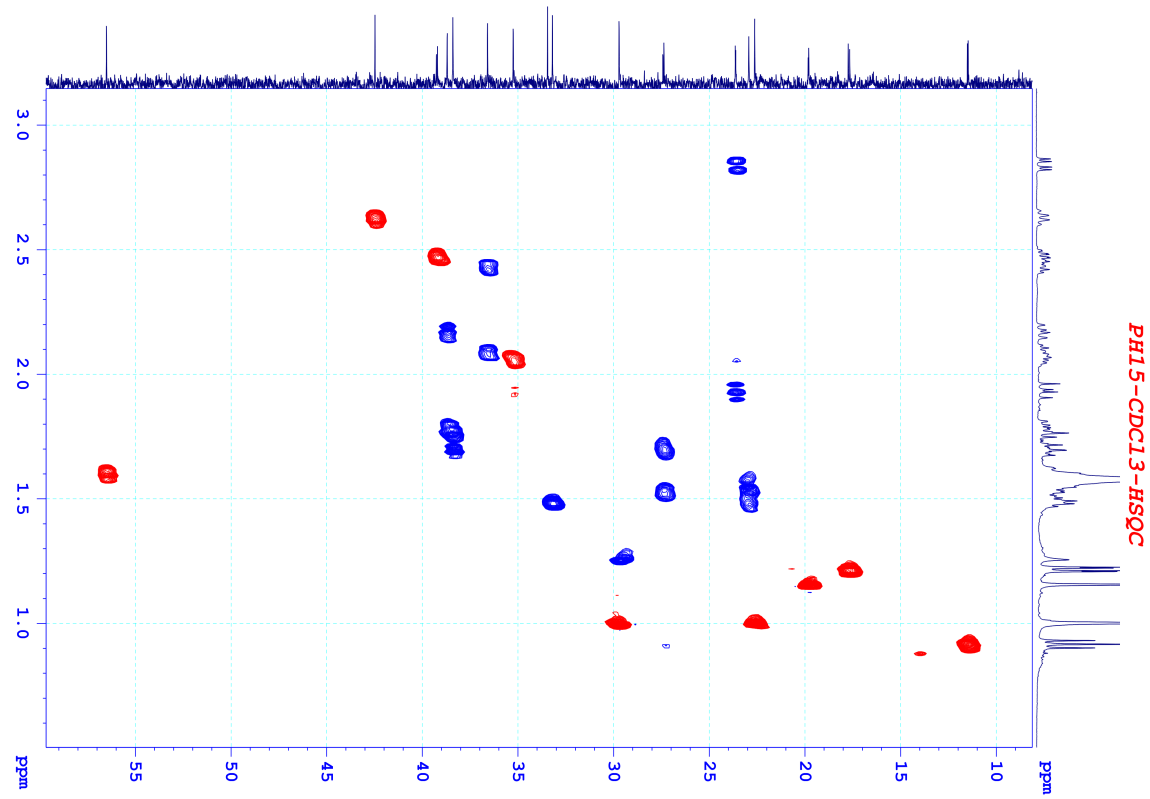
Phổ ^{13}C-NMR của hợp chất PH15



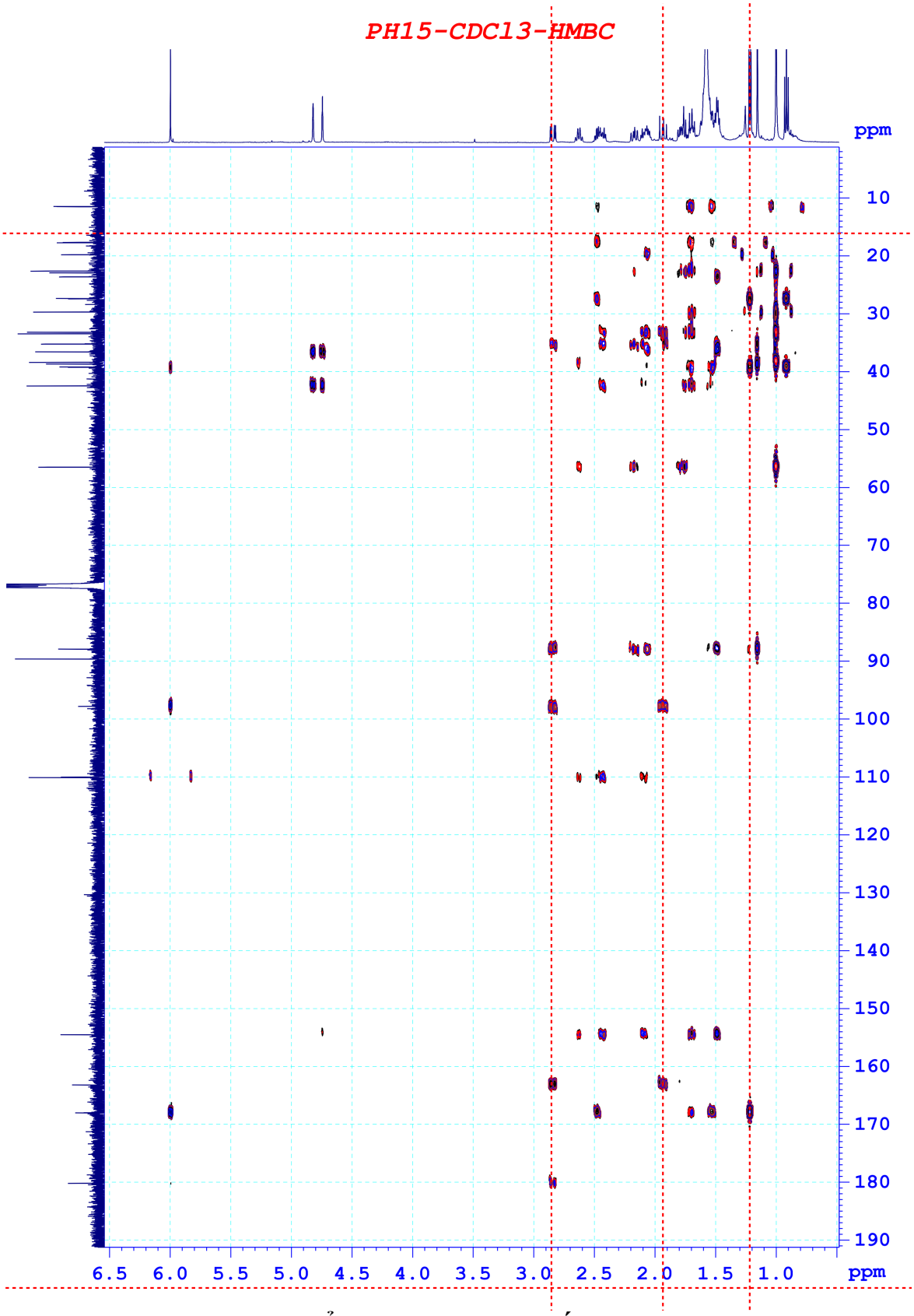
Phổ HSQC của hợp chất PH15



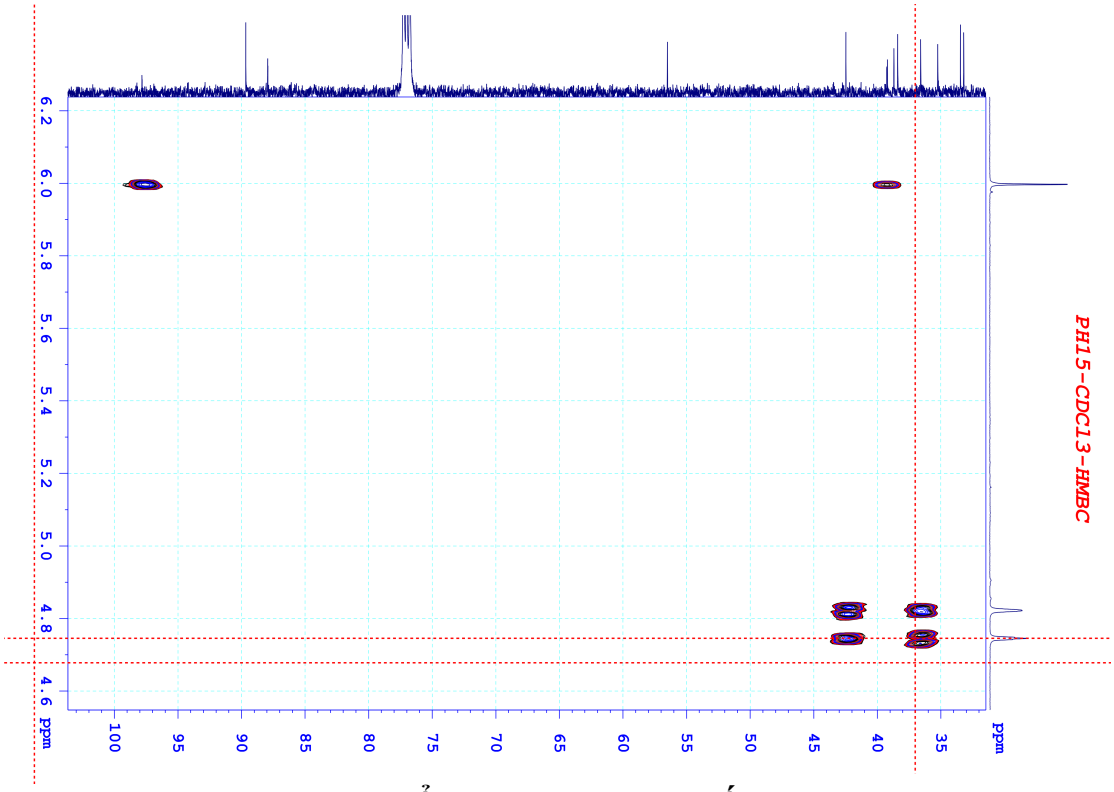
Phổ HSQC của hợp chất PH15



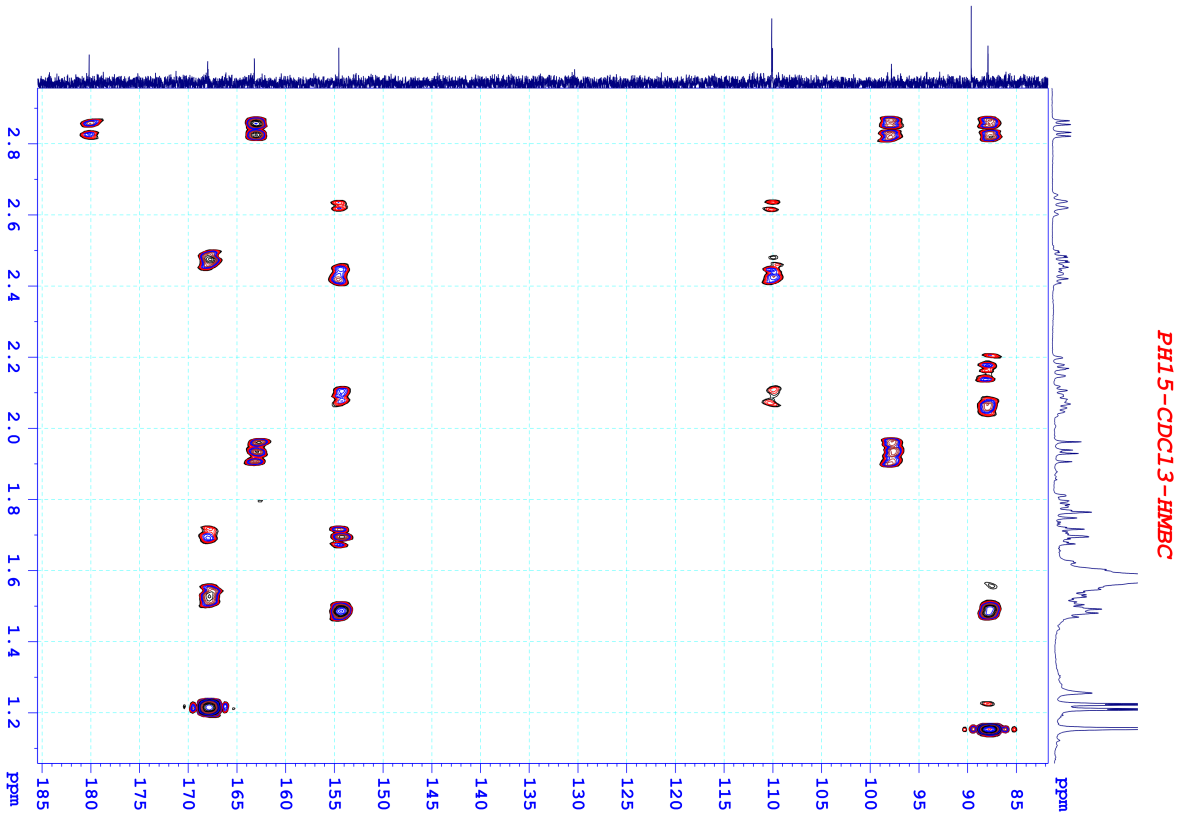
Phổ HSQC của hợp chất PH15



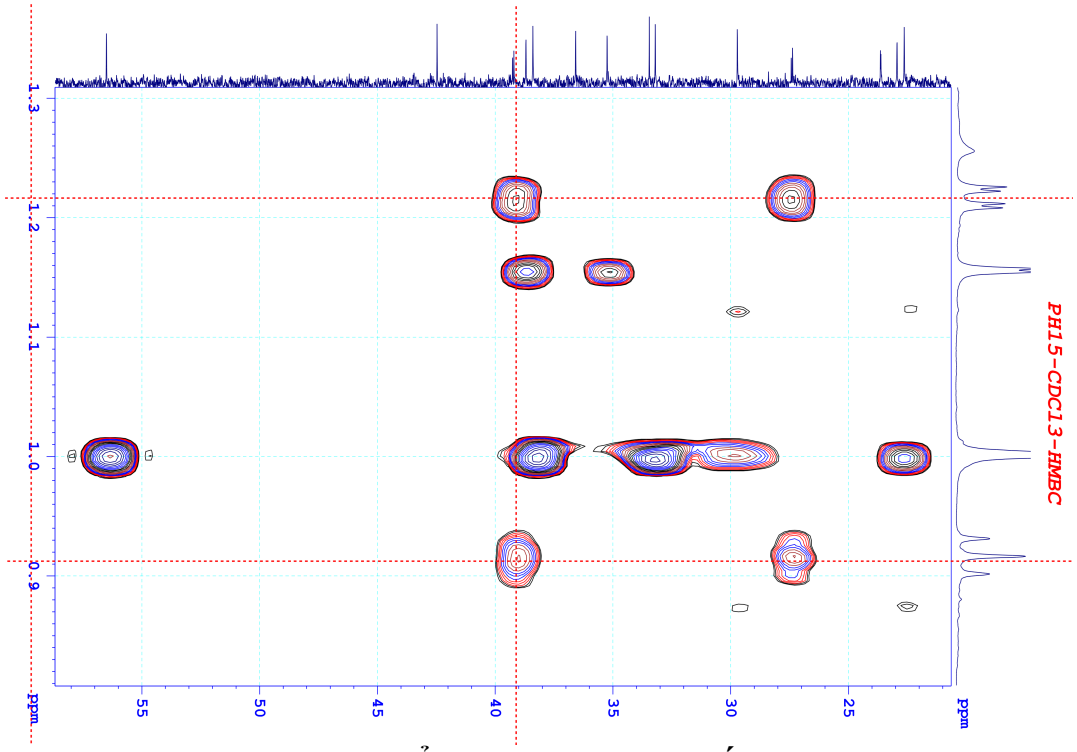
Phổ HMBC của hợp chất PH15



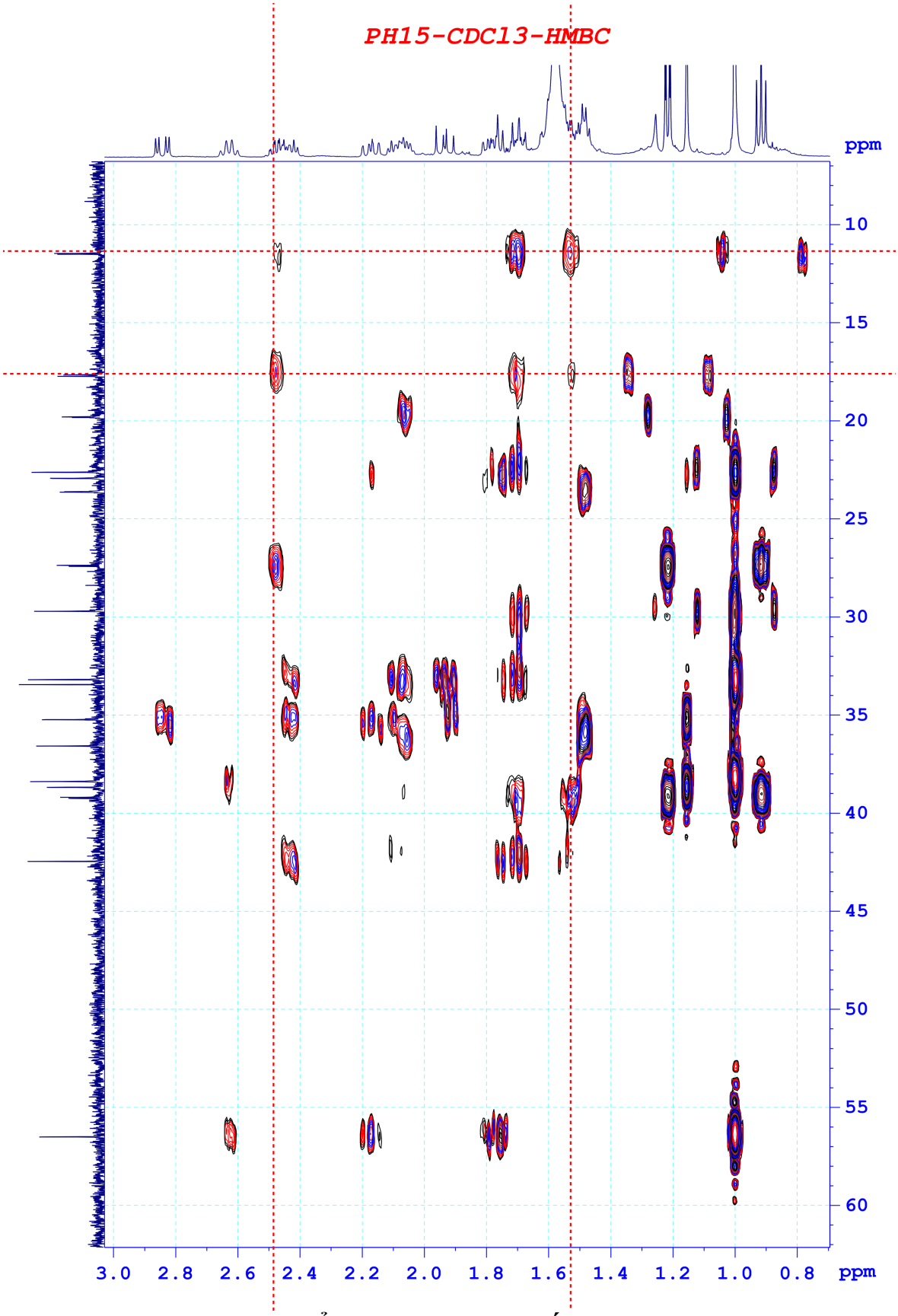
Phổ HMBC của hợp chất PH15



Phổ HMBC của hợp chất PH15



Phổ HMBC của hợp chất PH15

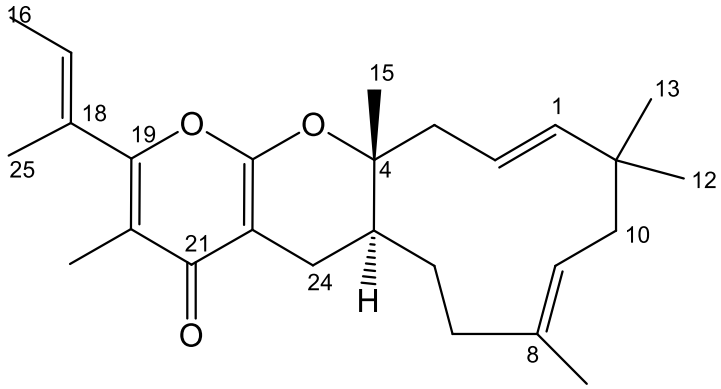


Phổ HMBC của hợp chất PH15

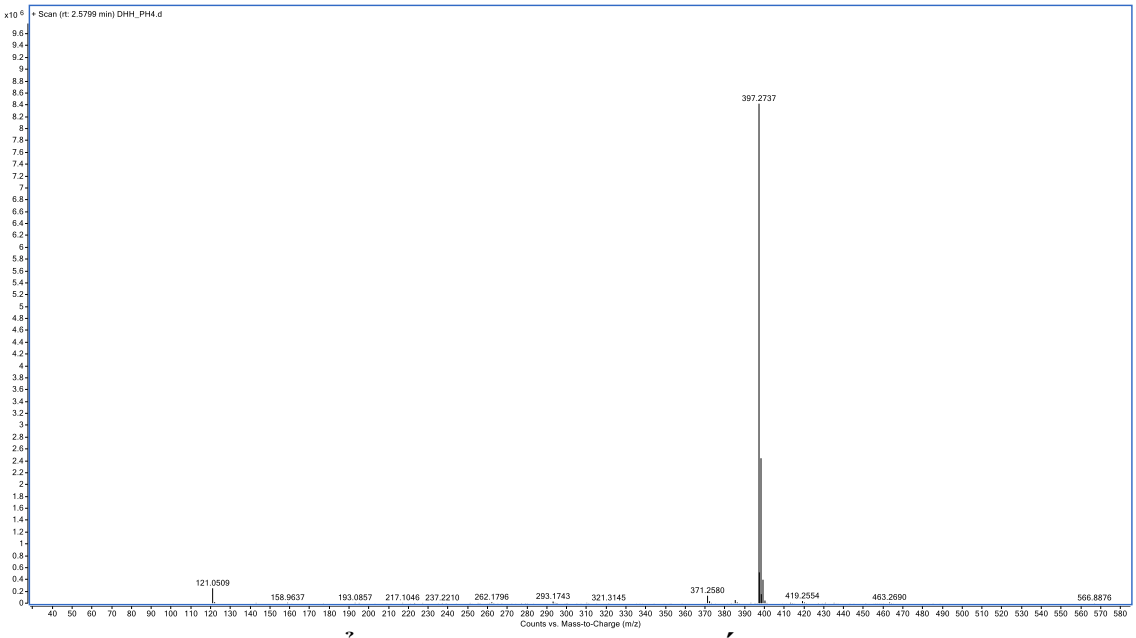
Phụ lục 3.3. Phổ của hợp chất PH4
(Pogostemin)

CTPT: $C_{26}H_{36}O_3$

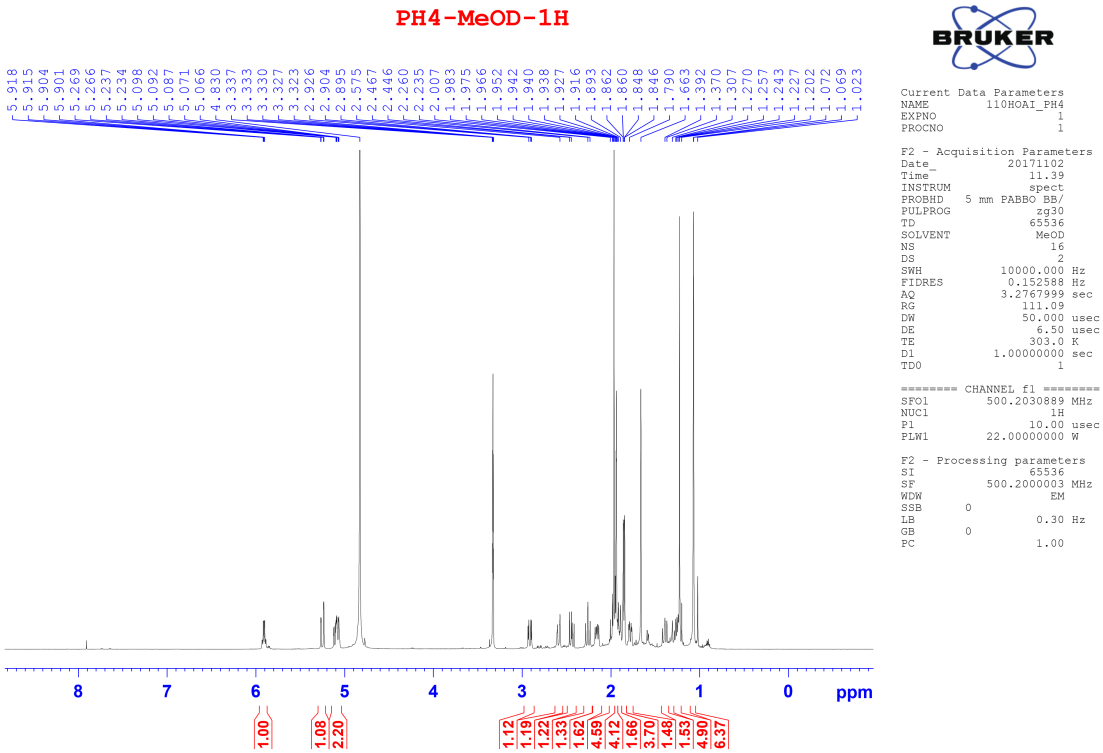
KLPT: 396,5710



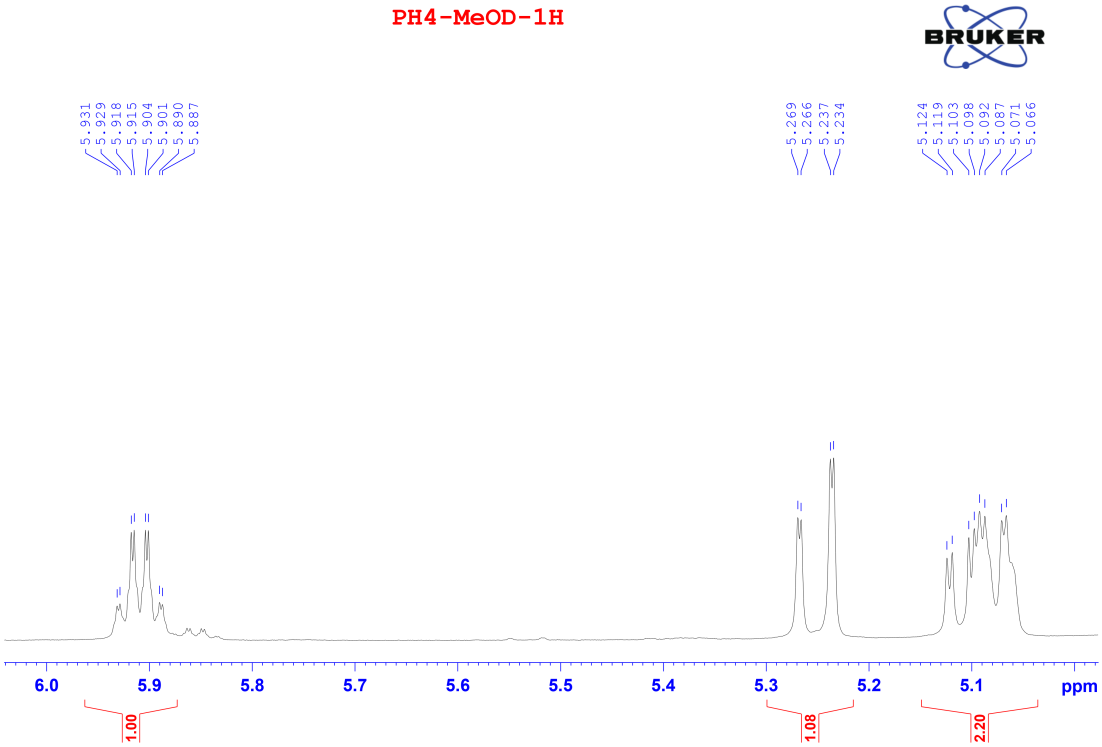
- Phổ HR-ESI-MS
- Phổ ^{1}H-NMR
- Phổ ^{13}C-NMR
- Phổ HMBC
- Phổ HSQC
- Phổ COSY
- Phổ NOESY



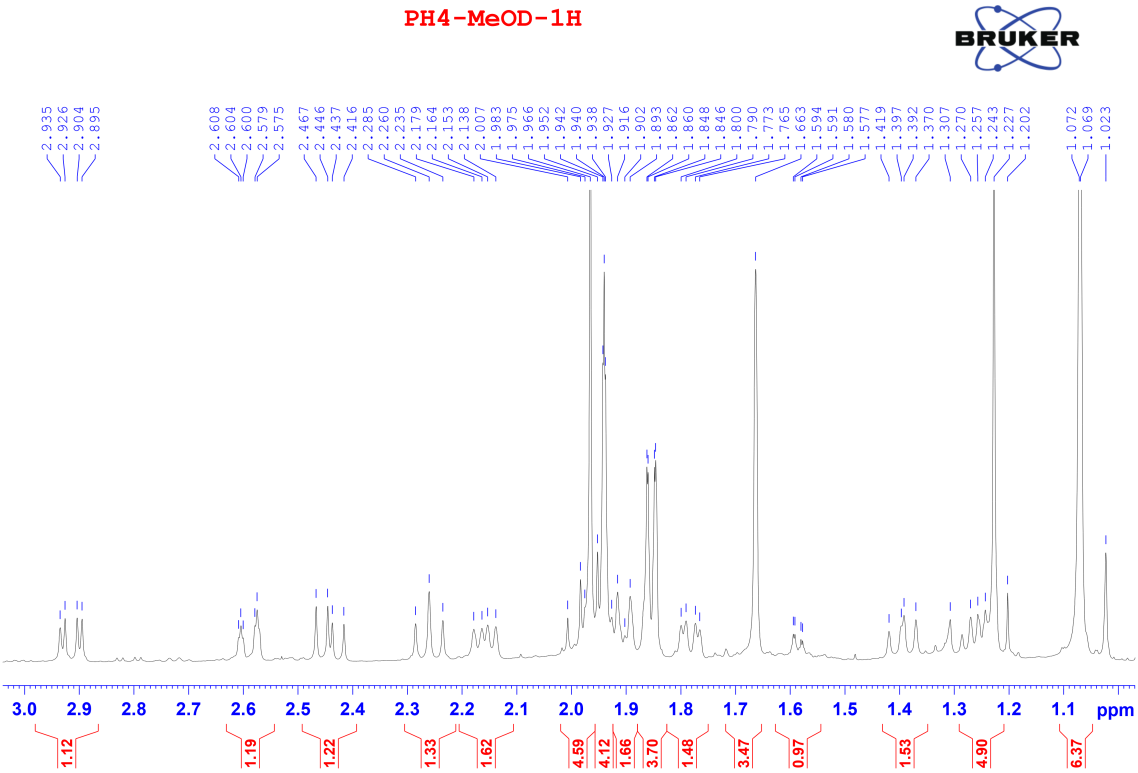
Phổ HR-ESI-MS của hợp chất PH4



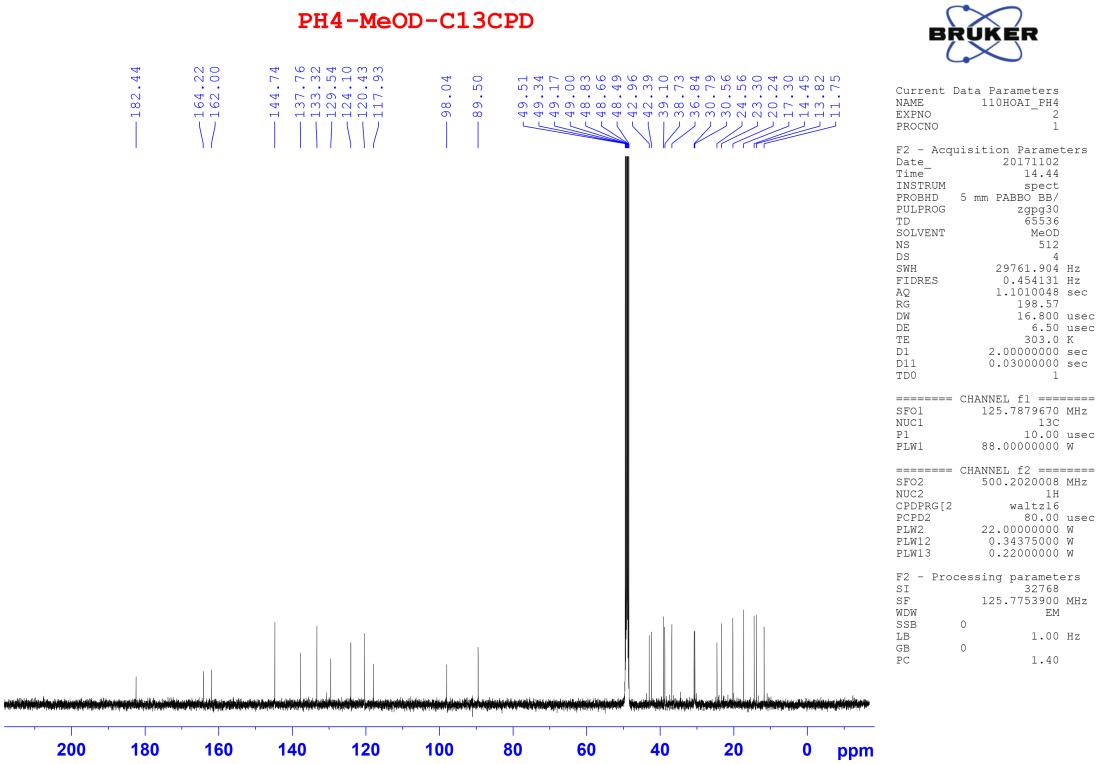
Phổ ^{1}H-NMR của hợp chất PH4



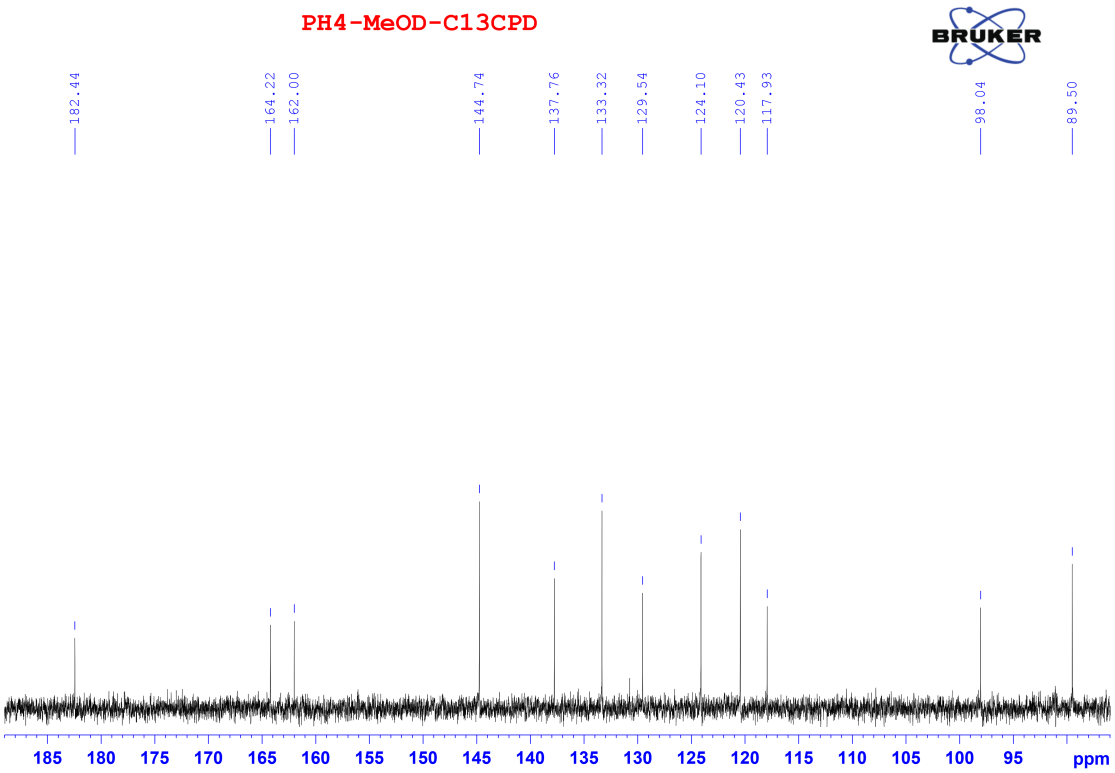
Phổ ^{1}H-NMR của hợp chất PH4



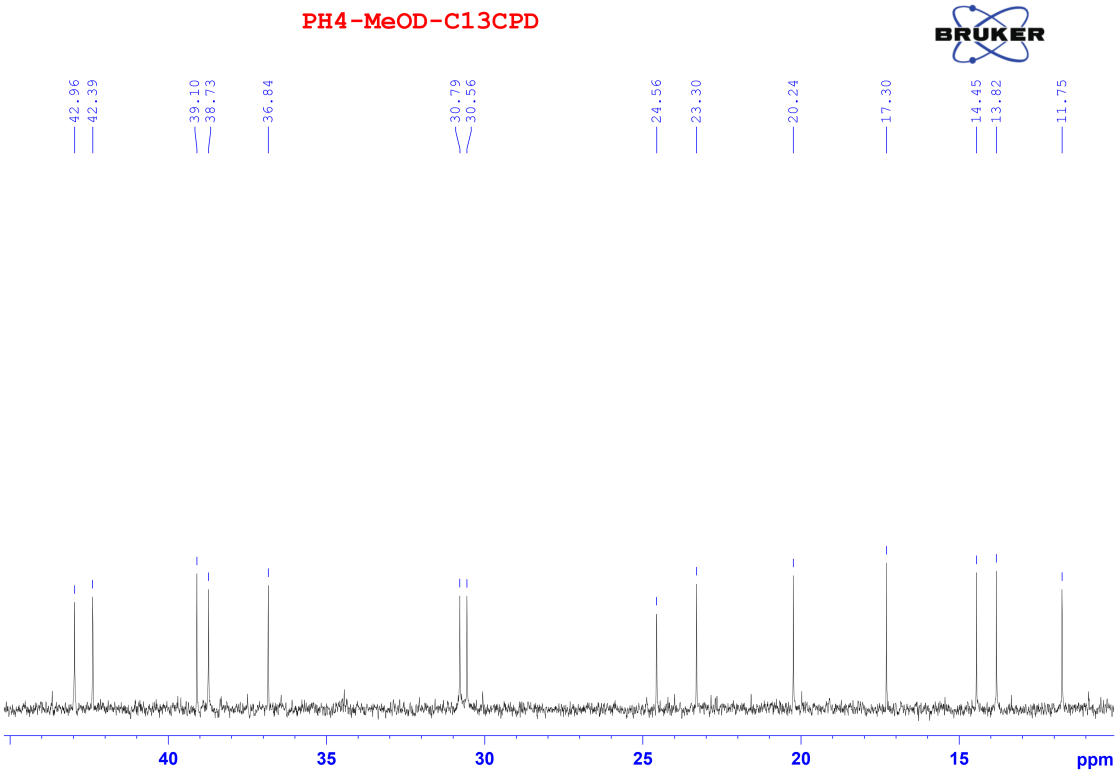
Phổ ^{1}H-NMR của hợp chất PH4



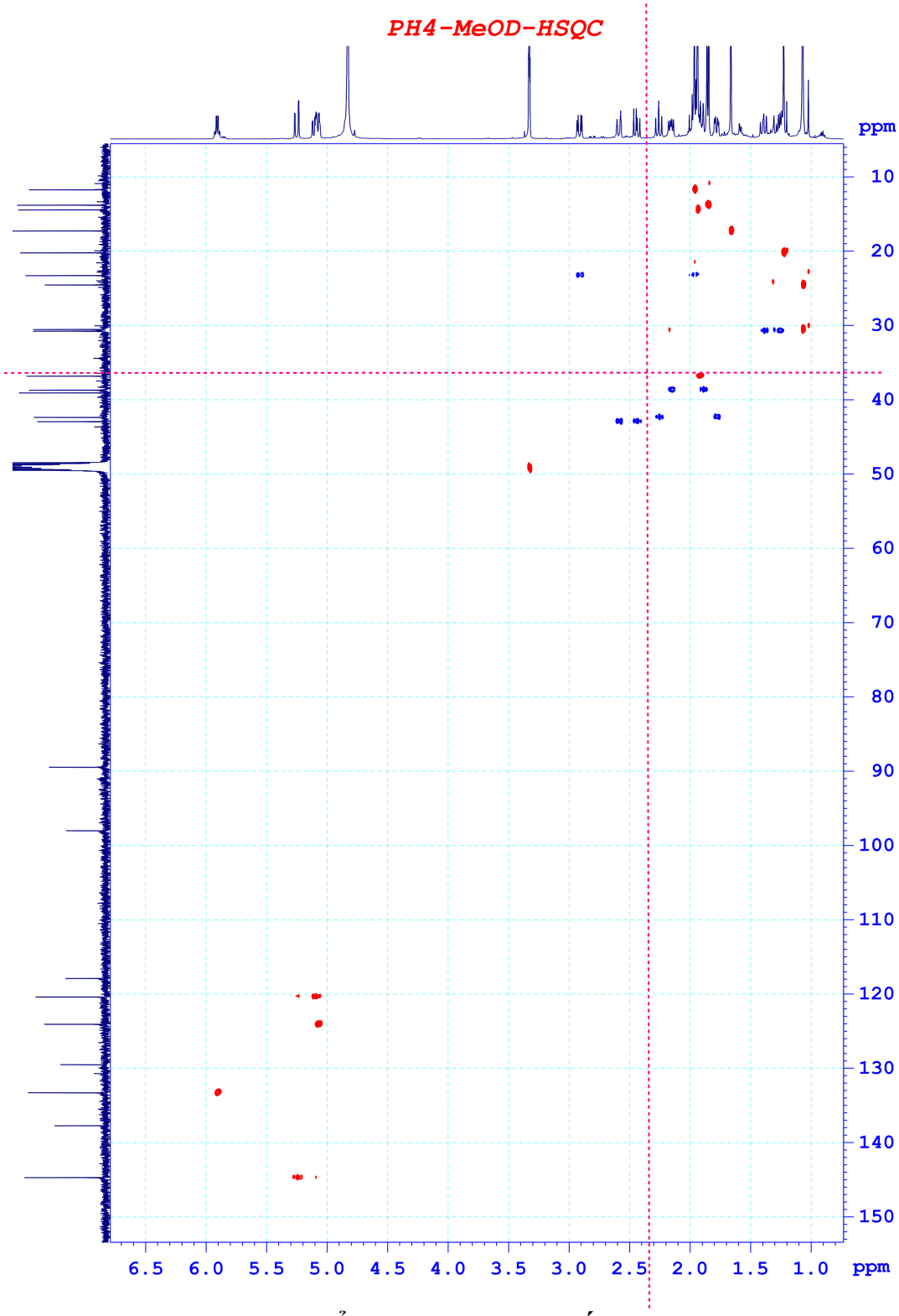
Phổ ^{13}C-NMR của hợp chất PH4



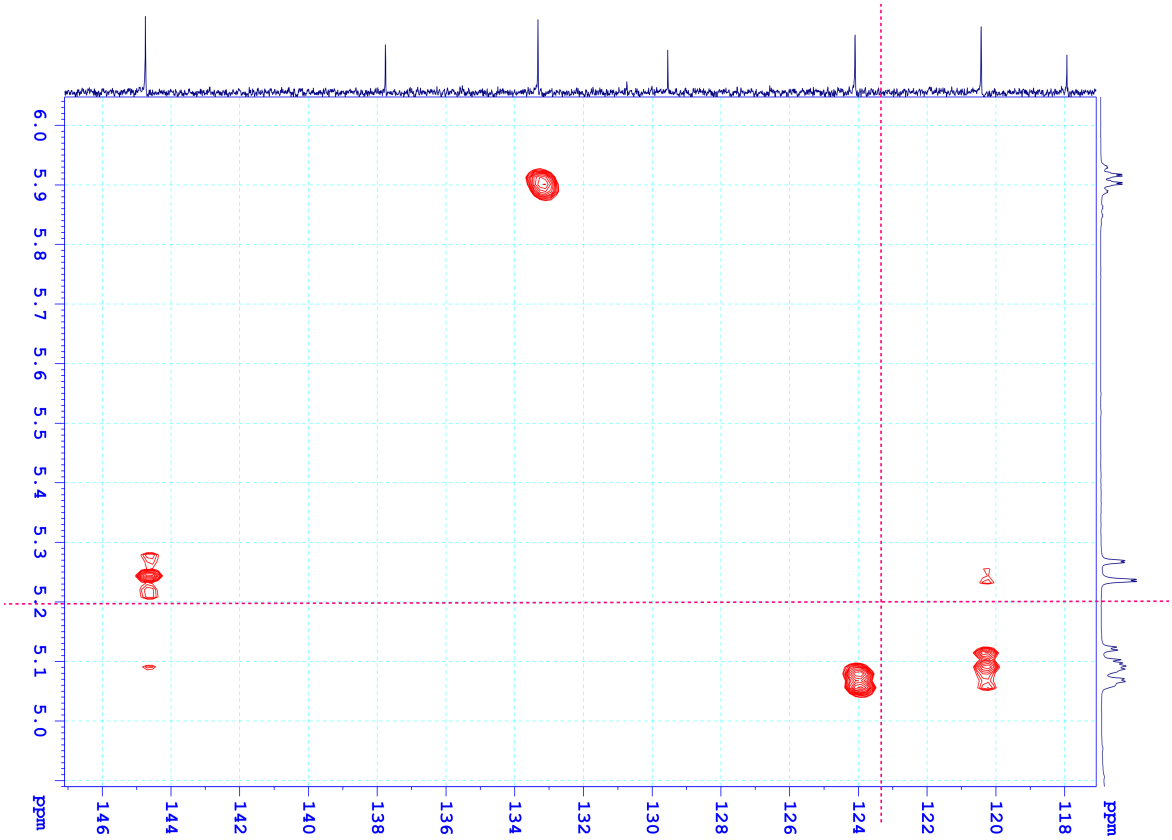
Phổ ^{13}C-NMR của hợp chất PH4



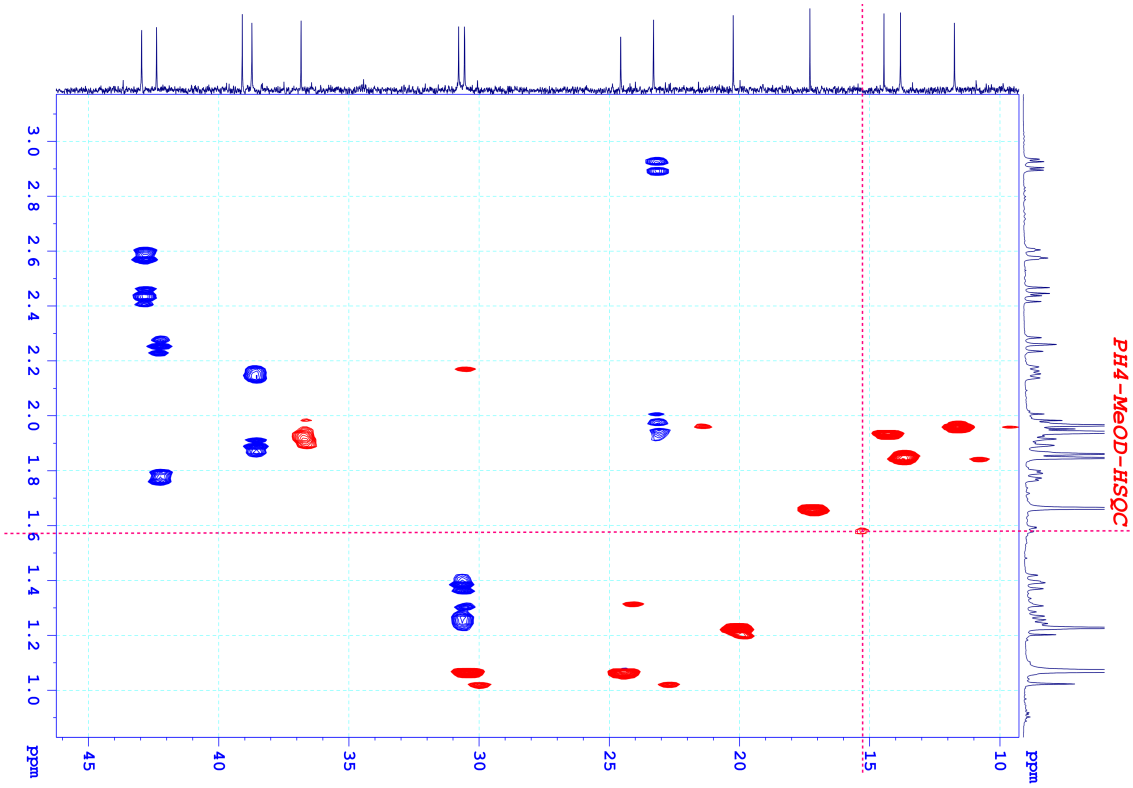
Phổ ^{13}C-NMR của hợp chất PH4



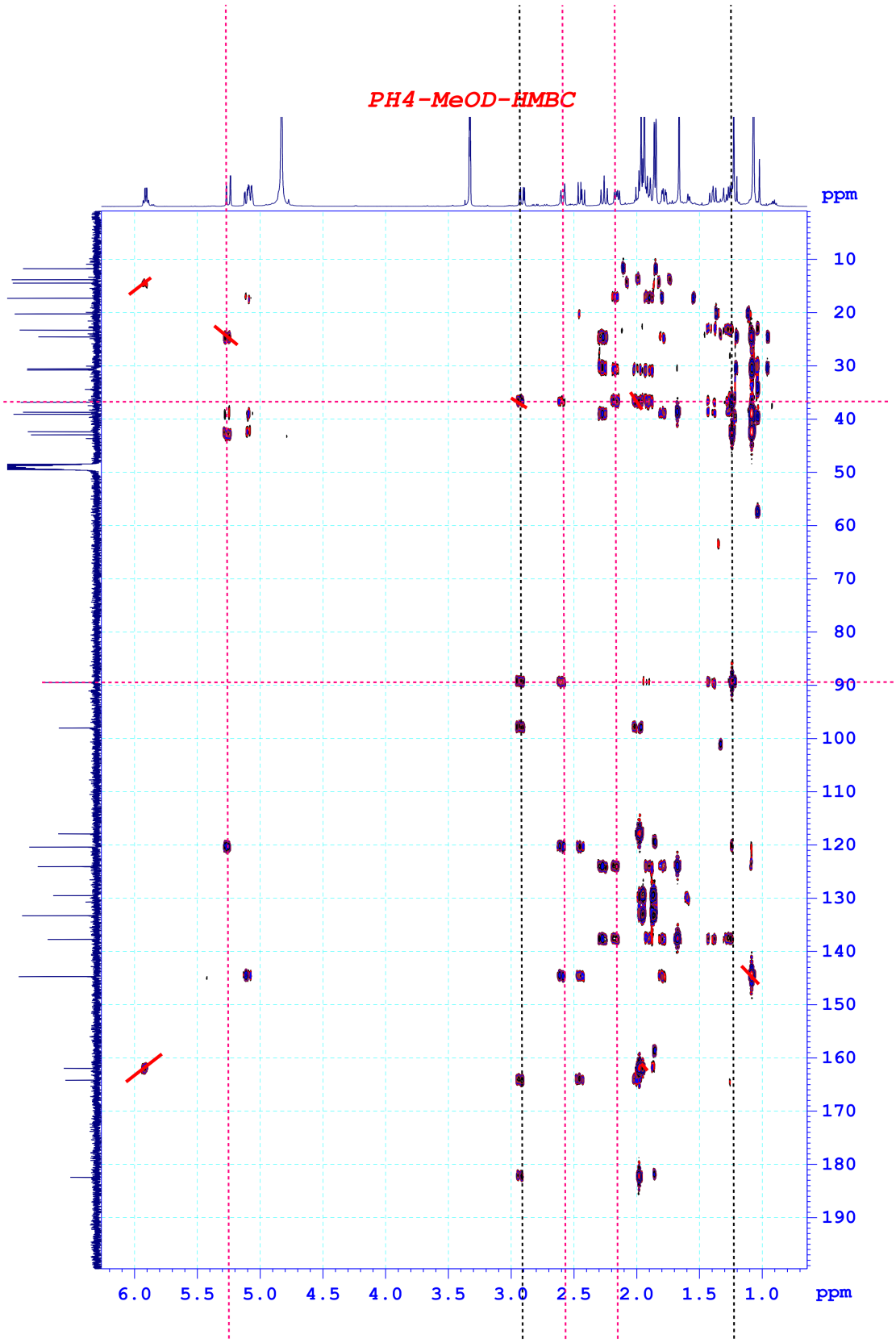
Phổ HSQC của hợp chất PH4



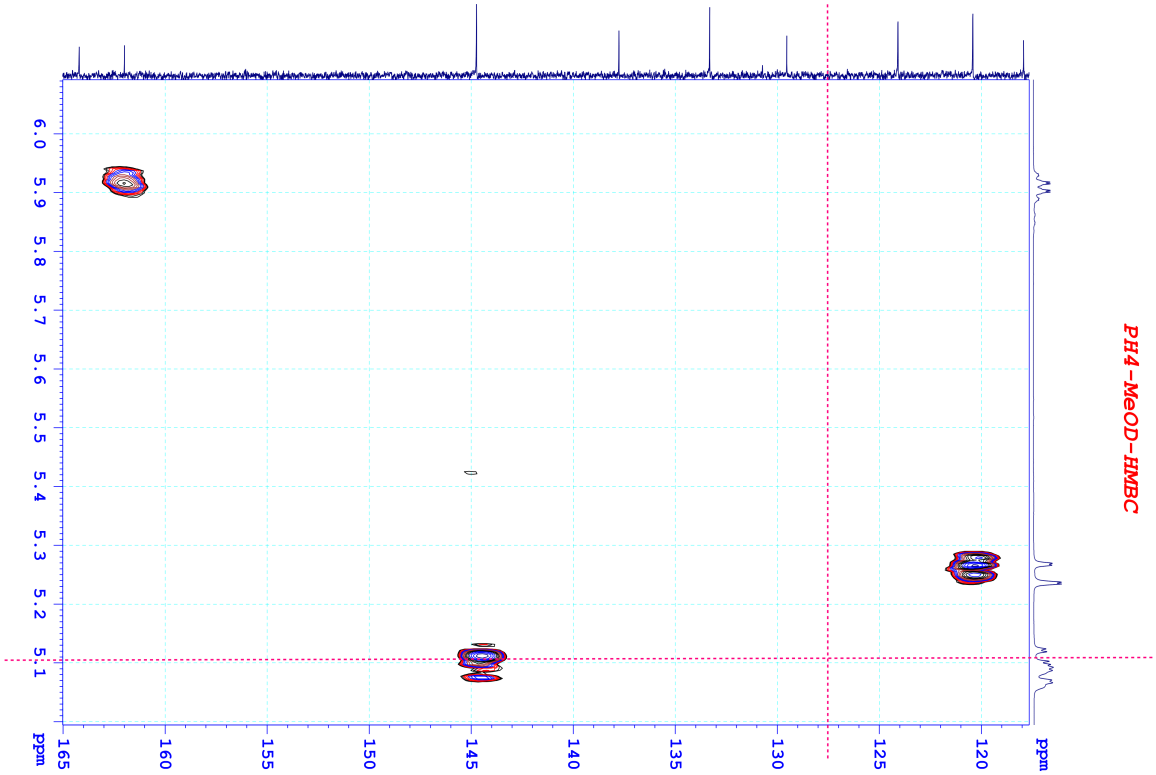
Phổ HSQC của hợp chất PH4



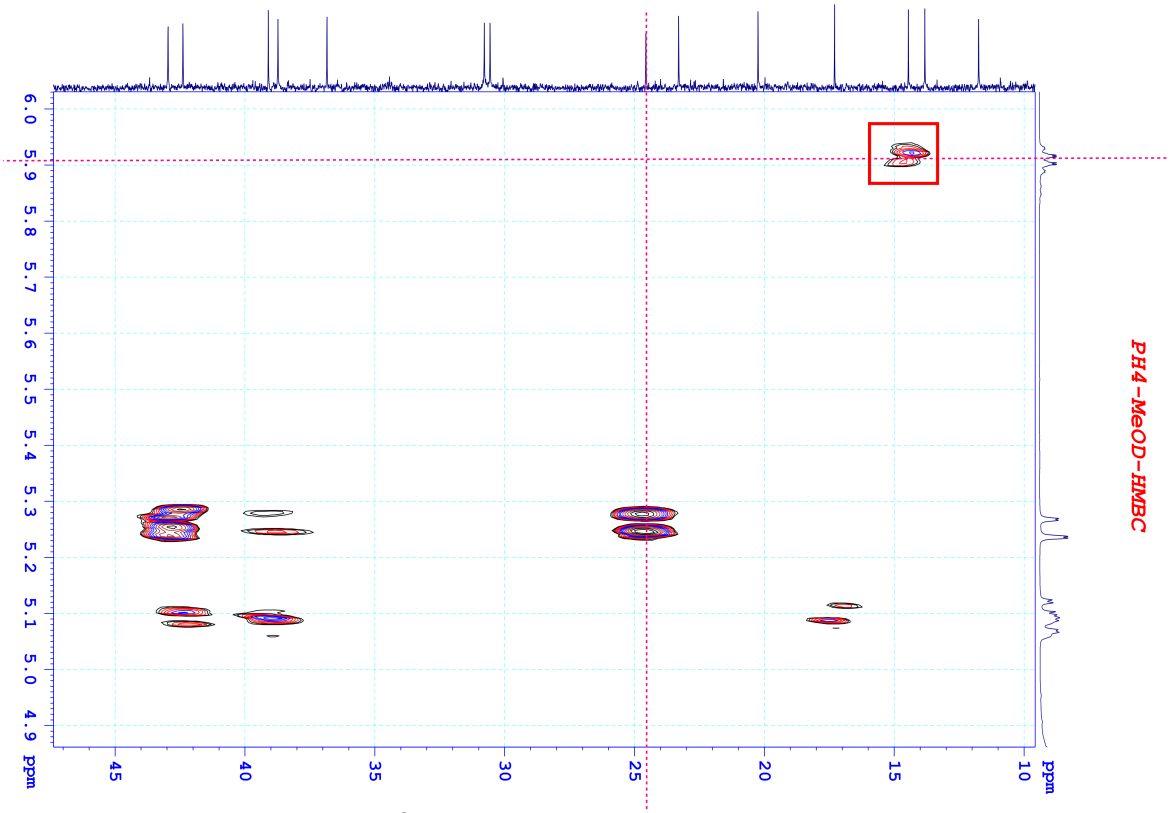
Phổ HSQC của hợp chất PH4



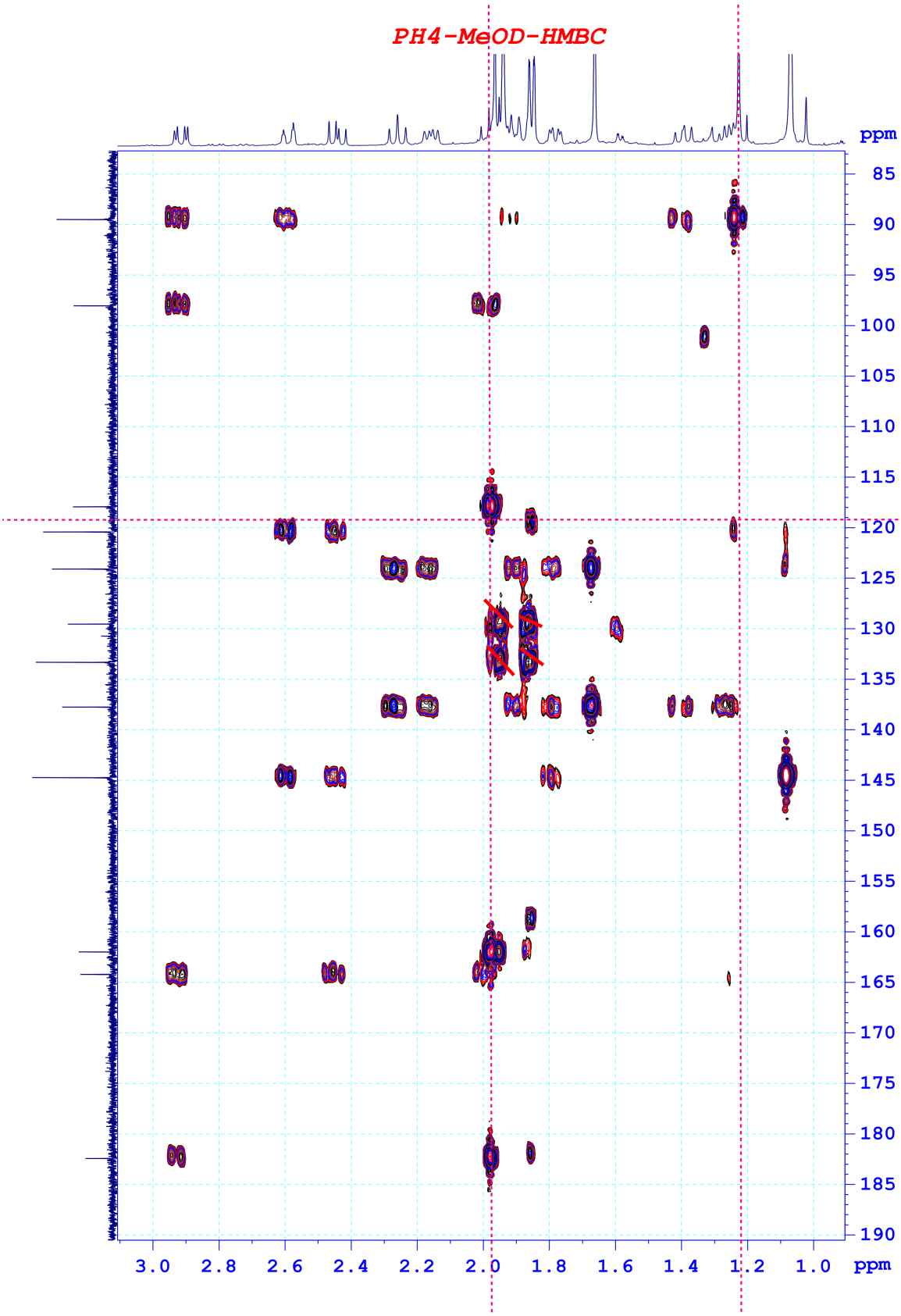
Phổ HMBC của hợp chất PH4



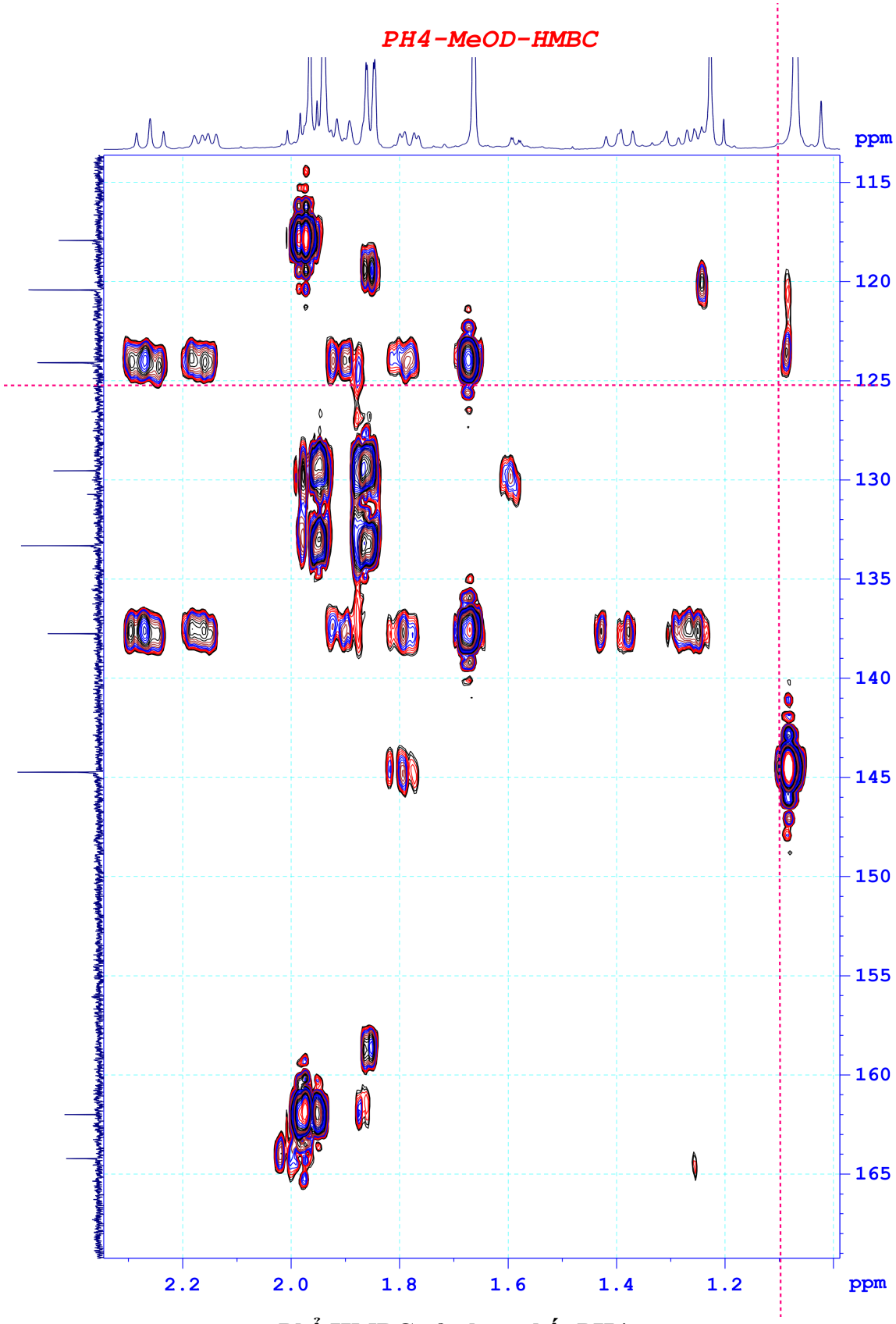
Phổ HMBC của hợp chất PH4



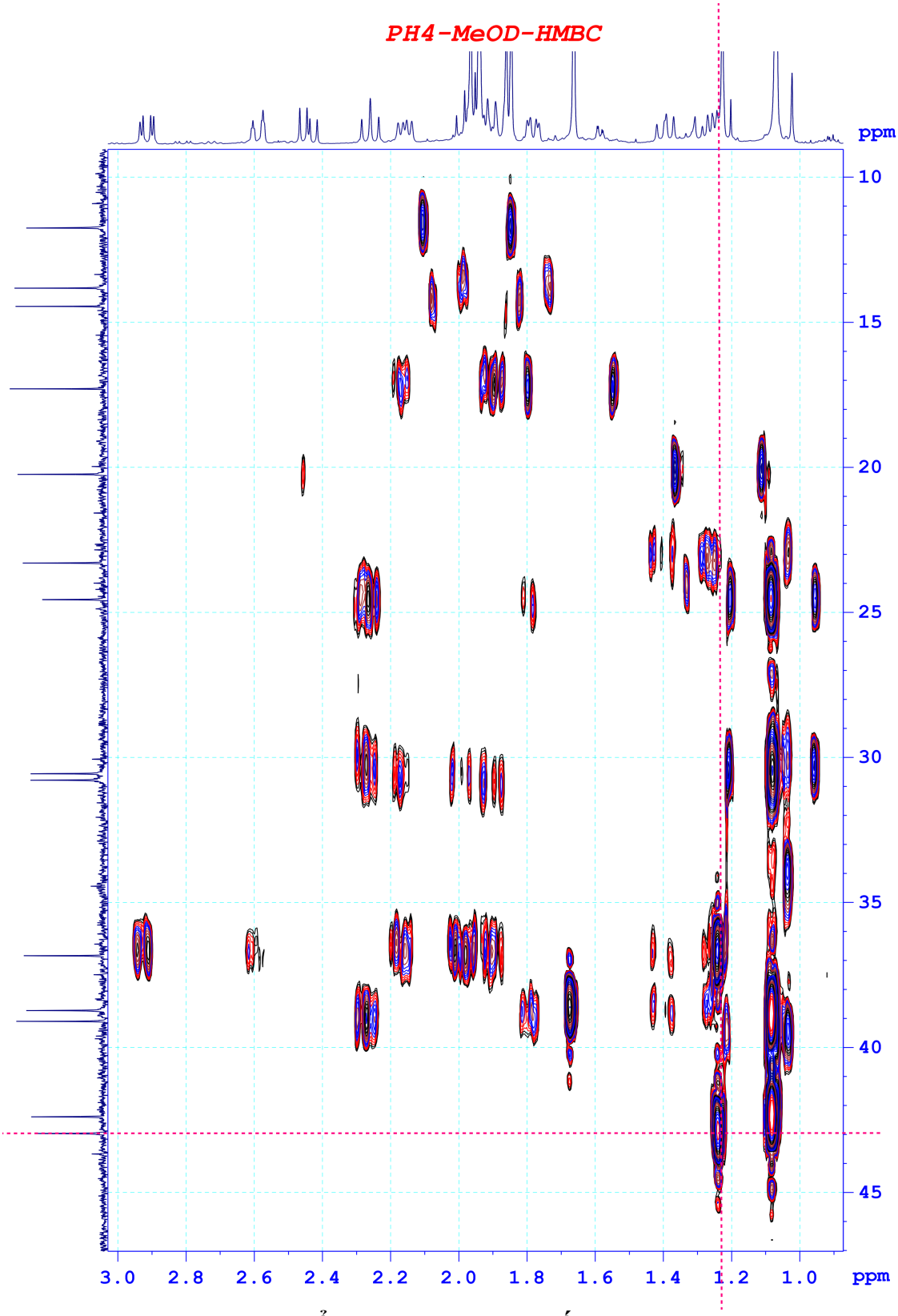
Phổ HMBC của hợp chất PH4



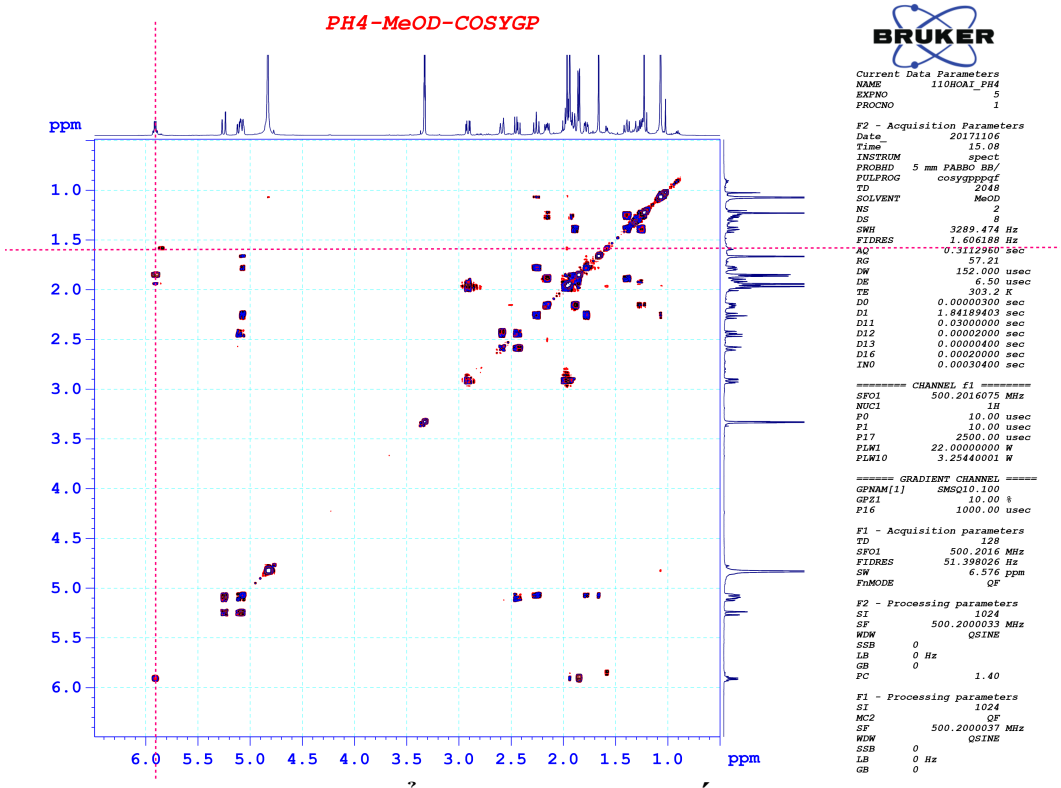
Phổ HMBC của hợp chất PH4



Phổ HMBC của hợp chất PH4

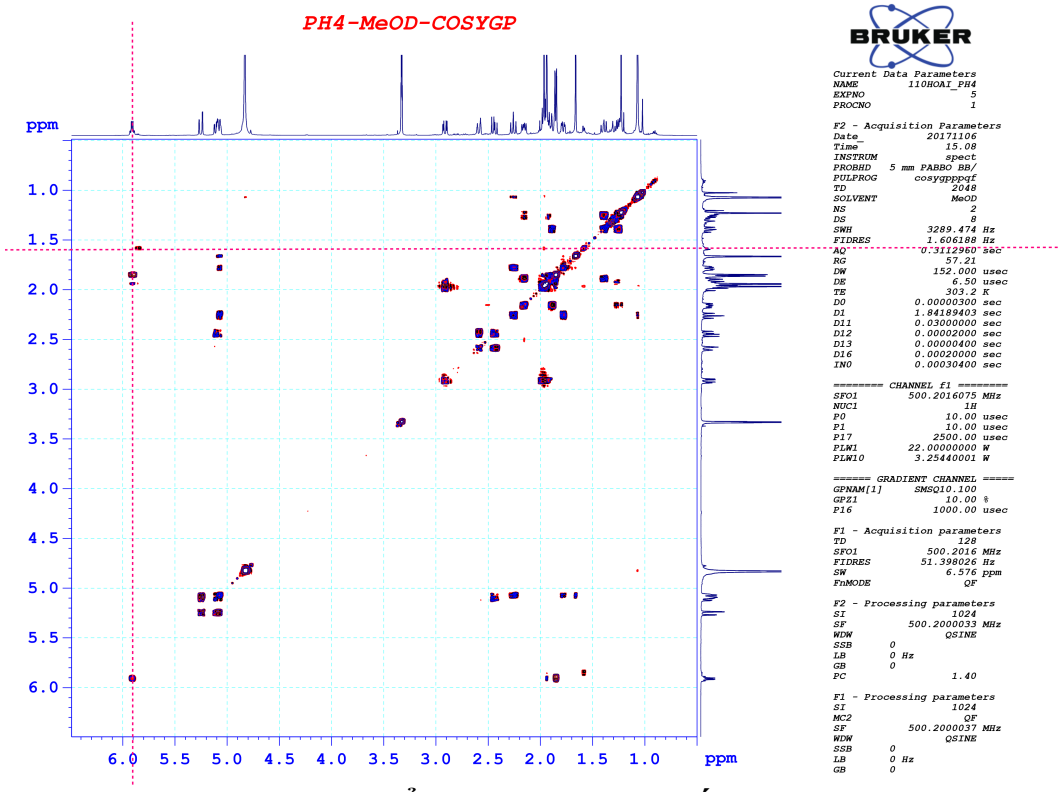


Phổ HMBC của hợp chất PH4



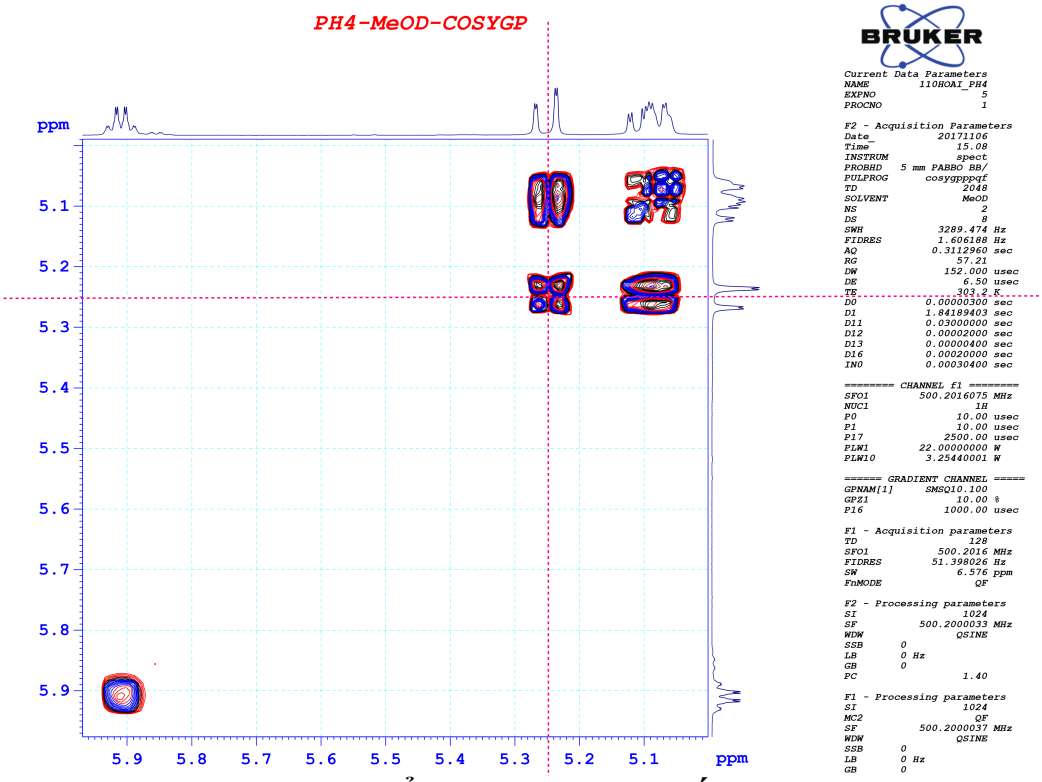

```
Current Data Parameters
NAME          110HOAI_PH4
EXPNO                   5
PROCNO                  1

F2 - Acquisition Parameters
Date_           20171106
Time               15.08
INSTRUM            spect
PROBHD   5 mm PABBO BB/
PULPROG      cosygpppqf
TD                  2048
SOLVENT             MeOD
NS                     2
DS                     8
SWH             3289.474 Hz
FIDRES          1.606188 Hz
AQ             0.3112960 sec
RG                 57.21
DW               152.000 usec
DE                  6.50 usec
TE                 303.2 K
D0            0.00000300 sec
D1            1.84189403 sec
D11           0.03000000 sec
D12           0.00002000 sec
D13           0.00000400 sec
D16           0.00020000 sec
IN0           0.00030400 sec

======== CHANNEL f1 ========
SFO1        500.2016075 MHz
NUC1                  1H
P0                 10.00 usec
P1                 10.00 usec
P17              2500.00 usec
PLW1         22.00000000 W
PLW10         3.25440001 W

====== GRADIENT CHANNEL =====
GPNAM[1]      SMSQ10.100
GPZ1               10.00 %
P16              1000.00 usec

F1 - Acquisition parameters
TD                   128
SFO1            500.2016 MHz
FIDRES         51.398026 Hz
SW                 6.576 ppm
FnMODE                QF

F2 - Processing parameters
SI                   1024
SF            500.2000033 MHz
WDW                 QSINE
SSB       0
LB        0 Hz
GB        0
PC                   1.40

F1 - Processing parameters
SI                   1024
MC2                    QF
SF            500.2000037 MHz
WDW                 QSINE
SSB       0
LB        0 Hz
GB        0
```

Phổ COSY của hợp chất PH4

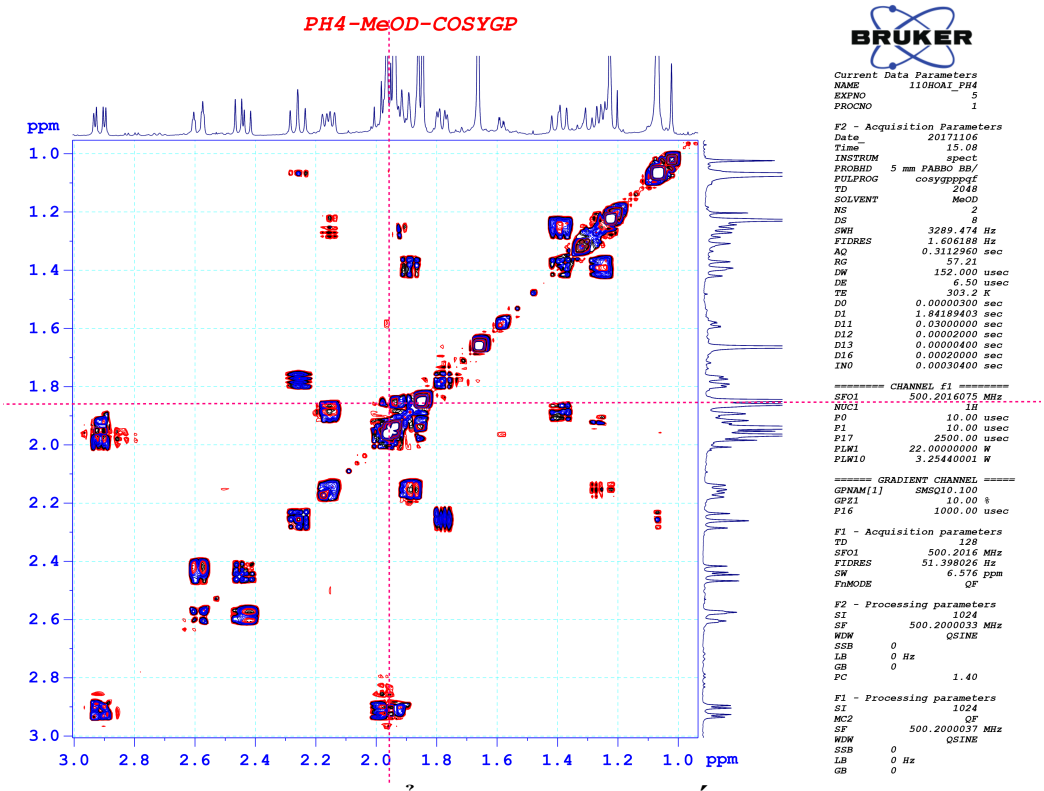



```
Current Data Parameters
NAME          110HOAI_PH4
EXPNO                   5
PROCNO                  1

F2 - Acquisition Parameters
Date_           20171106
Time               15.08
INSTRUM            spect
PROBHD   5 mm PABBO BB/
PULPROG      cosygpppqf
TD                  2048
SOLVENT             MeOD
NS                     2
DS                     8
SWH             3289.474 Hz
FIDRES          1.606188 Hz
AQ             0.3112960 sec
RG                 57.21
DW               152.000 usec
DE                  6.50 usec
TE                 303.2 K
D0            0.00000300 sec
D1            1.84189403 sec
D11           0.03000000 sec
D12           0.00002000 sec
D13           0.00000400 sec
D16           0.00020000 sec
IN0           0.00030400 sec

======== CHANNEL f1 ========
SFO1        500.2016075 MHz
NUC1                  1H
P0                 10.00 usec
P1                 10.00 usec
P17              2500.00 usec
PLW1         22.00000000 W
PLW10         3.25440001 W

====== GRADIENT CHANNEL =====
GPNAM[1]      SMSQ10.100
GPZ1               10.00 %
P16              1000.00 usec

F1 - Acquisition parameters
TD                   128
SFO1            500.2016 MHz
FIDRES         51.398026 Hz
SW                 6.576 ppm
FnMODE                QF

F2 - Processing parameters
SI                   1024
SF            500.2000033 MHz
WDW                 QSINE
SSB       0
LB        0 Hz
GB        0
PC                   1.40

F1 - Processing parameters
SI                   1024
MC2                    QF
SF            500.2000037 MHz
WDW                 QSINE
SSB       0
LB        0 Hz
GB        0
```

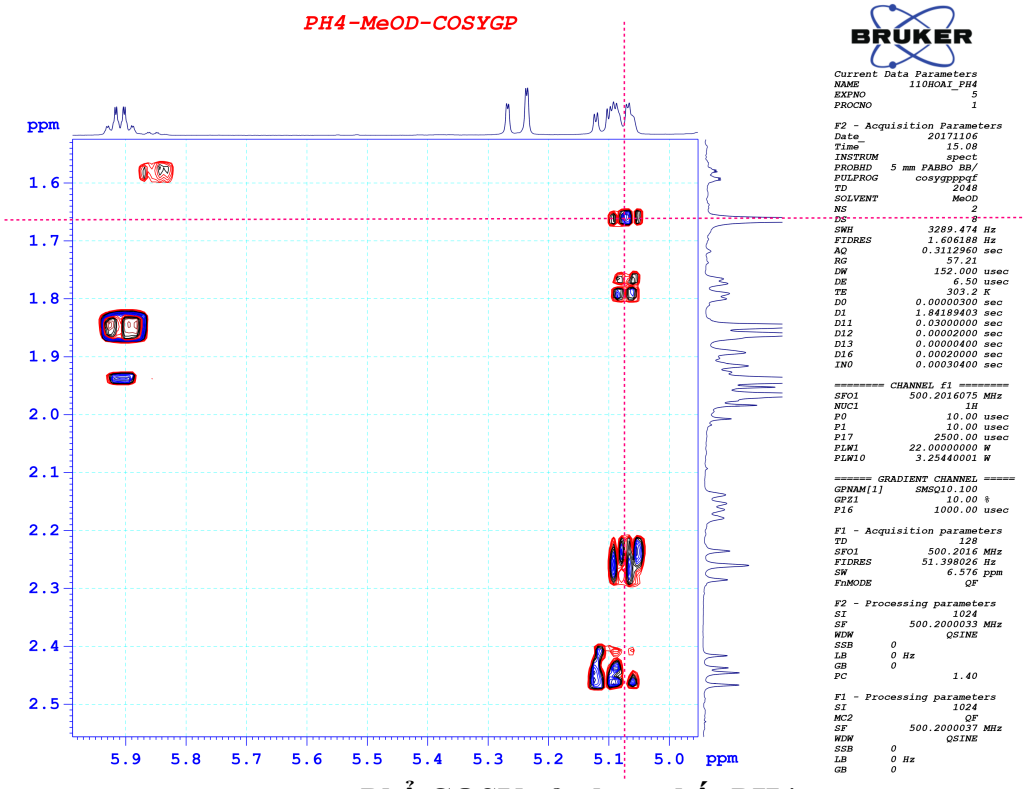
Phổ COSY của hợp chất PH4



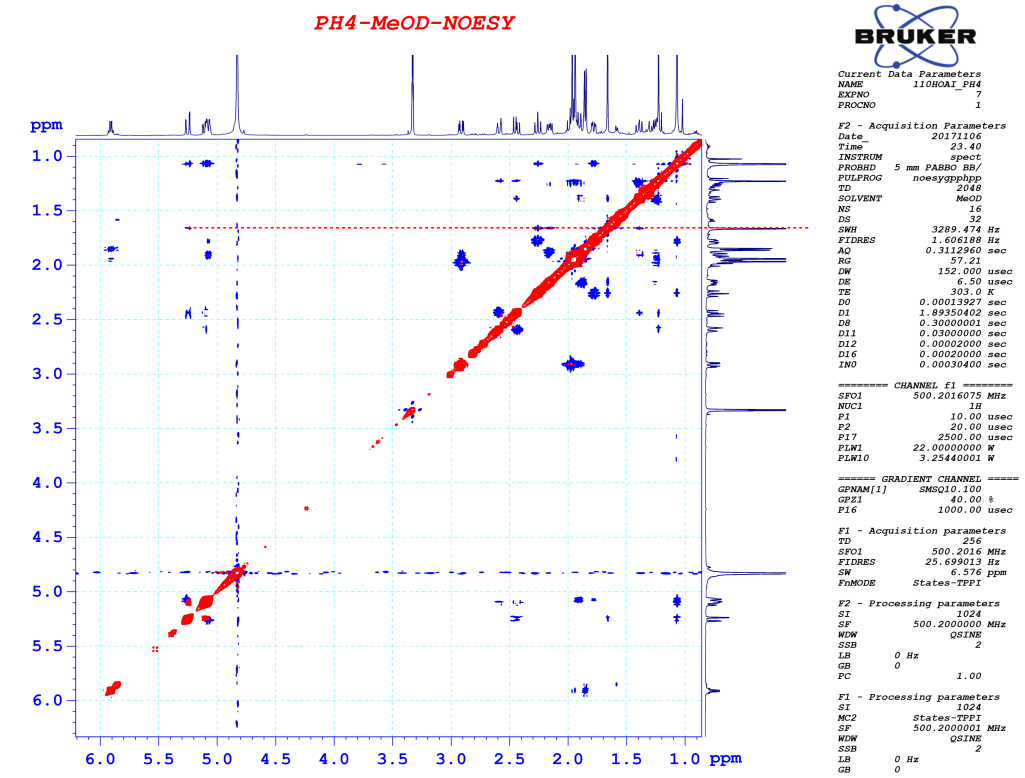
Phổ COSY của hợp chất PH4



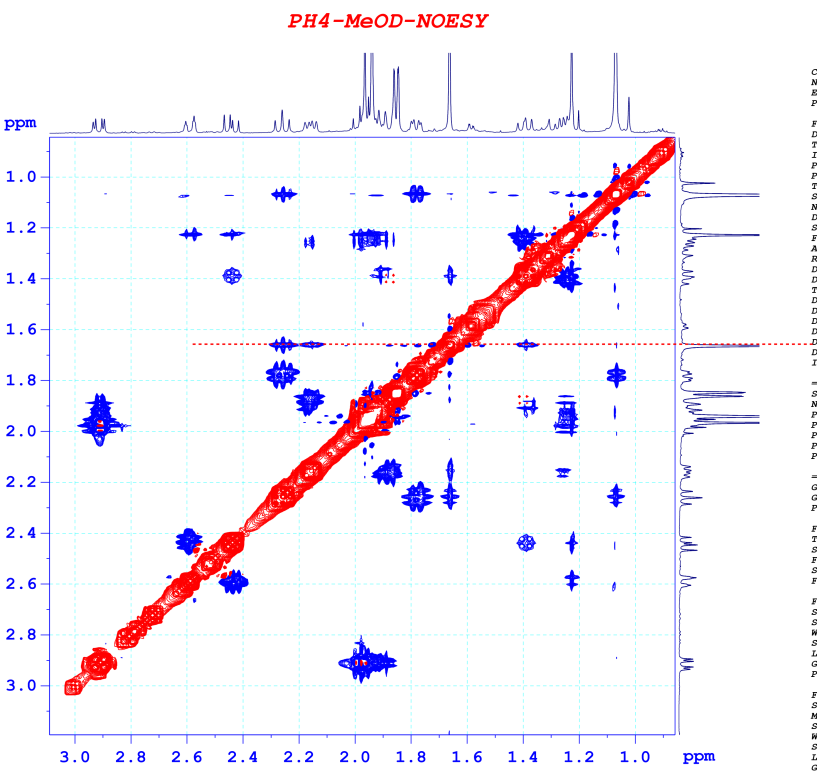
Phổ COSY của hợp chất PH4



Phổ COSY của hợp chất PH4

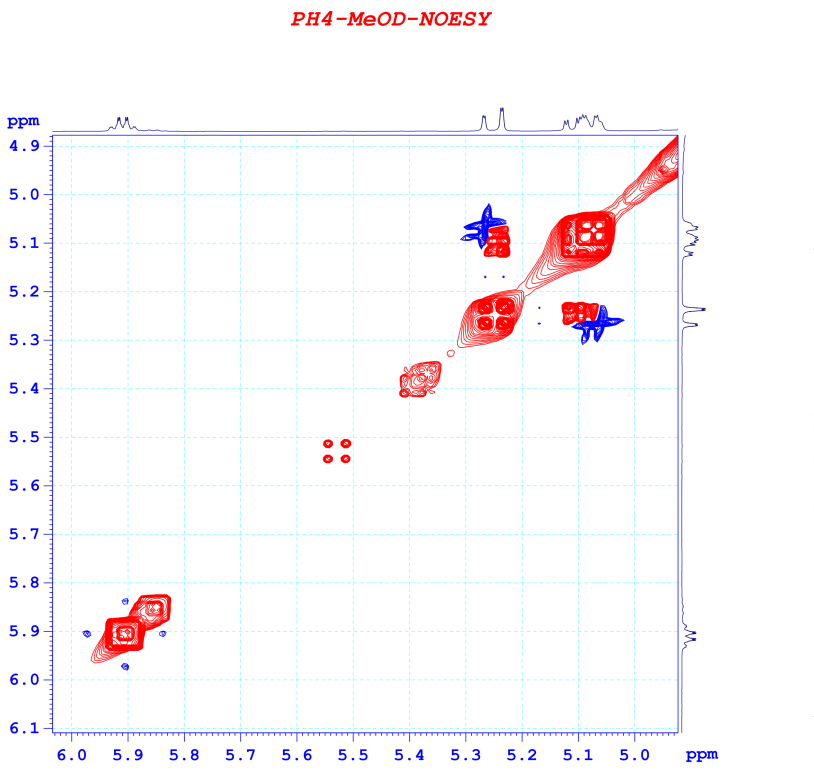


Phổ NOESY của hợp chất PH4



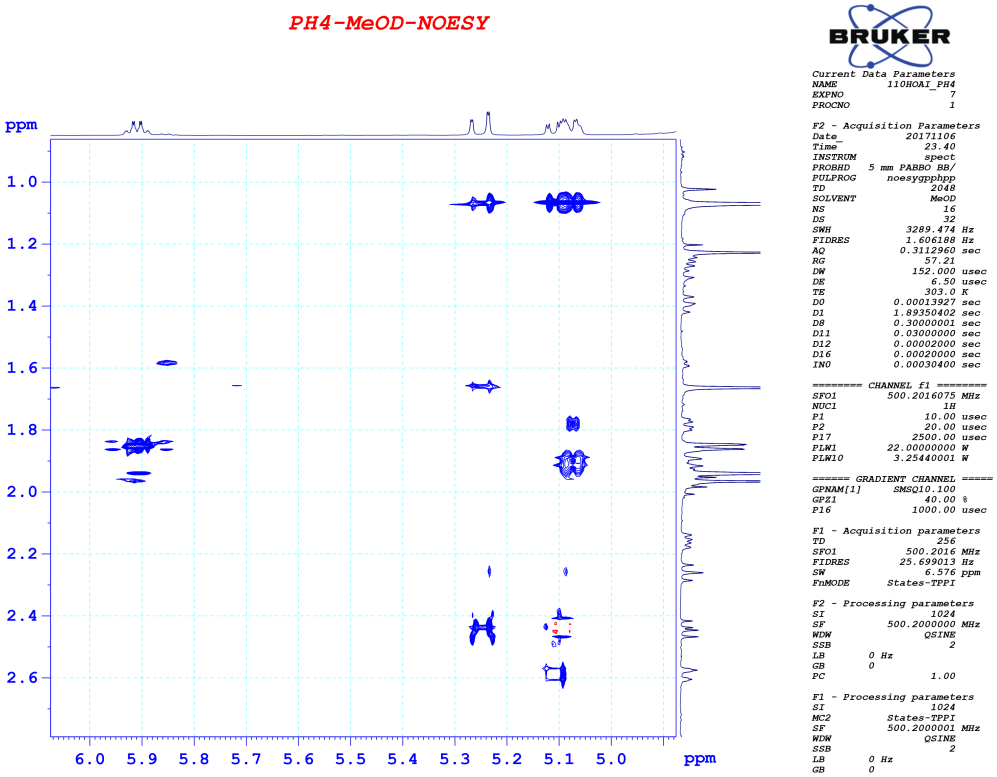

```
Current Data Parameters
NAME          110HOAI_PH4
EXPNO                   7
PROCNO                  1

F2 - Acquisition Parameters
Date_           20171106
Time                23.40
INSTRUM             spect
PROBHD   5 mm PABBO BB/
PULPROG     noesygpphpp
TD                   2048
SOLVENT              MeOD
NS                     16
DS                     32
SWH             3289.474 Hz
FIDRES          1.606188 Hz
AQ             0.3112960 sec
RG                 57.21
DW               152.000 usec
DE                  6.50 usec
TE                 303.0 K
D0             0.00013927 sec
D1             1.89350402 sec
D8             0.30000001 sec
D11            0.03000000 sec
D12            0.00002000 sec
D16            0.00020000 sec
IN0            0.00030400 sec

======== CHANNEL f1 ========
SFO1         500.2016075 MHz
NUC1                   1H
P1                  10.00 usec
P2                  20.00 usec
P17                2500.00 usec
PLW1         22.00000000 W
PLW10         3.25440001 W

====== GRADIENT CHANNEL =====
GPNAM[1]      SMSQ10.100
GPZ1                40.00 %
P16               1000.00 usec

F1 - Acquisition parameters
TD                    256
SFO1            500.2016 MHz
FIDRES         25.699013 Hz
SW                  6.576 ppm
FnMODE       States-TPPI

F2 - Processing parameters
SI                   1024
SF           500.2000000 MHz
WDW                 QSINE
SSB                     2
LB        0 Hz
GB        0
PC                   1.00

F1 - Processing parameters
SI                   1024
MC2          States-TPPI
SF           500.2000001 MHz
WDW                 QSINE
SSB                     2
LB        0 Hz
GB        0
```

Phổ NOESY của hợp chất PH4




```
Current Data Parameters
NAME          110HOAI_PH4
EXPNO                   7
PROCNO                  1

F2 - Acquisition Parameters
Date_           20171106
Time                23.40
INSTRUM             spect
PROBHD   5 mm PABBO BB/
PULPROG     noesygpphpp
TD                   2048
SOLVENT              MeOD
NS                     16
DS                     32
SWH             3289.474 Hz
FIDRES          1.606188 Hz
AQ             0.3112960 sec
RG                 57.21
DW               152.000 usec
DE                  6.50 usec
TE                 303.0 K
D0             0.00013927 sec
D1             1.89350402 sec
D8             0.30000001 sec
D11            0.03000000 sec
D12            0.00002000 sec
D16            0.00020000 sec
IN0            0.00030400 sec

======== CHANNEL f1 ========
SFO1         500.2016075 MHz
NUC1                   1H
P1                  10.00 usec
P2                  20.00 usec
P17                2500.00 usec
PLW1         22.00000000 W
PLW10         3.25440001 W

====== GRADIENT CHANNEL =====
GPNAM[1]      SMSQ10.100
GPZ1                40.00 %
P16               1000.00 usec

F1 - Acquisition parameters
TD                    256
SFO1            500.2016 MHz
FIDRES         25.699013 Hz
SW                  6.576 ppm
FnMODE       States-TPPI

F2 - Processing parameters
SI                   1024
SF           500.2000000 MHz
WDW                 QSINE
SSB                     2
LB        0 Hz
GB        0
PC                   1.00

F1 - Processing parameters
SI                   1024
MC2          States-TPPI
SF           500.2000001 MHz
WDW                 QSINE
SSB                     2
LB        0 Hz
GB        0
```

Phổ NOESY của hợp chất PH4




```
Current Data Parameters
NAME          110HOAI_PH4
EXPNO               7
PROCNO              1

F2 - Acquisition Parameters
Date_           20171106
Time              23.40
INSTRUM           spect
PROBHD   5 mm PABBO BB/
PULPROG     noesygpphpp
TD                2048
SOLVENT           MeOD
NS                  16
DS                  32
SWH            3289.474 Hz
FIDRES         1.606188 Hz
AQ            0.3112960 sec
RG               57.21
DW             152.000 usec
DE               6.50 usec
TE              303.0 K
D0           0.00013927 sec
D1           1.89350402 sec
D8           0.30000001 sec
D11          0.03000000 sec
D12          0.00002000 sec
D16          0.00020000 sec
IN0          0.00030400 sec

======== CHANNEL f1 ========
SFO1        500.2016075 MHz
NUC1                1H
P1               10.00 usec
P2               20.00 usec
P17            2500.00 usec
PLW1        22.00000000 W
PLW10        3.25440001 W

====== GRADIENT CHANNEL =====
GPNAM[1]     SMSQ10.100
GPZ1             40.00 %
P16            1000.00 usec

F1 - Acquisition parameters
TD                 256
SFO1           500.2016 MHz
FIDRES        25.699013 Hz
SW             6.576 ppm
FnMODE      States-TPPI

F2 - Processing parameters
SI                1024
SF          500.2000000 MHz
WDW               QSINE
SSB                   2
LB        0 Hz
GB        0
PC                1.00

F1 - Processing parameters
SI                1024
MC2         States-TPPI
SF          500.2000001 MHz
WDW               QSINE
SSB                   2
LB        0 Hz
GB        0
```

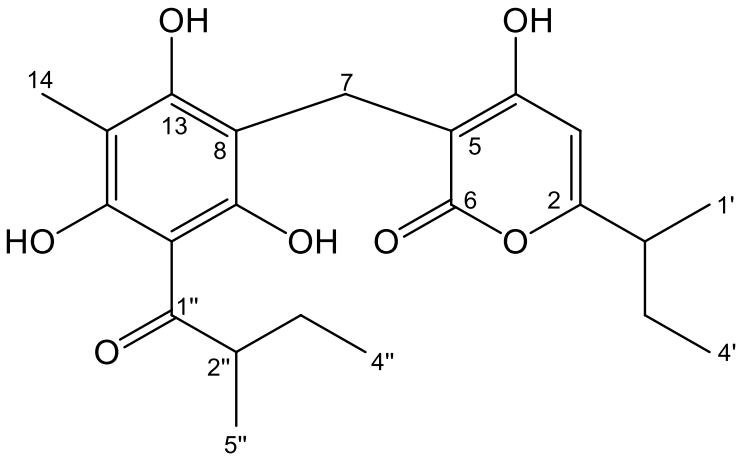
Phổ NOESY của hợp chất PH4

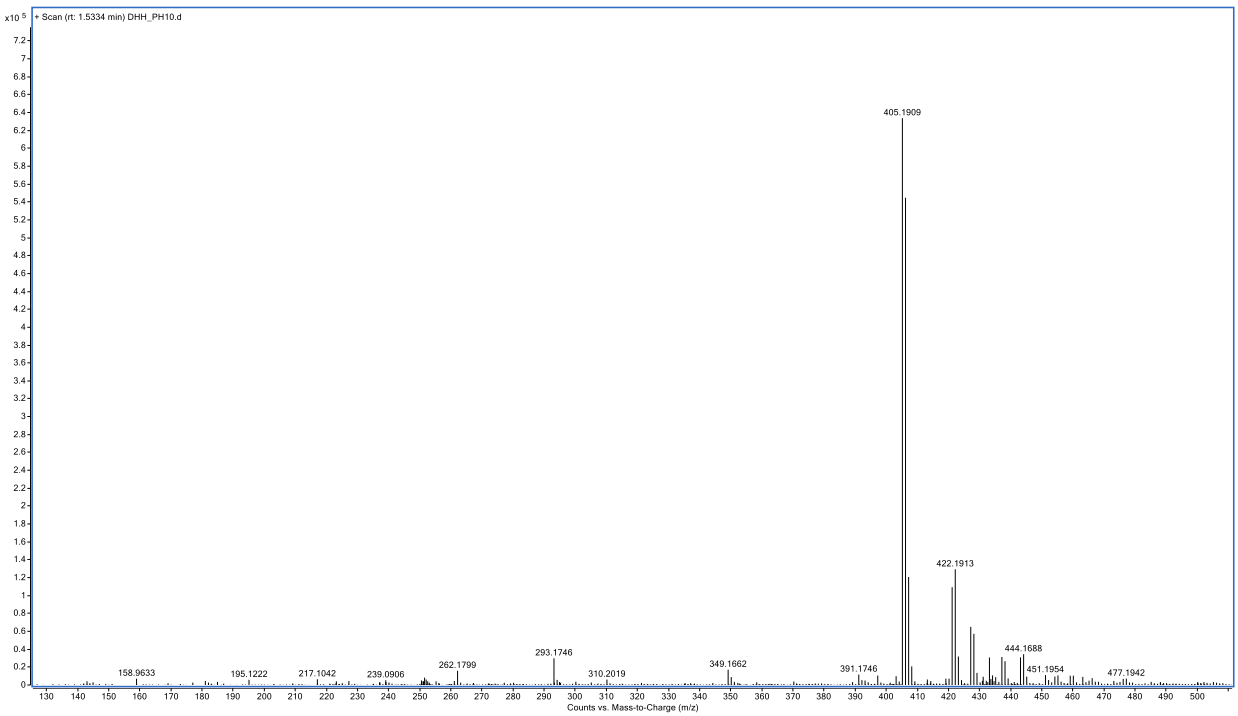
Phụ lục 3.4. Phổ của hợp chất PH10
(Pogostemonon B)

CTPT: $C_{22}H_{28}O_7$

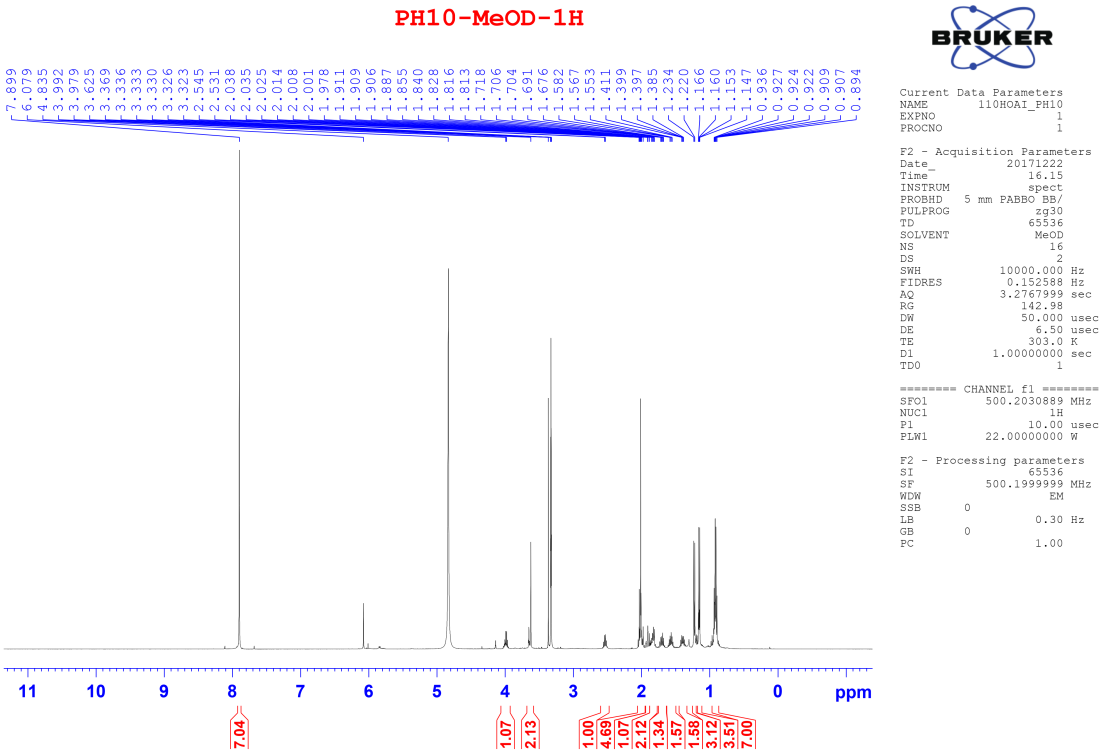
KLPT: 404,4590

- Phổ HR-ESI-MS
- Phổ ^{1}H-NMR
- Phổ ^{13}C-NMR
- Phổ HSQC
- Phổ HMBC

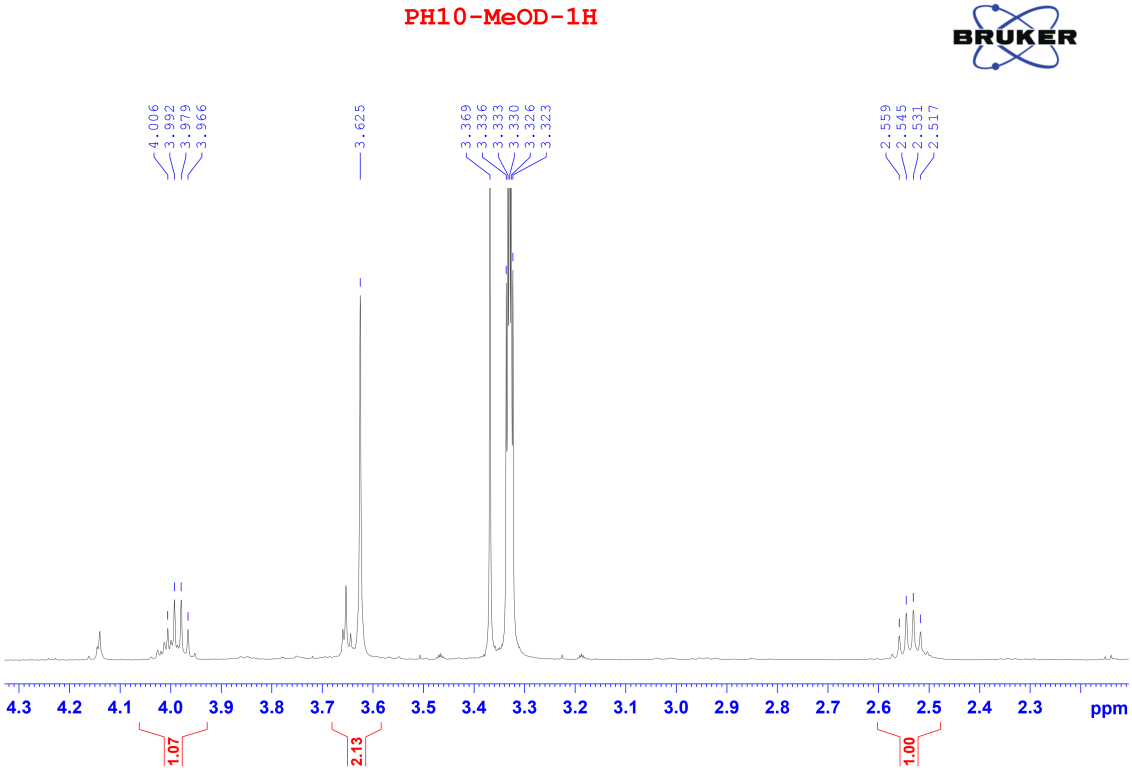




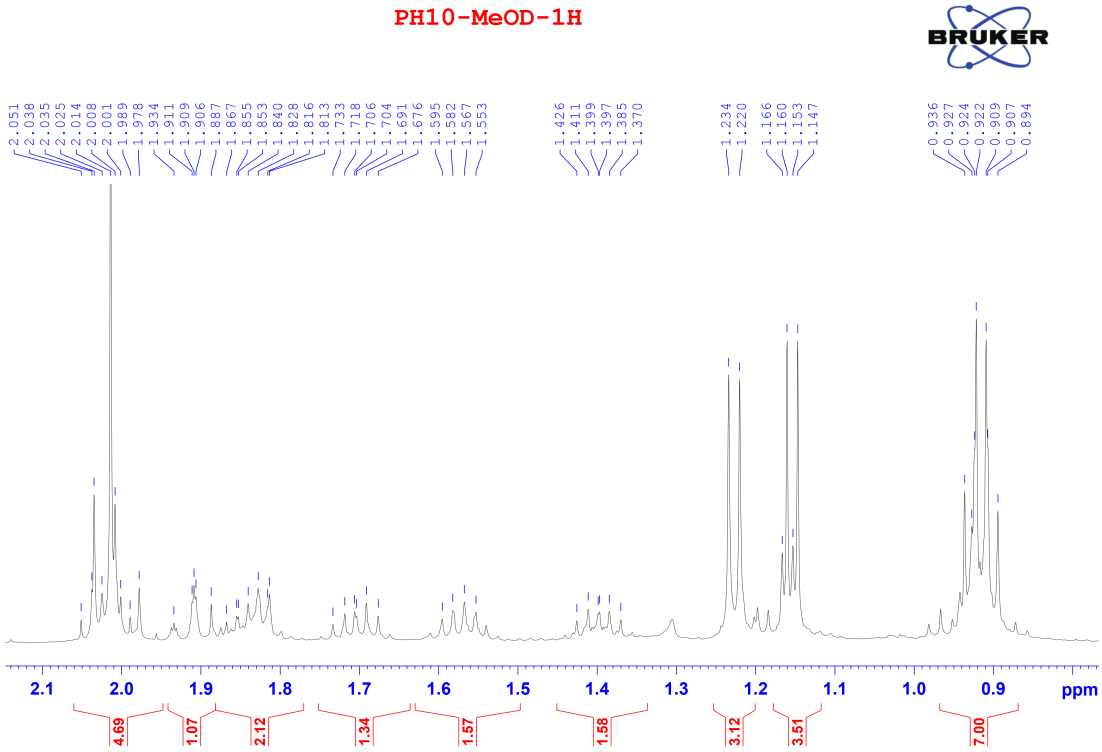
Phổ HR-ESI-MS của hợp chất PH10



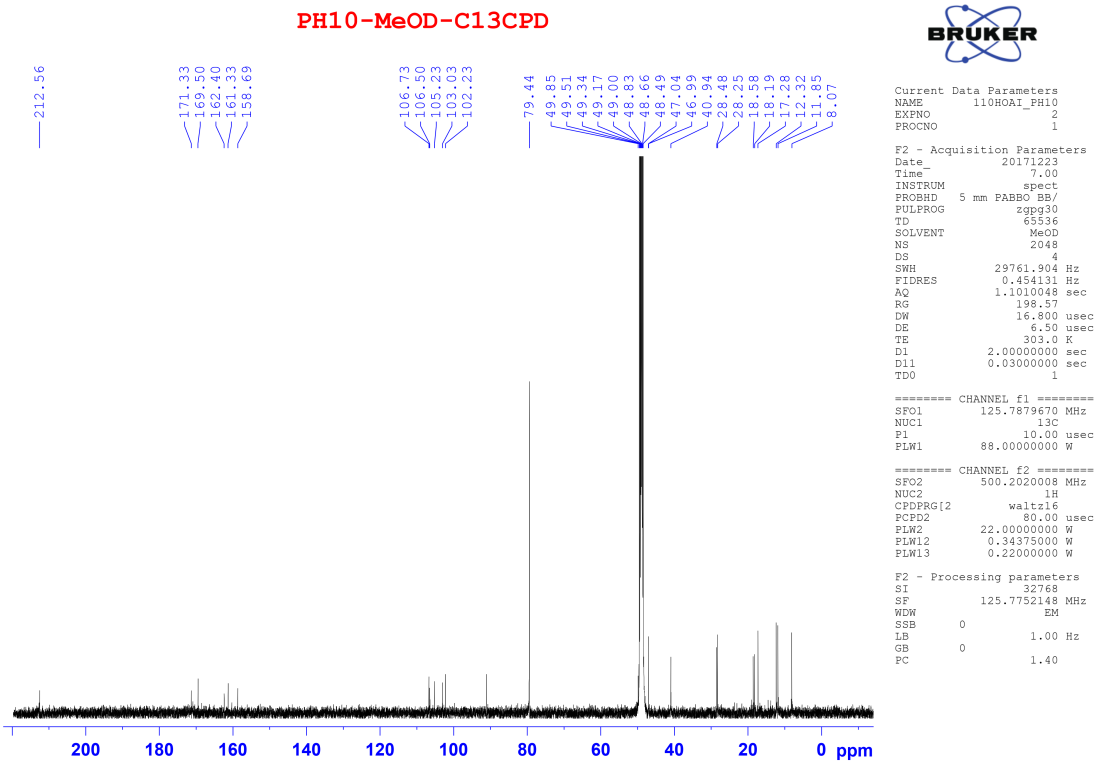
Phổ ^{1}H-NMR của hợp chất PH10



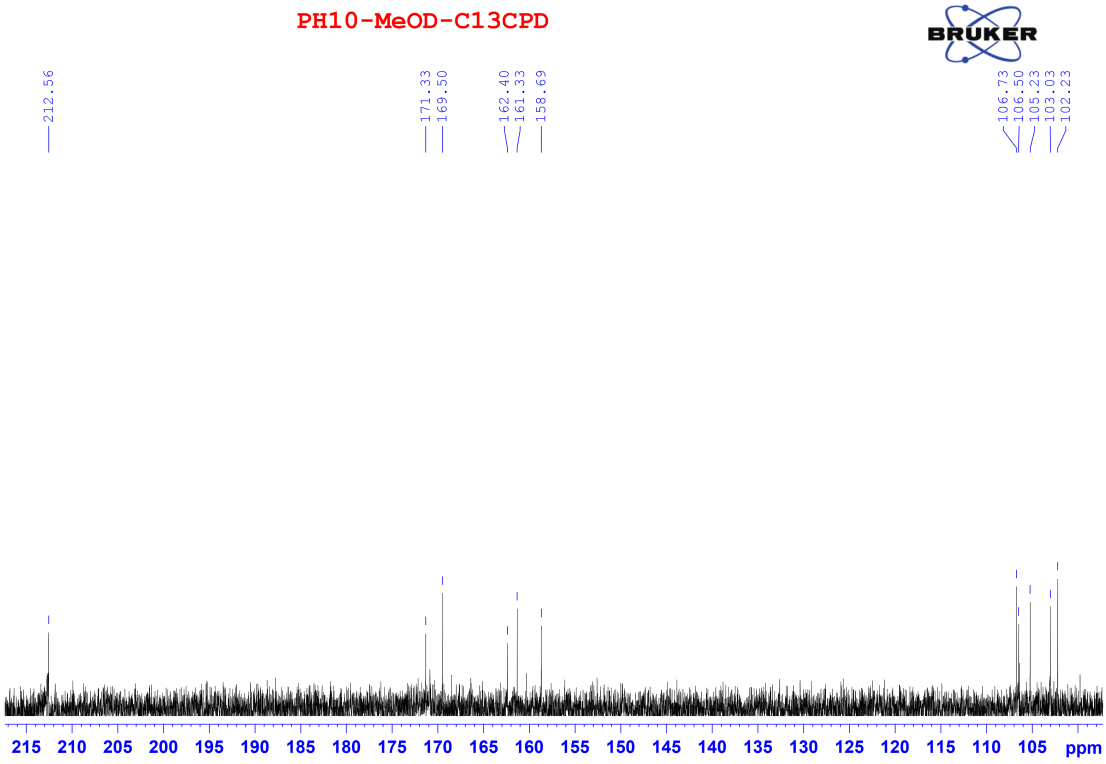
Phổ ^{1}H-NMR của hợp chất PH10



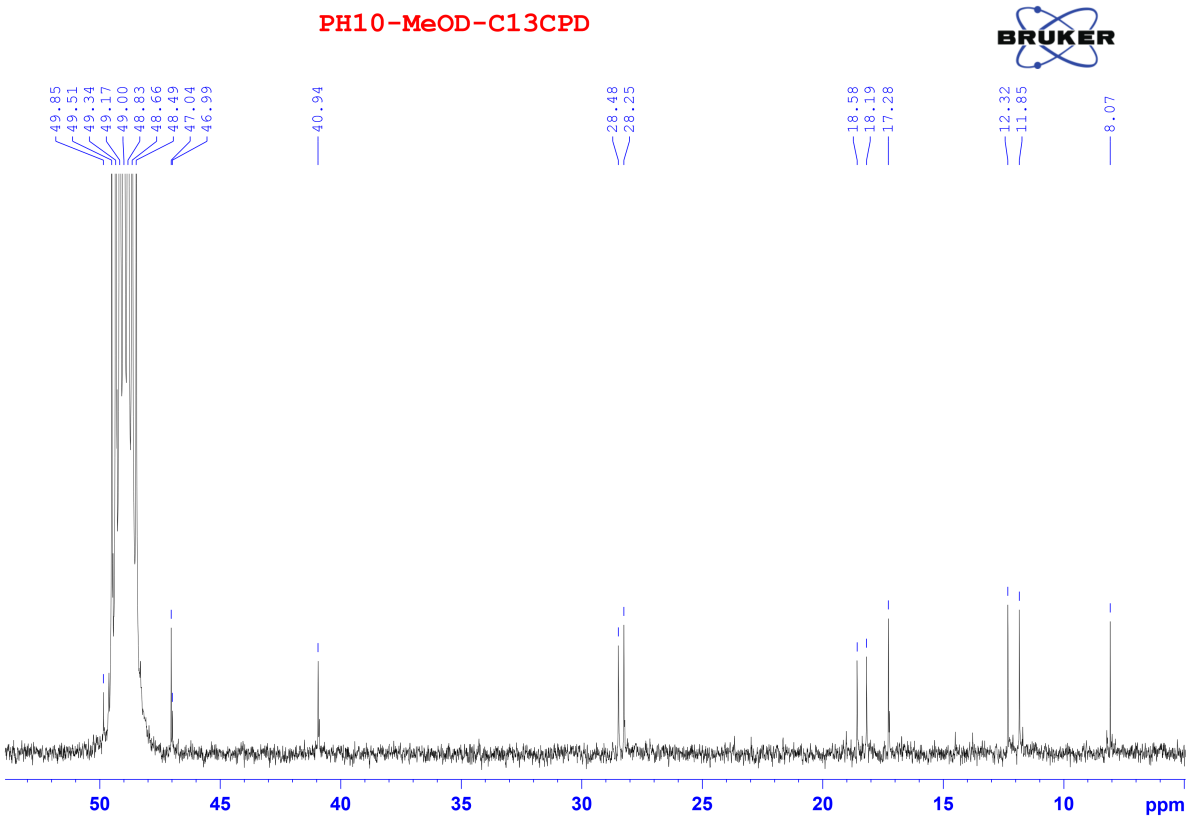
Phổ ^{1}H-NMR của hợp chất PH10



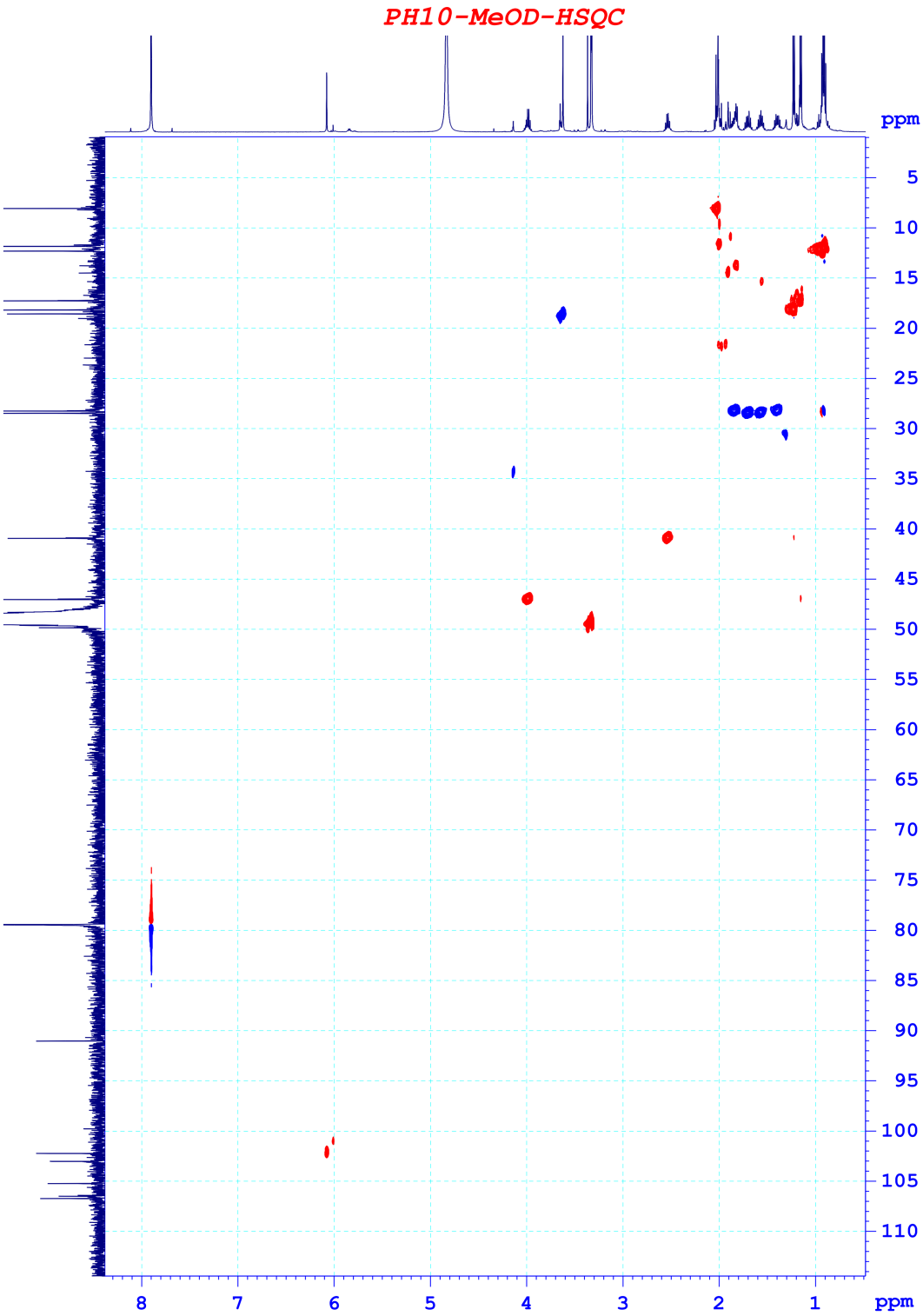
Phổ ^{13}C-NMR của hợp chất PH10



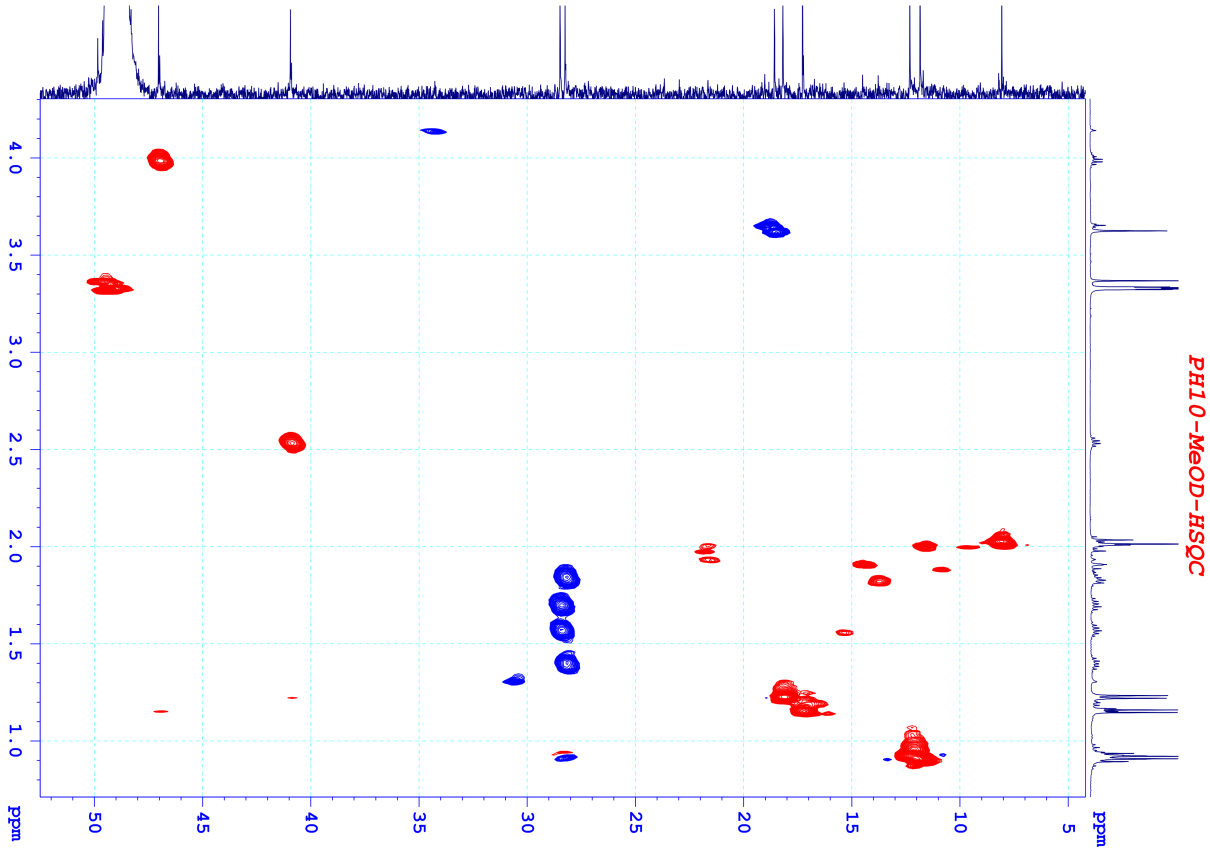
Phổ ^{13}C-NMR của hợp chất PH10



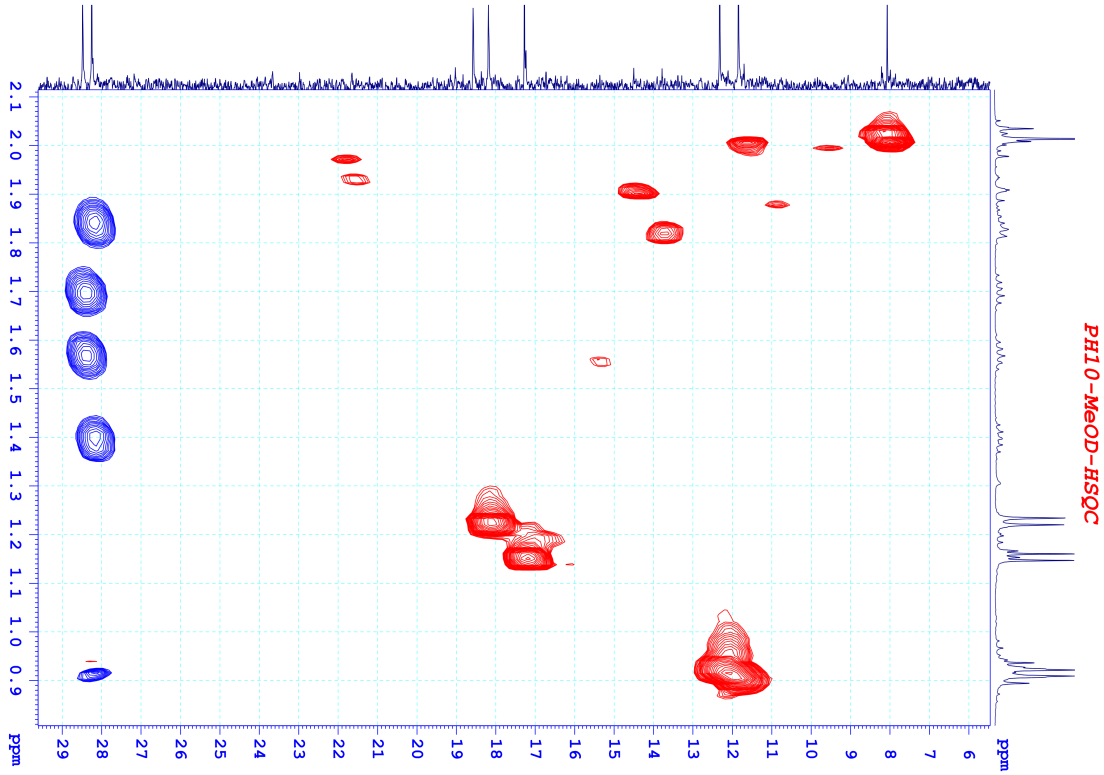
Phổ ^{13}C-NMR của hợp chất PH10



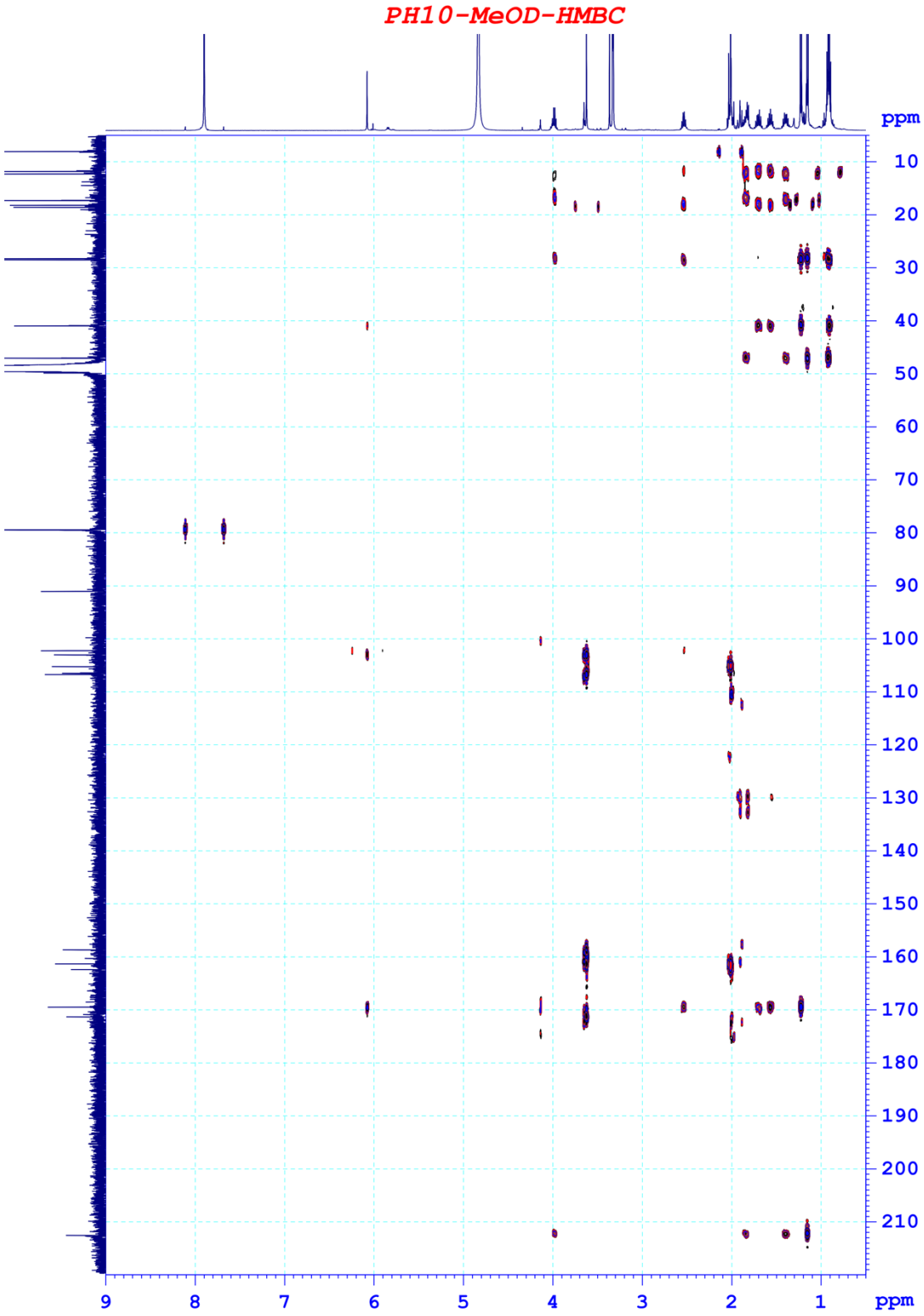
Phổ HSQC của hợp chất PH10



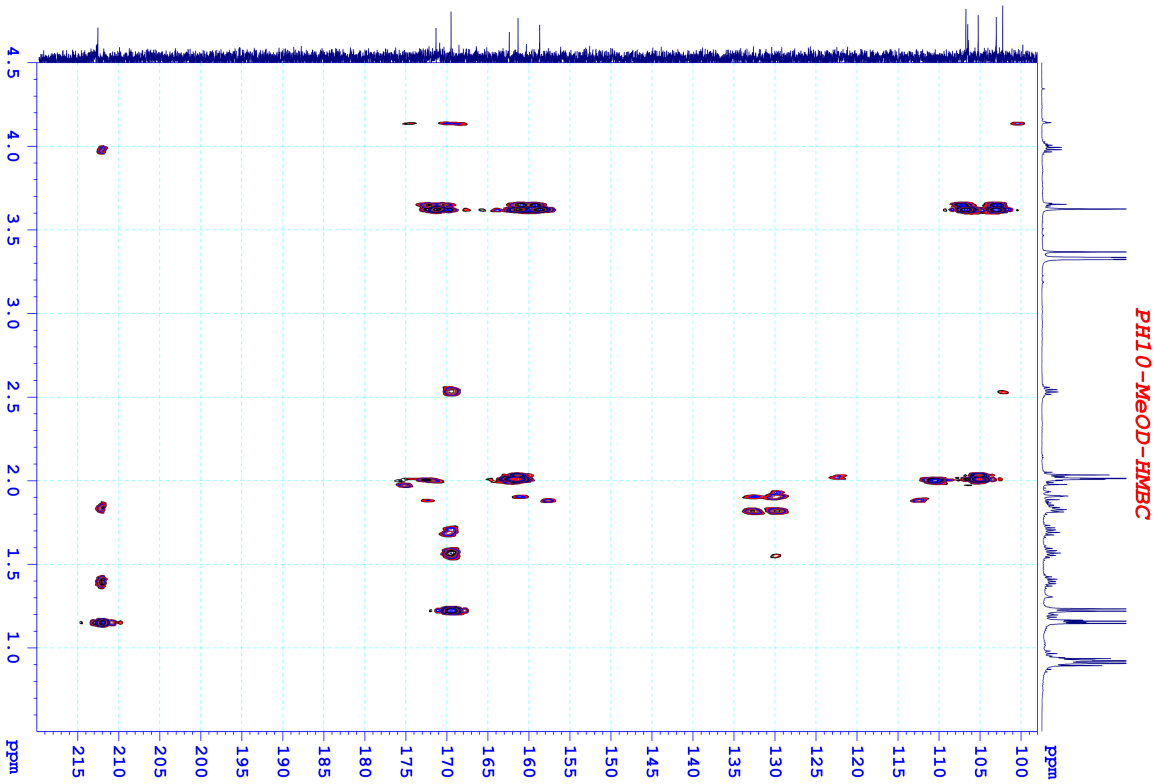
Phổ HSQC của hợp chất PH10



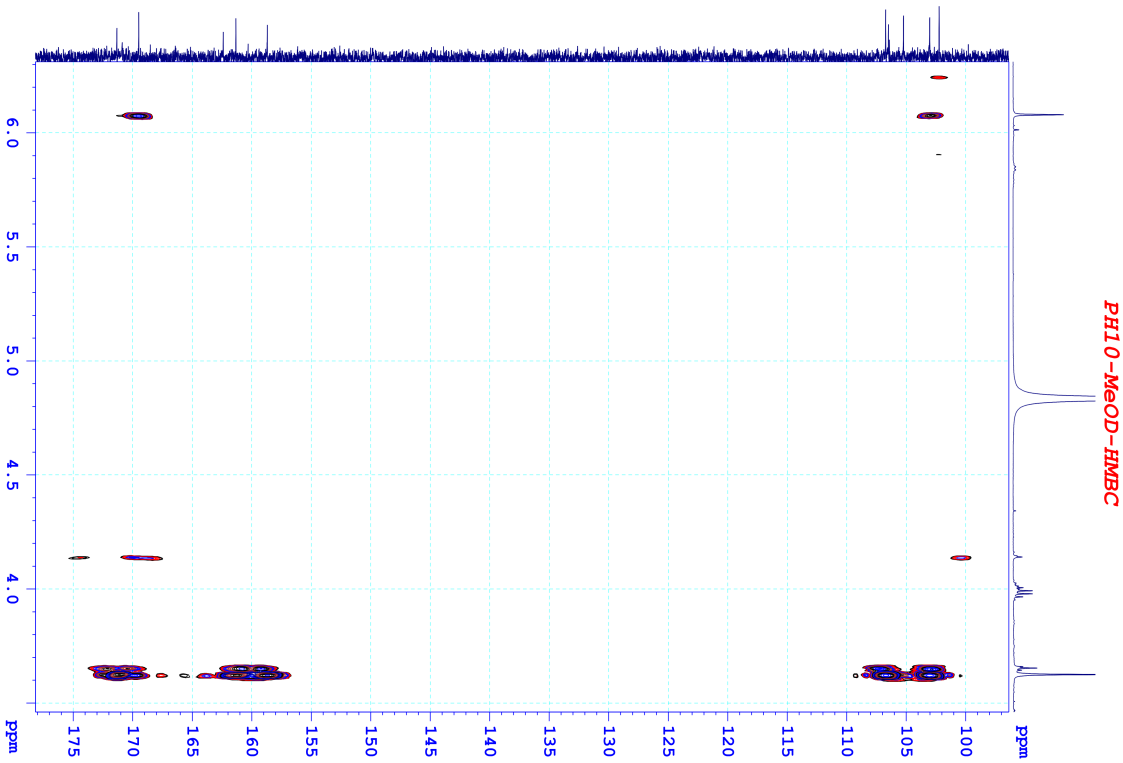
Phổ HSQC của hợp chất PH10



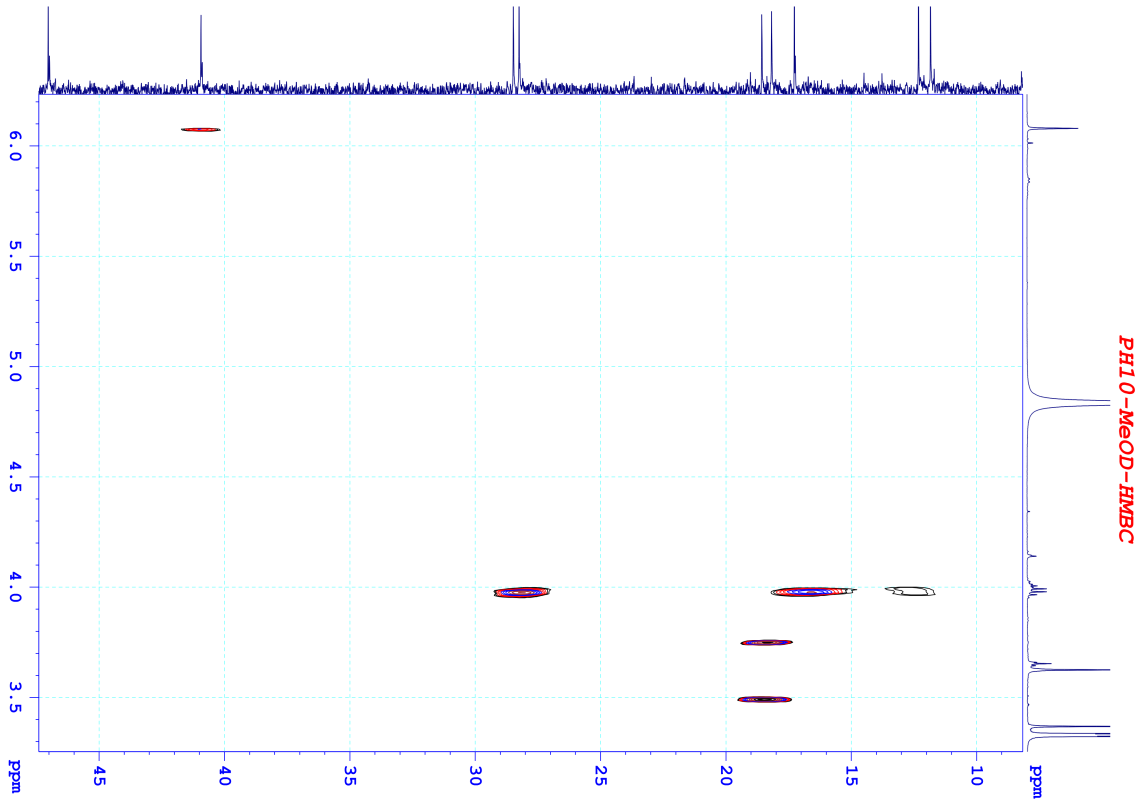
Phổ HMBCcủa hợp chất PH10



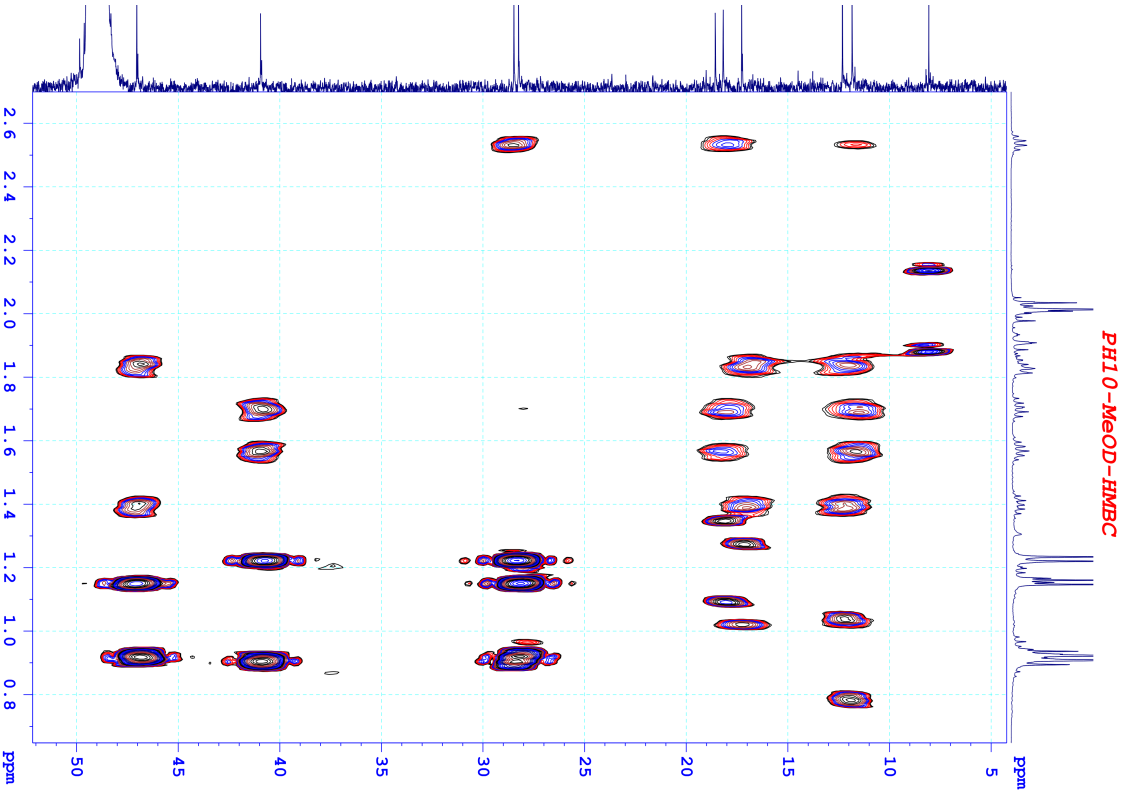
Phổ HMBCcủa hợp chất PH10



Phổ HMBCcủa hợp chất PH10



Phổ HMBCcủa hợp chất PH10

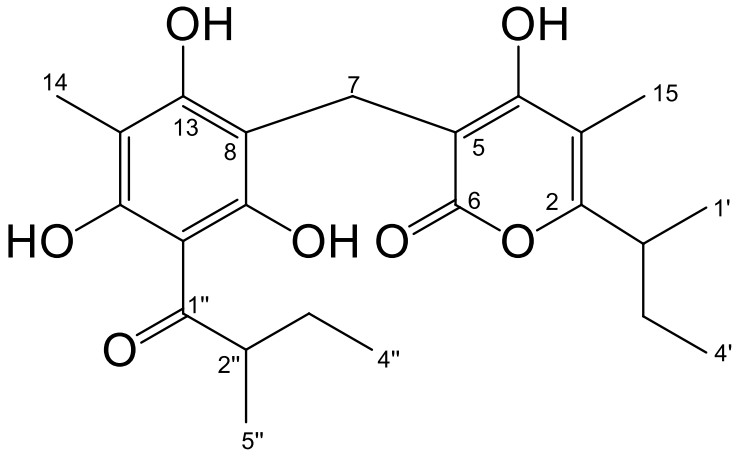


Phổ HMBCcủa hợp chất PH10

Phụ lục 3.5. Phổ của hợp chất PH19
(Pogostemonon D)

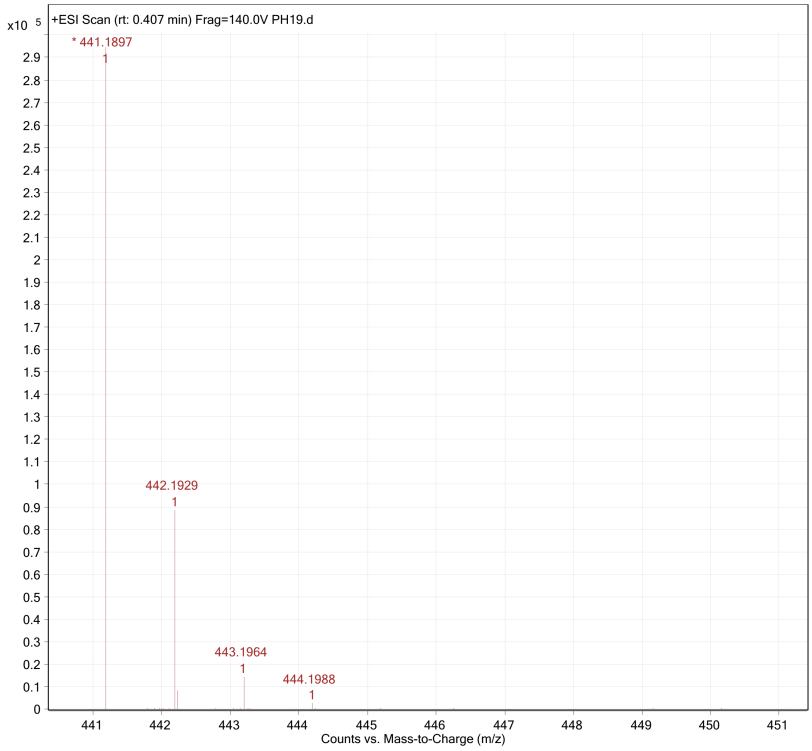
CTPT: $C_{23}H_{30}O_7$

KLPT: 418,4860



- Phổ HR-ESI-MS
- Phổ UV
- Phổ ^{1}H-NMR
- Phổ ^{13}C-NMR
- Phổ HSQC
- Phổ HMBC

Sample Name	PH19	**Position**	P1-A8	**Instrument Name**	Instrument 1
User Name		**Inj Vol**	2	**InjPosition**	
Sample Type	Sample	**IRM Calibration Status**	Success	**Data Filename**	PH19.d
ACQ Method	Cot ngan - MSMS_Pos.m	**Comment**		**Acquired Time**	08/05/2020 5:34:46 PM

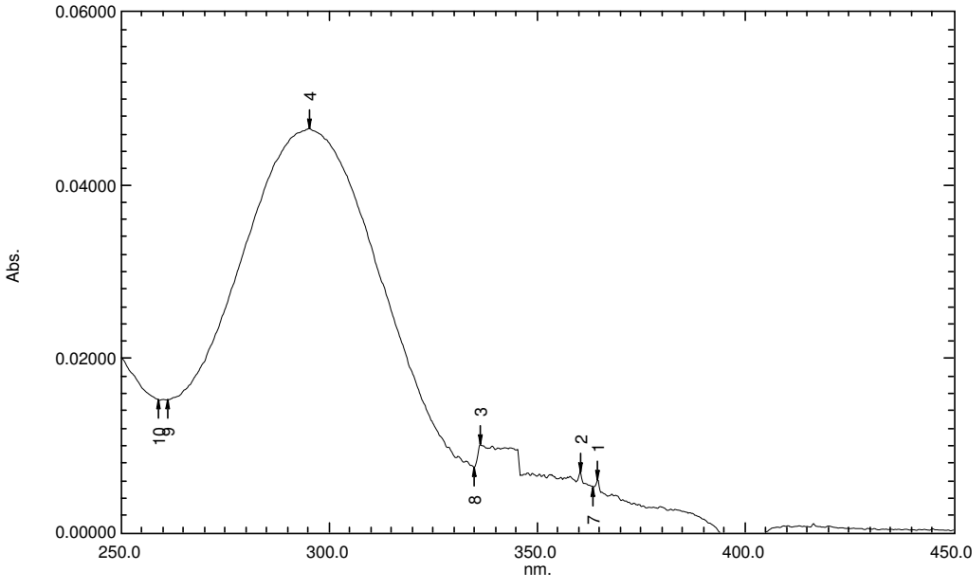


Phổ HR_ESI_MS của hợp chất PH19

Spectrum Peak Pick Report

05/07/2020 10:38:26 AM

Data Set: PH19_103303.spc - RawData



No.	P/V	Wavelength	Abs.	Description
1	↑	364.4	0.00600	
2	↑	360.2	0.00696	
3	↑	336.2	0.01010	
4	↑	295.2	0.04651	

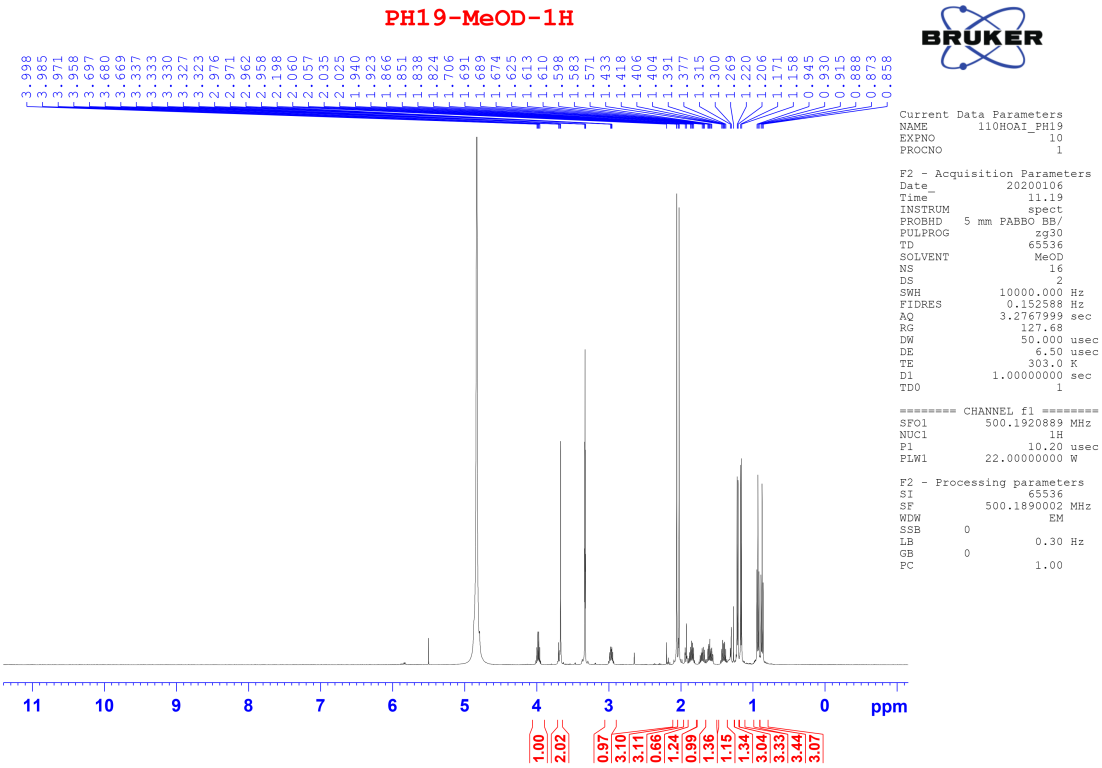
Measurement Properties
Wavelength Range (nm.): 190.0 to 600.0
Scan Speed: Fast
Sampling Interval: 0.2
Auto Sampling Interval: Disabled
Scan Mode: Auto

Instrument Properties
Instrument Type: UV-1800 Series
Measuring Mode: Absorbance
Slit Width: 1.0 nm
Light Source Change Wavelength: 360.0 nm
S/R Exchange: Normal

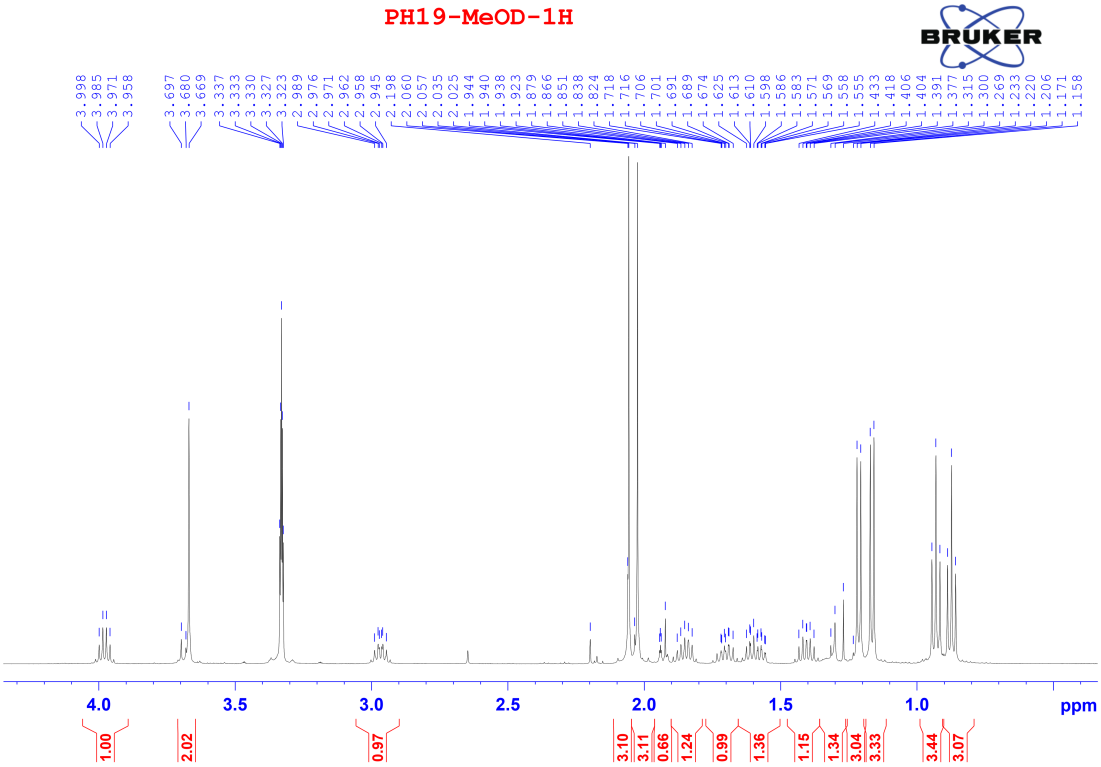
Attachment Properties
Attachment: None

Sample Preparation Properties
Weight: 0.108
Volume: 25ml
Dilution:
Path Length:
Additional Information: axit benzoic03:14:40 PM09/16/2010

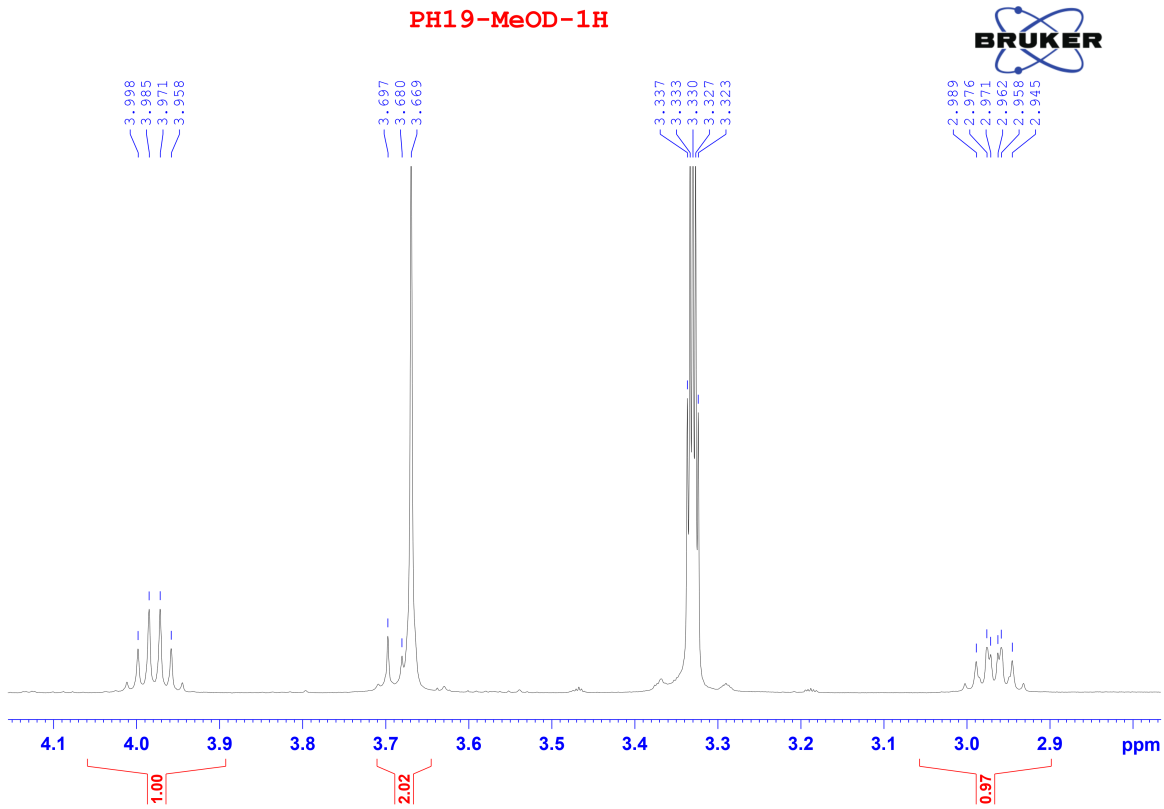
Phổ UV của hợp chất PH19



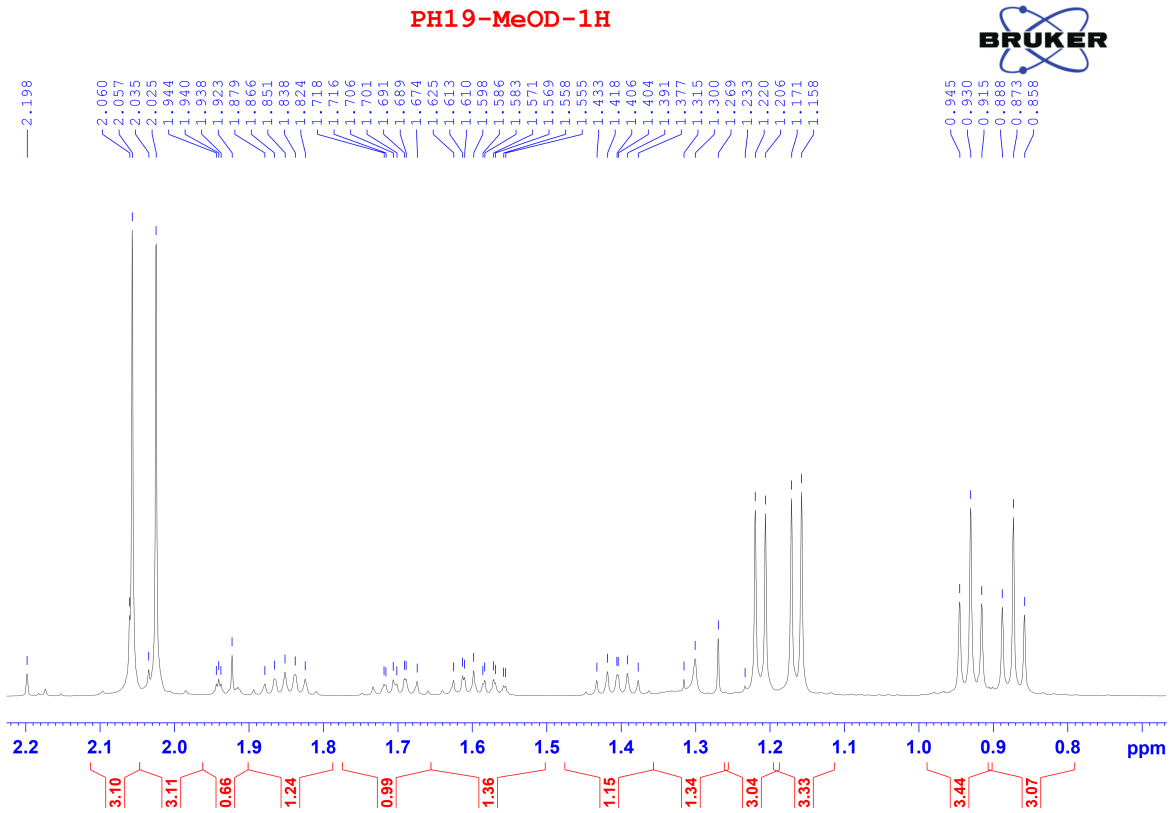
Phổ ^{1}H-NMR của hợp chất PH19



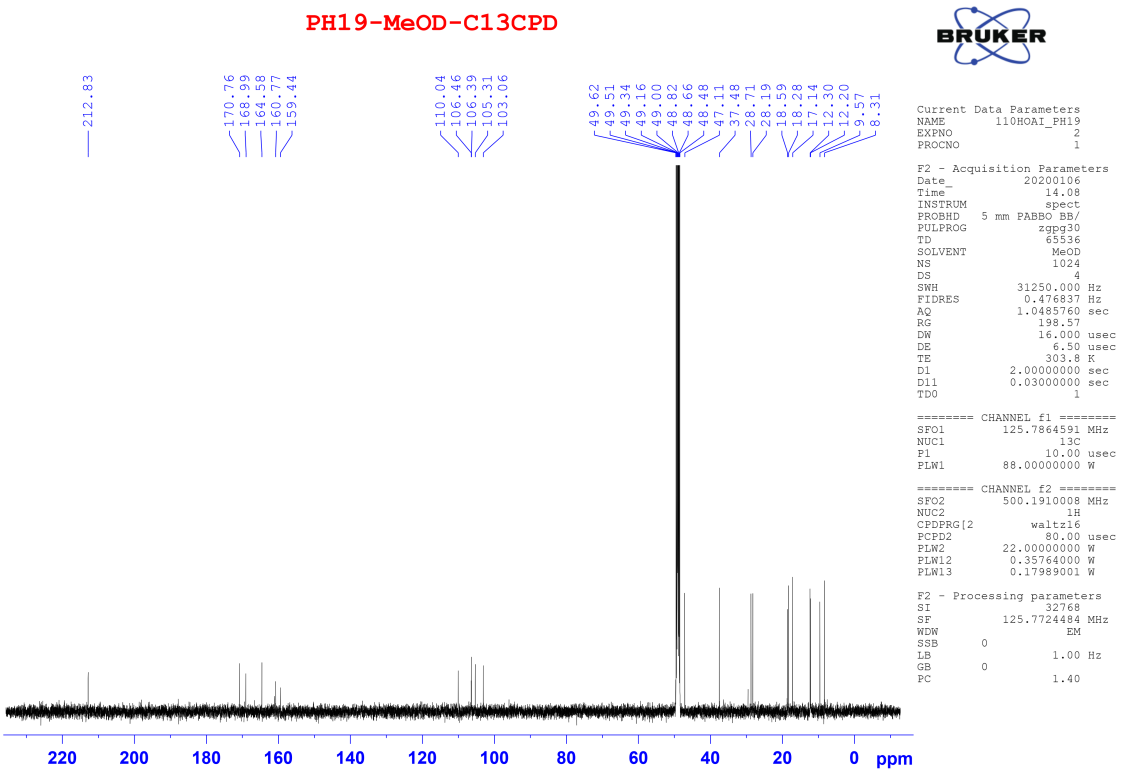
Phổ ^{1}H-NMR của hợp chất PH19



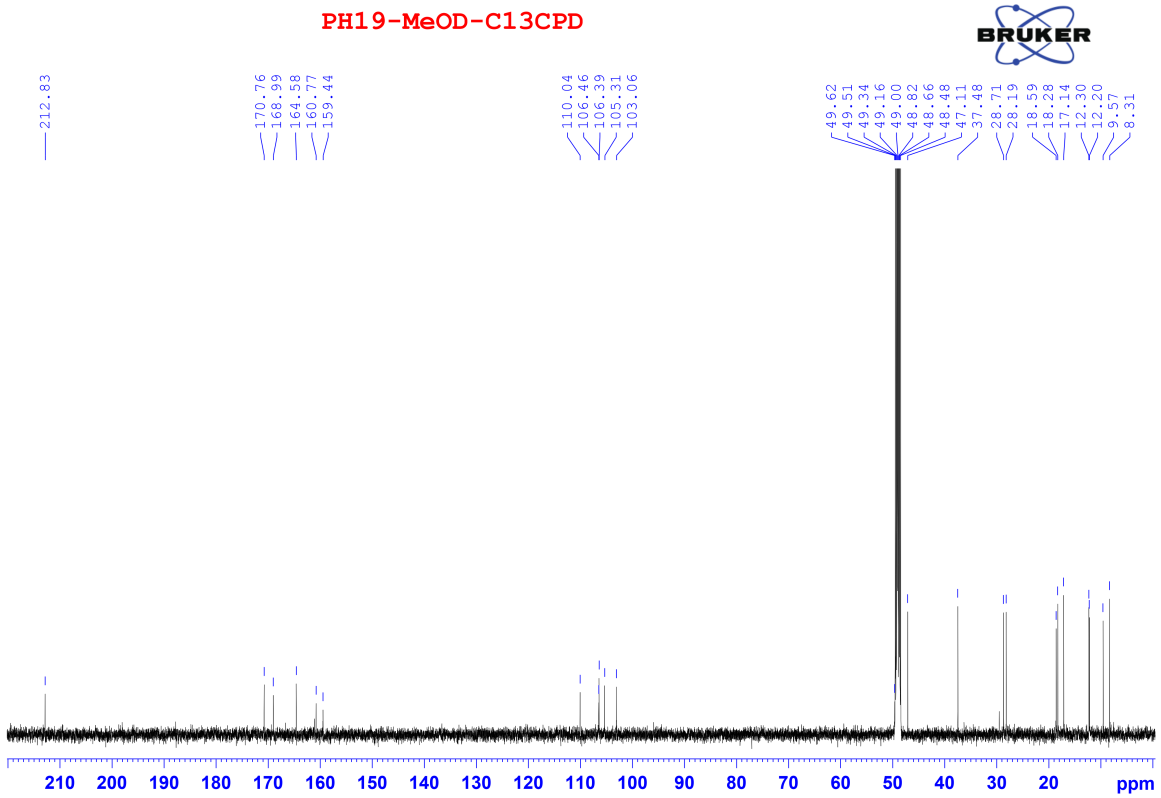
Phổ ^{1}H-NMR của hợp chất PH19



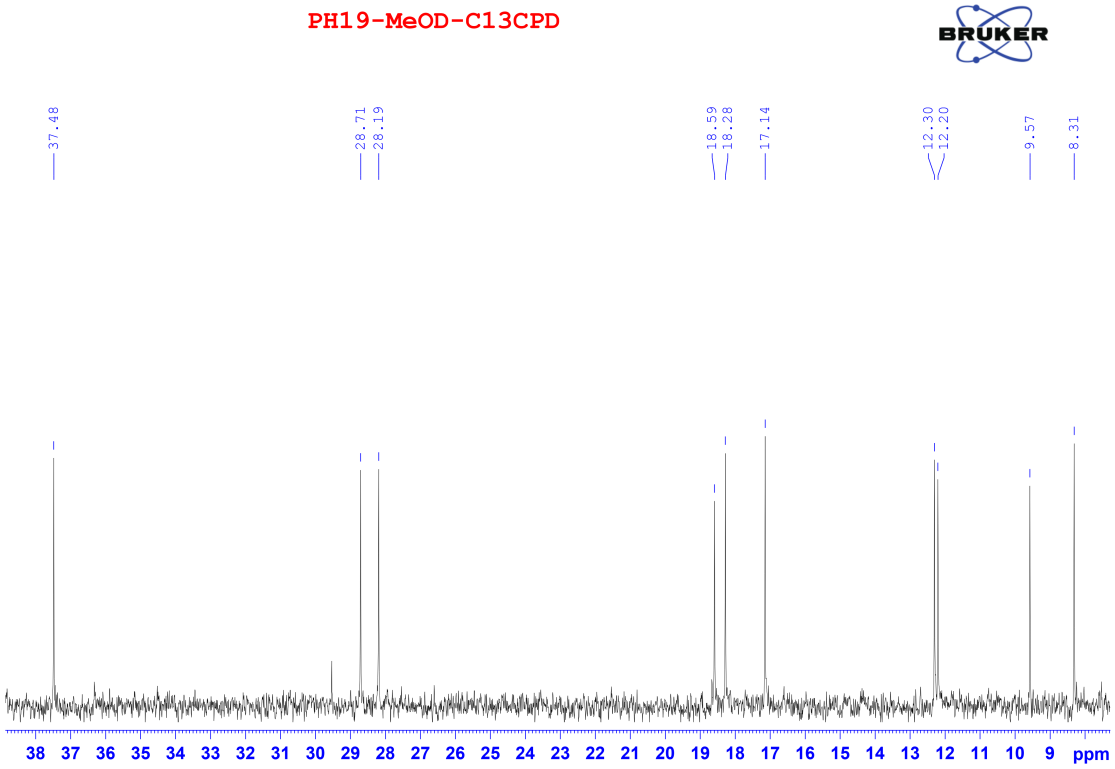
Phổ ^{1}H-NMR của hợp chất PH19



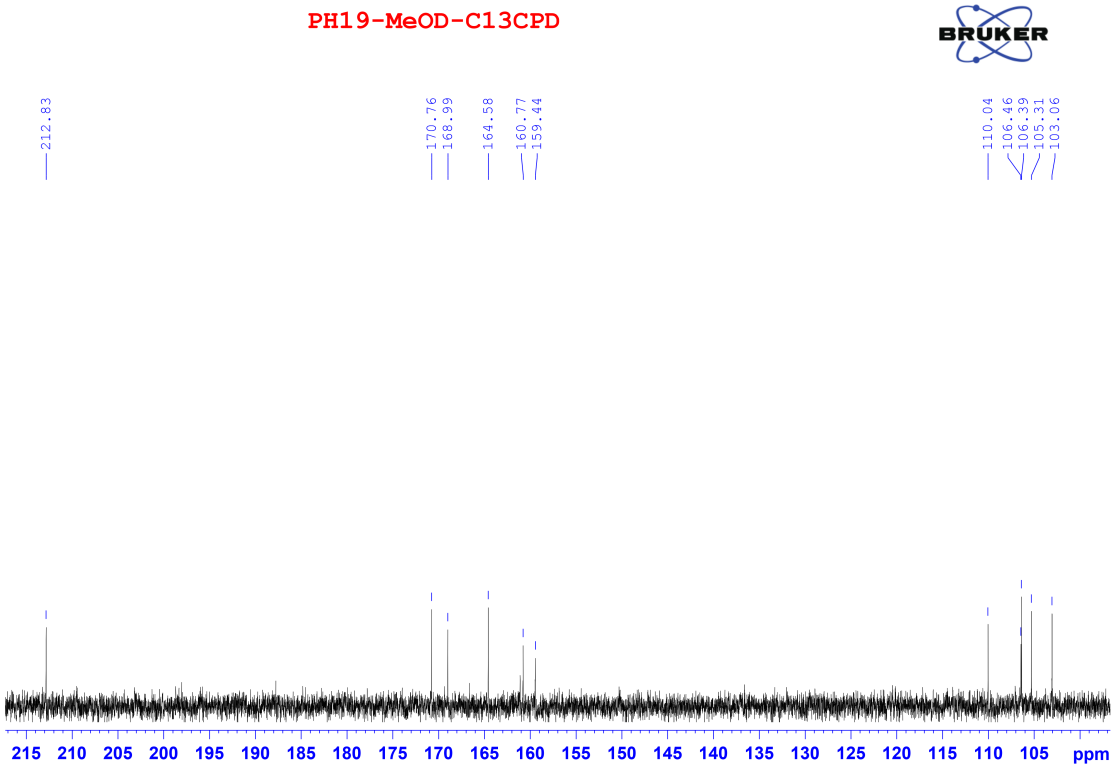
Phổ ^{13}C-NMR của hợp chất PH19



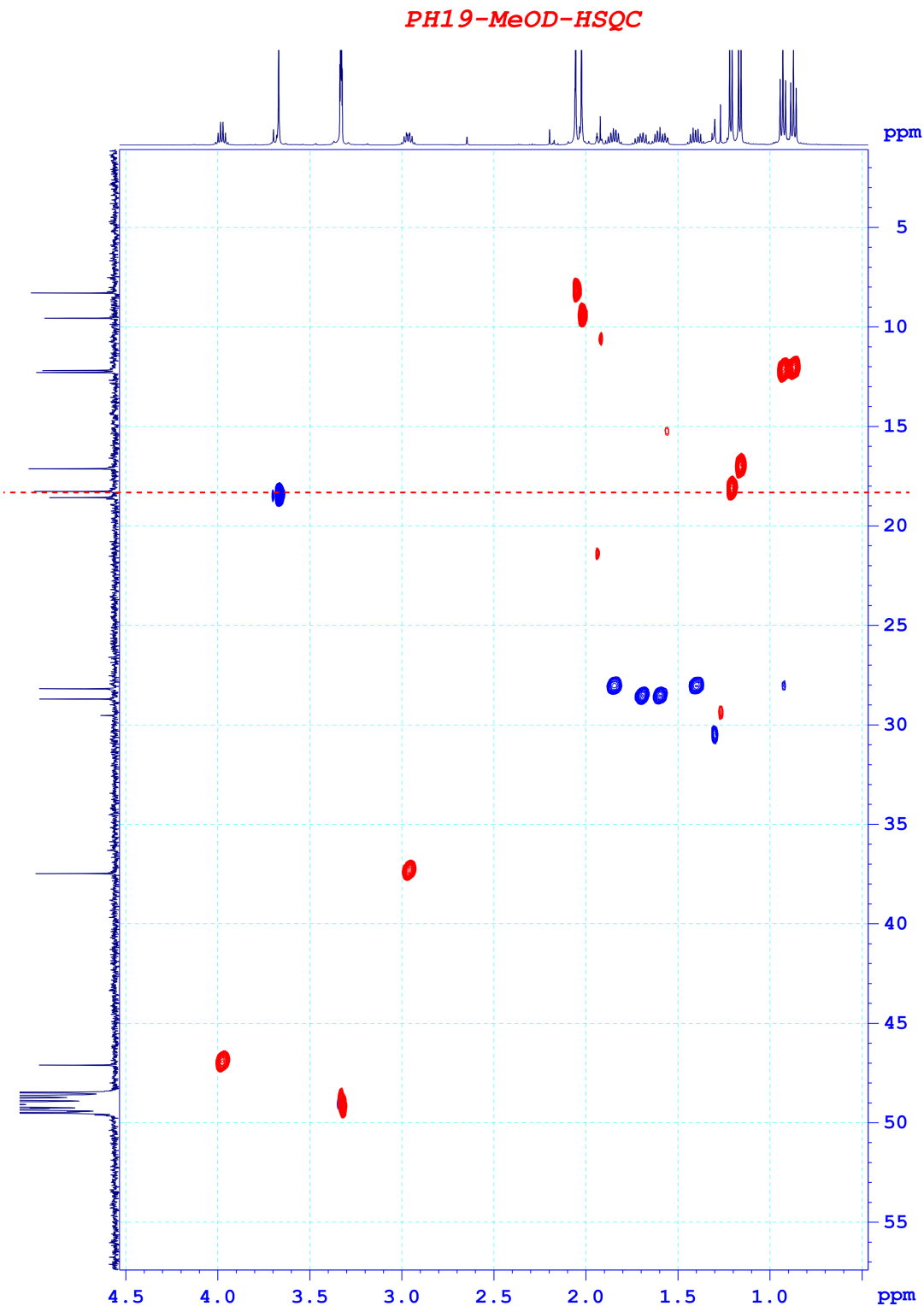
Phổ ^{13}C-NMR của hợp chất PH19



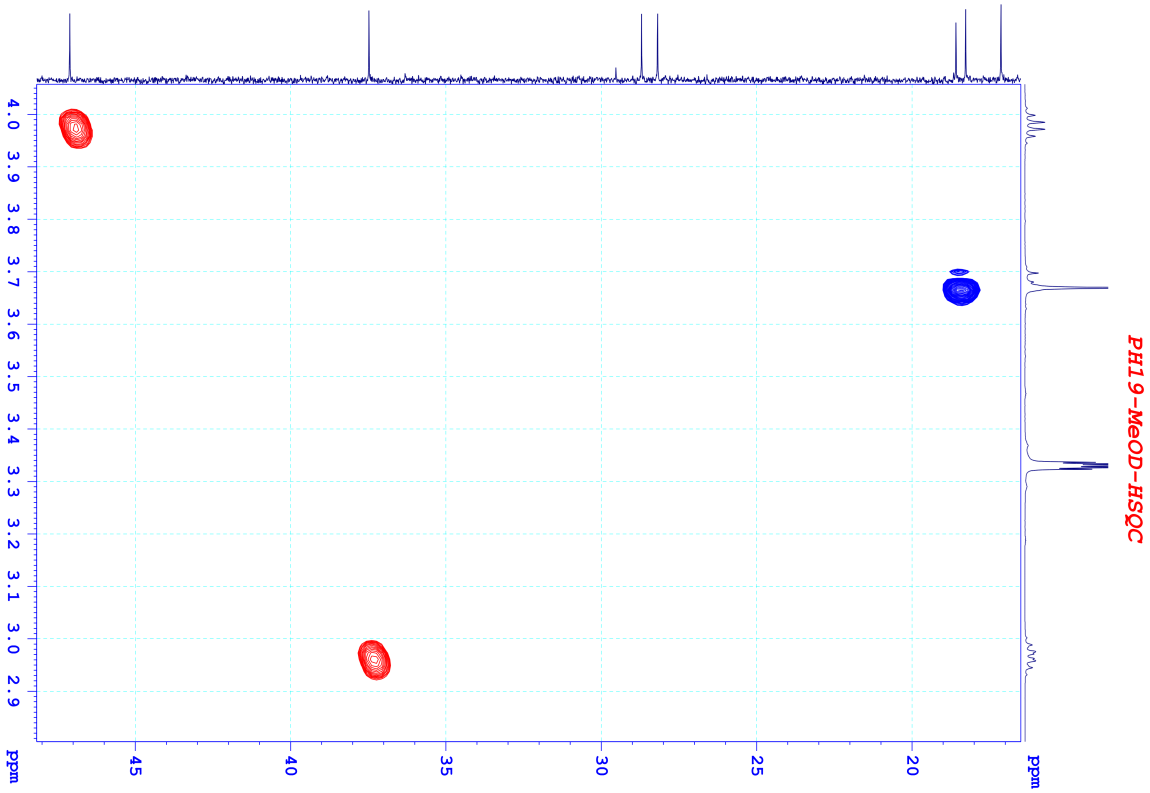
Phổ ^{13}C-NMR của hợp chất PH19



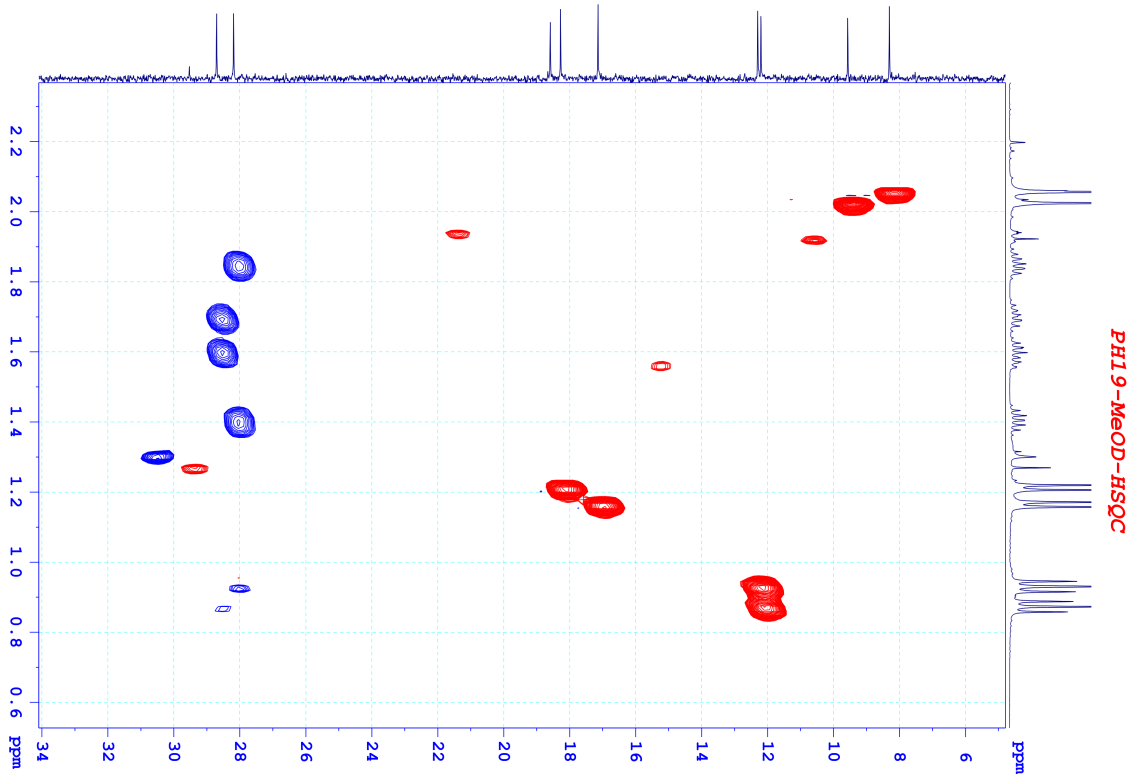
Phổ ^{13}C-NMR của hợp chất PH19



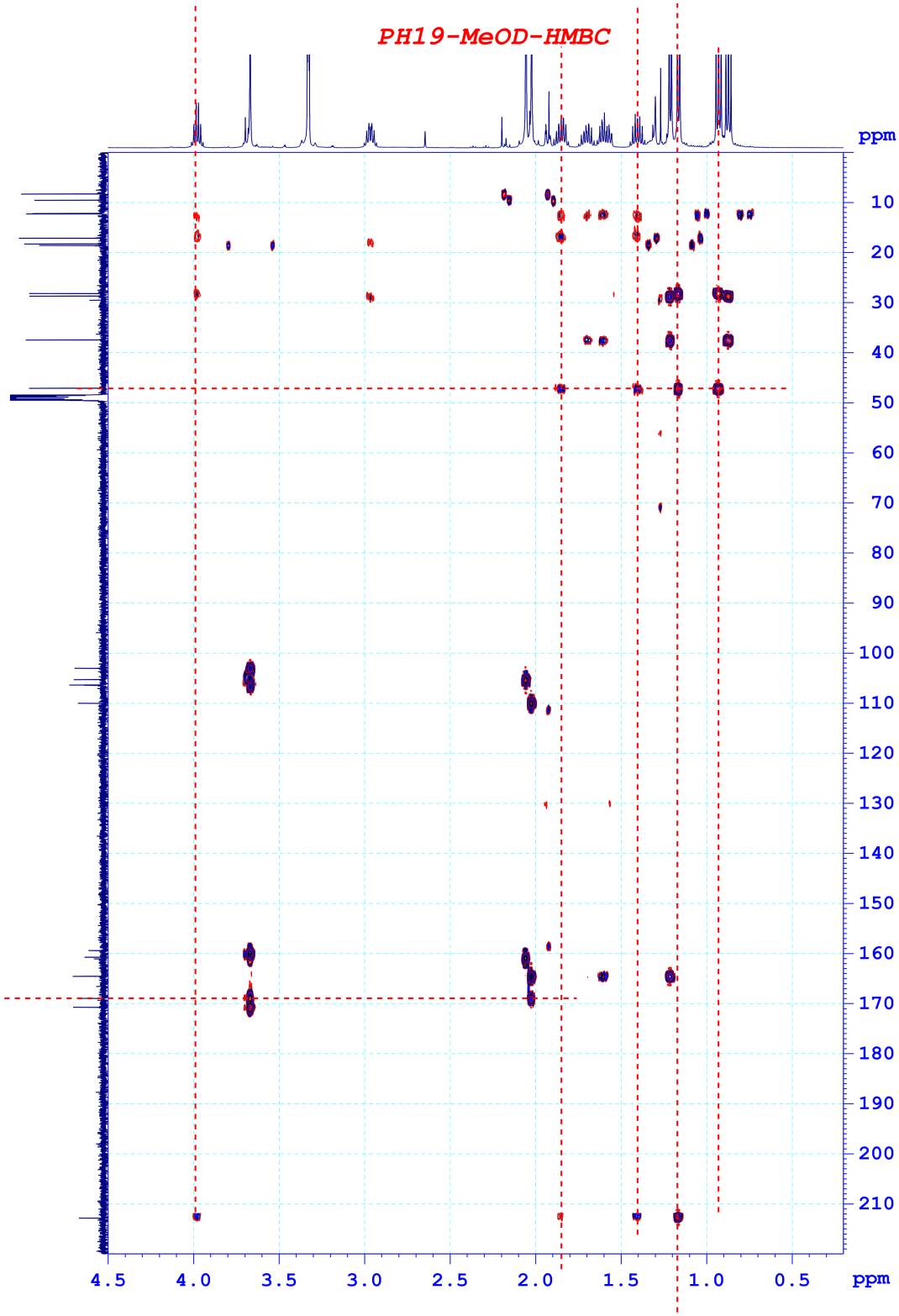
Phổ HSQC của hợp chất PH19



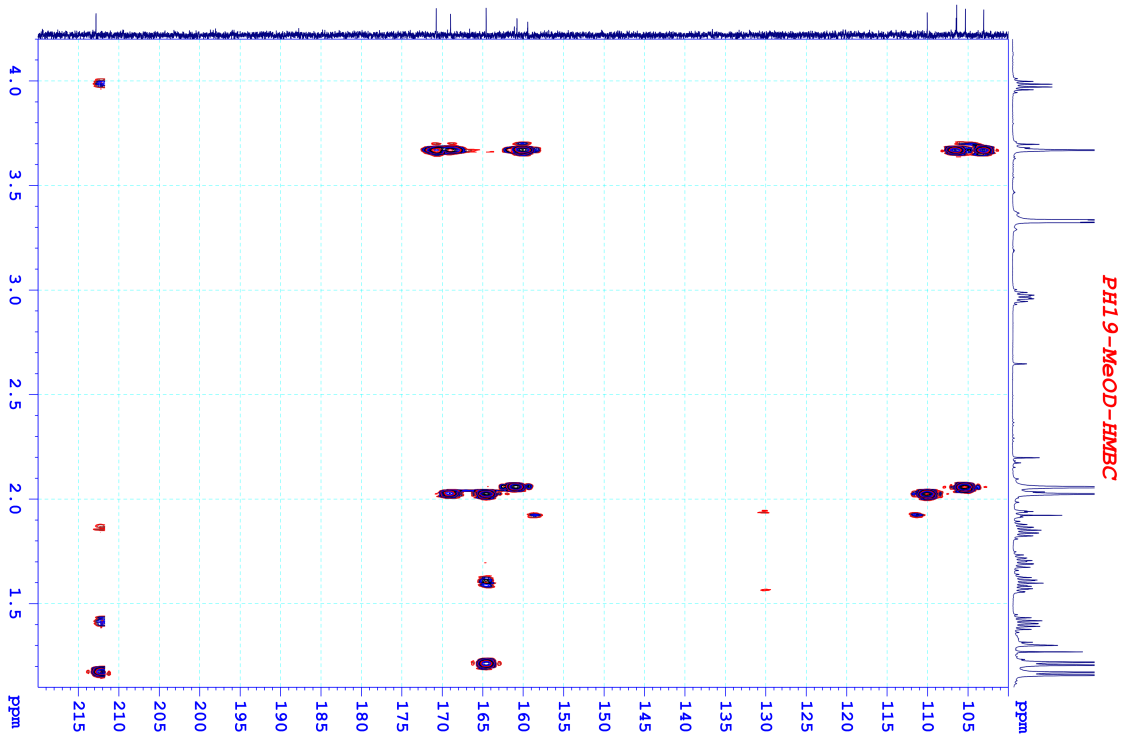
Phổ HSQC của hợp chất PH19



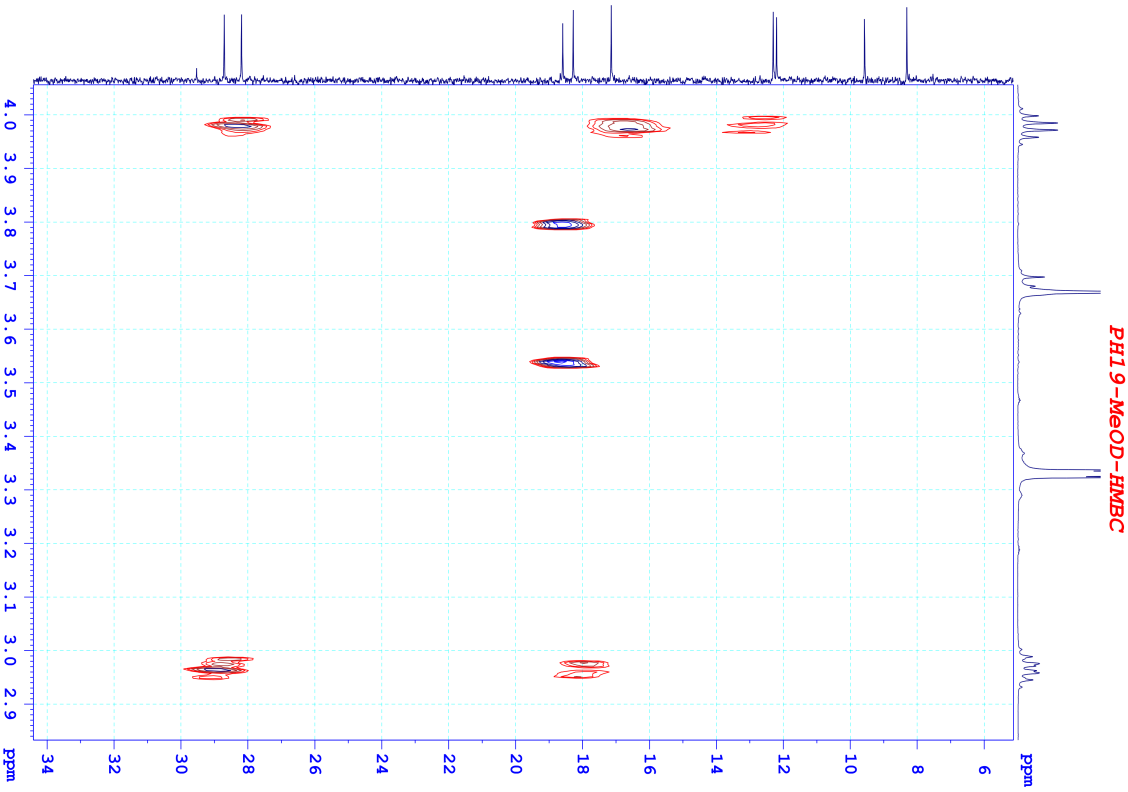
Phổ HSQC của hợp chất PH19



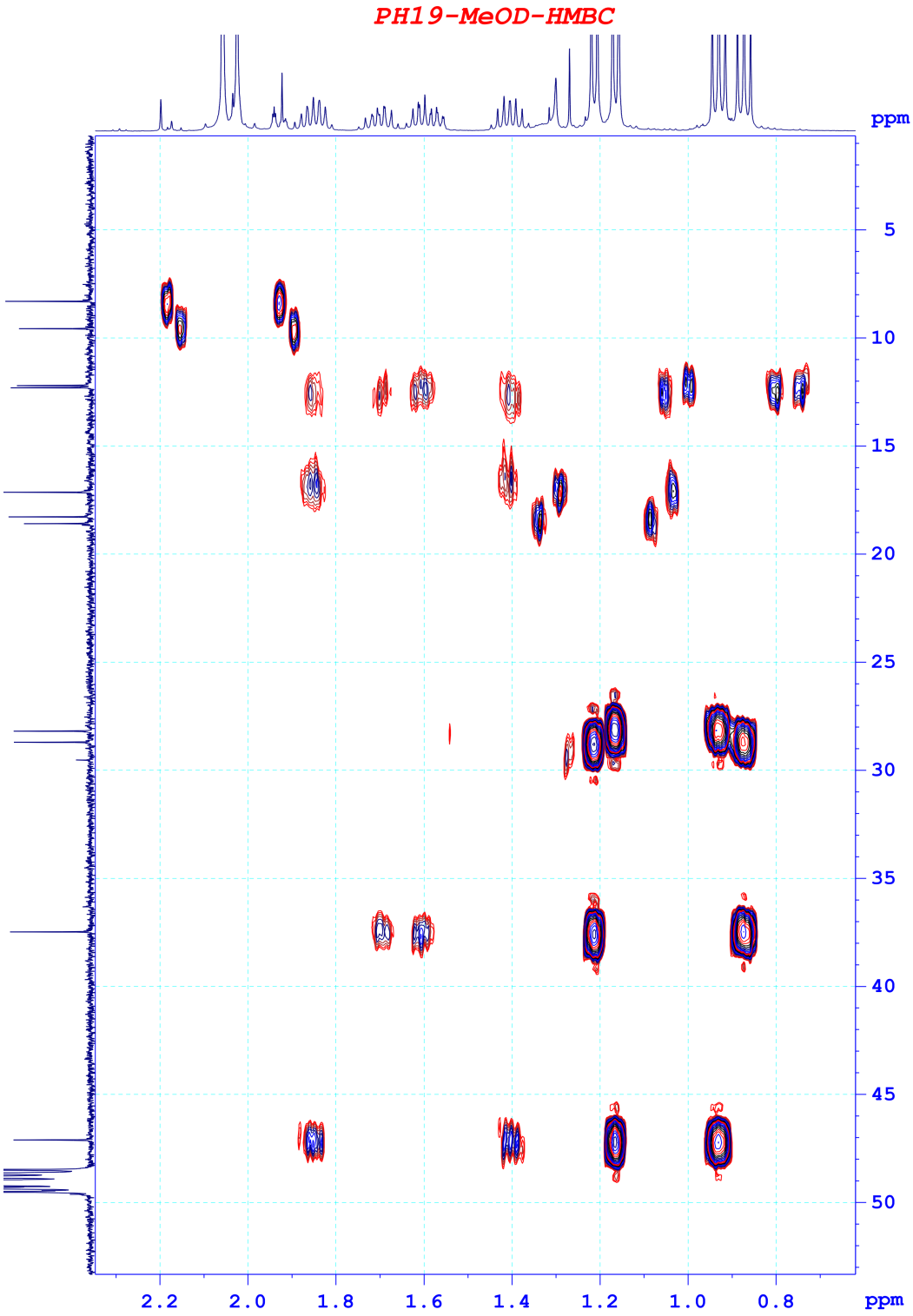
Phổ HMBC của hợp chất PH19



Phổ HMBC của hợp chất PH19



Phổ HMBC của hợp chất PH19



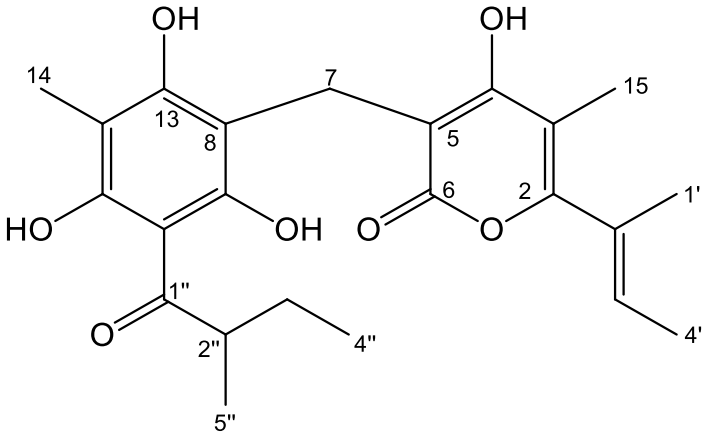
Phổ HMBC của hợp chất PH19

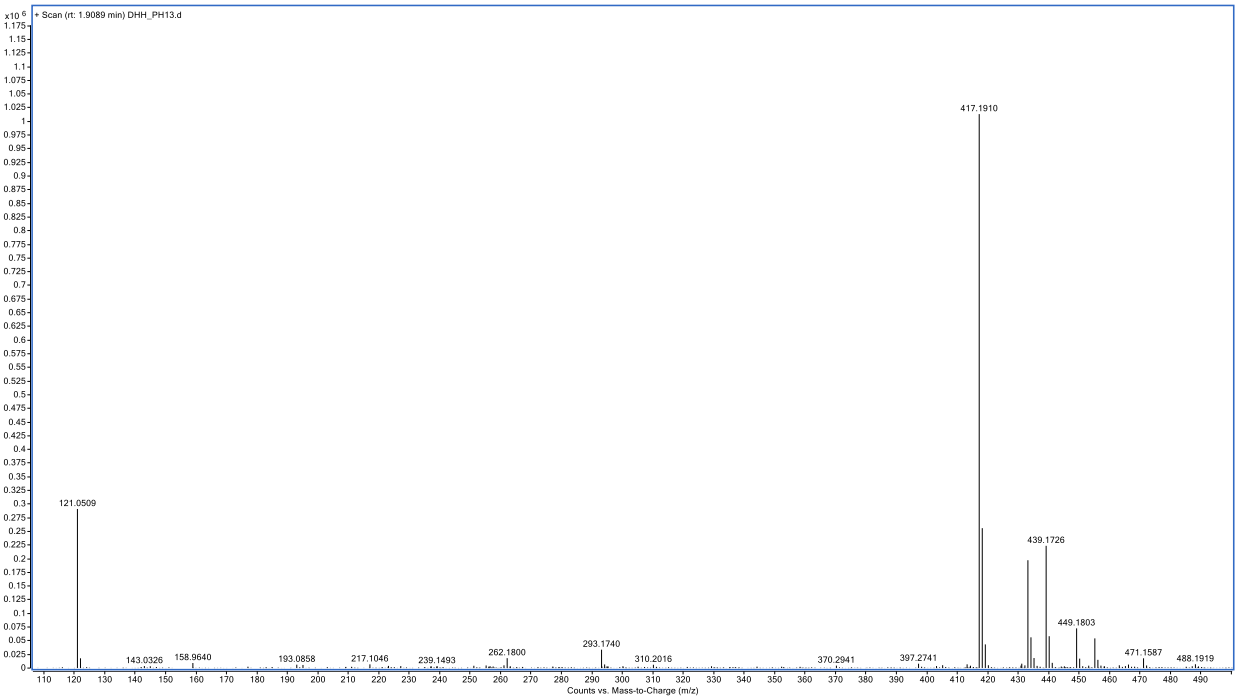
Phụ lục 3.6. Phổ của hợp chất PH13
(Pogostemonon C)

CTPT: $C_{22}H_{28}O_7$

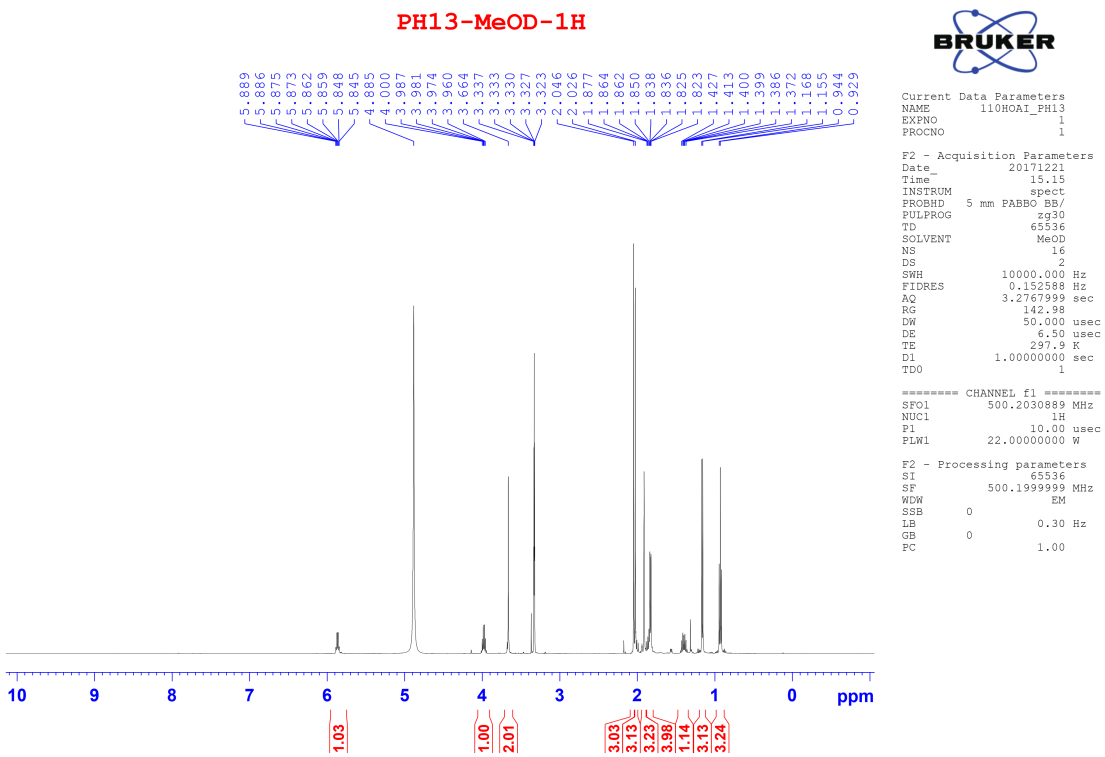
KLPT: 416,4700

- Phổ HR-ESI-MS
- Phổ ^{1}H-NMR
- Phổ ^{13}C-NMR
- Phổ HSQC
- Phổ HMBC

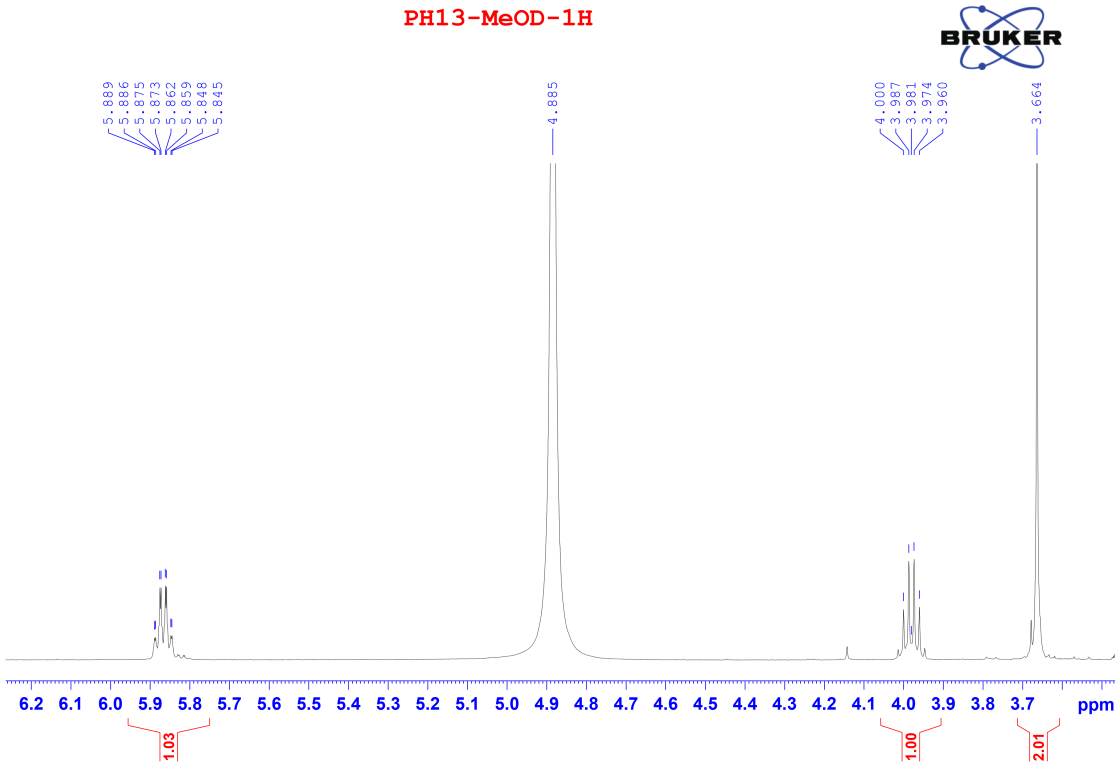




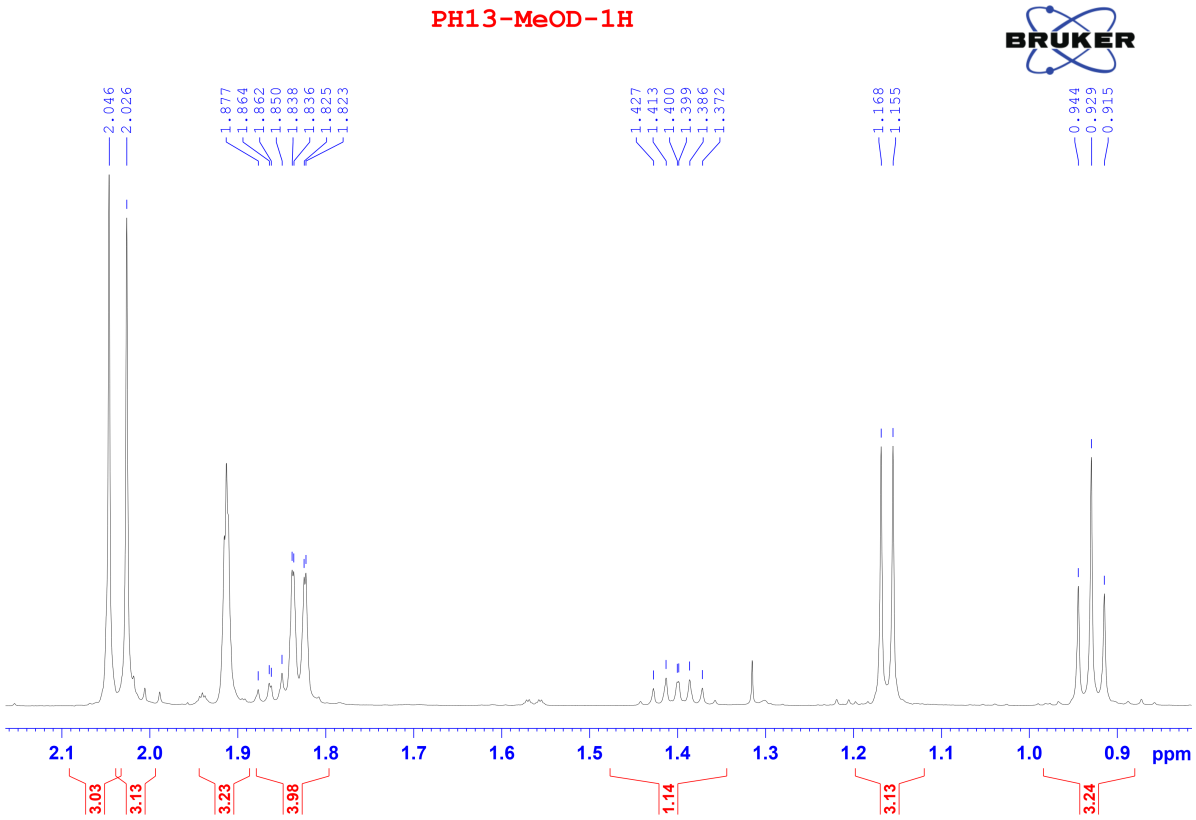
Phổ HR_ESI_MS của hợp chất PH13



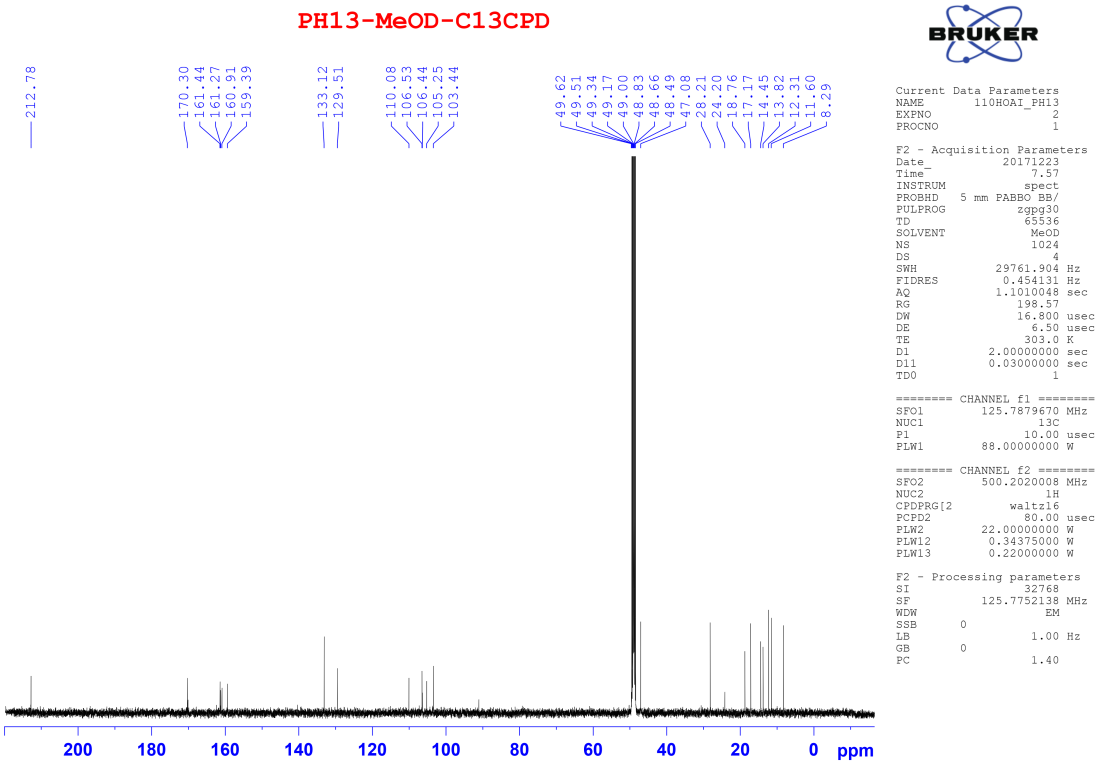
Phổ ^{1}H-NMR của hợp chất PH13



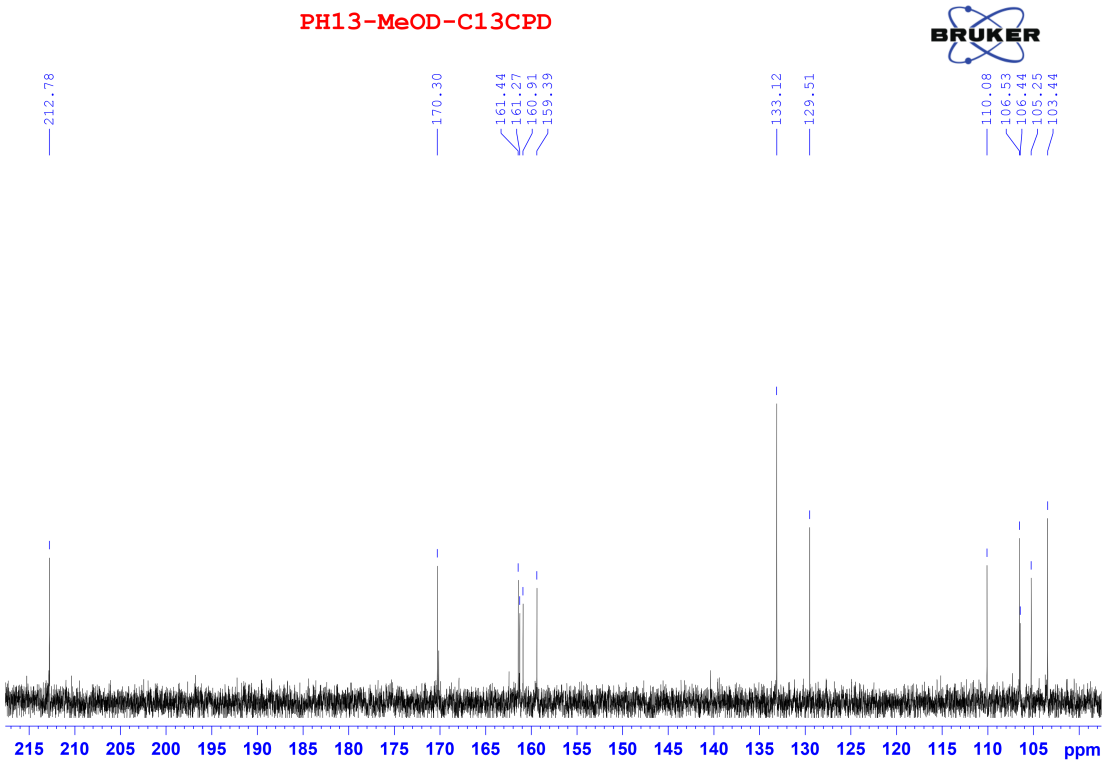
Phổ ^{1}H-NMR của hợp chất PH13



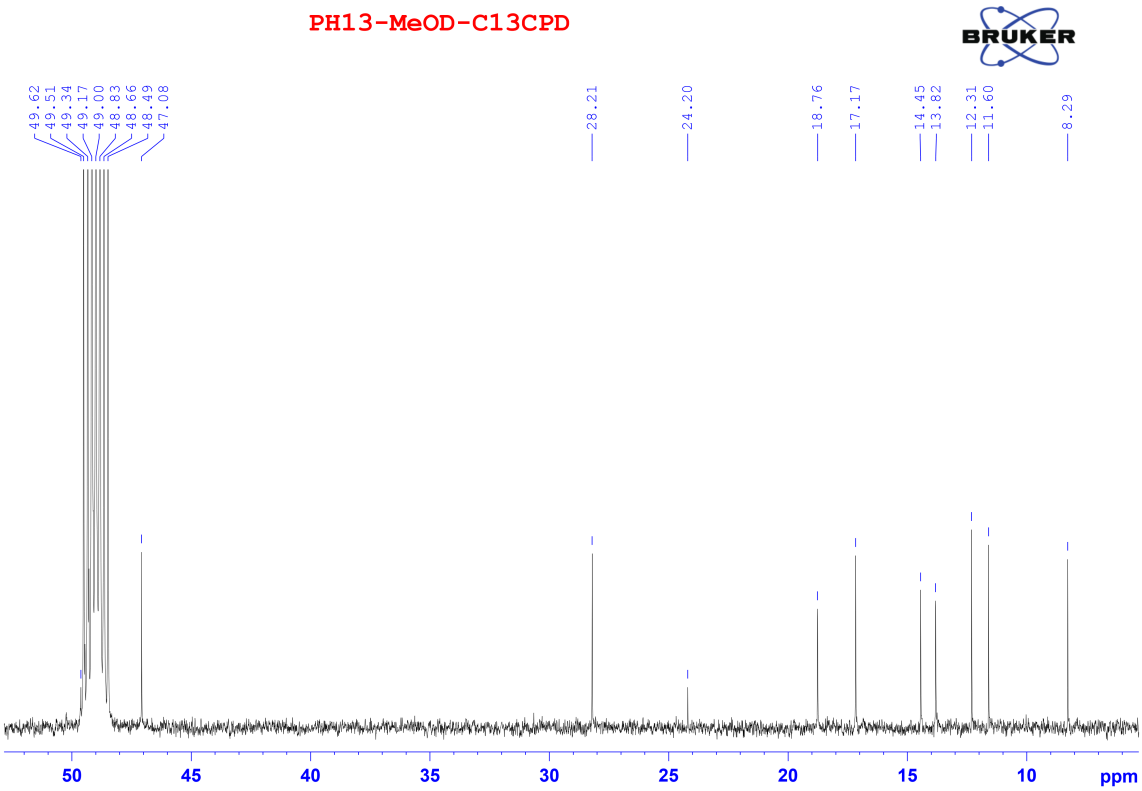
Phổ ^{1}H-NMR của hợp chất PH13



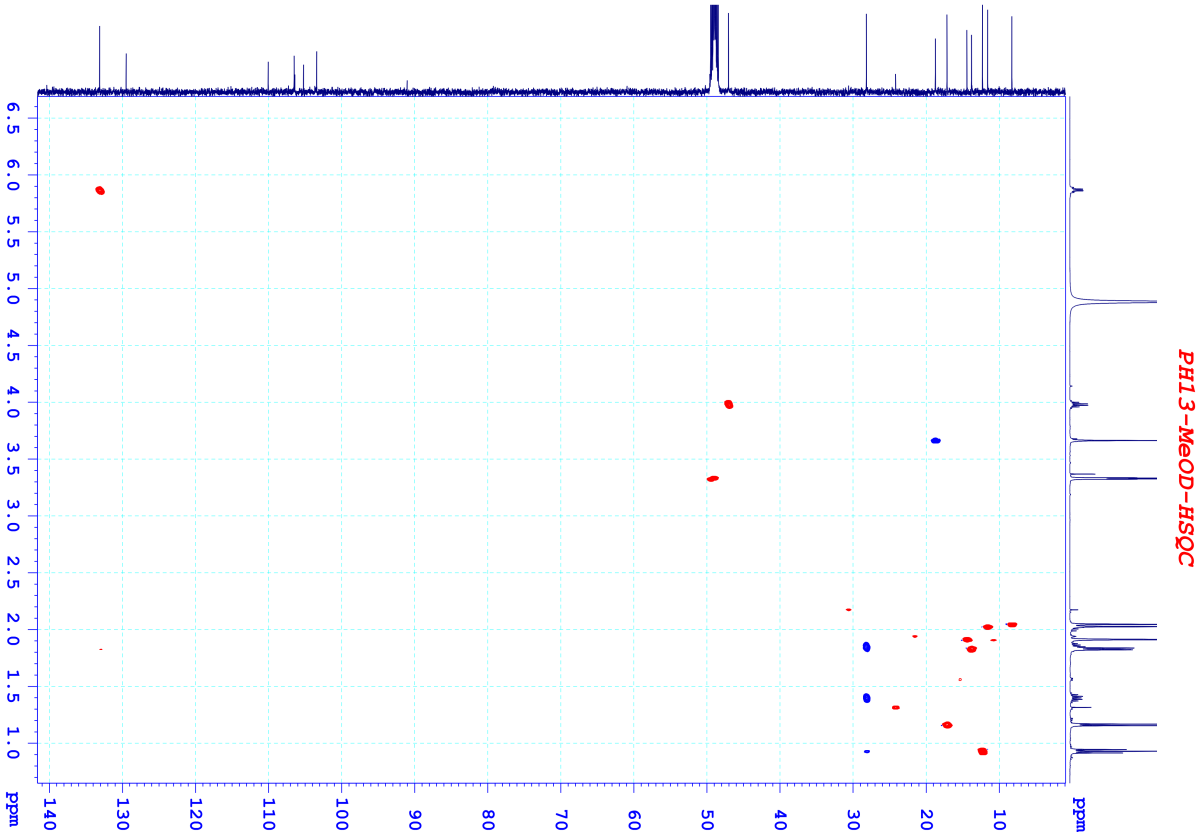
Phổ ^{13}C-NMR của hợp chất PH13



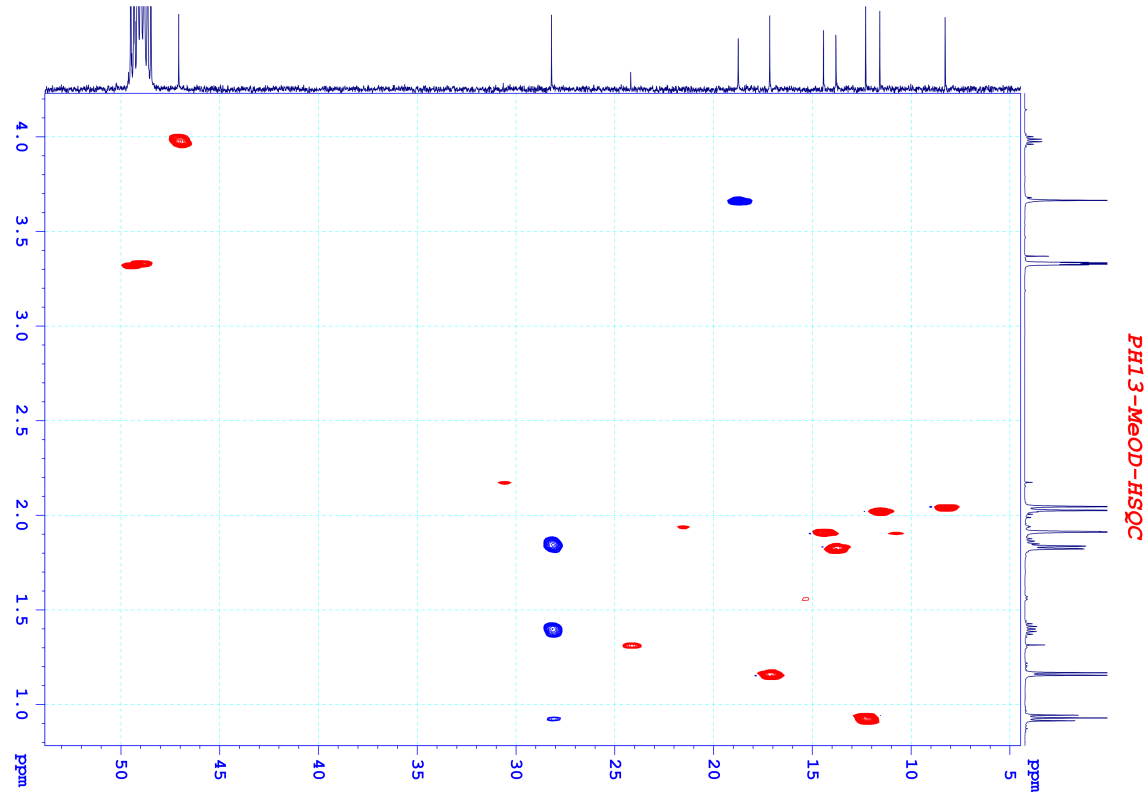
Phổ ^{13}C-NMR của hợp chất PH13



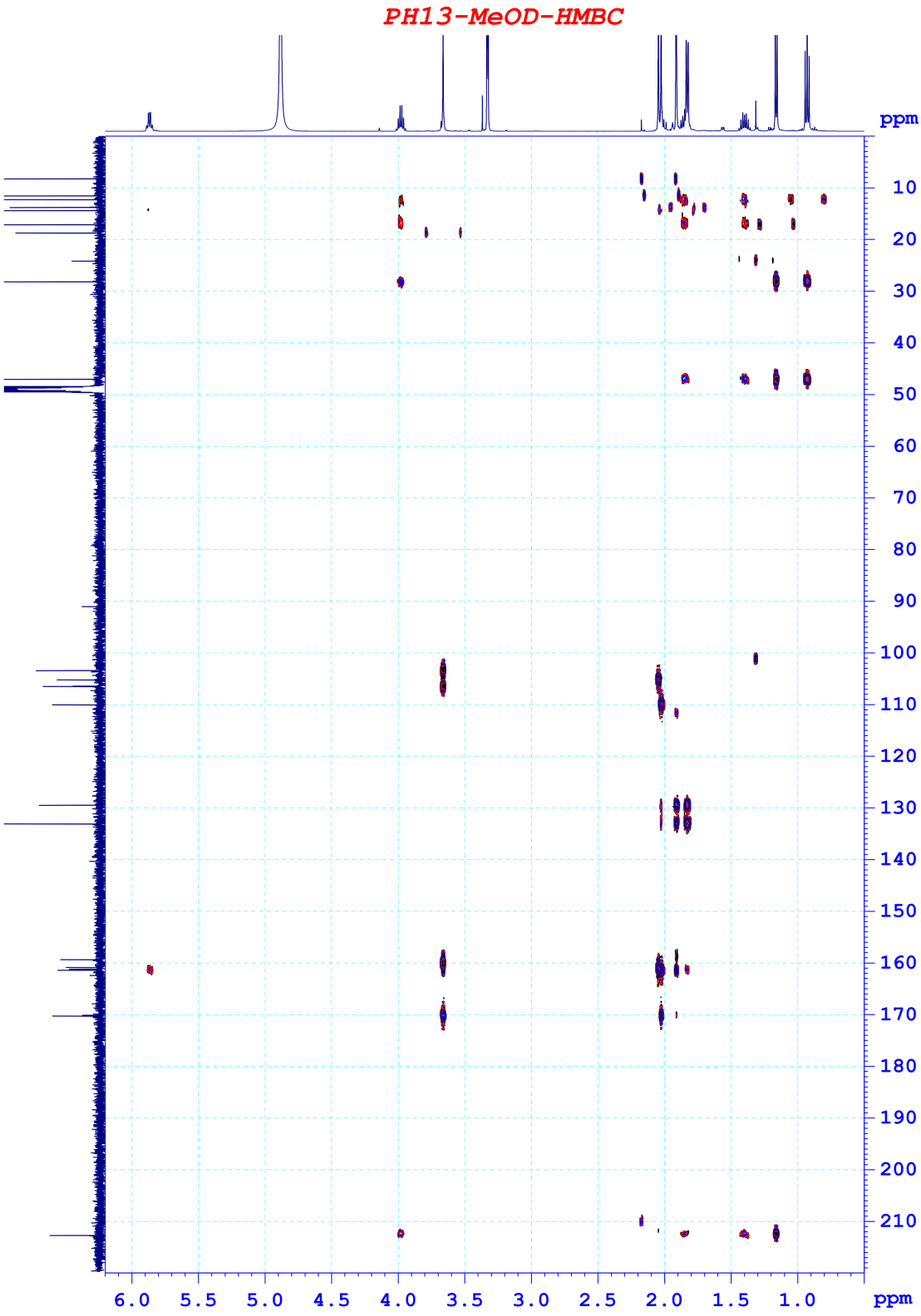
Phổ ^{13}C-NMR của hợp chất PH13



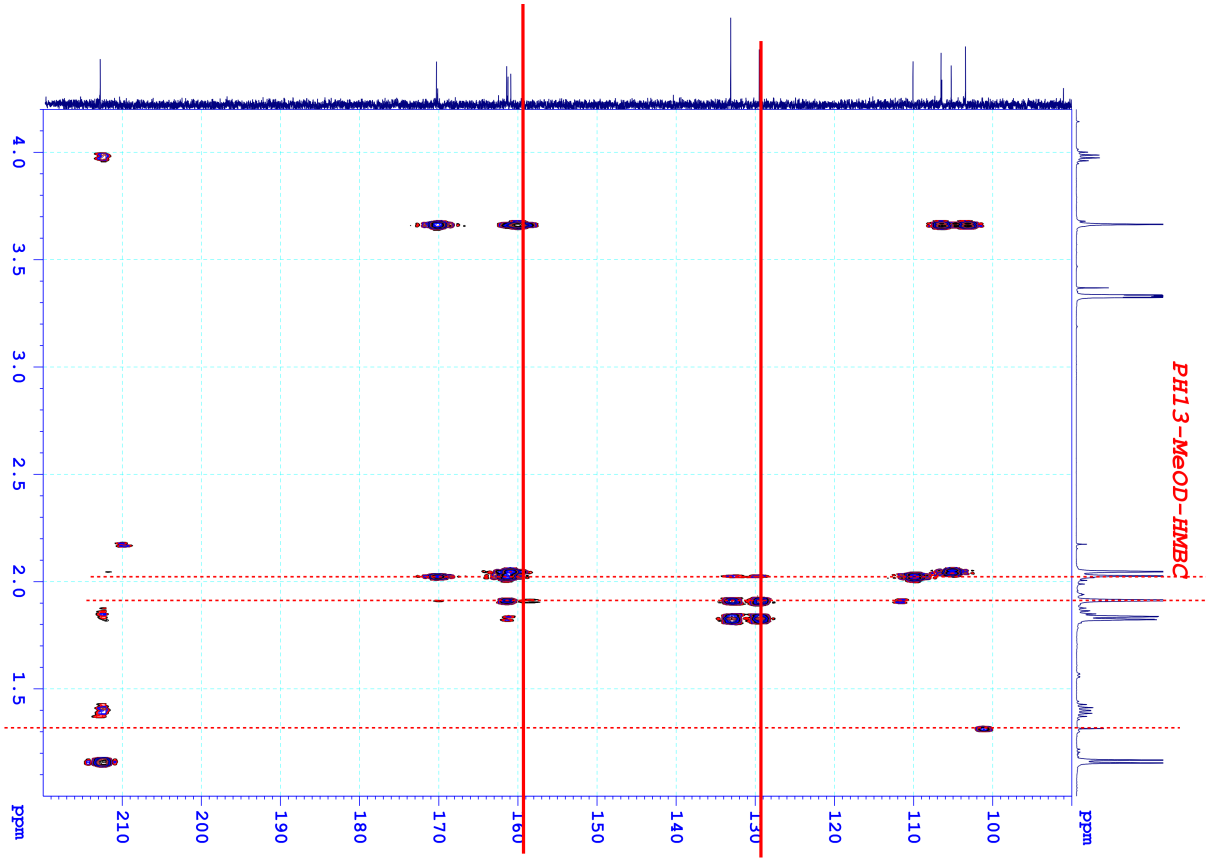
Phổ HSQC của hợp chất PH13



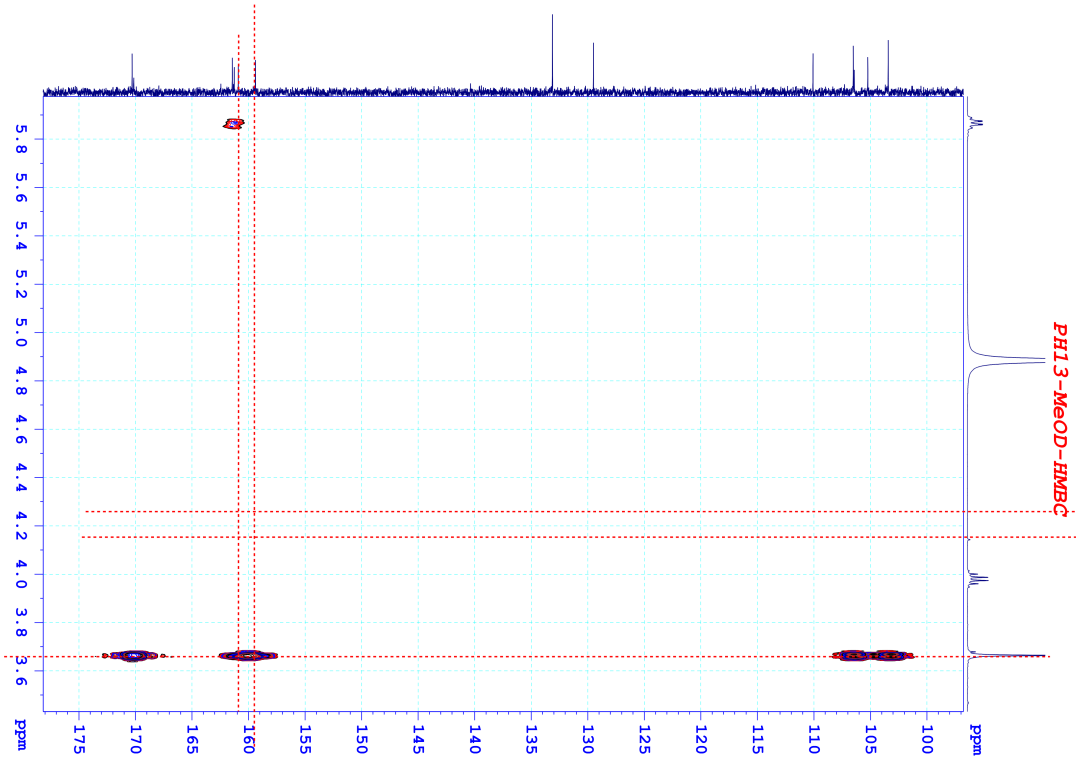
Phổ HSQC của hợp chất PH13



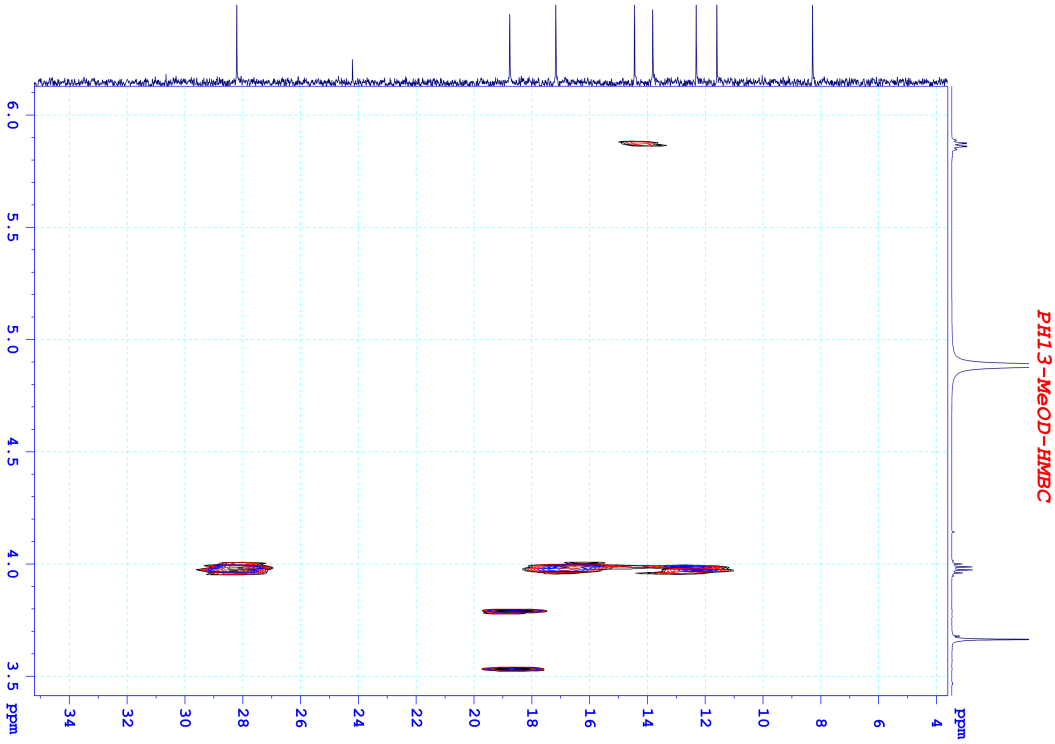
Phổ HMBC của hợp chất PH13



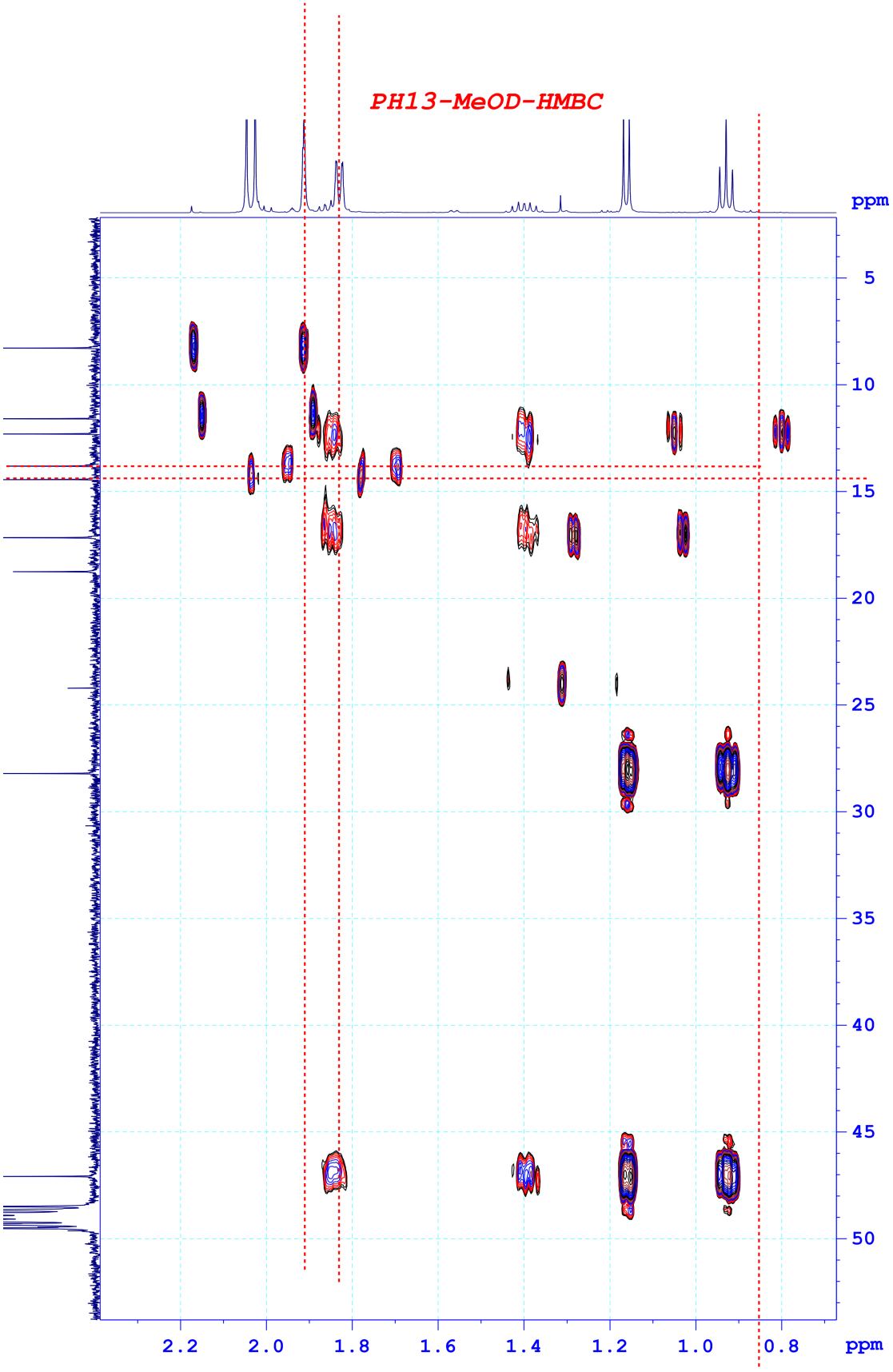
Phổ HMBC của hợp chất PH13



Phổ HMBC của hợp chất PH13



Phổ HMBC của hợp chất PH13



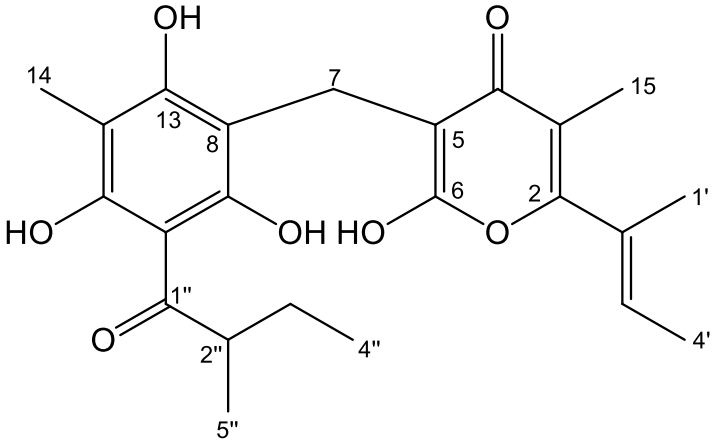
Phổ HMBC của hợp chất PH13

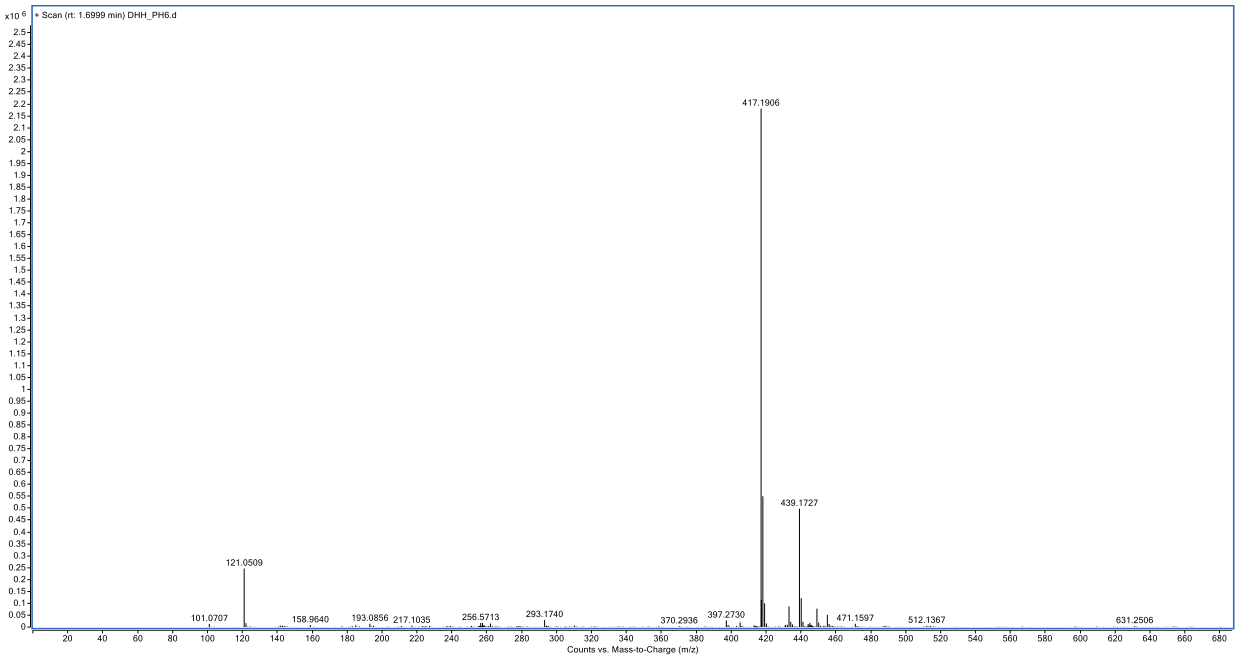
Phụ lục 3.7. Phổ của hợp chất PH6
(Pogostemonon A)

CTPT: $C_{22}H_{28}O_7$

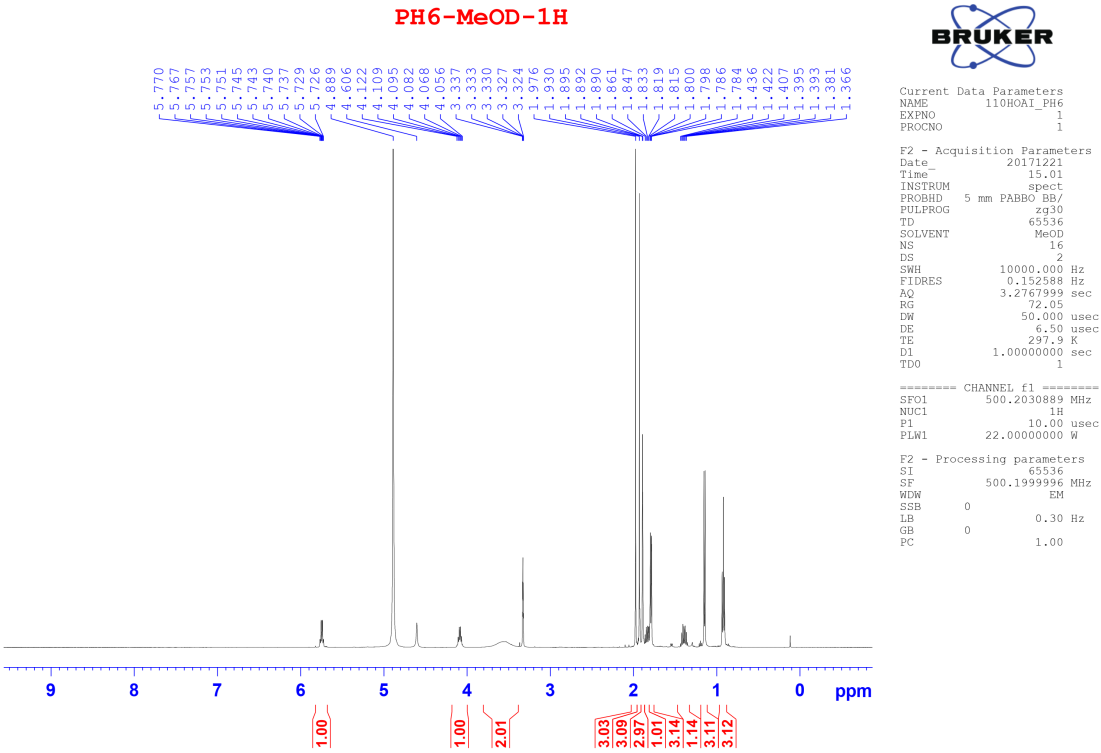
KLPT: 416,4700

- Phổ HR-ESI-MS
- Phổ ^{1}H-NMR
- Phổ ^{13}C-NMR
- Phổ HSQC
- Phổ HMBC

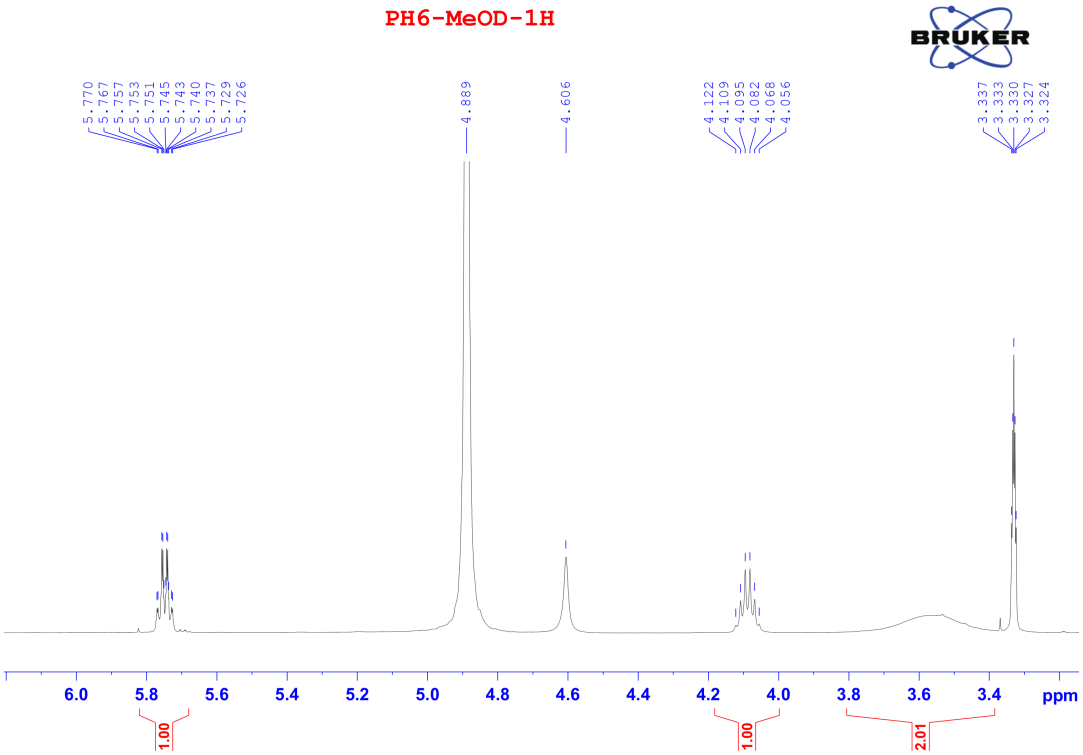




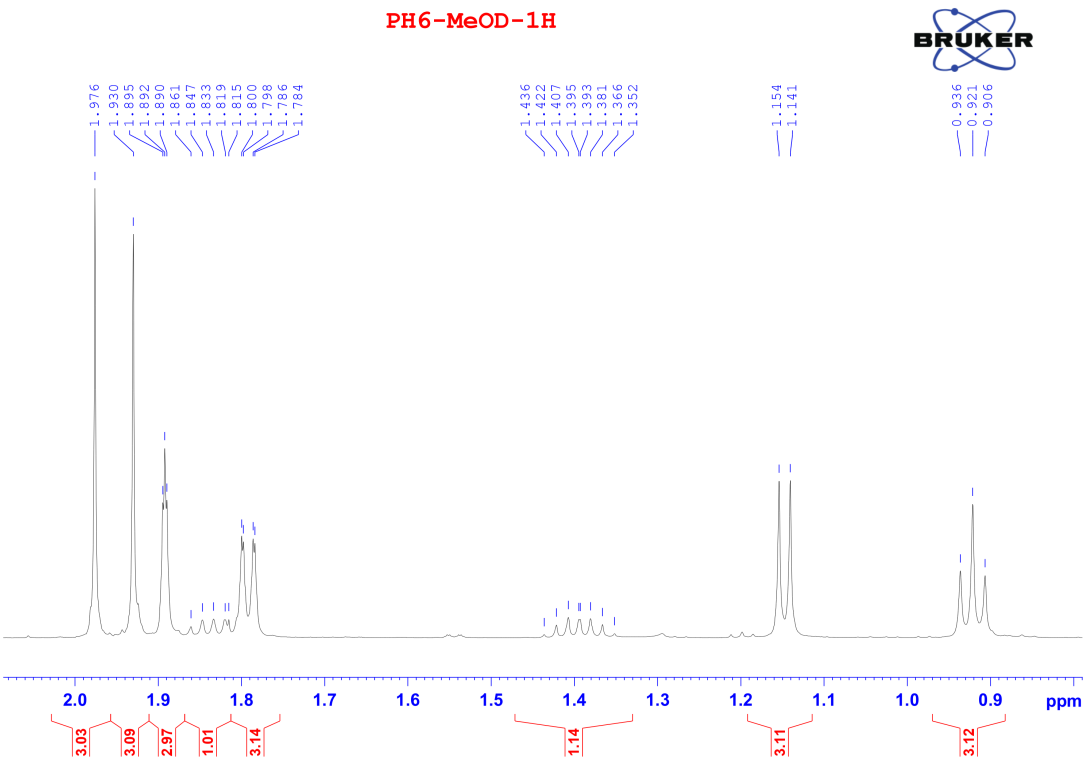
Phổ HR_ESI_MS của hợp chất PH6



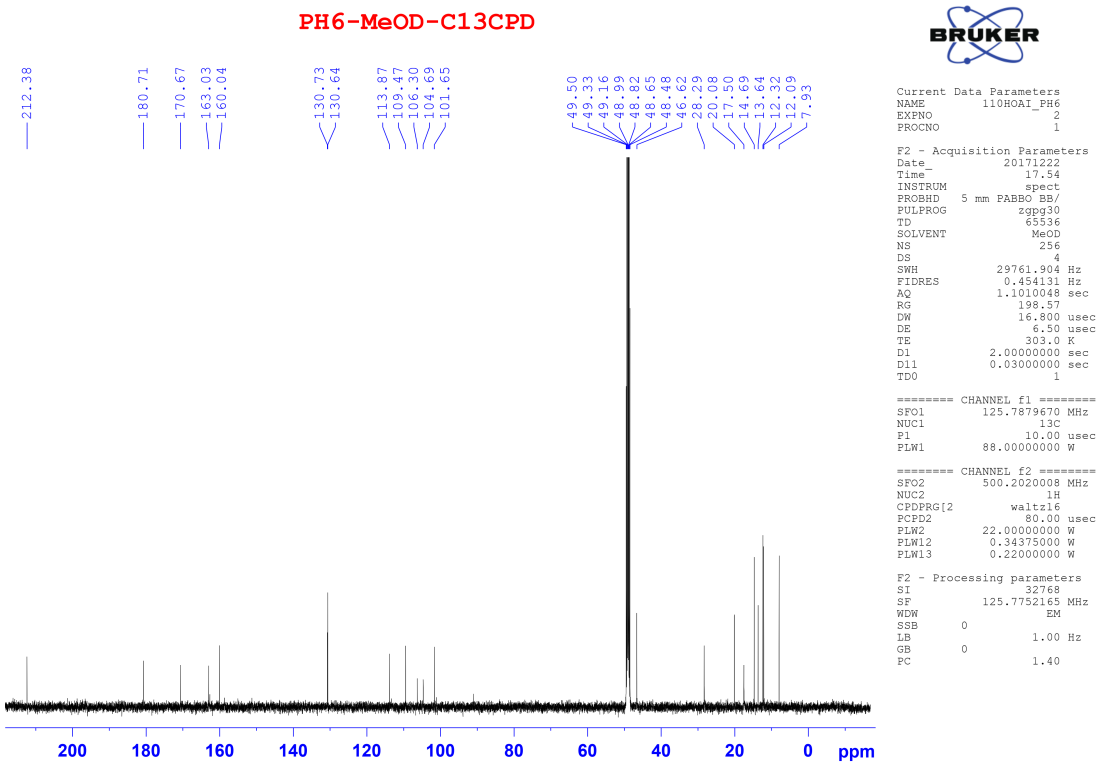
Phổ ^{1}H-NMR của hợp chất PH6



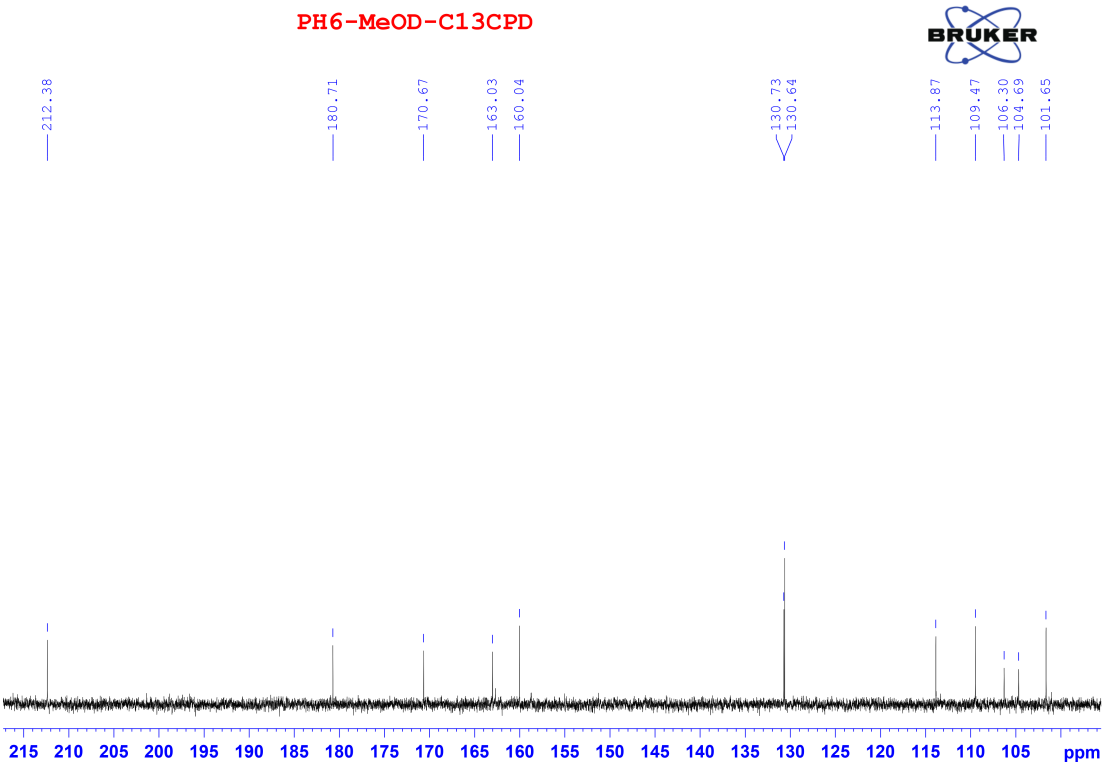
Phổ ^{1}H-NMR của hợp chất PH6



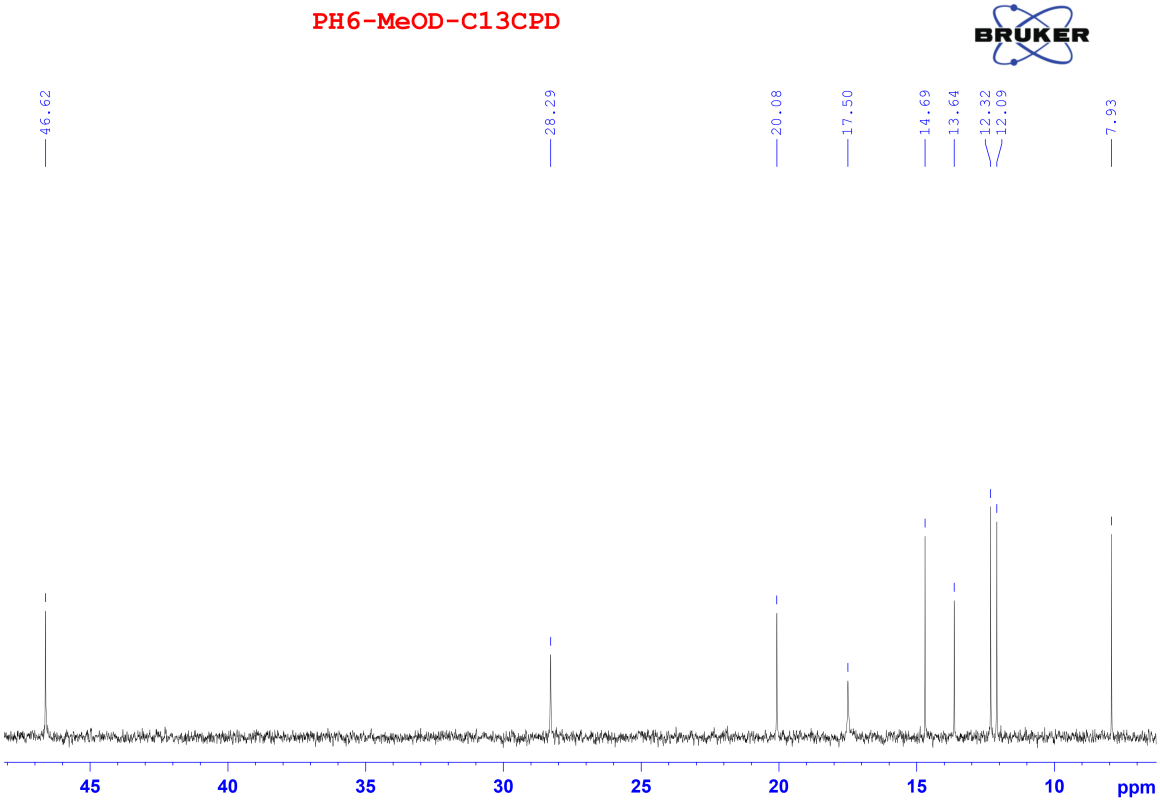
Phổ ^{1}H-NMR của hợp chất PH6



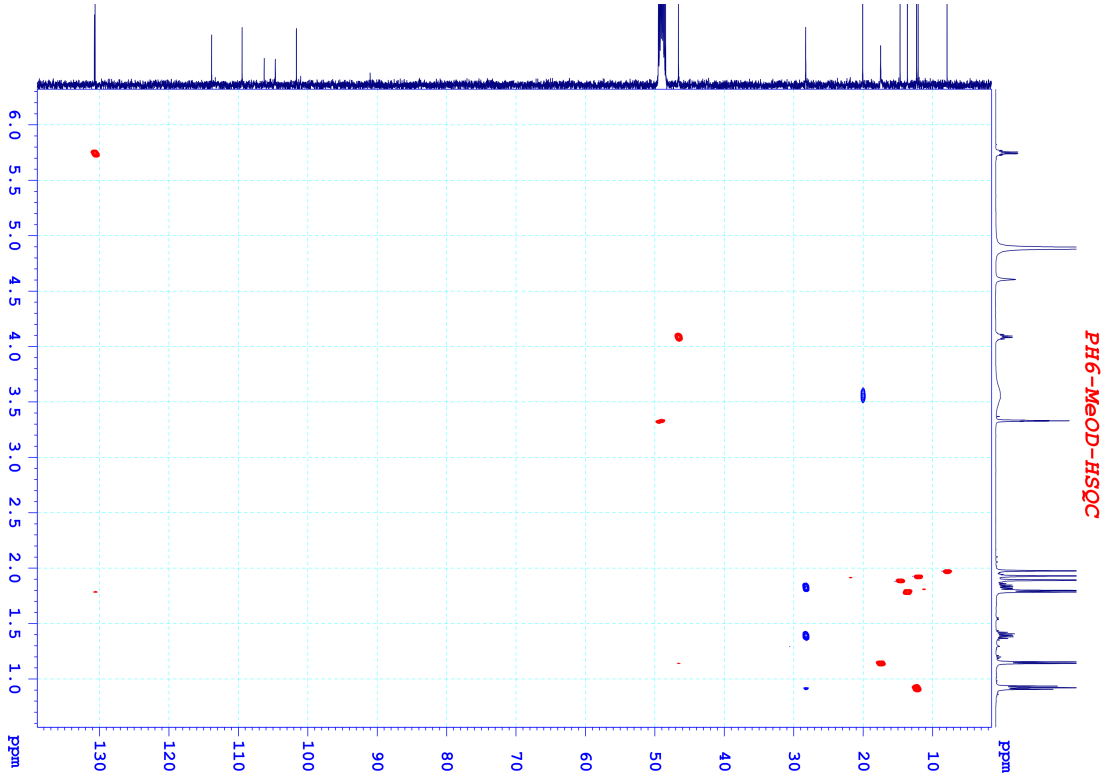
Phổ ^{13}C-NMR của hợp chất PH6



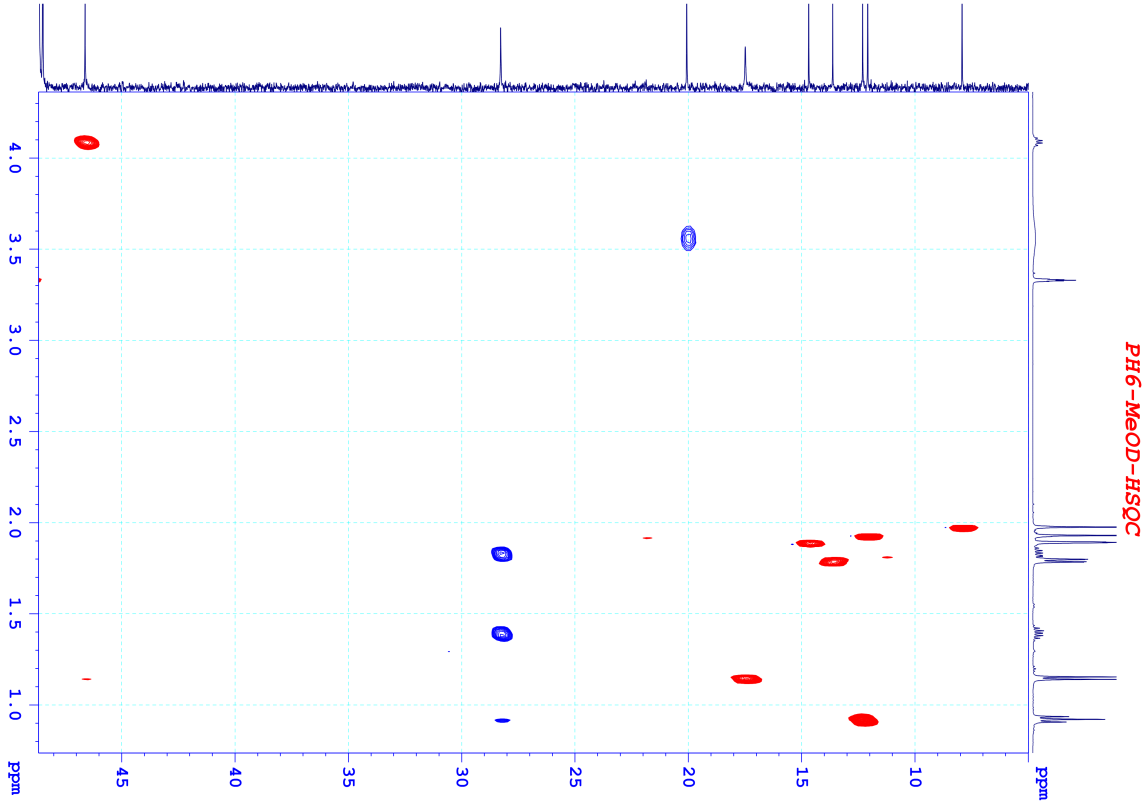
Phổ ^{13}C-NMR của hợp chất PH6



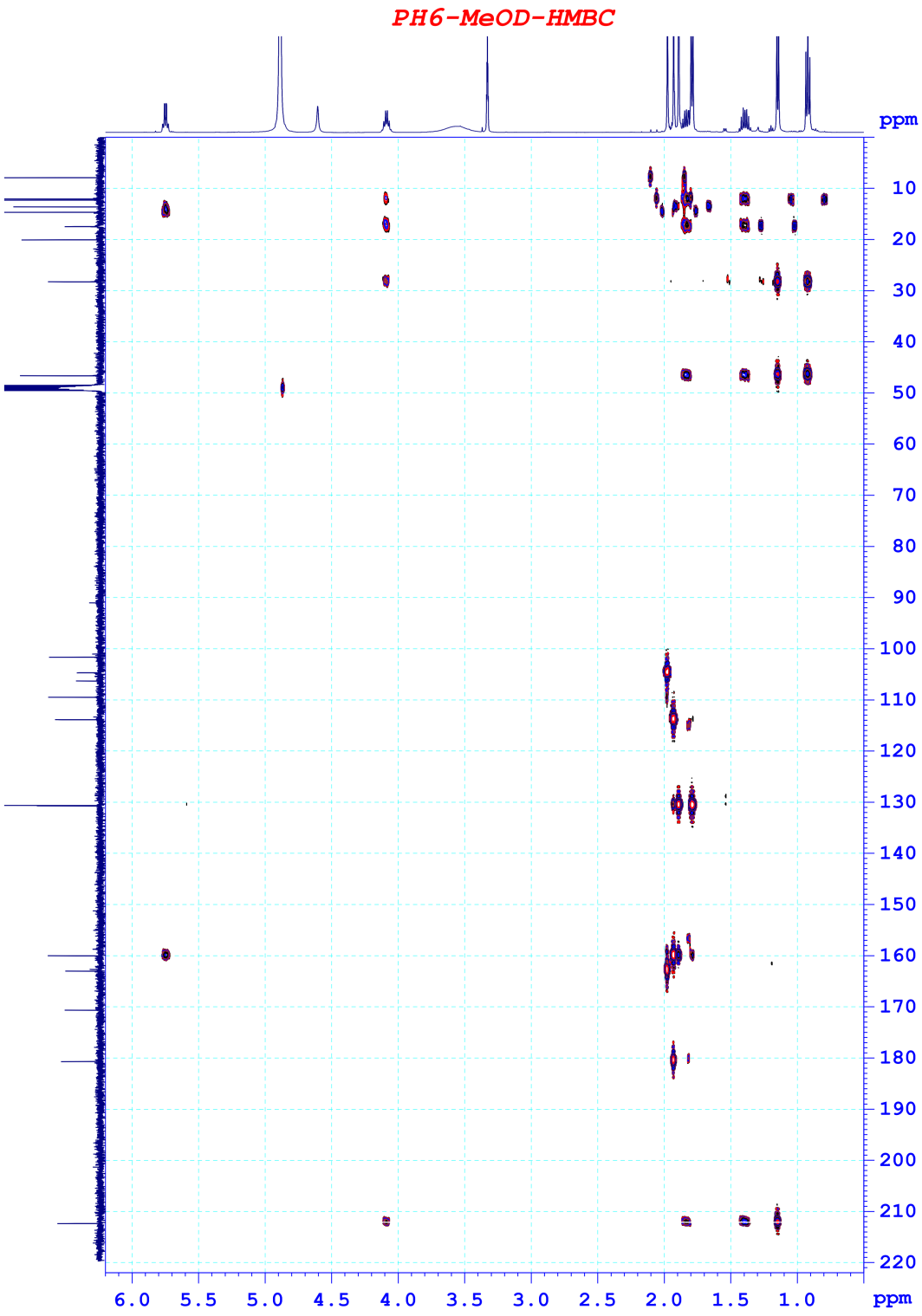
Phổ ^{13}C-NMR của hợp chất PH6



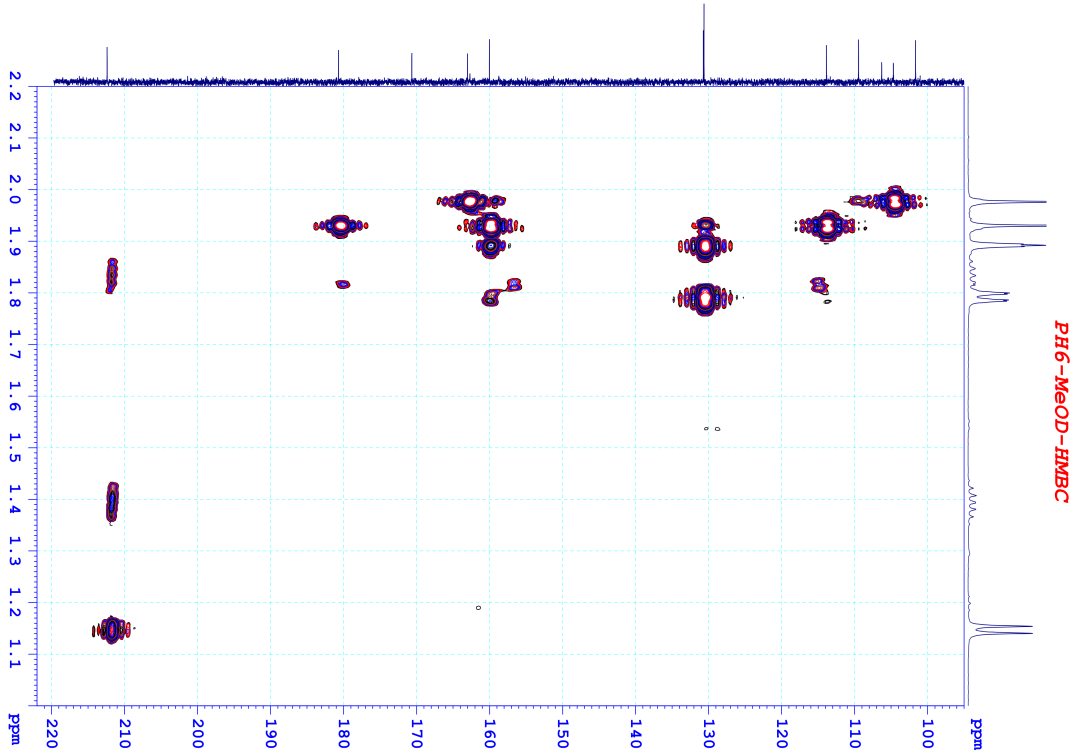
Phổ HSQC của hợp chất PH6



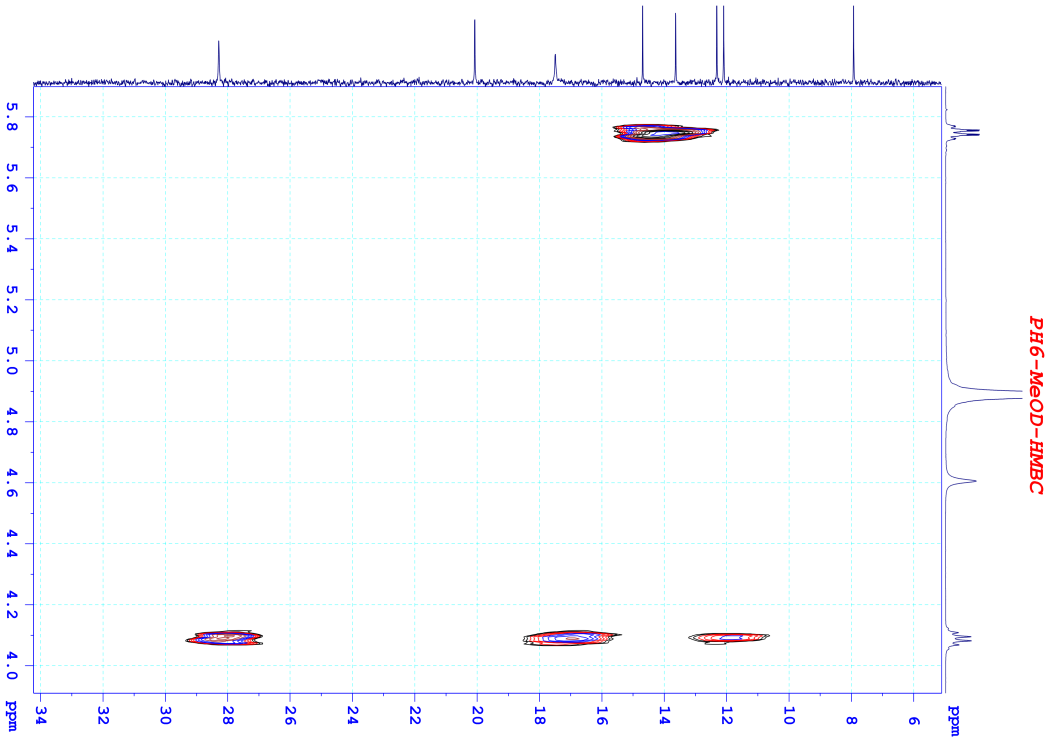
Phổ HSQC của hợp chất PH6



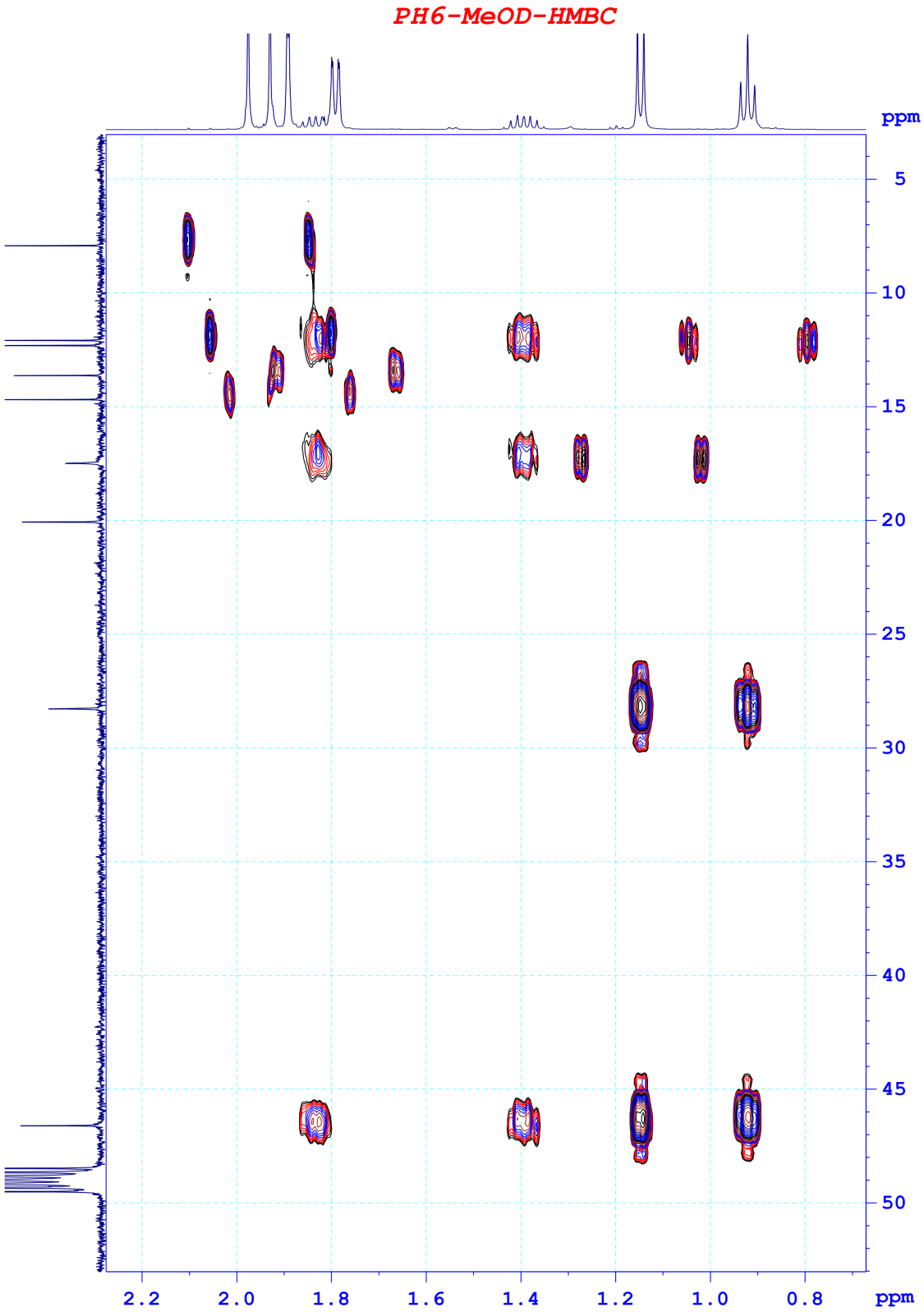
Phổ HMBC của hợp chất PH6



Phổ HMBC của hợp chất PH6



Phổ HMBC của hợp chất PH6

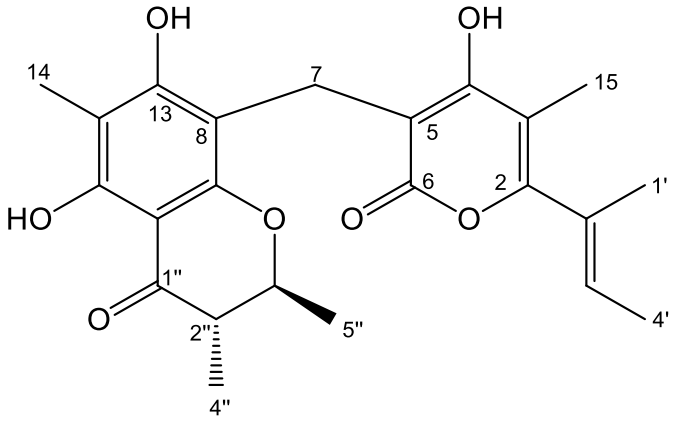


Phổ HMBC của hợp chất PH6

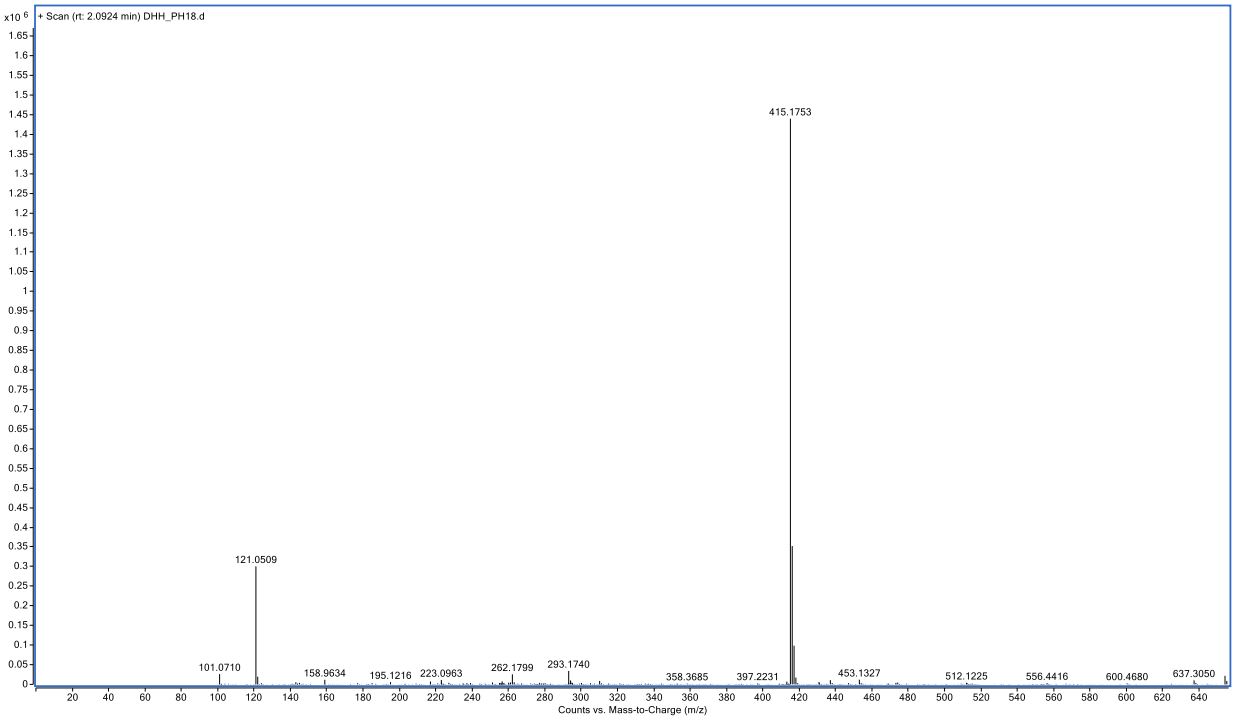
Phụ lục 3.8. Phổ của hợp chất PH18
(Pogostemon D)

CTPT: $C_{23}H_{26}O_7$

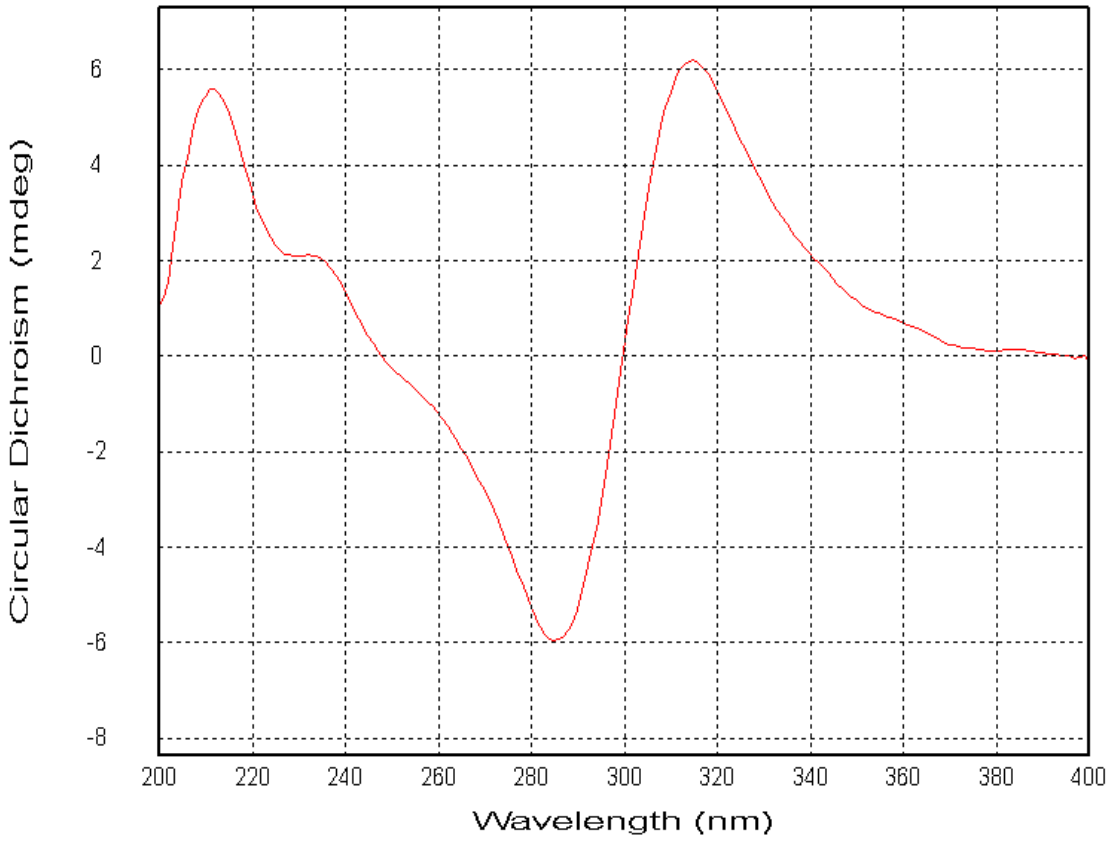
KLPT: 414,4540



- Phổ HR-ESI-MS
- Phổ CD
- Phổ IR
- Phổ ^{1}H-NMR
- Phổ ^{13}C-NMR
- Phổ HSQC
- Phổ HMBC
- Phổ NOESY

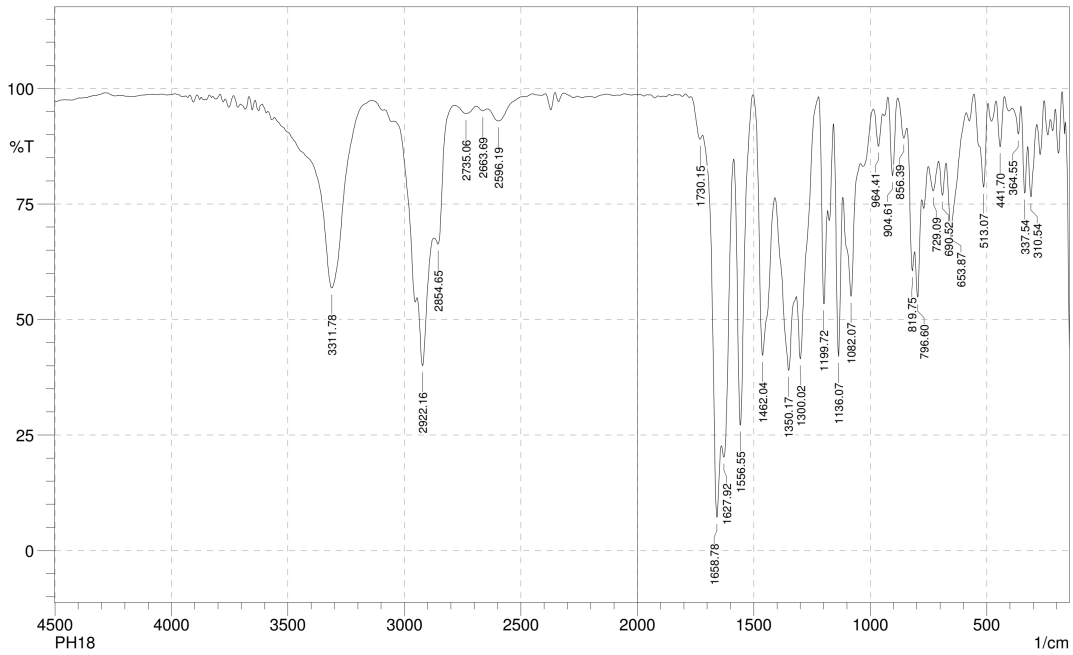


Phổ HR-ESI-MS của hợp chất PH18



Phổ CD của hợp chất PH18

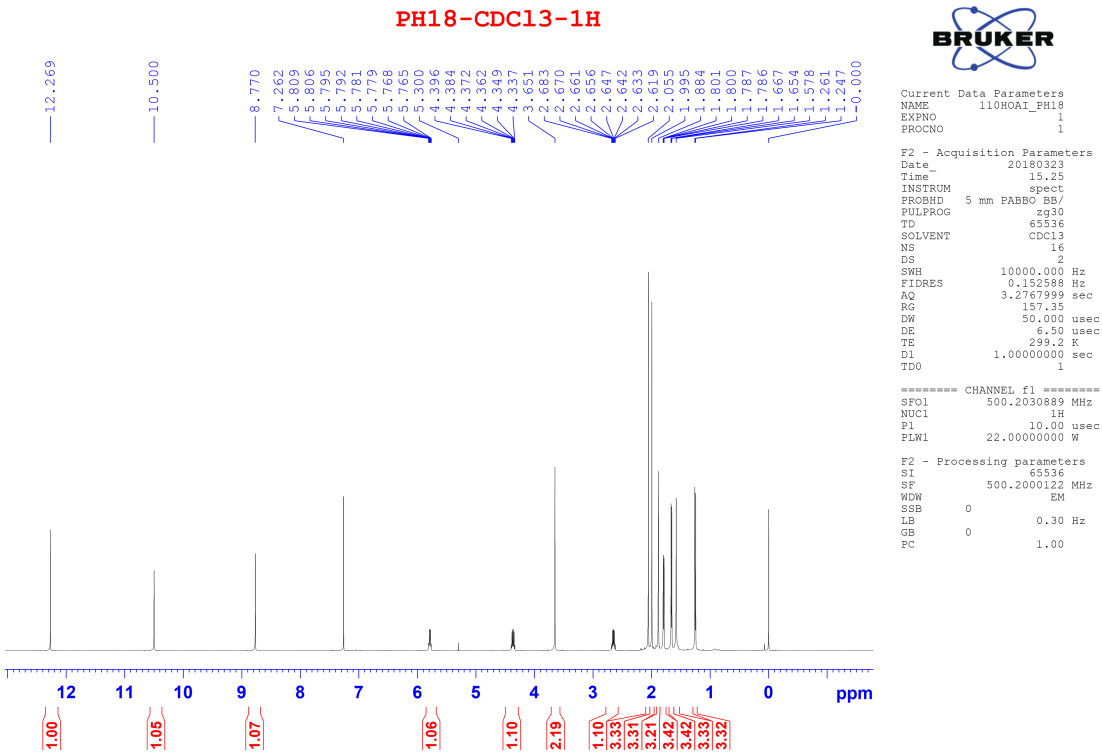
SHIMADZU



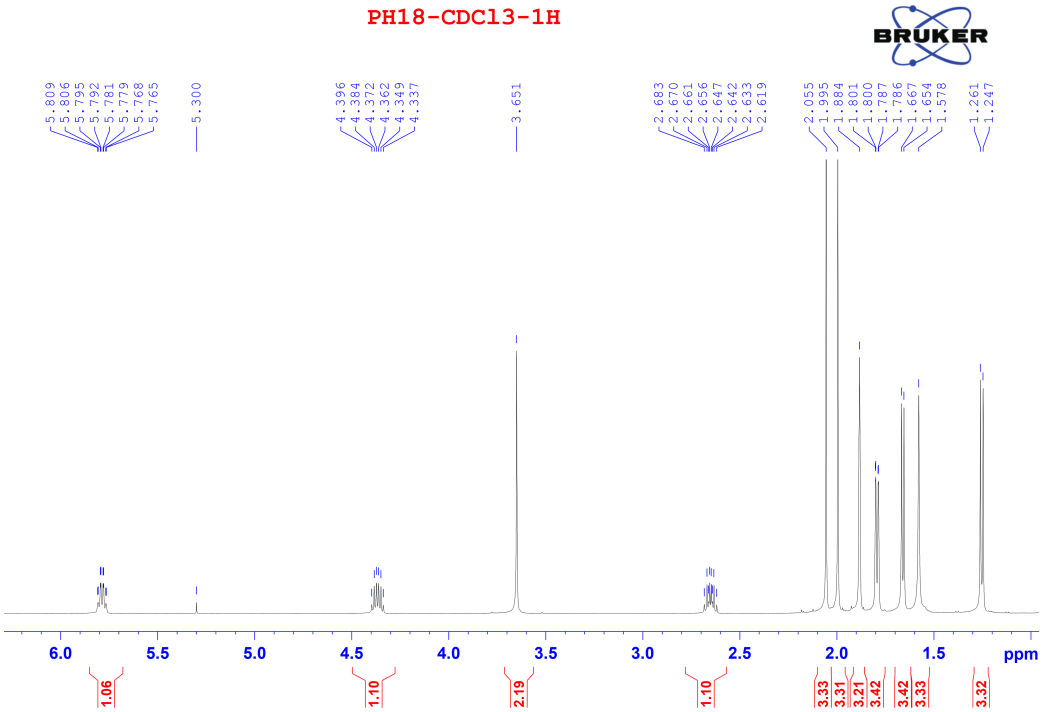
	Peak	Intensity	Corr. Intensity	Base (H)	Base (L)	Area	Corr. Area
1	310.54	76.518	12.599	324.04	285.46	2.992	1.212
2	337.54	77.373	13.564	352.97	325.97	2.01	0.924
3	364.55	90.126	5.633	389.62	354.9	1.026	0.371
4	441.7	87.376	10.348	459.06	424.34	1.164	0.821
5	513.07	78.611	18.673	553.57	495.71	3.251	2.651
6	653.87	70.202	15.971	673.16	588.29	7.598	3.372
7	690.52	76.892	7.163	705.95	675.09	2.926	0.596
8	729.09	77.851	5.827	750.31	707.88	3.972	0.693
9	796.6	54.648	14.375	808.17	779.24	5.794	1.372
10	819.75	60.515	12.05	842.89	810.1	4.802	1.004
11	856.39	89.248	4.151	881.47	844.82	1.247	0.332
12	904.61	81.081	16.922	923.9	883.4	1.913	1.556
13	964.41	87.47	7.439	985.62	947.05	1.51	0.639
14	1082.07	55.034	24.796	1116.78	1043.49	11.674	4.585
15	1136.07	41.966	41.618	1157.29	1118.71	8.205	5.205
16	1199.72	53.393	30.443	1220.94	1184.29	5.726	3.011
17	1300.02	41.468	21.439	1317.38	1222.87	16.085	4.334
18	1350.17	38.964	23.339	1408.04	1319.31	24.234	7.312
19	1462.04	42.2	46.673	1502.55	1409.96	18.398	12.594
20	1556.55	27.16	62.461	1585.49	1504.48	16.887	13.77
21	1627.92	20.193	14.324	1637.56	1587.42	19.694	3.047
22	1658.78	7.158	31.883	1718.58	1639.49	33.976	10.17
23	1730.15	89.011	2.471	1770.65	1720.5	1.617	0.266
24	2596.19	92.946	3.437	2642.48	2488.17	3.033	0.95
25	2663.69	95.169	0.653	2690.7	2644.41	0.92	0.069
26	2735.06	94.622	1.614	2785.21	2692.63	1.902	0.361
27	2854.65	66.304	7.181	2872.01	2787.14	7.149	0.8
28	2922.16	39.972	18.915	2945.3	2873.94	19.734	4.453
29	3311.78	56.796	39.139	3556.74	3142.04	34.799	26.666

Date/Time; 6/19/2018 5:31:11 PM
No. of Scans;
Resolution;
Apodization;

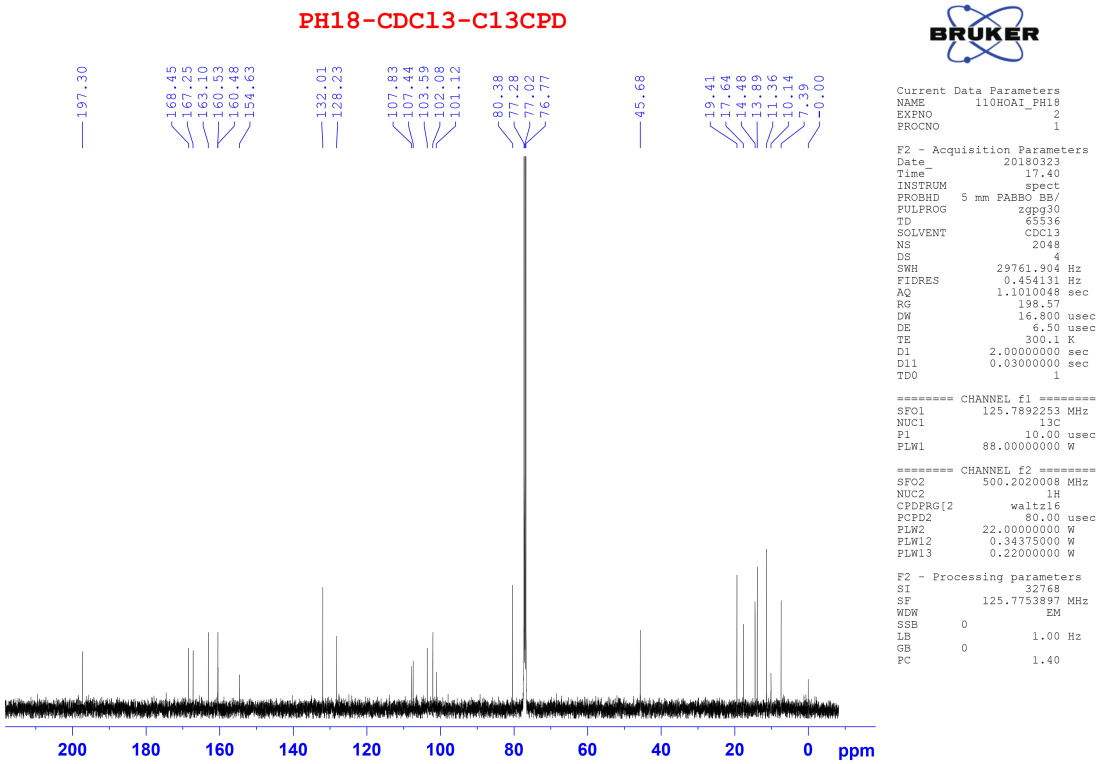
Phổ IR của hợp chất PH18



Phổ ^{1}H-NMR của hợp chất PH18

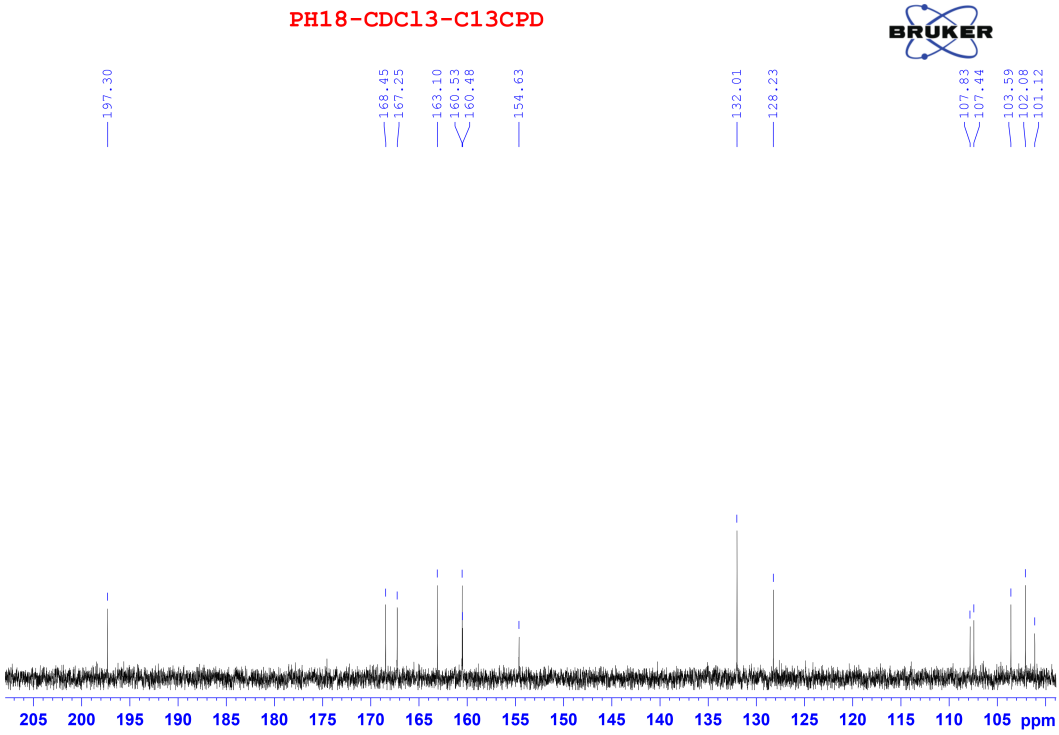


Phổ ^{1}H-NMR của hợp chất PH18

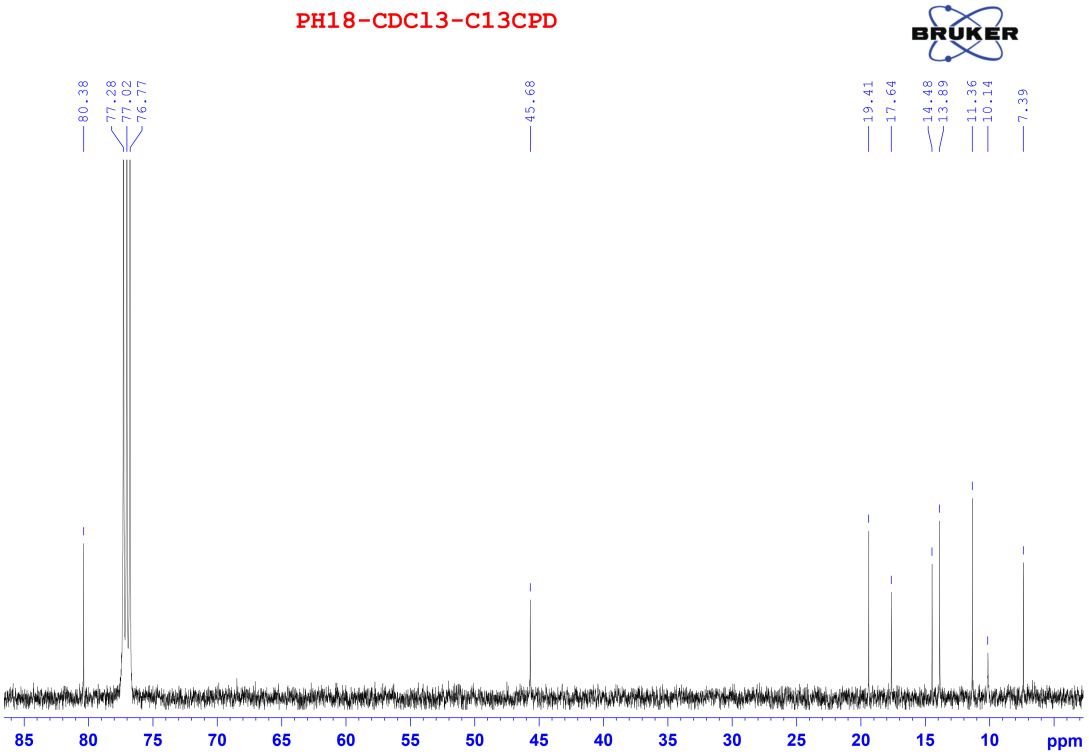



```
Current Data Parameters
NAME        110HOAI_PH18
EXPNO                  2
PROCNO                 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_             20180323
Time                 17.40
INSTRUM              spect
PROBHD    5 mm PABBO BB/
PULPROG            zgpg30
TD                  65536
SOLVENT             CDCl3
NS                   2048
DS                      4
SWH             29761.904 Hz
FIDRES           0.454131 Hz
AQ              1.1010048 sec
RG                 198.57
DW                 16.800 usec
DE                   6.50 usec
TE                  300.1 K
D1             2.00000000 sec
D11            0.03000000 sec
TD0                     1

======== CHANNEL f1 ========
SFO1          125.7892253 MHz
NUC1                   13C
P1                   10.00 usec
PLW1          88.00000000 W

======== CHANNEL f2 ========
SFO2          500.2020008 MHz
NUC2                    1H
CPDPRG[2          waltz16
PCPD2                80.00 usec
PLW2          22.00000000 W
PLW12          0.34375000 W
PLW13          0.22000000 W

F2 - Processing parameters
SI                   32768
SP            125.7753897 MHz
WDW                     EM
SSB       0
LB                    1.00 Hz
GB        0
PC                    1.40
```

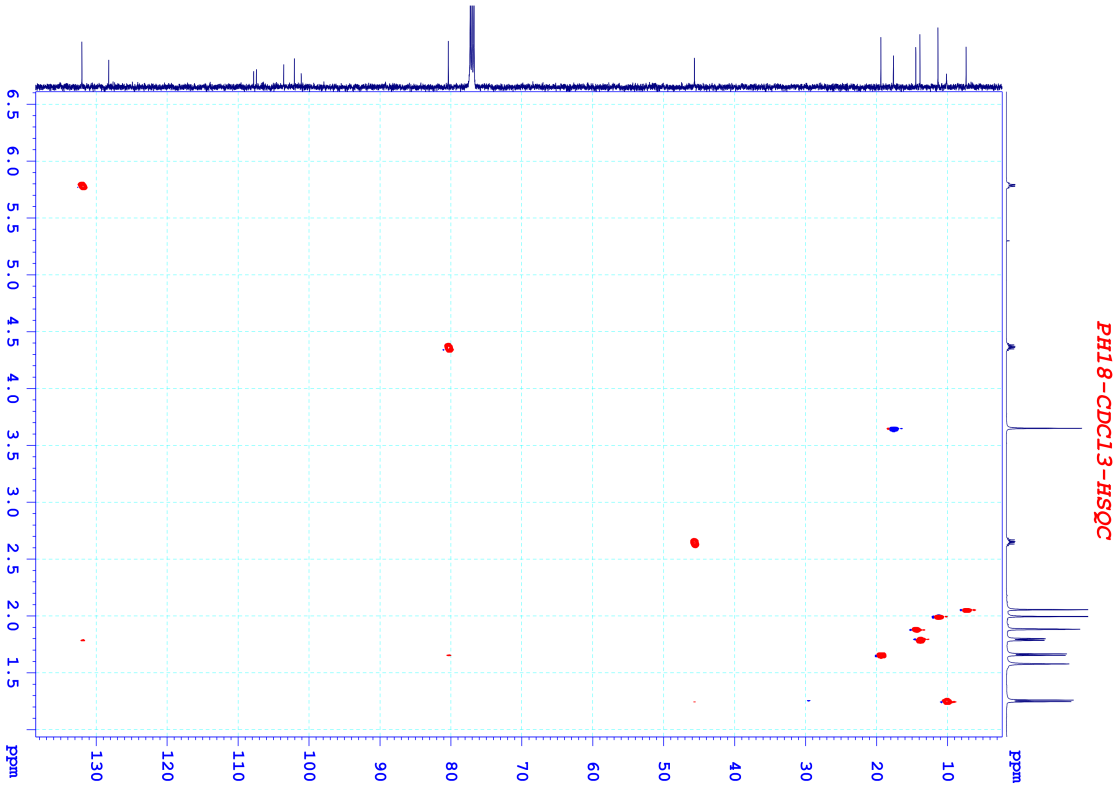
Phổ ^{13}C-NMR của hợp chất PH18



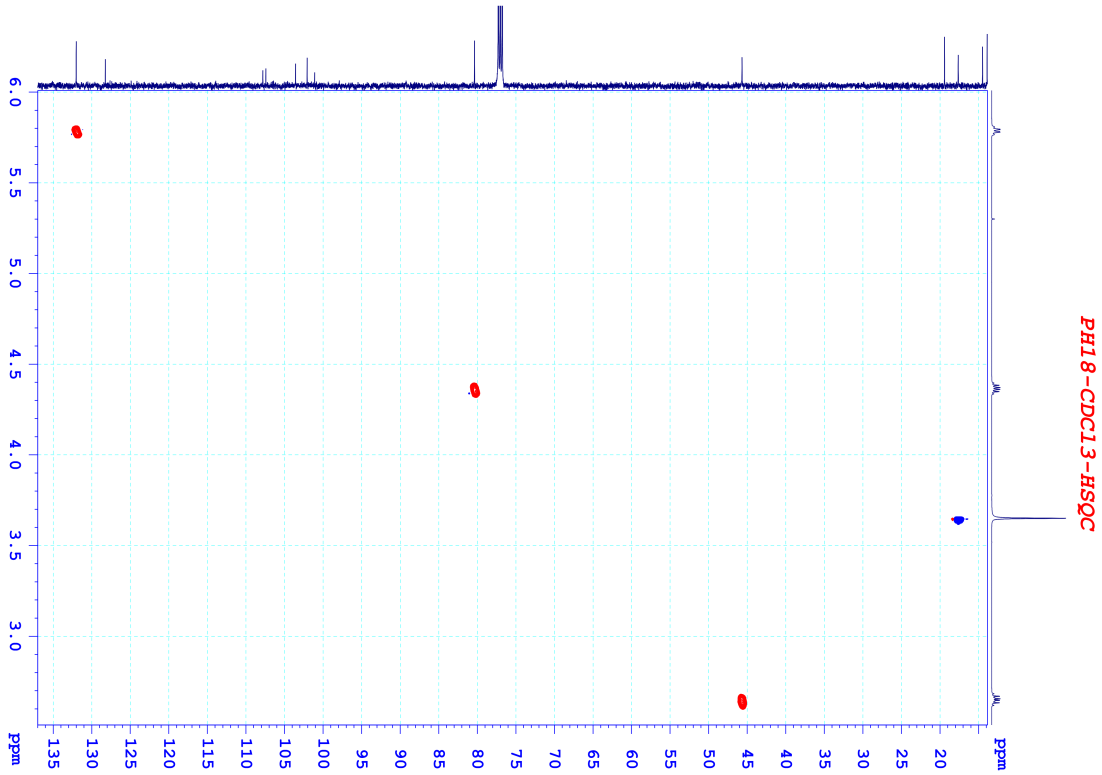
Phổ ^{13}C-NMR của hợp chất PH18



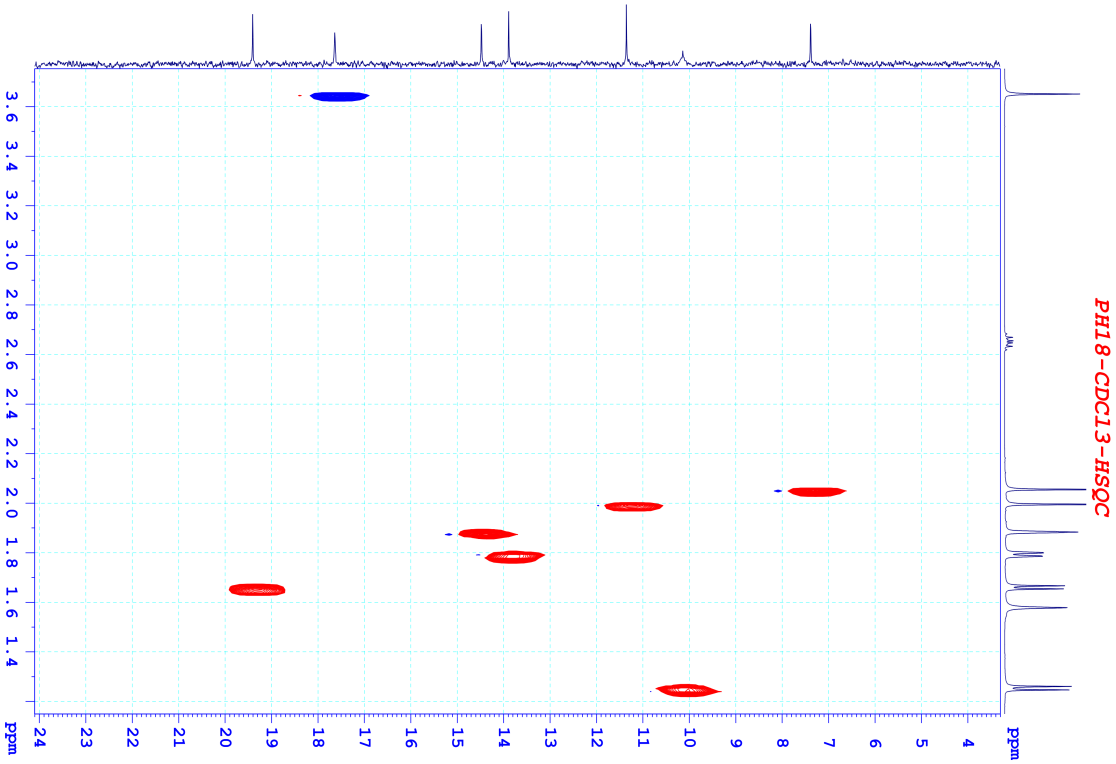
Phổ ^{13}C-NMR của hợp chất PH18



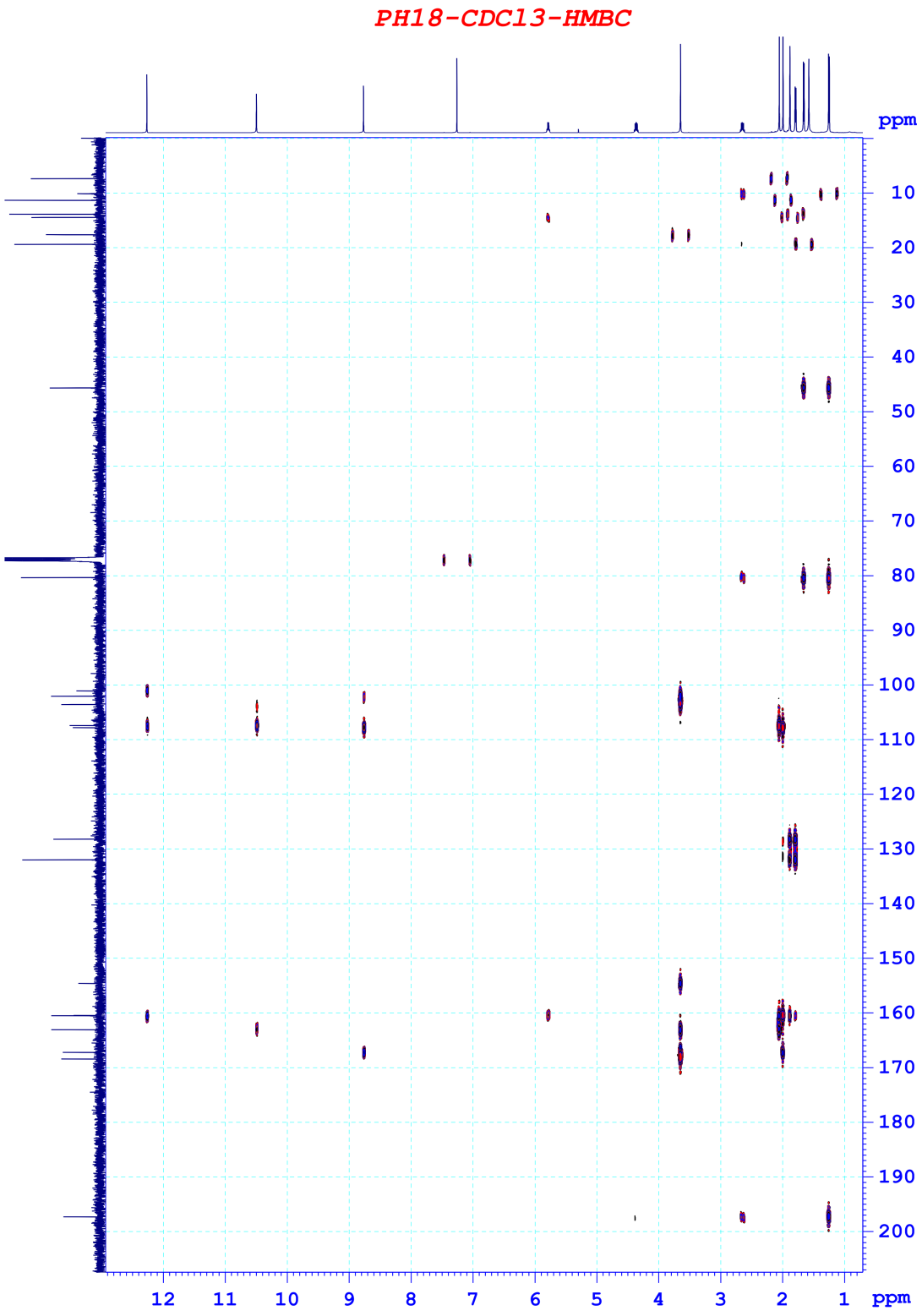
Phổ HSQC của hợp chất PH18



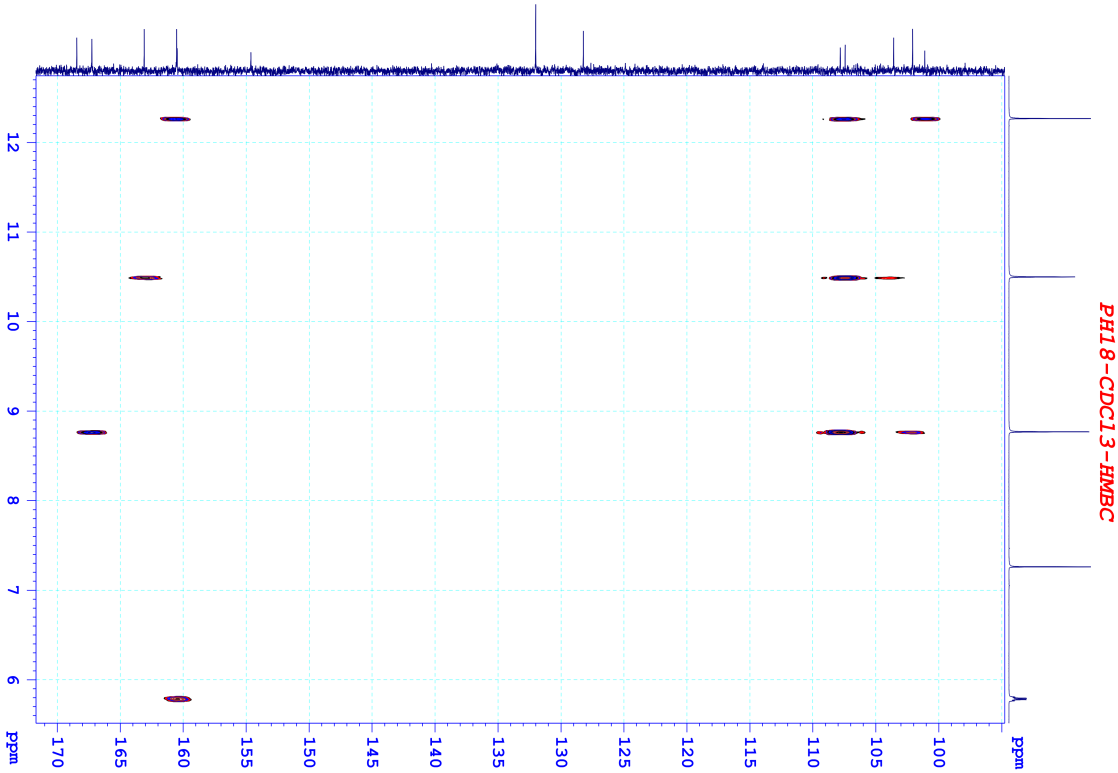
Phổ HSQC của hợp chất PH18



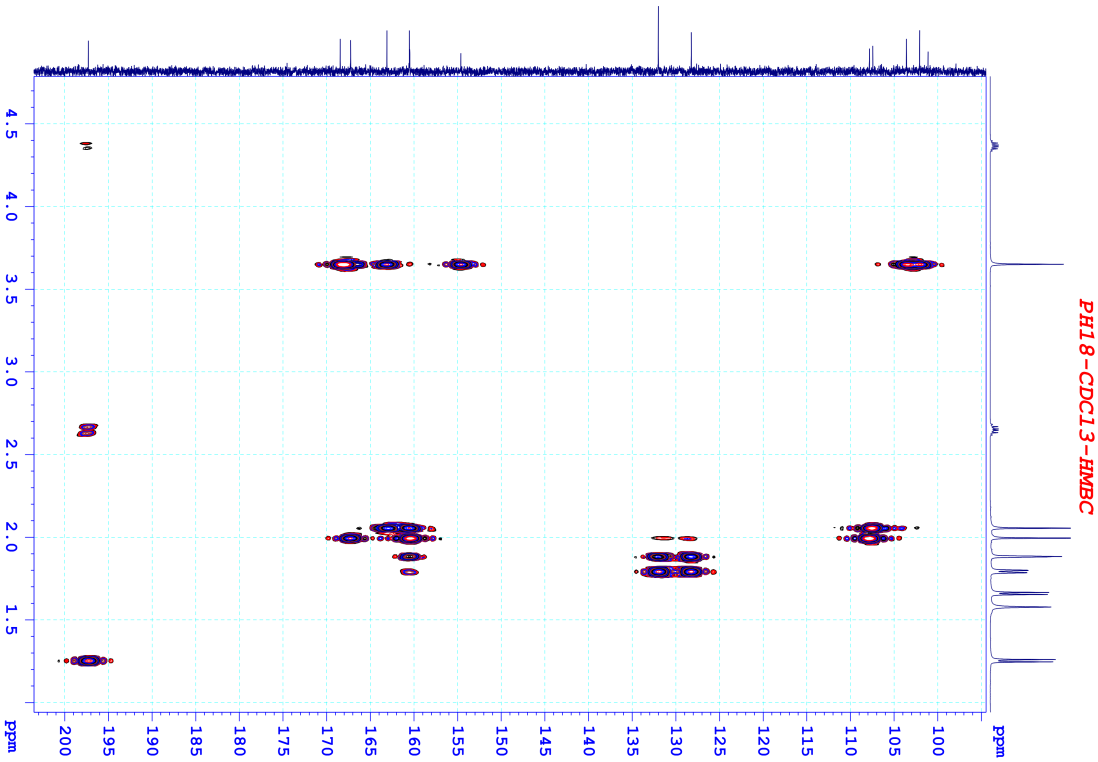
Phổ HSQC của hợp chất PH18



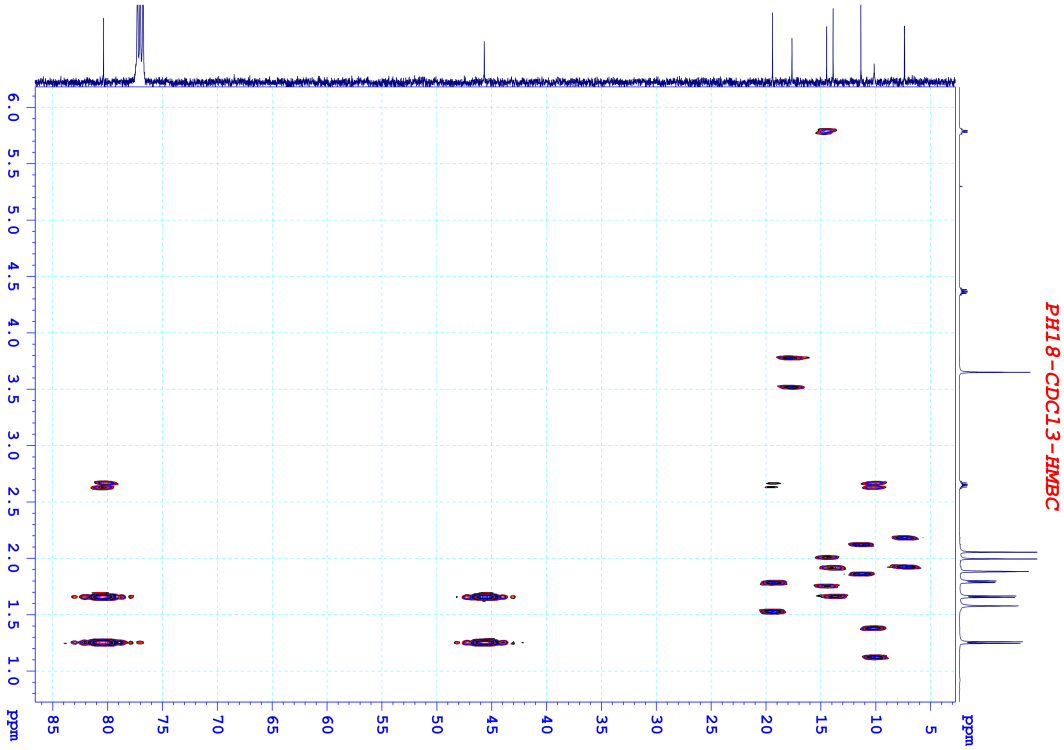
Phổ HMBC của hợp chất PH18



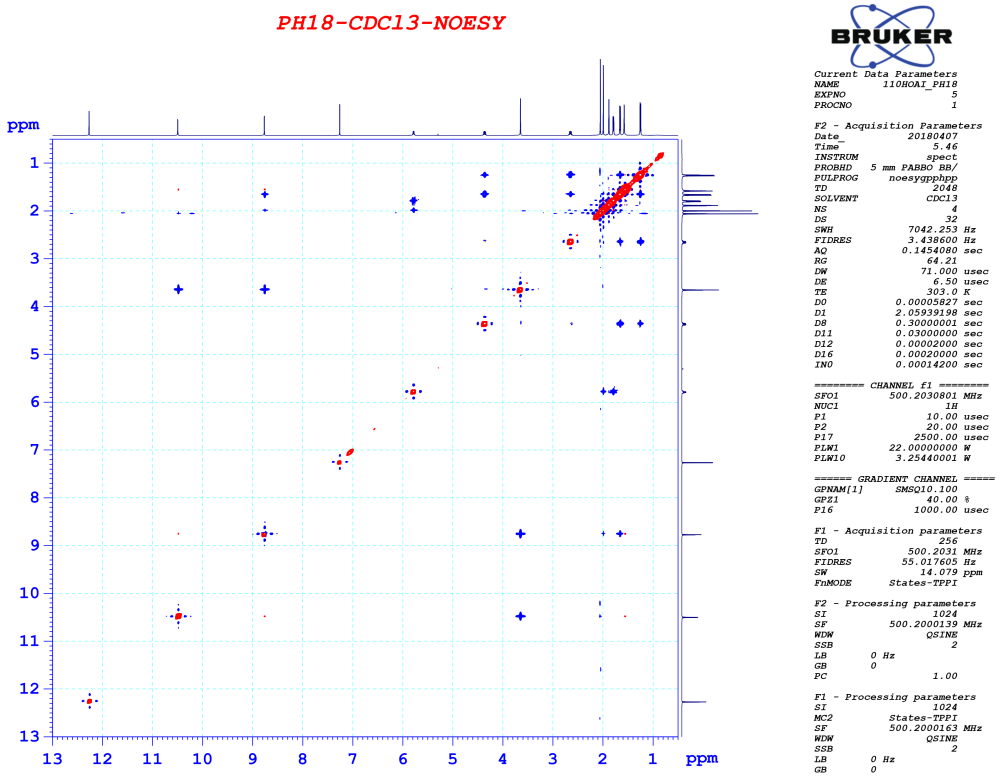
Phổ HMBC của hợp chất PH18



Phổ HMBC của hợp chất PH18

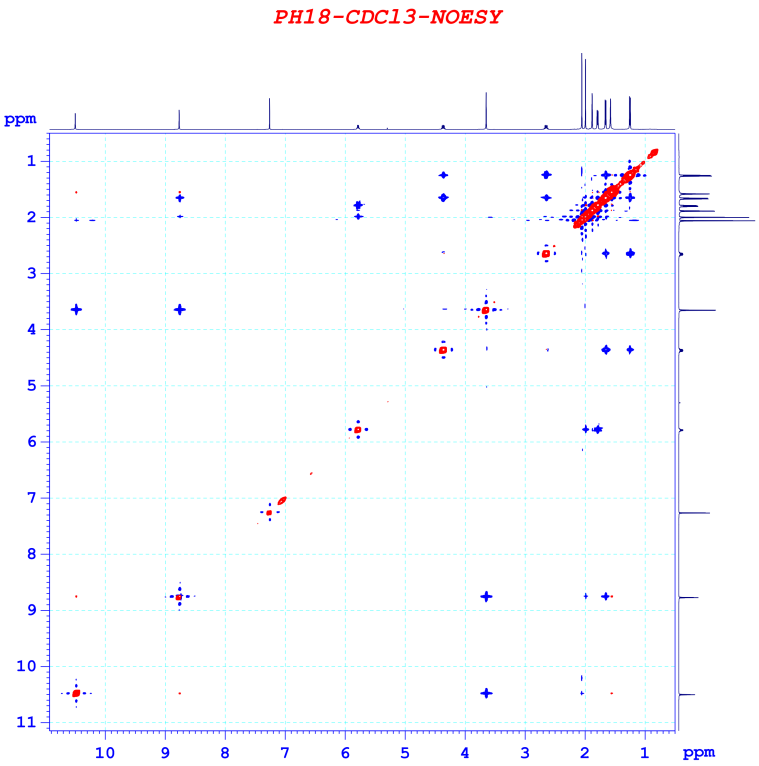


Phổ HMBC của hợp chất PH18



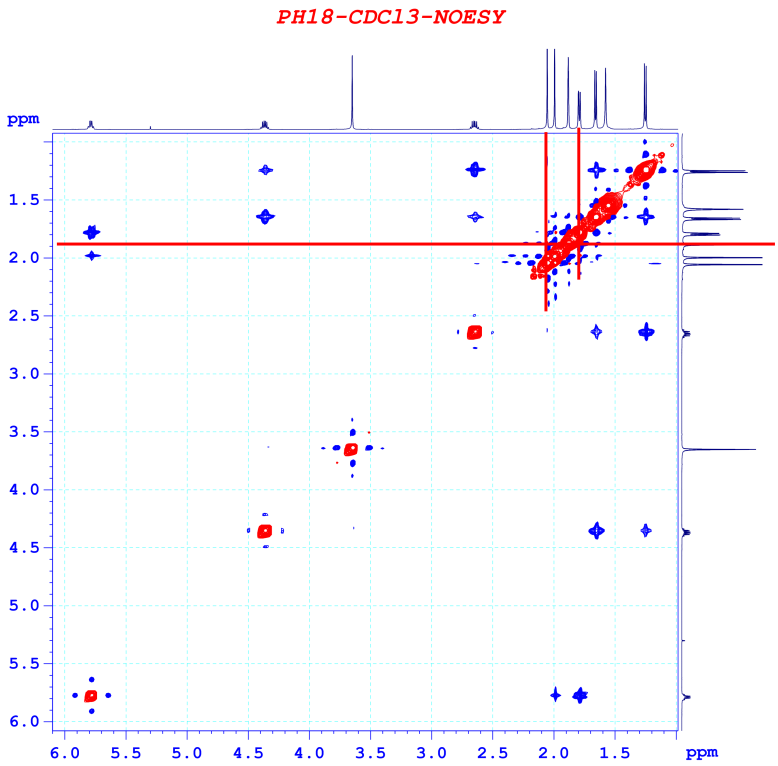

```
Current Data Parameters
NAME        110HOAI_PH18
EXPNO                   5
PROCNO                  1

F2 - Acquisition Parameters
Date_            20180407
Time                 5.46
INSTRUM             spect
PROBHD   5 mm PABBO BB/
PULPROG      noesygpphpp
TD                   2048
SOLVENT             CDCl3
NS                      4
DS                     32
SWH             7042.253 Hz
FIDRES          3.438600 Hz
AQ            0.1454080 sec
RG                   64.21
DW                71.000 usec
DE                  6.50 usec
TE                 303.0 K
D0            0.00005827 sec
D1            2.05939198 sec
D8            0.30000001 sec
D11           0.03000000 sec
D12           0.00002000 sec
D16           0.00020000 sec
IN0           0.00014200 sec

======== CHANNEL f1 ========
SFO1          500.2030801 MHz
NUC1                    1H
P1                   10.00 usec
P2                   20.00 usec
P17                2500.00 usec
PLW1         22.00000000 W
PLW10         3.25440001 W

====== GRADIENT CHANNEL =====
GPNAM[1]       SMSQ10.100
GPZ1                40.00 %
P16                 1000.00 usec

F1 - Acquisition parameters
TD                     256
SFO1            500.2031 MHz
FIDRES          55.017605 Hz
SW                 14.079 ppm
FnMODE        States-TPPI

F2 - Processing parameters
SI                     1024
SF            500.2000139 MHz
WDW                   QSINE
SSB                       2
LB         0 Hz
GB         0
PC                     1.00

F1 - Processing parameters
SI                     1024
MC2           States-TPPI
SF            500.2000163 MHz
WDW                   QSINE
SSB                       2
LB         0 Hz
GB         0
```

Phổ NOESY của hợp chất PH18



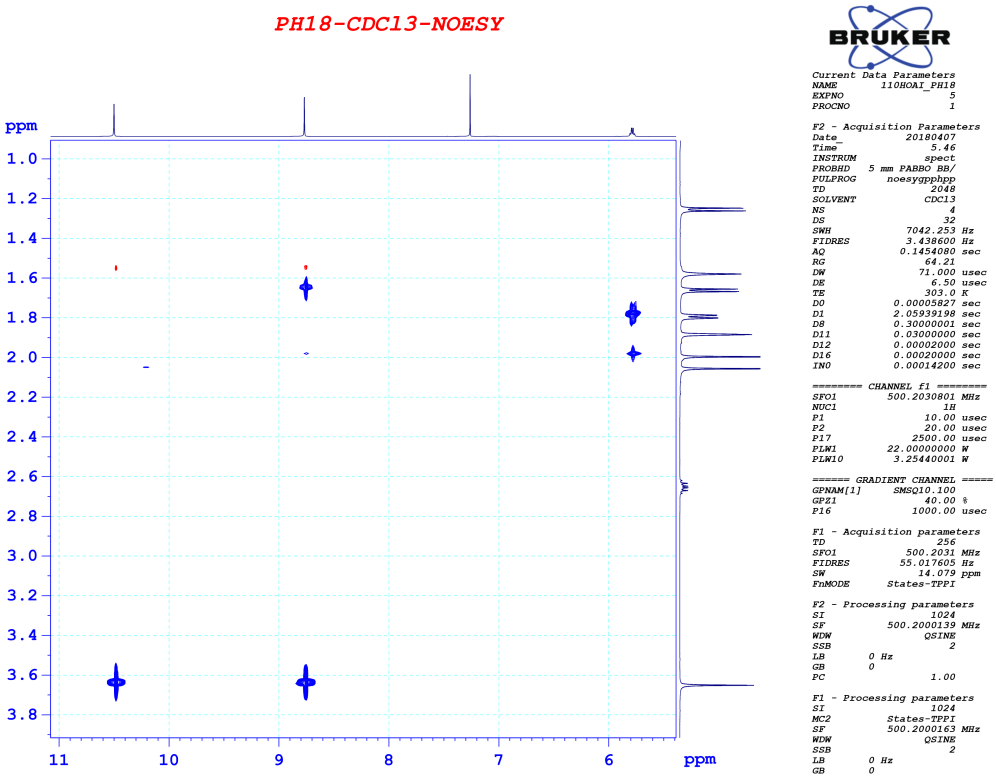

```
Current Data Parameters
NAME        110HOAI_PH18
EXPNO                   5
PROCNO                  1

F2 - Acquisition Parameters
Date_            20180407
Time                 5.46
INSTRUM             spect
PROBHD    5 mm PABBO BB/
PULPROG      noesygpphpp
TD                   2048
SOLVENT             CDCl3
NS                      4
DS                     32
SWH             7042.253 Hz
FIDRES          3.438600 Hz
AQ             0.1454080 sec
RG                  64.21
DW                 71.000 usec
DE                   6.50 usec
TE                  303.0 K
D0             0.00005827 sec
D1             2.05939198 sec
D8             0.30000001 sec
D11            0.03000000 sec
D12            0.00002000 sec
D16            0.00020000 sec
IN0            0.00014200 sec

======== CHANNEL f1 ========
SFO1         500.2030801 MHz
NUC1                   1H
P1                  10.00 usec
P2                  20.00 usec
P17                2500.00 usec
PLW1         22.00000000 W
PLW10         3.25440001 W

====== GRADIENT CHANNEL =====
GPNAM[1]      SMSQ10.100
GPZ1               40.00 %
P16              1000.00 usec

F1 - Acquisition parameters
TD                    256
SFO1            500.2031 MHz
FIDRES         55.017605 Hz
SW                14.079 ppm
FnMODE       States-TPPI

F2 - Processing parameters
SI                   1024
SF            500.2000139 MHz
WDW                  QSINE
SSB                      2
LB        0 Hz
GB        0
PC                    1.00

F1 - Processing parameters
SI                   1024
MC2          States-TPPI
SF            500.2000163 MHz
WDW                  QSINE
SSB                      2
LB        0 Hz
GB        0
```

Phổ NOESY của hợp chất PH18




```
Current Data Parameters
NAME        110HOAI_PH18
EXPNO                   5
PROCNO                  1

F2 - Acquisition Parameters
Date_            20180407
Time                 5.46
INSTRUM             spect
PROBHD    5 mm PABBO BB/
PULPROG      noesygpphpp
TD                   2048
SOLVENT             CDCl3
NS                      4
DS                     32
SWH             7042.253 Hz
FIDRES          3.438600 Hz
AQ             0.1454080 sec
RG                  64.21
DW                 71.000 usec
DE                   6.50 usec
TE                  303.0 K
D0             0.00005827 sec
D1             2.05939198 sec
D8             0.30000001 sec
D11            0.03000000 sec
D12            0.00002000 sec
D16            0.00020000 sec
IN0            0.00014200 sec

======== CHANNEL f1 ========
SFO1         500.2030801 MHz
NUC1                   1H
P1                  10.00 usec
P2                  20.00 usec
P17                2500.00 usec
PLW1         22.00000000 W
PLW10         3.25440001 W

====== GRADIENT CHANNEL =====
GPNAM[1]      SMSQ10.100
GPZ1               40.00 %
P16              1000.00 usec

F1 - Acquisition parameters
TD                    256
SFO1            500.2031 MHz
FIDRES         55.017605 Hz
SW                14.079 ppm
FnMODE       States-TPPI

F2 - Processing parameters
SI                   1024
SF            500.2000139 MHz
WDW                  QSINE
SSB                      2
LB        0 Hz
GB        0
PC                    1.00

F1 - Processing parameters
SI                   1024
MC2          States-TPPI
SF            500.2000163 MHz
WDW                  QSINE
SSB                      2
LB        0 Hz
GB        0
```

Phổ NOESY của hợp chất PH18

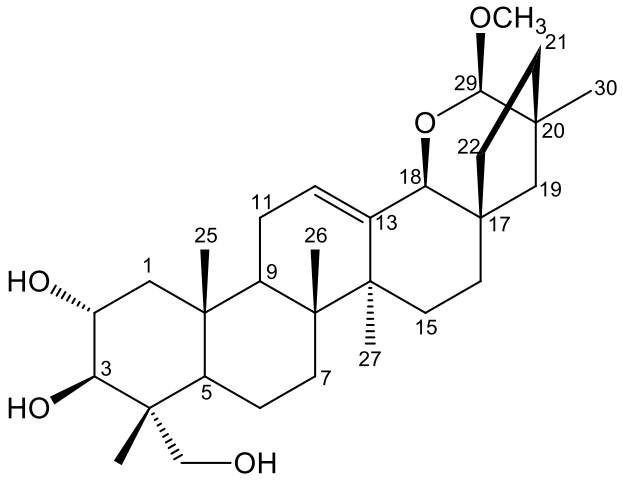


Phổ NOESY của hợp chất PH18

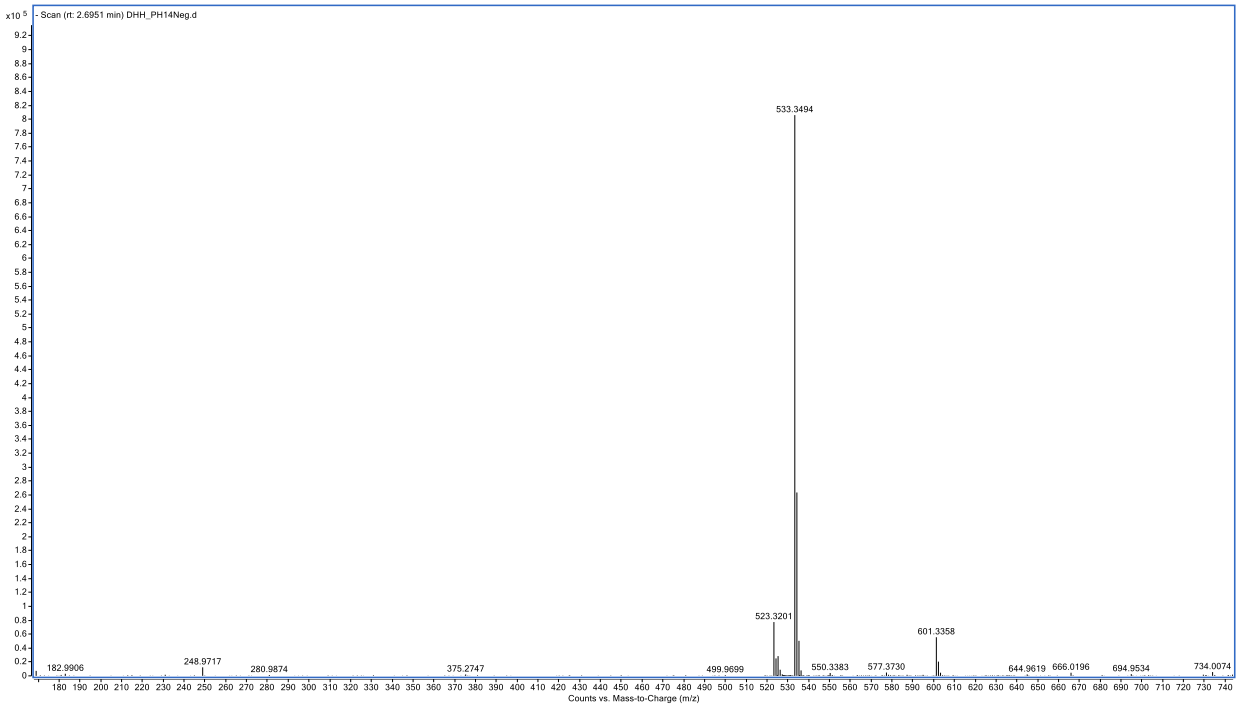
Phụ lục 3.9. Phổ của hợp chất PH14
(Pogostem)

CTPT: $C_{30}H_{48}O_5$

KLPT: 488,3502

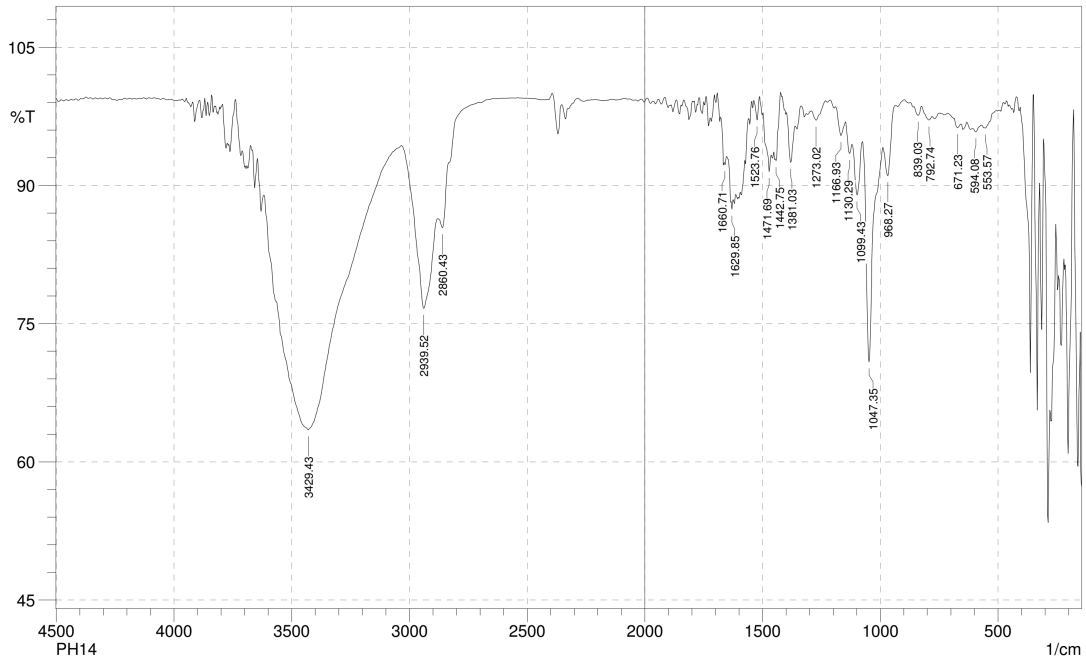


- Phổ HR-ESI-MS
- Phổ IR
- Phổ ^{1}H-NMR
- Phổ ^{13}C-NMR
- Phổ HMBC
- Phổ HSQC
- Phổ COSY
- Phổ NOESY



Phổ HR-ESI-MS của hợp chất PH14

SHIMADZU

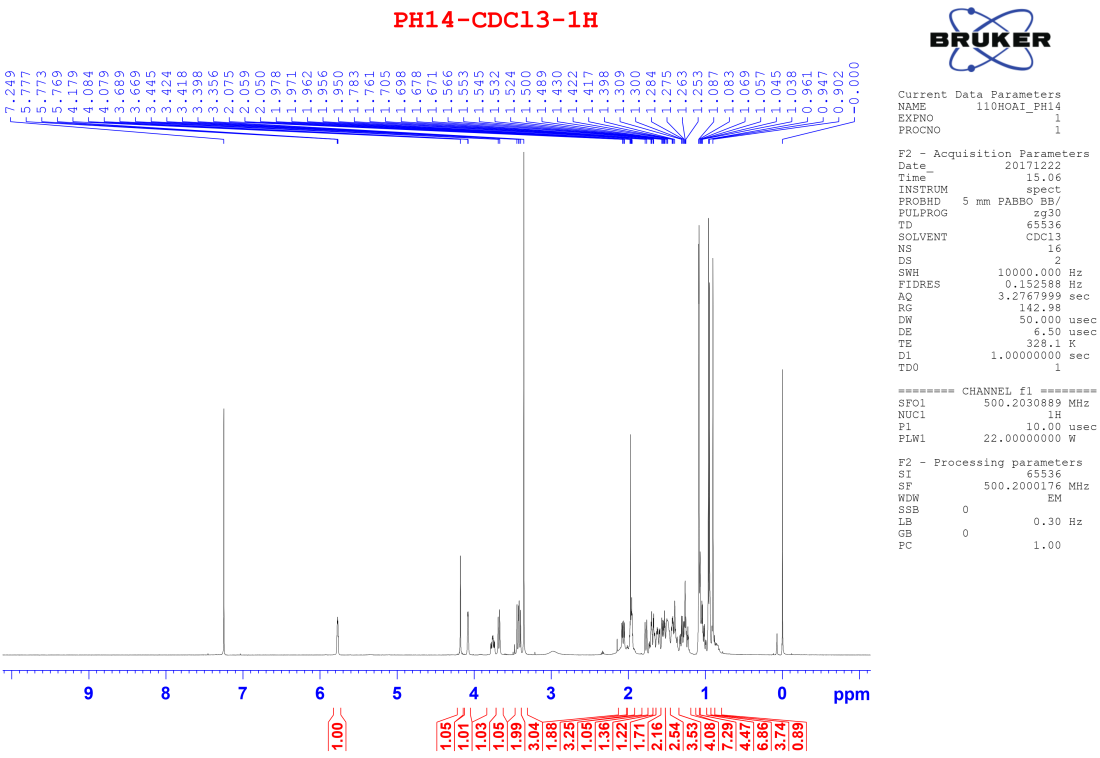


	Peak	Intensity	Corr. Intensity	Base (H)	Base (L)	Area	Corr. Area
1	553.57	96.24	0.17	557.43	509.21	0.6	0.02
2	594.08	95.81	0.49	607.58	572.86	0.59	0.03
3	671.23	96.26	0.67	684.73	659.66	0.39	0.05
4	792.74	97.11	0.66	823.6	781.17	0.46	0.09
5	839.03	97.62	0.95	854.47	825.53	0.26	0.08
6	968.27	91.05	4.72	987.55	935.48	1.29	0.48
7	1047.35	70.84	23.69	1076.28	989.48	5.94	3.78
8	1099.43	88.96	5.56	1118.71	1078.21	1.55	0.57
9	1130.29	93.47	1.85	1147.65	1120.64	0.66	0.13
10	1166.93	95.43	2.15	1188.15	1149.57	0.6	0.2
11	1273.02	97.09	1.33	1290.38	1234.44	0.52	0.19
12	1381.03	92.5	4.71	1398.39	1361.74	0.85	0.38
13	1442.75	92.7	0.8	1444.68	1423.47	0.34	0.04
14	1471.69	91.53	2.82	1496.76	1463.97	0.93	0.25
15	1523.76	97.1	2.37	1537.27	1514.12	0.17	0.12
16	1629.85	87.43	1.72	1651.07	1625.99	1.14	0.09
17	1660.71	92.26	0.37	1662.64	1653	0.32	0.01
18	2860.43	85.41	2.35	2879.72	2702.27	4.05	0.21
19	2939.52	76.66	12.76	3032.1	2881.65	11.14	4.4
20	3429.43	63.48	27.17	3616.53	3034.03	63.34	41.1

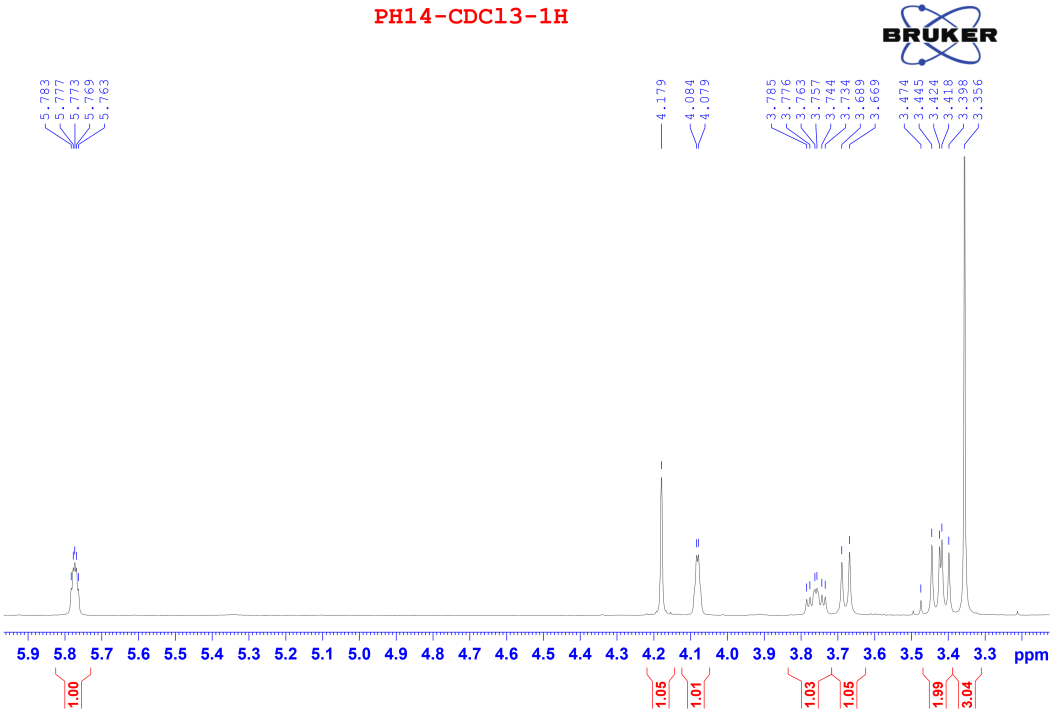
Comment;
PH14

Date/Time; 3/14/2018 5:08:39 PM
No. of Scans;
Resolution;
Apodization;
User; IR-Prestige

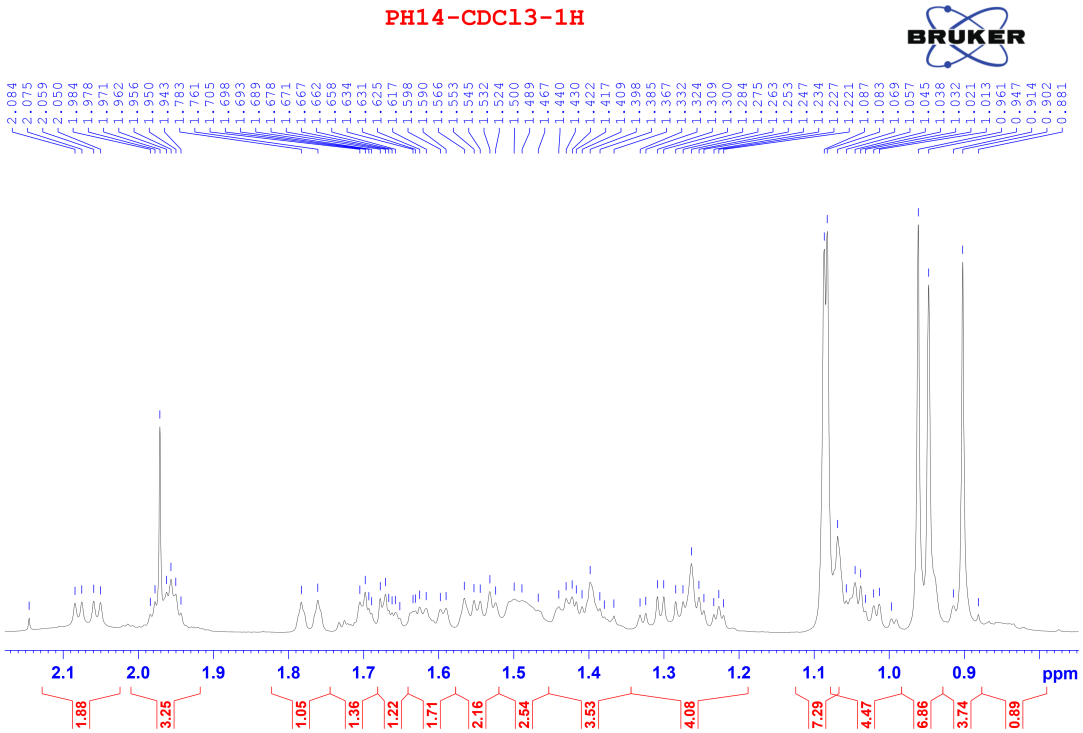
Phổ IR của hợp chất PH14



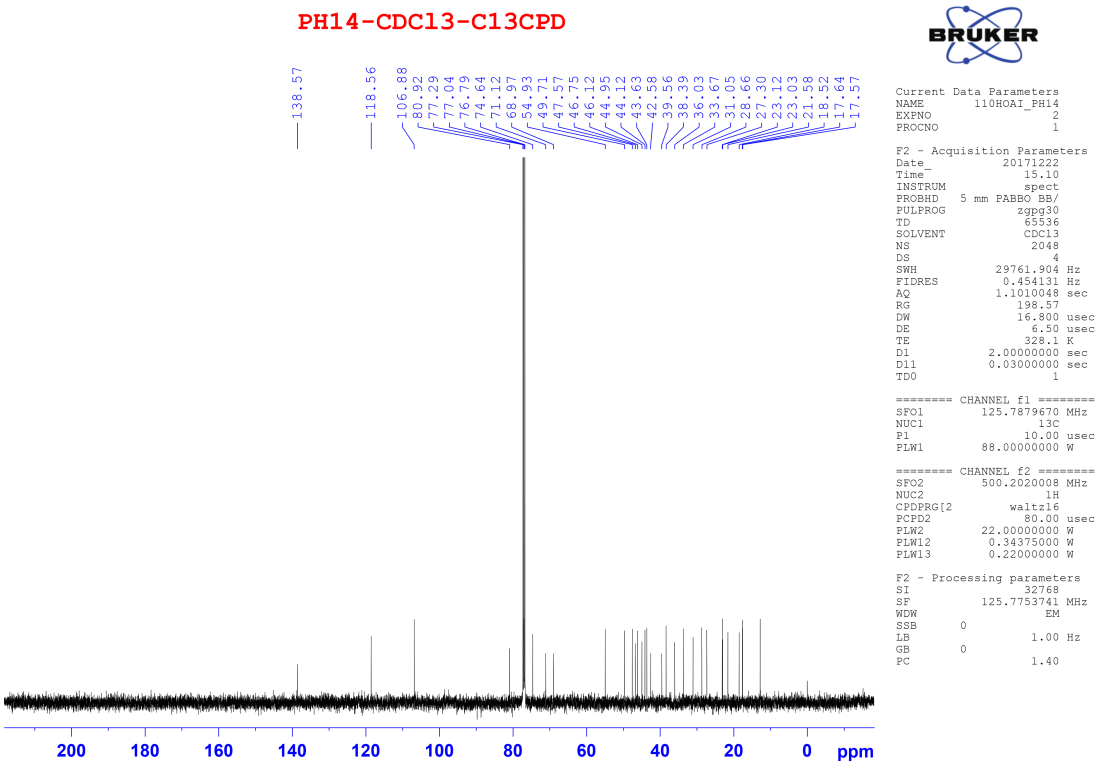
Phổ ^{1}H-NMR của hợp chất PH14



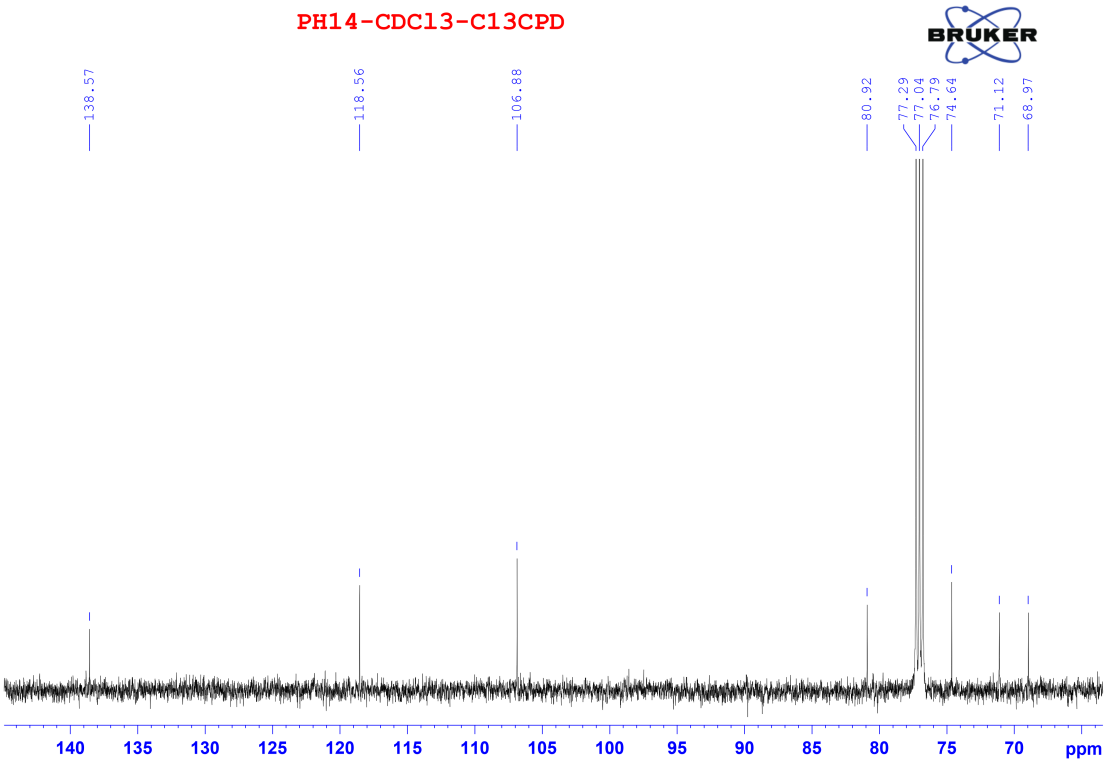
Phổ ^{1}H-NMR của hợp chất PH14



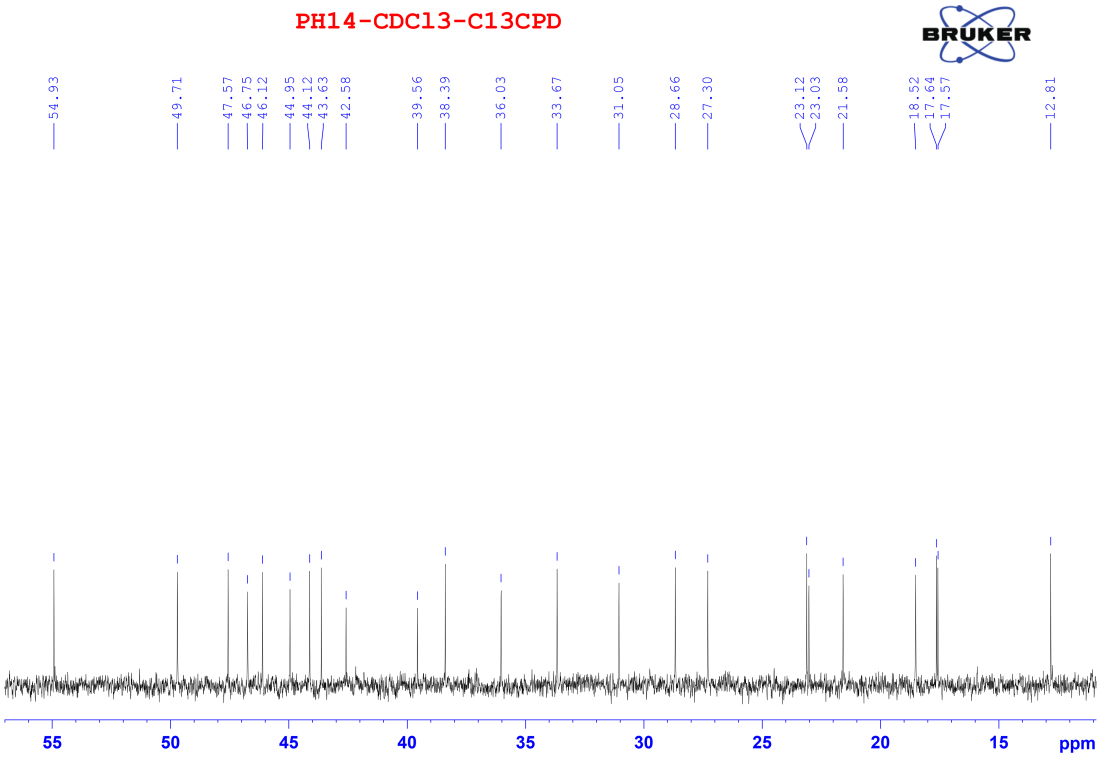
Phổ ^{1}H-NMR của hợp chất PH14



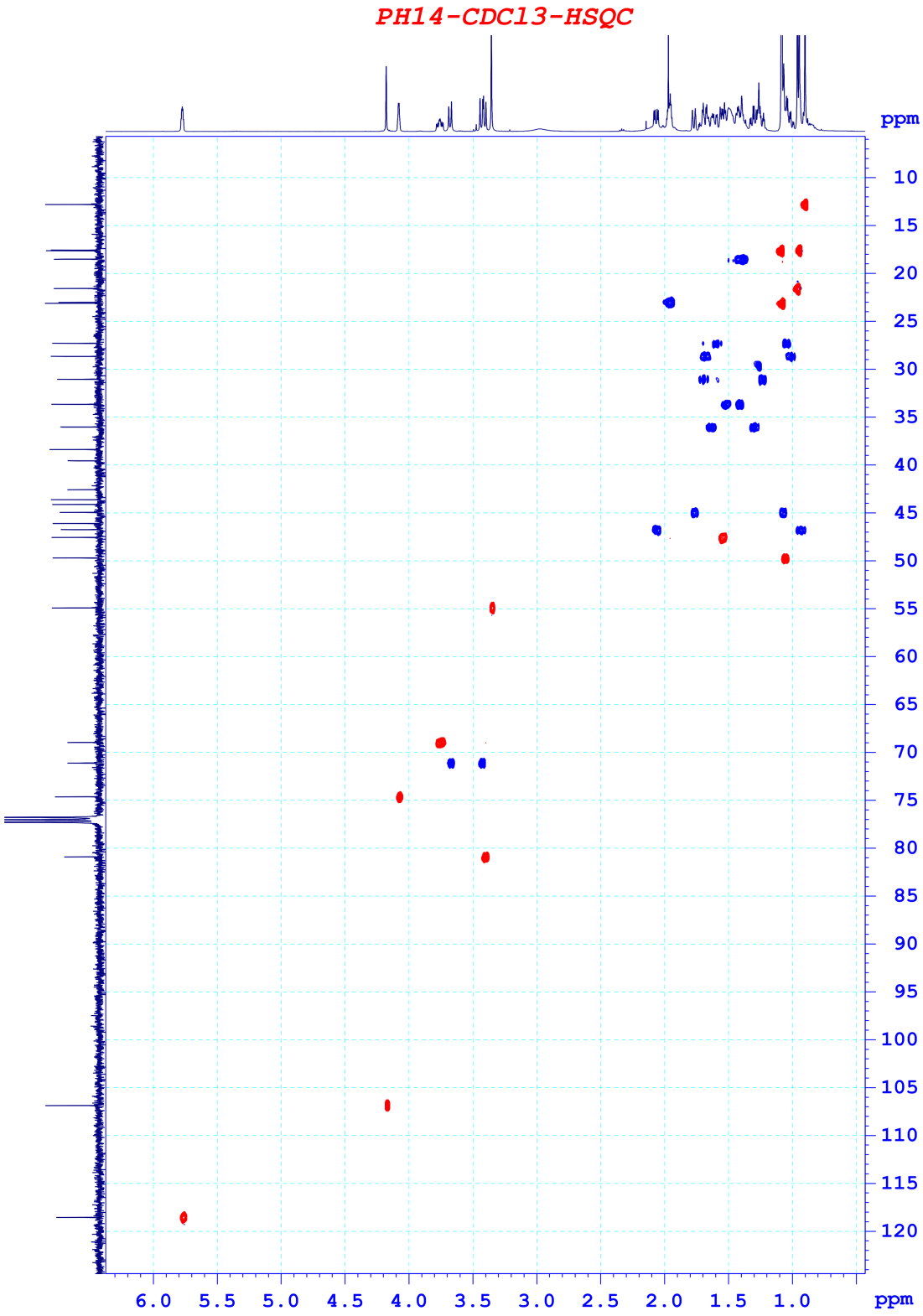
Phổ ^{13}C-NMR của hợp chất PH14



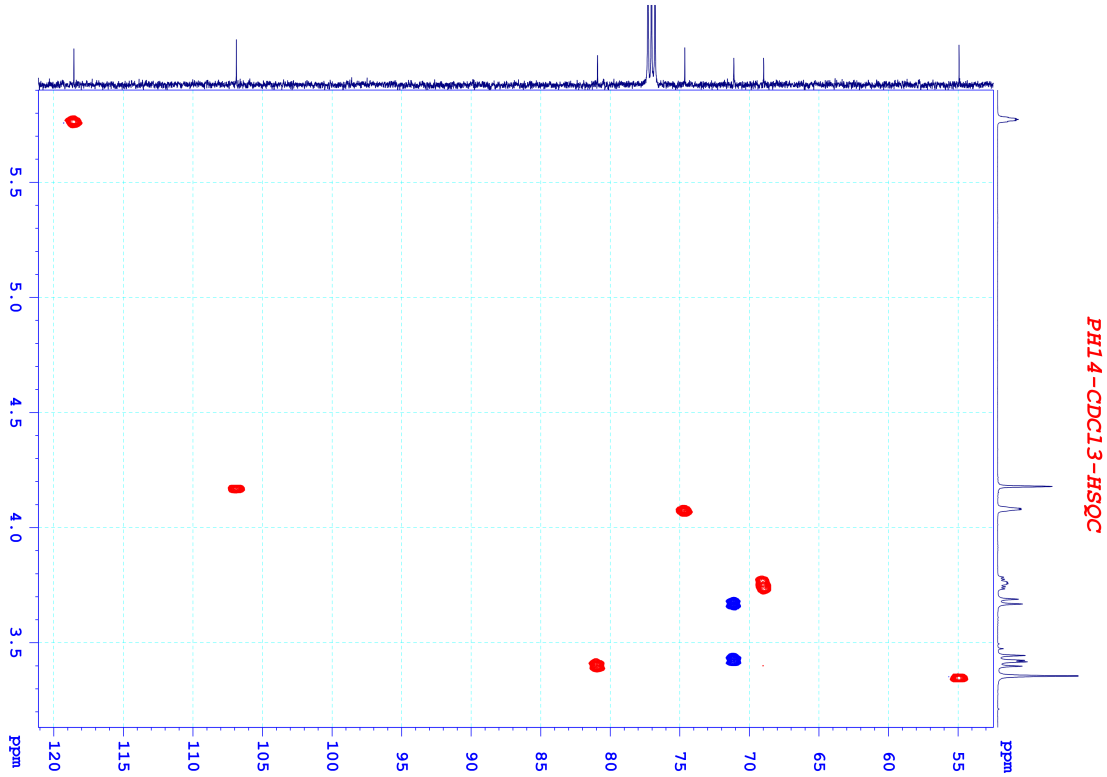
Phổ ^{13}C-NMR của hợp chất PH14



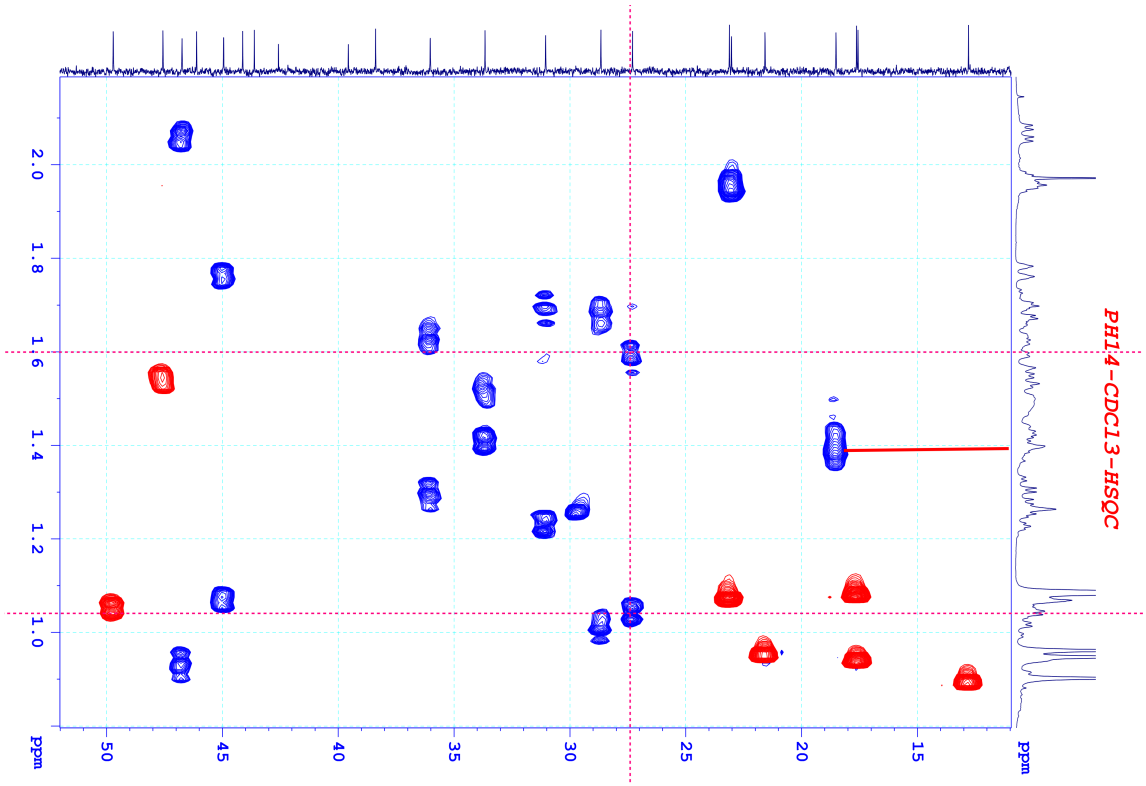
Phổ ^{13}C-NMR của hợp chất PH14



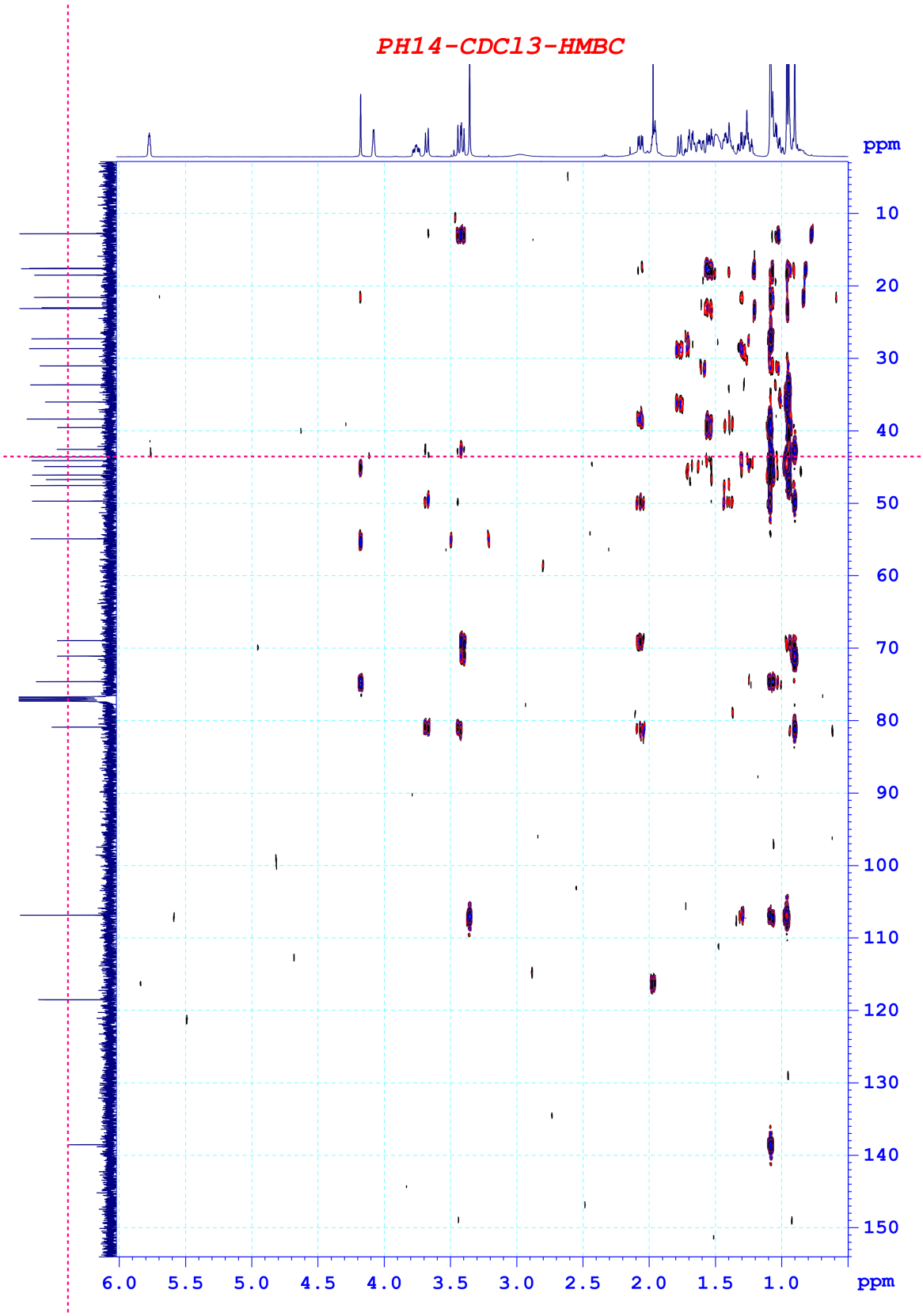
Phổ HSQC của hợp chất PH14



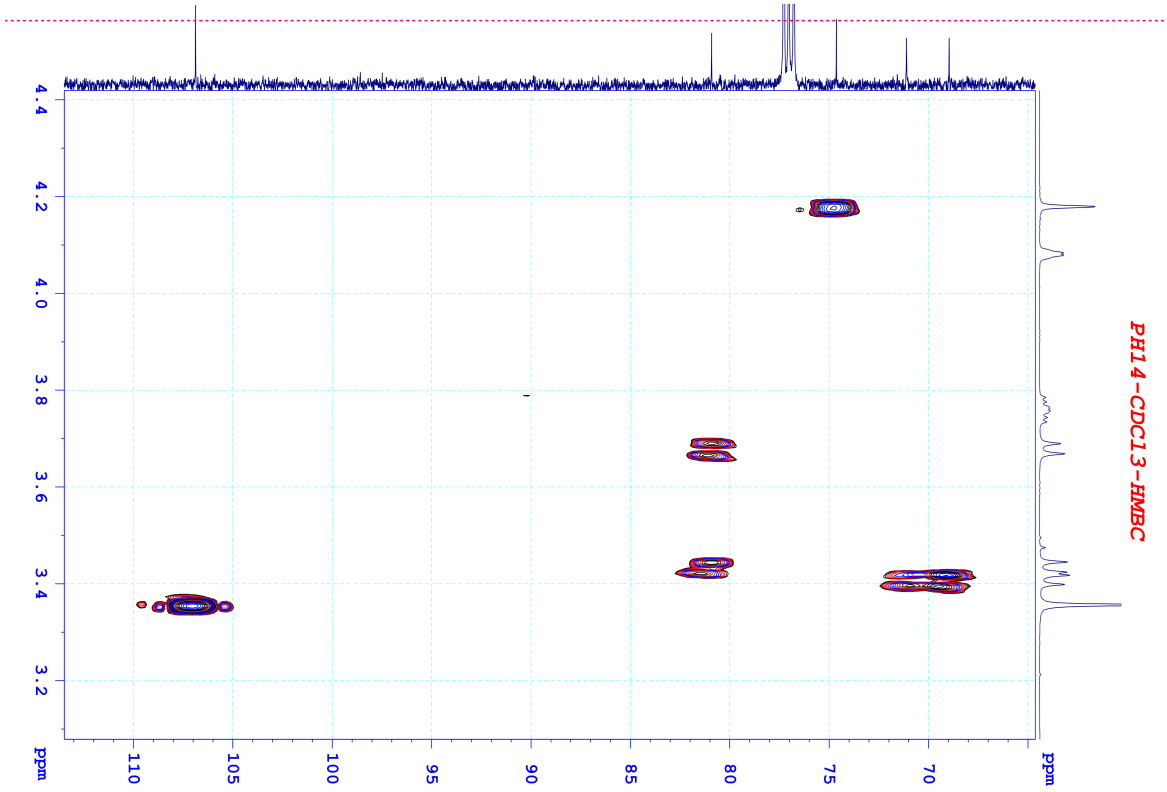
Phổ HSQC của hợp chất PH14



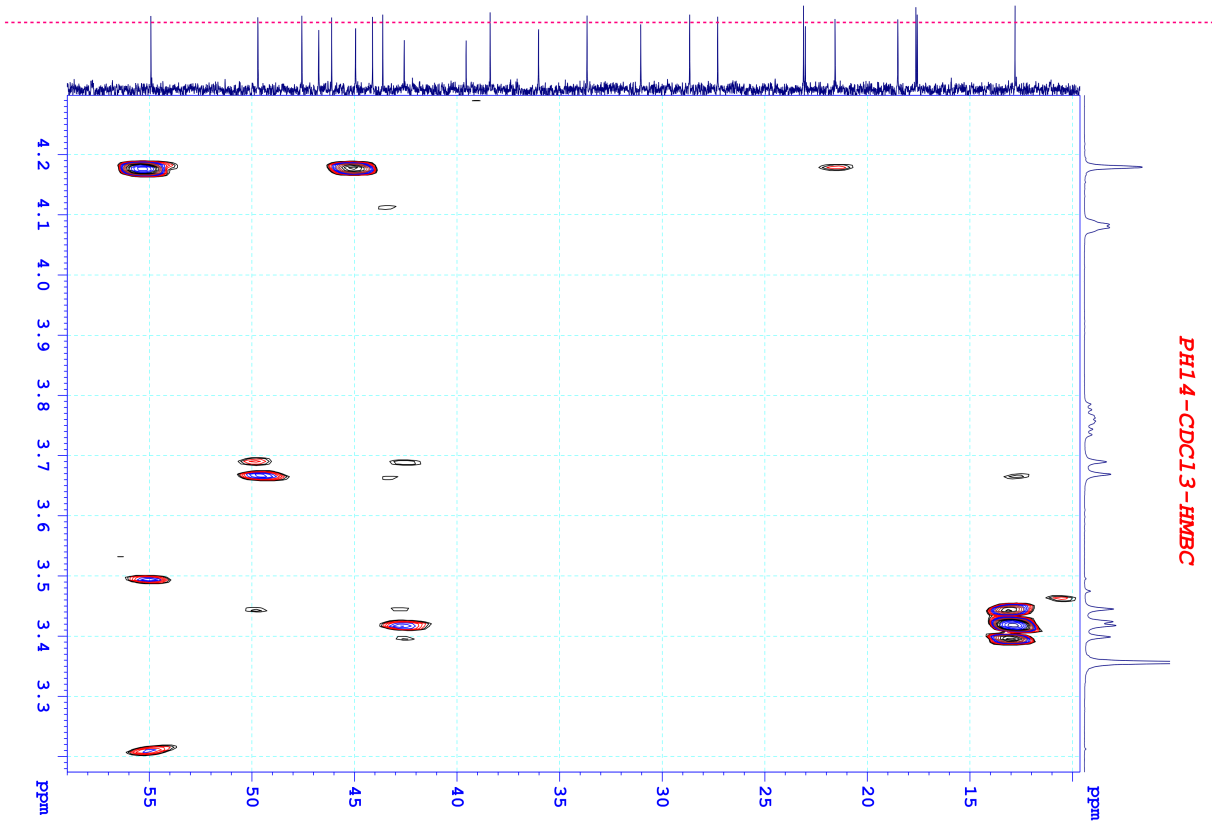
Phổ HSQC của hợp chất PH14



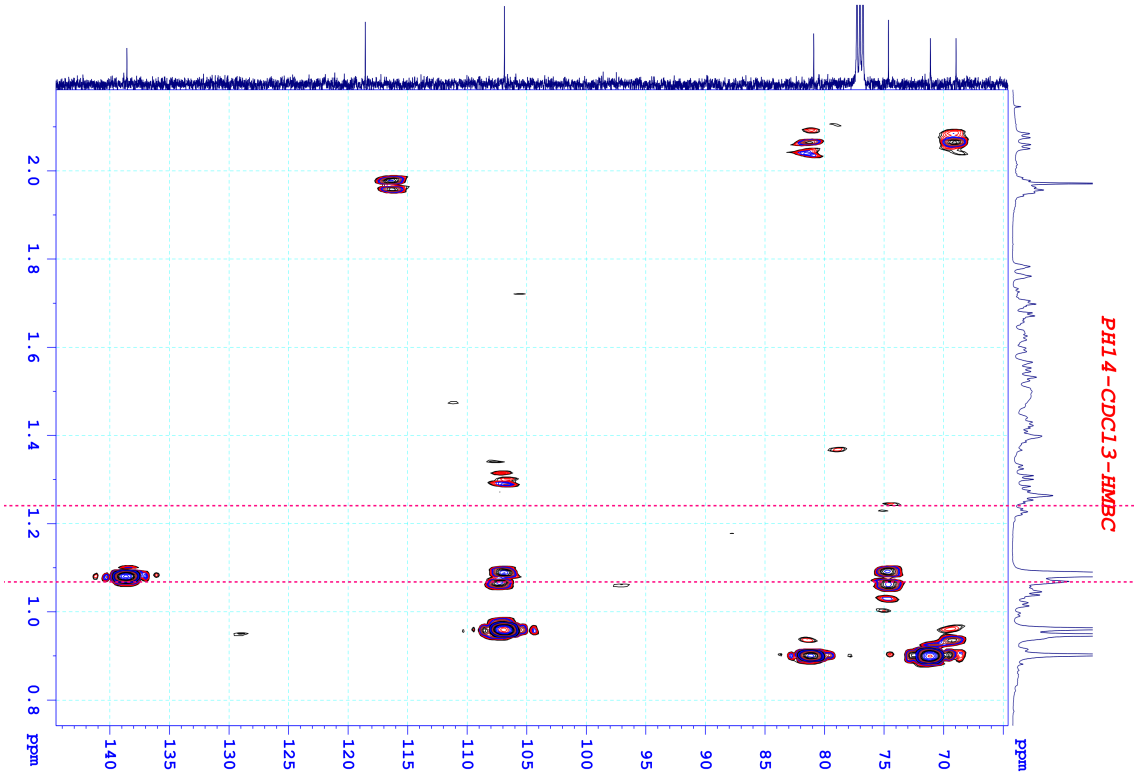
Phổ HMBC của hợp chất PH14



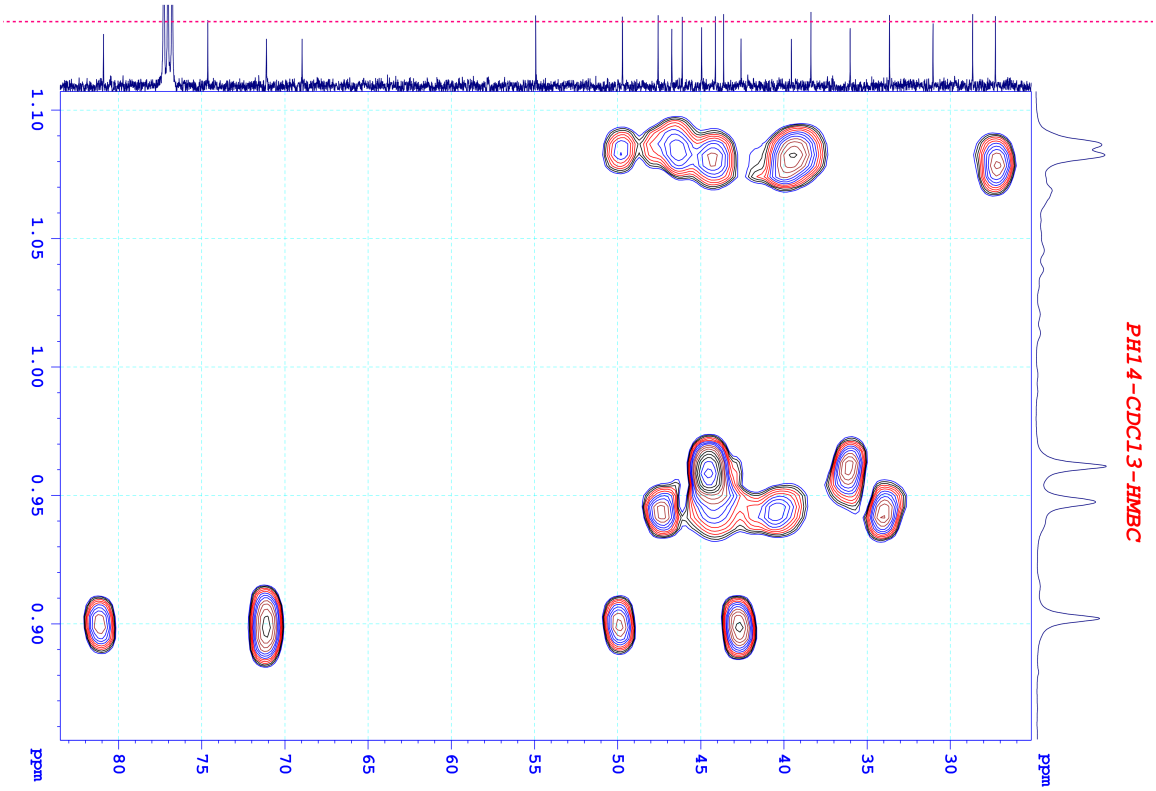
Phổ HMBC của hợp chất PH14



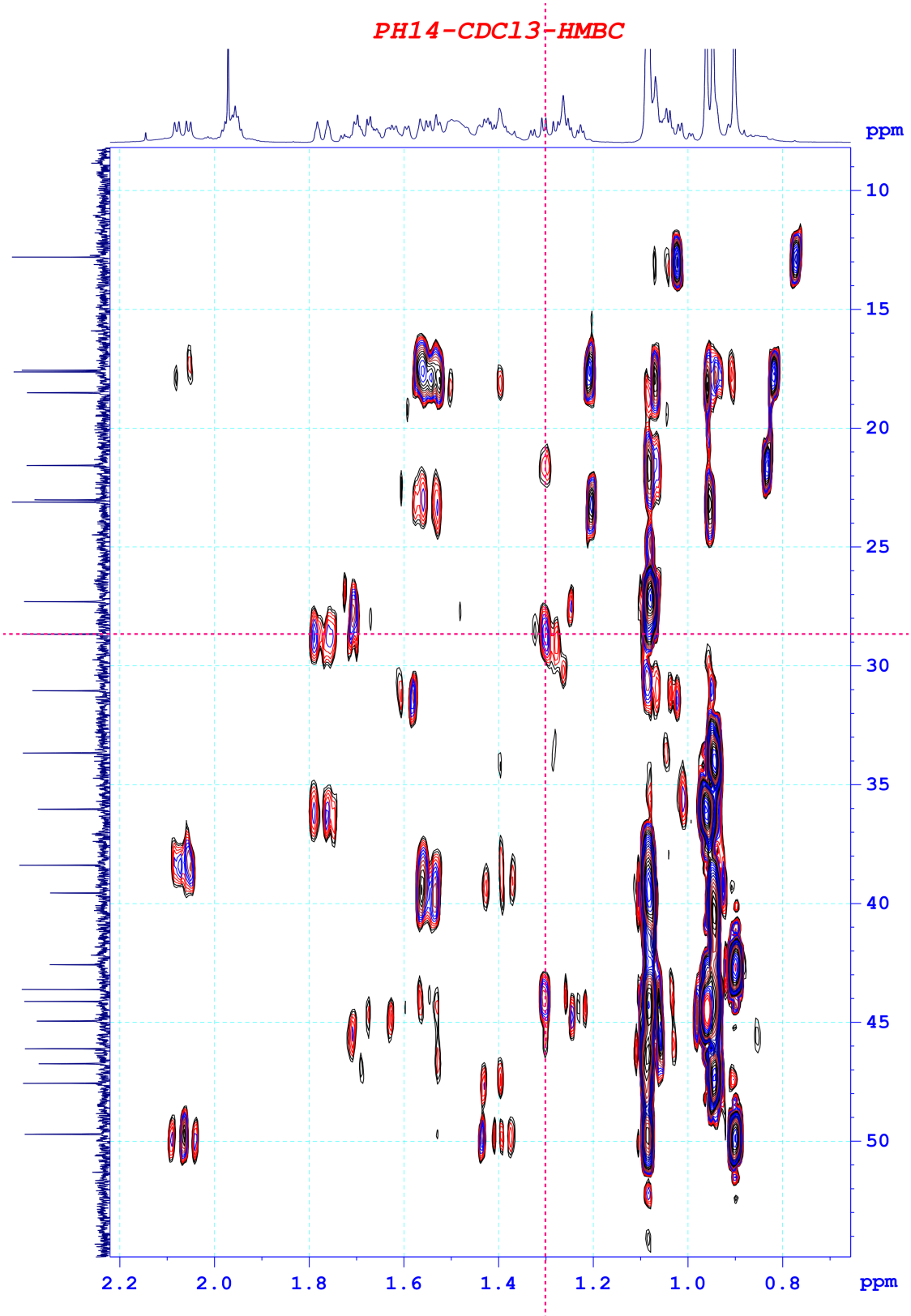
Phổ HMBC của hợp chất PH14



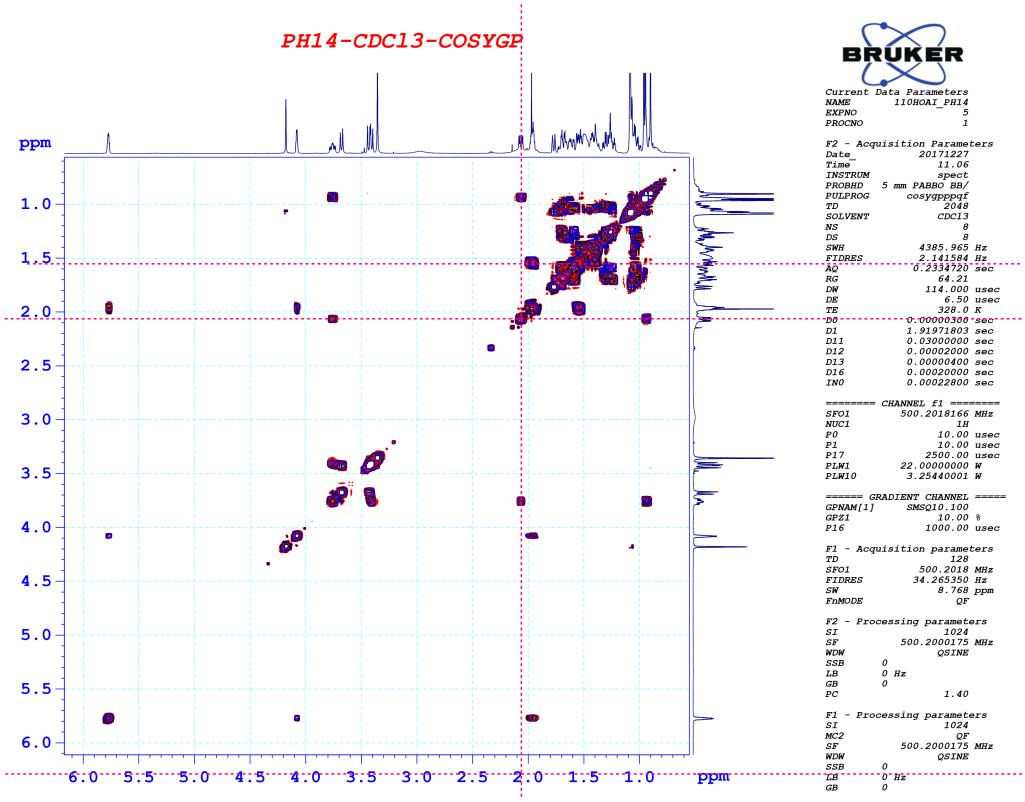
Phổ HMBC của hợp chất PH14



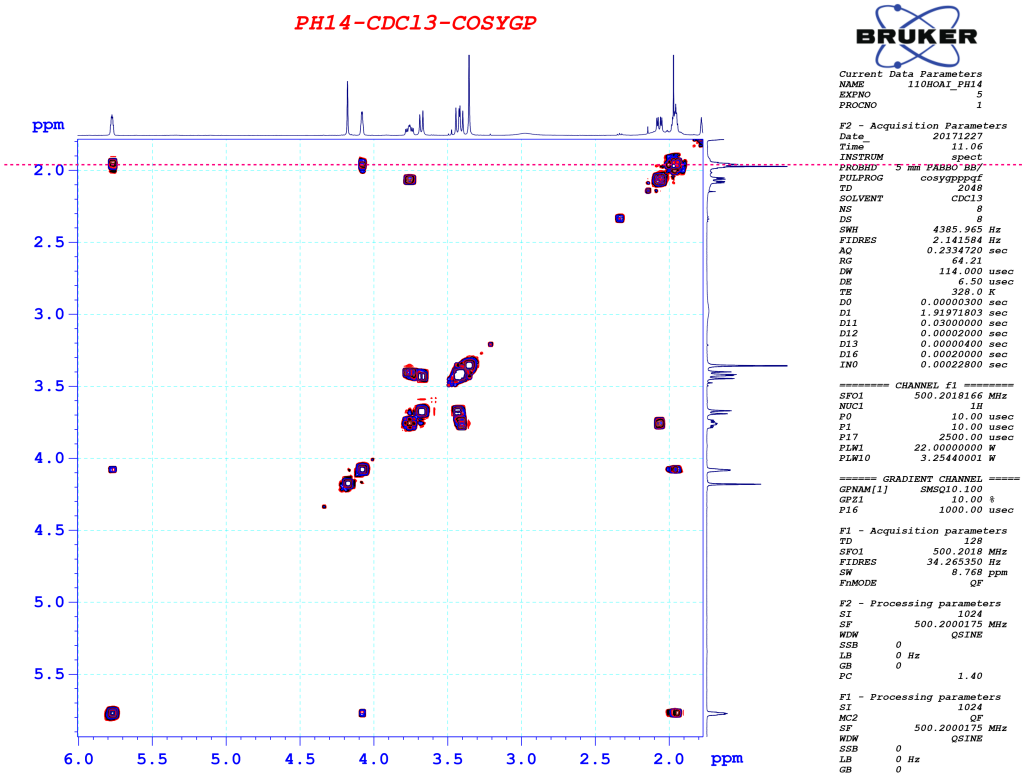
Phổ HMBC của hợp chất PH14



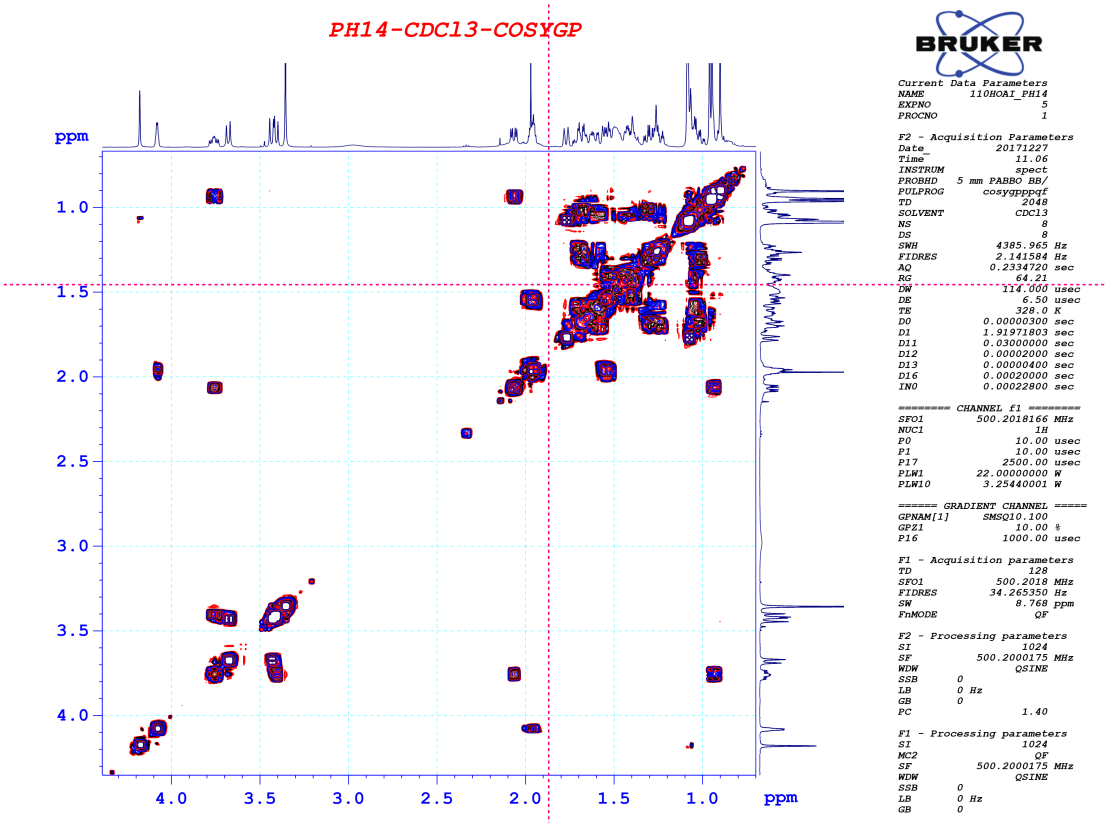
Phổ HMBC của hợp chất PH14



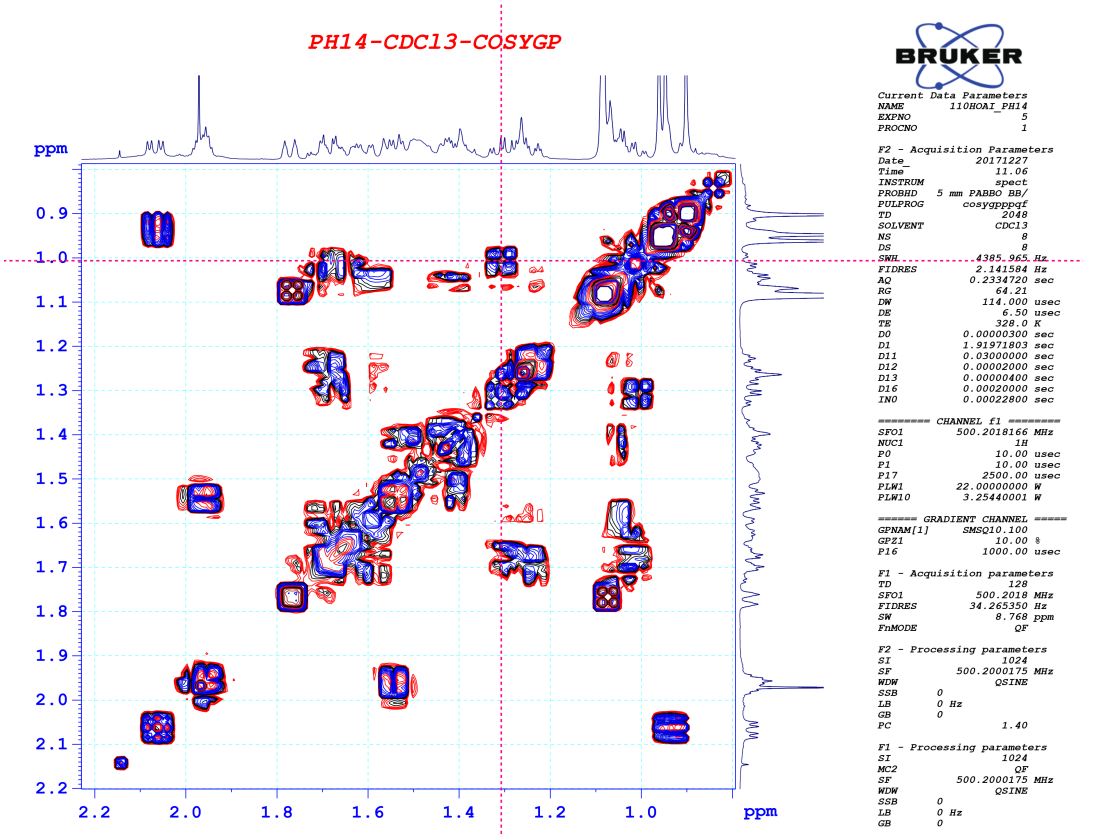
Phổ COSY của hợp chất PH14



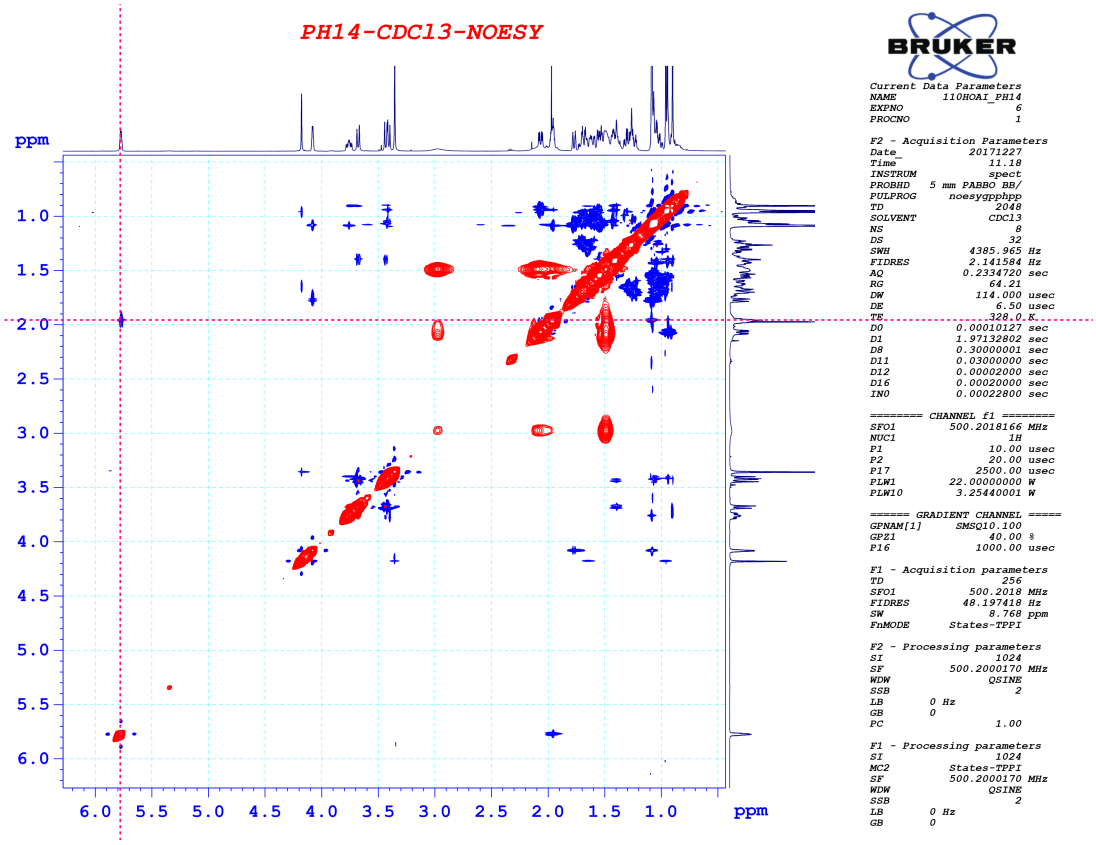
Phổ COSY của hợp chất PH14



Phổ COSY của hợp chất PH14

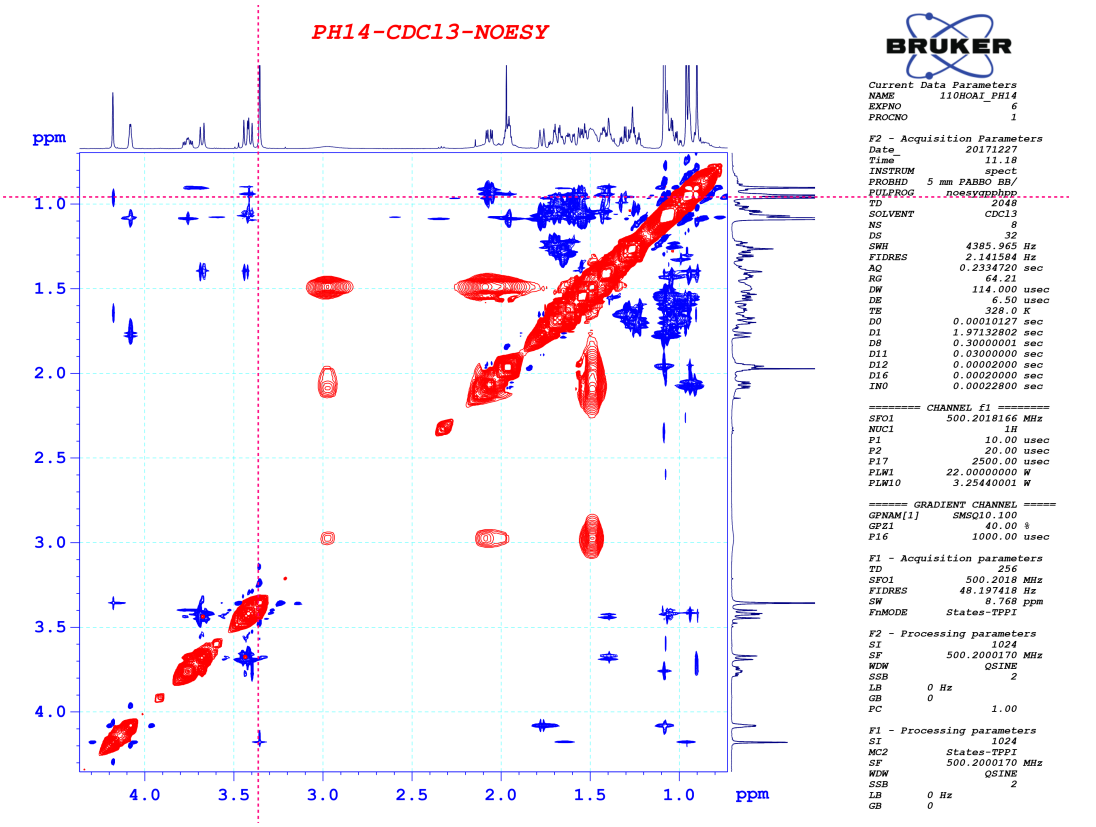


Phổ COSY của hợp chất PH14



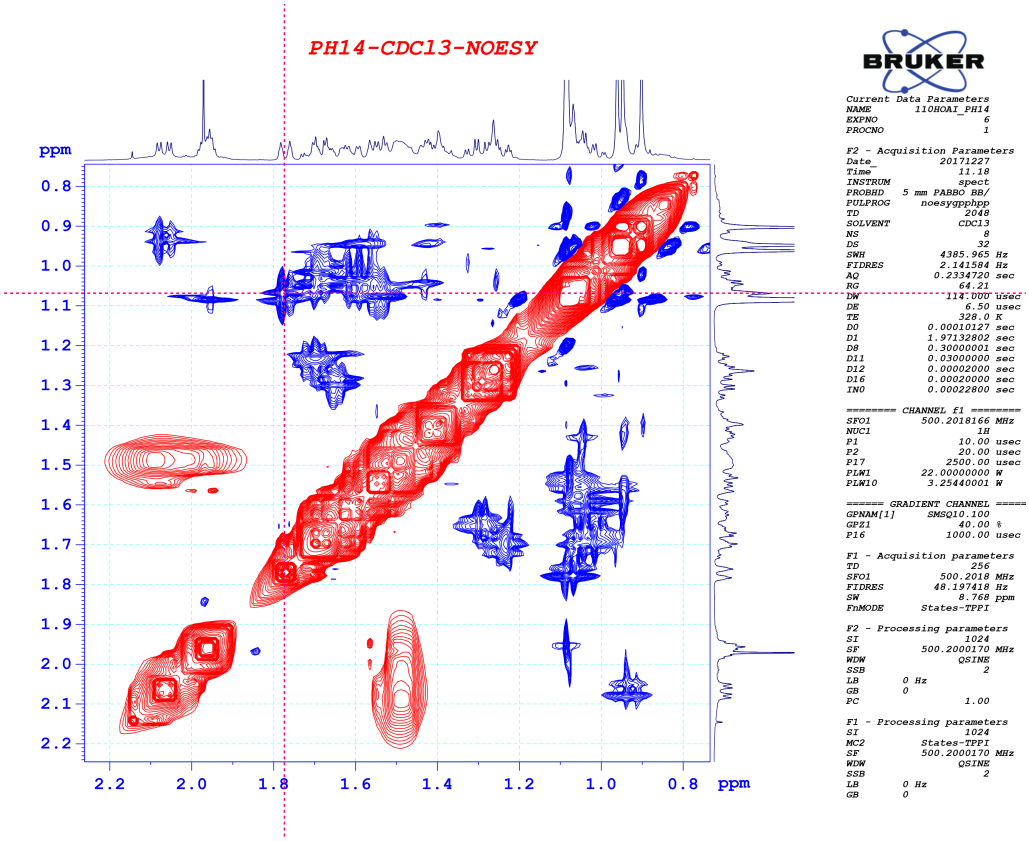

```
Current Data Parameters
NAME          110HOAI_PH14
EXPNO                    6
PROCNO                   1

F2 - Acquisition Parameters
Date_               20171227
Time                   11.18
INSTRUM                spect
PROBHD    5 mm PABBO BB/
PULPROG      noesygpphpp
TD                     2048
SOLVENT               CDCl3
NS                        8
DS                       32
SWH                4385.965 Hz
FIDRES             2.141584 Hz
AQ               0.2334720 sec
RG                    64.21
DW                  114.000 usec
DE                     6.50 usec
TE                    328.0 K
D0               0.00010127 sec
D1               1.97132802 sec
D8               0.30000001 sec
D11              0.03000000 sec
D12              0.00002000 sec
D16              0.00020000 sec
IN0              0.00022800 sec

======== CHANNEL f1 ========
SFO1            500.2018166 MHz
NUC1                      1H
P1                     10.00 usec
P2                     20.00 usec
P17                 2500.00 usec
PLW1           22.00000000 W
PLW10           3.25440001 W

====== GRADIENT CHANNEL =====
GPNAM[1]       SMSQ10.100
GPZ1                  40.00 %
P16                 1000.00 usec

F1 - Acquisition parameters
TD                      256
SFO1              500.2018 MHz
FIDRES           48.197418 Hz
SW                    8.768 ppm
FnMODE        States-TPPI

F2 - Processing parameters
SI                     1024
SF             500.2000170 MHz
WDW                    QSINE
SSB                        2
LB          0 Hz
GB          0
PC                     1.00

F1 - Processing parameters
SI                     1024
MC2           States-TPPI
SF             500.2000170 MHz
WDW                    QSINE
SSB                        2
LB          0 Hz
GB          0
```

Phổ NOESY của hợp chất PH14

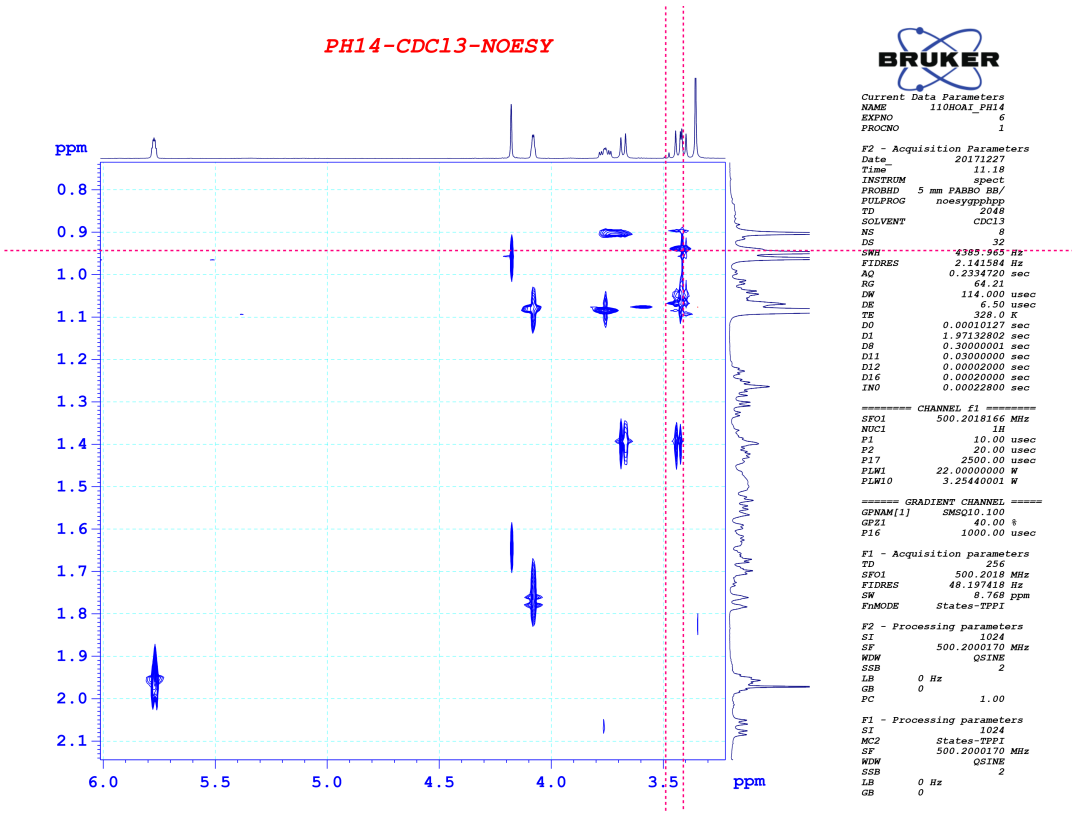



```
Current Data Parameters
NAME          110HOAI_PH14
EXPNO                    6
PROCNO                   1

F2 - Acquisition Parameters
Date_               20171227
Time                   11.18
INSTRUM                spect
PROBHD    5 mm PABBO BB/
PULPROG      noesygpphpp
TD                     2048
SOLVENT               CDCl3
NS                        8
DS                       32
SWH                4385.965 Hz
FIDRES             2.141584 Hz
AQ               0.2334720 sec
RG                    64.21
DW                  114.000 usec
DE                     6.50 usec
TE                    328.0 K
D0               0.00010127 sec
D1               1.97132802 sec
D8               0.30000001 sec
D11              0.03000000 sec
D12              0.00002000 sec
D16              0.00020000 sec
IN0              0.00022800 sec

======== CHANNEL f1 ========
SFO1            500.2018166 MHz
NUC1                      1H
P1                     10.00 usec
P2                     20.00 usec
P17                 2500.00 usec
PLW1           22.00000000 W
PLW10           3.25440001 W

====== GRADIENT CHANNEL =====
GPNAM[1]       SMSQ10.100
GPZ1                  40.00 %
P16                 1000.00 usec

F1 - Acquisition parameters
TD                      256
SFO1              500.2018 MHz
FIDRES           48.197418 Hz
SW                    8.768 ppm
FnMODE        States-TPPI

F2 - Processing parameters
SI                     1024
SF             500.2000170 MHz
WDW                    QSINE
SSB                        2
LB          0 Hz
GB          0
PC                     1.00

F1 - Processing parameters
SI                     1024
MC2           States-TPPI
SF             500.2000170 MHz
WDW                    QSINE
SSB                        2
LB          0 Hz
GB          0
```

Phổ NOESY của hợp chất PH14



Phổ NOESY của hợp chất PH14

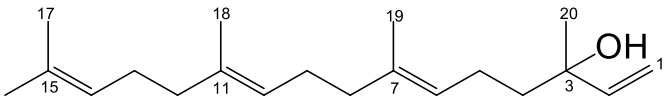


Phổ NOESY của hợp chất PH14

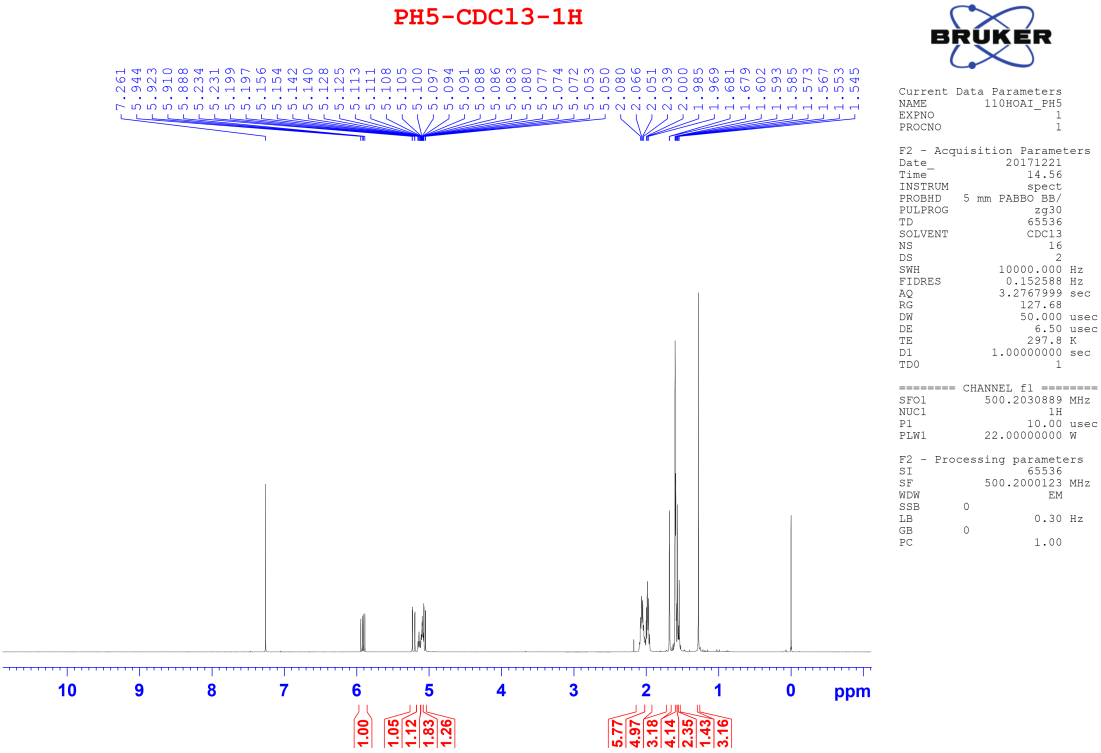
Phụ lục 3.10. Phổ của hợp chất PH5
(Geranyllinalool)

CTPT: $C_{20}H_{34}O$

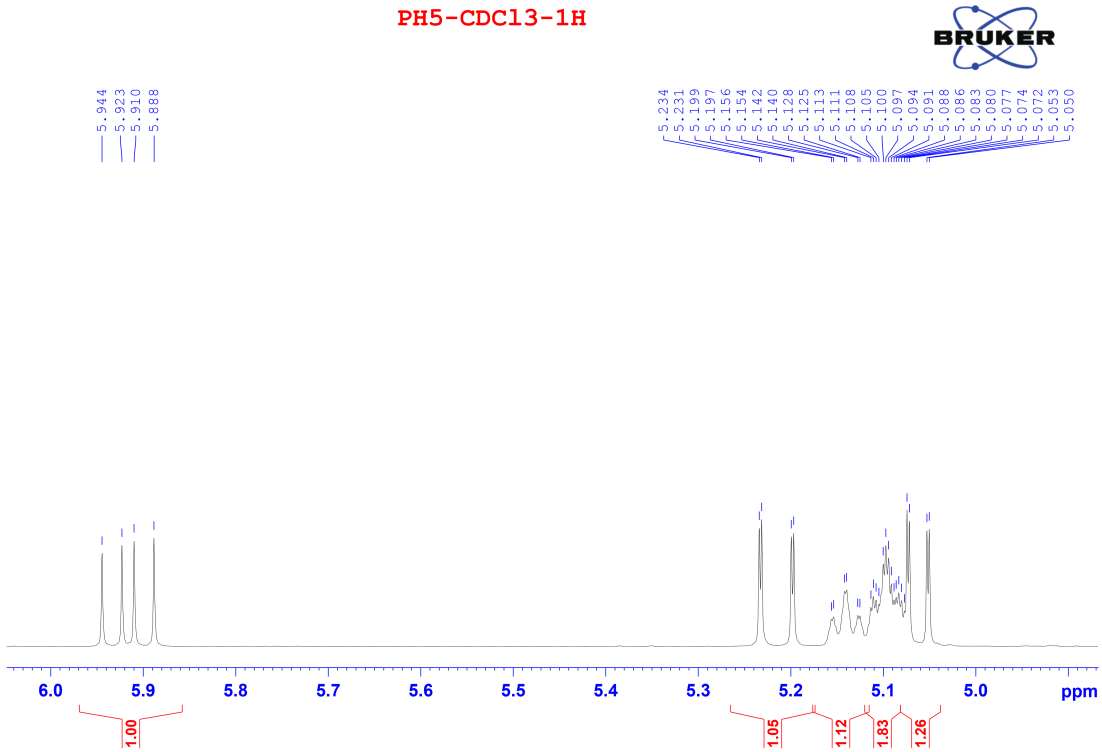
KLPT: 290,2610



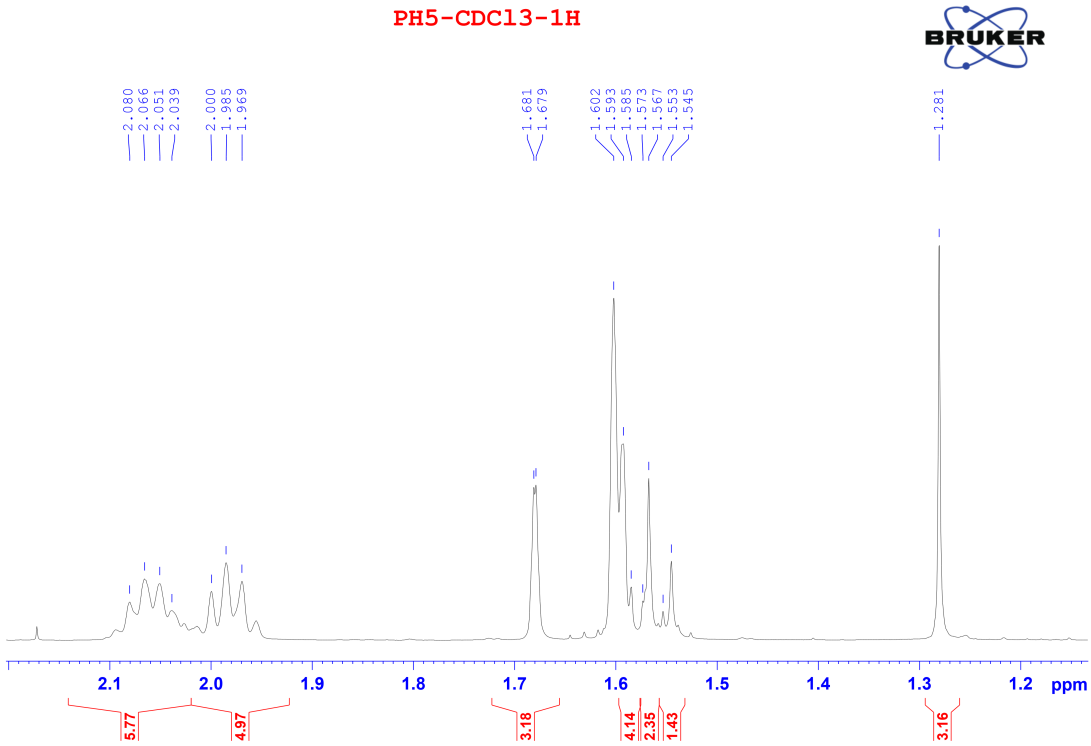
- Phổ ^{1}H-NMR
- Phổ ^{13}C-NMR
- Phổ HSQC



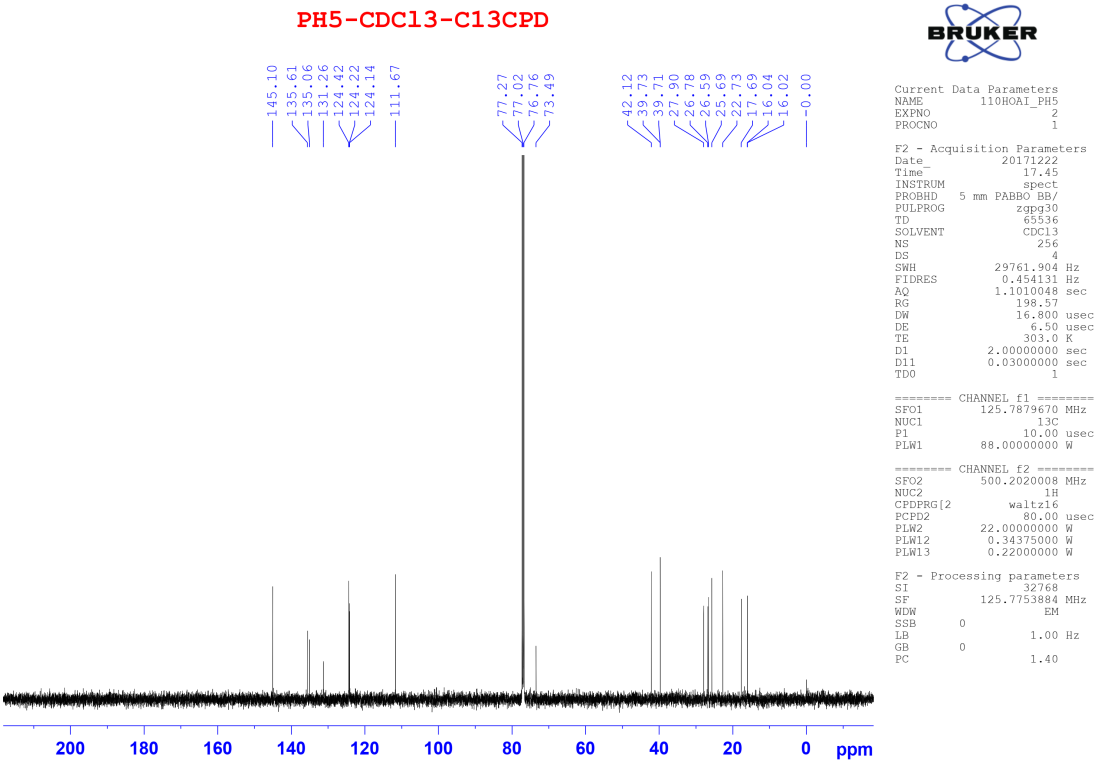
Phổ ^{1}H-NMR của hợp chất PH5



Phổ ^{1}H-NMR của hợp chất PH5

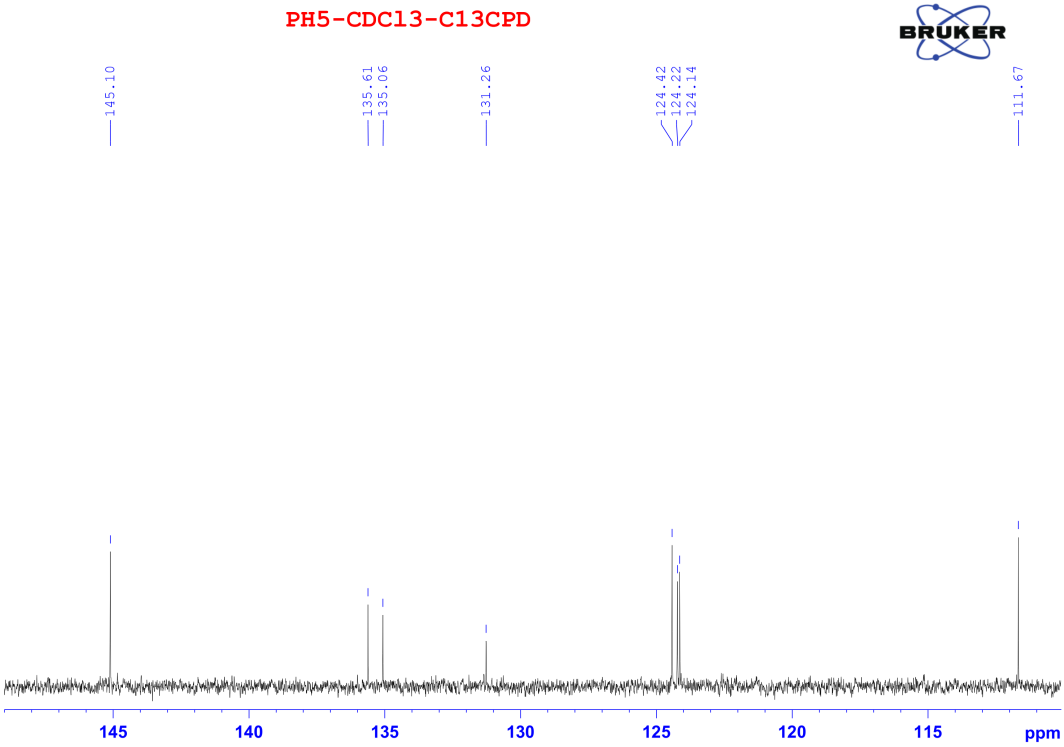


Phổ ^{1}H-NMR của hợp chất PH5

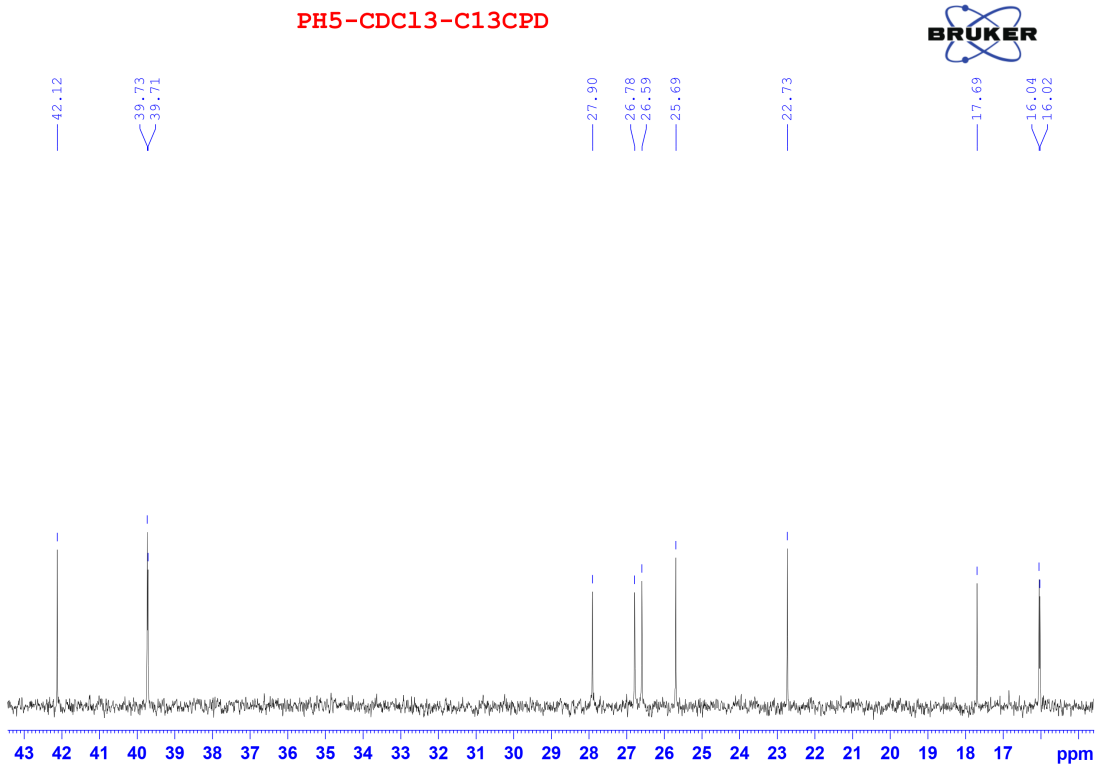



```
Current Data Parameters
NAME          110HOAI_PH5
EXPNO                   2
PROCNO                  1

F2 - Acquisition Parameters
Date_            20171222
Time                17.45
INSTRUM             spect
PROBHD    5 mm PABBO BB/
PULPROG           zgpg30
TD                 65536
SOLVENT            CDCl3
NS                   256
DS                     4
SWH            29761.904 Hz
FIDRES         0.454131 Hz
AQ            1.1010048 sec
RG               198.57
DW               16.800 usec
DE                 6.50 usec
TE                303.0 K
D1           2.00000000 sec
D11          0.03000000 sec
TD0                    1

======== CHANNEL f1 ========
SFO1         125.7879670 MHz
NUC1                  13C
P1                  10.00 usec
PLW1         88.00000000 W

======== CHANNEL f2 ========
SFO2         500.2020008 MHz
NUC2                   1H
CPDPRG[2          waltz16
PCPD2               80.00 usec
PLW2         22.00000000 W
PLW12         0.34375000 W
PLW13         0.22000000 W

F2 - Processing parameters
SI                  32768
SF           125.7753884 MHz
WDW                    EM
SSB       0
LB                   1.00 Hz
GB        0
PC                   1.40
```

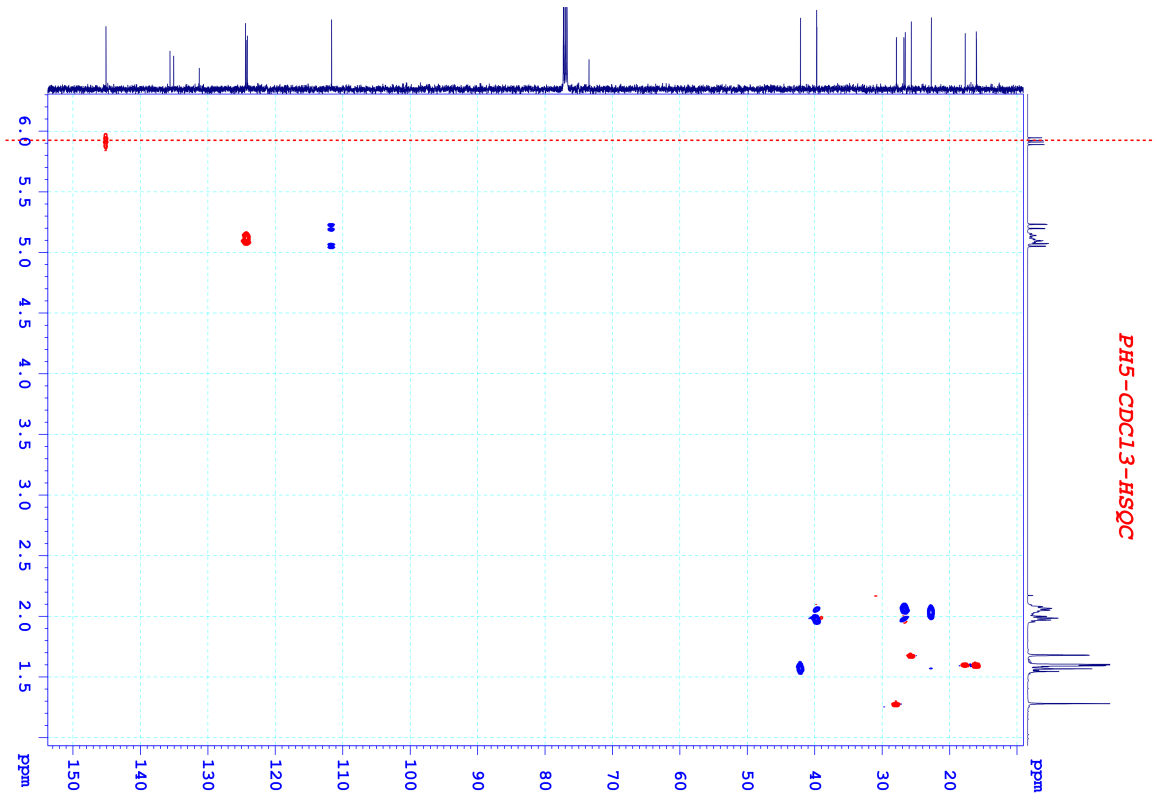
Phổ ^{13}C-NMR của hợp chất PH5



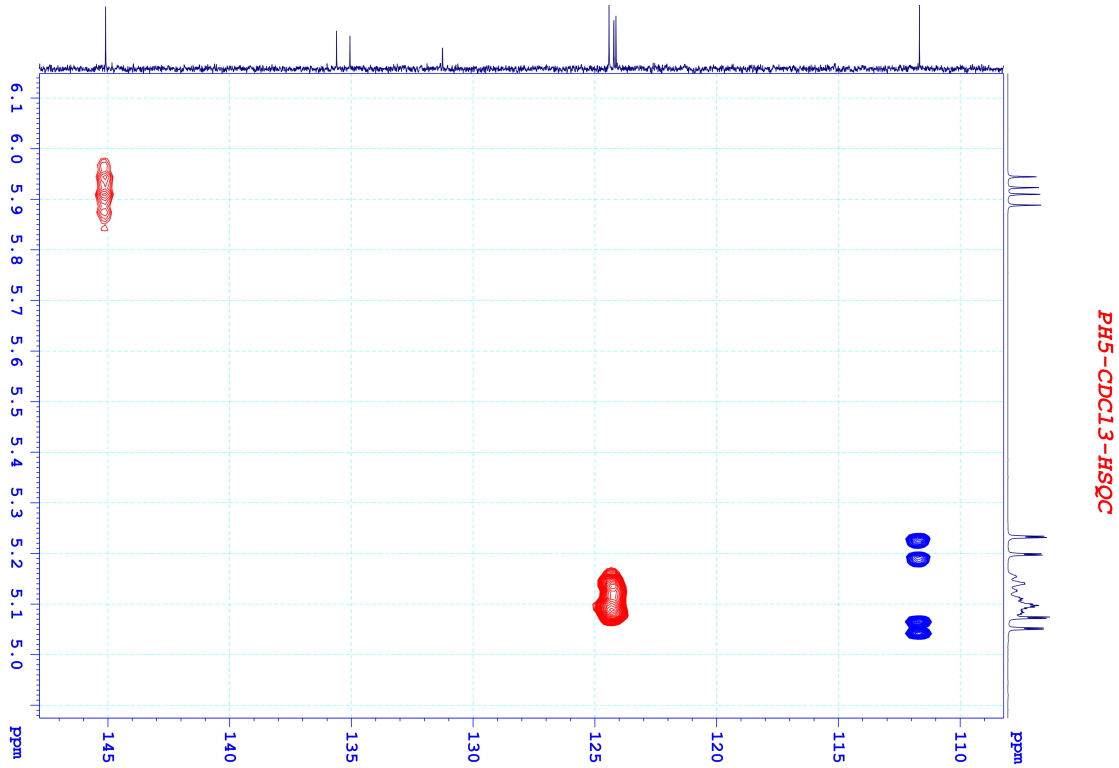
Phổ ^{13}C-NMR của hợp chất PH5



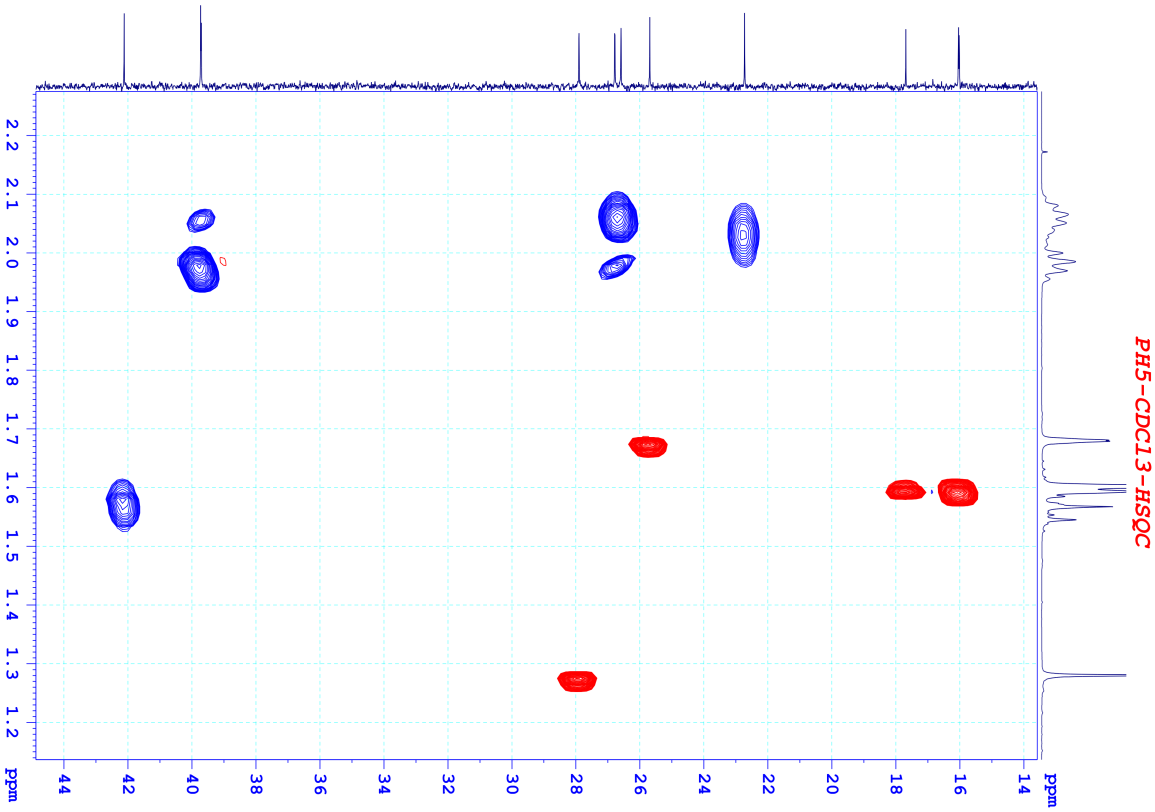
Phổ ^{13}C-NMR của hợp chất PH5



Phổ HSQC của hợp chất PH5



Phổ HSQC của hợp chất PH5



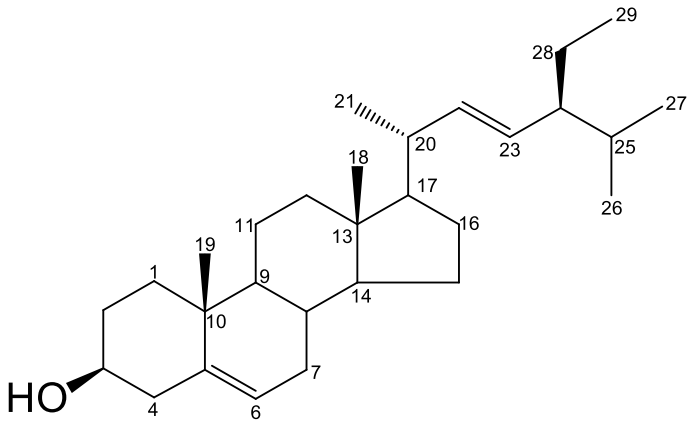
Phổ HSQC của hợp chất PH5

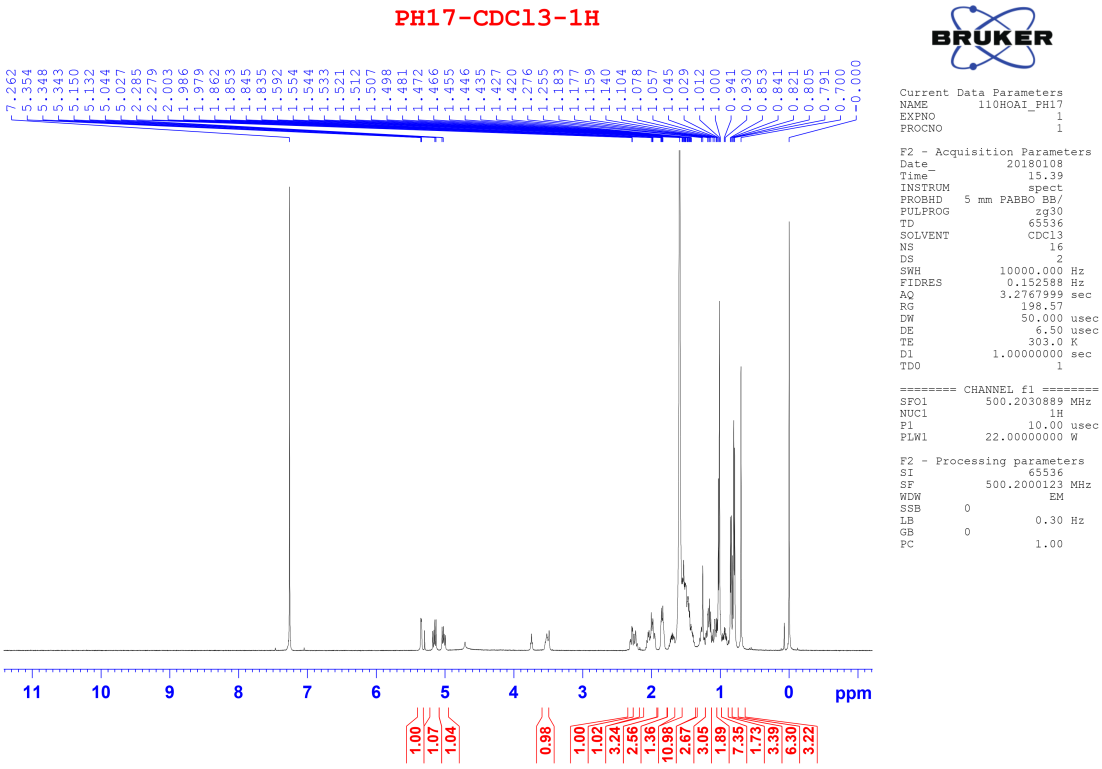
Phụ lục 3.11. Phổ của hợp chất PH17 (Stigmasterol)

CTPT: $C_{29}H_{48}O$

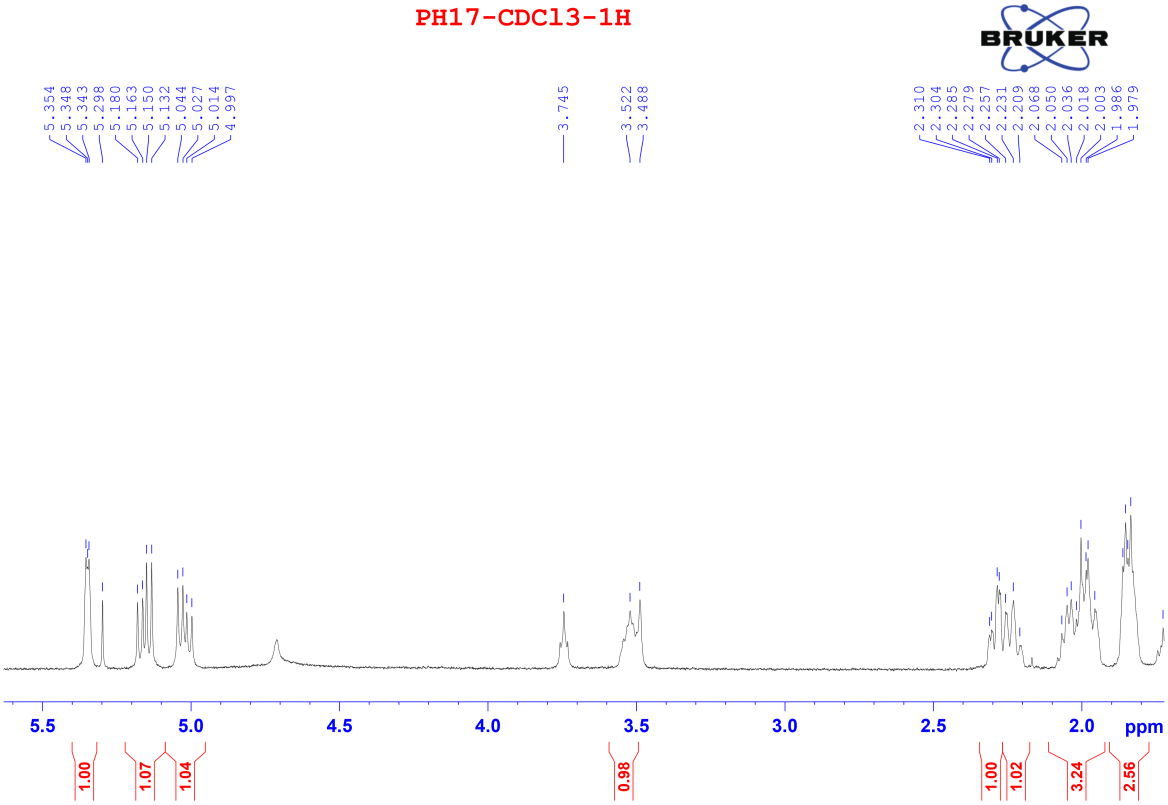
KLPT: 412,7020

- Phổ ^{1}H-NMR
- Phổ ^{13}C-NMR

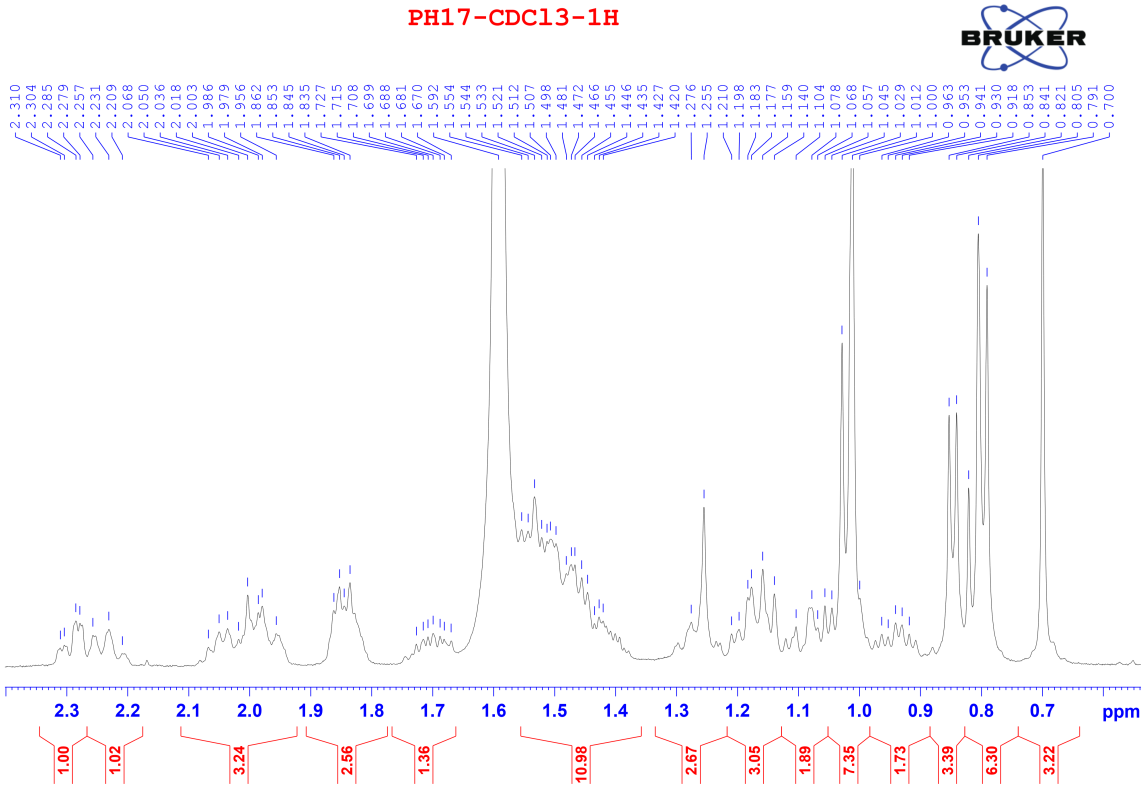




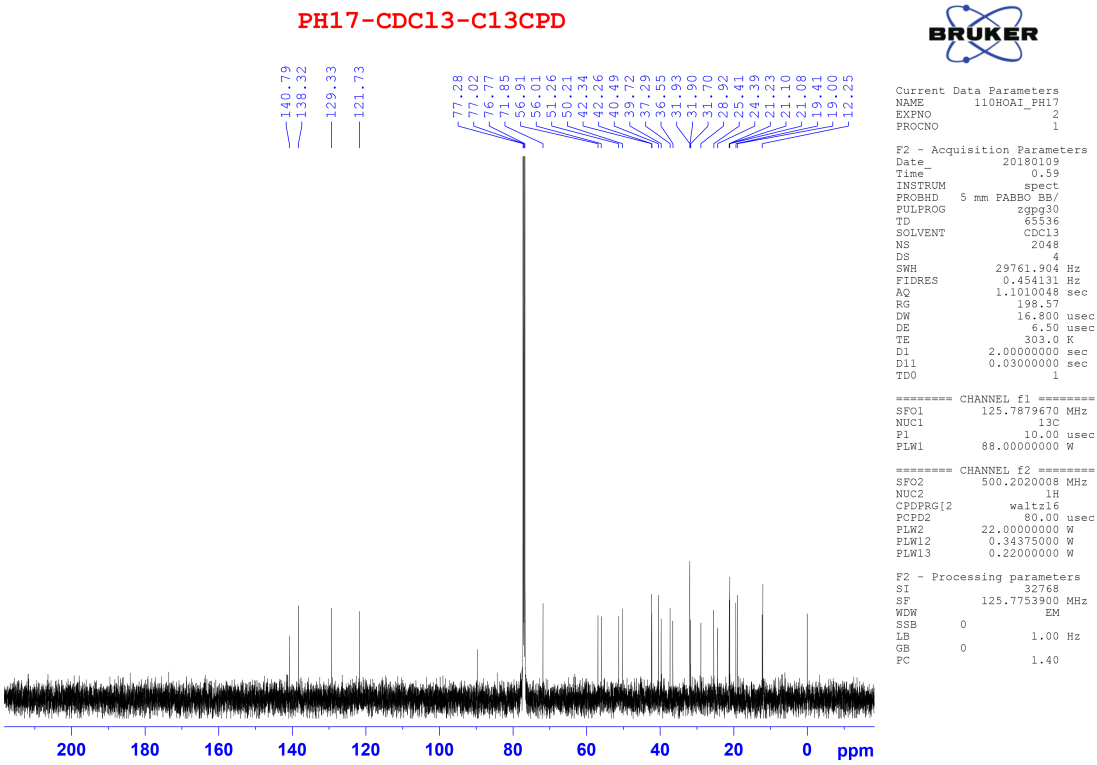
Phổ ^{1}H-NMR của hợp chất PH17



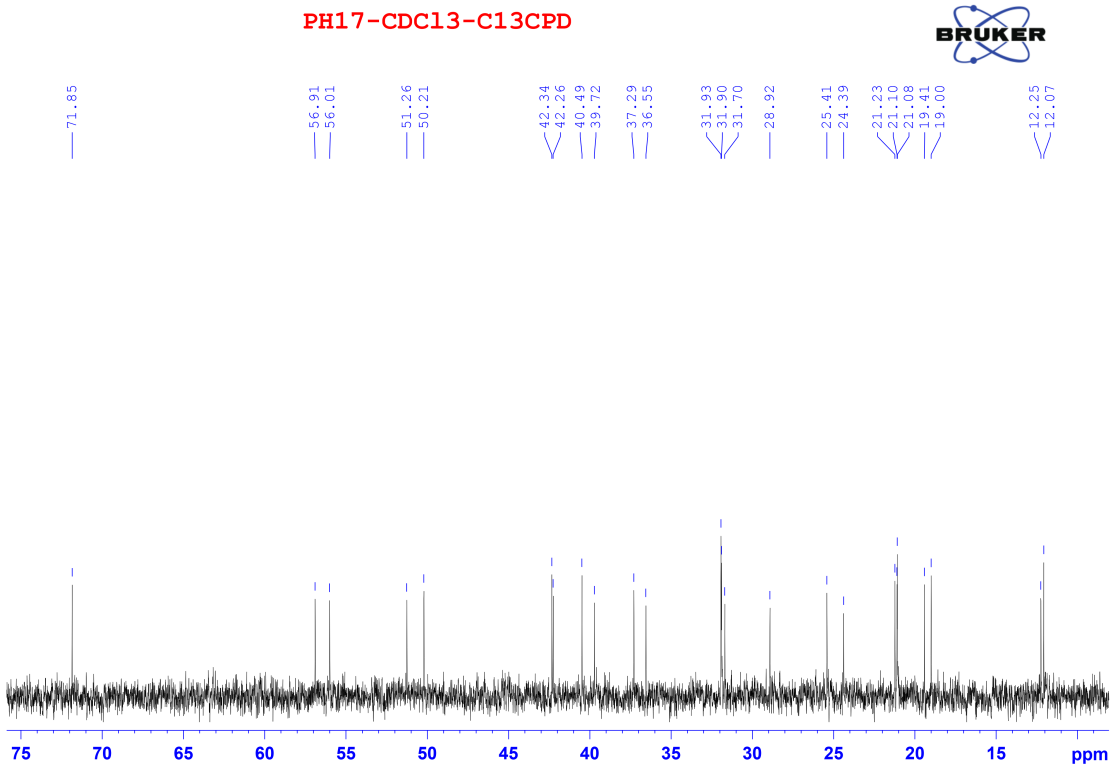
Phổ ^{1}H-NMR của hợp chất PH17



Phổ ^{1}H-NMR của hợp chất PH17



Phổ ^{13}C-NMR của hợp chất PH17



Phổ ^{13}C-NMR của hợp chất PH17