BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ

QUÁCH THỊ THANH VÂN

NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN HÓA HỌC, HOẠT TÍNH GÂY ĐỘC TẾ BÀO VÀ KHÁNG VIÊM CỦA HAI LOÀI *Barringtonia acutangula* (CHIẾC ĐỎ) VÀ *Barringtonia racemosa* (CHIẾC CHÙM) THUỘC CHI *Barringtonia* HỌ Lecythidaceae (HỌ LỘC VỪNG)

LUẬN ÁN TIẾN SĨ HÓA HỌC

Hà Nội – 2023

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ

QUÁCH THỊ THANH VÂN

NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN HÓA HỌC, HOẠT TÍNH GÂY ĐỘC TẾ BÀO VÀ KHÁNG VIÊM CỦA HAI LOÀI *Barringtonia acutangula* (CHIẾC ĐỎ) VÀ *Barringtonia racemosa* (CHIẾC CHÙM) THUỘC CHI *Barringtonia* HỌ Lecythidaceae (HỌ LỘC VỪNG)

Chuyên ngành: **Hóa hữu cơ**

Mã số: **9.44.01.14**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ HÓA HỌC

Hướng dẫn khoa học 1: GS.VS. Châu Văn Minh

Hướng dẫn khoa học 2: TS. Nguyễn Xuân Cường

Hà Nội - 2023

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan:

Đây là công trình nghiên cứu của riêng tôi dưới sự hướng dẫn của GS.VS. Châu Văn Minh và TS. Nguyễn Xuân Cường.

Các số liệu và kết quả được nêu trong luận án là hoàn toàn trung thực và chưa được ai công bố trong bất kì công trình nào khác.

Hà Nội, ngày…..tháng….năm 2023

Tác giả luận án

Quách Thị Thanh Vân

LỜI CẢM ƠN

Luận án này được hoàn thành tại Viện Hóa sinh biển, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam với sự tài trợ kinh phí từ Đề tài nghiên cứu cơ bản trong khoa học tự nhiên "Nghiên cứu thành phần hóa học, hoạt tính gây độc tế bào và kháng viêm các loài *Barringtonia acutangula, B. pauciflora* và *B. racemosa* ở Việt Nam" - mã số 104.01-2015.28.

Với lòng biết ơn sâu sắc, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn tới GS. VS. Châu Văn Minh, TS. Nguyễn Xuân Cường là những người thầy đã tận tình hướng dẫn, hết lòng chỉ bảo và tạo mọi điều kiện giúp đỡ tôi trong thời gian làm luận án.

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn tới lãnh đạo Viện Hóa sinh đã luôn giúp đỡ, ủng hộ và tạo mọi điều kiện tốt nhất cũng như những đóng góp về chuyên môn cho tôi trong suốt quá trình thực hiện và bảo vệ luận án.

Tôi cũng xin chân thành cảm ơn TS. Nguyễn Hoài Nam và tập thể cán bộ phòng Dược liệu biển, Viện Hóa sinh biển đã giúp đỡ tôi nhiệt tình trong suốt thời gian học tập.

Tôi xin trân trọng cảm ơn Ban Giám đốc cùng các cán bộ phòng Đào tạo Học viện Khoa học Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã giúp đỡ tôi trong quá trình học tập và hoàn thành luận án.

Tôi xin chân thành cảm ơn TS. Nguyễn Thế Cường, Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật đã giúp đỡ tôi thu thập mẫu và giám định loài, tên khoa học.

Tôi xin chân thành cảm ơn Đảng ủy, Ban Giám hiệu Trường Đại học Công nghiệp Việt Trì, lãnh đạo Khoa Công nghệ Hóa học-Môi trường và các đồng nghiệp trong Khoa Công nghệ Hóa học-Môi trường đã tạo mọi điều kiện tốt nhất cho tôi trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu.

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn chân thành tới toàn thể gia đình, bố mẹ, anh chị em hai bên gia đình, bạn bè và những người thân đã luôn luôn quan tâm, khích lệ, động viên, giúp đỡ và tạo mọi điều kiện cho tôi hoàn thành quá trình học tập và nghiên cứu này.

Xin trân trọng cảm ơn!

Tác giả luận án

Quách Thị Thanh Vân

MỤC LỤC

MỤC LỤC i
DANH MỤC HÌNH III
DANH MỤC BẢNG VII
DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT VIII
ĐẶT VẤN ĐỀ 1
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU VỀ VẤN ĐỀ NGHIÊN CỨU 3
1.1. Khái quát chung về chi *Barringtonia* ở việt nam 3
1.1.1. Đặc điểm phân loại học 3
1.1.2. Bộ phận dùng và công dụng trong y học cổ truyền 7
1.2. Nghiên cứu về thành phần hóa học của chi *Barringtonia* 8
1.2.1. Các nghiên cứu ở trong nước 8
1.2.2. Các nghiên cứu trên thế giới 9
1.3. Các nghiên cứu về hoạt tính sinh học chi *Barringtonia* 18
1.3.1. Các nghiên cứu theo hướng gây độc tế bào 18
1.3.2. Các nghiên cứu theo hướng kháng viêm 21
1.3.3. Các nghiên cứu theo hướng khác 22
CHƯƠNG 2: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU 27
2.1. Đối tượng nghiên cứu 27
2.1.1. Loài Chiếc đỏ - *B. acutangula* 27
2.1.2. Loài Chiếc chùm - *B. racemosa* 27
2.2. Phương pháp nghiên cứu 28
2.2.1 Phương pháp phân lập các hợp chất 28
2.2.2. Phương pháp xác định cấu trúc hóa học các hợp chất 29
2.2.3. Phương pháp đánh giá hoạt tính sinh học 29
CHƯƠNG 3: THỰC NGHIỆM 33
3.1. Phân lập các hợp chất 33
3.1.1. Phân lập các hợp chất từ loài *B. acutangula* 33
3.1.2. Thông số vật lý và dữ kiện phổ của các hợp chất phân lập từ loài *B. acutangula* 36
3.1.3. Phân lập các hợp chất từ loài *B. racemosa* 38
3.1.4. Thông số vật lý và dữ kiện phổ của các hợp chất phân lập từ loài *B. racemosa* 43
CHƯƠNG 4: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN 45
4.1. Xác định cấu trúc các hợp chất phân lập được từ loài *B. acutangula* 45
4.1.1. Hợp chất BA1: barringoside A (chất mới) 45

4.1.2. Hợp chất BA2: barringoside B (chất mới) 51
4.1.3. Hợp chất BA3: barringoside C (chất mới) 57
4.1.4. Hợp chất BA4: Barringoside D (chất mới) 63
4.1.5. Hợp chất BA5: Barringoside E (chất mới).....67
4.1.6. Hợp chất BA6: Barringoside F (chất mới).....73
4.1.7. Hợp chất BA7: kaempferol 3-O-β-D-galactopyranoside.....77
4.1.8. Hợp chất BA8: quercetin-3-O-β-D-galactopyranoside.....79
4.1.9. Hợp chất BA9: quercetin 3-O-β-D-(6-p-hydroxybenzoyl)galactopyranoside) 80
4.1.10. Hợp chất BA10: quercetin 3-O-α-L-arabinopyranosyl-(1→2)-β-D-galactopyranoside.....82
4.2. Xác định cấu trúc các hợp chất từ loài *b. racemosa* 84
4.2.1. Hợp chất BR1: barringoside G (chất mới) 84
4.2.2. Hợp chất BR2: barringoside H (chất mới) 91
4.2.3. Hợp chất BR3: barringoside I (chất mới).....96
4.2.4. Hợp chất BR4: niga-ichigoside F1 103
4.2.5. Hợp chất BR7: Arjunic acid.....105
4.2.6. Hợp chất BR5: Rosamultin 107
4.2.7. Hợp chất BR6: 23-hydroxytormentic acid.....109
4.2.8. Hợp chất BR8: Maslinic acid.....111
4.2.9. Cấu trúc hóa học các hợp chất đã phân lập từ hai loài nghiên cứu.....112
4.3. Kết quả thử hoạt tính sinh học của các hợp chất phân lập được từ hai loài nghiên cứu 115
4.3.1. Hoạt tính ức chế sản sinh NO định hướng kháng viêm 115
4.3.2. Hoạt tính gây độc tế bào.....117
TÍNH MỚI CỦA LUẬN ÁN 120
KẾT LUẬN 121
KIẾN NGHỊ.....122
DANH MỤC CÔNG TRÌNH ĐÃ ĐĂNG TẢI LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN.....123
TÀI LIỆU THAM KHẢO 124
PHỤ LỤC…….....PL-1

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1. Cấu trúc ba flavan-3-ol từ *B. acutangula* ở Việt Nam 8
Hình 1.2. Các saponin phân lập được từ *B. acutangula* và *B. asiatica* 10
Hình 1.3. Các hợp chất flavonoid phân lập được từ chi *Barringtonia* 11
Hình 1.4. Cấu trúc hợp chất R1-barrigenol và R2-barringenol 12
Hình 1.5. Cấu trúc hóa học của **34-35-36** 12
Hình 1.6. Cấu trúc triterpenoids mới phân lập được từ *B. racemosa* 13
Hình 1.7. Cấu trúc triterpenoids mới phân lập được từ *B. asiatica* 14
Hình 1.8. Cấu trúc triterpenoids phân lập được từ *B. racemosa* 15
Hình 1.9. Cấu trúc 2 hợp chất diterpenoid và hợp chất ceramid mới từ *B. racemosa* 15
Hình 1.10. Các hợp chất ellagitannin phân lập được từ *B. racemosa* 17
Hình 2.1. Ảnh loài *B. acutangula (L.)* Gaertn. 27
Hình 2.2. Ảnh loài *B. racemosa (L.)* Spreng 27
Hình 3.1. Sơ đồ chiết phân đoạn mẫu loài *B. acutangula* 33
Hình 3.2. Sơ đồ phân lập các hợp chất từ phân đoạn nước W4 mẫu loài *B. acutangula* 35
Hình 3.3. Sơ đồ phân lập các hợp chất từ cặn etyl mẫu loài *B.acutangula* 36
Hình 3.4. Sơ đồ chiết phân đoạn mẫu loài *B. racemosa* 39
Hình 3.5. Sơ đồ phân lập các hợp chất từ dịch nước mẫu loài *B. racemosa* 41
Hình 3.6. Sơ đồ phân lập các hợp chất từ cặn ethyl acetate mẫu loài *B. racemosa* 43
Hình 4.1.1.a. Phổ HR-ESI-MS của **BA1** 45
Hình 4.1.1.b. Cấu trúc hóa học của **BA1** 45
Hình 4.1.1.c. Phổ ^{1}H-NMR của **BA1** 46
Hình 4.1.1.d. Phổ ^{13}C-NMR của **BA1** 46
Hình 4.1.1.e. Phổ HSQC của **BA1** 47
Hình 4.1.1.f. Phổ HMBC của **BA1** 47
Hình 4.1.1.g. Phổ COSY của **BA1** 49
Hình 4.1.1.h. Các tương tác HMBC và COSY chính của **BA1** 50
Hình 4.1.2.a. Cấu trúc hóa học của của **BA2** 51
Hình 4.1.2.b. Phổ HR-ESI-MS của **BA2** 52
Hình 4.1.2.c. Phổ ^{1}H-NMR của **BA2** 52
Hình 4.1.2.d. Phổ ^{13}C-NMR của **BA2** 53

Hình 4.1.2.e. Phổ HSQC của **BA2** 55
Hình 4.1.2.g. Phổ COSY của **BA2** 56
Hình 4.1.2.h. Các tương tác HMBC và COSY chính của **BA2** 57
Hình 4.1.3.a. Cấu trúc hóa học của **BA3** 58
Hình 4.1.3.b. Phổ HR-ESI-MS của **BA3** 58
Hình 4.1.3.c. Phổ ^{1}H-NMR của **BA3** 58
Hình 4.1.3.d. Phổ ^{13}C-NMR của **BA3** 60
Hình 4.1.3.e. Phổ HSQC của **BA3** 61
Hình 4.1.3.f. Phổ HMBC của **BA3** 61
Hình 4.1.3.g. Một số tương tác HMBC chính của **BA3** 62
Hình 4.1.4.a. Cấu trúc hóa học của **BA4** 63
Hình 4.1.4.b. Phổ HR-ESI-MS của **BA4** 63
Hình 4.1.4.c. Phổ ^{1}H-NMR của **BA4** 64
Hình 4.1.4.d. Phổ ^{13}C-NMR của **BA4** 64
Hình 4.1.4.e. Phổ HSQC của **BA4** 66
Hình 4.1.4.f. Phổ HMBC của **BA4** 67
Hình 4.1.5.a. Phổ HR-ESI-MS của **BA5** 68
Hình 4.1.5.b. Cấu trúc hóa học của **BA5** 68
Hình 4.1.5.c. Phổ ^{1}H-NMR của **BA5** 68
Hình 4.1.5.e. Phổ HSQC của **BA5** 69
Hình 4.1.5.f. Phổ HMBC của **BA5** 70
Hình 4.1.5.g. Phổ COSY của **BA5** 72
Hình 4.1.5.h. Các tương tác HMBC và COSY chính của **BA5** 72
Hình 4.1.6.a. Cấu trúc hóa học của **BA6** 73
Hình 4.1.6.b. Phổ HR-ESI-MS của **BA6** 73
Hình 4.1.6.c. Phổ ^{1}H-NMR của **BA6** 74
Hình 4.1.6.d. Phổ ^{13}C-NMR của **BA6** 74
Hình 4.1.6.e. Phổ HSQC của **BA6** 76
Hình 4.1.6.f. Phổ HMBC của **BA6** 77
Hình 4.1.6.g. Một số tương tác HMBC chính của **BA6** 77
Hình 4.1.7. Cấu trúc hóa học và một số tương tác HMBC chính của **BA7** 78

Hình 4.1.8. Cấu trúc hóa học của **BA8**.....79
Hình 4.1.9. Cấu trúc hóa học và một số tương tác HMBC chính của **BA9**.....81
Hình 4.1.10. Cấu trúc hóa học và một số tương tác HMBC chính của **BA10**.....82
Hình 4.2.1.a. Cấu trúc hóa học của **BR1**.....84
Hình 4.2.1.b. Phổ HR-ESI-MS của **BR1**.....84
Hình 4.2.1.c. Phổ ^{1}H-NMR của **BR1**.....85
Hình 4.2.1.d. Phổ ^{13}C-NMR của **BR1**.....85
Hình 4.2.1.e. Phổ HSQC của **BR1**.....86
Hình 4.2.1.f. Phổ HMBC của **BR1**.....86
Hình 4.2.1.g. Phổ COSY của **BR1**.....88
Hình 4.2.1.h. Phổ 1D TOCSY (CD_3OD,500MHz) của **BR1**.....89
Hình 4.2.1.i. Phổ 2D TOCSY (CD_3OD,500MHz) của **BR1**.....89
Hình 4.2.1.k. Các tương tác HMBC và COSY chính của **BR1**.....90
Hình 4.2.2.a. Cấu trúc hóa học của **BR2**.....91
Hình 4.2.2.b. Phổ HR-ESI-MS của **BR2**.....92
Hình 4.2.2.c. Phổ ^{1}H-NMR của **BR2**.....92
Hình 4.2.2.d. Phổ ^{13}C-NMR của **BR2**.....93
Hình 4.2.2.e. Phổ HSQC của **BR2**.....93
Hình 4.2.2.f. Phổ HMBC của **BR2**.....94
Hình 4.2.2.g. Phổ COSY của **BR2**.....94
Hình 4.2.3.a. Cấu trúc hóa học của **BR3**.....97
Hình 4.2.3.b. Phổ HR-ESI-MS của **BR3**.....97
Hình 4.2.3.c. Phổ ^{1}H-NMR của **BR3**.....98
Hình 4.2.3.d. Phổ ^{13}C-NMR của **BR3**.....98
Hình 4.2.3.f. Phổ HMBC của **BR3**.....99
Hình 4.2.3.g. Phổ COSY của **BR3**.....99
Hình 4.2.3.h. Phổ 1D TOCSY của **BR3**.....102
Hình 4.2.3.i. Phổ 2D TOCSY của **BR3**.....102
Hình 4.2.4.a. Cấu trúc hóa học của **BR4**.....103
Hình 4.2.4.b. Một số tương tác HMBC chính của **BR4**.....105
Hình 4.2.7. Cấu trúc hóa học của **BR7**.....106

Hình 4.2.5. Cấu trúc hóa học của **BR5**.....107
Hình 4.2.6. Cấu trúc hóa học của **BR6**.....109
Hình 4.2.8. Cấu trúc hóa học của **BR8**.....109
Hình 4.2.9.a. Cấu trúc hóa học của các hợp chất từ loài *B. acutangula* 113
Hình 4.2.9.b. Cấu trúc hóa học của các hợp chất từ loài *B. racemosa*.....114
Hình 4.3.1. Cấu trúc hóa học 2 hợp chất **BA8** và **BA9** 116
Hình 4.3.2. Cấu trúc hóa học 2 hợp chất **BR1** và **BR3** 117

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1. Các loài thuộc chi Lộc vừng ở Việt Nam 3
Bảng 1.2. Phương pháp định tính hợp chất trong cao chiết lá cây lộc vừng.....9
Bảng 4.1.1. Giá trị phổ NMR của BA1 và các chất so sánh 48
Bảng 4.1.2. Giá trị phổ NMR của BA2 và các chất so sánh 53
Bảng 4.1.4. Giá trị phổ NMR của BA4 và chất so sánh.....64
Bảng 4.1.5. Giá trị phổ NMR của BA5 và hợp chất so sánh.....70
Bảng 4.1.6. Giá trị phổ NMR của hợp chất BA6 và các chất so sánh.....75
Bảng 4.1.7. Giá trị phổ NMR của BA7 và hợp chất so sánh.....78
Bảng 4.1.8. Giá trị phổ NMR của BA8 và các chất so sánh 80
Bảng 4.1.9. Giá trị phổ NMR của BA9 và hợp chất so sánh.....81
Bảng 4.1.10. Giá trị phổ NMR của BA10 và chất so sánh.....83
Bảng 4.2.1. Giá trị phổ NMR của BR1và hợp chất so sánh.....87
Bảng 4.2.2. Giá trị phổ NMR của BR2 và hợp chất so sánh.....95
Bảng 4.2.3. Giá trị phổ NMR của BR3 và hợp chất so sánh.....100
Bảng 4.2.4. *Giá trị phổ NMR của BR4 và hợp chất thao khảo* 104
Bảng 4.2.7. Giá trị NMR của BR7 và hợp chất so sánh.....106
Bảng 4.2.5. Giá trị phổ NMR của BR5 và hợp chất so sánh.....107
Bảng 4.2.6. Giá trị phổ NMR của BR6 và hợp chất so sánh.....109
Bảng 4.2.8. Giá trị phổ NMR của BR8 và hợp chất so sánh…….. 109
Bảng 4.3.1. Kết quả đánh giá tác dụng ức chế sản sinh NO của 18 hợp chất 115
Bảng 4.3.2. Kết quả gây độc tế bào ung thư của các chất có hoạt tính 118

DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT

Kí hiệu	Tiếng Anh	Tiếng Việt
A-549	Human lung adenocarcinoma epithelial cell line	Dòng tế bào ung thư phổi
AAPH	2,2'-Azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride	2,2'-Azobis(2-amidinopropan) dihydroclorit
AO	antioxidant	Chống oxi hóa
Ba-ME	*Barringtonia* methanol extraction	Dịch chiết metanol *Barringtonia*
^{13}C-NMR	Carbon-13 nuclear magnetic resonance	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân cacbon 13
COX-2	Cyclooxygenase	Enzym Cyclooxygen
CTPT		Công thức phân tử
1D TOCSY	Total Correlation Spectroscopy	Phổ TOCSY (tương tác tổng thể) một chiều
2D TOCSY	Total Correlation Spectroscopy	Phổ TOCSY hai chiều
DM	diclomethane/methanol	diclometan/metanol
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium	Môi trường nuôi cấy tế bào
DMSO	Dimethyl sulfoxide	Dimetyl sulfoxit
DMW	diclomethane/methanol/water	diclometan/metanol/nước
DPPH	2,2-diphenyl-1-picryl -hydrazyl	
EtOAc	Ethyl acetate	Ethyl acetate
EtOH	ethanol	Etanol/ rượu etylic
Gal	galactose	Đường galacto
Glc	Glucose	Đường gluco
^{1}H-^{1}H COSY	^{1}H-^{1}H Chemical Shift Correlation Spectroscopy	Phổ tương tác proton-proton
^{1}H-NMR	Proton nuclear magnetic resonance	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân proton

HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation	Phổ tương tác dị hạt nhân qua nhiều liên kết
HMG	3-hydroxy-3-methylglutaryl	
HR- ESI - MS	High Resolution - Electron Sprayt Ionization -Mass Spectroscopy	Phổ khối phân giải cao ion hóa phun mù điện tử
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence	Phổ tương tác dị hạt nhân qua 1 liên kết
IC_{50}	inhibitory concentration	Nồng độ ức chế 50%
iNOS	Inducible nitric oxide synthase	Tổng hợp oxit nitric cảm ứng
LD_{50}	Lethal dose 50	Liều độc cấp tính
LNCaP	Lymph Node Carcinoma of the Prostate	Dòng tế bào ung thư tuyến tiền liệt
LPS	lipopolysaccharide	Lipopolysaccarit
MCF-7	Human breast adenocarcinoma cell line	Dòng tế bào ung thư vú người
MeOH	Methanol	Metanol/ rượu metylic
MPLC	Medium-Performance Liquid Chromatography	Sắc kí lỏng trung áp
NF- kB	Nuclear Factor-kappa B	Yếu Tố Nhân kappa B
ORAC	Oxygen Radical Absorbance Capacity	Khả năng hấp thụ gốc tự do oxi
PGE2	prostaglandin E2	prostaglandin E2
Rha	Rhamnose	Đường rhamno
TBUT		Tế bào ung thư
TLC	Thin-layer chromatography	Sắc kí lớp mỏng
TMS	Tetramethylsilane	Tetramethylsilane
TNF-α	Tumor necrosis factors	Tumor necrosis factors
TPHH		Thành phần hóa học
TT		Thứ tự

ĐẶT VẤN ĐỀ

Từ xa xưa con người đã sử dụng thực vật làm thuốc, đến nay xã hội loài người càng phát triển càng có nhu cầu sử dụng dược liệu thiên nhiên bởi nhiều đặc điểm ưu việt. Các hợp chất thiên nhiên có nhiều ưu điểm như cấu trúc hóa học và hoạt tính sinh học đa dạng, dễ được hấp thụ và chuyển hóa trong cơ thể cũng như độc tính thấp dễ dàng phân hủy. Do đó, các hợp chất thiên nhiên nhận được quan tâm nghiên cứu của các nhà khoa học trong và ngoài nước với mục đích phát triển thành các dược phẩm chữa bệnh cho người. Việt Nam có hệ thực vật vô cùng đa dạng với trên 12.000 loài thực vật bậc cao có mạch và khoảng 5.000 loài được sử dụng trong y học dân tộc để điều trị nhiều nhóm bệnh khác nhau. Các bài thuốc trong y học cổ truyền có thể được dùng dưới dạng độc vị hay phối hợp nhiều vị. Ngoài giá trị chữa bệnh của hàng trăm loại thuốc đã được chứng minh thì rất nhiều bài thuốc đã được hiện đại hóa. Như một số loại thuốc đã được chiết xuất từ dược liệu của nước ta như rutin, palmatin, D-strophantin, berberin, L-tetrahydropalmatin, artermisinin, các sản phẩm từ tinh dầu,… có mặt rộng rãi trong nước và xuất khẩu. Xu hướng đi sâu nghiên cứu y học dân tộc và tìm kiếm các hợp chất có hoạt tính sinh học cao để làm thuốc từ dược liệu ngày càng được thế giới chú trọng.

Ung thư là căn bệnh phổ biến và nỗi lo sức khỏe của các nước phát triển cũng như đang phát triển. Theo số liệu thống kê của cơ quan nghiên cứu ung thư quốc tế (IACR, thuộc WHO) vừa công bố về tình hình ung thư hiệu chỉnh theo độ tuổi của 185 quốc gia, vùng lãnh thổ năm 2020 thì so với năm 2018, thế giới ghi nhận thêm hơn 2 triệu ca mắc mới ung thư, lên gần 19,3 triệu ca và số ca tử vong tăng từ 9,6 triệu ca (2018) lên 9,96 triệu ca (2020). Nhằm mục tiêu giảm số ca tử vong do ung thư thì đa dạng các nguồn gốc các loại thuốc điều trị ung thư là một hướng nghiên cứu. Các nghiên cứu gần đây từ năm 1986-2006 cho thấy 63% các hợp chất bắt nguồn từ tự nhiên làm các thuốc như Taxol, vinblastine, vincristine, dẫn chất camptothecin, etoposide được phát triển từ epipodophyllotoxin là các thuốc điều trị ung thư trên thế giới. Một số các hợp chất chống ung thư tự nhiên hứa hẹn khác như flavopiridol, roscovitine, combretastatin A-4, axit betulinic (**43**) đang trong giai đoạn thử nghiệm lâm sàng và tiền lâm sàng [1,2].

Chi *Barringtonia* đã và đang nhận được sự quan tâm nghiên cứu của các nhà khoa học trên thế giới. Các hoạt tính nổi bật như gây độc TBUT [1-3], ức chế enzym α-glucosidase [4], kháng vi sinh vật [5-9]. Tuy vậy, ở nước ta có rất ít các công bố khoa học được ghi nhận về TPHH và hoạt tính sinh học của các loài thuộc chi *Barringtonia*. Hiện mới có 1 nghiên cứu sơ bộ về cây Chiếc đỏ - *Barringtonia acutangula* và tách được 03 hợp chất khung flavan-3-ol [10]. Từ cơ sở trên, tác giả lựa chọn tiến hành đề tài luận án "**Nghiên cứu thành phần hóa học, hoạt tính gây độc tế bào và kháng viêm của hai loài *Barringtonia acutangula* (chiếc đỏ) và *Barringtonia racemosa* (chiếc chùm) thuộc chi *Barringtonia* họ Lecythidaceae (họ Lộc vừng)**" nhằm phân lập được các hợp chất có hoạt tính gây độc tế bào và hoạt tính kháng viêm từ loài Chiếc đỏ - *B. acutangula* và Chiếc chùm - *B. racemosa* thu thập ở Việt Nam.

Mục tiêu của luận án:

- Xác định được TPHH của loài Chiếc đỏ *B. acutangula* và Chiếc chùm *B. racemosa* thu thập ở Việt Nam.

- Đánh giá được hoạt tính gây độc TBUT và kháng viêm của các hợp chất thu được từ hai loài nghiên cứu để tìm kiếm các hoạt chất làm cơ sở khoa học cho các nghiên cứu tiếp theo.

Nội dung chính của luận án:

- Phân lập các hợp chất từ loài Chiếc đỏ *B. acutangula* và Chiếc chùm *B. racemosa* thu thập ở Việt Nam sử dụng các phương pháp sắc ký.

- Xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất thu được sử dụng các phương pháp phổ.

- Đánh giá hoạt tính gây độc TBUT và kháng viêm của các hợp chất thu được.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU VỀ VẤN ĐỀ NGHIÊN CỨU

1.1. Khái quát chung về chi *Barringtonia* ở Việt Nam

1.1.1. Đặc điểm phân loại học

Chi Lộc vừng *Barringtonia* J.R.Forst. & G.Forst. (1776) là một trong khoảng 20 chi của họ Lộc vừng Lecythidaceae A.Rich. (1825). Trên thế giới chi Lộc vừng có khoảng 56 loài phân bố ở các vùng nhiệt đới từ Đông Châu Phi tới Australia, chủ yếu ở Châu Á. Ở Việt Nam có khoảng 14 loài [11, 12] (Bảng 1.1).

Bảng 1.1. Các loài thuộc chi Lộc vừng ở Việt Nam

STT	Tên khoa học	Tên Tiếng Việt
1	*Barringtonia acutangula* (L.) Gaertn.	Chiếc đỏ
2	*Barringtonia acutangula* subsp. *spicata* (Bl.) Payens.	Chiếc khế
3	*Barringtonia* cf. *schmidtii* Warb. ex Craib	Chàm bia
4	*Barringtonia angusta* Kurz.	Vừng
5	*Barringtonia asiatica* (L.) Kurz	Chiếc châu á
6	*Barringtonia coccinea* (Lour.) Kost.	Chiếc
7	*Barringtonia conoidea* Griff.	Chiếc chùy
8	*Barringtonia eberhardtii* Gagnep.	Chiếc eberhardt
9	*Barringtonia edaphocarpa* Gagnep.	Chiếc
10	*Barringtonia macrocarpa* Hassk.	Chiếc trái to
11	*Barringtonia macrostachya* (Jack) Kurz	Chiếc chùm to
12	*Barringtonia micrantha* Gagnep.	Chiếc hoa nhỏ
13	*Barringtonia musiformis* King	Chiếc cau
14	*Barringtonia pauciflora* King	Chiếc ít hoa
15	*Barringtonia racemosa* (L.) Spreng.	Chiếc chùm

(1) Chiếc đỏ *B. acutangula* (L.) Gaertn.

Mô tả hình thái: Cây thân gỗ, cao đến 15 m, phân cành nhiều, tán lá tự nhiên thường có hình cầu hoặc hình trứng; loài mọc ở miền bắc thường rụng lá vào mùa đông, búp và lá non thường có màu đỏ. Lá đơn, mọc cách, thường tập trung ở đỉnh cành; cuống lá dài 5-10 mm, phiến lá hình trứng ngược hoặc hình bầu dục, dài đến 20 cm, mép có răng cưa mịn, gân bên 8-10 đôi. Cụm hoa chùm, thòng, mọc ở đầu cành, dài 30-110 cm, mang hoa dọc theo trục phát hoa. Hoa đều, lưỡng tính, mẫu 4, cuống

hoa hơi phình to ở giáp đế hoa, dài 3-5 mm, lá bắc dạng vẩy, cỡ 2 mm, có lông ở mép, sớm rụng; đài dính nhau phía dưới thành ống, dài 2-2,5 mm, đường kính 3-3,5 mm; thùy đài 4, hình bầu dục, dài 2,5-3 mm, bìa có nhiều lông; cánh hoa 4, đều, rời, màu trắng pha hồng nhạt ở giữa, màu xanh ở đỉnh, hình bầu dục, đỉnh cong, dài 1-1,2 cm; nhị nhiều, xếp thành 3 vòng, không đều, dính nhau ở phía dưới thành ống, dài 3-4 mm, phía trên rời dạng sợi màu đỏ, 2 vòng ngoài chỉ nhị dài 1,7-2,5 cm, vòng thứ 3 nhị lép không có bao phấn, chỉ nhị dài 4-5 mm, bầu dưới, 2-3 ô, mỗi ô nhiều noãn, đính trung trụ; vòi nhụy dạng sợi, dài 2,4-2,5 cm. Quả hình bầu dục, có 8 khía dọc, dài 2,5-3 cm, rộng 2-2,5 cm, màu xanh, mang đài tồn tại ở đỉnh.

Sinh học, sinh thái: Loài mọc ở ven kênh rạch, cửa sông hoặc nơi trũng thấp nước lợ đến ven suối trong rừng nhiệt đới thường xanh; được trồng làm cảnh, bóng mát tại các cơ quan, đường phố, khu dân cư, gia đình. Loài ra hoa hầu như quanh năm, quả tập trung nhiều khoảng tháng 8-10.

Phân bố: Gặp phổ biến ở các tỉnh từ đồng bằng, trung du đến các tỉnh miền núi từ phía Bắc, miền Trung, Tây Nguyên đến các tỉnh Nam Bộ. Còn có ở Mianma, Ấn Độ, Campuchia, Lào, Malaixia, Thái Lan, Inđônêxia, Philippin, Australia [12].

(2) Chiếc khế *B. acutangula* ssp. *spicata* (Bl.) Payens.

Mô tả hình thái: Đại mộc nhỏ, cao 3-5 m. Lá có phiến dày, dai, không lông, dài 15-20 cm, gân phụ 10 cặp, bìa có răng mịn, cuống 8-15 mm. Chùm thòng ở ngọn, dài 30-50 cm, hoa đỏ, rộng vào 1,5 cm, cánh hoa dính nhau ở đáy, cao 1 cm, quấn ra. Trái cao 3 cm, có 8 cạnh tròn, cao, hột 1.

Phân bố: Dựa rạch, Hà Sơn Bình đến Bình Dương [13].

(3) Chàm bia *B.* cf. *schmidtii* Ward.

Mô tả hình thái: Đại mộc nhỏ, nhánh không lông. Lá chụm ở chót nhánh, phiến dài 20 cm, bầu dục thon, đáy từ từ hẹp, bìa có răng nhỏ, uốn xuống, gân phụ 9-10 cặp, cuống 7 mm. Chùm thòng dài 30-35 cm, cánh hoa dài 8-10 mm, tiểu nhụy nhiều, dài 1,2 cm. Trái to bằng ngón tay út.

Phân bố: Phú Quốc [13].

(4) Vừng *B. angusta* Kurz.

Mô tả hình thái: Đại mộc. Lá có phiến to đến 30(65) x 9-10(15) cm, thon ngược, đáy từ từ hẹp thành cuống ngắn, bìa có răng nằm. Chùm thòng, dài đến 1 m,

hoa cách nhau, lá đài 4, dài 1 cm, cánh hoa to 3x3,5 cm, tiểu nhụy nhiều, noãn sào 4 buồng. Trái dài 5,5-6,5 cm, có 4 cánh dọc thấp.

Phân bố: Phú Quốc [13].

(5) Chiếc châu á *B. asiatica* (L.) Kurz.

Mô tả hình thái: Đại mộc cao đến 15 m. Lá có phiến to, xoan rộng, đầu tròn có khi lõm, không lông, dai, bìa nguyên, cuống vắng. Chùm ngắn ở ngọn, hoa to, lá đài 2, xanh, cánh hoa 4, trắng, dài đến 7 cm, tiểu nhụy nhiều. Trái to hơn 7 cm, có 4 cạnh, hột 1. Gỗ đỏ, tốt.

Phân bố: Dựa biển: Nha Trang, Côn Đảo [13].

(6) Chiếc đỏ *B. coccinea* (Lour.) Kost.

Mô tả hình thái: Đại mộc nhỏ, có nhiều nhánh mang lá, nhánh già có vỏ xám đen. Lá tương đối nhỏ 10 x 4 cm, xoan ngược đáy nhọn, bìa có răng nằm cuống dài 2-3 cm. Chùm hoa dài 30 cm, thòng, cọng hoa như chỉ, dài 3 mm, nụ hoa xoan 6 x 4 mm; lá đài không lông, vành đỏ, tiểu nhị nhiều [13].

Phân bố: Đà Nẵng.

(7) Chiếc chùy *B. conoidea* Griff.

Mô tả hình thái: Đại mộc nhỏ, nhánh không lông. Lá có phiến xoan thon ngược, bìa có răng tà, láng, không lông, cuống ngắn. Chùm ngắn, mang 7-8 hoa, đài có 8 sóng, cánh hoa ngắn, tiểu nhụy nhiều, noãn sào 3-4 buồng. Trái có 8 cánh ngắn ở đáy, hột 1 [13].

Phân bố: Dựa rạch, Lái Thiêu, Biên Hòa.

(8) Chiếc eberhardt *B. eberhardtii* Gagnep.

Mô tả hình thái: Đại mộc, nhánh non tía, có cạnh. Lá nhỏ so với các loài khác (dạng lá Dung), 8-12 x 3-4,5 cm, gắn gần nhau ở ngọn nhánh, gân phụ 5-9 cặp, bìa có răng nằm, cuống 1-1,3 cm. Phát hoa đỏ, dài 40-60 cm, mang hoa nhỏ, cọng dài 5-12 mm, lá đài 2 mm, cánh hoa 4, dài 5 mm, tiểu nhụy nhiều, chỉ dính nhau ở đáy, noãn sào 2 buồng [13].

Phân bố: Rừng Trường Sơn.

(9) Chiếc *Barringtonia edaphocarpa* Gagnep.

Phân bố: Sơn La.

(10) Chiếc trái to *B. macrocarpa* Hask.

Mô tả hình thái: Đại mộc cao 10 m, nhánh mảnh, không lông. Lá to, phiến, 20-24 x 9-10 cm, thon ngược hình muỗng, rộng ở ½ trên, đáy hẹp, tròn trên cuống, oliu xám, cuống dài vào 1 cm, tròn. Phát hoa dài 40-50 cm, thòng, nụ 15 mm, hoa trắng, cánh hoa tròn, to 15 mm, tiểu nhụy nhiều, chỉ dính nhau ở đáy, noãn sào có 4 cạnh cao như cánh.

Phân bố: Trên vùng có đá vôi Sông Đà [13].

(11) Chiếc chùm to *B. macrostachya* (Jack) Kurz.

Mô tả hình thái: Đại mộc 5-7 m. Lá to ở chót nhánh, thon chót nhọn nhọn hay tà, không lông, bìa có răng, gân phụ 10-17 cặp, cuống dài 5-17 cm, Chùm dài đến 40 cm, nụ 15 mm, hoa có cọng ngắn, cánh hoa 4, đỏ, gần như rời nhau. Trái dài 7,7 cm, nhọn 2 đầu, có 4 cạnh.

Phân bố: Dựa rạch nước lợ đến rừng, luôn luôn xanh bình nguyên, từ Thừa Thiên Huế trở vào [13].

(12) Chiếc hoa nhỏ *B. micrantha* Gagnep.

Mô tả hình thái: Đại Đại mộc sống nơi có nước ngập. Lá nhỏ hay trung, phiến dài 7-10 cm, rộng 3-4 cm, xoan, ngược, dày dày, bìa có răng nhỏ, đều, gân phụ 5-7 cặp, cuống 1-1,2 cm. Chùm thòng dài 10-20 cm, hoa nhỏ nhiều, nụ cao 4-6 mm, rộng 3 mm, đài có 4 răng, cánh hoa 4-5, trắng, cao 4 mm, tiểu nhụy nhiều, noãn sào 2 buồng nhiều noãn. Trái 4 cạnh tà, dài 2-2,5 cm, hột 1.

Phân bố: Châu Đốc [13].

(13) Chiếc cau *B. musiformis* Kurz.

Mô tả hình thái: Đại mộc 7-10 m, đường kính đến 30 cm, nhánh không lông. Lá chụm ở chót nhánh, phiến xoan thon ngược, chót tà, đáy nhọn, không lông, mặt trên nâu ô liu láng, mặt dưới nâu vàng, gân phụ 6-10 cặp, cuống 2-3,5 cm. Phát hoa ở nách lá, dài 10-12 cm ở trái, không lông. Trái to bằng trái cau, 4,5-6 x 3,5 cm, chót có thẹo dài còn lại, quả bì cứng, dày 6 mm, hột 1.

Phân bố: Dựa suối, vùng núi, 150-600 m, Quảng Nam, Đà Nẵng [13].

(14) Chiếc ít hoa *B. pauciflora* King.

Mô tả hình thái: Đại mộc 15 m. Lá khít nhau ở chót nhánh, dài đến 30 cm, không lông, bìa có răng, cuống dài 4-7 cm. Chùm thòng, dài đến 70 cm, nụ to 1-1,5 cm, hoa hường, cánh hoa 4, rời nhau, tiểu nhụy nhiều. Trái hình thoi, dài vào 5 cm.

Phân bố: Rừng luôn luôn xanh. Nha Trang, Biên Hòa [13].

(15) Chiếc chùm *B. racemosa* (L.) Spreng.

Mô tả hình thái: Đại mộc 15 m, phân cành nhiều, tán lá tự nhiên thường có hình cầu hoặc hình trứng, cành non thường rủ. Lá đơn, mọc cách, thường tập trung ở đỉnh cành, cuống lá dài dài cỡ 0,5-1,5 cm; phiến lá hình trứng ngược hoặc hình bầu dục, cỡ 10-30 x 5-10 cm, mép có răng cưa mịn, gân bên 10-12 đôi. Cụm hoa chùm, thòng, mọc ở đầu cành, dài 50-60 cm, hoa mọc dọc theo trục phát hoa. Hoa đều, lưỡng tính, mẫu 4; cuống hoa hơi phình to ở giáp đế hoa, dài 1-2,5 cm; nụ hoa cỡ 6-9 mm; đài dính nhau phía dưới thành ống, dài 2 - 2,5 mm; thùy đài 2-4, hình bầu dục, dài 1-1,2 cm; cánh hoa 4, đều, rời, màu vàng, hình bầu dục, đỉnh cong, dài 1-1,3 cm; nhị nhiều, xếp thành 5-6 vòng, không đều, vòng ngoài chỉ nhị dài 3-3,5 cm, vòng trong nhị lép không có bao phấn, chỉ nhị dài 1-1,5 cm; bầu dưới, 2-4 ô, mỗi ô 2-3 noãn, đính trung trụ; vòi nhụy dạng sợi, dài 4-6 cm. Quả hình trứng, dài đến 9 cm, hơi có 4 cạnh. Hạt hình trứng ngược, cỡ 2-4 cm.

Sinh học, sinh thái: Loài mọc ở ven kênh rạch, cửa sông hoặc nơi trũng thấp nước lợ đến ven suối trong rừng nhiệt đới thường xanh. Loài có hoa, quả tháng 7-3 năm sau.

Phân bố: Gặp phổ biến ở các tỉnh từ đồng bằng, trung du đến các tỉnh miền núi từ phía Bắc, miền Trung, Tây Nguyên đến các tỉnh Nam Bộ. Còn có mặt ở Lào, Mianma, Ấn Độ, Campuchia, Thái Lan, Malaixia, Inđônêxia, Philippin, Australia [12].

1.1.2. Bộ phận dùng và công dụng trong y học cổ truyền

- Vỏ thân chiếc đỏ *B. acutangula* được dùng chữa đau bụng, tiêu chảy, sốt với liều 8-16 g, sắc nước uống. Quả còn xanh, ép lấy nước bôi chữa chàm hoặc nghiền nhỏ ngâm với rượu để chữa đau răng (không nuốt nước). Quả và rễ giã nhỏ còn được dùng để ruốc cá. Ở Campuchia vỏ thân có thể uống chữa bệnh tiêu chảy, lậu và sốt rét. Dùng ngoài vỏ giã nát hoặc sắc nước đắp bôi tại chỗ chữa vết thương do côn trùng độc cắn. Gỗ mài với nước có tác dụng chữa rong kinh. Ở Philippin vỏ thân chữa vết thương. Ở Ấn Độ quả và hạt giã nát, đắp lên ngực chữa cảm lạnh, đắp lên bụng chữa đau bụng và đầy hơi [11].

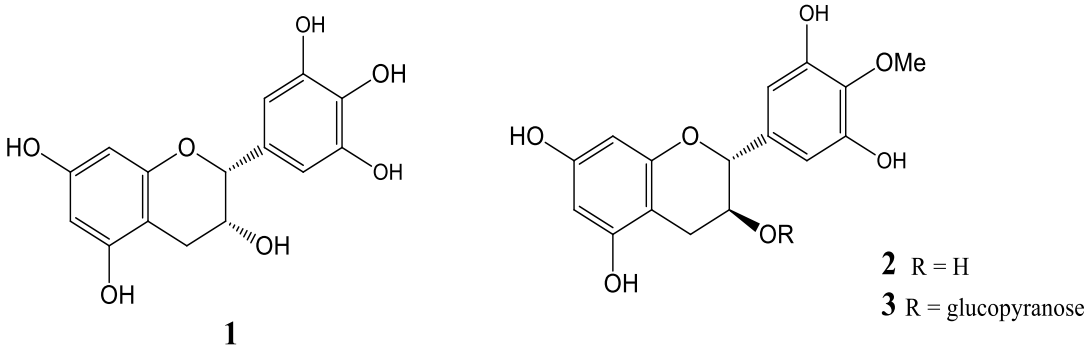
- Rễ chiếc chùm *B. racemosa* dùng để chữa bệnh sởi. Quả dùng để chữa bệnh ho và hen suyễn. Nhân hạt giã ra trộn lẫn bột và dầu dùng trị lỵ, ỉa chảy. Hạt thơm dùng chữa các cơn đau bụng và bệnh về mắt. Hạt và vỏ cũng được dùng trị giun. Ở Malaysia, lá của *B. racemosa* theo truyền thống được dùng điều trị tăng huyết áp và

làm thuốc giảm đau [14]. Bộ lạc Temuan, một trong những nhóm dân tộc thổ dân ở bán đảo Malaysia, sử dụng lá, rễ và vỏ cây *B. racemosa* giã nát để điều trị thủy đậu cũng như giảm ngứa. Ở Malaysia, chồi của *B. racemosa* thường được dùng làm salad. Ở khu vực này, quả và hạt được dùng trị bệnh hen suyễn, ho, áp xe, loét và tiêu chảy [15]. Quả cũng được dùng trị tiêu chảy, làm thuốc xông. Ở Nam Phi, bộ tộc Zulu sử dụng quả để điều trị bệnh sốt rét, hạt để điều trị viêm mắt và được các nữ hộ sinh sử dụng khi sinh con [16].

1.2. Nghiên cứu về TPHH của chi *Barringtonia*

1.2.1. Các nghiên cứu ở trong nước

Theo thống kê nghiên cứu hiện nay, Việt Nam ghi nhận có 14 loài thuộc chi *Barringtonia* nhưng mới có 2 bài báo liên quan đến TPHH của các loài thuộc chi được công bố. Năm 2014, nhóm tác giả Nguyễn Văn Dư và cộng sự đã đăng tải kết quả nghiên cứu bước đầu về TPHH của vỏ loài Chiếc đỏ - *B. acutangula* đã tách được 03 hợp chất flavan-3-ol là (+)-epigallocatechin (**1**), (+)-gallocatechin 4′-*O*-methyl ether (**2**) và (+)-gallocatechin 4′-*O*-methyl ether 5-*O*-β-D-glucopyranoside (**3**) [10].



Hình 1.1. Cấu trúc *ba flavan-3-ol* từ *B. acutangula* ở Việt Nam

Đến năm 2022, nhóm tác giả Nguyễn Phạm Tuấn và cộng sự [17] bằng phương pháp của Yadav (2014) đã định tính được một số dạng hợp chất có trong cặn chiết của lá cây lộc vừng (*B. acutangula*) như Bảng 1.1.

Bảng 1.2. Phương pháp định tính các hợp chất trong cao chiết lá cây lộc vừng

Hợp chất	Thực nghiệm	Hiện tượng
Alkaloid (phương pháp Mayer)	1mL dịch trích + vài giọt TT Mayer	Kết tủa màu trắng
(phương pháp Dragendorff)	1mL dịch trích + vài giọt TT Dragendorff	Kết tủa đỏ cam
Flavonoid	1mL dịch trích + vài giọt $FeCl_3$	
Saponin (Foam)	3mL dịch trích+ 6mL H_2O→ đun nóng	Kết tủa nâu đỏ
Steroid (Salkowski)	1mL dịch trích + 2mL $CHCl_3$ + 2mL $H2SO_4$ đậm đặc	Xuất hiện bọt Xuất hiện vòng đỏ nâu giữa 2 lớp
Tannin và phenol(Braymer)	0,5mLdịch trích + 10mL H_2O + 2-3 giọt $FeCl_3$ 0,1%	Kết tủa xanh dương đen
Terpenoid	2mL dịch trích + 2mL $(CH_3CO)_2O$ + 2-3 giọt H_2SO_4 đậm đặc	Xuất hiện màu đỏ đậm

1.2.2. Các nghiên cứu trên thế giới

Chi *Barringtonia* đã thu hút được sự quan tâm nghiên cứu của các nhà khoa học trên thế giới từ lâu. Những nghiên cứu đầu tiên từ những năm 1898 tới nay từ chi *Barringtonia* đã đăng tải được 113 hợp chất thuộc các lớp chất saponin, terpennoid, alkaloid, lignans, flavonoid, flavanones và steroid. Trong đó, các chất được tách và chứng minh cấu trúc chủ yếu từ các loài *B. acutangula* và *B. racemosa.*

a. Các hợp chất saponin

Saponin là một nhóm glucosides với các đặc tính tạo bọt. Saponin bao gồm một aglycones polycyclic gắn liền với một hoặc nhiều chuỗi đường. Phần aglycone, còn được gọi là sapogenin, hoặc là steroid (C27) hoặc một triterpene (C30) Saponin được chia làm hai loại đó là saponin acid (tritecpennoid saponin).

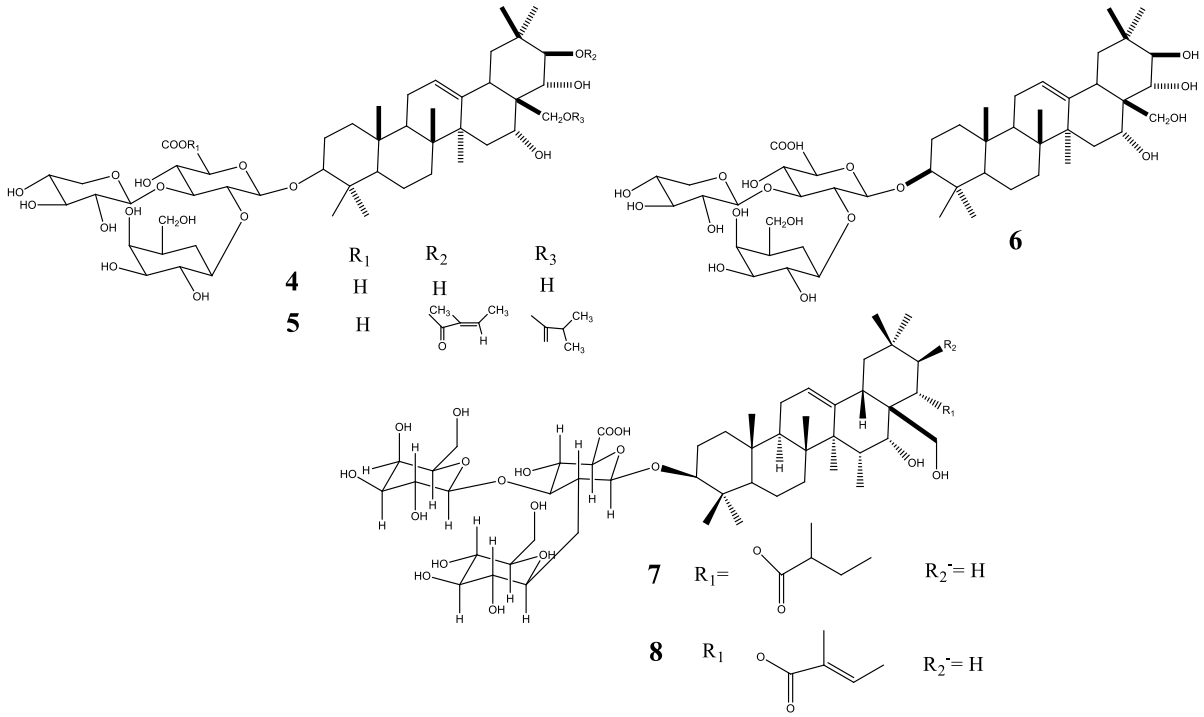
Trên thế giới các nghiên cứu về TPHH của chi *Barringtonia* có từ khá sớm. Năm 1901, Weil Ludwig [18] đã báo cáo trong thành phần loài *B. vriesei* có chứa glycoside saponin. Vào năm 1903, Van den Driessen-Mareeuw [19] đã phân lập được một saponin, barringtonin, từ hạt của *B. speciosa*. Năm 1934, tác giả T. Nozoe và cộng sự từ hạt loài *B. racemosa* đã ghi nhận từ hạt có chứa saponin, dầu và axit gallic [20].

Đến năm 1994, từ loài *B. acutangula* tiếp tục công bố ba hợp chất saponin glucuronid monouzoidic mới là barringtoside A-C **(4-6)** [21].

Năm 2002, hai saponin từ hạt loài Chiếc Châu á - *B. asiatica* là 3-O-[[β-D-galactopyranosyl(1→3)-β-D-glucopyranosyl(1→2)]-β-D-glucuronopyranosyloxy]-22-

O-(2-methylbutyroyloxy)-15,16,28-trihydroxy-(3β,15α,16α,22α)-olean-12-ene (**7**) và 3-O-[[β-D-galactopyranosyl(1→3)-β-D-glucopyranosyl(1→2)]-beta-D-glucuronopyranosyloxy]-22-O-[2(E)-methyl-2-butenyloyloxy]-15,16,28-trihydroxy-(3β,15α,16α,22α)-olean-12-ene (**8**) được phân tách và xác định cấu trúc [22].

Chín saponin mới là acutanguloside A-F (**9-14**) và acutanguloside D-F methyl ester (**15-17**) tiếp tục được tìm thấy từ loài *B. acutangula* vào năm 2005 [23].



9 R_1 = H, R_2 = A, R_3 = B, R_4 = H

10 R_1 = H, R_2 = A, R_3 = H, R_4 = Ac

11 R_1 = H, R_2 = A, R_3 = H, R_4 = H

12 R_1 = H, R_2 = A, R_3 = A, R_4 = H

13 R_1 = H, R_2 = A, R_3 = C, R_4 = H

14 R_1 = H, R_2 = C, R_3 = C, R_4 = H

15 R_1 = CH_3, R_2 = A, R_3 = A, R_4 = H

16 R_1 = CH_3, R_2 = A, R_3 = C, R_4 = H

17 R_1 = CH_3, R_2 = C, R_3 = C, R_4 = H

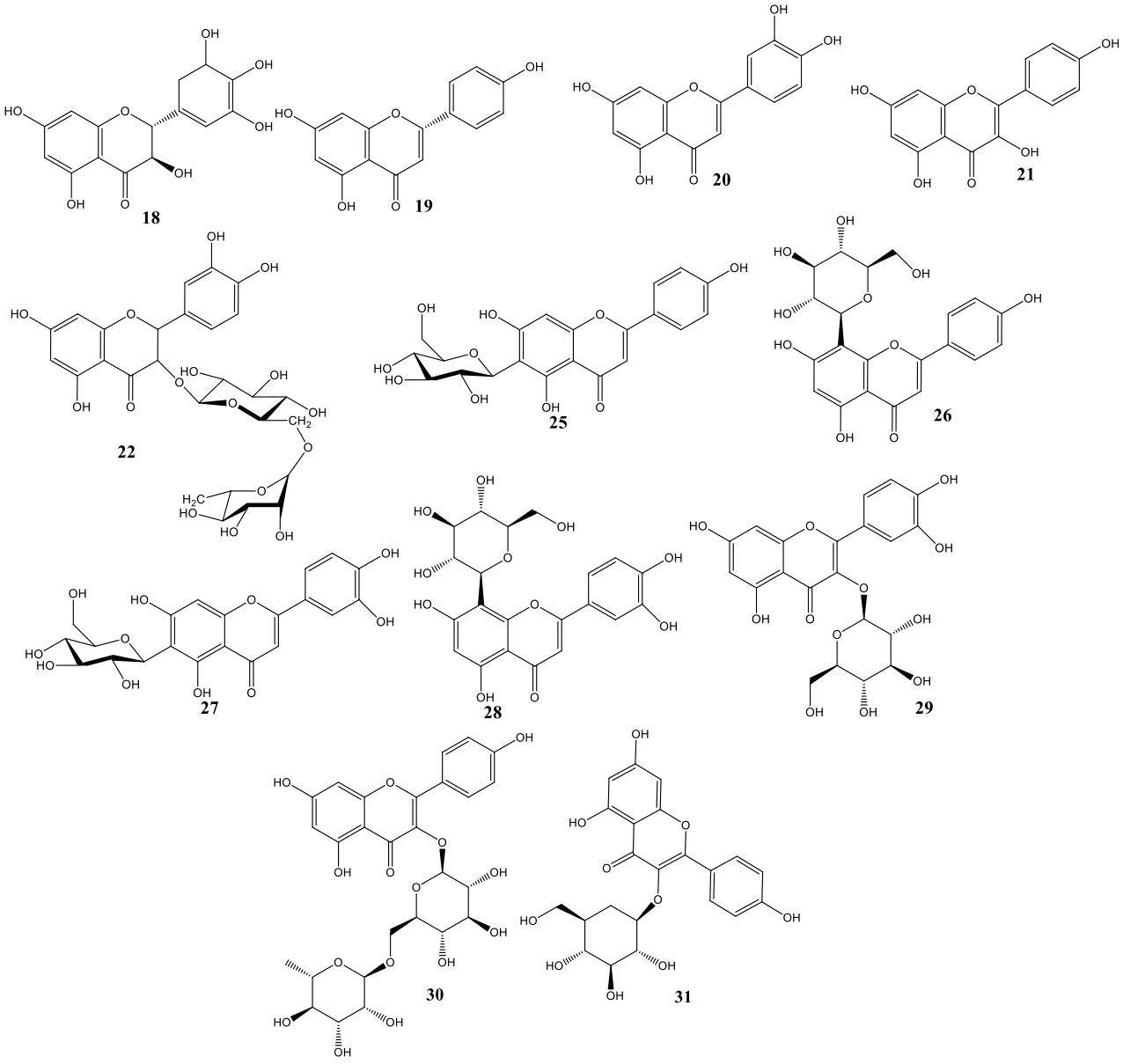
Hình 1.2. Các saponin phân lập được từ *B. acutangula* và *B. asiatica*

b. Các hợp chất flavonoid

Các flavonoid đã được báo cáo trong một số nghiên cứu của các tác giả. Năm 2006, từ lá *B. racemosa* đã báo cáo phân lập được dihydromyricetin (**18**) [24]. Cũng từ

lá của *B. racemosa* đã đăng tải một flavanone, một flavone và hai flavonols là naringenin (**19**), luteolin (**20**), kaempferol (**21**) và quercetin 3-O-rutinoside (**22**) cùng với axit gallic (**23**) và axit ferulic (**24**) [2, 25, 26].

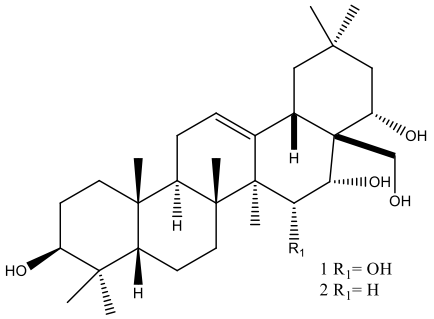
Năm 2016, Tsukasa Iwashina và Goro Kokubugata đã phân lập được sáu C-glycosylflavon và bốn flavonol O-glycosides từ lá của *B.asiatica*. Trong số các flavonoid của chúng, 4 flavon và 4 flavonoid đã được xác định là isovitexin (**25**), vitexin (**26**), isoorientin () và orientin (**27**), kaempferol 3-O-glucoside (**28**), kaempferol 3 -O-rutinoside (nicotiflorin) (**29**), quercetin 3-O-glucoside (isoquercitrin) (**30**), quercetin 3-O-rutinoside (rutin) (**21**) và hai C-glycosylflavone không xác định [27].



Hình 1.3. Các hợp chất flavonoid tách được từ chi *Barringtonia*

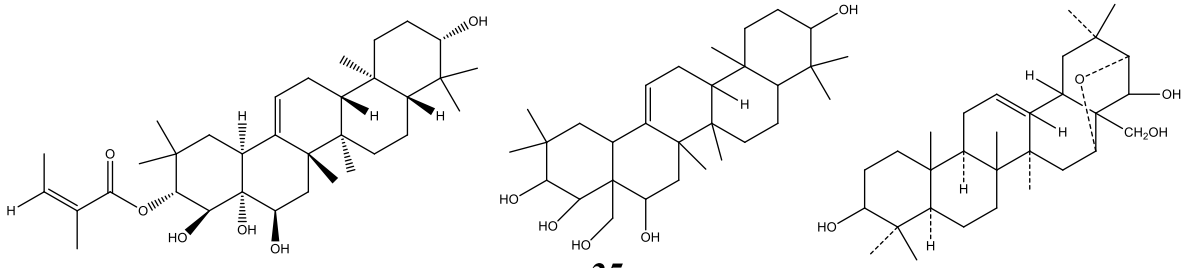
c. Tecpenoid và các hợp chất khác

Năm 1942, từ hạt quả *B. acutungula* thu tại Dacca (Bangladesh) ghi nhận sự có mặt của saponin ở dạng bột màu trắng [28]. Năm 1957, từ quả loài *B. racemose* Yau-Tang Lin và cộng sự đã phân tách được hai triterpenoid sapogenin R2-barringenol (**33**) có thể giống với barringtogenol (2:3:23:28-tetra-hydroxyolean-12-ene) và R1-Barrigenol: $C_{30}H_{50}O_7$ (**32**) [29]. Năm 1967, từ phổ ^{1}H-NMR hợp chất R1-barrigenol (**32**) được xác định là 3*β*,15α,16α,22α,28*β*-pentahydroxyolean-12-ene, và hợp chất R2-barringenol (**33**) có cấu trúc giống với camelliagenin A, giống với suy luận trước đây là 3β,16α,22α,28β-tetrahydroxyolean-12-ene tức là 15-deoxy-R1-barrigenol [30, 31].



Hình 1.4. Cấu trúc hợp chất R1-barrigenol và R2-barringenol

Sau đó, những năm 1961-1968, từ quả loài *B. acutangula* nhóm tác giả A.K.Barua đã tách và chứng minh cấu trúc của 3 triterpenoid sapogenin mới barringtogenol B (**34)**, barringtogenol C (**35**), barringtogenol D (**36**) [32-35]. Cũng từ quả loài *B. acutangula* ghi nhận chứa 6,31% protein, 0,35% chất béo, 1,33% đường, 4,08% tinh bột, 2,26% tanin, 2 saponin [11, 12].



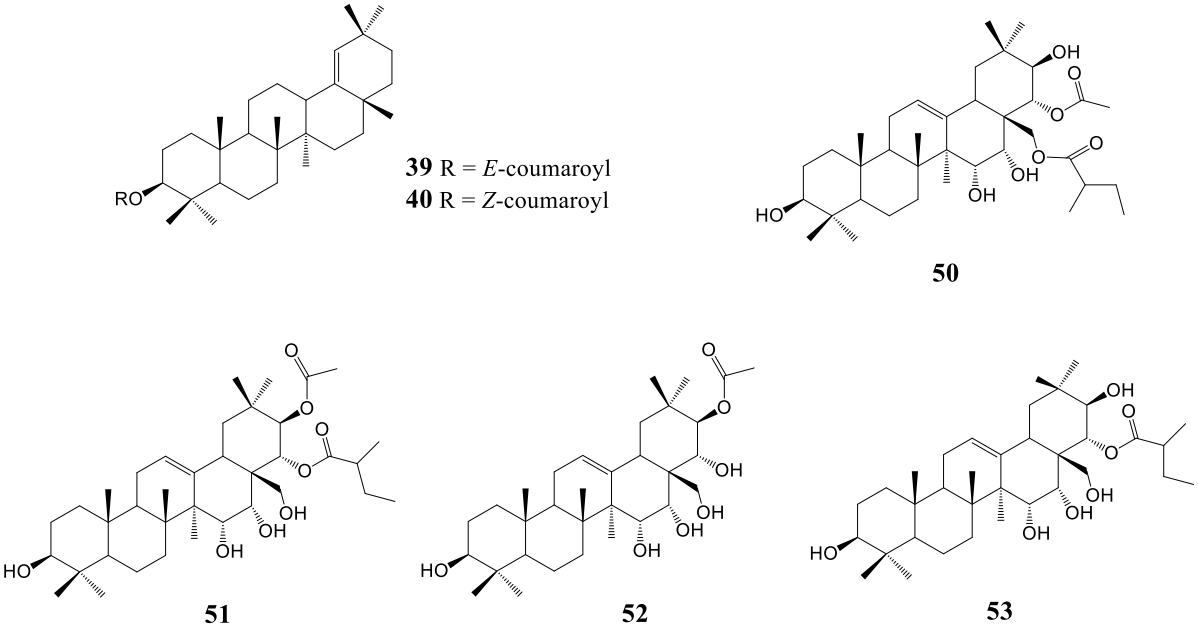
34 **35** **36**

Hình 1.5. Cấu trúc hóa học của **34-35-36**

Năm 1976, Lowry đã tách từ hoa của *B. racemosa* và *B. macrostachya* Kurz. hai anthocyanins, cyanidin (**37)** và delphinidin 3-O-sambubiosides (**38**) [36].

Năm 2006, từ vỏ thân loài *B. racemosa* thu tại đảo Hải Nam, Trung Quốc nhóm tác giả Yi Yang đã đăng tải hai hợp chất tritecpen dạng khung olean mới là olean-18-en-3β-O-*E*-coumaroyl ester (**39**) và olean-18-en-3*β*-*O*-*Z*-coumaroyl ester (**40**) cùng với

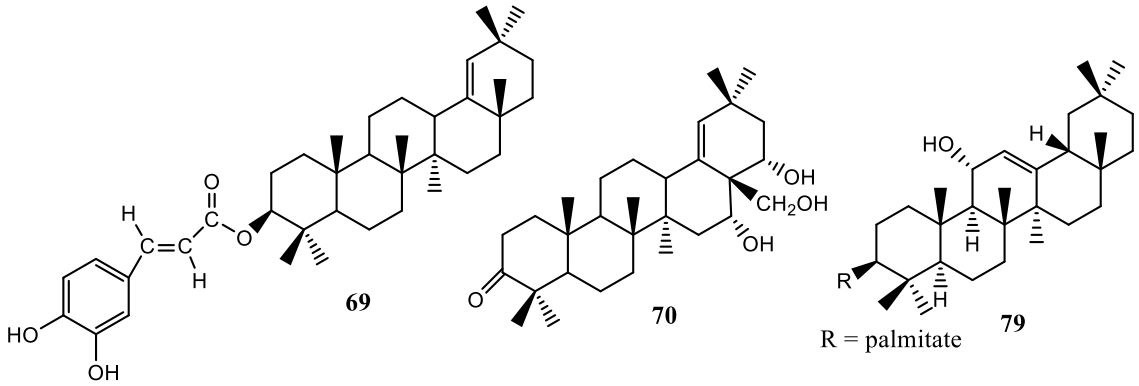
5 hợp chất cũ là germanicol (**41**), germanicone (**42**), axit betulinic (**43**), lupeol (**44**) và taraxerol (**45**) [37]. Cùng năm 2006, từ cặn chiết ethyl acetate vỏ cây loài *B. racemosa* đã tách được 5 hợp chất là axit 3,3'-đimetoxy ellagic (**46**), dihydromyticetin (**47**), axit gallic (**23**), axit bartogenic (**48**) và stigmasterol (**49)** [24]. Cũng từ loài *B. racemosa*, hai tritecpen mới là racemosol A (**50**) và isoracemosol A (**51**) cùng với stigmasterol (**49**), barringtogenol C (**7**) và axit bartogenic (**48**) tiếp tục được công bố năm 2009. Tuy nhiên chúng không có tác dụng gây độc trên hai dòng TBUT là HeLa và P388 D1 thử nghiệm [38]. Năm 2015, từ quả của loài *B. racemosa* tách được 02 hợp chất tritecpen mới rancemosol C và D (**52-53**) [39] và từ vỏ loài *B. acutangula* tách được betulin-3 cafeate (**54**) và amyrin (**55**) [40].



Hình 1.6. Cấu trúc triterpenoids mới tách được từ *B. racemosa*

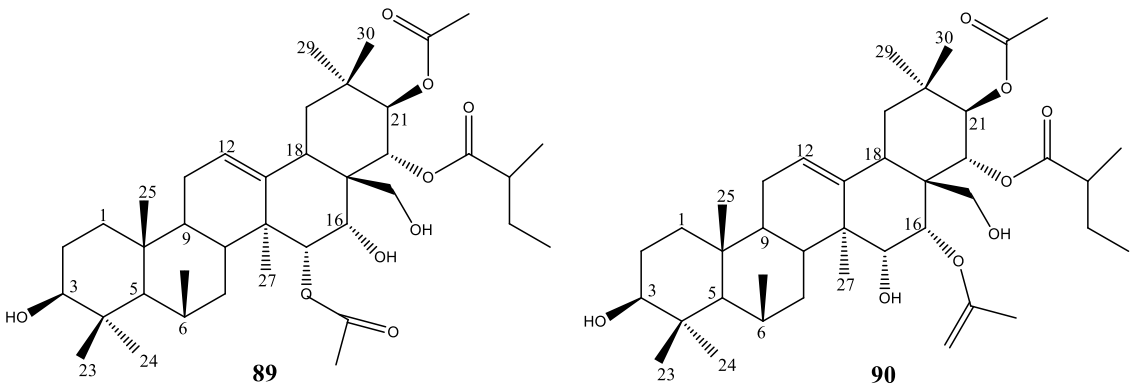
Năm 2007, từ loài mới *B. maunwongyathiae* thu tại rừng Khuan Thon, huyện Ao Luek, tỉnh Krabi, Thái Lan đã tách 10 triterpenes, 3 steroid và một dẫn xuất vitamin E. Các hợp chất này được chứng minh là taraxerol (**45**), 3-(*E*.)-coumaroyltaraxerol (**56**), 3-(*Z*.)-coumaroyltaraxerol (**57**), 3-(*E*.)-coumaroyl *β*.-amyrin (**58**), 3-(*Z*.)-coumaroyl *β*.-amyrin (**59**), 3-(*E*.)-coumaroyl *α*.-amyrin (**60**), 3-(*Z*.)-coumaroyl *α*.-amyrin (**61**), 3-(*E*.)-coumaroyllupeol (**62**), 3-(*Z*.)-coumaroyllupeol (**63**), axit 3,19,24-trihydroxyurs-12-ene-28-oic (**64**), stigma-4,22-dien-3-one (**65**), *β*.-stigmasterol (**66**), 3-*O*.-*β*.-D-glucopyranosyl-stigmasta-5,22-diene (**67**), và *α*.-tocopherylquinone (**68**). [41]

Từ loài *B. asiatica*, năm 2011 Ragasa CY đã phân tách được hai tritecpen mới là germanicol caffeoyl ester (**69**) và camelliagenone (**70**) cùng chín hợp chất đã biết: germanicol trans-coumaroyl ester (**71**), germanicol cis-coumaroyl ester (**72**), germanicol (**41**), camelliagenin A (**73**), spinasterol (**74**), sitosterol (**75**), squalene (**76**), lutein (**77**) và trilinolein (**78**) [9]. Đến năm 2012, nhóm nghiên cứu đã tiếp tục công bố hợp chất triterpene mới là (3-β,11-α)-11-hydroxyolean-12-en-3-yl palmitate (**79**) và hỗn hợp các hợp chất (3β) -olean-12-en-3-yl palmitate (**80a**), (3β) -urs-12-en-3-yl palmitate (**80b**) và (3β) -olean-18- en-3-yl palmitate (**80c**) theo tỷ lệ 2:1:4; β-amyrin (**81a**), α-amyrin (**82b**) và germanicol (**41**) theo tỷ lệ 3:1:4; 22-O-tigloylcamelliagenin A (**83a**) và axit betulinic (**43**) theo tỷ lệ 2:1; olean-12-en-3β, 16β, 22α-triol (**84**), β-sitosterol (**85**), spinasterol (**74**), squalene (**76**), trilinolein (**78**), verimol K (**86**), axit linoleic (**87**) [8]. Năm 2014, nhóm tiếp tục công bố đã tách được hỗn hợp của axit betulinic (**43**) và 22-O-tigloylcamelliagenin A (**83a**) theo tỷ lệ 1: 2 và hỗn hợp của 3β-olean-18-en-3- yl palmitate (**88a**), 3β-urs-12-en-3-yl palmitate (**88b**) và 3β-olean-12-en-3-yl palmitate (**88c**) theo tỷ lệ 4: 1: 2, hợp chất germanicol caffeoyl ester (**69**), germanicol trans-coumaroyl ester (**71**), germanicol cis-coumaroyl ester (**72**), germanicol (**41**), hợp chất phenolic, verimol K (**86**) [3].



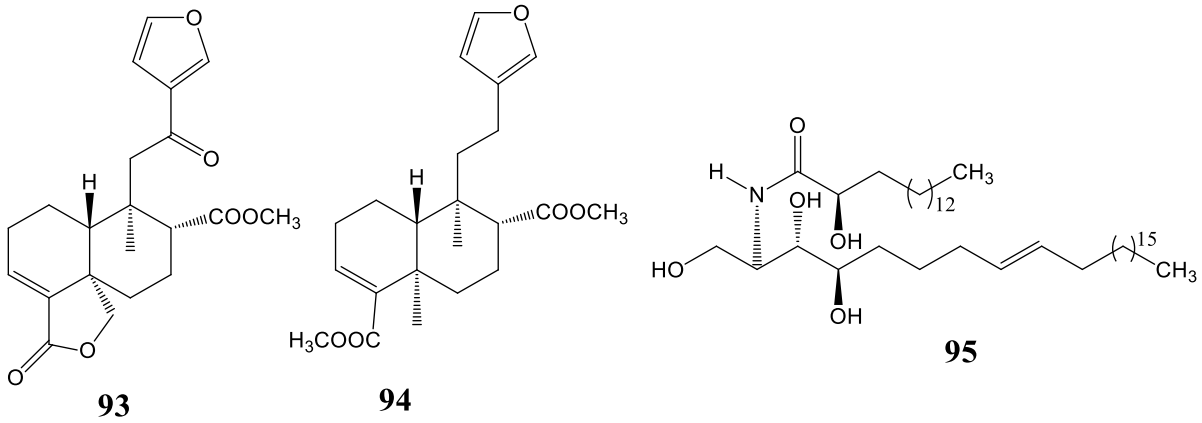
Hình 1.7. Cấu trúc triterpenoids mới tách được từ *B. asiatica*

Năm 2015, từ thân cây *B. racemosa*, hai triterpenes oleanane đồng phân mới đã được phân tách là racemosol B (**89**) và isoracemosol B (**90**) [42]. Từ cặn chiết quả khô loài *B. racemosa* đã tách được triterpenoid polyhydroxy oleanane monoacyl hóa là racemosol C – D (**91-92**) [39].



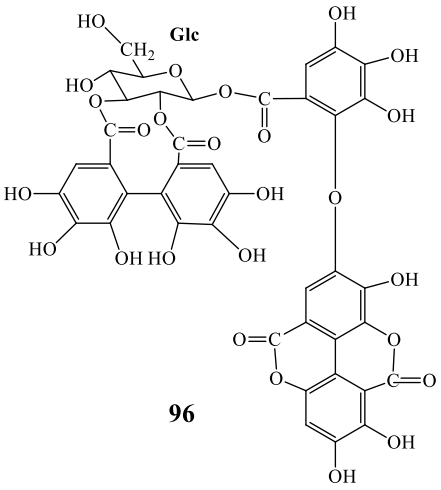
Hình 1.8. Cấu trúc triterpenoids tách được từ *B. racemosa*

Ngoài thành phần các hợp chất triterpenoid, hai hợp chất diterpenoid dạng khung *neo*-clerodan mới và hiếm là nasimalun A (**93**) và nasimalun B (**94**) được tìm thấy từ loài *B. racemosa* vào năm 2000 [43]. Gần đây, một ceramid mới là isoracemosol A (**95**) được tìm thấy từ loài này năm 2017 [44].

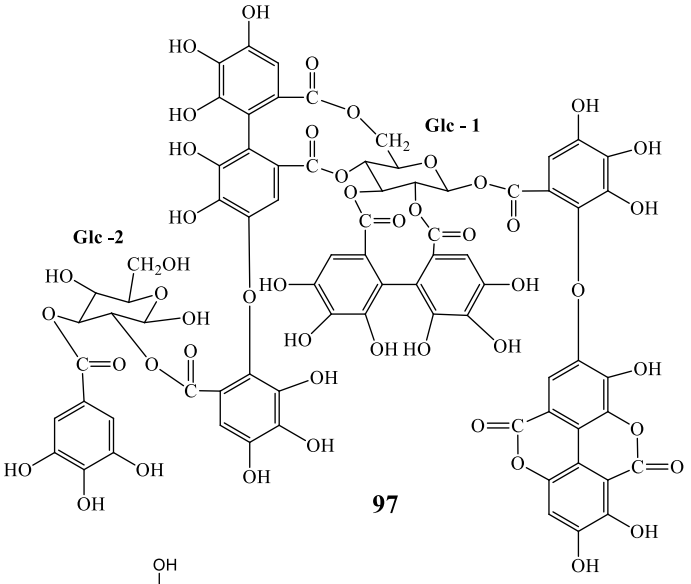


Hình 1.9. Cấu trúc 2 diterpenoid và ceramid mới từ *B. racemosa*

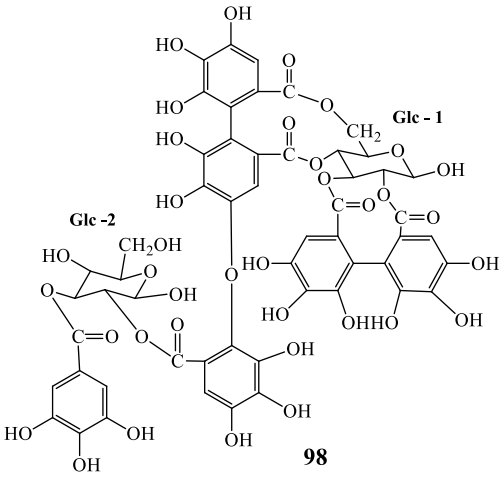
Trong nghiên cứu mới nhất năm 2021, từ lá loài *B. racemosa* đã tách được 5 ellagitannin mới là: barringtin M1 (**96**), barringtin D1 (**97**), barringtin D2 (**98**), barringtin D3 (**99**) và barricyclin D1 (**100**) cùng với các hợp chất đã biết axit valoneic dilactone (**101**), schimawalin A (**102**), 2,3-HHDP-glucose (**103**), và oenothein C (**104**) [45].



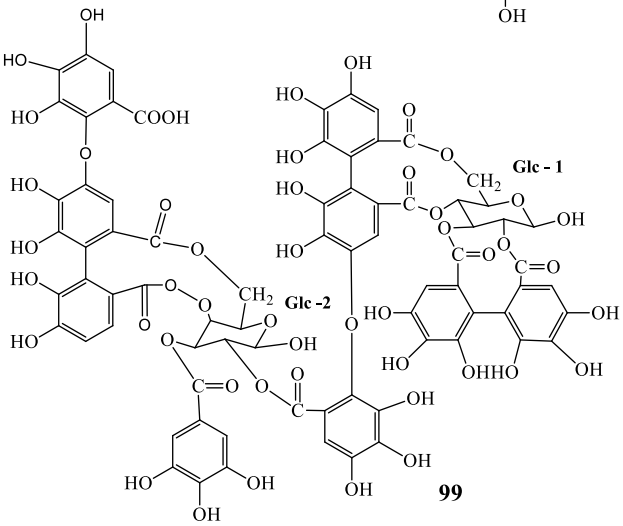
96



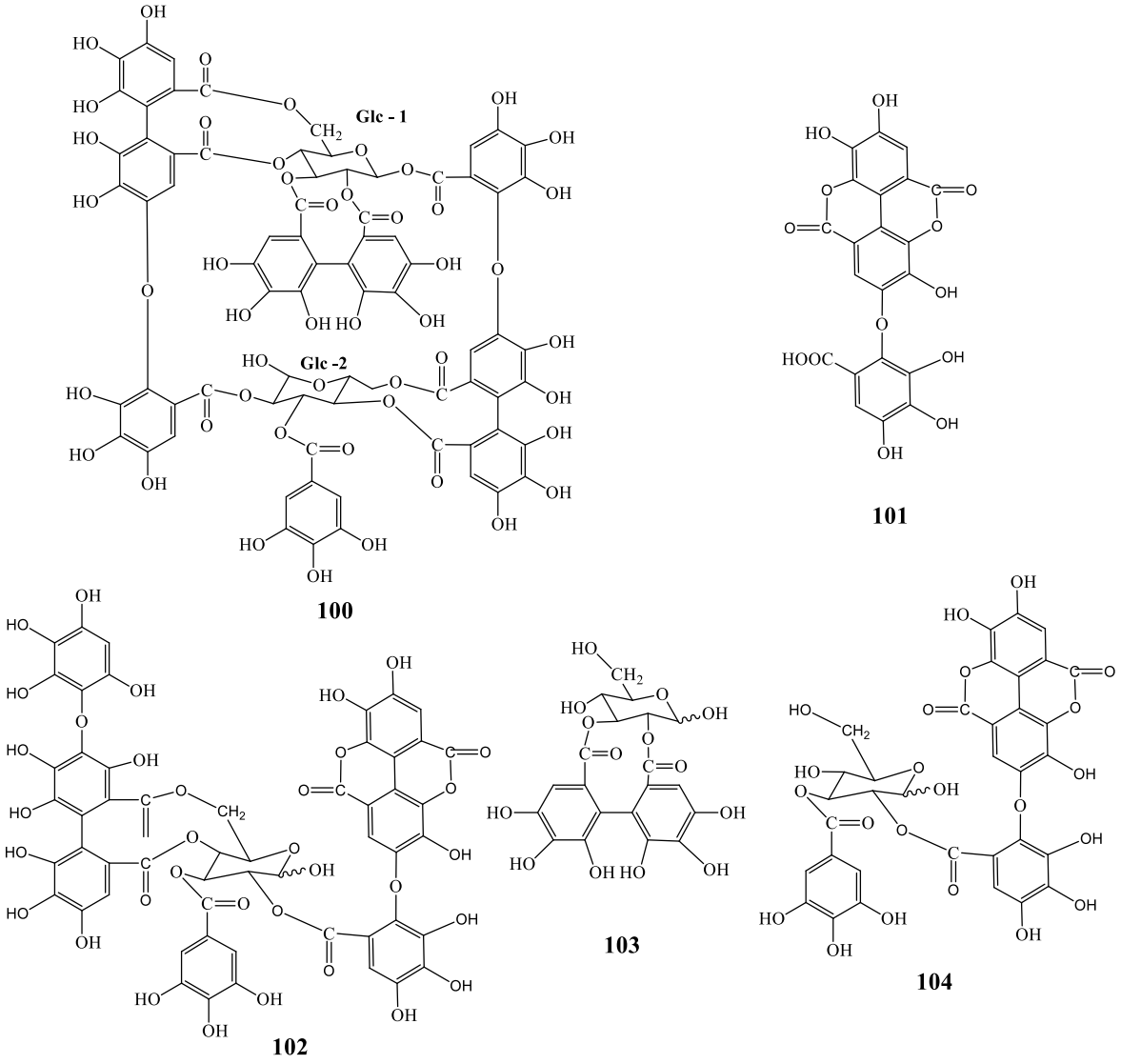
97



98



99



Hình 1.10. Các hợp chất ellagitannin tách được từ *B. racemosa*

Năm 2016, từ loài *B. racemosa* 12 hợp chất là axit 3β-p-E-coumaroymaslinic (**105**), cis-careaborin (**106**), careaborin (**107**), axit maslinic (**108**), axit 2α, 3β, 19α-trihydroxyolean-12-ene-24, 28-dioic (**109**), axit 3β-p-Z-coumaroylcorosolic (**110**), axit corosolic (**111**), axit 1α, 2α, 3β, 19α-tetrahydroxyurs-12-en-28-oic (**112**), axit 19α-hydroxyl ursolic (**113**), axit 3α, 19α-dihydroxyurs-12-en-24, 28-dioic (**114**), axit tormentic (**115**), 3-hydroxy-7, 22-dien-ergosterol (**116**) được công bố [46].

Có thể thấy, nghiên cứu bước đầu về các hợp chất trao đổi thứ cấp của loài Chiếc đỏ *B. acutangula* mọc ở Việt Nam có các hợp chất flavan-3-ol nhưng các công bố về TPHH loài này trên thế giới chủ yếu là các triterpen và saponin [21, 23, 47, 48], điều này gợi mở cho khả năng về tính đặc thù về TPHH của các loài *Barringtonia* ở Việt Nam so với các loài tương ứng trên thế giới do đó cần nghiên cứu tiếp về TPHH của loài này.

1.3. Các nghiên cứu về hoạt tính sinh học chi *Barringtonia*

1.3.1. Các nghiên cứu theo hướng gây độc tế bào

Theo kinh nghiệm dân gian ở Kerala (Ấn Độ) các hạt loài *B. racemosa* được dùng để ngăn ngừa và điều trị ung thư tuy nhiên chưa được báo cáo đầy đủ. Murakami năm 2000 cho thấy cặn chiết lá loài *B. racemosa* có khả năng ức chế 12-O hexadecanoylphorbol-13-acetate, một chất thúc đẩy khối u gây ra sự hoạt hóa của virus Epstein-Barr [49]. Virus herpes này được biết là sản xuất các protein của virus mà sau đó có thể dẫn đến bệnh ác tính bằng cách ảnh hưởng đến yếu tố phiên mã [49].

Năm 2002, từ cặn chiết hạt *B. racemosa,* Thomas và cộng sự đã đánh giá ảnh hưởng lên tế bào Dalton's Lymphoma Ascitic (DLA) ở chuột. Như vậy có khả năng loại bỏ hoàn toàn các tế bào khối u ở tất cả những con chuột bị bệnh ở liều thấp 6 mg/kg có ý nghĩa rất lớn. Vì thuốc là một chiết xuất thô nên nguyên tắc hoạt động có thể hoạt động ở mức liều rất thấp. Hiệu quả của thuốc được phát hiện là tốt hơn so với một loại thuốc tiêu chuẩn vincristine đối khối u này. Điều này cung cấp bằng chứng của việc sử dụng *B. racemosa* như một loại thuốc chống ung thư ở vùng Kerala, Ấn Độ [1].

Mười triterpenes, ba steroid và một dẫn xuất vitamin E đã được tách từ *B. maunwongyathiae* được đánh giá tiềm năng chống ung thư dựa trên sự ức chế biểu hiện ornithine decarboxylase do TPA gây ra, các hoạt động COX-1 và COX-2, và biểu hiện NF-κB luciferase gây ra bởi phorbol, cũng như kích hoạt yếu tố phản ứng chống oxy hóa qua trung gian biểu thức luciferase. Trong số các hợp chất này, taraxerol (**45**), 3-(E)-coumaroyl taraxerol (**56**) và α-tocopherylquinone (**68**) cho thấy tiềm năng ngăn ngừa hóa học đầy hứa hẹn. Hợp chất α-tocopherylquinone (**68**) ức chế hoạt động của ornithine decarboxylase do TPA gây ra với giá trị IC_{50} là 5,9 μM và tăng cường biểu hiện ARE với EC_{50} là 5,2 μM [41].

Năm 2009, năm hợp chất từ cặn MeOH của quả khô loài *B. racemosa* là racemosol A (**50**), isoracemosol A (**51**), 3β,15α,28-triacetoxyisoracemosol A, barringtogenol C (**7**) và axit bartogenic (**48**) không thể hiện tác dụng gây độc trên dòng tế bào HeLa và P388 D1 [38].

Năm 2010, hợp chất flavonoid glycoside là quercetin 3-O-rutinoside (rutin) (**22**) được tách từ quả của loài *B. racemosa* đã được khẳng định có hoạt tính chống tăng sinh đối với một số tế bào bạch cầu bao gồm JURKAT, MOLT 3, REH, và K562 và

kích thích apoptosis ở các dòng tế bào này. Mặt khác, hợp chất ít ảnh hưởng gây độc lên tế bào đơn nhân máu ngoại vi bình thường của người [2].

Năm 2013, hai loại nấm là EFB01 và EFB02 từ lá của loài *B. acutangula* được phát hiện có thể kìm hãm quá trình phát triển của TBUT người HT-29 [50].

Ragasa và các đồng nghiệp đã thử nghiệm tác dụng chống tăng sinh của 9 hợp chất tách được [8, 9] và cặn chiết dichloromethane từ loài *B. asiatica* lên dòng ung thư ruột kết ở người HCT 116. Nhìn chung, chỉ có germanicol (**41**), hỗn hợp axit betulinic (**43**), 22- O-tigloylcamelliagenin A (**83a**) có tác dụng gây độc lên dòng tế bào HCT 116 với IC_{50} tương ứng là 6,0 và 35,6 µg/mL và axit betulinic (**43**) có khả năng gây độc đối với TBUT biểu mô phổi ở người dòng A549 [3].

Hợp chất racemosol C và D (**91-92**) ngoài thử ức chế α-glucosidase tốt [39] còn được thử khả năng gây độc trên các dòng TBUT ở người MDA-MB-231, A-549, Hela và K-562. Kết quả thu được hợp chất **91-92** có thể gây độc trên dòng tế bào K562 có IC_{50} là 31,23 µM và 42,39 µM [39]. Cùng năm 2015, racemosol B (**89**), một triterpenoid khác từ thân của *B. racemosa* có hoạt tính gây độc yếu với A-549, MDA-MB-231, HeLa và K-562, với IC_{50} lần lượt là 64,03, 115,00, 90,44 và 54,02 mM [42].

Các cặn chiết ethyl acetate *B. acutangula*, trong thử nghiệm độc tế bào, tỷ lệ tử vong của tôm nước mặn được phát hiện tăng lên khi tăng nồng độ cho mỗi mẫu. Giá trị LC_{50} của cặn chiết ethyl acetat đã được xác định là 12,58 µg/ml, trong đó chỉ ra rõ ràng rằng cặn chiết gây độc đối với tôm nước mặn [51].

Năm 2016, cặn chiết *B. racemosa* cho thấy khả năng gây độc mạnh trên dòng TBUT MCF-7 với IC_{50} là 57,61 ± 2,24 µg/ml [52].

Polyphenol là nhóm chất có các hoạt tính chống ung thư đáng chú ý. Mặc dù không phải tất cả các polyphenol đều có hoạt tính này, tuy nhiên những polyphenol đã được phát hiện từ chi *Barringtonia* như kaempferol (**21**), mycricetin, (+) – epigallocatechin (**1**), axit gallic (**23**) và axit ellagic được báo cáo cho thấy có hoạt tính này [53].

Cặn chiết nước lá *B. racemosa* (BLE) đã được chứng minh là có hàm lượng axit gallic (GA) cao và BLE đã được chứng minh là có khả năng chống tăng sinh đối với tế bào Caco-2 (ung thư đại trực tràng). Nghiên cứu của tác giả ivanY. M. Ho chỉ ra cả BLE và GA đều ức chế tế bào Caco-2 theo liều lượng. Do cặn chiết lá *B. racemosa* giàu chất chống oxy hóa như axit gallic, axit ellagic, quercetin, axit protocatechuic và

kaempferol nên có khả năng thể hiện hoạt tính bằng cách nhắm mục tiêu trực tiếp vào sự biểu hiện của các gen có liên hệ tới sự phân hủy methylglyoxal tế bào và quá trình glycolytic. Kết quả chỉ ra tổng số 138 gen đã bị thay đổi đáng kể để đáp ứng với điều trị BLE ($p < 0,05$) với sự thay đổi lần lượt ít nhất là 1,5. SERPINE1 là gen điều chỉnh tăng đáng kể nhất với 2,8 lần trong khi HAMP là gen điều chỉnh giảm đáng kể nhất với 6,5 lần. Năm hướng tác động đến sự biểu hiện gen trong tế bào HepG2 đầu liên quan đến BLE là Methylglyoxal Degradation III, tiếp theo là VDR / RXR kích hoạt, kích hoạt TR / RXR, kích hoạt PXR / RXR và tạo gluconeogenesis. Sự biểu hiện của các gen mã hóa cho các enzym liên quan đến sự phân hủy methylglyoxal (ADH4, AKR1B10 và AKR1C2) và quá trình đường phân (ENO3, ALDOC và SLC2A1) đã được điều chỉnh đáng kể [54].

Triterpenoids là một nhóm chất phytochemical khác có đặc tính chống ung thư. Một số triterpenoit, bao gồm ursolic, axit oleanolic, axit betulinic (**43**), celastrol, pritimerin, lupeol (**44**) và avicins là những chất chống ung thư nổi tiếng [55]. Hai trong số các triterpenoit này, axit betulinic (**43)** [8] và lupeol (**44**) [37] có ở vỏ cây thuộc chi *Barringtonia* cho thấy khả năng vỏ cây có hoạt tính chống ung thư.

Hoạt động chống ung thư biểu mô buồng trứng ở người của hạt *B. racemosa.* Thử nghiệm MTT cho thấy độc tính tế bào phụ thuộc nồng độ. Nó đã được kiểm chứng khi tỉ lệ sống của tế bào giảm xuống khi nồng độ được tăng lên, với IC_{50} xác định ở 35,08 µg/mL. Sự có mặt của các alkaloid và flavonoid của loài *B. asiatica* được xem là các hợp chất tiềm năng gây ra tác dụng. Các các hợp chất tương tự có trong *B. racemosa* là được báo cáo trước đây là có hoạt động gây độc tế bào trên dòng tế bào MCF-7 với IC_{50} = 57,61 µg/mL [56].

Nghiên cứu của tác giả Vishal Kumar Dubey và cộng sự cho thấy axit bartogenic (BA) được chiết tách từ lá loài *B. racemosa* là một tác nhân chống khối u trong ung thư buồng trứng SKOV-3. Độc tính tế bào *in vitro* của BA và paclitaxel trên TBUT buồng trứng ở người (SKOV-3) được đánh giá bằng phương pháp MTT. Tiềm năng kháng u của BA, thuốc chống ung thư tiêu chuẩn (paclitaxel) và sự kết hợp BA với paclitaxel đã được đánh giá trên chuột SCID tích hợp SKOV-3. Phân tích hóa mô miễn dịch của NF-κB đã được thực hiện và phân tích trong các khối u SKOV-3. BA đơn lẻ và BA kết hợp với paclitaxel ức chế mạnh sự phát triển của khối u. IC_{50} của BA được tìm thấy là 15,72 µM. Tương tự, paclitaxel đã cho thấy khả năng chống khối u

đáng kể với IC_{50} là 3,234 μM. Điều trị paclitaxel, BA và kết hợp BA với paclitaxel được dung nạp tốt trong thời gian điều trị. Phân tích hóa mô miễn dịch của NF-κB trong các khối u SKOV-3 được điều trị bằng BA trong kết hợp với paclitaxel cho thấy khả năng kháng u hoàn hảo về mặt ức chế NF-κB. Kết quả của cho thấy BA thể hiện chống lại khối u trong việc hạn chế tế bào SKOV-3 và có độ an toàn đáng kể [57].

Mặc dù các terpenoit được biết đến với đặc tính chống ung thư, nhưng hàm lượng polyphenol cao cũng đáng được nghiên cứu thêm vì các hợp chất này cũng đã được chứng minh là có khả năng chống ung thư.

1.3.2. Các nghiên cứu theo hướng kháng viêm

Việc sử dụng quả và lá của *B. asiatica* và vỏ của *B. acutangula* trong điều trị truyền thống đối với bệnh thấp khớp và viêm nhiễm đã được ghi nhận. Quả loài *B. racemosa* thường được dùng trong y học Ấn Độ cho điều trị đau và kháng viêm thông qua phép ức chế PGE2, TNF-α, iNOS, COX-2 và kích hoạt yếu tố nhân NF-kB [58]. Cặn chiết methanol loài *B. racemosa* cũng được chứng minh có hoạt tính chống oxi hóa và kháng viêm [52, 54, 59].

Anna và cộng sự đã sử dụng thí nghiệm Griess để đánh giá mức độ ức chế oxit nitric trong tế bào lipopolysaccharide (LPS) và interferon (IFN) và tế bào RAW 264.7. Các cặn chiết khác nhau từ cặn chiết lá loài *B. racemosa* có khả năng ức chế tốt và chống oxy hóa nitric oxide (NO). Trong thử nghiệm Griess, các cặn chiết không phân cực như dịch cloroform và hexan là chất ức chế mạnh NO ở các nồng độ khác nhau (25, 50, 100 và 200 μg/ml) so với cặn chiết phân cực (cặn etanol). Cặn chiết cloroform không có tác dụng gây độc trên dòng tế bào RAW 264.7 ở các giải nồng độ, ngược lại so với cặn chiết hexan và etanol [60].

Chandra Mohan. S và cộng sự đã thử hoạt tính kháng viêm của cao ethanol lá cây *B. acutangula* bằng phương pháp ổn định màng tế bào hồng cầu người (HRBC)và và chống viêm khớp phương pháp biến tính protein huyết thanh bò và phương pháp biến tính albumin của trứng, đối chứng sử dụng thuốc chống viêm tiêu chuẩn Diclofenec. Nhóm tác giả nghiên cứu đã báo cáo dịch chiết lá *B. acutangula* ở nồng độ 10, 20, 30, 40 và 50 μg/mL cho thấy 29,95, 43,97, 47,63, 48,66 và 49,69% bảo vệ HRBC trong dung dịch nhược trương với IC_{50} là 43,71 μg/mL, trong khi diclofenac chuẩn ở 20, 40, 60, 80 và 100 μg/mL cho thấy 56,28, 60,14, 67,49, 72,78 và 78,69% với IC_{50} là IC_{50} là 0,592). Trong phương pháp biến tính albumin trứng, cặn chiết *B.*

acutangula ở nồng độ 10, 20, 30, 40 và 50 µg/mL cho thấy ức chế 37,57, 44,16, 60,57, 66,24 và 70,98% đối với sự biến tính albumin của trứng (IC_{50} là 23,36); trong khi đó, diclofenac chuẩn 20,40, 60, 80 và 100 µg/mL cho thấy 47,76, 57,71, 63,89, 75,87 và 84,81% ức chế biến tính albumin (IC_{50}: 25,31). Kết quả chỉ ra có tác dụng ức chế sự biến tính albumin của trứng mạnh hơn so với thuốc kháng viêm diclofenac và có các hoạt động kháng viêm *in vitro* tốt [61].

Minkyeong Jo và cộng sự đã đánh giá khả năng kháng viêm của dịch chiết methanol của lá và thân cây loài *B. angusta* trong *in vitro, in vivo* một cách có hệ thống đối với tế bào RAW264.7. Kết quả thu được cho thấy cặn chiết này có tác dụng ức chế sản xuất NO một cách phụ thuộc vào liều lượng (IC_{50} là 123,33 µg/mL (LPS) và 46,89 µg/mL (Pam3CSK4)) mà không ảnh hưởng tới khả năng sống của tế bào. Sự biểu hiện phiên mã của iNOS, IL-1β, COX-2, IL-6, và TNF-α và quá trình phosphoryl hóa Src, IκBα, p50 / 105 và p65 bị Ba-ME ức chế. Cặn chiết nhắm mục tiêu cụ thể đến protein Src bằng cách liên kết với miền SH2 của nó. Hơn nữa, cặn chiết methanol của lá và thân cây loài *B. angusta* cải thiện đáng kể các tổn thương viêm trong mô hình viêm dạ dày do HCl/EtOH. Vì vậy cặn chiết từ loài *B. angusta* có tiềm năng như một loại thuốc kháng viêm [62].

Trong một công bố khác cặn chiết *B. augusta* Kurz (BKE) được đánh giá khả năng kháng viêm và chống oxy hóa sử dụng lipopolysaccharide (LPS) và RAW 264.7. BKE ức chế oxit nitric gây ra bởi LPS (NO) và NO cảm ứng biểu hiện tổng hợp mà không tác động đến tế bào RAW 264.7. Ngoài ra, BKE cho thấy 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl và 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) khả năng thu gom gốc và ức chế phản ứng gây ra bởi LPS sản xuất oxy của các loài trong tế bào RAW 264,7. BKE cũng ngăn chặn sự phosphoryl hóa do LPS gây ra của IκB kinase và NF-κB và chuyển vị p65 từ tế bào sang nhân trong tế bào RAW 264,7. Những kết quả này cho thấy BKE là một nguyên liệu mới có thể có tác dụng chống oxi hóa và chống viêm có lợi dựa trên ức chế các con đường tín hiệu NF-κB [63].

1.3.3. Các nghiên cứu theo hướng khác

Ngoài ra, cặn chiết từ loài *B. acutangula* và loài *B. asiatica* còn phát hiện có tác dụng kháng vi sinh vật kiểm định [5-7]. Cao chiết loài *B. racemosa* có tác dụng giảm đau và kháng u [1, 64]. Cặn chiết MeOH loài *B. acutangula* cũng được khẳng định có

khả năng giảm đau, chống tiêu chảy, và giảm đau hệ thần kinh trung ương ở chuột [65].

Khan và các đồng nghiệp sử dụng các phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch để thử hoạt tính kháng khuẩn của cặn chiết ethanol của rễ *B. racemosa* hoạt động mạnh trong việc ức chế phát triển của 19 chủng vi khuẩn [5, 66]. Để kiểm tra kháng sinh các hoạt động của chiết xuất methanol thô của *B. asiatica* (lá, hoa quả, hạt, thân và vỏ rễ) trong các cặn chiết (dichloromethan, ethyl acetate, và buthanol) nhận thấy tất cả các cặn chiết đều thể hiện mức độ của hoạt động kháng khuẩn phổ rộng rất tốt [5].

Các cặn chiết ether dầu và ethyl acetate của được đánh giá có hoạt tính kháng nấm, kháng khuẩn, độc tế bào và chống oxy hóa. Khả năng kháng khuẩn và kháng nấm đã được đánh giá sử dụng phương pháp khuếch tán đĩa thạch trong thời gian ủ khác nhau. Khả năng kháng khuẩn được thử nghiệm trên 16 loại vi khuẩn Gram dương và Gram âm, kết quả là dịch chiết ete dầu của loài *B. acutangula* có tác dụng tốt trừ *Bacillus polymyx, Shigella boydii* và *Klebsiella* sp. Bên cạnh đó, cặn chiết ethyl acetate của vỏ loài *B. acutangula* có khả năng kháng nấm [51]. Hợp chất **(24**) ở trên được phát hiện có khả năng kháng một số chủng vi sinh vật kiểm định [66].

Năm 2007, axit bartogenic (**48**) từ loài *B. racemosa* lần đầu tiên được thử nghiệm phát hiện có tác dụng ức chế α-glucosidase và amylase [4].

Năm 2015, hai hợp chất racemosol C và racemosol D (**11, 12**) được phát hiện ức chế hoạt động của AGH gây bệnh đái tháo đường ở IC_{50} là 5,6 và 45,38 µM [39].

Năm 2015, nhóm tác giả Zaman K. A và Khalid A. A. (Bangladesh) đã nghiên cứu định tính và tác dụng chống oxi hóa trong chất ổn định DPPH của cặn chiết etanol từ lá và vỏ loài Chiếc đỏ *B. acutangula*. Kết quả là IC_{50} của dịch chiết lá là 1,0 µg/ml của vỏ là 5 µg/ml so với chất chuẩn là ascobic acid có IC_{50} là 3,16 µg/ml [67].

Các dịch chiết ete dầu hỏa, ethyl acetatevà methanol của *B. acutangula* biểu hiện hoạt tính thu dọn gốc tự do mạnh với IC_{50} tương ứng là 10,50, 9,83 và 3,84 µg/ml khi so sánh với chất chuẩn dương axit ascorbic (IC_{50} = 10,92 µg/ml) [51].

Trong nghiên cứu của Nazneen Ahmeda Sultana và cộng sự công bố năm 2019 đã đánh giá chất phytochemical, hoạt động kháng khuẩn, chất chống oxy hóa, chất độc tế bào và thuốc tẩy giun sán của chiết xuất vỏ cây *B. acutangula*. Nghiên cứu sử dụng 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazil (DPPH) để đánh giá khả năng thu dọn gốc tự do. Tác dụng gây độc tế bào được xác định bằng xét nghiệm sinh học khử độc tính bằng nước

muối. Đánh giá hoạt động tẩy giun sán được so sánh với piperazine citrate chuẩn đối chiếu. Kết quả nghiên cứu hóa thực vật từ dịch chiết loài gồm có: glycoside, alkaloid và flavonoid trong khi steroid, tannin và saponin không có. Kết quả chỉ ra dịch chiết có tác dụng thu dọn (IC_{50} = 53,80 µg/ml) trong khi axit ascorbic là 20,83 µg/ml; Hoạt tính kháng khuẩn tốt chống lại *B. megaterium* và *Vibrio parahaemolyticus* nhưng yếu đối với *B. cereus, V. mimicus* và *Salmonella typhi*; Hoạt động gây độc tế bào của các chất chiết xuất đã đánh giá bằng thử nghiệm sinh học khử độc tính của tôm nước mặn. Các tác dụng của chiết xuất phụ thuộc vào liều lượng. Trong thí nghiệm giá trị LC_{50} từ dịch chiết là 5,82 µg/mL trong khi vincristin sulphat chuẩn LC_{50} là 0,003 µg/mL. Đánh giá hoạt tính tẩy giun sán đã được so sánh với piperazine citrate, dịch chiết có khả năngtẩy giun sán vừa phải và phụ thuộc liều lượng. Dịch chiết methanol của vỏ cây *B. acutangula* gây tê liệt 22,33 phút. và thời gian chết lúc 45,00 phút so với Pheretima posthuma. Thuốc đối chứng piperazine citrate cho thấy thời gian tê liệt và chết là 25,00 và 64,00 phút [68].

Bệnh gút được xếp vào một loại bệnh viêm khớp được kích hoạt bởi sự tích tụ của các tinh thể urat tại hoạt dịch chất lỏng của khớp và mô. Sự lắng đọng của uric dư thừa axit và không đào thải được axit uric ra khỏi cơ thể là hai yếu tố chính phát triển bệnh gút. Nghiên cứu về một số loại cây dùng làm rau và thuốc dân gian của Malaisia trong đó có dịch chiết *B. racemosa* cho thấy khả năng kháng gút thông qua thử nghiệm *in vitro* sử dụng phương pháp ức chế xanthine oxidase ở các nồng độ khác nhau. Cao nhất là ức chế xanthine oxidase được ghi nhận ở 100 µg/mL của dịch chiết n-hexane của *B. racemosa* (51,34±0,19%) và dịch chiết etyl axetat của *B. racemosa* (56,97±1,66%) và dịch chiết metanol của *B. racemosa* (97,68±0,06%) [69].

Nghiên cứu của tác giả Âu Dương Tuyết Mai và cộng sự công bố năm 2020 đã đánh giá hiệu quả làm giảm nồng độ glucose trong máu của cao chiết *B. acutangula* thông qua mô hình chuột đái tháo đường để góp phần phát triển các nguyên liệu mới trong sản xuất các sản phẩm có tác dụng hỗ trợ và điều trị bệnh. Cây lộc vừng có độ ẩm là 72,25% và cao chiết etanol có độ ẩm là 3,05%. Cao chiết cây lộc vừng có chứa các hợp chất sinh học như terpenoid, flavonoid, tannin, alkaloid và saponin. Cao chiết cây lộc vừng hoàn toàn an toàn và không độc tính với chuột sau 3 ngày thí nghiệm với liều Dmax = 2000 mg/kg. Cao lộc vừng ở liều 250 và 500 mg/kg có khả năng làm giảm hàm lượng glucose huyết, đạt 211 mg/dL và 183 mg/dL so với lô đối chứng

(bệnh lý) hàm lượng glucose đạt 367mg/dL. Kết quả là sử dụng liều 250 và 500 mg/kg đạt hiệu quả ở mô hình chuột bị tăng đường huyết do sử dụng streptozotocin sau 14 ngày. Các chỉ số về sinh hóa như: Ure, Creatinine, Cholesterol, triglyceride, HDL-C và LDL-C được kiểm tra và phân tích đều đạt tiêu chuẩn khi so sánh với lô đối chứng (không bệnh lý). Cao chiết cây lộc vừng có hiệu quả cải thiện hàm lượng glucose huyết trên mô hình chuột bị tăng gluco huyết [70].

Một công bố năm 2019 cho thấy cặn ethanol lá của *B. acutangula* thể hiện hoạt tính chống đái tháo đường. Chuột để nhịn ăn trong 24 giờ và đã được tiêm alloxan monohydrat 37mg/mL với liều 150mg/kg thể trọng. Sau 48 giờ dùng thuốc, chuột mắc bệnh tiểu đường tăng lượng đường trong máu và nước tiểu (tức là đường huyết cao hơn 300 mg/mL). Các con chuột được duy trì ở trạng thái tiểu đường trong khoảng thời gian 21 ngày. Glucose huyết thanh được đo bằng kiểm tra Glucometer Accu. Những con chuột có nồng độ đường huyết lúc đói (> 250 mg/dL) được chọn để nghiên cứu. Kết quả là cặn etanol lá *B. acutangula* không gây độc với chuột nhưng có thể làm giảm đáng kể đường huyết, cholesterol toàn phần và chất béo trung tính trong huyết thanh. Dịch chiết nước *B. acutangula* cho kết quả tương tự so với cặn chiết etanol. Những kết quả này biểu hiện các hợp chất tách từ phần nước và etanol của lá *B. acutangula* có thể chống bệnh tiểu đường nên đã được đề xuất để tạo một số dạng sản phẩm như trà có thể giúp kiểm soát bệnh tiểu đường [71].

Các saponin triterpene có trong vỏ và hạt của *B. acutangula* ức chế 11B-HSD1 và phần cặn chiết đa hợp chất được làm giàu này có thể là phác đồ điều trị hiệu quả cho bệnh đái tháo đường típ 2, béo phì và MetS. Mười hai hợp chất từ vỏ, hạt quả và lá của *B. acutangula* được xác định là saponin triterpene và có tác động đến 28 phân tử protein liên quan đến bệnh đái tháo đường típ 2, béo phì và MetS đó là HSD11B1, HSD11B2, HMGCR, AKR1B10, AR, ALOX15, CYP19A1, CYP17A1, LSS, NR1H3, PTPN1, PTGS1, PTAFR, PRKCA, PRKCE, F2RL1, ATP5B, HSP90AA1, ATP2A2, SQLE, FDFT1, XDH, ATP1A1, ATP1A2, PPP2R5D, PPP2CA, PPP1CC, STAT3 [72].

Nghiên cứu mới nhất năm 2022 của Nur A Sitohang đã đánh giá gel chiết xuất từ hạt *B. racemose* có hiệu quả trong việc đẩy nhanh quá trình lành vết thương trên chuột cống trong thí nghiệm *in vivo*. Kết quả là điều trị trên chuột bởi công thức gel

chứa 7 ppm chiết xuất hạt *B. racemosa* có khả năng chữa lành vết thương nhanh hơn so với điều trị bằng thuốc Metcovazin tại chỗ [73].

Như vậy, các loài *Barringtonia* trên thế giới đã được phát hiện có nhiều tác dụng sinh học tiềm năng như kháng vi sinh vật kiểm định, chống gây độc tế bào, oxi hóa, ức chế enzym α-glucosidase, giảm đau... Tuy vậy, các nghiên cứu về TPHH và hoạt tính sinh học vẫn chưa đầy đủ, hệ thống và mới chủ yếu tập trung vào 03 loài: *B. acutangula, B. asiatica và B. racemosa*. Thành phần chính đã được ghi nhận từ các loài này đa phần là các hợp chất thuộc khung tritecpene với cấu trúc hóa học thú vị, các saponin và một số hợp chất ditecpenoide dạng khung *neo*-clerodan và rất ít hợp chất khung flavonoid.

Về nghiên cứu để làm nguyên liệu cho sản xuất thuốc thì hiện tại các nghiên cứu đa phần chỉ dừng lại là nghiên cứu phân đoạn chiết các loài của chi *Barringtonia*, có rất ít tài liệu nghiên cứu sâu về tách các hợp chất tinh khiết và thử các tác dụng sinh học.

Từ đó nhận thấy: Nghiên cứu bước đầu Nguyễn Văn Dư về TPHH của loài *B. acutangula* ở Việt Nam phát hiện hợp chất flavan-3-ol, điều này gợi mở cho khả năng về tính đặc thù về TPHH của các loài *Barringtonia* ở Việt Nam so với các loài tương ứng trên thế giới, tiềm năng nhiều hợp chất mới, có hoạt tính sinh học hấp dẫn sẽ được tìm thấy ở những loài của Việt Nam trong quá trình nghiên cứu sâu hơn.

CHƯƠNG 2: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu của luận án là hai loài Chiếc đỏ (*Barringtonia acutangula* (L.) Gaertn.) và Chiếc chùm (*B. racemosa* (L.) Spreng) ở Việt Nam.

2.1.1. Loài Chiếc đỏ *B. acutangula*

Hình 2.1. Ảnh loài *B. acutangula* (L.) Gaertn.

- Số hiệu: PL01
- Nơi thu: xã Lộc Trì, huyện Phú Lộc, tỉnh Thừa Thiên Huế
- Thời gian: 17/08/2016
- Người thu: Nguyễn Thế Cường & c.s.
- Người định loại và mô tả: TS. Nguyễn Thế Cường, Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật

2.1.2. Loài Chiếc chùm *B. racemosa*

Hình 2.2. Ảnh loài *B. racemosa* (L.) Spreng

- Số hiệu: BH01

- Nơi thu: Biên Hòa, Đồng Nai

- Thời gian: 25/08/2016

- Người thu: Nguyễn Thế Cường & c.s.

- Người định loại và mô tả: TS. Nguyễn Thế Cường, Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1 Phương pháp phân lập các hợp chất

2.2.1.1. Sắc kí lớp mỏng (TLC)

TLC là phương pháp hiệu quả để phân tích và phát hiện số lượng các nhóm chất khác nhau có trong thành phần dịch chiết thực vật hoặc các phân đoạn tách ra. TLC là phương pháp sử dụng bản mỏng tráng sẵn DC – alufolien 60 F_{254} (1.05554.0001, Merck), RP-18 F_{254s} (1.15685.0001, Merck), các vệt chất được quan sát bằng đèn tử ngoại tại các bước sóng 254 và 365 nm hoặc dùng các dung dịch thuốc thử phun đều lên bản mỏng sau đó sấy khô rồi đốt nóng từ từ bằng máy khò đến khi vệt chất hiện màu.

2.2.1.2. Sắc kí lớp mỏng điều chế

Sắc kí lớp mỏng điều chế sử dụng bản mỏng tráng sẵn silica gel 60G F_{254} (Merck 1,05875) vệt chất được phát hiện bằng đèn tử ngoại tại các bước sóng 254 và 365 nm, hoặc cắt rìa bản mỏng để phun dung dịch H_2SO_4 10%, hơ nóng để xác định vệt chất, ghép lại bản mỏng để phát hiện vùng chất, sau đó tiến hành cạo lớp silica gel có chất, giải hấp phụ thu được các hợp chất.

2.2.1.3. Sắc kí cột (CC)

Sắc ký cột là phương pháp thường quy được dùng để tách phân đoạn, tinh chế các nhóm chất, các hợp chất sạch khác nhau từ dịch chiết hỗn hợp ban đầu. Các chất có trọng lượng và kích cỡ phân tử khác nhau cũng như có cấu trúc hóa học khác nhau sẽ được tách thành các phân đoạn hóa học khác nhau. Pha tĩnh là silica gel pha thường 0.040-0.063 mm (240-430 mesh), pha đảo (ODS-A, 12 nm S-150 μm, YMC Co., Ltd., Japan) và Sephadex. Nhựa trao đổi ion Diaion HP-20 (Supelco, Bellefonte, PA, USA). Pha động là các dung môi hữu cơ như *n*-hexane, methanol, diclomethane....

2.2.1.4. Sắc kí lỏng trung áp (MPLC)

Thực hiện trên máy Biotarg-Isolera của Viện Hóa sinh biển.

2.2.1.5. Sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC)

Các thí nghiệm được thực hiện trên hệ thống HPLC phân tích Agilent 1200 series và sắc ký lỏng điều chế Preparative HPLC-Agilent 1200 series được sử dụng để phân tích và làm sạch các hợp chất tại Viện Hóa sinh biển.

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

Xác đinh cấu trúc hóa học các hợp chất dựa trên kết hợp các thông số vật lý với các giá trị phổ bao gồm:

2.2.2.1. Phổ khối lượng phân giải cao

Phổ HR-ESI-MS đo trên thiết bị Varian 910 FT-ICR mass specttrometer (CA, USA) thuộc Viện Hóa học và Agilent 6530 Accurate-Mass spectrometer (CA, USA) thuộc viện Hóa sinh biển.

2.2.2.2. Phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR)

- Phổ NMR được đo trên máy Bruker AM 500 và AVANCE III HD 500 FT-NMR spectrometer (Đức) của Viện Hóa học. Chất chuẩn nội sử dụng là Tetrametyl Silan (TMS).

- Các phổ NMR được dùng gồm có:

Phổ NMR 1 chiều: ^{13}C-NMR, ^{1}H-NMR, 1D TOCSY.

Phổ NMR 2 chiều: HSQC, HMQC, HMBC, NOESY, ^{1}H-^{1}H COSY, 2D TOCSY.

Dung môi được sử dụng: CD_3OD, DMSO-d_6, pyridin-d_5.

2.2.2.3. Độ quay cực $[\alpha]_D$

Độ quay cực được ghi trên thiết bị JASCO P-2000 Polarimeter của Viện Hóa sinh biển.

2.2.3. Phương pháp đánh giá hoạt tính sinh học

Phương pháp thử tác dụng kháng viêm qua sự ức chế tạo thành nitric oxide (NO) và đánh giá tác dụng gây độc TBUT được tiến hành tại Viện Hóa sinh biển và Viện Công nghệ sinh học.

2.2.3.1. Phương pháp đánh giá hoạt tính kháng viêm

Các hợp chất được thử khả năng kháng viêm dựa trên sự ức chế tạo thành nitric oxide (NO) trên dòng tế bào RAW264.7 theo phương pháp của Dirsch [74] cụ thể như sau:

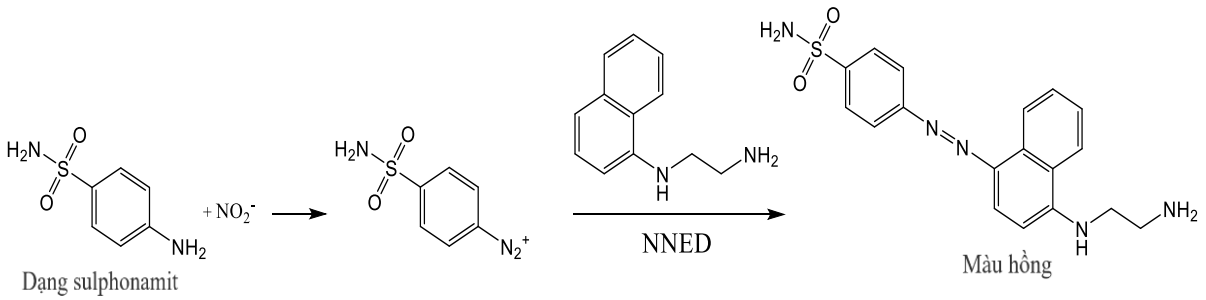
Chuẩn bị mẫu: Các hợp chất được pha thành dung dịch gốc với nồng độ 100 mM trong DMSO, sau đó pha loãng ở các nồng độ khác nhau.

Nguyên lý:Gốc tự do •NO được tạo ra ở nhiều tế bào khác nhau. Dạng •NO cảm ứng có mặt ở nguyên bào sợi, tế bào gan, hay đại thực bào thường được tạo ra với lượng lớn khi có các đáp ứng viêm.

Một phương pháp được dùng để tính gián tiếp •NO là đo cường độ màu các thành phần sản phẩm của nó (nitrat và nitrit). Phản ứng này đòi hỏi nitrat (NO_3^-) trước tiên được giảm về nitrit (NO_2^-), dưới tác động của nitrat reductaza.

$$\underset{\text{Nitrat}}{NO_3^-} \xrightarrow{\text{Nitrat reductaza}} \underset{\text{Nitrit}}{NO_2^-}$$

Nitrit được phát hiện và phân tích thông qua tạo ra màu hồng đỏ khi mẫu thử có chứa NO_2^- với thuốc thử Griess.



Khi thêm axit sulphanilic, nitrit tạo thành muối diazonium, sau đó các thuốc nhuộm azo (N-alpha-naphthyl-ethylenediamin) được bổ sung để tạo ra màu hồng.

Các bước thực hiện: Nuôi cấy tế bào RAW264.7 trong 48 giờ với môi trường DMEM ở 37°C, 5% CO_2 với 10% FBS, penixilin (100 U/mL) và streptomyxin sulphat (100 µg/mL). Sau đó chúng được nuôi cấy ở giếng phiến 96 với thể tích là 200 µl, mật độ $2{,}5 \times 10^5$ tế bào/giếng. Sử dụng 0,1 mg/mL LPS để kích thích tế bào trong 24 giờ dưới sự có mặt của các mẫu thử ở nhiều nồng độ, pha sẵn trong DMSO. Thuốc thử Griess phản ứng với dịch nổi của tế bào. $NaNO_2$ ở các nồng độ (5, 10, 20, 40, 80, 160 µg/mL) được dùng để xây dựng đường chuẩn. Đo độ hấp thụ ở 570 nm.

Tính giá trị IC_{50}: Nồng độ ức chế 50% (IC_{50}) được xác định trên bằng thử nghiệm với 05 nồng độ là 1, 3, 10, 30 và 100 µM. Giá trị IC_{50} được tính theo phương pháp hồi quy không tuyến tính sử dụng phần mềm Graphpad Prism 6.0.

2.2.3.2. Phương pháp đánh giá hoạt tính gây độc tế bào

Nuôi cấy tế bào *in vitro*:

- Các dòng TBUT được nuôi cấy dưới dạng đơn lớp trong môi trường DMEM với thành phần: 10 mM HEPES, 2 mM L-glutamine và 1,0 mM sodium pyruvate, có bổ sung 10% FBS (hãng GIBCO).

- Sau 3 đến 5 ngày, tế bào được cấy chuyển với tỉ lệ (1/3) và được nuôi trong tủ ấm CO_2 ở 37^oC, 5% CO_2.

Phép thử xác định tính độc tế bào SRB được tiến hành theo phương pháp của Monks (1991) [75], bằng xác định hàm lượng protein tế bào tổng số thông qua mật độ quang học (Optical Density - OD) đo được khi nhuộm thành phần protein của tế bào với Sulforhodamine B (SRB). Giá trị OD đo được tỉ lệ thuận với lượng SRB đã gắn với phân tử protein, do vậy lượng tế bào càng nhiều thì giá trị OD càng lớn và ngược lại. Các bước tiến hành:

Chuẩn bị stock chất thử bằng cách pha chất thử với DMSO thành nồng độ là 20 mg/mL. Sau đó các chất thử được pha loãng trong DMSO 10% (DMSO 10% được pha loãng bằng nước cất khử trùng) thành giải nồng độ giảm dần (2000, 400, 80 và 16 µg/mL). Tế bào được trypsin hóa để làm rời tế bào và tiến hành đếm trong buồng đếm để thay đổi mật độ đáp ứng yêu cầu của thí nghiệm. Đưa vào các giếng của đĩa 96 giếng chất thử đã pha ở các nồng độ, thêm tế bào với nồng độ phù hợp nêu trên vào các giếng này để cho nồng độ chất thử trong giếng là 100; 20; 4 và 0.8 µg/ml. Ủ 48 giờ trong tủ ấm. Giếng không có chất thử nhưng có TBUT (180µl) sẽ được dùng làm đối chứng ngày 0. Sau 1 giờ, tế bào ở giếng đối chứng ngày 0 sẽ được cố định bằng TCA (Trichloracetic acid). Sau 48 giờ, tế bào được cố định trong 1 giờ bằng TCA, được nhuộm 30 phút bằng SRB trong ở 37 ^oC, rửa bằng acetic acid 3 lần rồi để khô ở nhiệt độ phòng. Tiếp tục cho 10 mM unbuffered Tris base để hòa tan lượng SRB, lắc nhẹ trong 10 phút. Kết quả OD được đọc trên máy ELISA Plate Reader (Bio-Rad) ở bước sóng 515-540 nm.

Tính toán kết quả:

% ức chế sự phát triển của tế bào với sự có mặt chất thử sẽ được tính bằng công thức sau:

$$\% \text{ ức chế} = 100\% - \frac{[OD(\text{chấtthử}) - OD(\text{ngày } 0)] \times 100}{OD(\text{đốichứngâm}) - OD(\text{ngày } 0)}$$

Lặp lại 3 lần phép thử để đảm bảo tính chính xác. Ellipticine/camptothecin ở các nồng độ 10; 2; 0,4; 0,08 μg/ml được dùng làm chất chuẩn dương; DMSO 10% luôn được dùng như chất chuẩn âm. Giá trị IC_{50} sẽ được tính bằng phần mềm TableCurve 2Dv4.

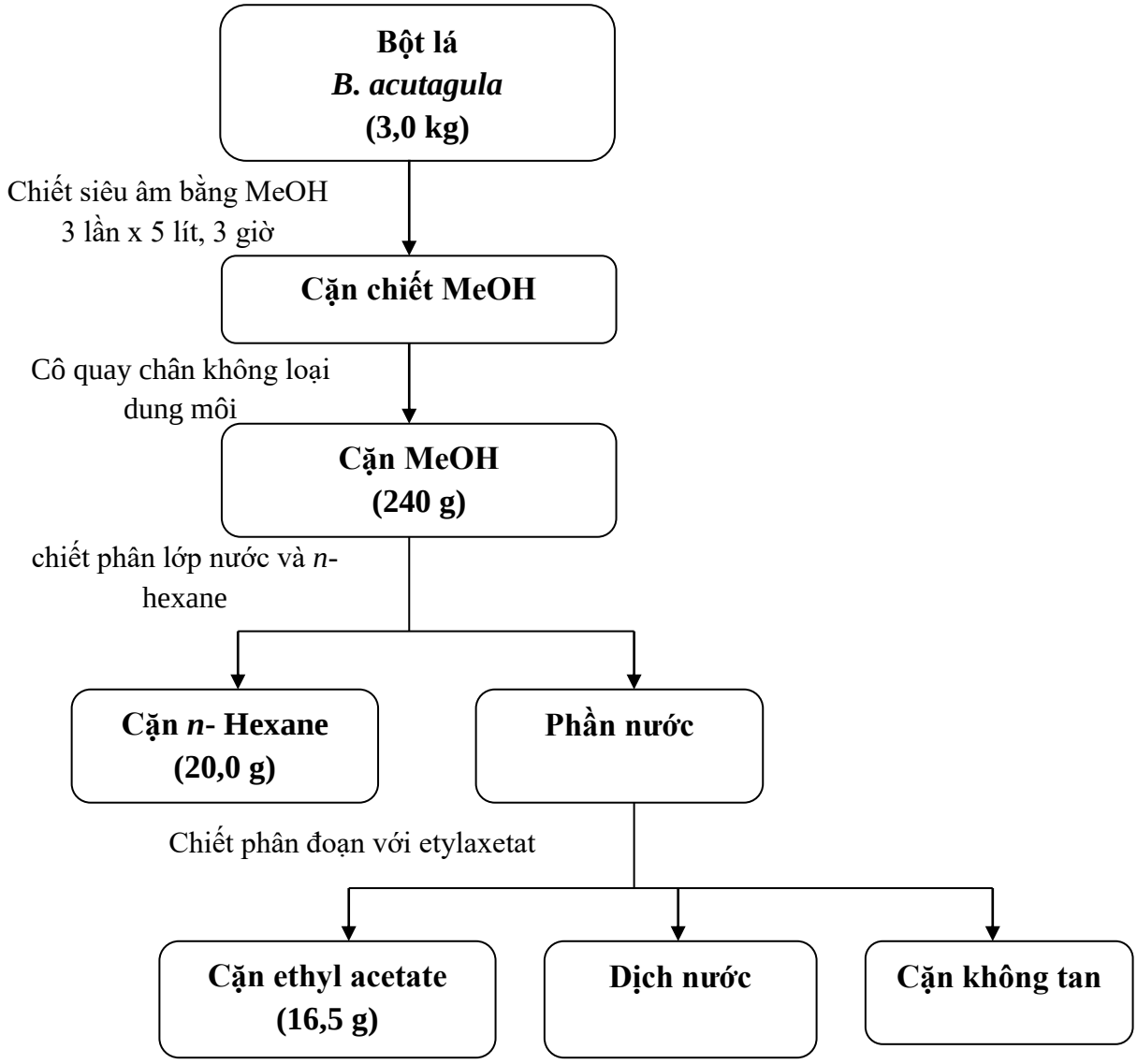
- Các dòng tế bào MCF-7 và LNCa được cung cấp bởi GS. TS. J. M. Pezzuto, Trường Đại học Long-Island (Mỹ) và GS. Jeanette Maier, trường Đại học Milan (Italia).

CHƯƠNG 3: THỰC NGHIỆM

3.1. Phân lập các hợp chất

3.1.1. Phân lập các hợp chất từ loài *B. acutangula*

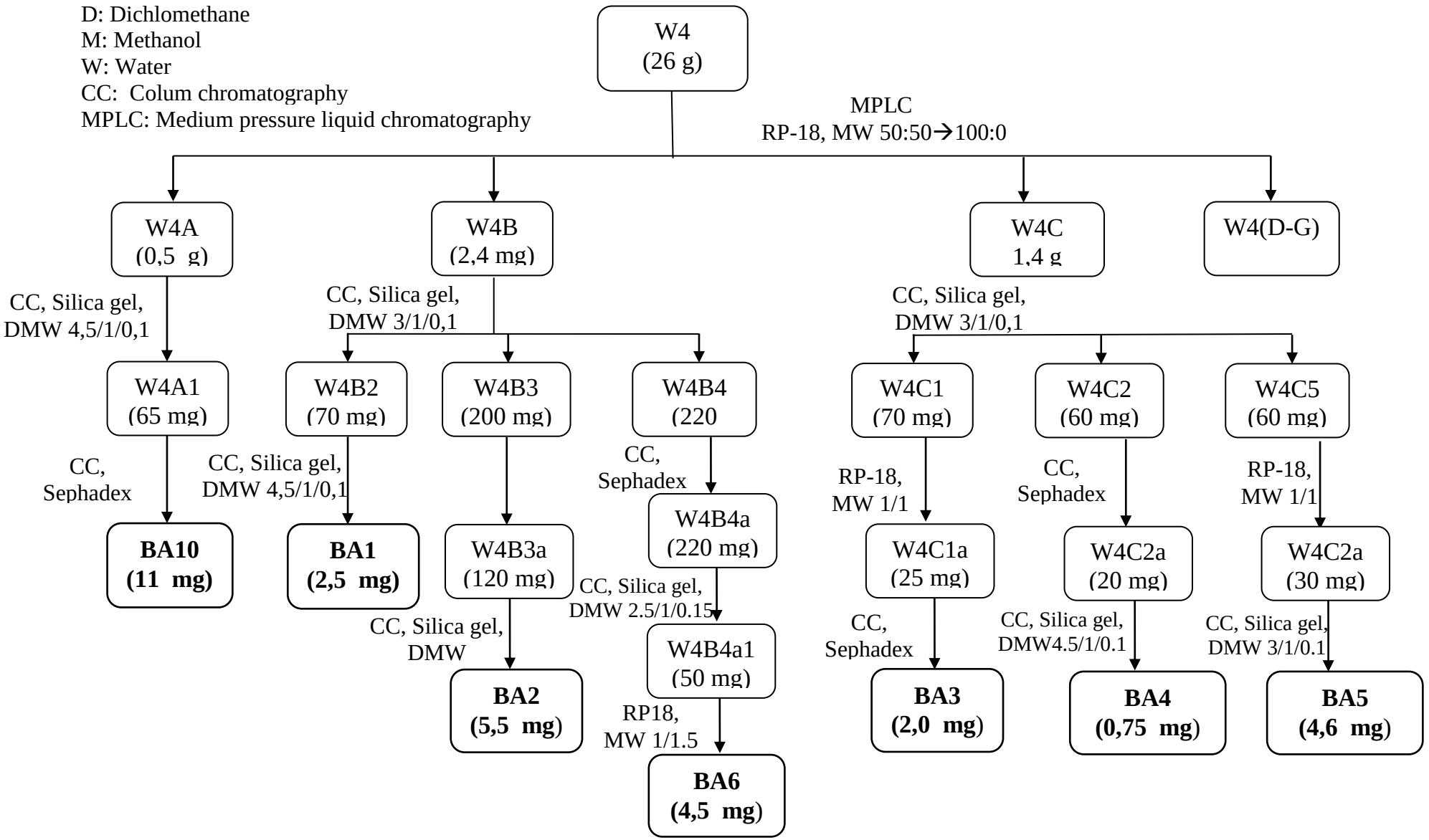
Lá loài *B. acutangula* được làm sạch, sấy khô ở nhiệt độ thấp hơn 50^{o}C, sau đó nghiền nhỏ tạo thành bột. Bột khô (3,0 kg) lá loài *B. acutangula* được đem chiết siêu âm 3 lần với 5 lít methanol mối lần chiết trong 3 giờ, rút và lọc cặn chiết sau đó cô quay đuổi dung môi thu được 240 g cặn chiết methanol. Hòa 400 g cặn chiết MeOH được phân bố vào nước và chiết lỏng-lỏng với các dung môi *n*-henxane, dichloromethane thu được ba phân đoạn: cặn *n*-hexane (20,0 g), 16,5 g cặn CH_2Cl_2 dịch nước và cặn không tan (Hình 3.1).



Hình 3.1. Sơ đồ chiết phân đoạn mẫu loài *B. acutangula*

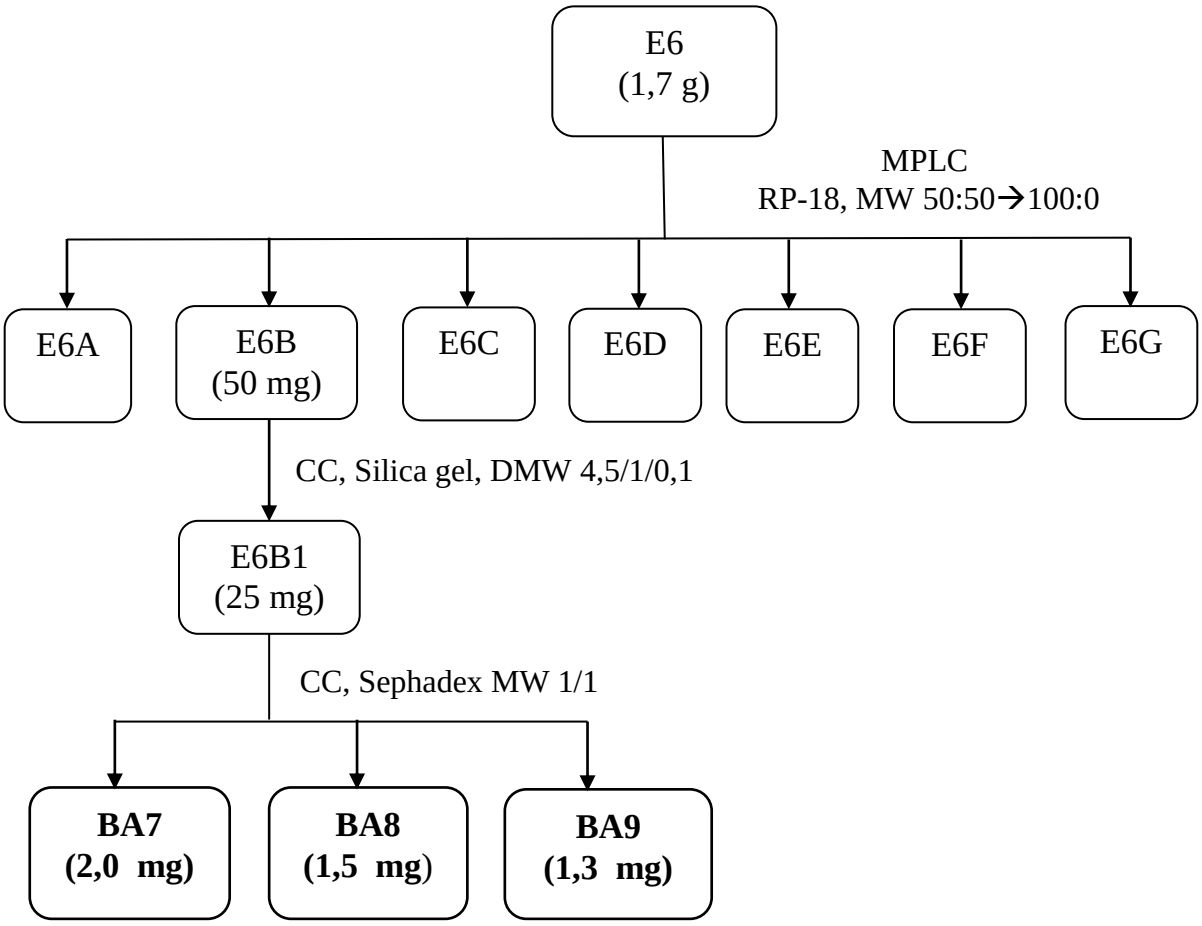
Phần dịch nước được tách trên cột Diaion chạy gradient với hệ dung môi là 100% nước → methanol:nước (25/75) (v/v) → methanol:nước (50/50) (v/v) → 100%

methanol nhận được 04 phân đoạn từ W1→W4. Phân đoạn W4 được tách trên RP-18 MPLC với hệ dung môi methanol:nước (1:1) (v/v) nhận được 7 phân đoạn W4A→W4G. Phân đoạn W4A (0,5 g) được phân tách tiếp bằng cột sắc ký silica gel hệ dung môi DMW (3:1:0,1) (v/v/v), sau đó chạy cột sephadex với hệ dung môi MW (1:1, v/v) nhận được **BA10** (11 mg). Phân đoạn W4B (2,4 g) được phân tách trên cột sắc ký nhồi silica gel với DMW (3:1:0,1) (v/v/v) nhận được 4 phân đoạn W4B1 (320 mg), W4B2 (70 mg), W4B3 (200 mg) và W4B4 (220 mg). Phân đoạn W4B2 (70 mg) được chạy tiếp cột RP-18 hệ dung môi MW (1:1) (v/v) nhận được hợp chất **BA1** (2,5 mg). Phân đoạn W4B3 (200 mg) được đưa lên cột sephadex với hệ dung môi MW (1,5:1) (v/v) nhận được phân đoạn W4B3a (120 mg) và làm sạch trên cột sắc ký silica gel rửa giải bằng DMW (2,5:1:0,1) (v/v) nhận được hợp chất **BA2** (5,5 mg). Phân đoạn W4B4 (220 mg) được tách trên cột Sephadex LH-20 với hệ dung môi MW (1,5:1) (v/v) nhận được phân đoạn W4B4a (120 mg). Phân đoạn W4B4a (120 mg) sau đó được phân tách trên cột silica gel pha thường sử dụng DMW (2.5:1:0,15) (v/v/v) nhận được phân đoạn W4B4a1 (50 mg). Phân đoạn W4B4a1 (50 mg) tiếp tục chạy cột sắc ký RP-18 hệ dung môi MW (1:1,5) (v/v) nhận được hợp chất **BA6** (4,5 mg). Phân đoạn W4C (1,4 g) được phân tách trên cột sắc ký silica gel hệ dung môi D:M:W (3:1:0,1) (v/v/v) nhận được 5 phân đoạn W4C1 (70 mg), W4C2 (60 mg), W4C3 (170 mg), W4C4 (150 mg) và W4C5 (60 mg). Phân đoạn W4C1 (70 mg) được đưa lên cột RP-18 hệ dung môi M:W (1:1) (v/v) và tinh chế tiếp trên cột sephadex hệ dung môi metanol:nước (1:1) (v/v) nhận được hợp chất **BA3** (2,0 mg). Phân đoạn W4C2 (60 mg) được chạy cột sephadex hệ dung môi M:W (1:1) (v/v) rồi tiếp tục chạy cột sắc ký pha thường hệ dung môi D:M:W (4,5:1:0,1) (v/v/v) nhận được hợp chất **BA4** (0,75 mg). Phân đoạn W4C5 (60 mg) được tách trên cột YMC hệ dung môi M:W (1:1) (v/v), sau đó tách tiếp trên cột pha thường với D:M:W (3:1:0,1) (v/v/v) nhận được hợp chất **BA5** (4,6 mg).



Hình 3.2. Sơ đồ phân lập các hợp chất từ phân đoạn nước W4 mẫu loài *B. acutangula*

Cặn ethyl acetate (16,5 g) được sắc ký lỏng trung áp silica gel chạy rửa giải gradient hệ dung môi D:M từ 100% D→100% M nhận được 08 phân đoạn E1→E8. Phân đoạn E6 (1,7 g) được tách trên máy MPLC sử dụng cột RP-18 pha động methanol:nước (1:1) (v/v) thu được 7 phân đoạn E6A→E6G. Phân đoạn E6B (50 mg) được tiếp tục chạy cột pha thường với dung môi D:M:W (4,5:1:0,1) (v/v/v), sau đó được tách tiếp trên cột sephadex với M:W (1:1) (v/v) thu được các hợp chất **BA7** (2,0 mg), **BA8** (1,5 mg) và **BA9** (1,3 mg).



Hình 3.3. Sơ đồ phân lập các hợp chất từ cặn etyl mẫu loài *B. acutangula*

3.1.2. Thông số vật lý và dữ kiện phổ của các hợp chất phân lập được từ loài *B. acutangula*

*3.1.2.1. Hợp chất **BA1**: Barringoside A (**Hợp chất mới**)*

Chất rắn màu vàng. Độ quay cực $[\alpha]_D^{25}$ – 35,0 (*c*, 0,05, MeOH)

Giá trị phổ ^{13}C-NMR (125 MHz, CD_3OD) và ^{1}H-NMR (500 MHz, CD_3OD): xem Bảng 4.1.1.

HR-ESI-MS: *m/z* 925,23789 $[M+Na]^+$

Tính toán lý thuyết cho ion $C_{42}H_{46}NaO_{22}^+$ là 925,23730.

*3.1.2.2. Hợp chất **BA2**: Barringoside B (**Hợp chất mới**)*

Trạng thái tập hợp: chất bột màu vàng. Độ quay cực $[\alpha]_D^{25}$– 33,0 (*c*, 0,05, MeOH)

Giá trị phổ ^{13}C-NMR (125 MHz, CD_3OD) và ^{1}H-NMR (500 MHz, CD_3OD): xem Bảng 4.1.2.

HR-ESI-MS: *m/z* 941,23281 $[M+Na]^+$

Tính toán lý thuyết cho ion $C_{42}H_{46}NaO_{23}^+$ là 941,23222.

*3.1.2.3. Hợp chất **BA3**: Barringoside C (**Hợp chất mới**)*

Trạng thái tập hợp: chất bột màu vàng. Độ quay cực $[\alpha]_D^{25}$– 21,0 (*c*, 0,05, MeOH)

Giá trị phổ ^{13}C-NMR (125 MHz, CD_3OD) và ^{1}H-NMR (500 MHz, CD_3OD): xem Bảng 4.1.3.

HR-ESI-MS: *m/z* 763,18505 $[M+Na]^+$

Tính toán lý thuyết cho ion $C_{36}H_{36}NaO_{17}^+$ là 763,18448.

*3.1.2.4. Hợp chất **BA4**: Barringoside D (**Hợp chất mới**)*

Trạng thái tập hợp: chất bột màu vàng. Độ quay cực $[\alpha]_D^{25}$– 41,0 (*c*, 0,05, MeOH)

Giá trị phổ ^{13}C-NMR (125 MHz, CD_3OD) và ^{1}H-NMR (500 MHz, CD_3OD): xem Bảng 4.1.4.

HR-ESI-MS: *m/z* 887,26099 $[M+H]^+$

Tính toán lý thuyết cho ion $C_{42}H_{47}O_{21}^+$ là 887,26044.

*3.1.2.5. Hợp chất **BA5**: Barringoside E (**Hợp chất mới**)*

Trạng thái tập hợp: chất bột màu vàng.. Độ quay cực $[\alpha]_D^{25}$– 50,0 (*c*, 0,05, MeOH)

Giá trị phổ ^{13}C-NMR (125 MHz, CD_3OD) và ^{1}H-NMR (500 MHz, CD_3OD): xem Bảng 4.1.5.

HR-ESI-MS: *m/z* 1031,30328 $[M+H]^+$

Tính toán lý thuyết cho ion $C_{48}H_{55}O_{25}^+$ là 1031,30270.

*3.1.2.6. Hợp chất **BA6**: Barringoside F (**Hợp chất mới**)*

Trạng thái tập hợp: chất bột màu vàng. Độ quay cực $[\alpha]_D^{25}$–55,0 (*c*, 0,05, MeOH)

Giá trị phổ ^{13}C-NMR (125 MHz, CD_3OD) và ^{1}H-NMR (500 MHz, CD_3OD): xem Bảng 4.1.6.

HR-ESI-MS: *m/z* 923,22224 $[M+Na]^+$

Tính toán lý thuyết cho ion $C_{42}H_{44}NaO_{22}^+$ là 923,22165.

*3.1.2.7. Hợp chất **BA7**: kaempferol 3-O-β-D-galactopyranoside*

Trạng thái tập hợp: chất bột màu vàng. Giá trị phổ ^{13}C-NMR (125 MHz, CD_3OD) và ^{1}H-NMR (500 MHz, CD_3OD): xem Bảng 4.1.7.

CTPT $C_{21}H_{20}O_{11}$, M = 448

*3.1.2.8. Hợp chất **BA8**: quercetin-3-O-β-D-galactopyranoside*

Trạng thái tập hợp: chất bột màu vàng. Giá trị phổ ^{13}C-NMR (125 MHz, DMSO-d_6) và ^{1}H-NMR (500 MHz, DMSO-d_6): xem Bảng 4.1.8.

CTPT $C_{21}H_{20}O_{12}$, M= 464

*3.1.2.9. Hợp chất **BA9**: quercetin 3-O-β-D-(6-p-hydroxybenzoyl)galacto-pyranoside*

Trạng thái tập hợp: chất bột màu vàng. Giá trị phổ ^{13}C-NMR (125 MHz, CD_3OD) và ^{1}H-NMR (500 MHz, CD_3OD): xem Bảng 4.1.9.

CTPT $C_{24}H_{24}O_{14}$, M = 584

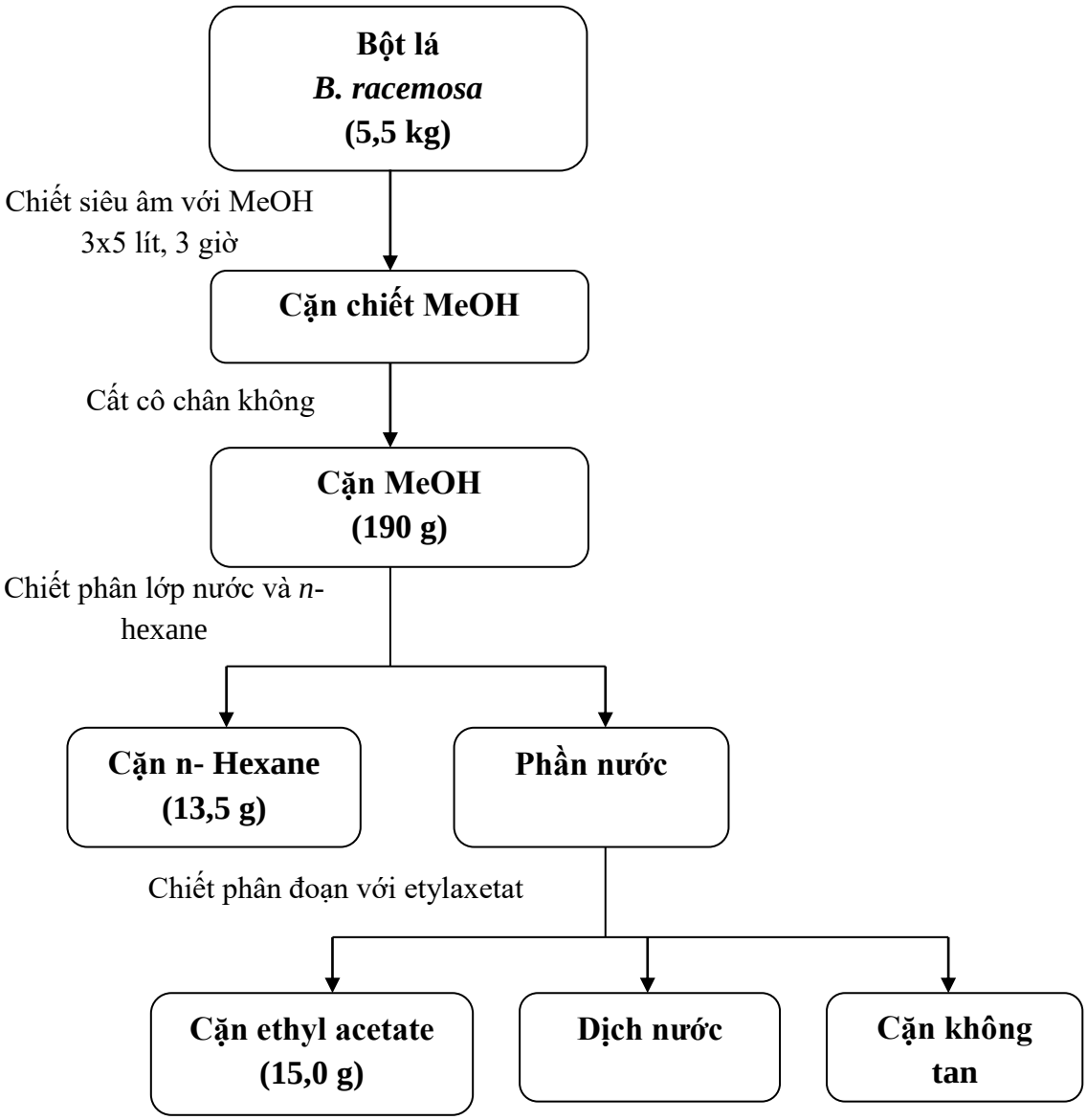
*3.1.2.10. Hợp chất **BA10**: quercetin 3-O-α-L-arabinopyranosyl-(1→2)-β-D-galacto-pyranoside*

Trạng thái tập hợp: chất bột màu vàng. Giá trị phổ ^{13}C-NMR (125 MHz, CD_3OD) và ^{1}H-NMR (500 MHz, CD_3OD): xem Bảng 4.1.10.

CTPT $C_{26}H_{28}O_{16}$, M = 596

3.1.3. Phân lập các hợp chất từ loài *B. racemosa*

Lá loài *B. acutangula* được làm sạch, sấy khô ở nhiệt độ thấp hơn 50^{o}C, sau đó nghiền nhỏ tạo thành 5,5 kg bột. Bột khô của lá loài *B. racemosa* được đem chiết 3 lần siêu âm với 5 lít methanol 3 giờ, cặn chiết sau đó được cô quay đuổi dung môi nhận được cặn chiết methanol (190 g). Hòa 190 g cặn chiết MeOH được phân bố vào nước và chiết lỏng-lỏng với các dung môi *n*-henxane, ethyl acetate thu được ba phân đoạn: cặn *n*-hexane (13,5 g), 15,0 g cặn ethyl acetate, dịch nước và một phần cặn không tan.



Hình 3.4. Sơ đồ chiết các phân đoạn mẫu loài *B. racemosa*

Chấm các vết chất của các cặn chiết trên TLC silica gel, RP-18 cho thấy các phần cặn ethyl acetate (cặn E) và phần cặn nước đều có các vết tương đối đậm nét và rõ, còn phần cặn *n*-hexane các vết mờ và ít hơn. Vì vậy tiến hành tách các hợp chất từ cặn ethyl acetate và cặn nước.

Phần cặn nước được lọc hết cặn không tan trước khi đưa lên cột diaion HP-20 và rửa giải trước tiên bằng nước để loại bỏ phần đường và muối vô cơ. Tiếp theo sử dụng hệ dung môi gradient lần lượt là 100% nước → M:W (25:75, v/v)→ M:W (50:50, v/v)→ M:W (25:75, v/v)→ M100% nhận được 5 phân đoạn, W1→W5.

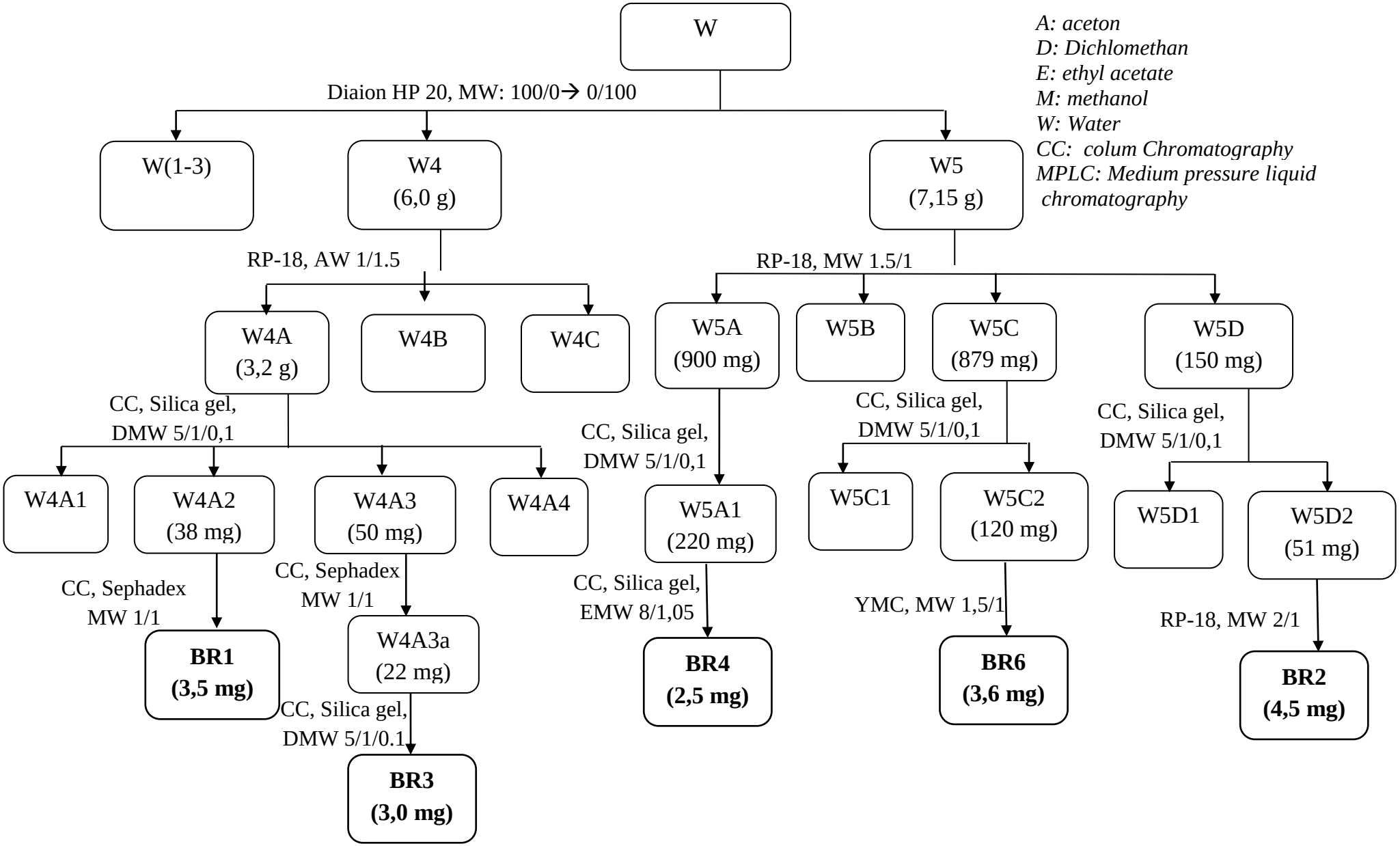
Phân đoạn W4 (6,0 g) được tách tiếp thành 3 phân đoạn nhỏ là W4A-W4C sử dụng sắc ký cột RP-18 với acetone/nước (1/1,5, v/v). Phân đoạn W4A (3,2 g) được tách thành 4 phân đoạn nhỏ hơn W4A1-W4A4 bằng cột sắc ký nhồi silica gel

pha thường và dung môi là D/M/W (5/1/0,1, v/v). Làm sạch phân đoạn W4A2 (38,2 mg) bằng cột sắc ký nhồi Sephadex với pha động là MeOH/H_2O (1/1) nhận được hợp chất **BR1** (3,5 mg). Phân đoạn W4A3 (50 mg) được làm sạch bằng cột nhồi Sephadex với pha động là M/W (1/1, v/v), sau đó phân tách tiếp trên cột nhồi silica gel pha thường với D/M/W (5/1/0,1, v/v) nhận được **BR3** (3,0 mg).

Phân đoạn W5 (7,15 g) được tách cột RP-18 với M/W (1,5/1, v/v) thu được 4 phân đoạn nhỏ W5A-W5D. Phân đoạn W5A (900 mg) tiếp tục đưa lên cột silica gel sử dụng D/M/W (5/1/0,1, v/v) và tiếp tục được làm sạch bằng cột sắc ký nhồi silica gel pha thường và sử dụng E/M/W (8/1/0,05, v/v) thu được **BR04** (2,5 mg) dưới dạng chất bột màu trắng.

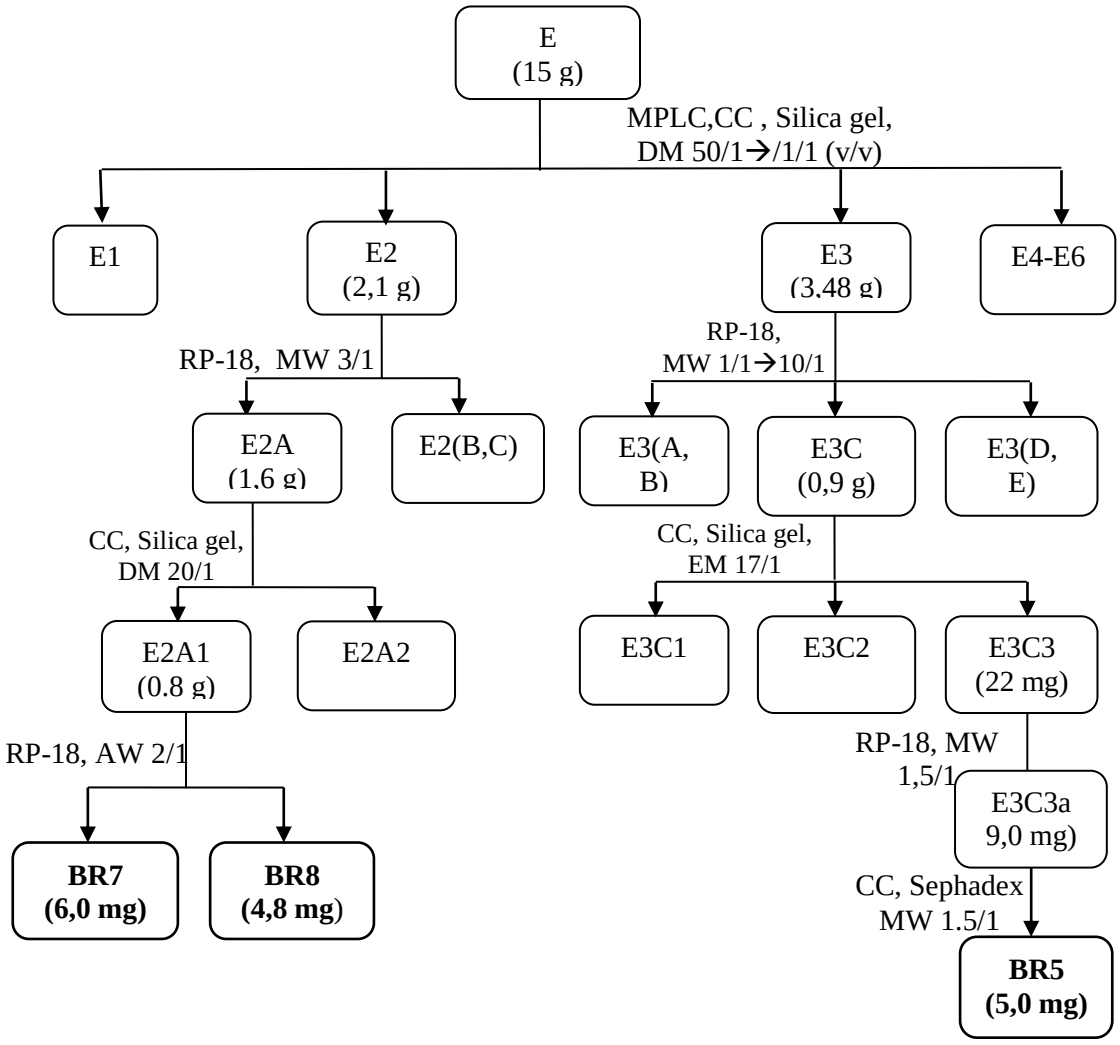
Phân đoạn W5C (879 mg) được tách ra 2 phân đoạn W5C1 và W5C2 sử dụng cột silica gel với D/M/W (5/1/0,1, v/v). Tiếp tục làm sạch phân đoạn W5C2 (120 mg) trên cột nhồi RP-18 sử dụng MeOH/H_2O (1,5/1, v/v) nhận được **BR06** (3,6 mg) dưới dạng chất bột màu trắng.

Phân đoạn W5D (150 mg) được tách thành 2 phân đoạn nhỏ hơn W5D1 và W5D2 bằng cột nhồi sililca gel sử dụng D/M/W (5/1/0,1, v/v). Phân tách phân đoạn W5D2 (51 mg) trên cột nhồi RP-18 sử dụng dung môi A/W (1/1,5, v/v), sau đó làm sạch bằng sắc ký cột sephadex với pha động là M/W (2/1, v/v) nhận được hợp chất **BR2** (4,5 mg).



Hình 3.5. Sơ đồ phân lập các hợp chất từ dịch nước mẫu loài *B. racemosa*

Cặn E (15 g) được tách thành 06 phân đoạn, E1-E6, sử dụng MPLC với cột nhồi silica gel và pha động gradient nồng độ D/M từ 50/1 đến 1/1 (v/v). Phân đoạn E3 (3,48 g) tiếp tục được tách trên cột nhồi RP-18 và dùng M/W (1/1, 2/1, 3/1 và 10/1, v/v) nhận được 5 phân đoạn nhỏ, E3A-E3E. Phân doạn E3C (0,9 g) được phân tách tiếp thành 03 phân đoạn nhỏ hơn, E3C1-E3C3, sử dụng cột nhồi silica gel và hệ dung môi E/M (17/1, v/v). Phân đoạn E3C3 (22 mg) được tinh chế bằng cột RP-18 dùng M/W (1,5/1, v/v), sau đó tinh chế tiếp trên cột Shephadex LH-20 CC sử dụng pha động M/W (1,5/1, v/v) nhận được hợp chất **BR5** (5 mg). Phân đoạn E2 (2,1 g) được phân tách thành 3 phân đoạn nhỏ, E2A-E2C, sử dụng sắc ký cột RP-18 và pha động là M/W (3/1, v/v). Phân đoạn E2A (1,6 g) tiếp tục được phân tách thành hai phân đoạn nhỏ hơn E2A1 và E2A2 sử dụng cột nhồi silica gel và hệ dung môi D/M (20/1, v/v). Hai hợp chất **BR7** (6,0 mg) và **BR8** (4,8 mg) được làm sạch từ phân đoạn E2A1 (0,8 g) trên cột sắc ký nhồi RP-18 và pha động là A/W (2/1, v/v), sau đó làm sạch tiếp trên cột nhồi silica gel sử dụng D/M (20/1, v/v).



Hình 3.6. Sơ đồ phân lập các hợp chất từ cặn ethyl acetate mẫu loài *B. racemosa*

3.1.4. Thông số vật lý và dữ kiện phổ của các hợp chất phân lập từ loài chiếc chùm *B. racemosa*

*3.1.4.1. Hợp chất **BR1**: Barringoside G (**Hợp chất mới**)*

Chất rắn màu vàng. Độ quay cực $[\alpha]_D^{25}$ –25,0 (*c*, 0,05, MeOH)

Giá trị phổ ^{13}C-NMR (125 MHz, CD_3OD) và ^{1}H-NMR (500 MHz, CD_3OD): xem Bảng 4.2.1.

HR-ESI-MS: *m/z* 895.2252 $[M+Na]^+$

Tính toán lý thuyết cho ion $C_{41}H_{44}NaO_{21}^+$ là 895.2267.

*3.1.4.2. Hợp chất **BR2**: Barringoside H (**Hợp chất mới**)*

Chất rắn màu vàng. Độ quay cực $[\alpha]_D^{25}$ –32,0 (*c*, 0,05, MeOH)

Giá trị phổ ^{13}C-NMR (125 MHz, CD_3OD) và ^{1}H-NMR (500 MHz, CD_3OD): xem Bảng 4.2.2.

HR-ESI-MS: *m/z* 925.2360 $[M+Na]^+$

Tính toán lý thuyết cho ion $C_{42}H_{46}NaO_{22}^+$ là 925.2373.

*3.1.4.3. Hợp chất **BR3**: Barringoside I (**Hợp chất mới**)*

Chất rắn màu vàng. Độ quay cực $[\alpha]_D^{25}$–85,0 (*c*, 0,05, MeOH)

Giá trị phổ ^{13}C-NMR (125 MHz, CD_3OD) và ^{1}H-NMR (500 MHz, CD_3OD): xem Bảng 4.2.3.

HR-ESI-MS: *m/z* 1187.3214$[M+Na]^+$

Tính toán lý thuyết cho ion $C_{56}H_{60}NaO_{27}^+$ là 1187.3229.

*3.1.4.4. Hợp chất **BR4**: Niga-ichigoside F1*

Chất bột màu trắng. Độ quay cực $[\alpha]_D^{25}$ +15,0 (*c*, 0,05, MeOH)

Giá trị phổ ^{13}C-NMR (125 MHz, CD_3OD) và ^{1}H-NMR (500 MHz, CD_3OD): xem Bảng 4.2.4.

CTPT $C_{36}H_{58}O_{11}$, M= 666

*3.1.4.5. Hợp chất **BR5**: Rosamultin*

Chất bột màu trắng. Độ quay cực $[\alpha]_D^{25}$+10,0 (*c*, 0,05, MeOH)

Giá trị phổ ^{13}C-NMR (125 MHz, CD_3OD) và ^{1}H-NMR (500 MHz, CD_3OD): xem Bảng 4.2.5.

CTPT $C_{36}H_{58}O_{10}$, M= 650

*3.1.4.6. Hợp chất **BR6**: 23-Hydroxytormentic acid*

Chất bột màu trắng. Độ quay cực $[\alpha]_D^{25}$+25,0 (*c*, 0,05, MeOH)

Giá trị phổ ^{13}C-NMR (125 MHz, CD_3OD) và ^{1}H-NMR (500 MHz, CD_3OD): xem Bảng 4.2.6.

CTPT $C_{30}H_{48}O_6$, M = 504

*3.1.4.7. Hợp chất **BR7**: Arjunic acid*

Chất bột màu trắng. Độ quay cực $[\alpha]_D^{25}$+20,0 (*c*, 0,05, MeOH)

Giá trị phổ ^{13}C-NMR (125 MHz, CD_3OD) và ^{1}H-NMR (500 MHz, CD_3OD): xem Bảng 4.2.7.

CTPT $C_{30}H_{48}O_5$, M = 488

*3.1.4.8. Hợp chất **BR8**: Maslinic acid*

Chất bột màu trắng. Độ quay cực $[\alpha]_D^{25}$+40,0 (*c*, 0,05, MeOH)

Giá trị phổ ^{13}C-NMR (125 MHz, CD_3OD) và ^{1}H-NMR (500 MHz, CD_3OD): xem Bảng 4.2.8.

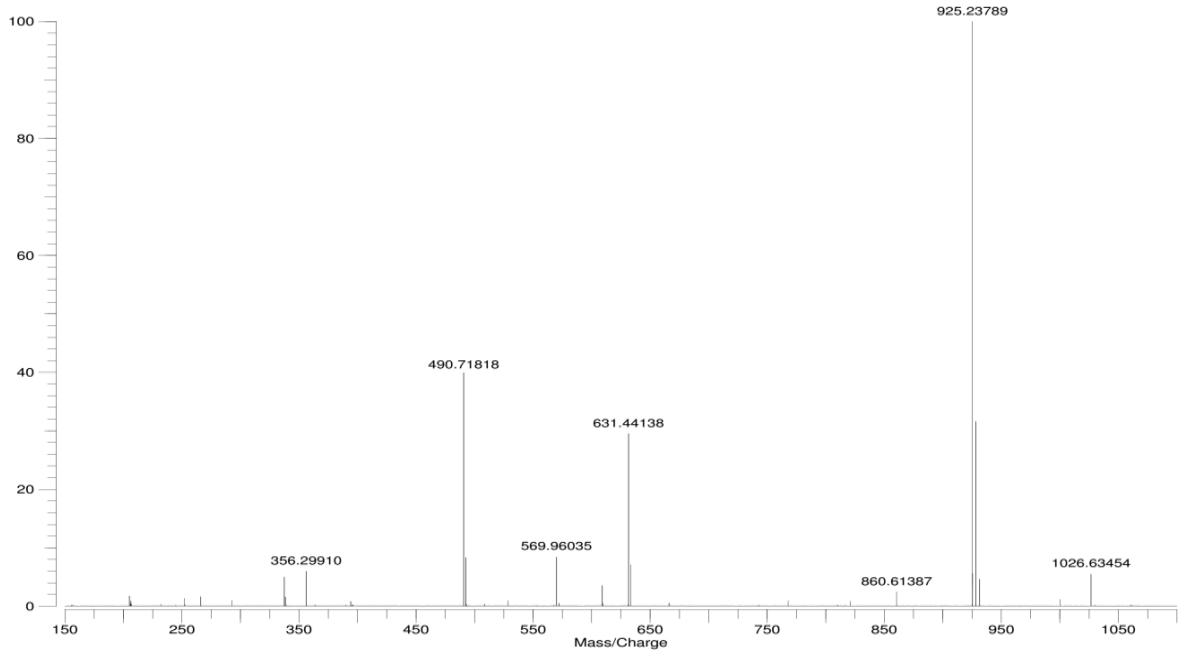
CTPT $C_{30}H_{48}O_4$, M = 472.

CHƯƠNG 4: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

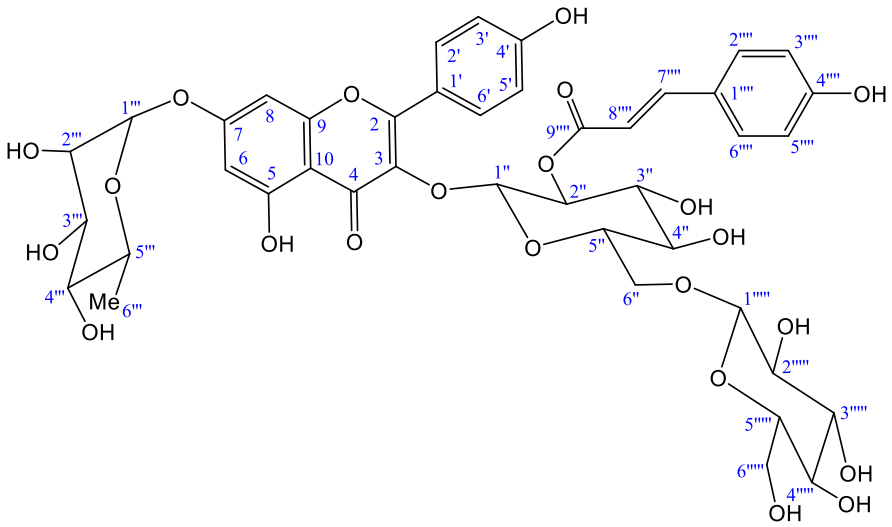
4.1. Xác định cấu trúc các hợp chất phân lập được từ loài *B. acutangula*

4.1.1. Hợp chất BA1: barringoside A (chất mới)

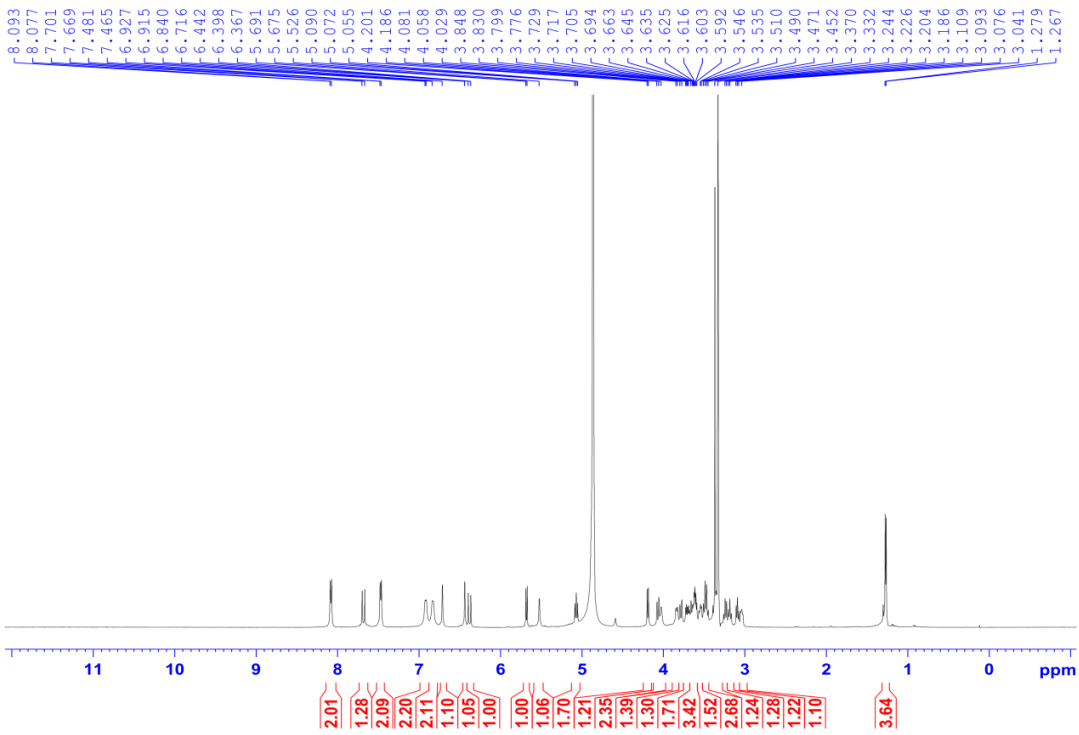
Hợp chất **BA1** có dạng chất rắn màu vàng nhạt với CTPT $C_{42}H_{46}O_{22}$, được chứng minh bằng phổ HR-ESI-MS với pic ion giả phân tử xuất hiện tại *m/z* 925,23789 $[M+Na]^+$.



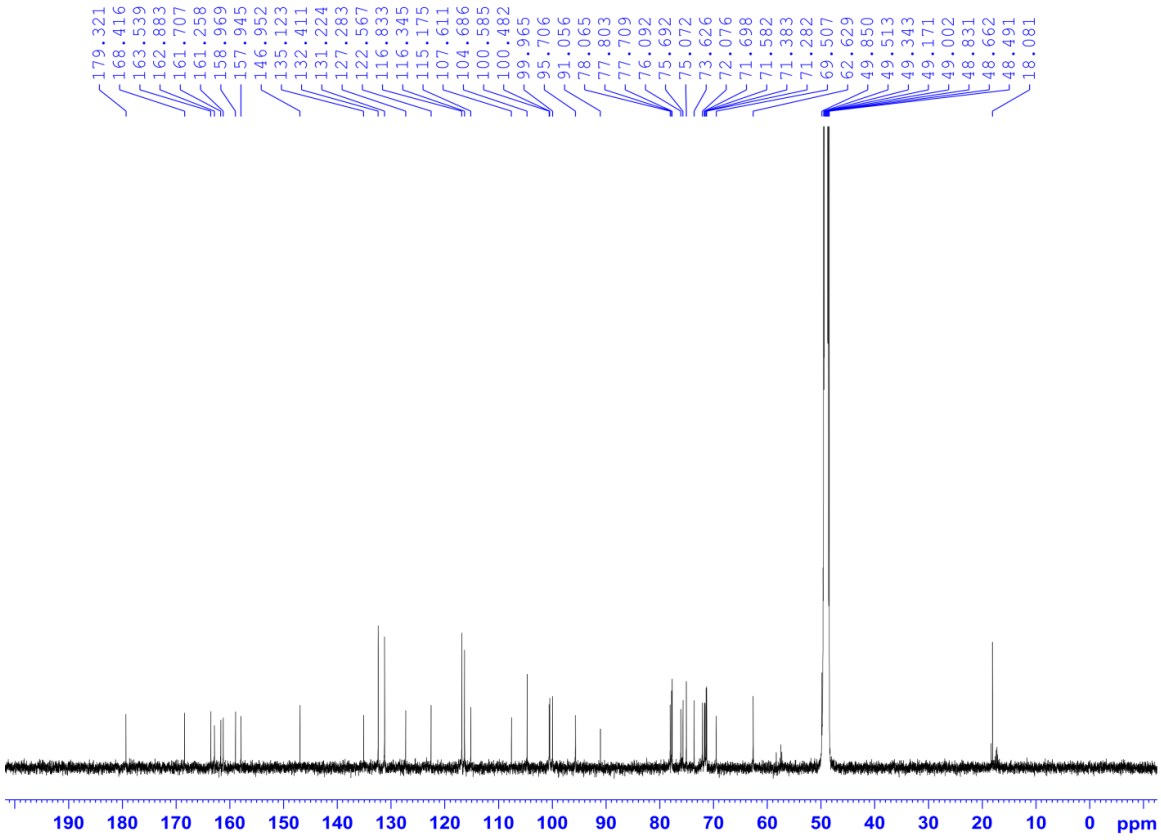
Hình 4.1.1.a. Phổ HR-ESI-MS của **BA1**



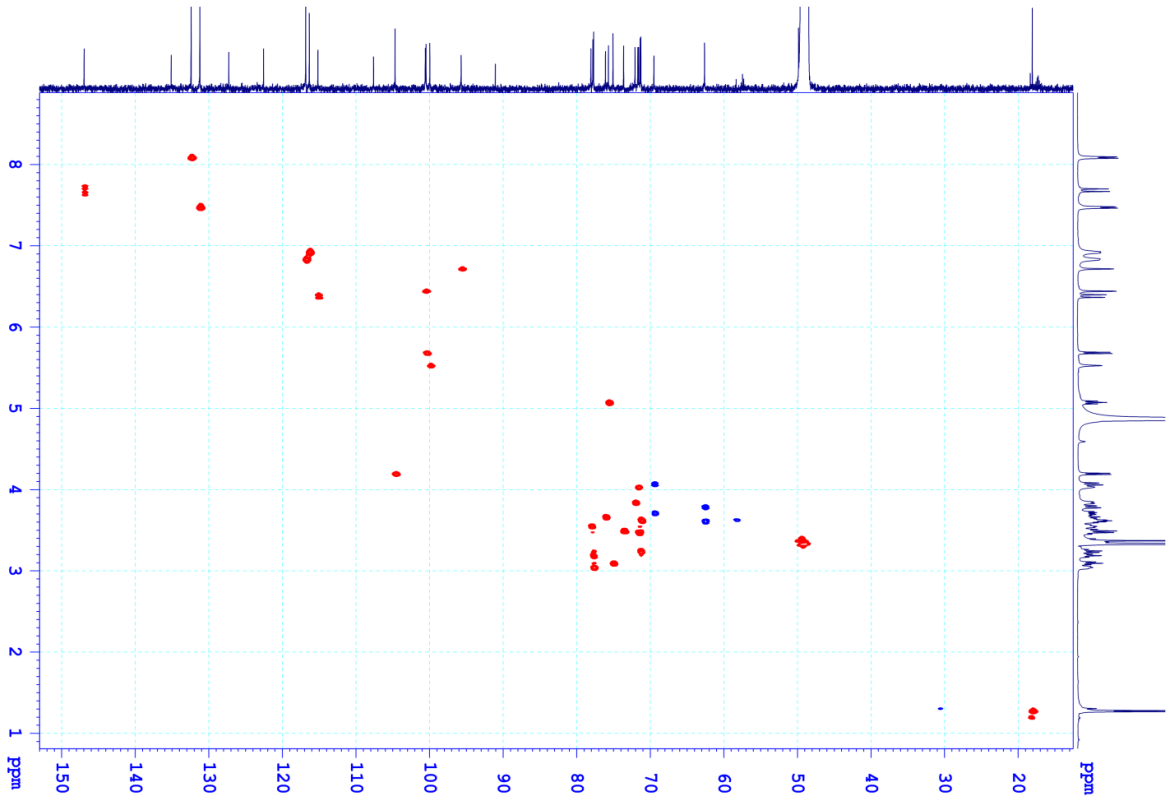
Hình 4.1.1.b. Cấu trúc hóa học của **BA1**



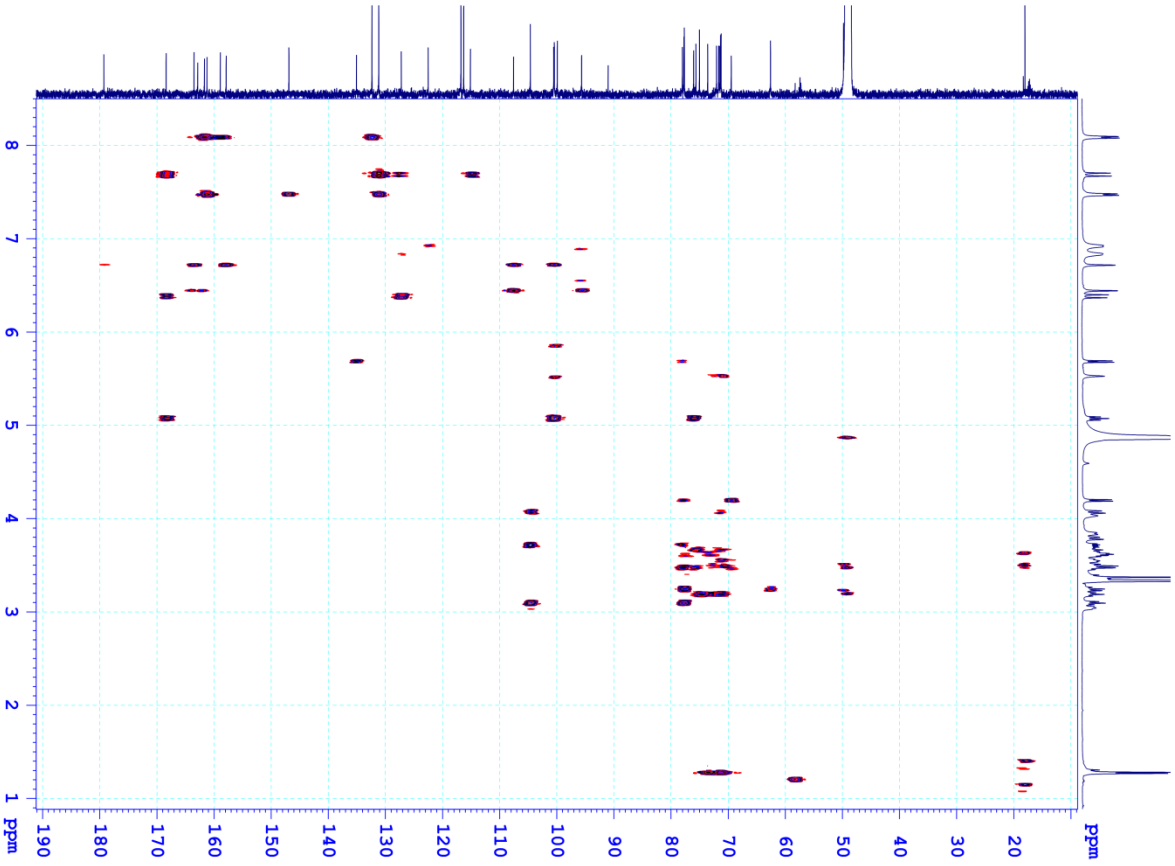
Hình 4.1.1.c. Phổ ^{1}H-NMR của **BA1**



Hình 4.1.1.d. Phổ ^{13}C-NMR của **BA1**



Hình 4.1.1.e. Phổ HSQC của **BA1**



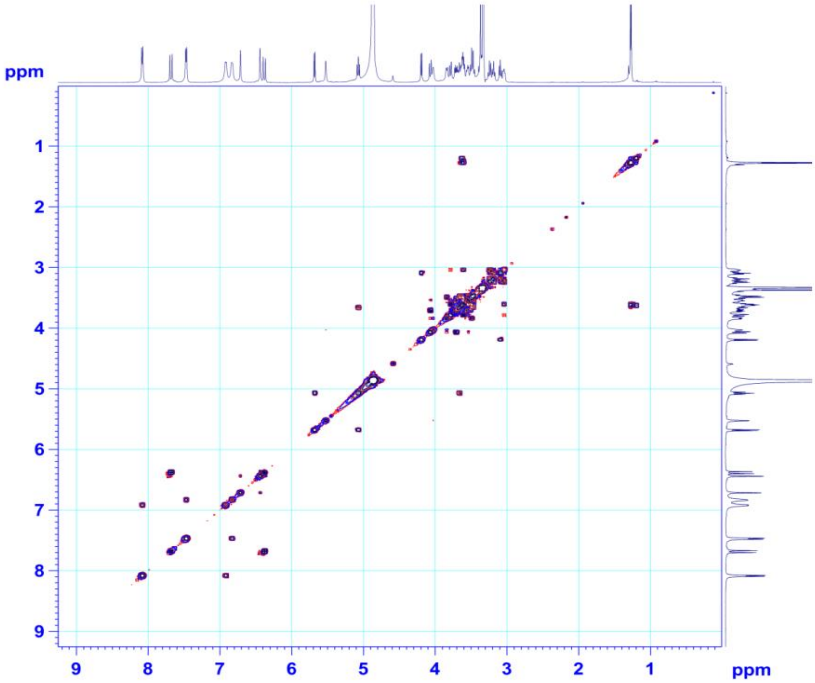
Hình 4.1.1.f. Phổ HMBC của **BA1**

Bảng 4.1.1. Giá trị phổ NMR của **BA1** và các chất so sánh

C	**[a]δC**	**[b]δC**	**δC [c,d]**	**δH [c,e]** dạng tín hiệu (*J* = Hz)	**HMBC** (H → C)
Aglycon					
2		159,3	158,9	-	
3		135,6	135,1	-	
4		179,6	179,3	-	
5		163,3	162,8	-	
6		100,7	100,5	6,44 s	5, 7, 8, 10
7		163,6	163,5	-	
8		95,9	95,7	6,71 s	4, 6, 7, 9, 10
9		158,0	157,9	-	
10		107,5	107,6	-	
1′		122,5	122,5	-	
2′		132,5	132,4	8,08 d (8,0)	2, 4′, 6′
3′		116,3	116,3	6,92 d (8,0)	
4′		161,8	161,7	-	
5′		116,3	116,3	6,92 d (8,0)	
6′		132,5	132,4	8,08 d (8,0)	
Glc1					
1″	**101,0**	**103,5**	**100,5**	5,68 d (8,0)	3
2″	75,8	75,8	75,6	5,07 dd (8,0, 9,0)	9‴′
3″	**76,3**	**77,9**	**76,0**	3,66 t (9,0)	
4″	71,0	71,4	71,5	3,47 t (9,0)	
5″	77,6	77,9	78,1	3,55 m	
6″	68,6	69,5	69,5	3,71 dd (6,0, 12,0) 4,07 br d (12,0)	
Rha					
1‴		100,0	99,9	5,52 s	7
2‴		71,6	71,7	4,03 br s	
3‴		72,0	72,0	3,80 br d (9,0)	
4‴		73,5	73,6	3,49 t (9,0)	
5‴		71,3	71,2	3,62[f]	
6‴		18,2	18,0	1,27 d (6,0)	4‴, 5‴
p-coumaric acid					

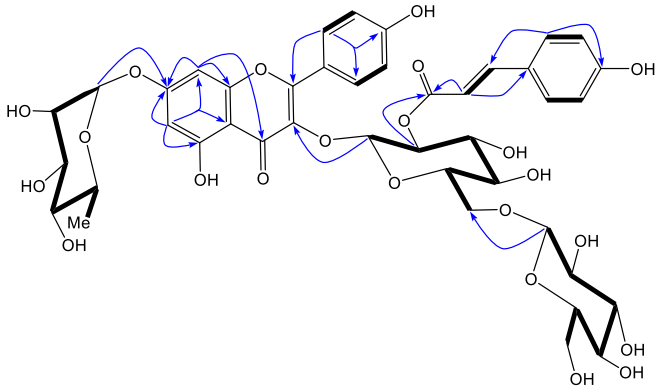
C	[a]δ_C	[b]δ_C	δ_C [c,d]	δ_H [c,e] dạng tín hiệu (*J* = Hz)	HMBC (H → C)
1′′′′	127,2		127,2	-	
2′′′′	131,2		131,2	7,47 d (8,0)	4′′′′, 7′′′′
3′′′′	116,8		116,8	6,83 d (8,0)	
4′′′′	161,1		161,2	-	
5′′′′	116,8		116,8	6,83 d (8,0)	
6′′′′	131,2		131,2	7,47 d (8,0)	
7′′′′	146,9		146,9	7,68 d (16,0)	
8′′′′	115,2		115,1	6,39 d (16,0)	1′′′′, 7′′′′, 9′′′′
9′′′′	168,5		168,4	-	
Glc2					
1′′′′′		104,6	104,6	4,19 d (7,5)	6′′
2′′′′′		75,1	75,0	3,09 dd (7,5, 9,0)	
3′′′′′		77,8	77,8	3,18 t (9,0)	
4′′′′′		71,3	71,3	3,24 t (9,0)	
5′′′′′		77,7	77,7	3,04 m	
6′′′′′		62,5	62,6	3,61[f]/3,79 br d (11,5)	

[a]δ_C của quercetin 3-*O*-[2′′-*O*-(*E*)-*p*-coumaroyl][*β*-D-glucopyranosyl(1→3)-*α*-L-rhamnopyranosyl(1→6)]-*β*-D-glucoside [76], [b]δ_C của kaempferol 3-*O*-*β*-[*β*-D-glucopyranosyl(1→6)D-glucopyranoside]-7-*O*-*α*-L-rhamnopyranoside [77], [c]đo trong CD_3OD, [d]125 MHz, [e]500 MHz, [f]tín hiệu bị che lấp.



Hình 4.1.1.g. Phổ COSY của **BA1**

Dữ liệu phổ NMR của **BA1** biểu hiện một flavonoid triglycoside với sự xuất hiện 03 proton anome tại δ_H 5,68 (1H, d, J = 8,0 Hz, H-1″), 5,52 (1H, br s, H-1‴) và 4,19 (1H, d, J = 7,5 Hz, H-1⁗), có tương tác HSQC với các cacbon anome tương ứng tại δ_C 100,5 (C-1″), 100,0 (C-1‴) và 104,7 (C-1⁗) chứng minh cho 03 đơn vị đường. Phân tích cụ thể các tương tác trên phổ HSQC cho phép gán chính xác các tín hiệu cacbon với các proton liên kết trực tiếp với chúng. Từ kết quả phổ HSQC, kết hợp phân tích phổ COSY với các tương tác H-1″ (δ_H 6,58)/H-2″ (δ_H 5,07)/H-3″ (δ_H 3,66)/H-4″ (δ_H 3,47)/H-5″ (δ_H 3,55)/H-6″ (δ_H 3,71 và 4,07), H-1‴ (δ_H 5,52)/H-2‴ (δ_H 4,03)/H-3‴ (δ_H 3,80)/H-4‴ (δ_H 3,49)/H-5‴ (δ_H 3,62)/H-6‴ (δ_H 1,27) và H-1⁗ (δ_H 4,19)/H-2⁗ (δ_H 3,09)/H-3⁗ (δ_H 3,18)/H-4⁗ (δ_H 3,24)/H-5⁗ (δ_H 3,04)/H-6⁗ (δ_H 3,61 và 3,79), cho phép xác định được số liệu ^{1}H-NMR và ^{13}C-NMR tại tất cả các vị trí của 03 đơn vị đường như ở Bảng 4.1.1. Ngoài ra, sự xuất hiện của 2 proton thơm có tương tác *meta* [δ_H 6,44 (H-6) và 6,71 (H-8), mỗi tín hiệu [1H, br s] và bốn proton thuộc vòng thơm có tương tác *ortho* [δ_H 8,08 (H-2′ và H-6′) và 6,92 (H-3′ và H-5′), mỗi tín hiệu 2H, d, J = 8,0 Hz] đặc trưng cho cấu trúc khung kaempferol. Các giá trị phổ ^{1}H và ^{13}C NMR của **BA1** tương tự các giá trị của kaempferol 3-*O*-*β*-[*β*-D-glucopyranosyl(1→6)D-glucopyranoside]-7-*O*-*α*-L-rhamnopyranoside [77], ngoài việc có thêm các tín hiệu thuộc một nhóm *trans*-*p*-coumaroyl tại δ_C 127,3 (C-1⁗), 131,2 (C-2⁗ và C-6⁗), 116,8 (C-3⁗ và C-5⁗), 161,3 (C-4⁗), 146,9 (C-7⁗), 115,2 (C-8⁗) và 168,4 (C-9⁗)/δ_H 7,47 (2H, d, J = 8,0 Hz, H-2⁗ và H-6⁗), 6,83 (2H, d, J = 8,0 Hz, H-3⁗ và H-5⁗), 7,68 (1H, d, J = 16,0 Hz, H-7⁗) và 6,39 (1H, d, J = 16,0 Hz, H-8⁗).



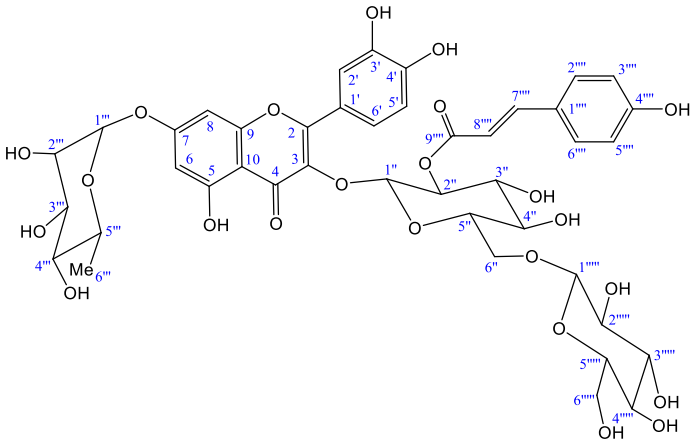
Hình 4.1.1.h. Các tương tác HMBC và COSY chính của **BA1**

Phân tích cụ thể các tín hiệu trên các phổ COSY và HMBC (hình 4.1.1.h) khẳng định chính xác cấu trúc hóa học của **BA1**. Các vị trí gắn của đường glucose đầu tiên tại

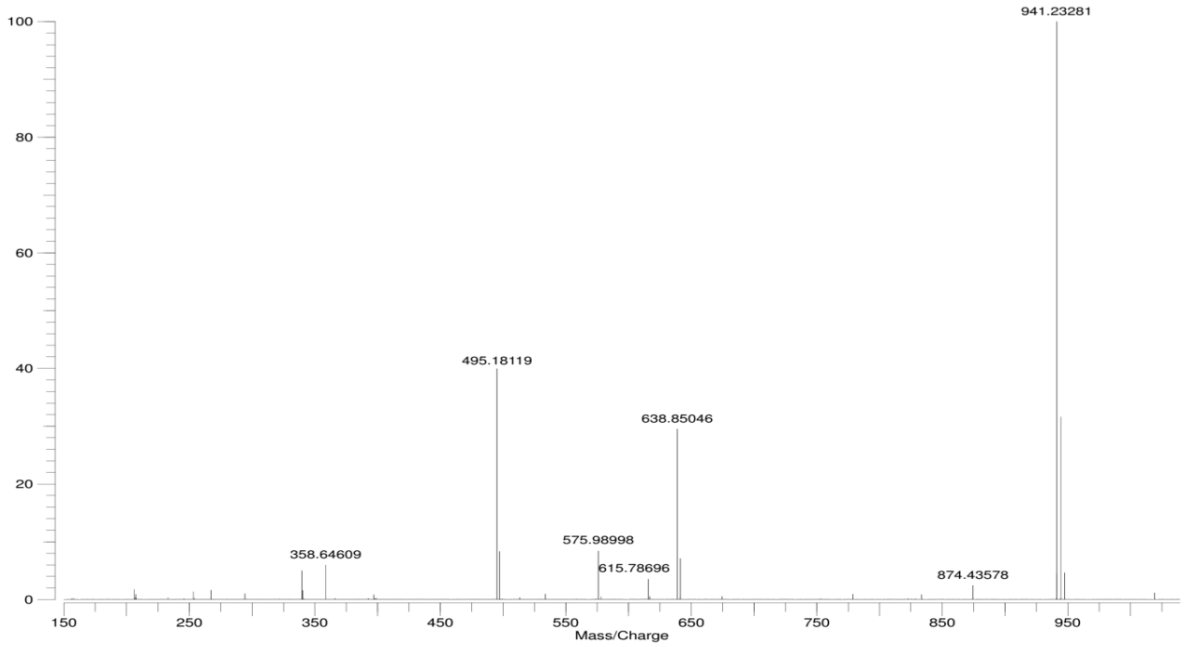
C-3, đường rhamnose tại C-7 và đường glucose thứ hai tại C-6″ được xác định bằng các tương tác xa HMBC của các proton anome H-1″ (δ_H 5,68) với C-3 (δ_C 135,1), H-1‴ (δ_H 5,52) với C-7 (δ_C 163,5) và H-1⁗ (δ_H 4,19) với C-6″ (δ_C 69,5). Ngoài ra, giá trị phổ ^{13}C NMR tại các vị trí của đơn vị đường glucose thứ nhất của **BA1** (bảng III.1) tương tự các giá trị của quercetin 3-*O*-[2″-*O*-(*E*)-*p*-coumaroyl][*β*-D-glucopyranosyl(1→3)-*α*-L-rhamnopyranosyl-(1→6)]-*β*-D-glucopyranoside [76] kết hợp với sự dịch chuyển rất mạnh về hướng vùng trường thấp của proton H-2″ tại δ_H 5,07 cho phép xác định vị trí ester hóa của nhóm *trans*-*p*-coumaroyl tại C-2″. Nhận định này được xác nhận thêm bằng tương tác xa HMBC (hình II.1.h) của H-2″ (δ_H 5,07) với C-9⁗ (δ_C 168,4). Như vậy, cấu trúc hóa học của **BA1** được chứng minh là kaempferol 3-*O*-[2″-*O*-(*E*)-*p*-coumaroyl][*β*-D-glucopyranosyl (1→6)*β*-D-glucopyranoside]-7-*O*-*α*-L-rhamnopyranoside, một hợp chất mới và được gọi tên là barringoside A.

4.1.2. Hợp chất BA2: barringoside B (chất mới)

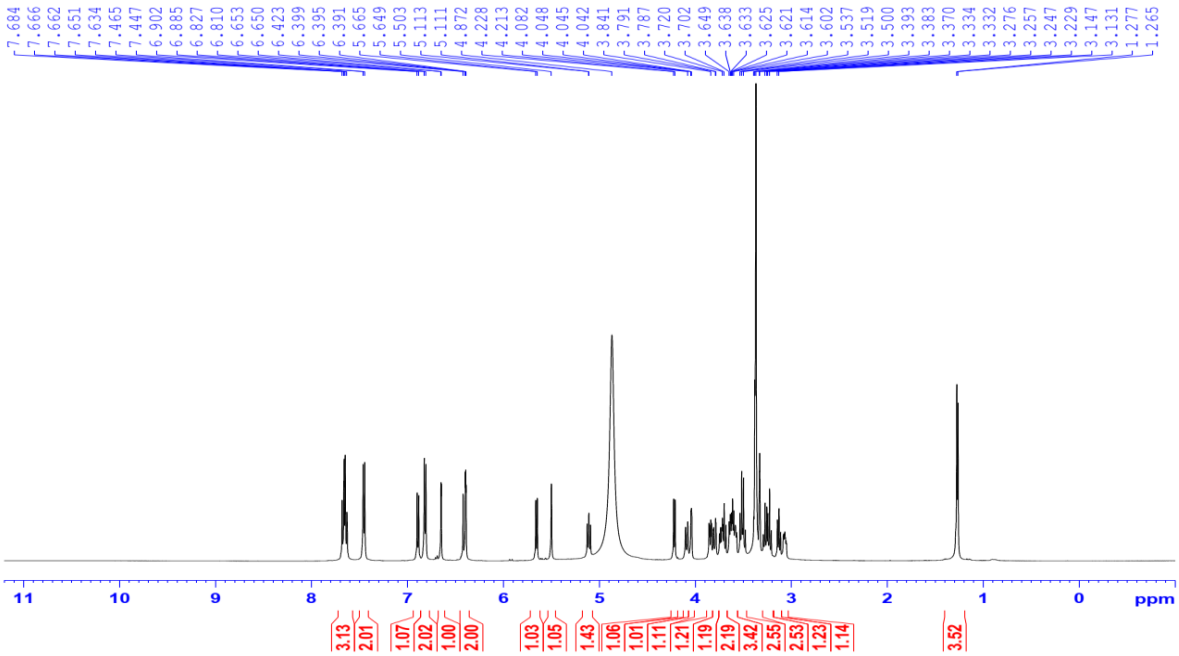
So sánh dữ liệu phổ ^{13}C và ^{1}H NMR cho thấy **BA2** có sự tương ứng các số liệu của **BA1**, ngoại trừ sự có mặt các tín hiệu của một vòng thơm tương tác ABX tại δ_H 7,65 (1H, d, *J* = 2,0 Hz, H-2′), 6,90 (1H, d, *J* = 8,0 Hz, H-5′), and 7,64 (1H, dd, *J* = 8,0, 2,0 Hz, H-6′) ở **BA2**, thay cho vòng thơm tương tác AA′BB′ ở **BA1**. Ghi nhận này được khẳng định thêm bằng phổ HR-ESI-MS với pic ion giả phân tử tại *m/z* 941,23281 $[M+Na]^+$ xác định CTPT $C_{42}H_{46}O_{23}$ của **BA2**. Các tương tác HMBC được ghi nhận giữa H-2′ (δ_H 7,65)/H-6′ (δ_H 7,64) và C-2 (δ_C 158,9) chứng minh cho cấu trúc vòng B bị thế ba vị trí dạng 1,3,4.



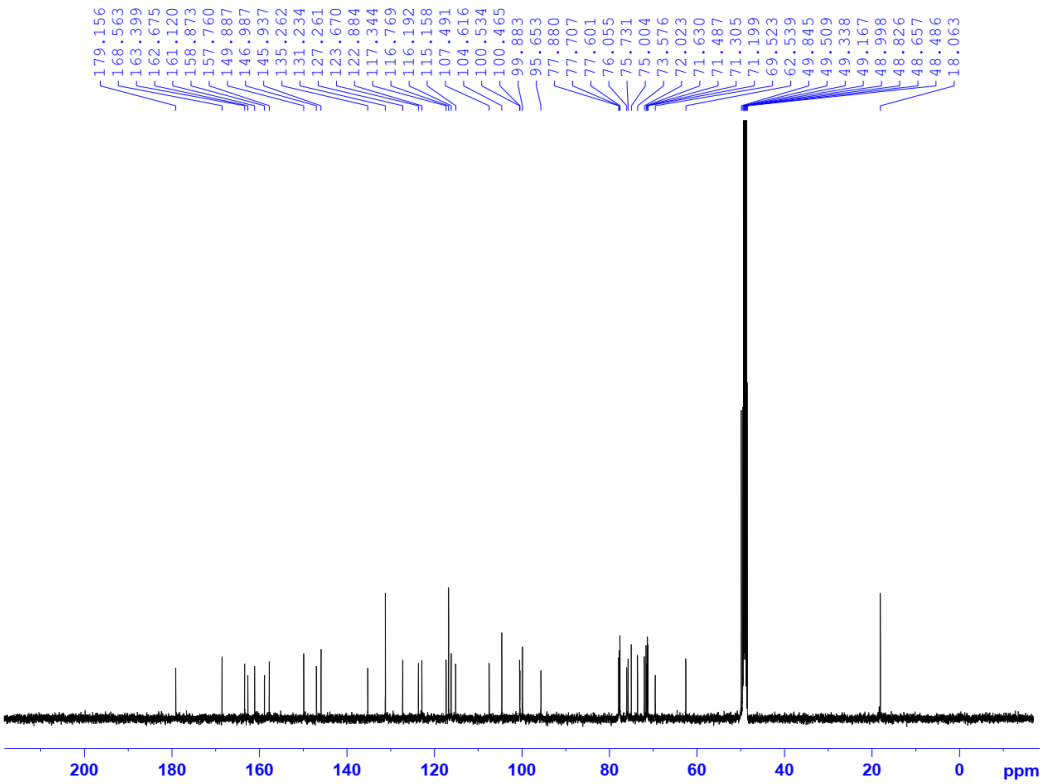
Hình 4.1.2.a. Cấu trúc hóa học của của **BA2**



Hình 4.1.2.b. Phổ HR-ESI-MS của **BA2**



Hình 4.1.2.c. Phổ ^{1}H-NMR của **BA2**



Hình 4.1.2.d. Phổ ^{13}C-NMR của **BA2**

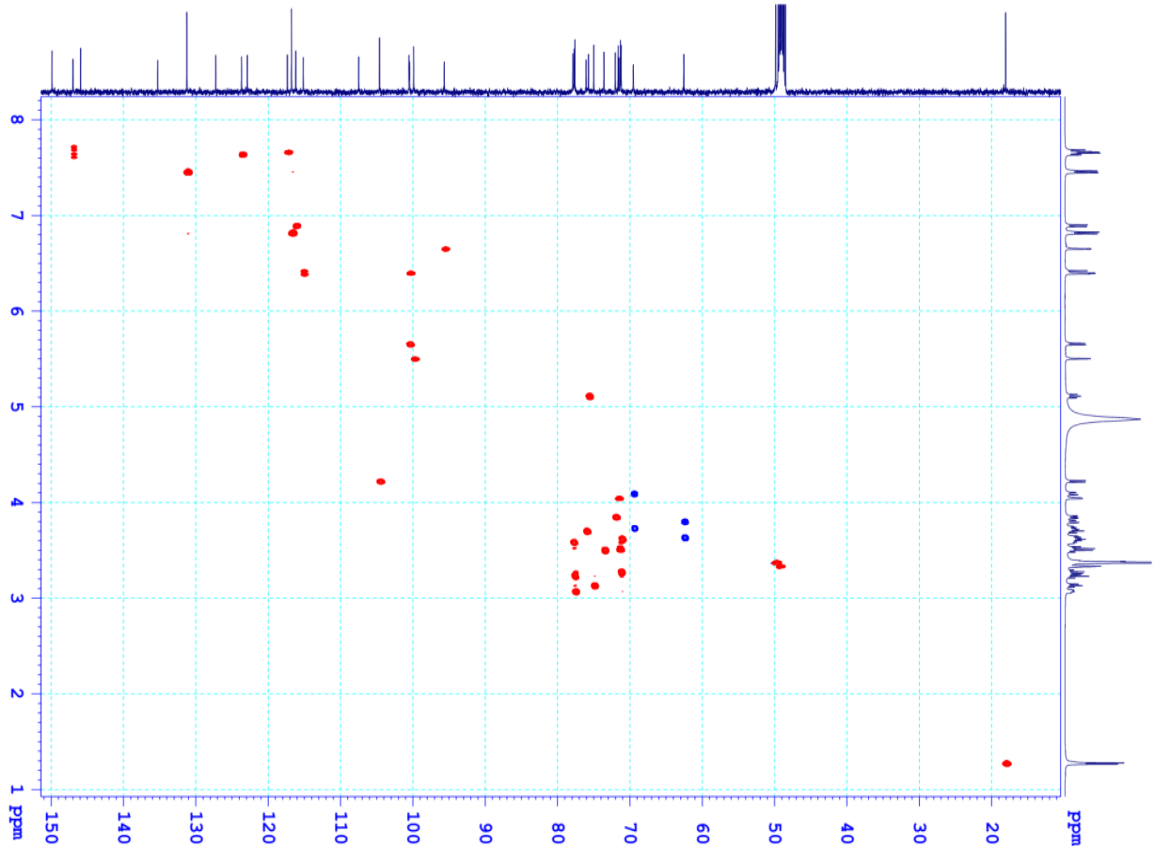
Bảng 4.1.2. Giá trị phổ NMR của **BA2** và các chất so sánh

C	**$^{a}\delta_C$**	**$^{b}\delta_C$**	**δ_C ^{c,d}**	**δ_H ^{c,e}** dạng tín hiệu (J = Hz)	**HMBC** (H → C)
Aglycon					
2			158,8	-	
3			135,2	-	
4			179,1	-	
5			162,6	-	
6			100,5	6,39 d (1,5)	5, 7, 8, 10
7			163,4	-	
8			95,6	6,65 d (1,5)	4, 6, 7, 9, 10
9			157,7	-	
10			107,4	-	
1′			122,8	-	
2′			117,3	7,65 d (2,0)	2, 4′, 6′
3′			145,9	-	

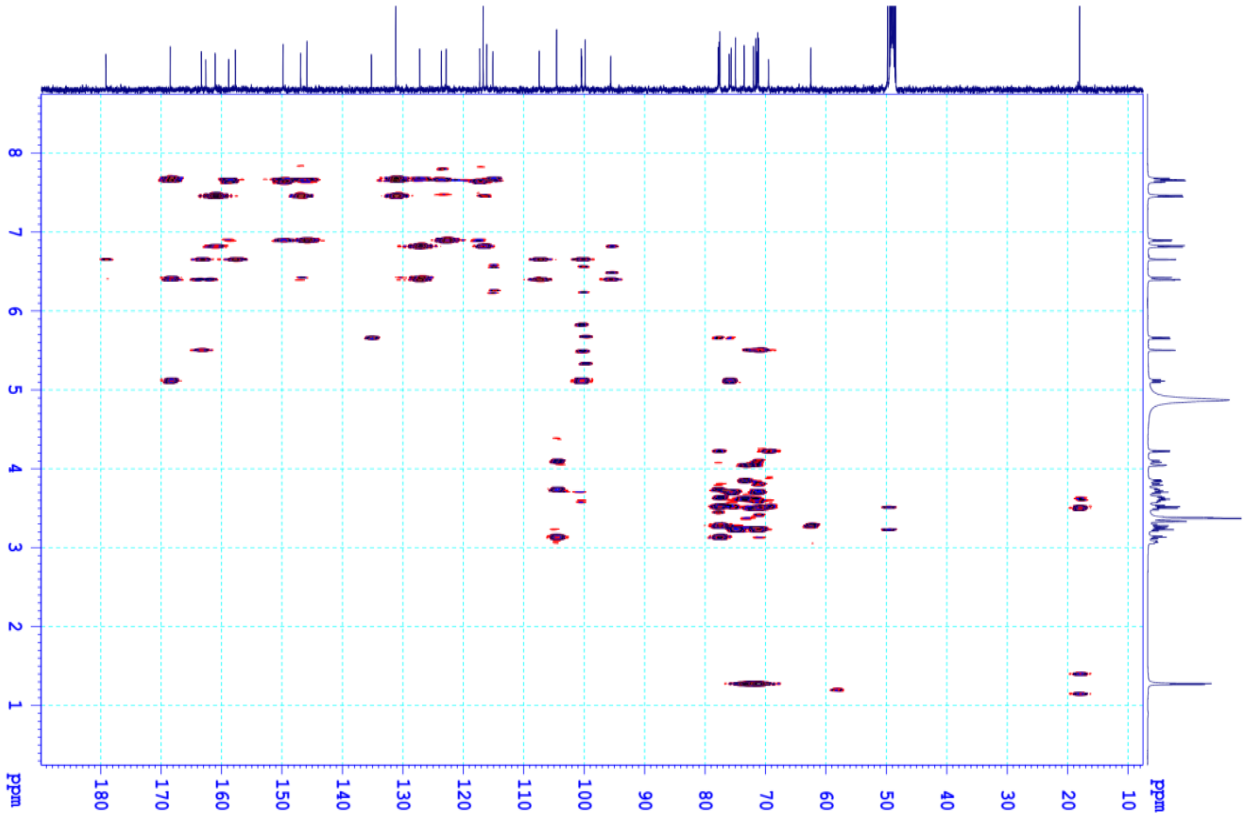
C	**[a]δ_C**	**[b]δ_C**	**δ_C [c,d]**	**δ_H [c,e]** dạng tín hiệu (*J* = Hz)	**HMBC** (H → C)
4′			149,8	-	
5′			116,1	6,90 d (8,0)	
6′			123,6	7,64 dd (8,0, 2,0)	2, 2′, 4′
Glc1					
1″	**101,0**	**103,5**	**100,5**	5,65 d (8,0)	3
2″	75,8	75,8	75,7	5,11 dd (8,0, 9,0)	9‴′
3″	**76,3**	**77,9**	**76,0**	3,70 t (9,0)	
4″	71,0	71,4	71,4	3,52 t (9,0)	
5″	77,6	77,9	77,8	3,58 m	
6″	68,6	69,5	69,5	3,73 dd (6,0, 12,0) 4,09 br d (12,0)	
Rha					
1‴		100,0	99,9	5,50 br s	7
2‴		71,6	71,6	4,04 dd (1,5, 3,0)	
3‴		72,0	72,0	3,85 dd (3,0, 9,0)	
4‴		73,5	73,5	3,50 t (9,0)	
5‴		71,3	71,2	3,62[f]	
6‴		18,2	18,0	1,27 d (6,0)	4‴, 5‴
p-coumaric acid					
1‴′	127,2		127,2	-	
2‴′	131,2		131,2	7,45 d (8,5)	4‴′, 7‴′
3‴′	116,8		116,7	6,82 d (8,5)	
4‴′	161,1		161,1	-	
5‴′	116,8		116,7	6,82 d (8,5)	
6‴′	131,2		131,2	7,45 d (8,5)	
7‴′	146,9		146,9	7,67 d (16,0)	
8‴′	115,2		115,1	6,42 d (16,0)	1‴′, 7‴′, 9‴′

C	[a]δ_C	[b]δ_C	δ_C [c,d]	δ_H [c,e] dạng tín hiệu (*J* = Hz)	HMBC (H → C)
9‴′	168,5		168,5	-	
Glc2					
1‴′′		104,6	104,6	4,22 d (7,5)	6′′
2‴′′		75,1	75,0	3,13 dd (7,5, 9,0)	
3‴′′		77,8	77,7	3,23 t (9,0)	
4‴′′		71,3	71,3	3,27 t (9,0)	
5‴′′		77,7	77,6	3,07 m	
6‴′′		62,5	62,5	3,63[f] 3,80 dd (2,0, 12,0)	

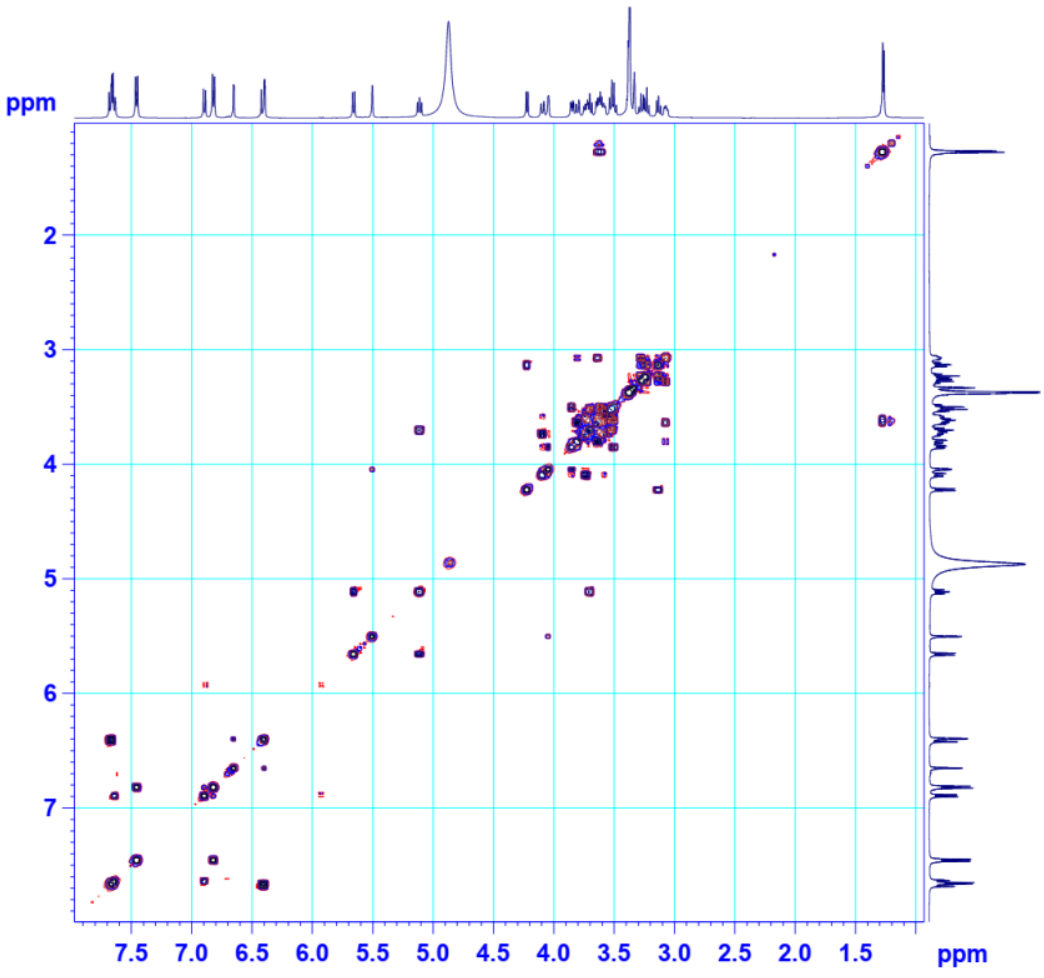
[a]δ_C của quercetin 3-*O*-[2′′-*O*-(*E*)-*p*-coumaroyl][*β*-D-glucopyranosyl(1→3)-*α*-L-rhamnopyranosyl(1→6)]-*β*-D-glucoside [76], [b]δ_C của kaempferol 3-*O*-*β*-[*β*-D-glucopyranosyl(1→6)D-glucopyranoside]-7-*O*-*α*-L-rhamnopyranoside [77], [c]đo trong CD_3OD, [d]125 MHz, [e]500 MHz, [f]tín hiệu bị che lấp.



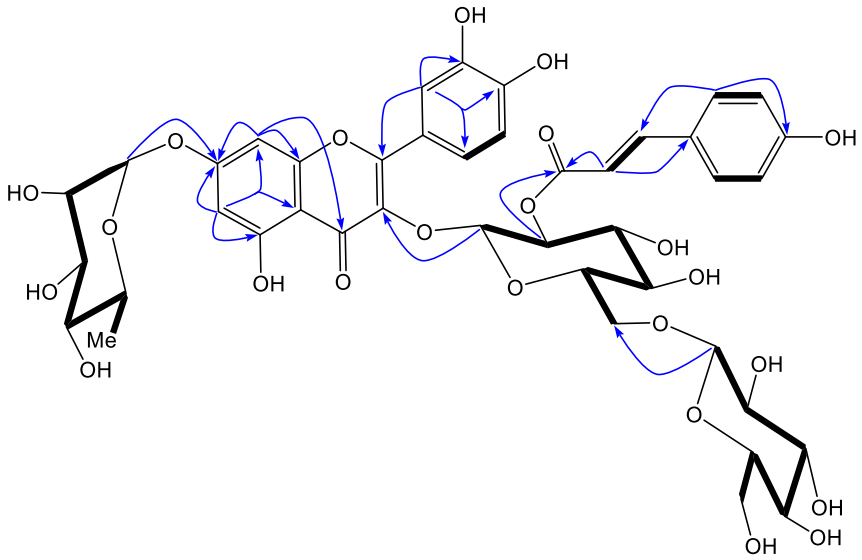
Hình 4.1.2.e. Phổ HSQC của **BA2**



Hình 4.1.2.f. Phổ HMBC của **BA2**



Hình 4.1.2.g. Phổ COSY của **BA2**

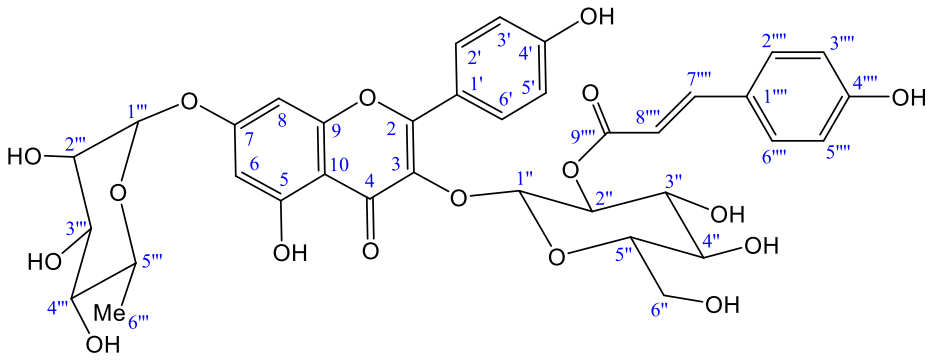


Hình 4.1.2.h. Các tương tác HMBC và COSY chính của **BA2**

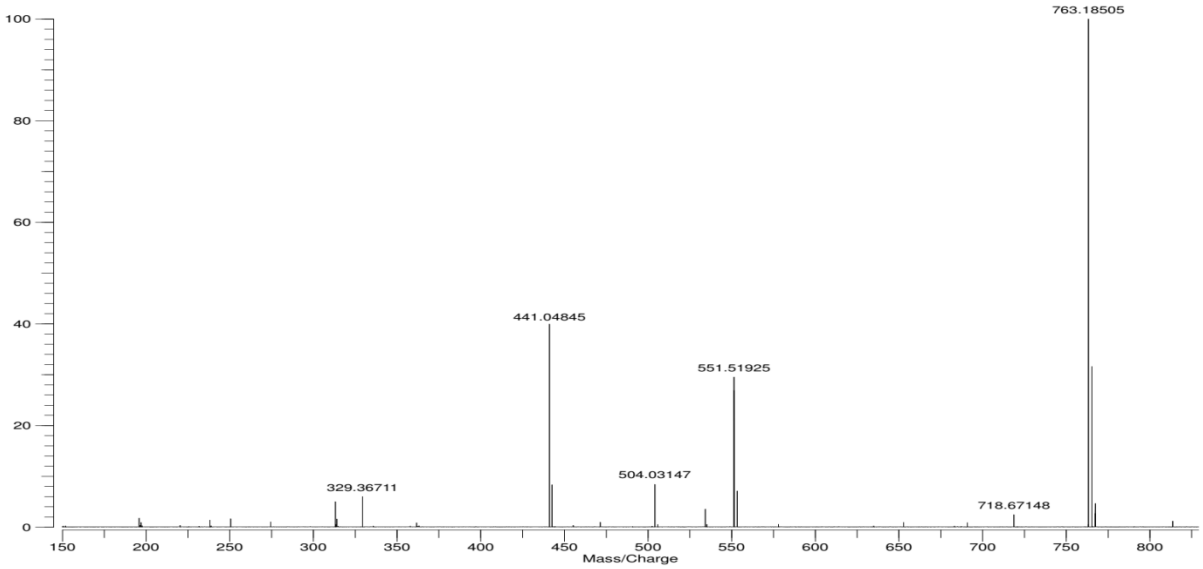
Ngoài ra, các píc đặc trưng cho 2 proton thơm có tương tác *meta* [δ_H 6,39 (H-6) và 6,65 (H-8), mỗi píc ^{1}H, d (J = 1,5 Hz)]; một đơn vị *trans*-*p*-coumaroyl tại δ_C 127,2 (C-1‴′), 131,2 (C-2‴′ và C-6‴′), 116,7 (C-3‴′ và C-5‴′), 161,1 (C-4‴′), 146,9 (C-7‴′), 115,1 (C-8‴′) và 168,5 (C-9‴′)/δ_H 7,45 (2H, d, J = 8,5 Hz, H-2‴′ và H-6‴′), 6,82 (2H, d, J = 8,5 Hz, H-3‴′ và H-5‴′), 7,67 (1H, d, J = 16,0 Hz, H-7‴′) và 6,42 (1H, d, J = 16,0 Hz, H-8‴′); 03 đơn vị đường [03 proton anome tại δ_H 5,65 (1H, d, J = 8,0 Hz, H-1″), 5,50 (1H, br s, H-1‴) và 4,22 (1H, d, J = 7,5 Hz, H-1⁗), có tương tác HSQC với các cacbon anome tương ứng tại δ_C 100,5 (C-1″), 99,9 (C-1‴) và 104,6 (C-1⁗)] cũng được ghi nhận. Trên phổ HMBC cũng ghi nhận được các tương tác xa của các proton anome H-1″ (δ_H 5,63) với C-3 (δ_C 135,2), H-1‴ (δ_H 5,50) với C-7 (δ_C 163,4); H-1⁗ (δ_H 4,22) với C-6″ (δ_C 69,5), và H-2″ (δ_H 5,11) với C-9‴ (δ_C 168,5). Như vậy, cấu trúc hóa học của **BA2** được chứng minh là quercetin 3-*O*-[2″-*O*-(*E*)-*p*-coumaroyl][*β*-D-glucopyranosyl(1→6)*β*-D-glucopyranoside]-7-*O*-*α*-L-rhamnopyranoside, một hợp chất mới và được gọi tên là barringoside B.

4.1.3. Hợp chất BA3: barringoside C (chất mới)

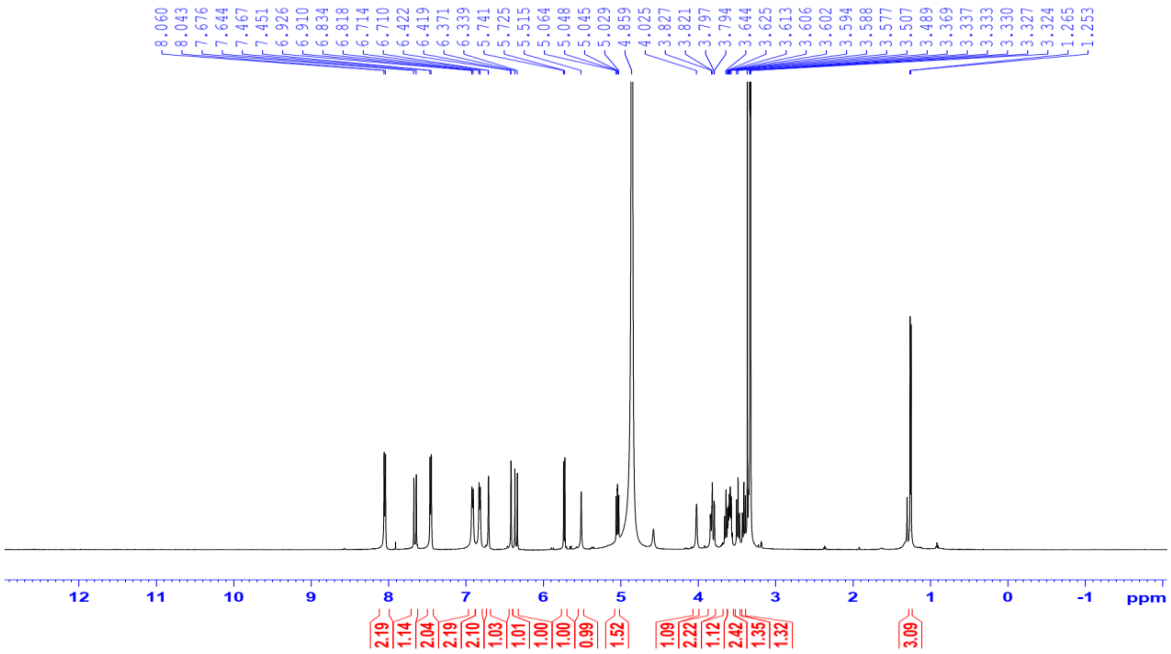
So sánh dữ liệu phổ ^{13}C và ^{1}H NMR của **BA2** cho thấy có sự tương ứng các số liệu của **BA1** ngoài việc thiếu hụt các tín hiệu của 01 đơn vị đường glucose. Điều này được khẳng định bằng phổ HR-ESI-MS với píc ion giả phân tử tại *m/z* 763,18505 $[M+Na]^+$ xác định CTPT của **BA3** là $C_{36}H_{36}O_{17}$.



Hình 4.1.3.a. Cấu trúc hóa học của **BA3**



Hình 4.1.3.b. Phổ HR-ESI-MS của **BA3**



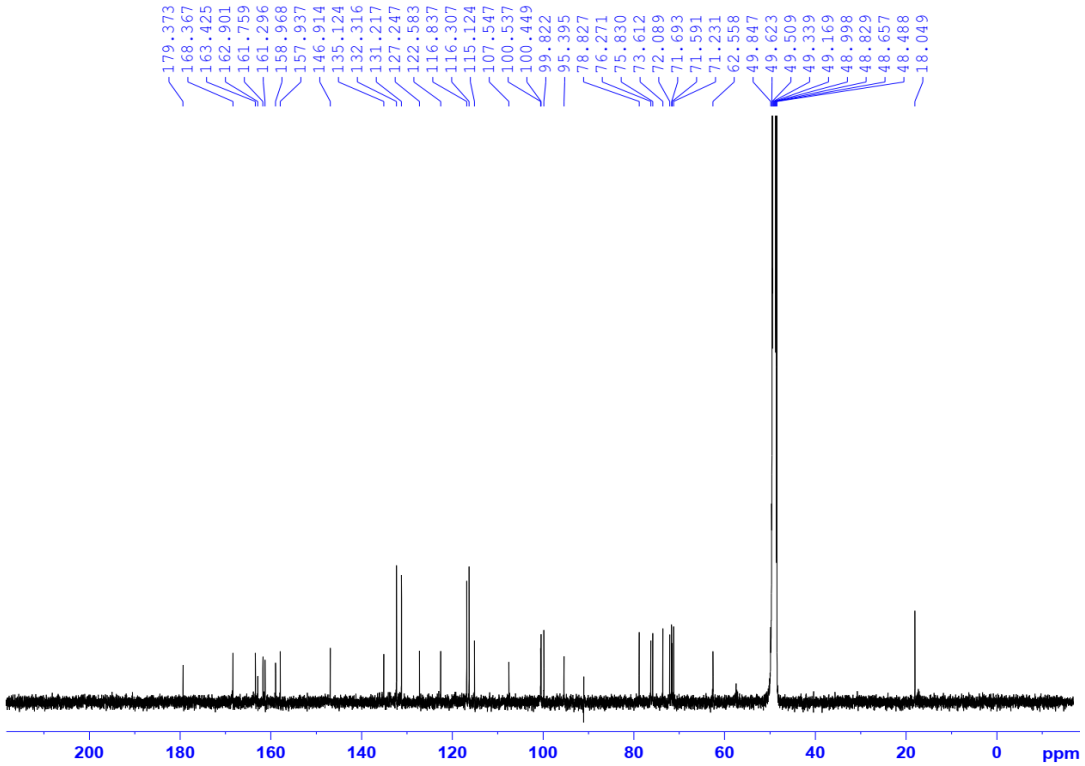
Hình 4.1.3.c. Phổ ^{1}H-NMR của **BA3**

Bảng 4.1.3. Giá trị phổ NMR của **BA3** và các chất so sánh

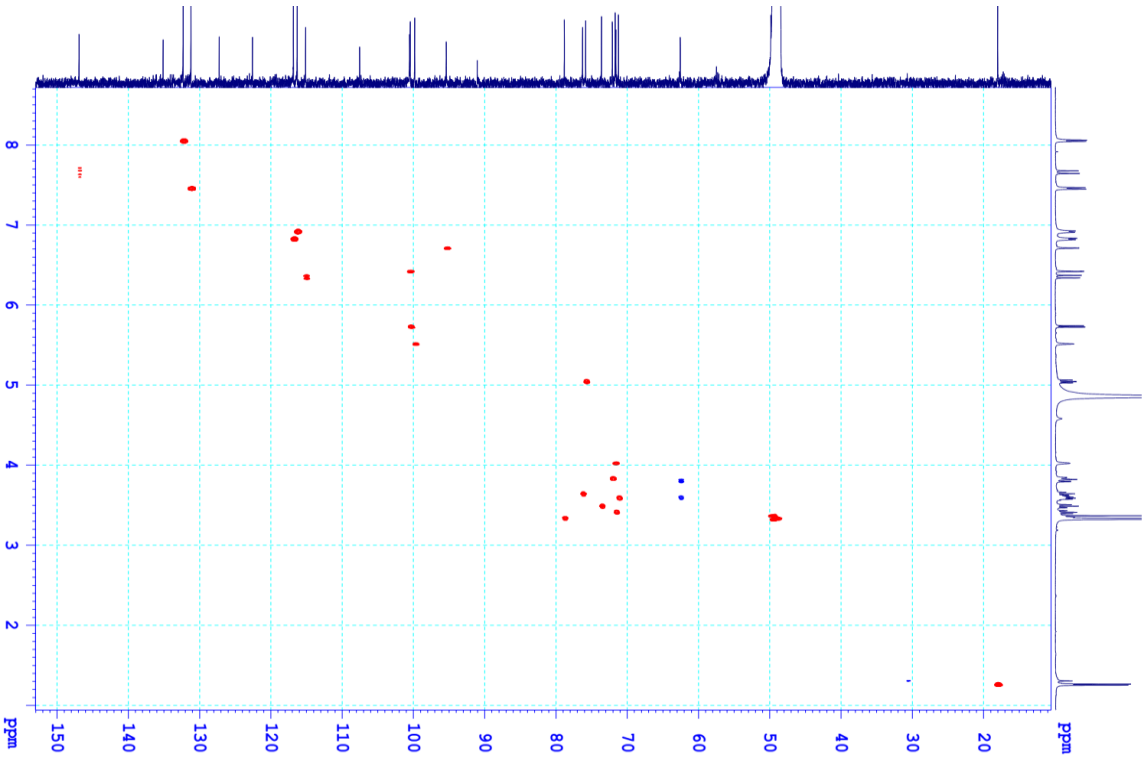
C	**[a]δC**	**[b]δC**	**[c]δC**	**δC[d,e]**	**δH[d,f]**dạng tín hiệu (*J* = Hz)	**HMBC** (H → C)
Aglycon						
2			159,3	158,9	-	
3			135,6	135,1	-	
4			179,6	179,3	-	
5			163,3	162,9	-	
6			100,7	100,5	6,42 d (2,0)	5, 7, 8, 10
7			163,6	163,4	-	
8			95,9	95,3	6,71 d (2,0)	4, 6, 7, 9, 10
9			158,0	157,9	-	
10			107,5	107,5	-	
1′			122,5	122,5	-	
2′			132,5	132,3	8,05 d (8,0)	2, 4′, 6′
3′			116,3	116,3	6,92 d (8,0)	
4′			161,8	161,7	-	
5′			116,3	116,3	6,92 d (8,0)	
6′			132,5	132,3	8,05 d (8,0)	
Glc						
1″	100,9	100,9	103,5	100,4	5,73 d (8,0)	3
2″	74,3	75,9	75,8	75,8	5,05 dd (8,0,9,0)	9‴′
3″	73,3	76,4	77,9	76,2	3,64 t (9,0)	
4″	70,4	71,6	71,4	71,5	3,41 t (9,0)	
5″	77,8	78,5	77,9	78,8	3,33 m	
6″	62,1	62,6	69,5	62,5	3,60/3,80 dd (2,0, 12,0)	
Rha						
1‴			100,0	99,8	5,51 br s	7
2‴			71,6	71,6	4,02 br s	
3‴			72,0	72,0	3,83 br d (9,0)	

4‴			73,5	73,6	3,49 t (9,0)	
5‴			71,3	71,2	3,59	
6‴			18,2	18,0	1,26 d (6,0)	4‴, 5‴
p-coumaric acid						
1⁗	127,2	127,4		127,2	-	
2⁗	131,3	131,3		131,2	7,46 d (8,0)	4⁗, 7⁗
3⁗	116,9	116,9		116,8	6,83 d (8,0)	
4⁗	161,3	160,0		161,3	-	
5⁗	116,9	116,9		116,8	6,83 d (8,0)	
6⁗	131,3	131,3		131,2	7,46 d (8,0)	
7⁗	146,8	147,1		146,9	7,66 d (16,0)	
8⁗	115,2	115,3		115,1	6,36 d (16,0)	1⁗, 7⁗, 9⁗
9⁗	168,7	168,5		168,3	-	

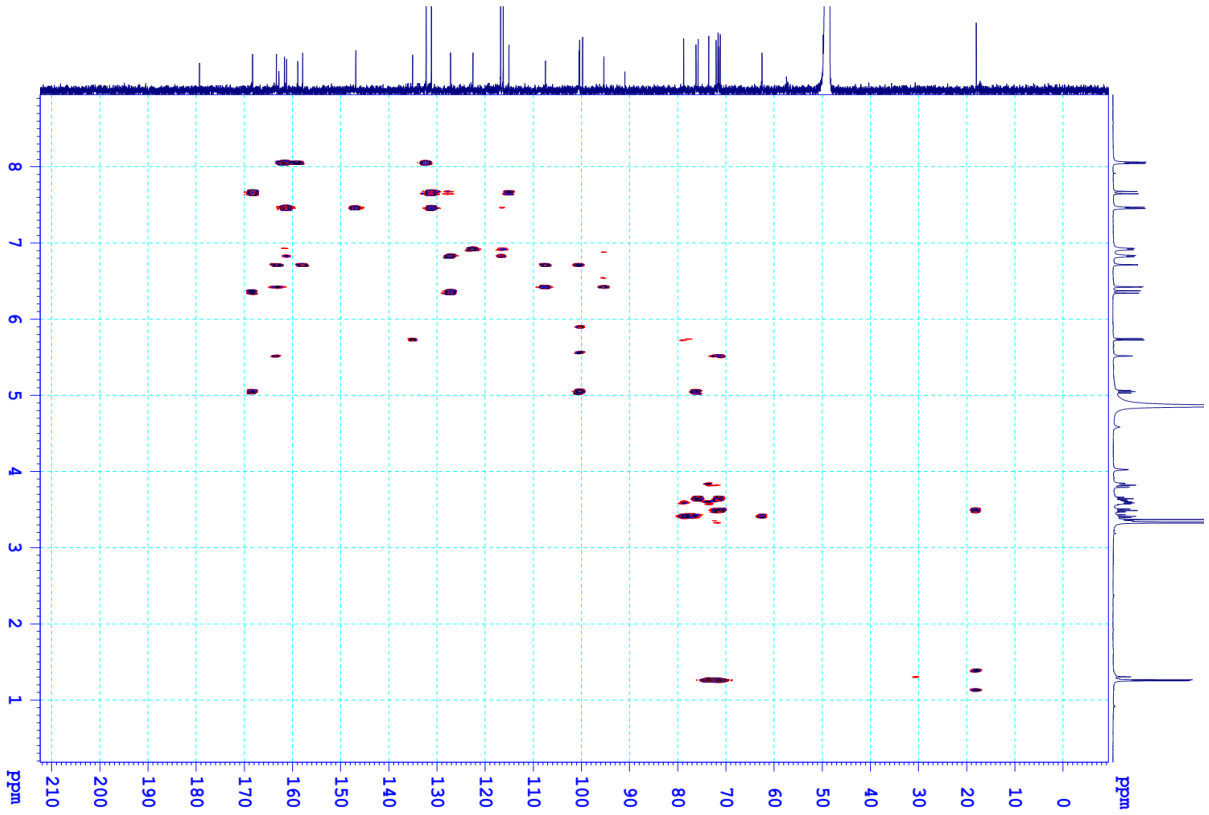
[a]δ_C của các đường galactopyranosyl và coumaroyl của 3-*O*-[2-*O*-(*E*)-*p*-coumaroyl-*β*-D-galactopyranosyl]-7-*O*-*β*-D-glucopyranosylkaempferol [78], [b]δ_C của đường glucopyranosyl và nhánh coumaroyl của allivictoside G [79], [c]δ_C của kaempferol3-*O*-*β*-[*β*-D-glucopyranosyl(1→6)D-glucopyranoside]-7-*O*-*α*-L-rhamnopyranoside [77], [d]đo trong CD_3OD, [e]125 MHz, [f]500 MHz, [g]tín hiệu bị che lấp.



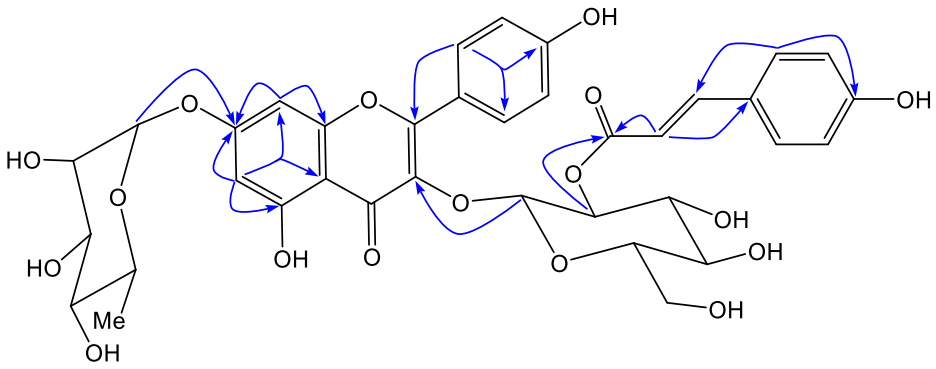
Hình 4.1.3.d. Phổ ^{13}C-NMR của **BA3**



Hình 4.1.3.e. Phổ HSQC của **BA3**



Hình 4.1.3.f. Phổ HMBC của **BA3**

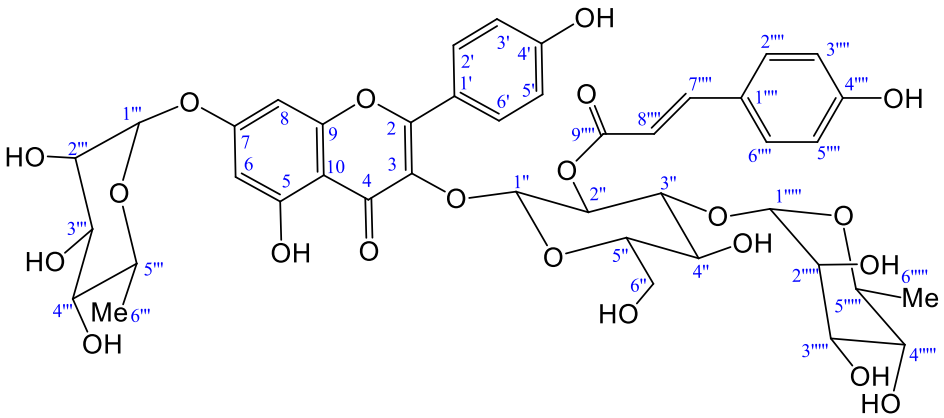


Hình 4.1.3.g. Một số tương tác HMBC chính của **BA3**

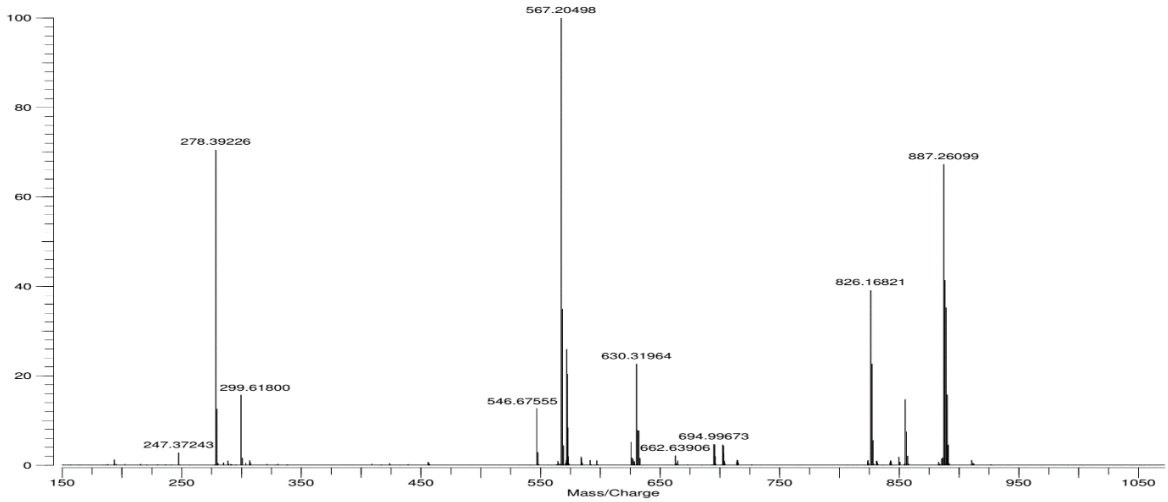
Trên phổ ^{1}H-NMR và ^{13}C-NMR của **BA3** xuất hiện các píc đặc trưng cho 2 proton thơm có tương tác *meta* [δ_H 6,42 (H-6) và 6,71 (H-8), mỗi píc 1H, d (J = 2,0 Hz)]; bốn proton thuộc vòng thơm có tương tác *ortho* [δ_H 8,05 (H-2′ và H-6′) và 6,92 (H-3′ và H-5′), mỗi tín hiệu 2H, d, J = 8,0 Hz]; một đơn vị *trans*-*p*-coumaroyl tại δ_C 127,2 (C-1′′′′), 131,2 (C-2′′′′ và C-6′′′′), 116,8 (C-3′′′′ và C-5′′′′), 161,3 (C-4′′′′), 146,9 (C-7′′′′), 115,1 (C-8′′′′) và 168,3 (C-9′′′′)/δ_H 7,46 (2H, d, J = 8,0 Hz, H-2′′′′ và H-6′′′′), 6,83 (2H, d, J = 8,0 Hz, H-3′′′′ và H-5′′′′), 7,66 (1H, d, J = 16,0 Hz, H-7′′′′) và 6,36 (1H, d, J = 16,0 Hz, H-8′′′′); 01 đường glucopyranosyl [δ_H 5,73 (1H, d, J = 8,0 Hz, H-1′′), 5,05 (1H, dd, J = 8,0, 9,0 Hz, H-2′′), 3,64 (1H, t, J = 9,0 Hz, H-3′′), 3,41 (1H, t, J = 9,0 Hz, H-4′′), 3,33 (1H, m, H-5′′), 3,60 (1H, H_a-6′′), 3,80 (1H, dd, J = 2,0, 12,0 Hz, H_b-6′′)/δ_C 100,4 (C-1′′), 75,8 (C-2′′), 76,2 (C-3′′), 71,5 (C-4′′), 78,8 (C-5′′), 62,5 (C-6′′)]; và 01 đường rhanopyranosyl [δ_H 5,51 (1H, br s, H-1′′′), 4,02 (1H, br s, H-2′′′), 3,83 (1H, br d, J = 9,0 Hz, H-3′′′), 3,49 (1H, t, J = 9,0 Hz, H-4′′′), 3,59 (1H, H-5′′′), 1,26 (3H, d, J = 6,0 Hz, H-6′′′)/δ_C 99,8 (C-1′′′), 71,6 (C-2′′′), 72,0 (C-3′′′), 73,6 (C-4′′′), 71,2 (C-5′′′), 18,0 (C-6′′′)]. So sánh giá trị phổ ^{13}C NMR của đường glucopyranosyl và nhánh coumaroyl của **BA3** với các giá trị của allivictoside G [79] và các số liệu của đường galactopyranosyl và nhánh coumaroyl của 3-*O*-[2-*O*-(*E*)-*p*-coumaroyl-*β*-D-galactopyranosyl]-7-*O*-*β*-D-glucopyranosylkaempferol [78] cùng với phân tích cụ thể các tương tác HMBC khẳng định **BA3** là kaempferol 3-*O*-[2′′-*O*-(*E*)-*p*-coumaroyl-*β*-D-glucopyranoside]-7-*O*-*α*-L-rhamnopyranoside, một hợp chất mới và được gọi tên là barringoside C.

4.1.4. Hợp chất BA4: Barringoside D (chất mới)

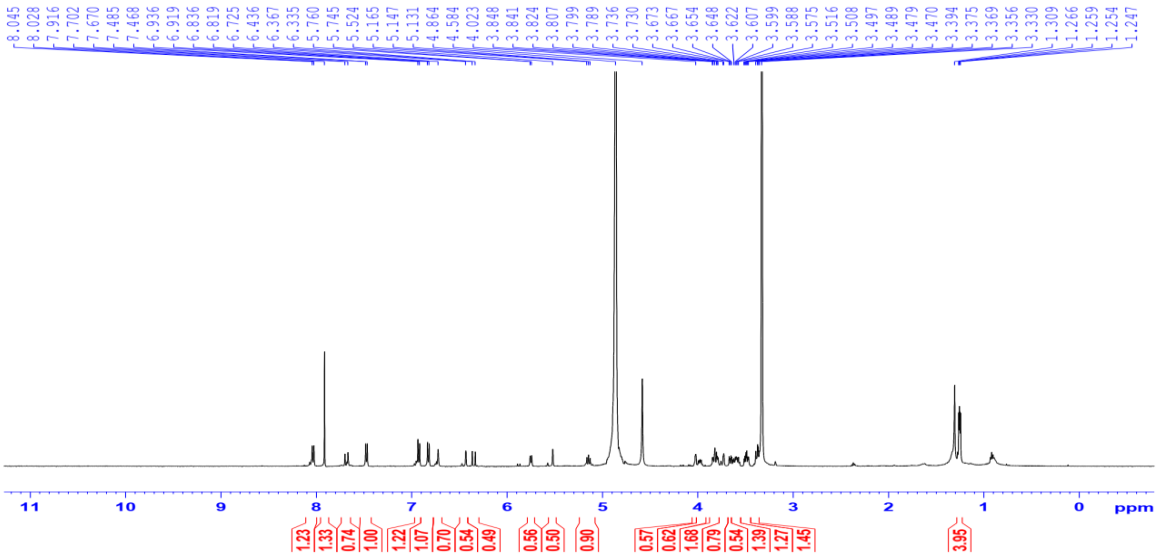
Phổ NMR của **BA4** cũng đặc trưng cho một flavonoid glysoside. Các giá trị phổ ^{13}C và ^{1}H NMR của **BA4** tương tự các giá trị của **BA3** ngoài sự xuất hiện thêm một đường α-L-rhamnopyranose tại δ_H 4,87 (1H, br s, H-1‴′), 3,73 (1H, br d, J = 3,0 Hz, H-2‴′), 3,66 (1H, br dd, J = 3,0, 9,0 Hz, H-3‴′), 3,37 (1H, H-4‴′), 3,97 (1H, dd, J = 6,0, 9,0 Hz, H-5‴′), 1,25 (3H, d, J = 6,0 Hz, H-6‴′)/δ_C 103,1 (C-1‴′), 72,5 (C-2‴′), 72,1 (C-3‴′), 73,8 (C-4‴′), 70,4 (C-5‴′), 17,8 (C-6‴′). Trên phổ HR-ESI-MS xuất hiện píc ion giả phân tử tại *m/z* 887,26099 $[M+H]^+$ xác định CTPT của **BA4** là $C_{42}H_{46}O_{21}$.



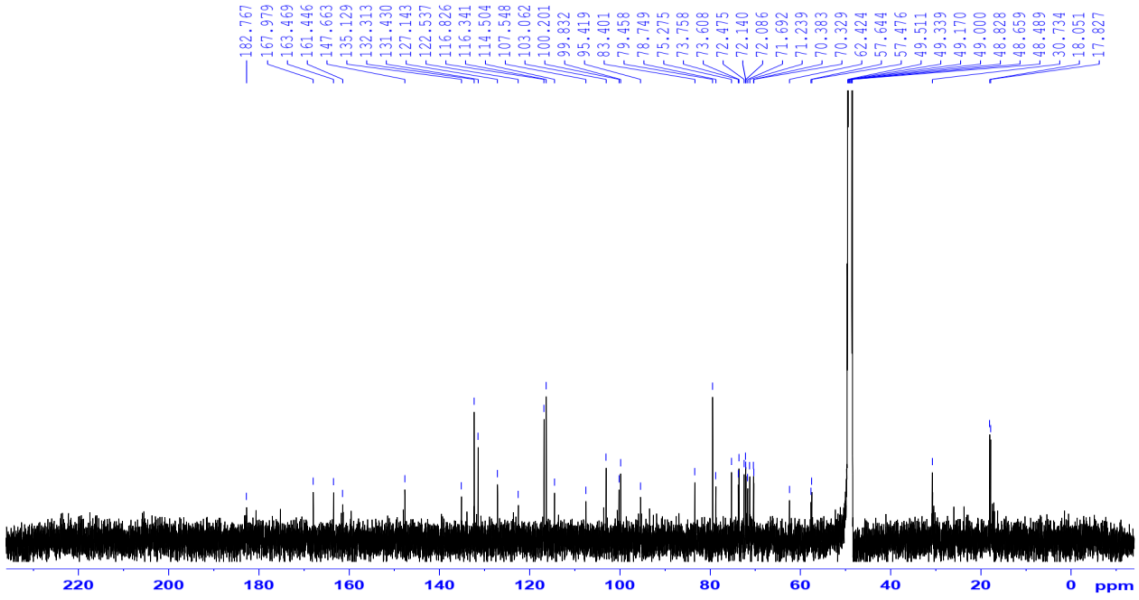
Hình 4.1.4.a. Cấu trúc hóa học của **BA4**



Hình 4.1.4.b. Phổ HR-ESI-MS của **BA4**



Hình 4.1.4.c. Phổ ^{1}H-NMR của **BA4**



Hình 4.1.4.d. Phổ ^{13}C-NMR của **BA4**

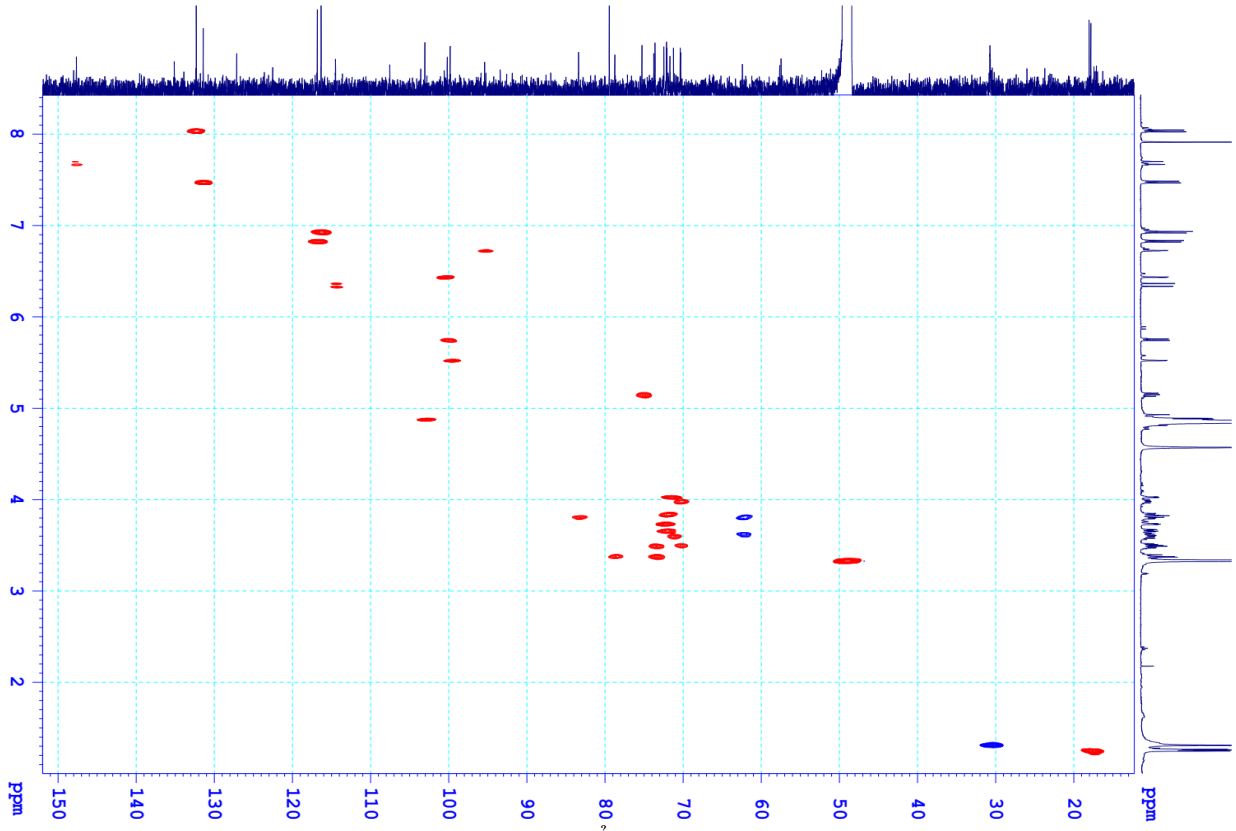
Bảng 4.1.4. Giá trị phổ NMR của **BA4** và chất so sánh

C	**$^{a}\delta_C$**	**$^{b}\delta_C$**	**δ_C ^{c,d}**	**δ_H ^{c,e}**dạng tín hiệu (*J* = Hz)	**HMBC** (H → C)
Aglycon					
2	158,9		159,0	-	
3	135,1		135,1	-	
4	179,3		nd	-	
5	162,9		nd	-	
6	100,5		100,6	6,43 br s	5, 7, 8, 10
7	163,4		163,5	-	
8	95,3		95,4	6,72 br s	4, 6, 7, 9, 10

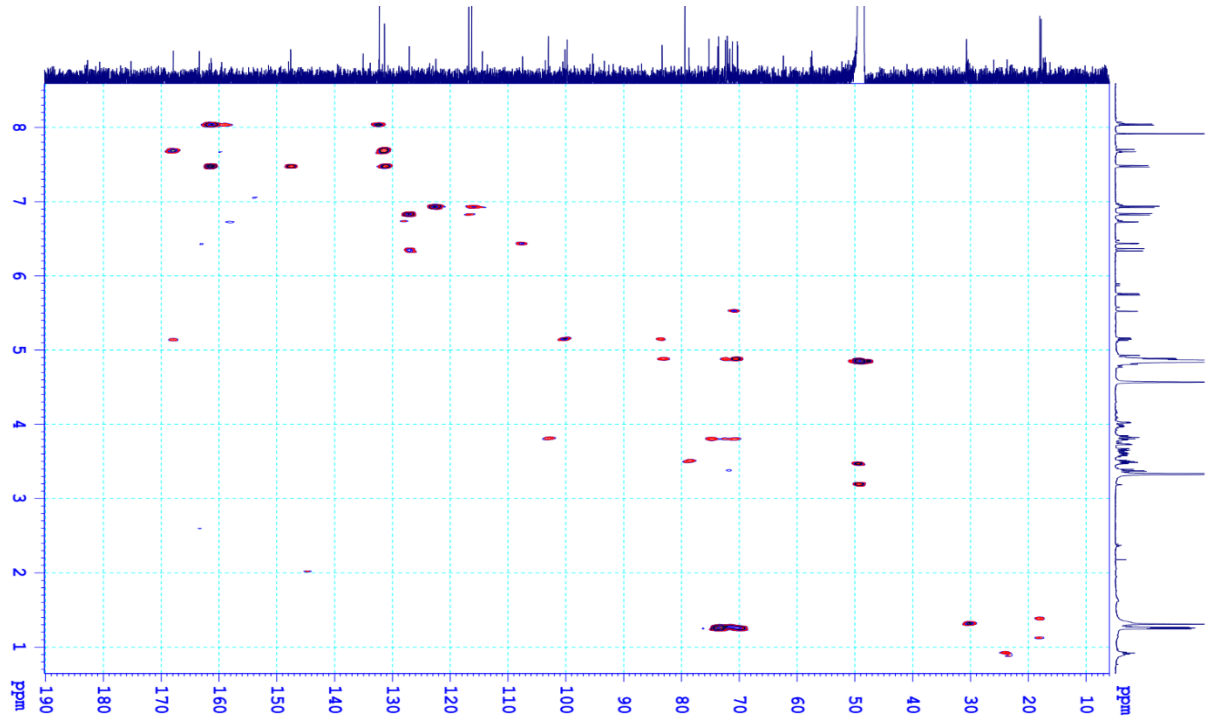
C	**[a]δ_C**	**[b]δ_C**	**δ_C [c,d]**	**δ_H [c,e]**dạng tín hiệu (*J* = Hz)	**HMBC** (H → C)
9	157,9		nd	-	
10	107,5		107,5	-	
1′	122,5		122,5	-	
2′	132,3		132,3	8,03 d (8,5)	2, 4′, 6′
3′	116,3		116,3	6,92 d (8,5)	
4′	161,7		161,4	-	
5′	116,3		116,3	6,92 d (8,5)	
6′	132,3		132,3	8,03 d (8,5)	2, 2′, 4′
Glc					
1″	100,4	100,2	100,2	5,75 d (7,5)	3
2″	75,8	75,4	75,3	5,15 dd (8,0, 9,0)	9‴′
3″	76,2	83,5	83,4	3,80[f]	
4″	71,5	70,5	70,3	3,49 [f]	
5″	78,8	78,9	78,7	3,37 [f]	
6″	62,5	62,5	62,4	3,80/3,62	
Rha					
1‴	99,8		99,8	5,52 br s	7
2‴	71,6		71,7	4,02 br s	
3‴	72,0		72,1	3,83 [f]	
4‴	73,6		73,6	3,48 [f]	
5‴	71,2		71,2	3,59 [f]	
6‴	18,0		18,0	1,26 d (6,0)	4‴, 5‴
p-cou					
1⁗	127,2	127,2	127,1	-	
2⁗	131,2	131,6	131,4	7,48 d (8,5)	4⁗, 7⁗
3⁗	116,8	116,9	116,8	6,83 d (8,5)	
4⁗	161,3	161,7	161,4	-	
5⁗	116,8	116,9	116,8	6,83 d (8,5)	
6⁗	131,2	131,6	131,4	7,48 d (8,5)	
7⁗	146,8	147,8	147,7		
8⁗	115,2	114,6	114,5	6,35 d (16,0)	1⁗, 7⁗, 9⁗

C	[a]δ_C	[b]δ_C	δ_C [c,d]	δ_H [c,e]dạng tín hiệu (*J* = Hz)	**HMBC** (H → C)
9‴′	168,7	168,4	168,0	-	
Rha2					
1⁗′		103,2	103,1	4,87 br s	
2⁗′		72,6	72,5	3,73 br d (3,0)	
3⁗′		72,2	72,1	3,66 dd (3,0, 9,0)	
4⁗′		74,0	73,8	3,37 [f]	
5⁗′		70,4	70,4	3,97 dd (6,0, 9,0)	
6⁗′		17,9	17,8	1,25 d (6,0)	

[a]δ_C của **BA3**, [b]δ_C của đường glucopyranosyl, rhamnosyl và nhánh coumaroyl của kaempferol 3-*O*-[α-rhamnopyranosyl(1→3)-(2-*O*-*p*-coumaroyl)]-*β*-glucopyranoside, 7-*O*-[*α*-rhamnopyranosyl-(1→3)-(4-*O*-*p*-coumaroyl)]-*α*-rhamnopyranoside [80]; [c]đo trong CD_3OD, [d]125 MHz, [e]500 MHz, [f]tín hiệu bị che lấp, nd: tín hiệu không ghi nhận được.



Hình 4.1.4.e. Phổ HSQC của **BA4**

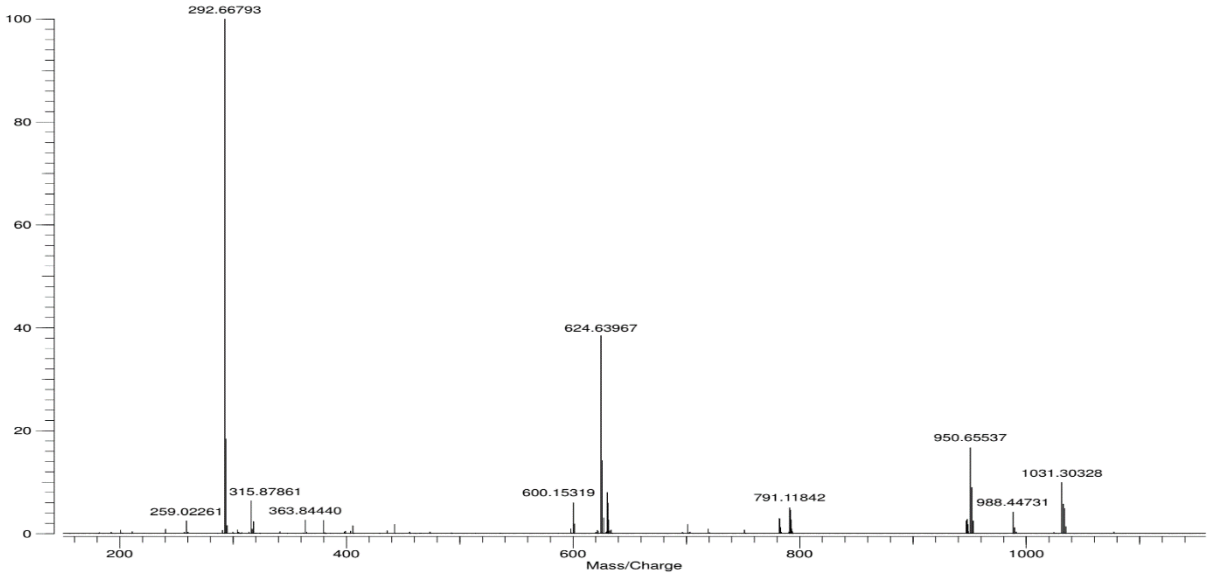


Hình 4.1.4.f. Phổ HMBC của **BA4**

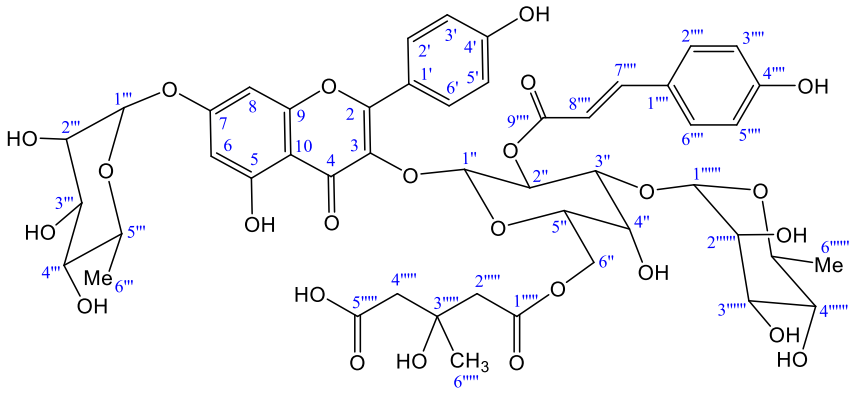
Sự tương đồng về giá trị phổ ^{13}C NMR phần đường glucose, đường rhamnose xuất hiện thêm và nhánh coumaroyl của **BA4** (bảng 4.1.4) với các số liệu tương ứng của kaempferol 3-*O*-[α-rhamnopyranosyl(1→3)-(2-*O*-*p*-coumaroyl)]-*β*-glucopyranoside, 7-*O*-[*α*-rhamnopyranosyl-(1→3)-(4-*O*-*p*-coumaroyl)]-*α*-rhamnopyranoside [80] khẳng định **BA4** là kaempferol 3-*O*-[2′′-*O*-(*E*)-*p*-coumaroyl][*α*-L-rhamnopyranosyl(1→6)*β*-D-glucopyranoside]-7-*O*-*α*-L-rhamnopyranoside, một hợp chất mới và được gọi tên là barringoside D.

4.1.5. Hợp chất BA5: Barringoside E (chất mới)

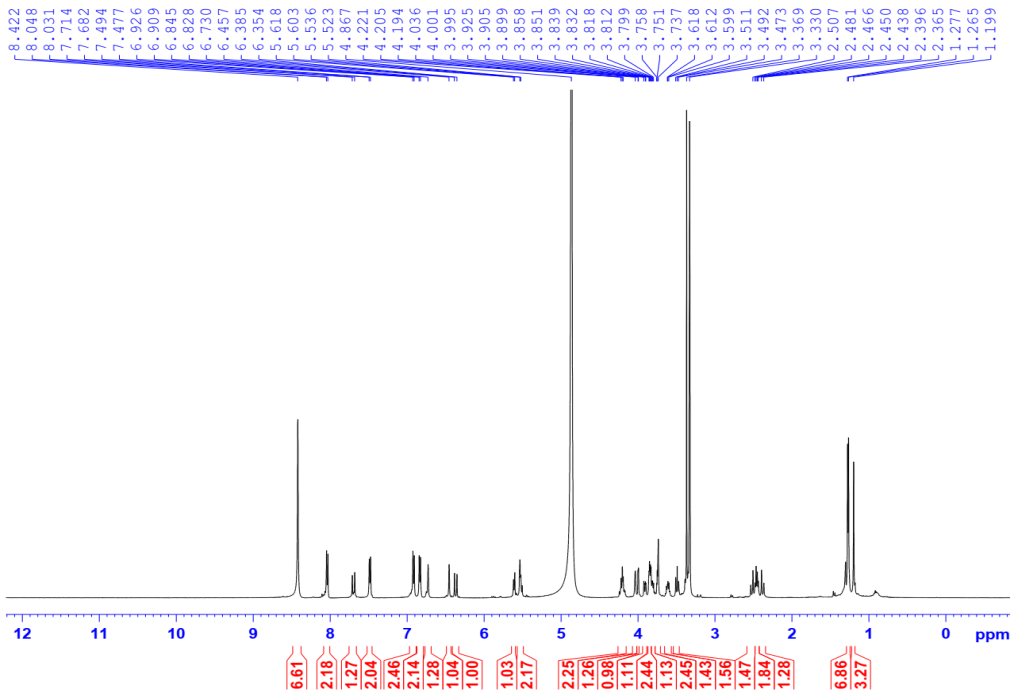
Các giá trị phổ ^{13}C và ^{1}H NMR của **BA5** tương tự các giá trị của **BA4** ngoài sự xuất hiện thêm một nhánh 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG) [81, 82] tại δ_C 172,2 (C-1′′′′′), 46,6 (C-2′′′′′), 70,6 (C-3′′′′′), 46,6 (C-4′′′′′), 177,0 (C-5′′′′′), và 27,7 (C-6′′′′′)/δ_H 2,45 (1H, d, J = 14,0 Hz, H_a-2′′′′′), 2,52 (1H, d, J = 14,0 Hz, H_b-2′′′′′), 2,38 (1H, d, J = 15,5 Hz, H_a-4′′′′′), 2,46 (1H, d, J = 15,5 Hz, H_b-4′′′′′) và 1,20 (3H, s, H-6′′′′′). Điều này được chứng minh bằng phổ HR-ESI-MS với sự có mặt píc ion dương tại *m/z* 1031,30328 $[M+H]^+$ (tính toán lý thuyết cho ion $C_{48}H_{55}O_{25}^+$, 1031,30270) cho phép xác định CTPT của **BA5** là $C_{48}H_{55}O_{25}$.



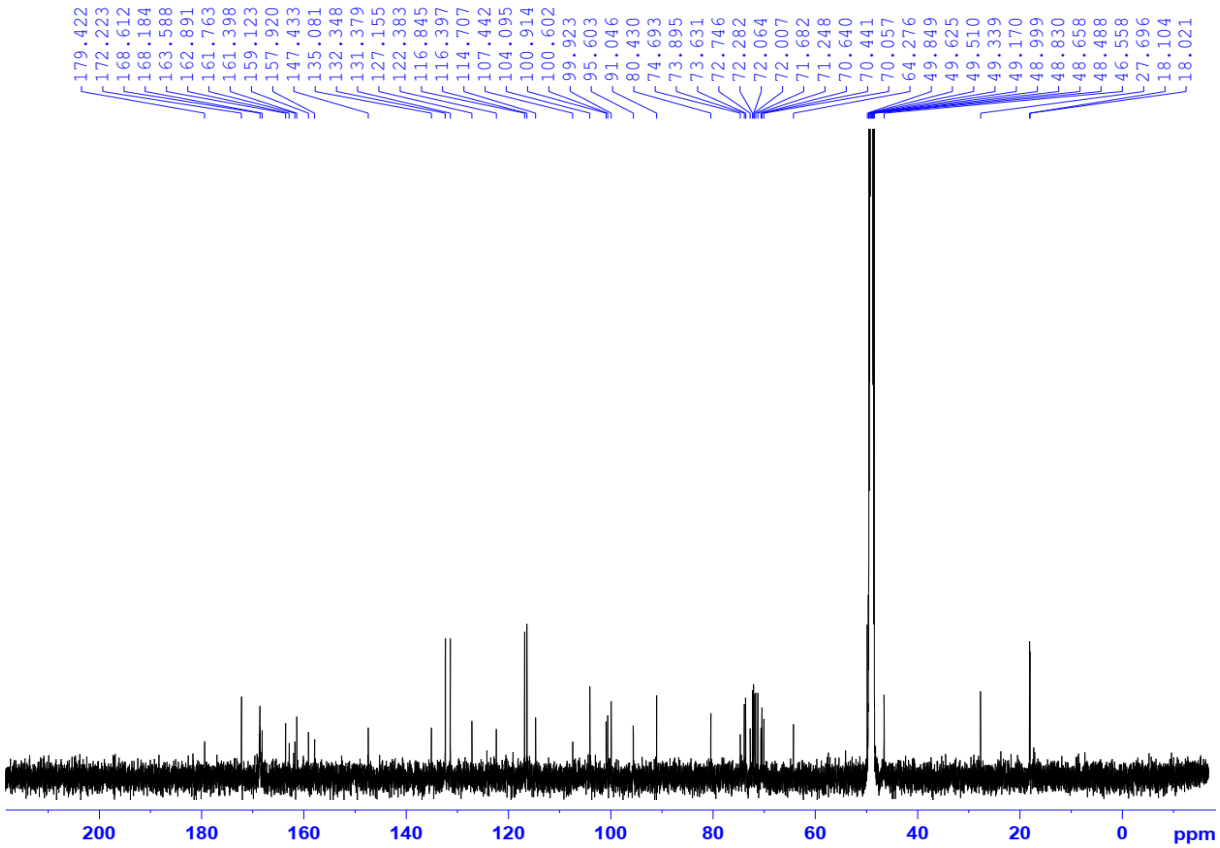
Hình 4.1.5.a. Phổ HR-ESI-MS của **BA5**



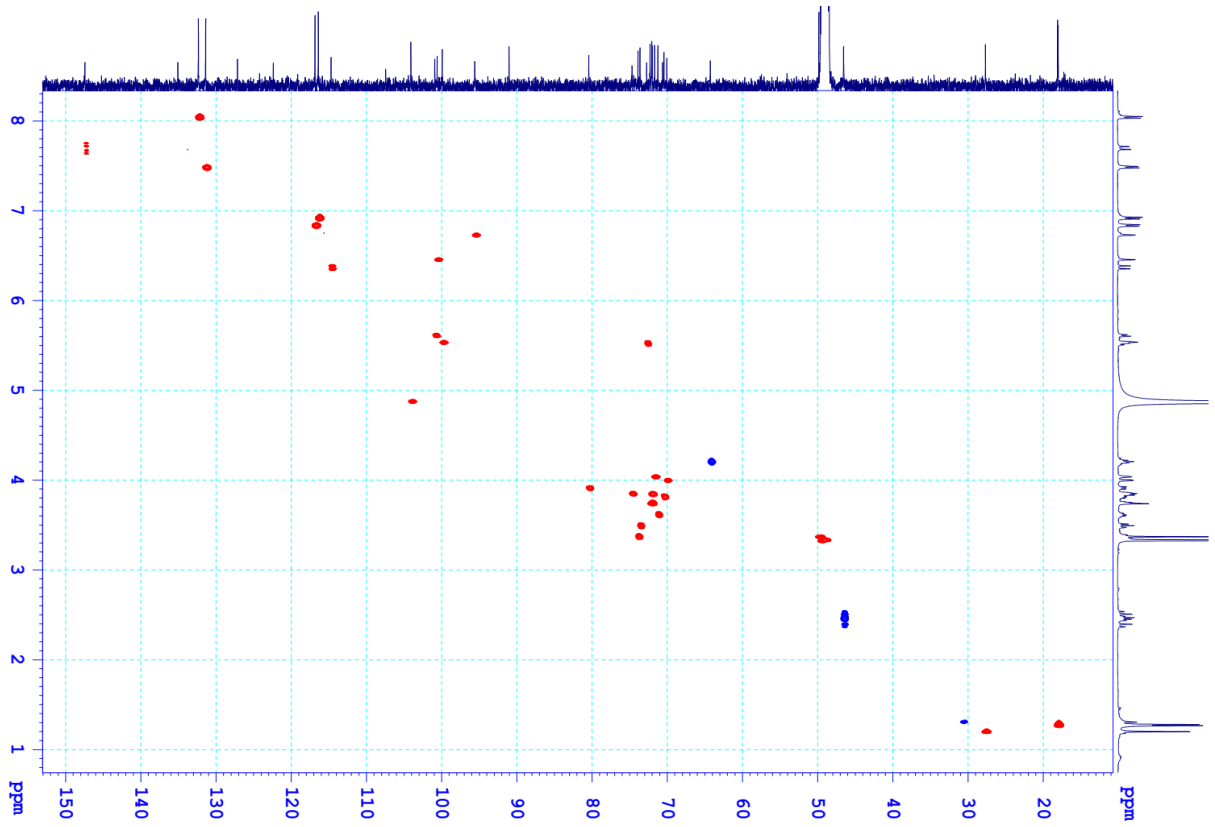
Hình 4.1.5.b. Cấu trúc hóa học của **BA5**



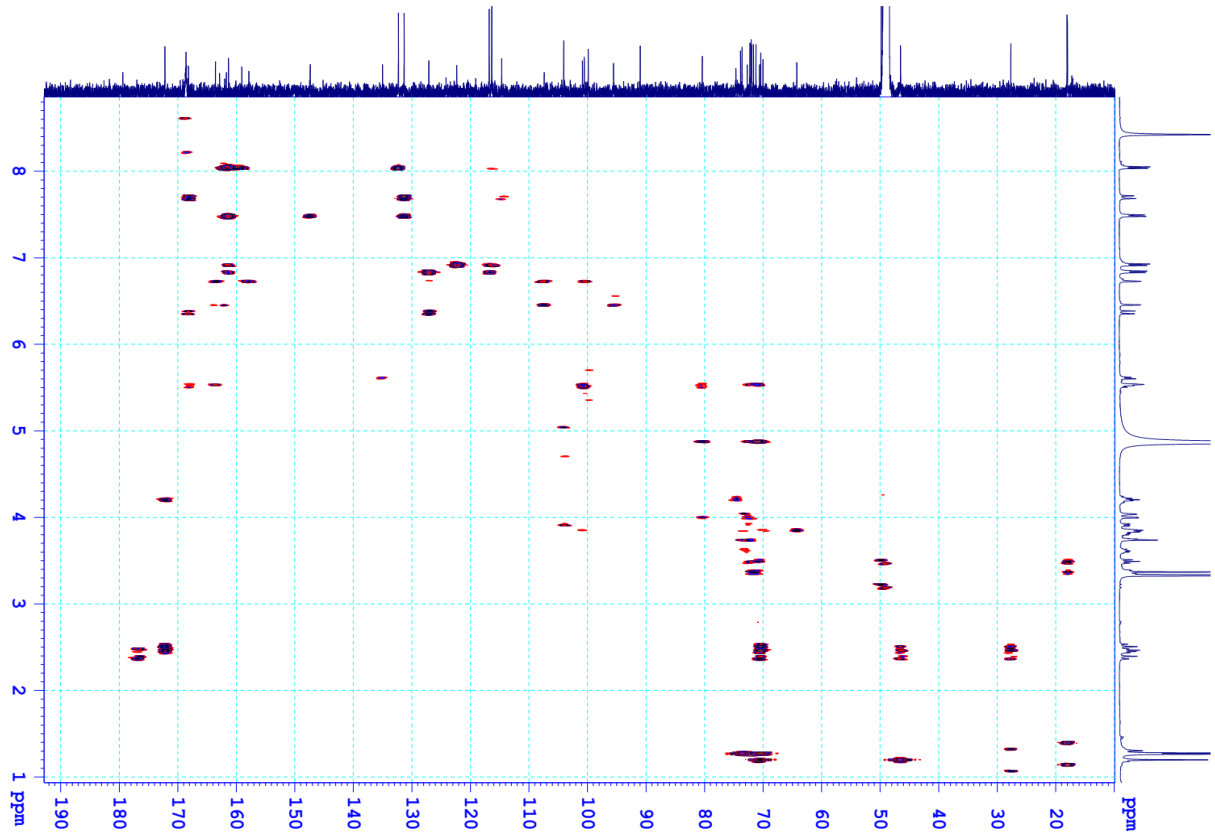
Hình 4.1.5.c. Phổ ^{1}H-NMR của **BA5**



Hình 4.1.5.d. Phổ ^{13}C-NMR của **BA5**



Hình 4.1.5.e. Phổ HSQC của **BA5**



Hình 4.1.5.f. Phổ HMBC của **BA5**

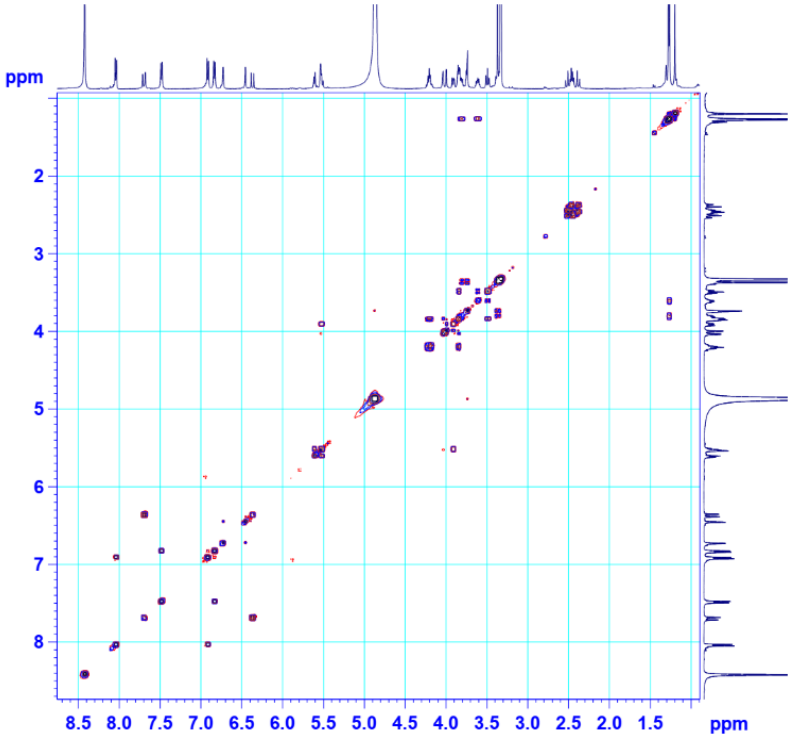
Bảng 4.1.5. Giá trị phổ NMR của **BA5** và hợp chất so sánh

C	**$^{a}\delta_C$**	**$^{b}\delta_C$**	**δ_C ^{c,d}**	**δ_H ^{c,e}**dạng tín hiệu (*J* = Hz)	**HMBC** (H → C)
Aglycon					
2		158,0	159,1	-	
3		134,7	135,1	-	
4		178,9	179,4	-	
5		161,5	161,8	-	
6		100,4	100,6	6,46 br s	8, 10
7		168,8	163,6	-	
8		95,4	95,6	6,73 br s	4, 6, 10
9		158,3	157,9	-	
10		105,1	107,4	-	
1′		122,8	122,4	-	
2′		132,2	132,3	8,04 d (8,5)	2, 4′, 6′
3′		116,3	116,4	6,92 d (8,5)	
4′		161,5	161,4	-	
5′		116,3	116,4	6,92 d (8,5)	
6′		132,2	132,3	8,04 d (8,5)	2, 2′, 4′
Gal					

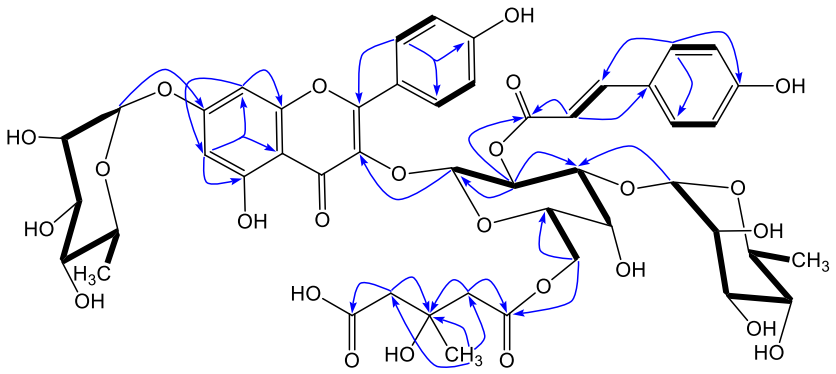
C	**[a]δC**	**[b]δC**	**δC [c,d]**	**δH [c,e]**dạng tín hiệu (*J* = Hz)	**HMBC** (H → C)
1″		100,0	100,9	5,61 d (7,5)	3
2″		**75,1**	**72,7**	5,52 dd (7,5, 9,0)	1″, 3″, 9‴″
3″		**83,5**	**80,4**	3,91 dd (3,0, 9,0)	
4″		70,3	70,1	4,00 d (3,0)	
5″		**78,6**	**74,7**	3,85 m	
6″		62,4	64,3	4,20 m	4″, 5″, 1⁗
Rha 1					
1‴			99,9	5,54 br s	7
2‴			71,7	4,04 br s	
3‴			72,0	3,85 m	
4‴			73,6	3,50 t (9,0)	
5‴			71,2	3,61 dd (6,0, 9,0)	
6‴			18,1	1,27 d (6,0)	4‴, 5‴
p-coumaric acid					
1⁗		127,1	127,1	-	
2⁗		131,4	131,4	7,49 d (8,5)	4⁗, 7⁗
3⁗		116,8	116,8	6,84 d (8,5)	
4⁗		161,5	161,4	-	
5⁗		116,8	116,8	6,84 d (8,5)	
6⁗		131,4	131,4	7,49 d (8,5)	
7⁗		147,6	147,4	7,69 d (16,0)	
8⁗		114,5	114,7	6,37 d (16,0)	1⁗, 7⁗, 9⁗
9⁗		168,0	168,2	-	
HMG					
1⁗	171,4		172,2	-	
2⁗	47,2		46,6	2,45 d (14,0) 2,52 d (14,0)	1⁗, 3⁗
3⁗	71,1		70,6	-	
4⁗	47,5		46,6	2,38 d (15,5) 2,46 d (16,0)	3⁗, 5⁗
5⁗	179,4		177,0	-	
6⁗	27,6		27,7	1,20 s	2⁗, 3⁗, 4⁗
Rha 2					
1‴″		103,0	104,1	4,87 br s	3″
2‴″		72,4	72,3	3,74 br s	
3‴″		72,1	72,1	3,74 m	
4‴″		73,7	73,9	3,37 t (9,0)	
5‴″		70,2	70,4	3,81 dd (6,0, 9,0)	

C	[a]δ_C	[b]δ_C	δ_C [c,d]	δ_H [c,e]dạng tín hiệu (J = Hz)	HMBC (H → C)
6‴‴‴‴		17,8	18,0	1,27 d (6,0)	4‴‴‴‴, 5‴‴‴‴

[a]δ_C phần nhánh (3-hydroxy-3-methyl)glutaroyl của methyl 3,5-di-*O*-caffeoyl-4-*O*-(3-hydroxy-3-methyl)glutaroylquinate [81], [b]δ_C của đường galactosyl, rhamnosyl và nhóm *p*-coumaroyl của kaempferol-3-*O*-[2-*O*-(trans-*p*-coumaroyl)-3-*O*-*α*-L-rhamnopyranosyl]-*β*-D-glucopyranoside [83], [c]đo trong CD_3OD, [d]125 MHz, [e]500 MHz, [f]tín hiệu bị che lấp.



Hình 4.1.5.g. Phổ COSY của **BA5**



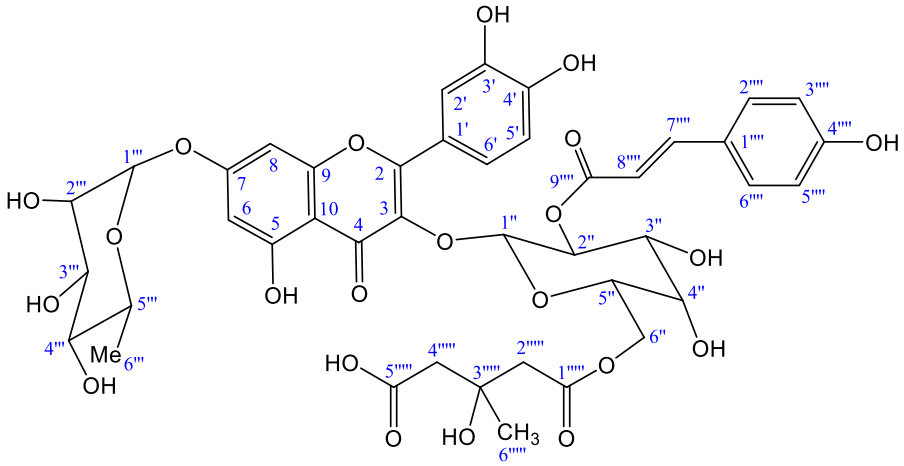
Hình 4.1.5.h. Các tương tác HMBC và COSY chính của **BA5**

Vị trí đính của nhánh HMG tại C-6″ được gán dựa trên tương tác xa HMBC của H-6″ (δ_H 4,20) với C-1‴‴ (δ_C 172,2). Tuy nhiên, các số liệu phổ ^{13}C NMR của đường thứ nhất của **BA5** khác xa so với các giá trị của **BA4** gợi ý cho sự có mặt của đường *β*-D-galactopyranosyl ở hợp chất **BA5**, nhận định này được khẳng định thêm bằng hằng số tương tác ^{1}H NMR với $J_{1''\text{-}2''}$ = 8,0 Hz, $J_{2''\text{-}3''}$ = 9,0 Hz và $J_{3''\text{-}4''}$ = 3,0 Hz. Phân tích cụ thể các tín hiệu COSY và HMBC cho phép chứng minh cấu trúc hóa học của **BA5**

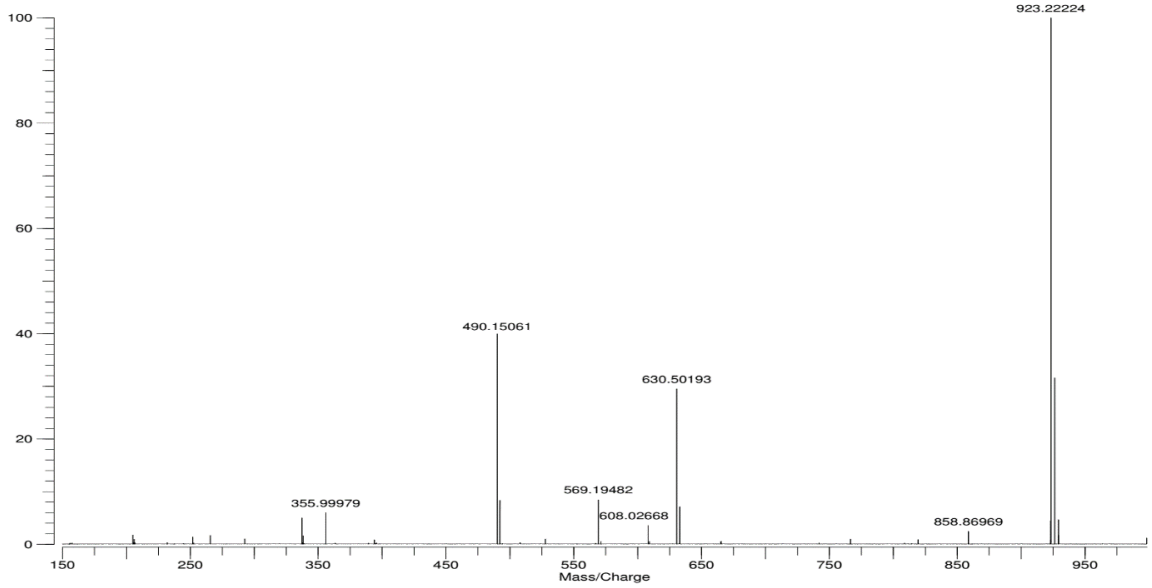
là kaempferol 3-*O*-[2-*O*-(*E*)-*p*-coumaroyl][6-*O*-(3-hydroxy-3-methyl)glutaroyl][*α*-L-rhamnopyranosyl(1→3)]-*β*-D-galactopyranoside 7-*O*-*α*-L-rhamnopyranoside, một hợp chất mới và được gọi tên là barringoside E.

4.1.6. Hợp chất BA6: Barringoside F (chất mới)

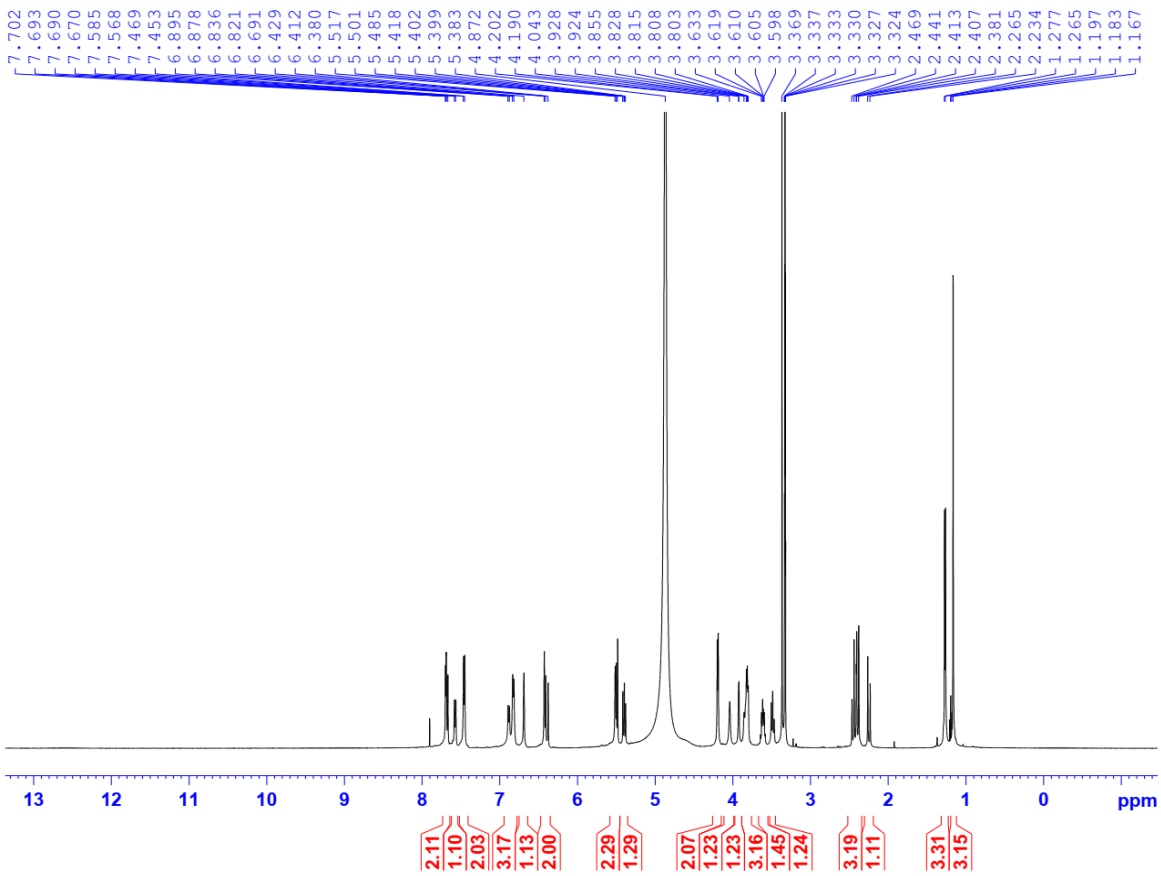
Các giá trị phổ ^{13}C và ^{1}H NMR của **BA6** tương tự các giá trị của **BA5** ngoài việc thiếu hụt 01 đơn vị đường rhamnose và sự xuất hiện các tín hiệu thuộc 1 vòng thơm tương tác ABX ở **BA6** thay cho vòng AA′B′B ở **BA5**. Điều này được khẳng bằng phổ HR-ESI-MS với sự có mặt pic ion tại *m/z* 923,22224 $[M+Na]^+$ (tính toán lý thuyết cho ion $C_{42}H_{44}NaO_{22}^+$, 923,22165) chứng minh CTPT của **BA6** là $C_{42}H_{44}O_{22}$.



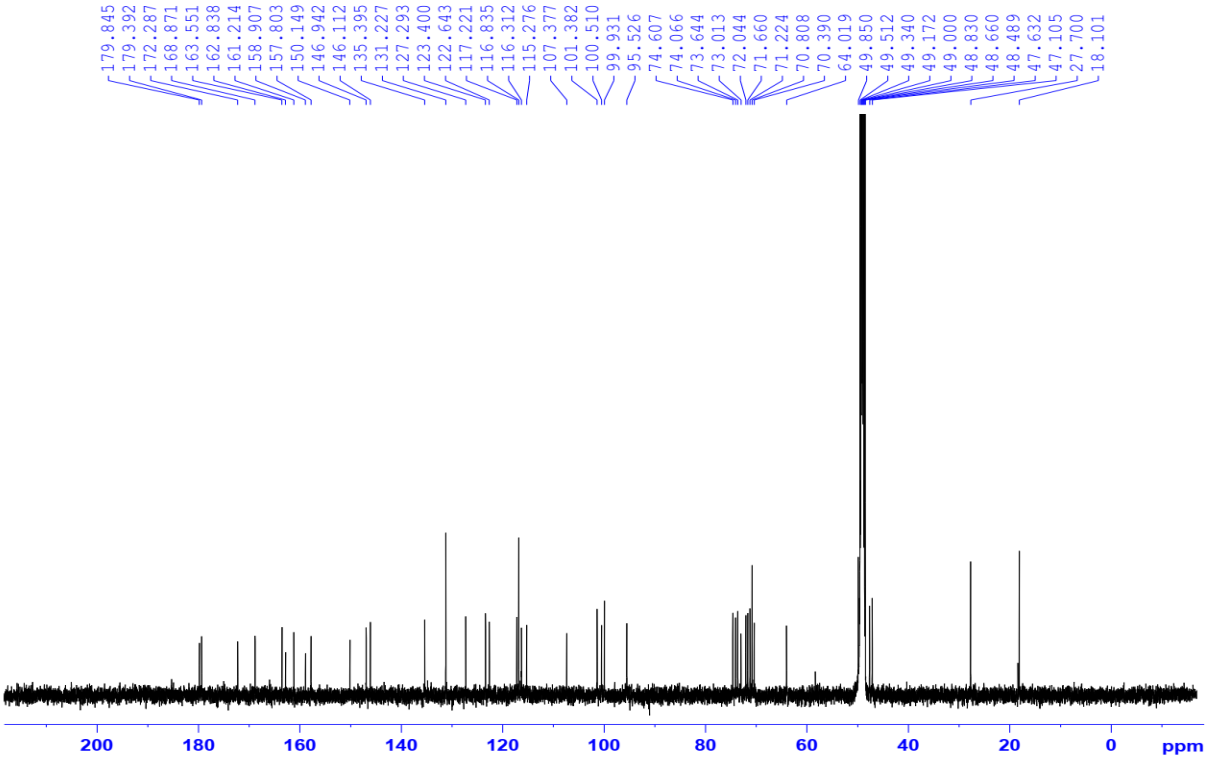
Hình 4.1.6.a. Cấu trúc hóa học của **BA6**



Hình 4.1.6.b. Phổ HR-ESI-MS của **BA6**



Hình 4.1.6.c. Phổ ^{1}H-NMR của **BA6**



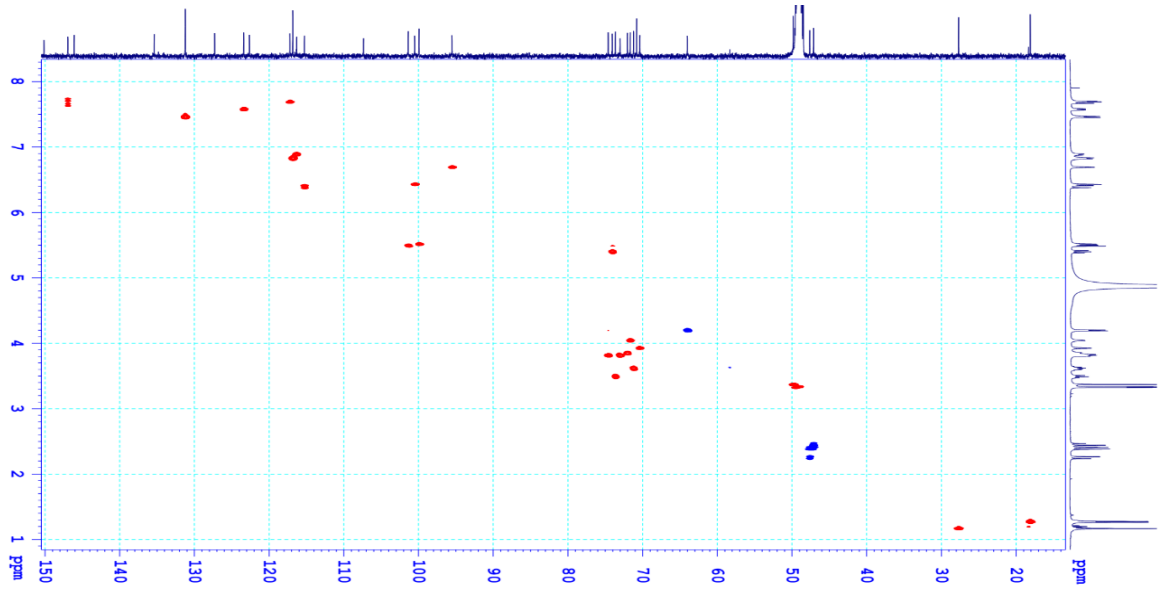
Hình 4.1.6.d. Phổ ^{13}C-NMR của **BA6**

Bảng 4.1.6. Giá trị phổ NMR của hợp chất **BA6** và các chất so sánh

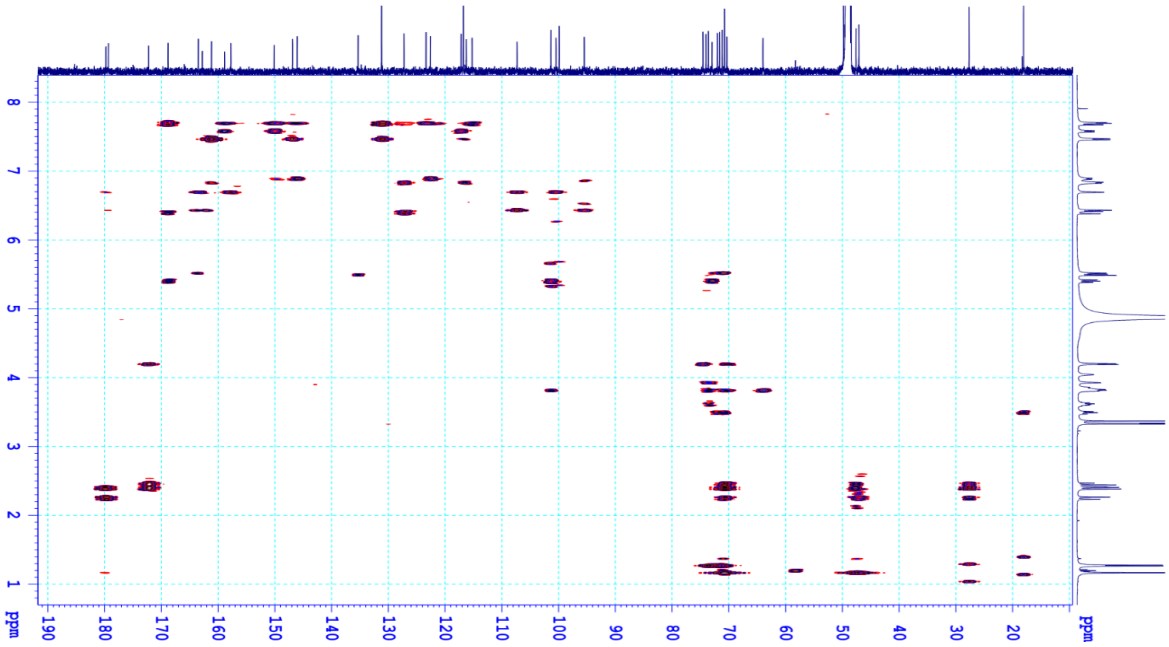
C	**[a]δC**	**[b]δC**	**δC [c,d]**	**δH [c,e]**dạng tín hiệu (*J* = Hz)	**HMBC** (H → C)
Aglycon					
2			158,9	-	
3			135,4	-	
4			179,4	-	
5			162,8	-	
6			100,5	6,43 br s	8, 10
7			163,5	-	
8			95,5	6,69 br s	4, 6, 10
9			157,8	-	
10			107,4	-	
1′			122,6	-	
2′			117,2	6,89 d (2,0)	2, 4′, 6′
3′			146,1	-	
4′			150,1	-	
5′			116,3	6,89 d (8,5)	
6′			123,4	7,58 br d (8,5)	2, 2′, 4′
Gal					
1″		101,1	101,4	5,49 d (8,0)	3
2″		74,0	74,1	5,40 dd (8,0, 9,0)	1″, 3″, 9‴″
3″		73,2	73,0	3,81[f]	
4″		70,6	70,4	3,93 d (2,0)	
5″		75,0	74,6	3,81[f]	
6″		64,2	64,0	4,20 m	4″, 5″, 1‴″
Rha					
1‴			99,9	5,52 br s	7
2‴			71,7	4,04 br s	
3‴			72,0	3,85 br d (9,0)	
4‴			73,6	3,49 t (9,0)	
5‴			71,2	3,62 m	
6‴			18,1	1,27 d (6,0)	4‴, 5‴
p-coumaric acid					

1′′′′		127,2	127,3	-	
2′′′′		131,2	131,2	7,46 d (8,0)	4′′′′, 7′′′′
3′′′′		116,8	116,8	6,93 d (8,0)	
4′′′′		161,3	161,2	-	
5′′′′		116,8	116,8	6,93 d (8,0)	
6′′′′		131,2	131,2	7,46 d (8,0)	
7′′′′		147,0	146,9	7,68 d (16,0)	
8′′′′		115,2	115,3	6,39 d (16,0)	1′′′′, 7′′′′, 9′′′′
9′′′′		168,8	168,9	-	
HMG					
1′′′′′	171,4		172,3	-	
2′′′′′	47,2		47,1	2,40 d (14,0)/2,46 d (14,0)	1′′′′′, 3′′′′′
3′′′′′	71,1		70,8	-	
4′′′′′	47,5		47,6	2,24 d (15,5)/2,40 d (15,5)	3′′′′′, 5′′′′′
5′′′′′	179,4		179,8	-	
6′′′′′	27,6		27,7	1,17 s	2′′′′′, 3′′′′′, 4′′′′′

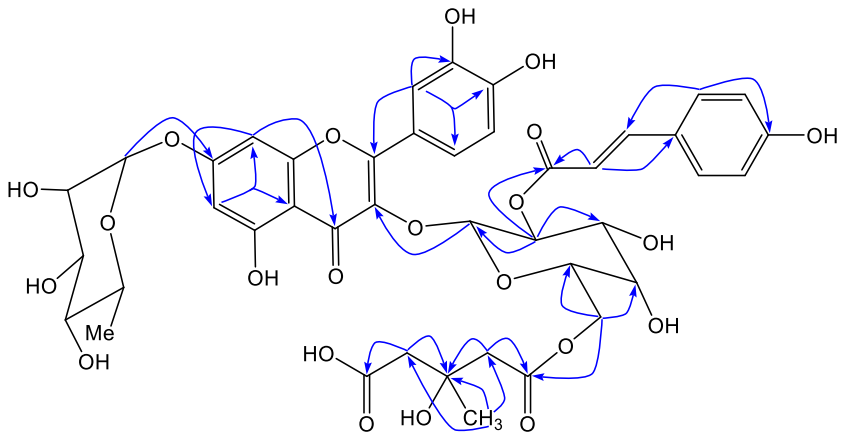
[a]δ_C của nhánh (3-hydroxy-3-methyl)glutaroyl của methyl 3,5-di-*O*-caffeoyl-4-*O*-(3-hydroxy-3-methyl)glutaroylquinate [81], [b]δ_C cho đơn vị đường galactosyl và nhóm *p*-coumaroyl của kaempferol 3-*O*-(2′′,6′′-di-*O*-*E*-*p*-coumaryl)-*β*-D-galactopyranoside [84], [c]đo trong CD_3OD, [d]125 MHz, [e]500 MHz, [f]tín hiệu chồng lấp.



Hình 4.1.6.e. Phổ HSQC của **BA6**



Hình 4.1.6.f. Phổ HMBC của **BA6**



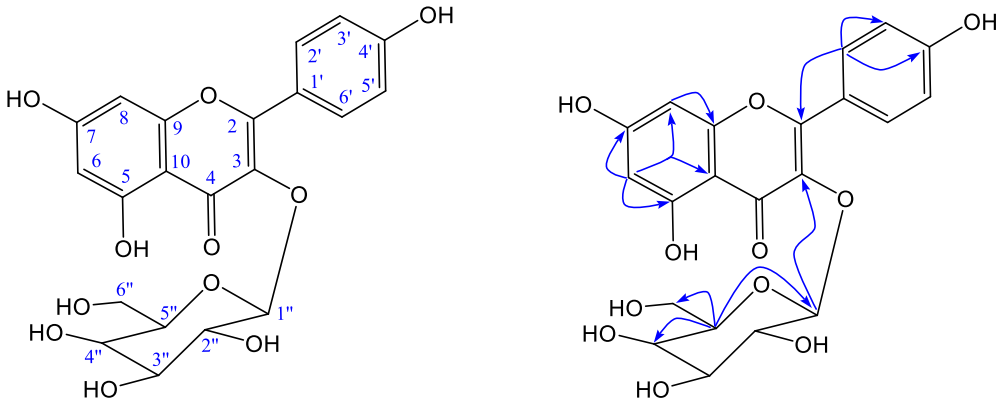
Hình 4.1.6.g. Một số tương tác HMBC chính của **BA6**

Sự phù hợp về giá trị phổ ^{13}C NMR của đơn vị đường galactosyl và nhánh *p*-coumaroyl của **BA6** với các giá trị của kaempferol 3-*O*-(2′′,6′′-di-*O*-*E*-*p*-coumaroyl)-*β*-D-galactopyranoside [84] cùng với phân tích cụ thể các tương tác xa trên phổ HMBC khẳng định **BA6** là quercetin 3-*O*-[2-*O*-(*E*)-*p*-coumaroyl][6-*O*-(3-hydroxy-3-methyl)glutaroyl]-*β*-D-galactopyranoside 7-*O*-*α*-L-rhamnopyranoside, một hợp chất mới và được gọi tên là barringoside F.

4.1.7. Hợp chất BA7: kaempferol 3-O-β-D-galactopyranoside

Hợp chất **BA7** tách được dưới dạng bột màu vàng. Phổ ^{1}H-NMR của **BA7** đặc trưng cho một flavonoid dạng khung kampferol với sự có các píc đặc trưng cho 2 cặp proton thơm đối xứng tương tác *ortho* với nhau tại δ_H 8,11 (2H, d, *J* = 8,5 Hz, H-2′ và H-6′) và 6,91 (2H, d, *J* = 8,6 Hz, H-3′ và H-5′) và 2 proton thơm có tương tác *meta* tại δ_H 6,23 (1H,

br s, H-6) và 6,43 (1H, br s, H-8). Ngoài ra, một đơn vị đường 3-*O*-*β*-D-galactopyranoside cũng được ghi nhận tại δ_C 105,0 (CH, C-1″), 73,0 (CH, C-2″), 75,0 (CH, C-3″), 70,0 (CH, C-4″), 77,1 (CH, C-5″) và 62,0 (CH_2, C-6″)/δ_H 5,16 (1H, d, *J* = 8,0 Hz, H-1″), 3,81 (1H, dd, *J* = 8,0, 9,0 Hz, H-2″), 3,55 (1H, dd, *J* = 9,0, 4,0 Hz, H-3″), 3,84 (1H, br d, *J* = 4,0 Hz, H-4″), 3,46 (1H, br t, *J* = 6,0 Hz, H-5″), 3,54 (1H, dd, *J* = 6,0, 11,0 Hz, H_a-6″) và 3,64 (1H, dd, *J* = 2,0, 11,0 Hz, H_b-6″) [85, 86].



Hình 4.1.7. Cấu trúc hóa học và một số tương tác HMBC chính của **BA7**

Từ các giá trị phổ NMR của **BA7** so sánh với các số liệu đã đăng tải cho thấy **BA7** là kaempferol 3-*O*-*β*-D-galactopyranoside hay còn được gọi là trifolin [85, 86]. Vị trí đính của đường galactose tại C-3 được xác định bằng tương tác HMBC ghi nhận được giữa H-1″ (δ_H 5,16) và C-3 (δ_C 135,6). Phân tích cụ thể các tín hiệu trên phổ HMBC khẳng định cấu trúc hóa học của **BA7**. Các phổ NMR của **BA7** xem tại Phụ lục 1.

Bảng 4.1.7. Giá trị phổ NMR của **BA7** và hợp chất so sánh

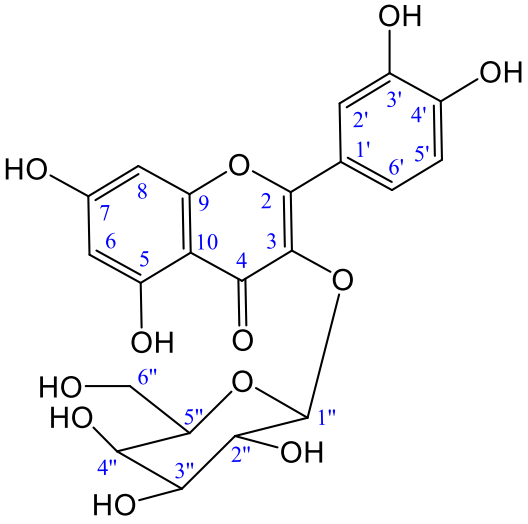
C	**$^a\delta_C$**	**$^b\delta_C$**	**δ_C^{c,d}**	**δ_H^{c,e}** dạng tín hiệu (*J*= Hz)	**HMBC** (H → C)
2	156,3	159,0	159,0	-	
3	133,4	135,7	135,6	-	
4	177,4	179,6	179,6	-	
5	161,2	163,2	163,0	-	
6	98,7	100,7	99,9	6,23 br s	5, 7, 8, 10
7	164,2	167,9	166,2	-	
8	93,6	95,4	94,8	6,43 br s	6, 9, 10
9	156,4	158,8	158,5	-	
10	103,9	106,6	105,6	-	
1′	120,8	123,0	122,7	-	

2′	**130,9**	**116,3**	**132,3**	8,11 d (8,5)	2, 3′, 4′
3′	**115,0**	**132,5**	**116,1**	6,91 d (8,5)	1′, 4′, 6′
4′	159,9	161,8	161,6	-	
5′	**115,0**	**132,5**	**116,1**	6,91 d (8,5)	
6′	**130,9**	**116,3**	**132,3**	8,11 d (8,5)	
Gal					
1″	101,6	105,4	105,0	5,16 d (8,0)	3
2″	**71,2**	**75,2**	**73,0**	3,81 dd (8,0, 9,0)	1″, 3″
3″	**73,1**	**73,2**	**75,0**	3,55 dd (9,0, 4,0)	
4″	67,8	70,1	70,0	3,84 br d (4,0)	3″
5″	75,7	77,3	77,1	3,46 br t (6,0)	3″
6″	60,2	62,1	62,0	3,54 dd (6,0, 11,0) 3,64 dd (2,0, 11,0)	1″, 4″, 6″

[a]δ_C của trifolin đo trong DMSO-d_6 [85], [b]δ_C của trifolin đo trong CD_3OD [86], [c]đo trong CD_3OD, [d]125 MHz, [e]500 MHz.

4.1.8. Hợp chất BA8: quercetin-3-O-β-D-galactopyranoside

Hợp chất **BA8** tách được dưới dạng bột màu vàng. Phổ ^{1}H-NMR của **BA8** gần giống các phổ của **BA7**, ngoài việc có các tín hiệu của ba proton thuộc vòng thơm ABX tại δ_H 7,52 (1H, d, J = 2,0 Hz, H-2′), 6,82 (1H, d, J = 8,0 Hz, H-5′) và 7,66 (1H, dd, J = 2,0, 8,0 Hz, H-6′) thay cho hai cặp proton vòng thơm đối xứng tương tác ở vị trí *ortho*. Với cơ sở số liệu trên, **BA8** được dự đoán có cấu trúc khung dạng quercetin.



Hình 4.1.8. Cấu trúc hóa học của **BA8**

Bảng 4.1.8. Giá trị phổ NMR của **BA8** và các chất so sánh

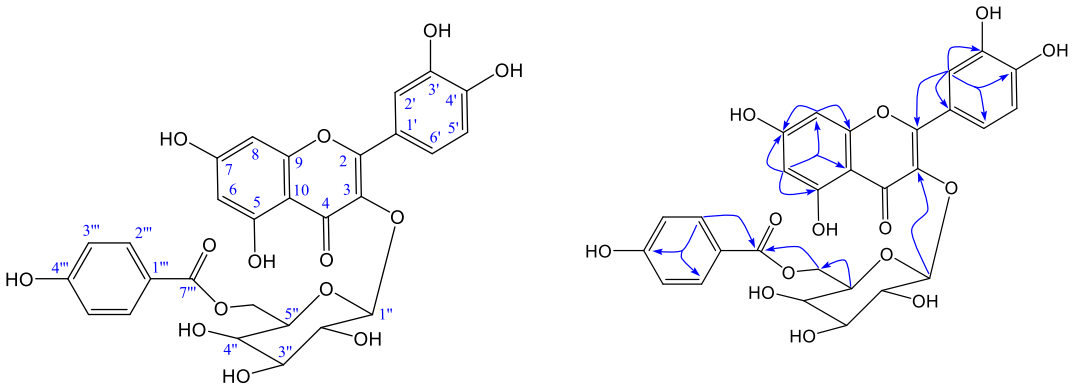
C	**[a]δ_C**	**δ_C[b,c]**	**δ_H[b,d]** dạng tín hiệu (*J* = Hz)
2	156,5	156,2	-
3	133,7	133,5	-
4	177,6	177,4	-
5	161,1	161,2	-
6	98,8	98,6	6,20 d (2,0)
7	164,2	164,1	-
8	93,7	93,4	6,40 d (2,0)
9	156,4	156,2	-
10	104,0	103,9	-
1′	121,3	121,0	-
2′	116,1	115,9	7,52 d (2,0)
3′	144,8	144,7	-
4′	148,4	148,4	-
5′	115,3	115,1	6,82 d (8,0)
6′	122,0	121,9	7,66 dd (2,0, 8,0)
Gal			
1″	102,0	101,8	5,37 d (7,5)
2″	71,3	71,2	
3″	73,2	73,1	
4″	67,9	67,9	
5″	75,9	75,8	
6″	60,2	60,1	

[a]δ_C của quercetin-3-*O*-*β*-D-galactopyranoside trong DMSO-d_6 [87], [b]đo trongDMSO-d_6, [c]125 MHz, [d]500 MHz.

So sánh giá trị phổ ^{13}C-NMR của **BA8** với các giá trị phổ đã đăng tải cho thấy sự tương đồng. Do đó, hợp chất này được xác định là quercetin-3-*O*-*β*-D-galactopyranoside [87]. Các phổ NMR của **BA8** xem tại Phụ lục 2.

4.1.9. Hợp chất BA9: quercetin 3-O-β-D-(6-p-hydroxybenzoyl)galactopyranoside)

Các phổ NMR của **BA9** tương tự **BA8** ngoài sự có mặt thêm 1 nhóm 6-*p*-hydroxybenzoyl tại δ_C 121,9 (C, C-2‴), 132,6 (CH, C-2‴ và C-6‴), 116,0 (CH, C-3‴ và C-5‴), 163,4 (C, C-4‴) và 167,8 (C, C-7‴)/δ_H 7,62 (2H, d, *J* = 8,5 Hz, H-2‴ và H-6‴) và 6,68 (2H, d, *J* = 8,5 Hz, H-3‴ và H-5‴).



Hình 4.1.9. Cấu trúc hóa học và một số tương tác HMBC chính của **BA9**

Các tín hiệu carbon và proton của nhóm methylen C-6″ của đường galactose bị di chuyển mạnh về hướng trường thấp tại δ_C 64,4/δ_H 4,32 (1H, dd, *J* = 4,5, 11,5 Hz) và 4,38 (1H, dd, *J* = 8,0, 11,5 Hz) cho thấy vị trí ester hóa của nhóm benzoyl tại C-6″.

Bảng 4.1.9. Giá trị phổ NMR của **BA9** và hợp chất so sánh

C	**$^a\delta_C$**	**$\delta_C^{b,c}$**	**$\delta_H^{b,d}$**dạng tín hiệu (*J*= Hz)	**HMBC** (H → C)
2	157,5	158,7	-	
3	134,7	135,5	-	
4	178,6	179,5	-	
5	161,9	162,9	-	
6	99,6	100,0	6,21 d (1,0)	5, 7, 8, 10
7	165,3	166,1	-	
8	94,5	94,8	6,38 br s	6, 7, 9, 10
9	157,7	158,3	-	
10	104,7	105,4	-	
1′	122,0	122,8	-	
2′	117,3	117,6	7,78 d (2,0)	2, 1′, 3′, 4′, 6′
3′	145,1	145,8	-	
4′	149,2	149,9	-	
5′	115,7	116,1	6,84 d (8,5)	1′, 3′, 4′, 6′
6′	122,1	123,0	7,58 dd (2,0, 8,5)	2, 2′, 4′
Gal				
1″	103,88	105,0	5,22 d (8,0)	3
2″	72,24	73,0	3,87 dd (8,0, 9,0)	1″
3″	74,14	75,0	3,62 dd (3,5, 9,0)	2″
4″	69,39	70,3	3,89 d (3,5)	
5″	74,03	74,8	3,83 dd (4,5, 8,0)	6″
6″	64,04	64,4	4,32 dd (4,5, 11,5) 4,38 dd (8,0, 11,5)	7‴
Benz				
1‴	121,28	121,9	-	

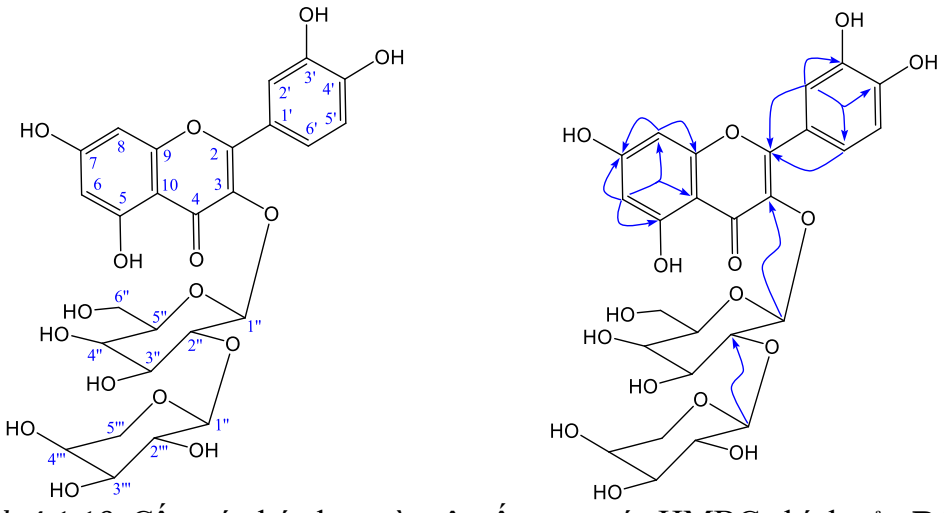
2‴, 6‴	132,05	132,6	7,62 d (8,5)	4‴, 7‴
3‴, 5‴	115,69	116,0	6,68 d (8,5)	1‴, 4‴
4‴	162,56	163,4	-	
7‴	166,68	167,8	-	

[a]δ_Ccủa hyperoside đo trong acetone-d_6 + D_2O [88], [c]đo trongCD_3OD, [d]125 MHz, [e]500 MHz.

Từ các phân tích nêu trên, giá trị phổ NMR của **BA9** được tiến hành so sánh với tài liệu tham khảo và cho thấy sự tương đồng hoàn toàn. Ngoài ra, vị trí ester hóa của nhóm benzoyl tại C-6″ được chứng minh thêm bằng tương tác HMBC giữa H-6″ (δ_H 4,32 và 4,38) và C-7‴ (δ_C 167,8). Như vậy, hợp chất **BA9** được chứng minh là quercetin 3-*O*-*β*-D-(6-*p*-hydroxybenzoyl)galactopyranoside hay còn có tên khác là hyperoside [88, 89]. Các phổ NMR của **BA9** xem tại Phụ lục 3.

4.1.10. Hợp chất BA10:quercetin 3-O-α-L-arabinopyranosyl-(1→2)-β-D-galactopyranoside

Hợp chất **BA10** thu được dưới dạng chất bột màu vàng. Các phổ NMR của nó cũng tương tự **BA8** ngoại trừ sự xuất hiện thêm 1 đường *α*-L-arabinopyranose tại δ_C 105,2 (CH, C-1‴′), 74,6 (CH, C-2‴′), 76,8 (CH, C-3‴′), 70,9 (CH, C-4‴′) và 66,5 (CH_2, C-5‴′)/δ_H 4,80 (1H, d, *J* = 6,0 Hz, H-1‴′), 3,46 (1H, dd, *J* = 6,0, 8,5 Hz, H-2‴′), 3,43 (1H, d, *J* = 8,5, 2,5 Hz, H-3‴′), 3,54 (1H, m, H-4‴′), 3,28 (1H, d, *J* = 9,5, 11,5 Hz, H_a-6‴′), 3,99 (1H, d, *J* = 4,5, 11,5 Hz, H_b-6‴′) [90].



Hình 4.1.10. Cấu trúc hóa học và một số tương tác HMBC chính của **BA10**

Các tín hiệu carbon C-2″ của đường galactose bị di chuyển mạnh về hướng trường thấp tại δ_C 79,9 gợi ý vị trí gắn của đường arabinose tại C-2″.

Bảng 4.1.10. Giá trị phổ NMR của **BA10** và chất so sánh

C	**[a]δ_C**	**δ_C [b,c]**	**δ_H [b,d]**dạng tín hiệu (*J*= Hz)	**HMBC** (H → C)
2	158,2	158,1	-	
3	135,1	135,1	-	
4	179,6	179,5	-	
5	163,1	162,9	-	
6	100,0	99,7	6,18 br s	5, 7, 8, 10
7	166,4	165,6	-	
8	94,7	94,5	6,37 br s	6, 7, 9, 10
9	158,4	158,2	-	
10	105,6	105,6	-	
1′	126,0	123,0	-	
2′	117,4	117,4	7,74 br s	2, 4′, 6′
3′	146,0	145,8	-	
4′	149,9	149,7	-	
5′	116,2	116,1	6,89 d (8,5)	
6′	123,4	123,3	7,65 br d (8,5)	2, 2′, 4′
Gal				
1″	101,5	101,4	5,42 d (7,5)	3, 3″, 5″
2″	80,1	79,9	4,06 dd (7,5, 9,0)	2″, 1‴
3″	75,1	75,0	3,76 dd (2,5, 9,0)	
4″	70,3	70,2	3,88 d (2,5)	2″, 3″
5″	77,1	76,9	3,52 m	
6″	62,0	61,9	3,60 dd (6,0, 12,0) 3,65 dd (6,0, 12,0)	4″
Ara				
1‴	105,4	105,2	4,80 d (6,0)	2″, 5‴
2‴	74,7	74,6	3,46 dd (6,0, 8,5)	
3‴	76,9	76,8	3,43 dd (8,5, 2,5)	
4‴	71,0	70,9	3,54 m	
5‴	66,6	66,5	3,28 dd (9,5, 11,5) 3,99 dd (4,5, 11,5)	

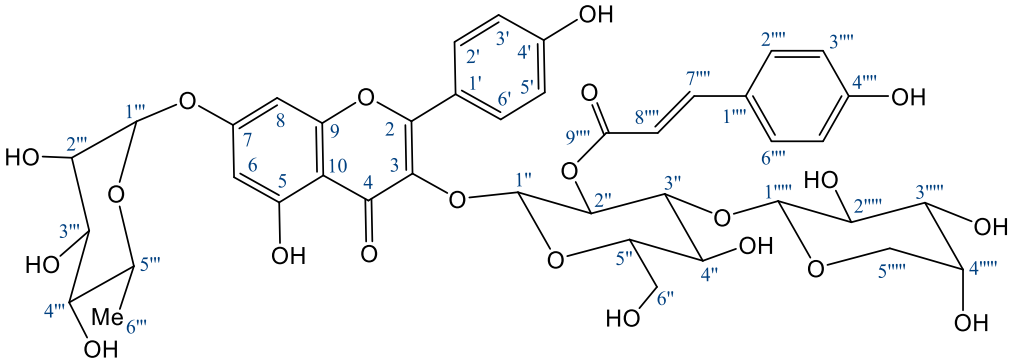
[a]δ_C của quercetin 3-*O*-*α*-L-arabinopyranosyl-(1→2)-*β*-D-galactopyranoside [90], [b]đo trong CD_3OD, [c]125 MHz, [d]500 MHz.

Từ các kết quả đã nêu, giá trị phổ NMR của **BA10** được tiến hành so sánh với tài liệu tham khảo và cho thấy sự tương đồng hoàn toàn. Ngoài ra, vị trí đính của đường arabinose tại C-2″ được chứng minh thêm dựa trên tương tác HMBC nhận được giữa H-1‴ (δ_H 4,80) và C-2″ (δ_C 79,9). Do đó, **BA10** được khẳng định là quercetin 3-*O*-*α*-L-arabinopyranosyl-(1→2)-*β*-D-galactopyranoside [90]. Các phổ NMR của **BA10** xem tại Phụ lục 4.

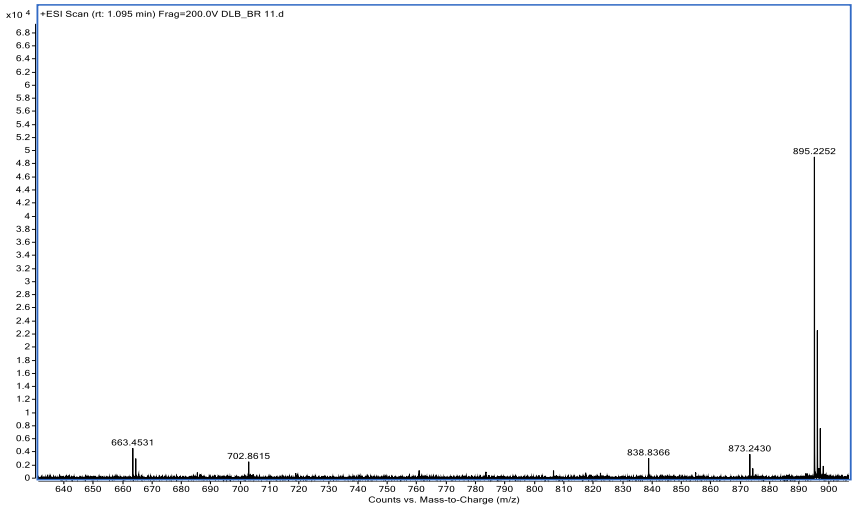
4.2. Xác định cấu trúc các hợp chất từ loài *B. racemosa*

4.2.1. Hợp chất BR1: barringoside G (chất mới)

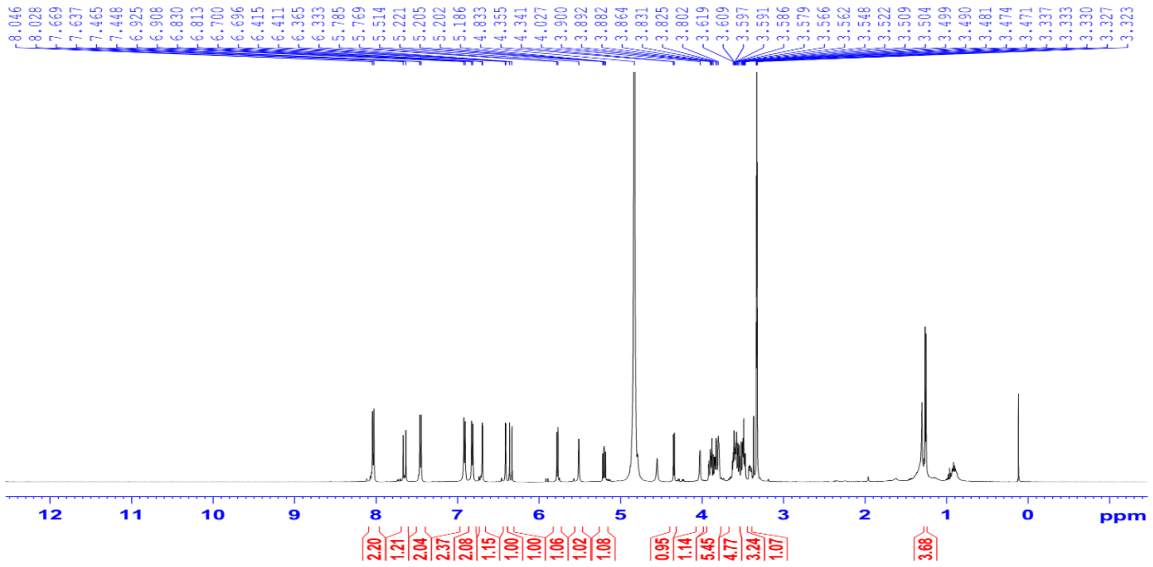
Hợp chất **BR1** tách được dưới dạng chất rắn màu vàng. CTPT được chứng minh là $C_{41}H_{44}O_{21}$ bằng phổ HR-ESI-MS với sự có mặt của pic ion giả phân tử tại *m/z* 873,2430 $[M+H]^+$ (tính toán lý thuyết cho ion $C_{41}H_{45}O_{21}^+$, 873,2448) và 895,2252 $[M+Na]^+$ (tính toán lý thuyết cho ion $C_{41}H_{44}NaO_{21}^+$, 895,2267).



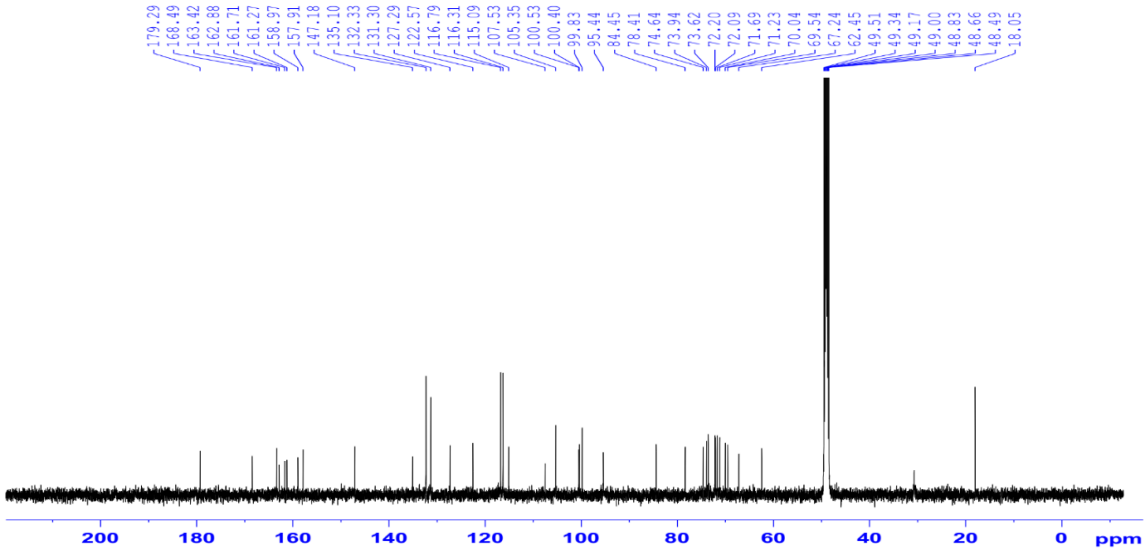
Hình 4.2.1.a. Cấu trúc hóa học của **BR1**



Hình 4.2.1.b. Phổ HR-ESI-MS của **BR1**



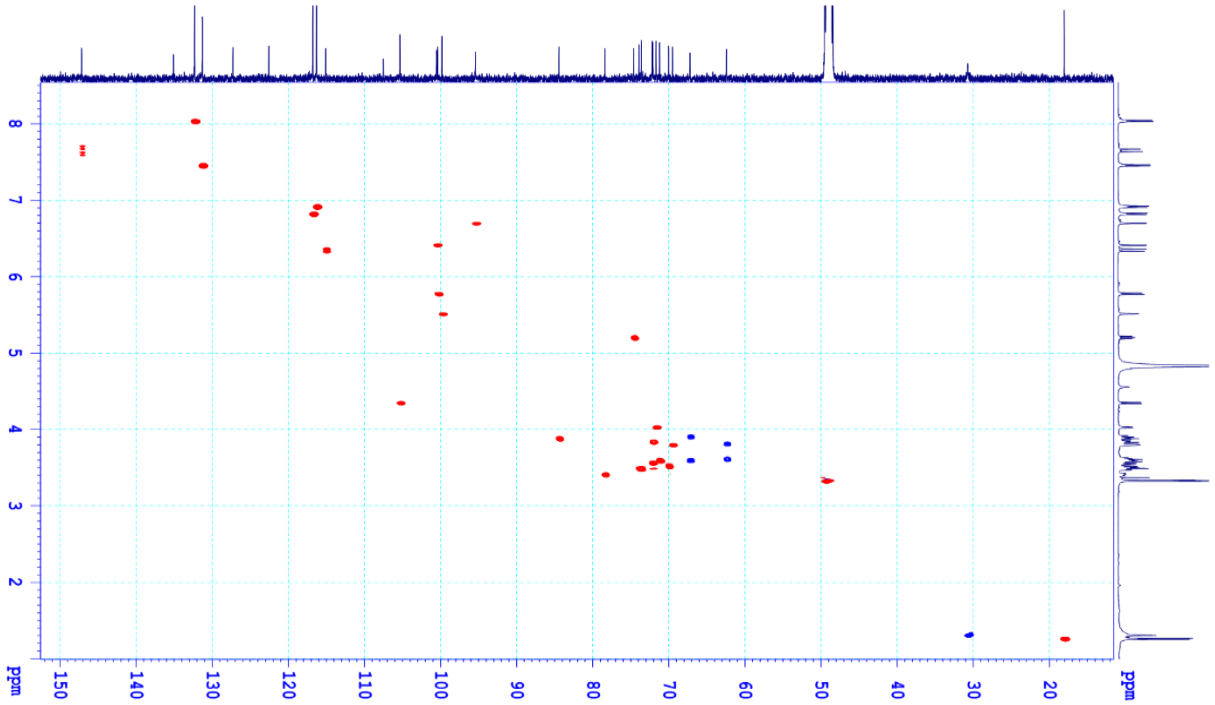
Hình 4.2.1.c. Phổ ^{1}H-NMR của **BR1**



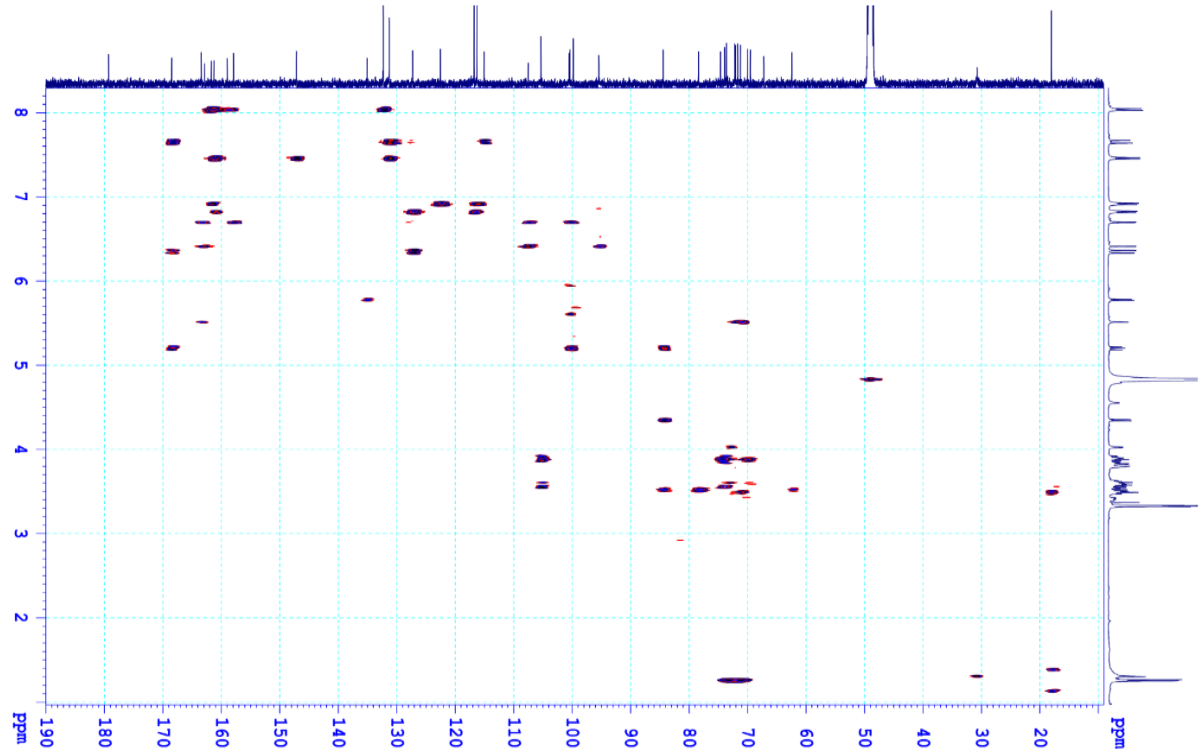
Hình 4.2.1.d. Phổ ^{13}C-NMR của **BR1**

Các dữ liệu phổ NMR cho thấy sẽ là một kaempferol glycoside bị acyl hóa. Các tín hiệu của 03 proton anome tại δ_H 5,78 (1H, d, J = 8,0 Hz, H-1″), 5,51 (1H, br s, H-1‴) và 4,35 (1H, d, J = 7,0 Hz, H-1⁗), có tương tác HSQC với các cacbon anome tương ứng tại δ_C 100,4 (C-1″), 99,8 (C-1‴) và 105,3 (C-1⁗) khẳng định có 03 đơn vị đường. Ngoài ra, cấu trúc khung kaempferol và một nhóm (*E*)-*p*-coumaroyl được khẳng định bởi các tín hiệu của tám proton thơm có tương tác *ortho* [δ_H 8,04 (H-2′ và H-6′), 6,92 (H-3′ và H-5′), 7,46 (H-2⁗ và H-6⁗) và 6,82 (H-3⁗ và H-5⁗), mỗi tín hiệu 2H, d, J = 8,5 Hz] và hai proton tương tác *meta* [δ_H 6,41 (H-6) và 6,70 (H-8), mỗi

tín hiệu 1H, d, J = 2,0 Hz] cùng với tín hiệu proton của 1 nối đôi dạng *trans* [δ_H 7,66 (H-7′′′′) và 6,35 (H-8′′′′), mỗi tín hiệu 1H, d, J = 16,0 Hz].



Hình 4.2.1.e. Phổ HSQC của **BR1**



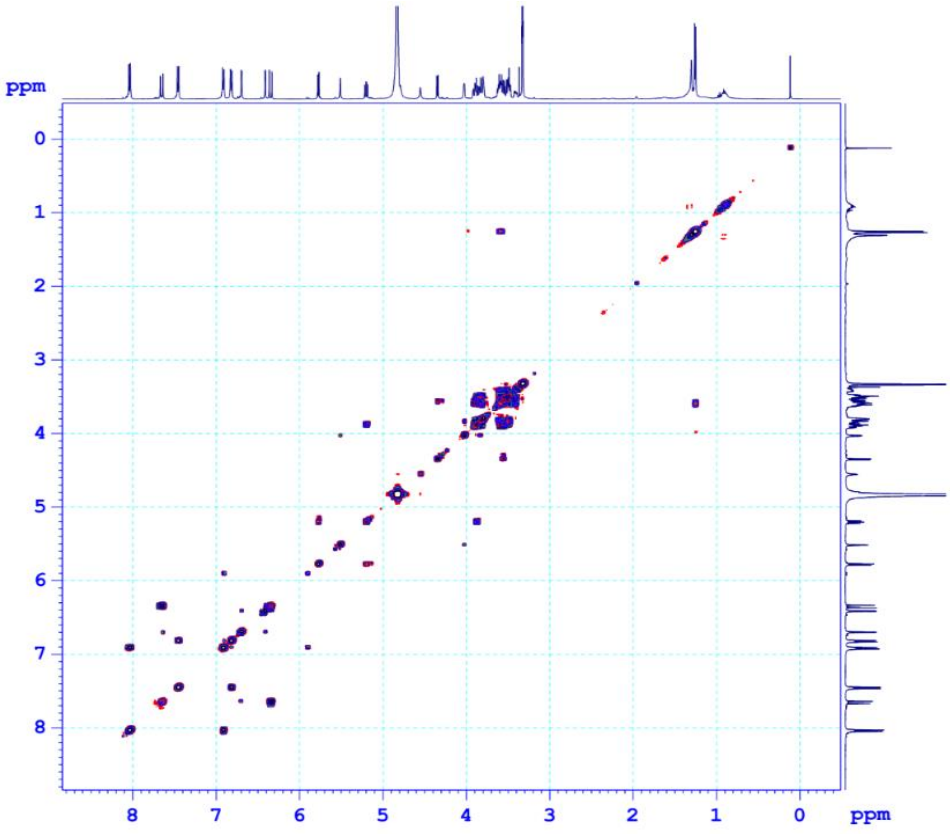
Hình 4.2.1.f. Phổ HMBC của **BR1**

Bảng 4.2.1. Giá trị phổ NMR của **BR1**và hợp chất so sánh

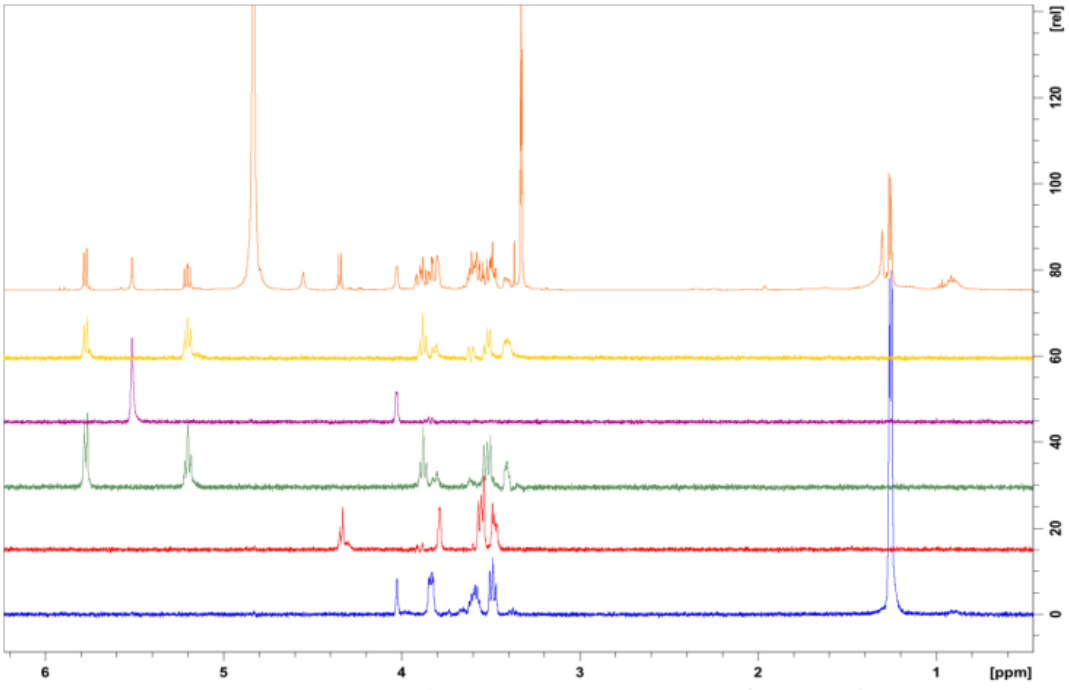
C	**[a]δC**	**[b]δC**	**δC [c,d]**	**δH [c,e]**dạng tín hiệu (J = Hz)	**HMBC** (H → C)
Aglycon					
2	159,0		158,9	-	
3	135,1		135,1	-	
4	179,4		179,2	-	
5	162,9		162,8	-	
6	100,5		100,5	6,41 d (2,0)	5, 7, 8, 10
7	163,4		163,4	-	
8	95,4		95,4	6,70 d (2,0)	6, 7, 9, 10
9	157,9		157,9	-	
10	107,5		107,5	-	
1′	122,6		122,5	-	
2′, 6′	132,3		132,3	8,04 d (8,5)	2
3′, 5′	116,3		116,3	6,92 d (8,5)	
4′	161,8		161,7	-	
Glc					
1″	100,4	100,8	100,4	5,78 d (8,0)	3
2″	75,8	74,6	74,6	5,20 dd (8,0, 9,0)	9‴′
3″	76,3	84,5	84,4	3,88 t (9,0)	
4″	71,6	70,3	70,0	3,52 t (9,0)	
5″	78,8	77,0	78,4	3,41 m	
6″	62,6	68,3	62,4	3,61 br d (12,0) 3,82 dd (3,0, 12,0)	
Rha					
1‴	99,8		99,8	5,51 br s	7
2‴	71,7		71,6	4,03 br s	
3‴	72,1		72,0	3,84 dd (3,5, 9,0)	
4‴	73,6		73,6	3,49 t (9,0)	
5‴	71,2		71,2	3,59 dd (9,0, 6,0)	
6‴	18,0		18,0	1,26 d (6,0)	4‴, 5‴
p-Cou					
1‴′	127,2	127,3	127,2	-	

C	[a]δ_C	[b]δ_C	δ_C [c,d]	δ_H [c,e] dạng tín hiệu (J = Hz)	HMBC (H → C)
2′′′′, 6′′′′	131,2	131,3	131,3	7,46 d (8,5)	4′′′′, 7′′′′
3′′′′, 5′′′′	116,8	116,8	116,7	6,82 d (8,5)	
4′′′′	161,3	161,1	161,2	-	
7′′′′	146,9	115,1	147,1	7,66 d (16,0)	
8′′′′	115,1	147,2	115,0	6,35 d (16,0)	1′′′′, 7′′′′, 9′′′′
9′′′′	168,4	168,6	168,4	-	
Ara					
1′′′′′		105,3	105,3	4,35 d (7,0)	3′′
2′′′′′		72,3	72,2	3,56 dd (7,0, 8,5)	
3′′′′′		74,0	73,9	3,49 dd (4,5, 8,5)	
4′′′′′		69,9	69,5	3,80 br s	
5′′′′′		67,3	67,2	3,91 dd (2,5, 11,0) 3,60 br d (11,0)	

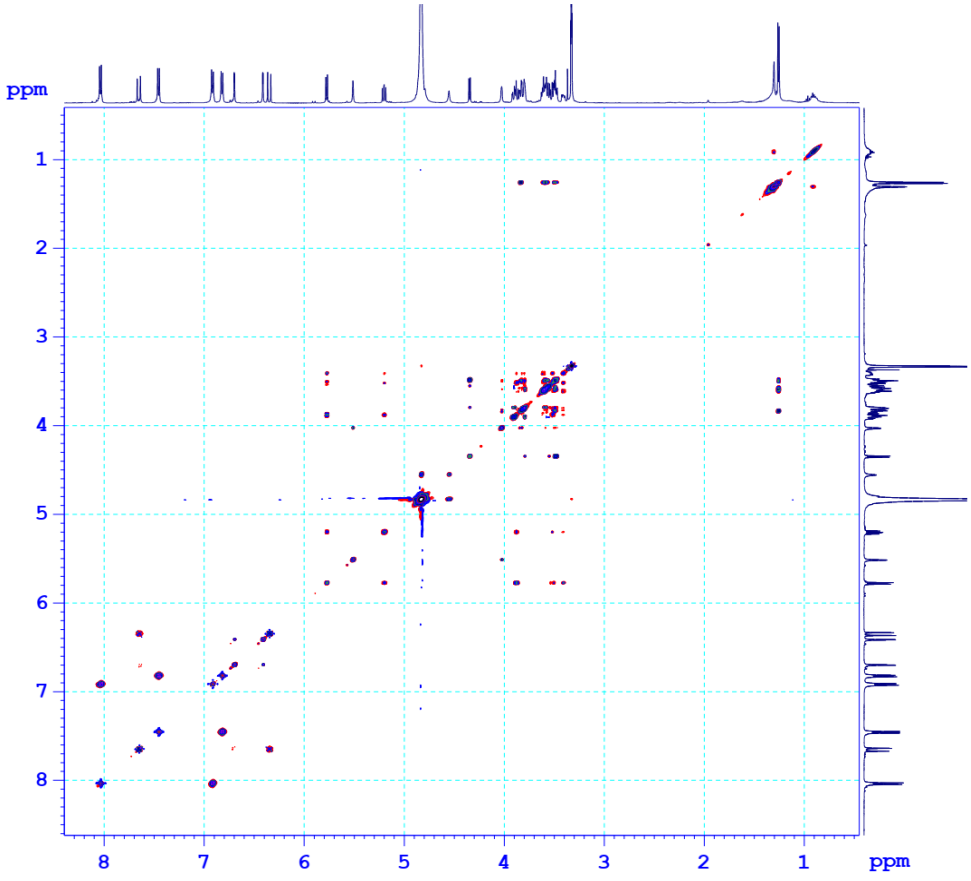
[a]δ_C của **BA3**, [b]δ_C của camelliquercetiside C [76], [c]đo trong CD_3OD, [d]125 MHz, [e]500 MHz, *tín hiệu bị che lấp.



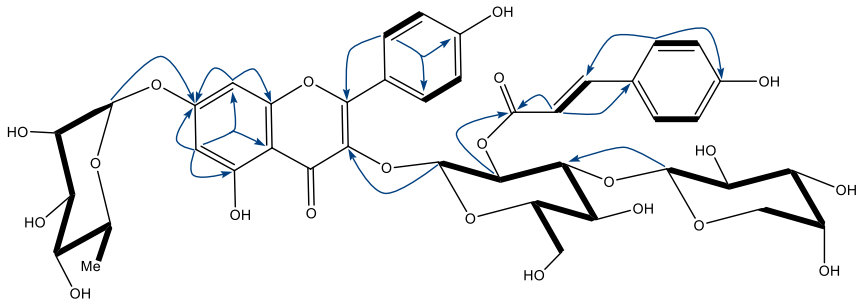
Hình 4.2.1.g. Phổ COSY của **BR1**



Hình 4.2.1.h. Phổ 1D TOCSY (CD_3OD,500MHz) của **BR1**



Hình 4.2.1.i. Phổ 2D TOCSY (CD_3OD,500MHz) của **BR1**



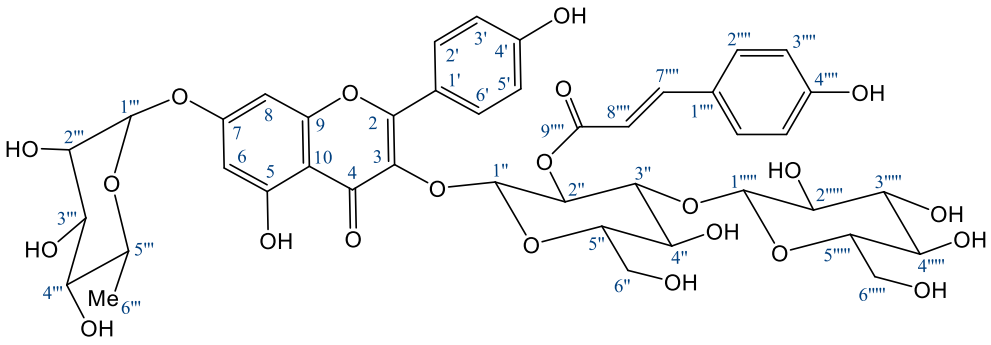
Hình 4.2.1.k. Các tương tác HMBC và COSY chính của **BR1**

Phân tích cụ thể các tín hiệu HSQC, HMBC, COSY và 1D và 2D TOCSY xác định được giá trị phổ ^{1}H và ^{13}C NMR của phần khung kaempferol, nhóm (*E*)-*p*-coumaroyl và ba đơn vị đường của **BR1** (xem bảng 4.3.2.1). Sử dụng phổ 1D TOCSY cho phép xác định được sự tách vạch và hằng số tương tác của các tín hiệu proton của các đơn vị đường bị chồng lấp với kỹ thuật gây kích thích từ trường vào từng tín hiệu proton riêng lẻ sẽ chỉ còn xuất hiện các tín hiệu proton của đơn vị đường đó và triệt tiêu tất cả các proton khác. Cụ thể là kích thích từ trường vào proton H-1″ (δ_H 5,78, d, *J* = 8,0 Hz) giữ lại các tín hiệu proton H-2″ (δ_H 5,20, dd, *J* = 8,0, 9,0 Hz), H-3″ (δ_H 3,88, t, *J* = 9,0 Hz), H-4″ (δ_H 3,52, t, *J* = 9,0 Hz), H-5″ (δ_H 3,41, m), H_a-6″ (δ_H 3,61, br d, *J* = 12,0 Hz) và H_b-6″ (δ_H 3,82, dd, *J* = 3,0, 12,0 Hz); kích thích proton H-6‴ (δ_H 1,26, d, *J* = 6,0 Hz) giữ lại các tín hiệu proton H-2‴ (δ_H 4,03, br s), H-3‴ (δ_H 3,84, dd, *J* = 3,5, 9,0 Hz), H-4‴ (δ_H 3,49, t, *J* = 9,0 Hz) và H-5‴ (δ_H 3,59, dd, *J* = 6,0, 9,0 Hz); kích thích proton H-1⁗ (δ_H 5,78, d, *J* = 7,0 Hz) giữ lại các tín hiệu proton H-2⁗ (δ_H 3,56, dd, *J* = 7,0, 8,5 Hz), H-3⁗ (δ_H 3,49, dd, *J* = 4,5, 8,5 Hz) và H-4⁗ (δ_H 3,80, br s). Các giá trị phổ ^{1}H và ^{13}C NMR của **BR1** tương tự các giá trị của **BA3**, ngoại trừ sự xuất hiện thêm một đơn vị đường pentose ở **BR1** tại δ_C 105,3 (C-1⁗), 72,2 (C-2⁗), 73,9 (C-3⁗), 69,5 (C-4⁗), 67,2 (C-5⁗)/δ_H 4,35 (1H, d, *J* = 7,0 Hz, H-1⁗), 3,56 (1H, dd, *J* = 7,0, 8,5 Hz, H-2⁗), 3,49 (1H, dd, *J* = 4,5, 8,5 Hz, H-3⁗), 3,80 (1H, br s, H-4⁗), 3,91 (1H, dd, *J* = 2,5, 11,0 Hz, H_a-6⁗), 3,60 (1H, br d, *J* = 11,0 Hz, H_b-6⁗). Đơn vị đường này được xác định là *α*-L-arabinopyranose bằng Sự tương đồng về giá trị phổ ^{13}C NMR và các giá trị hằng số tương tác ^{1}H NMR với các số liệu tương ứng của camelliquercetiside C [76]. Các vị trí liên kết của đường glucose tại C-3, rhamnose tại C-7 và nhóm (*E*)-*p*-coumaroyl tại C-2″ được khẳng định thêm bằng tương tác xa HMBC của H-1″ (δ_H 5,78) với C-3 (δ_C 135,1), H-1‴ (δ_H 5,51) với C-7 (δ_C 163,4) và H-2‴ (δ_H 5,20) với C-9⁗ (δ_C 168,5). Ngoài ra, proton anome H-1⁗

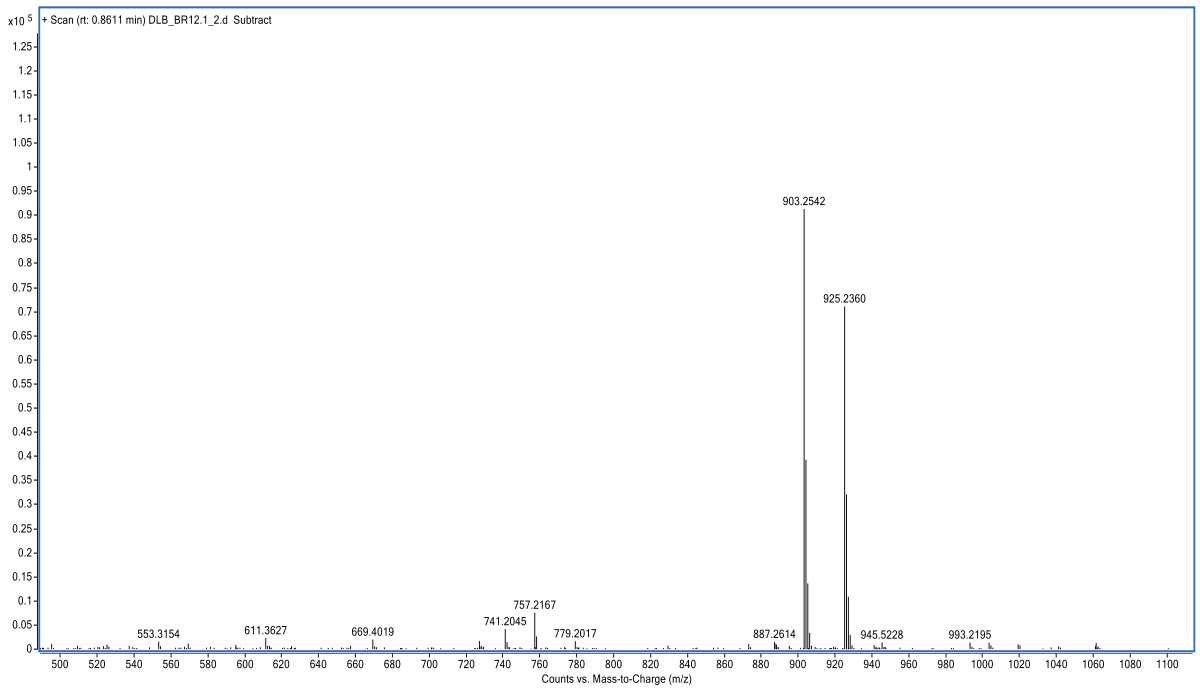
(δ_H 4,35) có tương tác HMBC với C-3′′ (δ_C 84,4) cho thấy vị trí liên kết của đường arabinose tại C-3′′ (Hình 4.2.1.k.). Từ tất cả các minh chứng trên, **BR1** được chứng minh là kaempferol 3-*O*-[2′′-*O*-(*E*)-*p*-coumaroyl][*α*-L-arabinopyranosyl(1→3) *β*-D-glucopyranoside]-7-*O*-*α*-L-rhamnopyranoside, một hợp chất mới và được gọi tên là barringoside G.

4.2.2. Hợp chất BR2: barringoside H (chất mới)

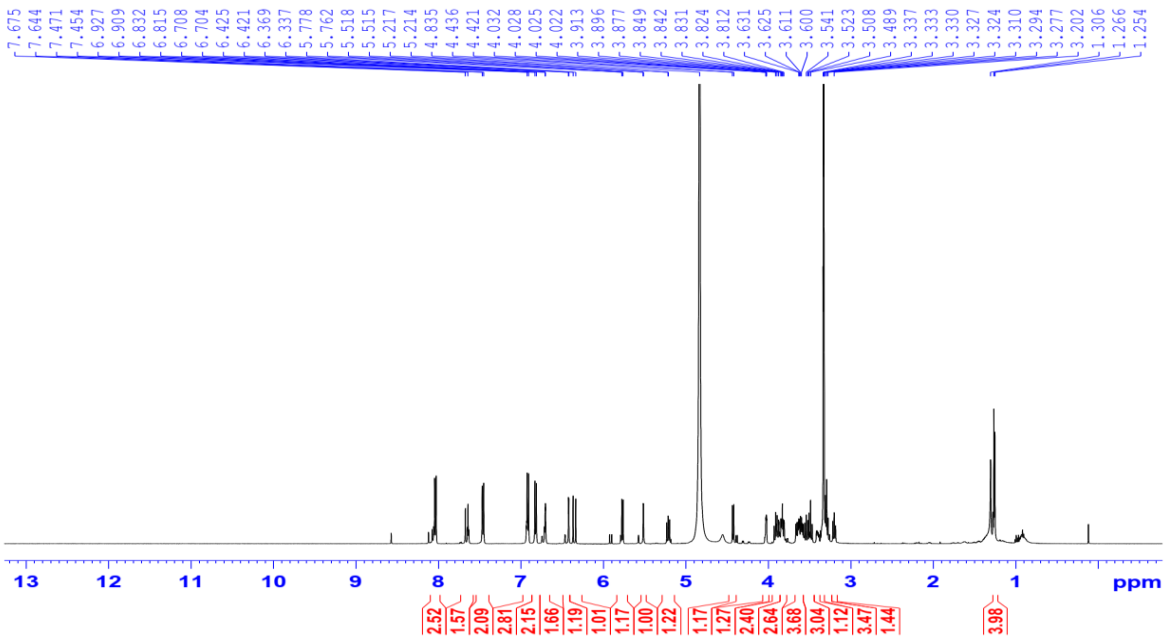
Các giá trị phổ ^{1}H và ^{13}C NMR của **BR2** tương tự các giá trị phổ của **BR1**, ngoài sự xuất hiện một đường *β*-D-glucopyranose [91] với các tín hiệu tại δ_C 104,9 (C-1′′′′′), 74,8 (C-2′′′′′), 77,7 (C-3′′′′′), 71,4 (C-4′′′′′), 78,1 (C-5′′′′′) và 62,5 (C-6′′′′′)/δ_H 4,43 (1H, d, *J* = 8,0 Hz, H-1′′′′′), 3,20 (1H, dd, *J* = 8,0, 9,0 Hz, H-2′′′′′), 3,29 (2H, t, *J* = 9,0 Hz, H-3′′′′′ và H-4′′′′′), 3,34 (1H, m, H-5′′′′′), 3,64 (1H, dd, *J* = 6,0, 12,0 Hz, H_a-6′′′′′) và 3,89 (1H, dd, *J* = 2,0, 12,0 Hz, H_b-6′′′′′) trên các phổ của **BR2** thay thế cho đường *α*-L-arabinopyranose trên các phổ của **BR1**. Điều này cũng được chứng minh bằng phổ HR-QTOF-MS với pic ion giả phân tử tại *m/z* 903,2542 $[M+H]^+$ (tính toán lý thuyết cho ion $C_{42}H_{47}O_{22}^+$, 903,2553) và 925,2360 $[M+Na]^+$ (tính toán lý thuyết cho ion $C_{42}H_{46}NaO_{22}^+$, 925,2373), cho thấy CTPT của **BR2** là $C_{42}H_{46}O_{22}$.



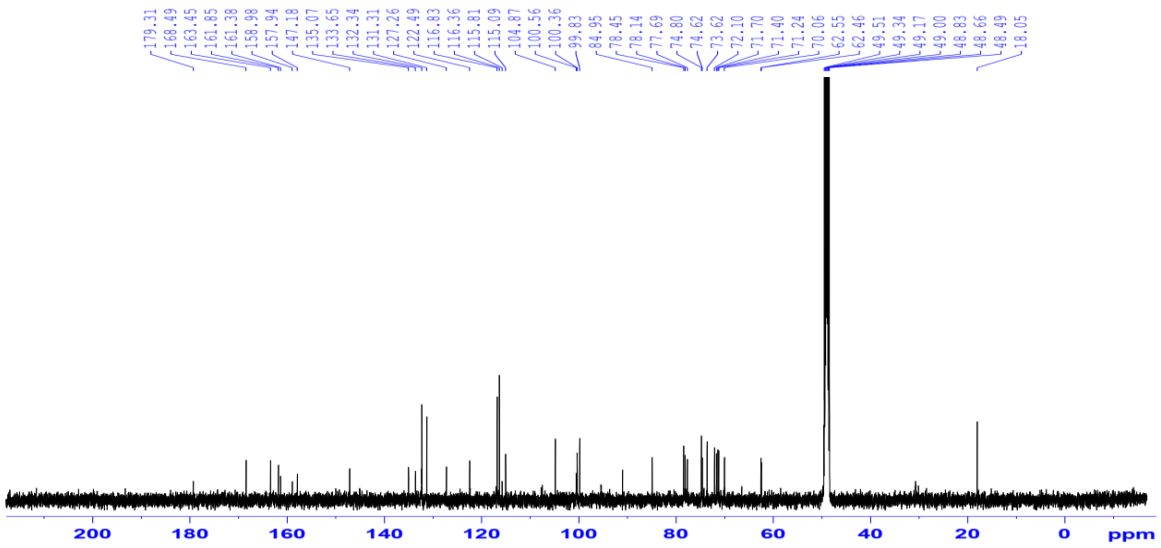
Hình 4.2.2.a. Cấu trúc hóa học của **BR2**



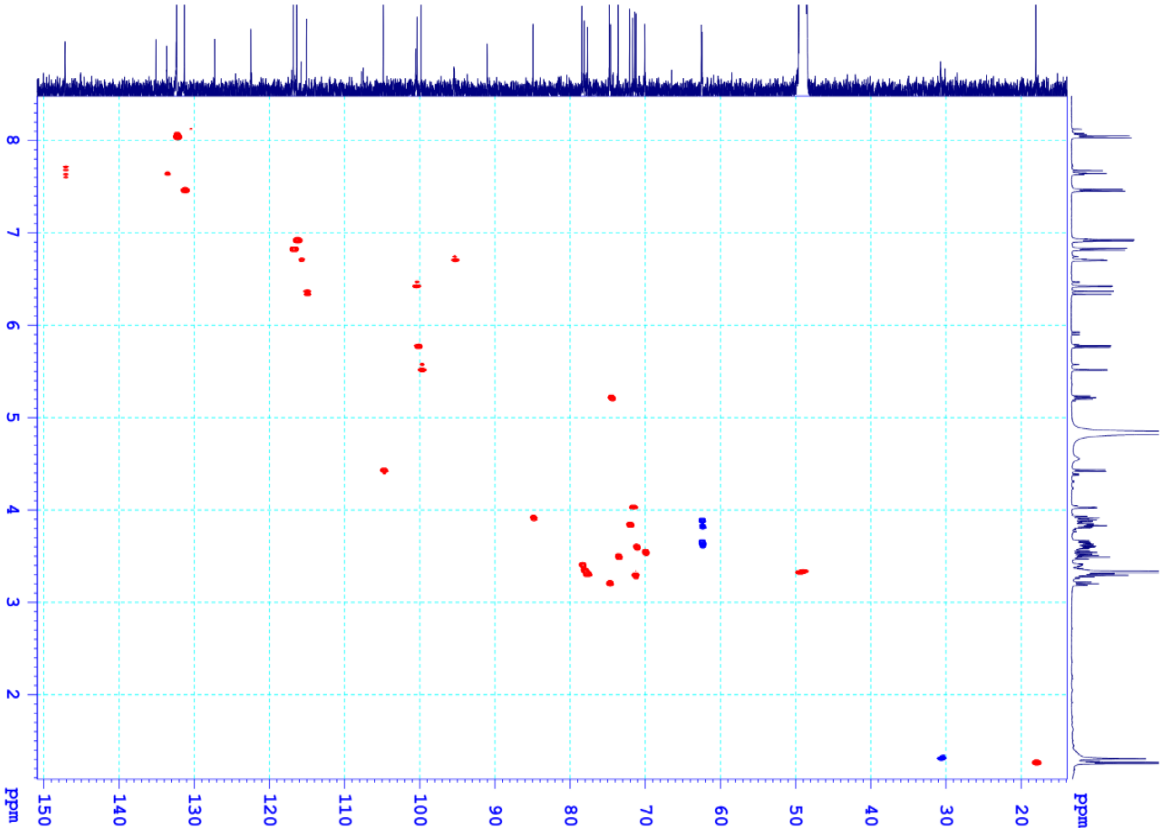
Hình 4.2.2.b. Phổ HR-ESI-MS của **BR2**



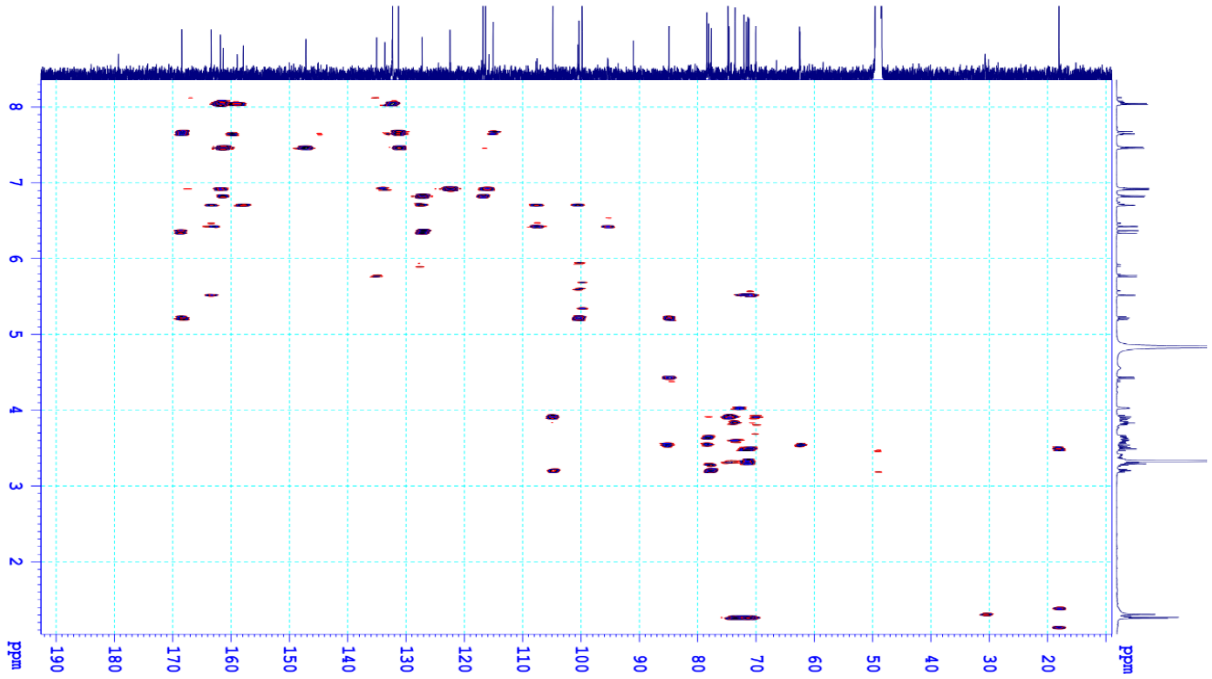
Hình 4.2.2.c. Phổ ^{1}H-NMR của **BR2**



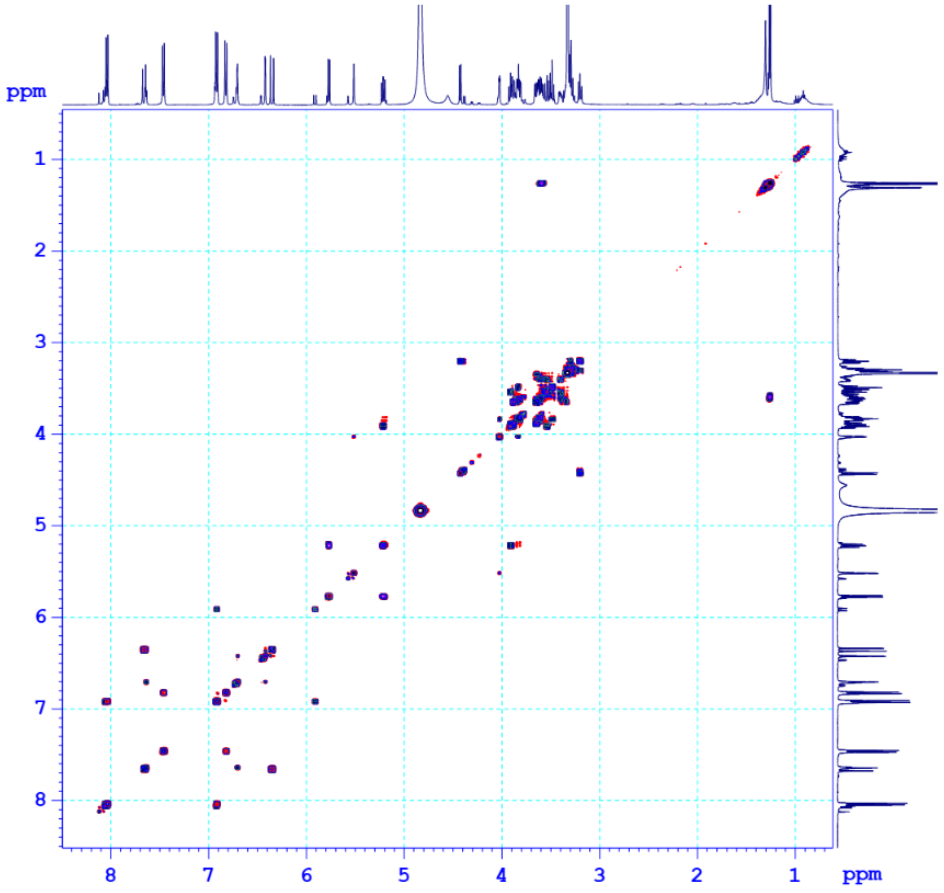
Hình 4.2.2.d. Phổ ^{13}C-NMR của **BR2**



Hình 4.2.2.e. Phổ HSQC của **BR2**



Hình 4.2.2.f. Phổ HMBC của **BR2**



Hình 4.2.2.g. Phổ COSY của **BR2**

Bảng 4.2.2. Giá trị phổ NMR của **BR2** và hợp chất so sánh

C	**[a]δ_C**	**[b]δ_C**	**δ_C [c,d]**	**δ_H [c,e]**dạng tín hiệu (*J* = Hz)	**HMBC** (H → C)
Aglycon					
2	158,9	158,8	157,0	-	
3	135,1	134,0	135,1	-	
4	179,2	179,0	179,3	-	
5	162,8	161,6	nd		
6	100,5	101,2	100,5	6,42 d (2,0)	5, 7, 8, 10
7	163,4	163,4	163,4	-	
8	95,4	96,2	95,4	6,70 d (2,0)	4, 6, 7, 9, 10
9	157,9	158,3	157,9	-	
10	107,5	105,1	107,5	-	
1′	122,5	123,1	122,5	-	
2′, 6′	132,3	132,2	132,3	8,04 d (8,5)	2
3′, 5′	116,3	116,0	116,3	6,92 d (8,5)	
4′	161,7	161,2	161,8	-	
Glc					
1″	100,4	99,8	100,3	5,77 d (8,0)	3
2″	74,6	73,6	74,6	5,22 dd (8,0, 9,0)	9‴″
3″	84,4	84,7	84,9	3,91 t (9,0)	
4″	70,0	69,8	70,0	3,54 t (9,0)	
5″	78,4	78,2	78,4	3,40 m	
6″	62,4	62,3	62,4	3,62 dd (5,5, 12,0) 3,82 dd (2,0, 12,0)	
Rha					
1‴	99,8		99,8	5,52 d (2,0)	7
2‴	71,6		71,7	4,03 dd (2,0, 3,5)	
3‴	72,0		72,1	3,84 dd (3,5, 9,0)	
4‴	73,6		73,6	3,49 t (9,0)	
5‴	71,2		71,2	3,59 m	
6‴	18,0		18,0	1,26 d (6,0)	4‴, 5‴
p-Cou					

1′′′′	127,2	126,9	127,2	-	
2′′′′, 6′′′′	131,3	131,4	131,3	7,46 d (8,5)	4′′′′, 7′′′′
3′′′′, 5′′′′	116,7	117,0	116,8	6,82 d (8,5)	
4′′′′	161,2	162,0	161,4	-	
7′′′′	147,1	147,6	147,2	7,66 d (16,0)	
8′′′′	115,0	114,6	115,1	6,36 d (16,0)	1′′′′, 7′′′′, 9′′′′
9′′′′	168,4	168,3	168,5	-	
Glc		*Glc 2*	*Glc 2*		
1′′′′′	105,3	105,0	104,9	4,43 d (8,0)	3′′
2′′′′′	72,2	74,7	74,8	3,20 dd (8,0, 9,0)	
3′′′′′	73,9	77,7	77,7	3,29 t (9,0)	
4′′′′′	69,5	71,3	71,4	3,29 t (9,0)	
5′′′′′	67,2	78,2	78,1	3,34 m	
6′′′′′		62,5	62,5	3,64 dd (6,0, 12,0) 3,89 dd (2,0, 12,0)	

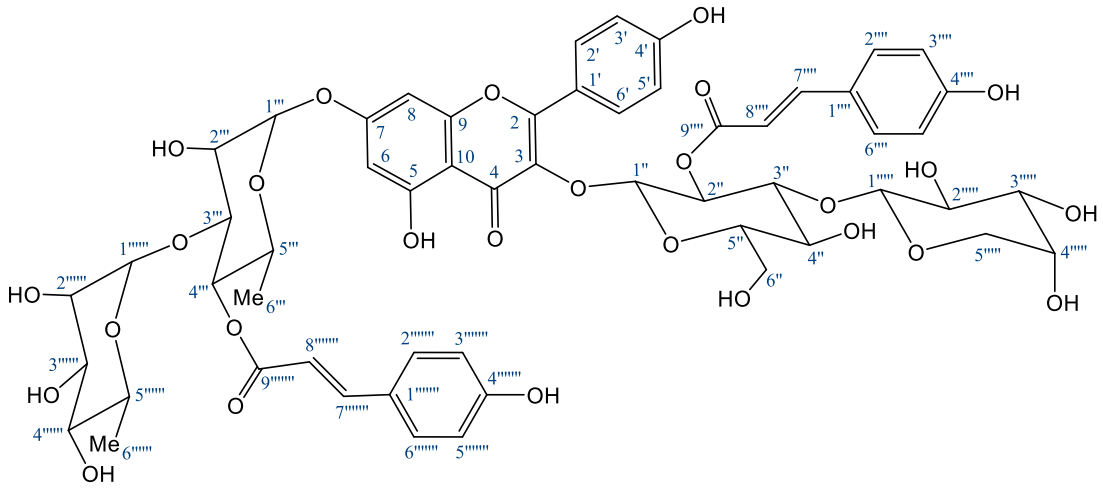
[a]δ_C của **BR1**, [b]δ_C của kaempferol 3-*O*-[2-*O*-(*trans*-*p*-coumaroyl)-3-*O*-*β*-D-glucopyranosyl]-*β*-D-glucopyranoside [91], [c]đo trong CD_3OD, [d]125 MHz, [e]500 MHz, *tín hiệu bị che lấp, nd: tín hiệu không ghi nhận được.

Vị trí liên kết tại C-3′′ của đơn vị đường glucose xuất hiện được xác định bằng cách so sánh giá trị phổ ^{13}C và ^{1}H NMR của **BR2** với các giá trị tương ứng của kaempferol 3-*O*-*β*-D-glucopyranosyl-(1→3)-*β*-D-(2-*O*-caffeoyl) glucopyranoside 7-*O*-*α*-L-rhamnopyranoside [92] và kaempferol 3-*O*-[2-*O*-(*trans*-*p*-coumaroyl)-3-*O*-*β*-D-glucopyranosyl]-*β*-D-glucopyranoside [91] và chứng minh thêm bằng tương tác xa HMBC của H-1′′′′′ (δ_H 4,43) với C-3′′ (δ_C 84,9). Do đó, **BR2** được chứng minh là kaempferol 3-*O*-[2′′-*O*-(*E*)-*p*-coumaroyl][*β*-D-glucopyranosyl(1→3)*β*-D-glucopyranoside]-7-*O*-*α*-L-rhamnopyran-oside, một hợp chất mới và được gọi tên là barringoside H.

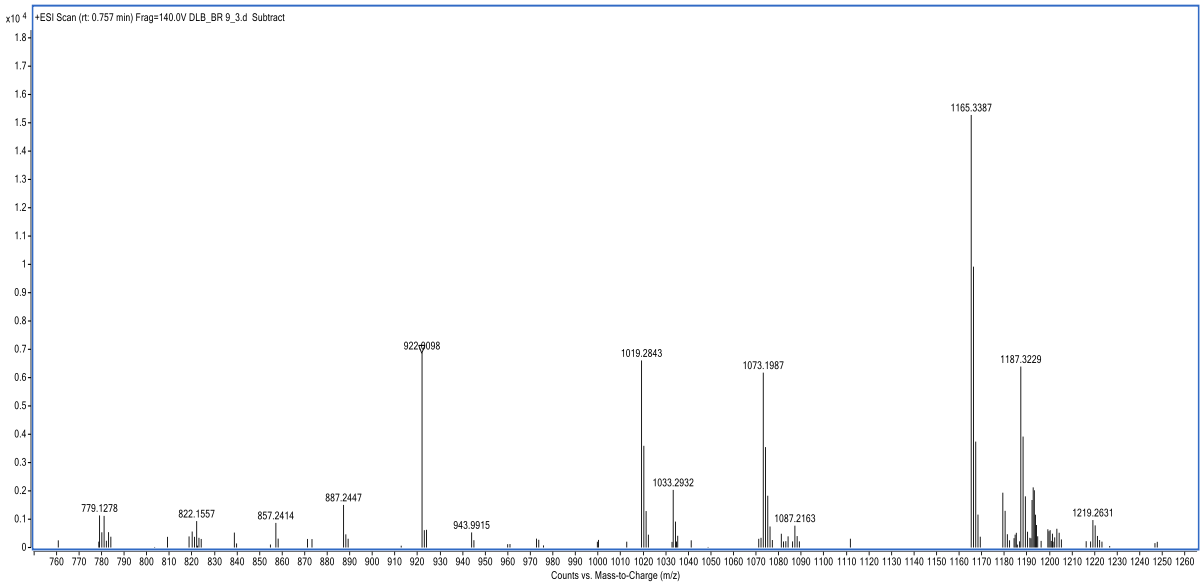
4.2.3. Hợp chất BR3: barringoside I (chất mới)

Hợp chất **BR3** cũng thu được dưới dạng chất rắn màu vàng. Các giá trị phổ ^{1}H và ^{13}C NMR của nó tương đồng các giá trị của **BR1**, ngoài việc có thêm các tín hiệu của một đường *α*-L-rhamnopyranosyl và một nhánh (*E*)-*p*-coumaroyl. Điều này được khẳng định bằng phổ HR-QTOF-MS với các píc ion tại *m/z* 1165,3387 $[M+H]^+$ (tính

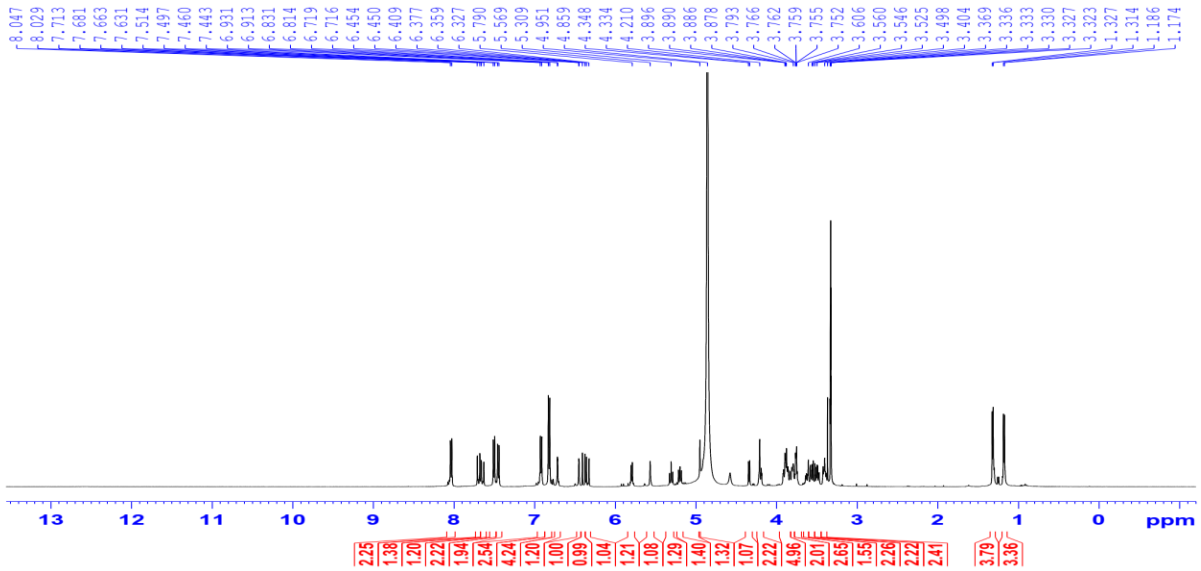
toán lý thuyết cho ion $C_{56}H_{61}O_{27}^{+}$, 1165,3395) và 1187,3229 $[M+Na]^{+}$ (tính toán lý thuyết cho ion $C_{56}H_{60}NaO_{27}^{+}$, 1187,3214) cho thấy CTPT của **BR3** là $C_{56}H_{60}O_{27}$.



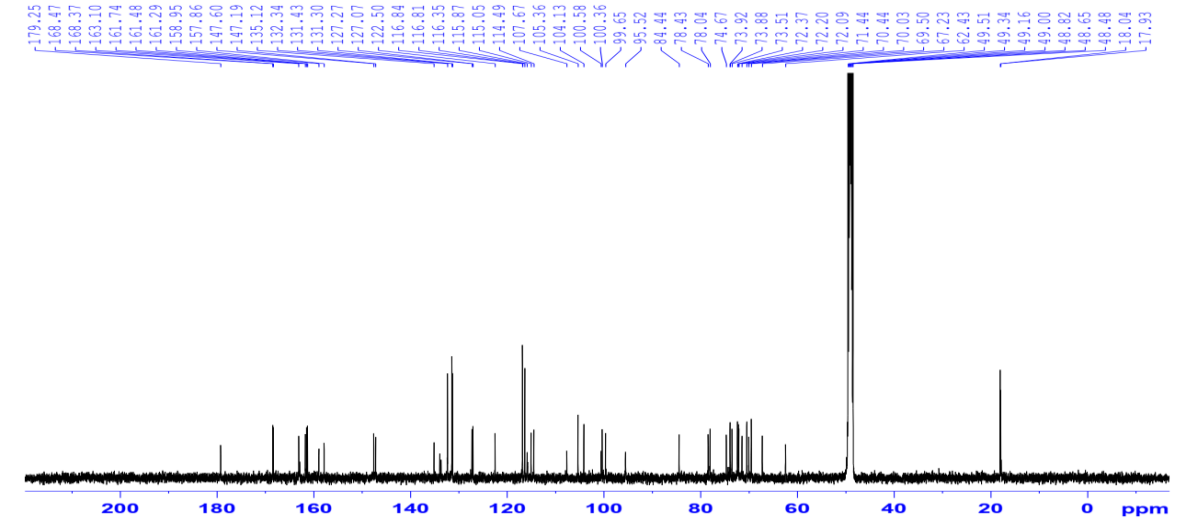
Hình 4.2.3.a. Cấu trúc hóa học của **BR3**



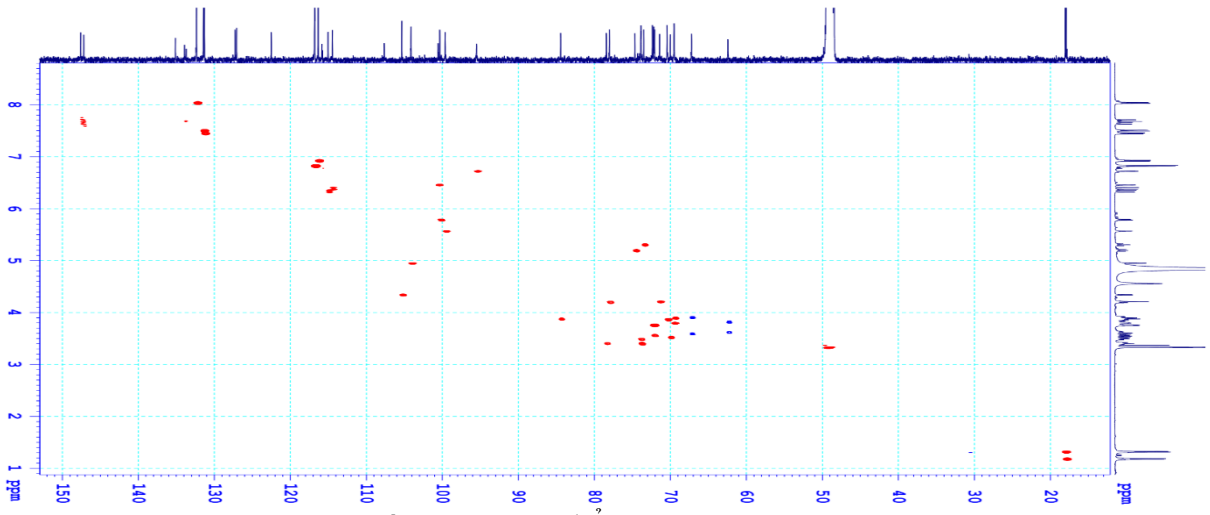
Hình 4.2.3.b. Phổ HR-ESI-MS của **BR3**



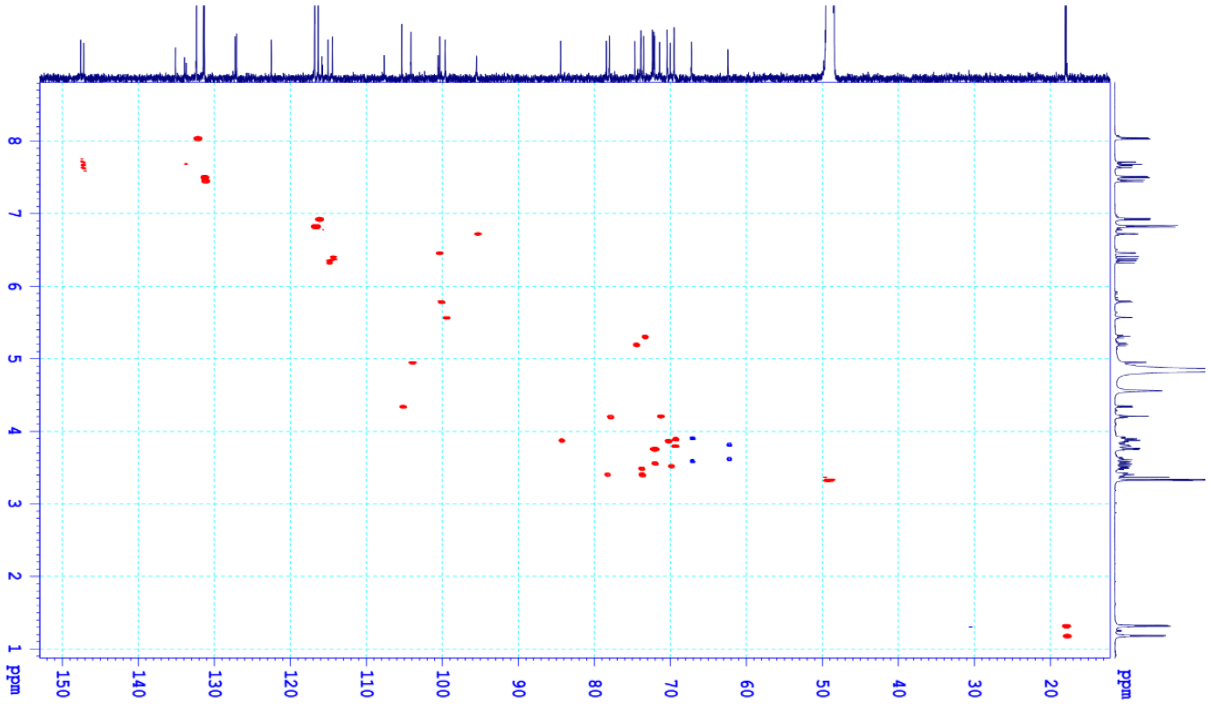
Hình 4.2.3.c. Phổ ^{1}H-NMR của **BR3**



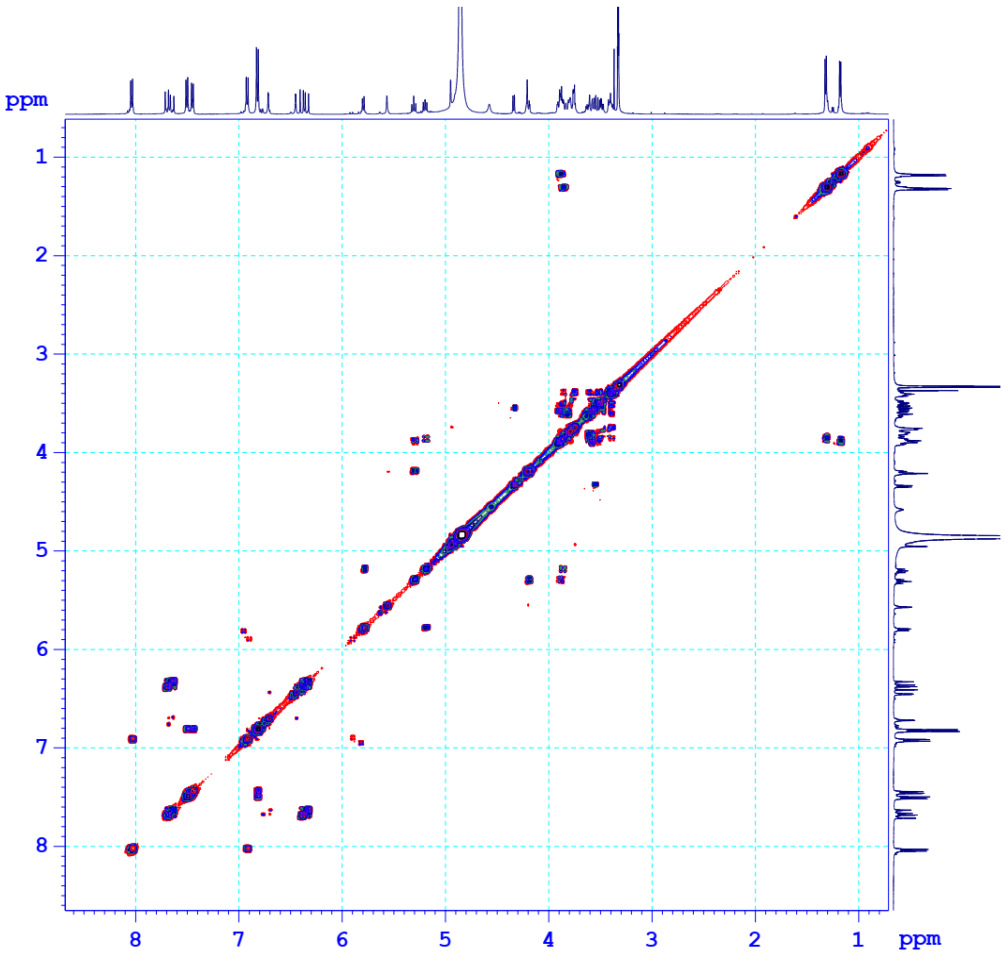
Hình 4.2.3.d. Phổ ^{13}C-NMR của **BR3**



Hình 4.2.3.e. Phổ HSQC của **BR3**



Hình 4.2.3.f. Phổ HMBC của **BR3**



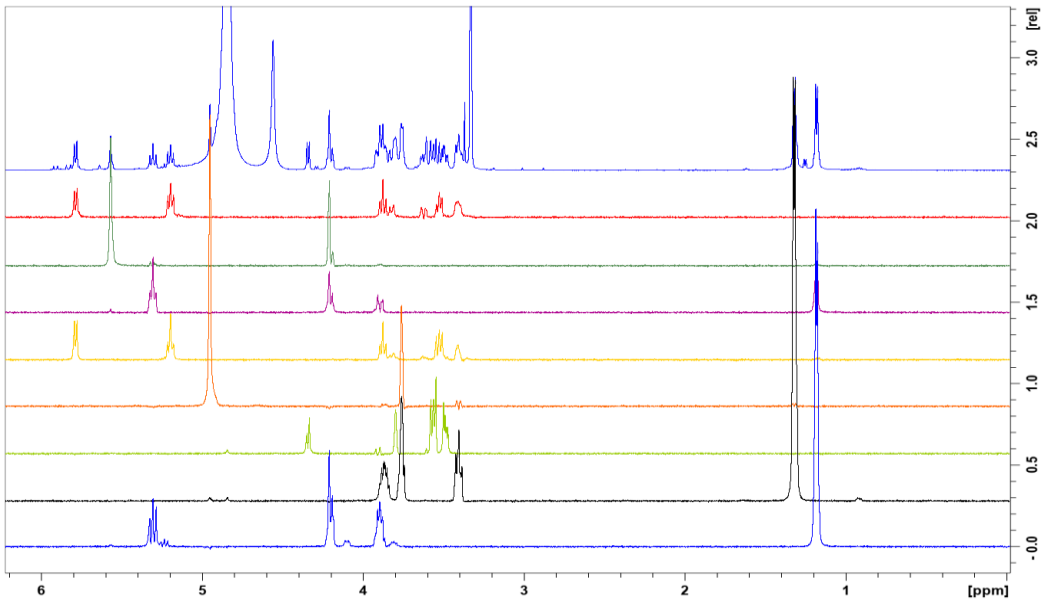
Hình 4.2.3.g. Phổ COSY của **BR3**

Bảng 4.2.3. Giá trị phổ NMR của **BR3** và hợp chất so sánh

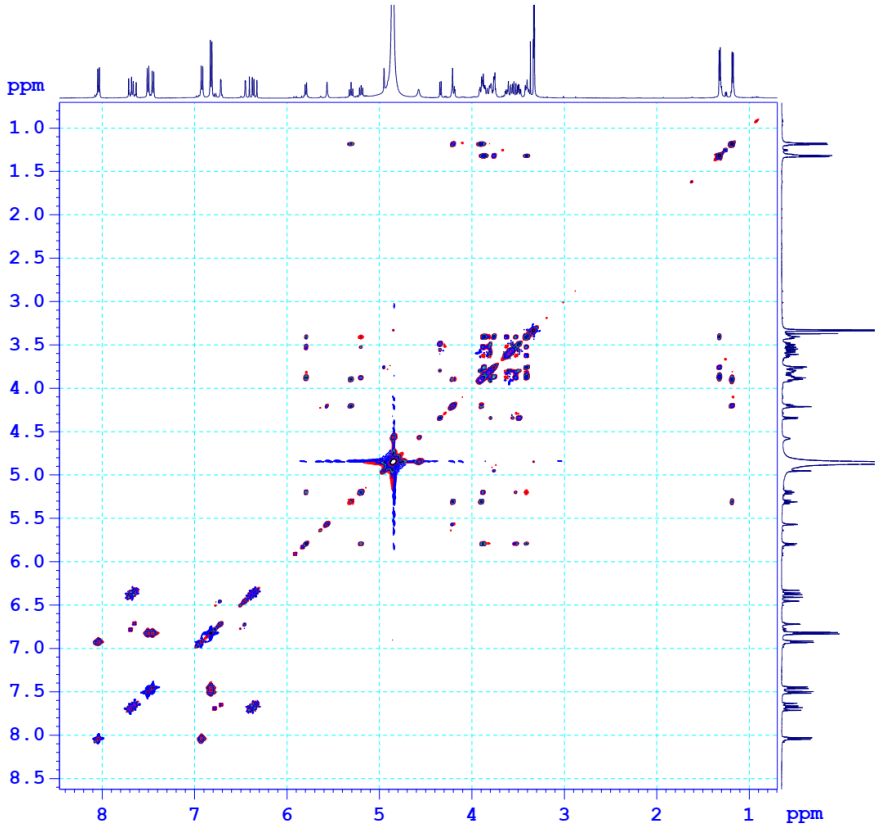
C	**[a]δC**	**[b]δC**	**δC [c,d]**	**δH [c,e]**dạng tín hiệu (*J* = Hz)	**HMBC** (H → C)
Aglycon					
2	159,0		158,9	-	
3	135,2		135,1	-	
4	179,4		179,2	-	
5	163,0		nd		
6	100,7		100,5	6,45 d (2,0)	5, 7, 8, 10
7	163,2		163,1	-	
8	95,7		95,5	6,72 d (1,5)	4, 6, 7, 9, 10
9	158,0		157,8	-	
10	107,8		107,6	-	
1′	122,5		122,5	-	
2′, 6′	132,4		132,3	8,04 d (9,0)	2
3′, 5′	116,5		116,3	6,92 d (9,0)	
4′	162,0		161,7	-	
Glc					
1″	100,2	100,8	100,3	5,80 d (8,0)	3
2″	75,4	74,6	74,6	5,20 dd (8,0, 9,0)	9‴″
3″	83,5	84,5	84,4	3,87 t (9,0)	
4″	70,5	70,3	70,0	3,52 t (9,0)	
5″	78,9	77,0	78,4	3,41 m	
6″	62,5	68,3	62,4	3,62 br d (11,5) 3,82 dd (2,5, 11,5)	
Rha 1					
1‴	99,7		99,6	5,57 br s	7
2‴	71,5		71,4	4,21 br s	
3‴	78,2		78,0	4,20 dd (3,0, 9,0)	
4‴	73,6		73,5	5,31 t (9,0)	9‴‴‴
5‴	69,6		69,5	3,89 dd (9,0, 6,0)	
6‴	18,09		17,9	1,18 d (6,0)	4‴, 5‴
2″-p-Cou					
1‴″	127,1	127,3	127,0	-	
2‴″, 6‴″	131,6	131,3	131,4	7,50 d (8,5)	4‴″, 7‴″

C	**[a]δ_C**	**[b]δ_C**	**δ_C [c,d]**	**δ_H [c,e]**dạng tín hiệu (*J* = Hz)	**HMBC** (H → C)
3′′′′, 5′′′′	116,9	116,8	116,8	6,82 d (8,5)	
4′′′′	161,6	161,1	161,4	-	
7′′′′	147,7	115,1	147,6	7,70 d (16,0)	
8′′′′	114,6	147,2	114,4	6,39 d (16,0)	1′′′′, 7′′′′, 9′′′′
9′′′′	168,1	168,6	168,4	-	
Ara					
1′′′′′		105,3	105,3	4,34 d (7,0)	3′′
2′′′′′		72,3	72,2	3,55 dd (7,0, 9,0)	
3′′′′′		74,0	73,9	3,48 dd (3,5, 9,0)	
4′′′′′		69,9	69,5	3,79 br s	
5′′′′′		67,3	67,2	3,59 br d (11,0) 3,90 br d (11,0)	
Rha 2					
1′′′′′′	104,3		104,1	4,95 br s	3′′′
2′′′′′′	72,5		72,3	3,75*	
3′′′′′′	72,2		72,0	3,75*	
4′′′′′′	73,9		73,8	3,40 t (9,0)	
5′′′′′′	70,5		70,4	3,86 dd (9,0, 6,5)	
6′′′′′′	18,2		18,0	1,32 d (6,5)	
3′′′-p-Cou					
1′′′′′′′	127,2		127,2	-	
2′′′′′′′, 6′′′′′′′	131,6		131,3	7,45 d (8,5)	
3′′′′′′′, 5′′′′′′′	116,9		116,8	6,82 d (8,5)	
4′′′′′′′	161,7		161,2	-	
7′′′′′′′	147,8		147,1	7,65 d (16,0)	
8′′′′′′′	114,6		115,0	6,34 d (16,0)	
9′′′′′′′	168,4		168,3	-	

[a]δ_C của kaempferol 3-*O*-[*α*-rhamnopyranosyl(1→3)-(2-*O*-pcoumaroyl)]-*β*-glucopyranoside, 7-*O*-[*α*-rhamnopyranosyl-(1→3)-(4-*O*-*p*-coumaroyl)]-*α*-rhamnopyranoside [80], [b]δ_C củacamelliquercetiside C [76], [c]đo trong CD_3OD, [d]125 MHz, [e]500 MHz, nd: tín hiệu không ghi nhận được, *tín hiệu bị che lấp, .



Hình 4.2.3.h. Phổ 1D TOCSY của **BR3**

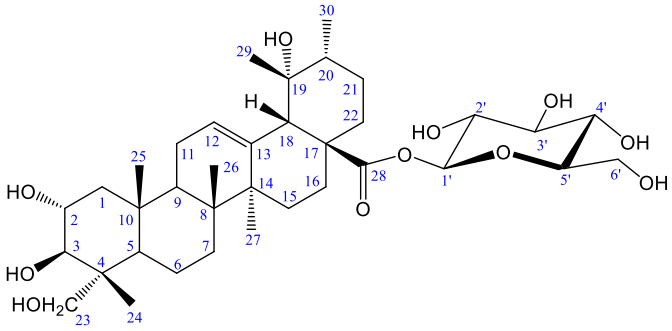


Hình 4.2.3.i. Phổ 2D TOCSY của **BR3**

Phổ ^{13}C NMR của **BR3,** kaempferol 3-*O*-[*α*-rhamnopyranosyl(1→3)-(2-*O*-pcoumaroyl)]-*β*-glucopyranoside, 7-*O*-[*α*-rhamnopyran-osyl-(1→3)-(4-*O*-*p*-coumaroyl)]-*α*-rhamnopyranoside [80] và camelliquercetiside C [76] được so sánh với nhau (bảng 4.2.3), gợi ý vị trí gắn tương ứng của đường *α*-L-rhamnopyranosyl và một nhánh (*E*)-*p*-coumaroyl xuất hiện thêm tại C-3‴ và C-4‴. Bên cạnh đó, proton H-1⁗ (δ_H 4.95) có

tương tác HMBC với C-3‴ (δ_C 78.0) cho thấy vị trí đính của đường rhamose tại cacbon này. Vị trí este hóa của nhánh coumaroyl tại C-4‴ cũng được chứng minh rõ ràng trên cơ sở tín hiệu HMBC nhận được giữa H-4‴ (δ_H 5.31) và C-9‴‴‴ (δ_C 168.4). Từ tất cả các minh chứng trên, **BR3** được chứng minh là kaempferol 3-*O*-[2-*O*-(*E*)-*p*-coumaroyl][*α*-L-arabinopyranosyl-(1→3)-*β*-D-glucopyranoside]-7-*O*-[*α*-L-rhamnopyranosyl-(1→3)-(4-*O*-(*E*)-*p*-coumaroyl)]-*α*-L-rhamnopyranoside, một hợp chất mới và được gọi tên là barringoside I.

4.2.4. Hợp chất BR4: niga-ichigoside F1



Hình 4.2.4.a. Cấu trúc hóa học của **BR4**

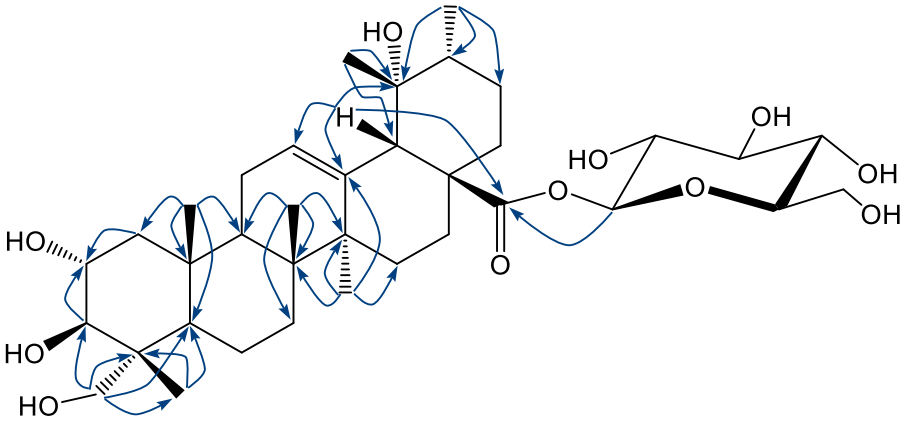
Hợp chất **BR4** được tách dưới dạng chất bột màu trắng. Không giống như các hợp chất ở trên, các phổ ^{13}C- và ^{1}H-NMR của **BR4** đặc trưng cho một triterpen glycoside. Phần triterpen aglycon có chứa các tín hiệu của 2 nhóm oxymethin [δ_C 69,7 (C-2) và 78,3 (C-3)/δ_H 3,71 (H-2) và 3,38 (H-3)], một cacbon bậc bốn mang oxy [δ_C 73,6 (C-19)], một nhóm oxymethylen [δ_C 66,5 (C-23)/δ_H 3,53 và 3,29, mỗi tín hiệu 1H, d, J = 11,0 Hz (H-23)], năm nhóm methyl vạch đơn [δ_C 13,8 (C-24), 17,6 (C-25), 17,6 (C-26), 24,7 (C-27) và 27,0 (C-29)/δ_H 0,73(H-24), 1,06 (H-25), 0,80 (H-26), 1,36 (H-27) và 1,23 (H-29), tương ứng mỗi tín hiệu 3H, s), một nhóm methyl vạch kép [δ_C 16,5 (C-30)/δ_H 0,95 (3H, d, J = 6,5 Hz, H-30)], một nối đôi bị thế 3 vị trí [δ_C 129,5 (CH, C-12) và 139,7 (C, C-13)/δ_H 5,33 (1H, br s, H-12)] và một nhóm carboxyl [δ_C 178,5 (H-28)]. Bên cạnh đó, các tín hiệu thuộc 1 đường glucose cũng được ghi nhận tại δ_C 95,8 (CH, C-1′), 73,9 (CH, C-2′), 78,3 (CH, C-3′), 71,2 (CH, C-4′), 78,6 (CH, C-5′), và 62,5 (CH_2, C-6′)/δ_H 5,35 (d, J = 8,0 Hz, H-1′), 3,33 (H-2′), 3,40 (H-3′), 3,37 (H-4′), 3,35 (H-5′), 3,82 (dd, J = 2,0, 12,0 Hz, H_a-6′) và 3,70 (dd, J = 4,5, 12,0 Hz, H_b-6′) [93].

Bảng 4.2.4. Giá trị phổ NMR của **BR4** và hợp chất thao khảo

C	$^{a}\delta_C$	$\delta_C^{b,c}$	$\delta_H^{b,d}$ dạng tín hiệu (*J* = Hz)	**HMBC** (H → C)
1	47,9	47,9	0,90 m/1,95 m	
2	68,8	69,7	3,71*	
3	78,2	78,3	3,38*	2, 4, 23, 24
4	43,5	44,1	-	
5	48,5	48,2	1,30 m	
6	18,7	19,2	1,42 m/1,45 m	
7	33,1	33,5	1,30 m/1,65 m	
8	40,6	41,2	-	
9	47,9	48,7	1,79 m	
10	38,3	39,0	-	
11	24,2	24,8	2,04 m	
12	128,3	129,5	5,33 br s	
13	139,2	139,7	-	
14	42,1	42,8	-	
15	29,1	29,6	1,02 m/1,84 m	
16	26,0	26,5	1,64 m/2,63 dt	
17	48,5	49,6	-	
18	54,4	54,9	2,54 s	12, 13, 19, 28
19	72,5	73,6	-	
20	42,1	42,9	1,35 m	
21	27,0	27,2	1,25 m/1,75 m	
22	37,7	38,3	1,64 m/1,79 m	
23	66,6	66,5	3,53 d (11,0)/3,29 d (11,0)	3, 4, 5, 24
24	14,2	13,8	0,73 s	3, 4, 5, 23
25	17,5	17,6	1,06 s	1, 5, 9, 10
26	17,5	17,6	0,80 s	7, 8, 9, 14
27	24,5	24,7	1,36 s	8, 13, 14, 15
28	176,8	178,5	-	
29	27,0	27,0	1,23 s	18, 19, 20
30	16,7	16,5	0,95 d (6,5)	19, 20, 21
Glc				
1′	95,7	95,8	5,35 d (8,0)	28

2′	73,9	73,8	3,33	
3′	78,8	78,3	3,40	
4′	71,2	71,2	3,37	
5′	79,0	78,6	3,35	
6′	62,3	62,5	3,70 dd (4,5, 12,0) 3,82 dd (2,0, 12,0)	

[a]δcủa niga-ichigoside F1 đo trong pyridine-d_5[93], [b]đo trongCD_3OD, [c]125 MHz, [d]500 MHz.



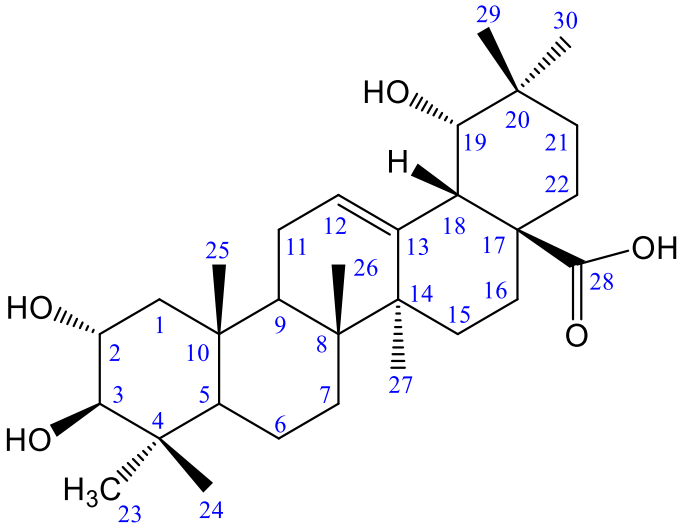
Hình 4.2.4.b. Một số tương tác HMBC chính của **BR4**

Tín hiệu cacbon anome bị di chuyển rất mạnh về hướng trường cao gợi ý vị trí este hóa của đường glucose ở cacbon carboxyl. Nhận định này được chứng minh bởi tương tác HMBC ghi nhận được giữa proton anome H-1′ (δ_H 5,35) và cacbon carbonyl C-28 (δ_C 178,5), các tương tác HMBC của H-18 (δ_H 2,54) với C-12 (δ_C 129,5), C-13 (δ_C 139,7), C-19 (δ_C 73,6), và C-28 (δ_C 178,5); H-29 (δ_H 1,23) với C-18 (δ_C 54,9), C-19 (δ_C 73,6), và C-20 (δ_C 42,9); và các tương tác của H-30 (δ_H 0,95) với C-19 (δ_C 73,6), C-20 (δ_C 42,9) và C-21 (δ_C 27,2) chứng minh rõ ràng vị trí của nối đôi C-12/C-13, cacbon bậc bốn mang oxi C-19 và cacbon carboxyl C-28. Phân tích cụ thể các tương tác khác trên phổ HMBC kết hợp so sánh giá trị phổ ^{13}C-NMR với các giá trị đã đăng tải khẳng định hợp chất **BR4** là niga-ichigoside F1 [93]. Các phổ NMR của **BR4** xem tại Phụ lục 5.

4.2.5. Hợp chất BR7: Arjunic acid

Tương tự như **BR6**, các phổ ^{13}C- và ^{1}H-NMR của **BR7** cũng cho thấy một hợp chất triterpen. Tuy nhiên, trên các phổ của **BR7** xuất hiện các píc của 7 nhóm metyl vạch đơn [δ_C 29,2 (C-23), 17,3 (C-24), 16,9 (C-25), 17,7 (C-26), 25,0 (C-27), 28,6 (C-29) và 25,1 (C-30)/δ_H 1,05 (H-23), 0,83 (H-24), 1,02 (H-25), 0,79 (H-26), 1,31 (H-27),

0,96 (H-29) và 0,98 (H-30), tương ứng mỗi tín hiệu 3H, s] gợi ý cho một hợp chất tritecpen dạng khung olean.



Hình 4.2.7. Cấu trúc hóa học của **BR7**

Bảng 4.2.7. Giá trị NMR của **BR7** và hợp chất so sánh

C	$^{a}\delta_C$	$\delta_C^{b,c}$	$\delta_H^{b,d}$dạng tín hiệu (*J* = Hz)	**HMBC** (H → C)
1	48,1	47,9	0,92 m/1,95 m	
2	69,6	69,5	3,65 m	
3	84,7	84,5	2,93 br d (9,5)	
4	40,7	40,5	-	
5	57,0	56,8	0,89 m	
6	19,8	19,7	1,47 m/1,58 m	
7	34,0	33,9	1,55 m/1,78 m	
8	40,9	40,7	-	
9	49,4	49,1	1,81 m	
10	39,5	39,3	-	
11	25,0	24,8	2,00 m	
12	124,9	124,7	5,34 t (3,5)	
13	144,9	144,7	-	
14	42,8	42,6	-	
15	29,6	29,5	1,03 m/1,77 m	
16	28,7	28,60	1,62 m/2,61 m	
17	46,8	46,7	-	
18	45,3	45,1	3,08 br s	
19	82,6	82,4	3,28 d (4,0)	
20	36,2	36,0	-	
21	29,6	29,4	1,01 m/1,65 m	
22	34,2	34,0	1,34 m/1,64 m	

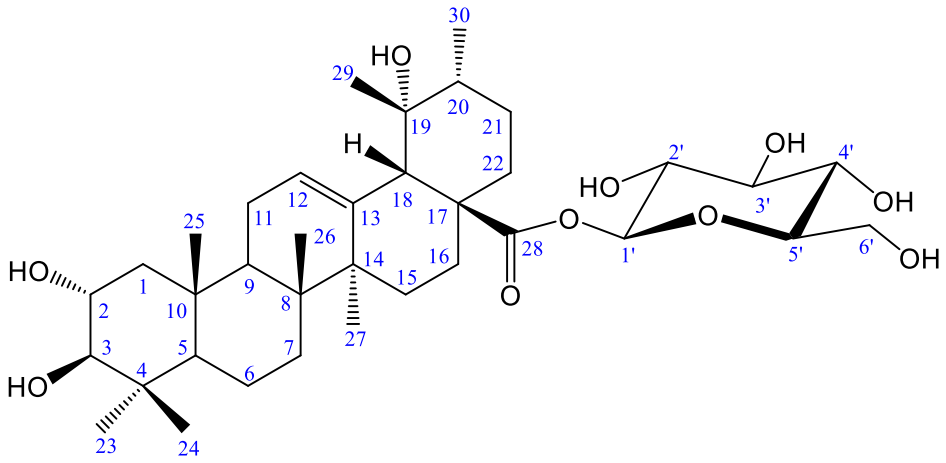
C	[a]δ_C	δ_C[b,c]	δ_H[b,d] dạng tín hiệu (J = Hz)	**HMBC** (H → C)
23	29,4	29,2	1,05 s	3, 4, 5, 24
24	17,5	17,3	0,83 s	3, 4, 5, 23
25	17,1	16,9	1,02 s	1, 5, 9, 10
26	17,9	17,7	0,79 s	7, 8, 9, 14
27	25,2	25,0	1,31 s	8, 13, 14, 15
28	182,5	182,3	-	
29	28,8	28,6	0,96 s	19, 20, 21, 30
30	25,3	25,1	0,98 s	19, 20, 21, 29

[a]δ của axit arjunic đo trong CD_3OD[94], [b]đo trong CD_3OD, [c]125 MHz, [d]500 MHz.

Ngoài ra, 3 nhóm oximethin [δ_C 69,5 (C-2), 84,5 (C-3) và 82,4 (C-19)/δ_H 3,65 (m, H-3), 2,93 (br d, J = 9,5 Hz, H-3) và 3,28 (d, J = 4,0 Hz, H-19)], một nối đôi bị thế 3 vị trí [δ_C 124,7 (CH, C-12) và 144,7 (C, C-13)/δ_H 5,34 (t, J = 3,5 Hz, H-12)] và một cacbon carboxyl [δ_C 182,3 (C-28)] cũng được ghi nhận. So sánh chi tiết giá trị phổ ^{13}C-NMR của **BR7** với các giá trị đã đăng tải [94], cùng với phân tích cụ thể các tín hiệu trên phổ HMBC và HSQC xác định hợp chất này là arjunic acid. Các phổ NMR của **BR7** xem tại Phụ lục 8.

4.2.6. Hợp chất BR5: Rosamultin

Các giá trị phổ ^{1}H-NMR và ^{13}C-NMR của **BR5** tương tự các giá trị của **BR4**, ngoài sự xuất hiện của một nhóm methyl vạch đơn [δ_C 29,3 (C-23)/δ_H 1,03 (3H, s, H-23)] ở hợp chất **BR5** thay cho một nhóm oxymethylen ở **BR4**.



Hình 4.2.5. Cấu trúc hóa học của **BR5**

Bảng 4.2.5. Giá trị phổ NMR của **BR5** và hợp chất so sánh

C	[a]δ	δ_C[b,c]	δ_H[b,d] dạng tín hiệu(J = Hz)	**HMBC** (H → C)
1	47,9	48,2	0,92 m/1,96 m	

C	**[a]δ**	**δ_C[b,c]**	**δ_H[b,d]** dạng tín hiệu(*J* = Hz)	**HMBC** (H → C)
2	68,6	69,5	3,65 ddd (5,0, 9,5, 11,5)	
3	83,9	84,5	2,93 d (9,5)	2, 4, 23, 24
4	38,5	39,2	-	
5	56,0	56,7	0,87 d (1,5)	
6	19,1	19,6	1,45 m/1,55 m	
7	33,5	34,0	1,35 m/1,57 m	
8	40,6	41,3	-	
9	48,0	48,4	1,74 m	
10	39,6	40,4	-	
11	24,4	24,7	2,03 m	
12	128,4	129,5	5,33 br s	
13	139,3	139,6	-	
14	42,1	42,7	-	
15	29,4	29,6	1,03 m/1,85 m	
16	26,1	26,5	1,65 m/2,63 dt (4,0, 13,5)	
17	48,6	49,5	-	
18	54,4	54,9	2,54 s	12, 13, 19, 28
19	72,7	73,6	-	
20	42,1	42,9	1,37 m	
21	27,0	27,2	1,26 m/1,75 m	
22	37,7	38,2	1,65 m/1,80 m	
23	29,2	29,3	1,03 s	3, 4, 5, 24
24	17,5	17,4	0,83 s	3, 4, 5, 23
25	17,6	17,1	1,03 s	1, 5, 9, 10
26	17,0	17,6	0,80 s	7, 8, 9, 14
27	24,6	24,6	1,35 s	8, 13, 14, 15
28	176,9	178,5	-	
29	26,7	27,0	1,22 s	18, 19, 20
30	16,7	16,5	0,95 d (6,5)	19, 20, 21
Glc				
1′	95,8	95,7	5,34 d (8,0)	28
2′	74,0	73,8	3,33	
3′	78,9	78,3	3,41	
4′	71,3	71,1	3,37	

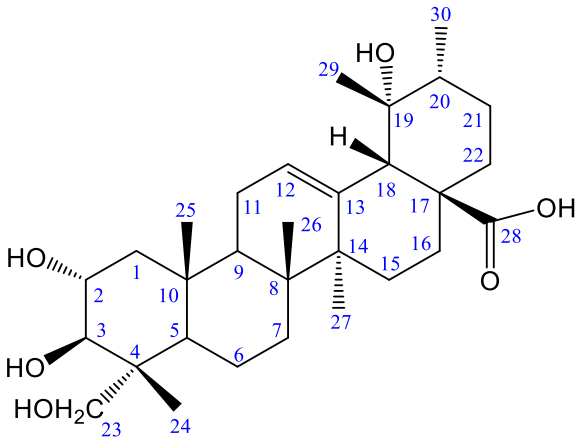
C	[a]δ	δ_C[b,c]	δ_H[b,d] dạng tín hiệu(*J* = Hz)	**HMBC** (H → C)
5′	79,2	78,5	3,35	
6′	62,4	62,4	3,82 dd (2,0, 12,0) 3,70 dd (4,5, 12,0)	

[a]δcủa rosamutin đo trong pyridin-d_5[95], [b]đo trongCD_3OD, [c]125 MHz, [d]500 MHz.

Tương tác HMBC giữa proton methyl xuất hiện thêm δ_H 1,03 (H-23) với các cacbon C-3 (δ_C 84,5), C-4 (δ_C 39,2), C-5 (δ_C 56,7) và C-24 (δ_C 17,4) chứng minh cho vị trí của nó tại C-23. Phân tích cụ thể các tương tác HMBC khác cùng với sự tương đồng về giá trị phổ ^{13}C-NMR với các số liệu đã đăng tải khẳng định **BR5** là rosamultin [95]. Các phổ NMR của **BR5** xem tại Phụ lục 5.

4.2.7. Hợp chất BR6: 23-hydroxytormentic acid

Các phổ ^{1}H-NMR và ^{13}C-NMR của **BR6** cũng tương đồng với các phổ của **BR4** ngoài việc thiếu hụt các tín hiệu của đơn vị đường glucose. Các tín hiệu của 2 nhóm oxymethin [δ_C 69,7 (C-2) và 78,3 (C-3)/δ_H 3,72 (1H, m, H-2) và 3,38 (1H, br d, *J* = 9,5 Hz, H-3)], một cacbon bậc 4 mang oxy [δ_C 73,6 (C-19)], một nhóm oximethylen [δ_C 66,4 (C-23)/δ_H 3,53 và 3,29, mỗi tín hiệu 1H, d, *J* = 11,5 Hz (H-23)], năm nhóm methyl vạch đơn [δ_C 13,8 (C-24), 17,5 (C-25), 17,6 (C-26), 24,8 (C-27) và 27,0 (C-29)/δ_H 0,73(H-24), 1,06 (H-25), 0,83 (H-26), 1,37 (H-27) và 1,22 (H-29), tương ứng mỗi tín hiệu 3H, s], một nhóm methyl vạch kép [δ_C 16,6 (C-30)/δ_H 0,95 (3H, d, *J* = 6,5 Hz, H-30)] và một nối đôi bị thế 3 vị trí [δ_C 129,1 (CH, C-12) và 140,2 (C, C-13)/δ_H 5,31 (1H, t, *J* = 3,0 Hz, H-12)].



Hình 4.2.6. Cấu trúc hóa học của **BR6**

Bảng 4.2.6. Giá trị phổ NMR của **BR6** và hợp chất so sánh

C	[a]δ_C	δ_C[b,c]	δ_H[b,d] dạng tín hiệu (*J*= Hz)	**HMBC** (H → C)

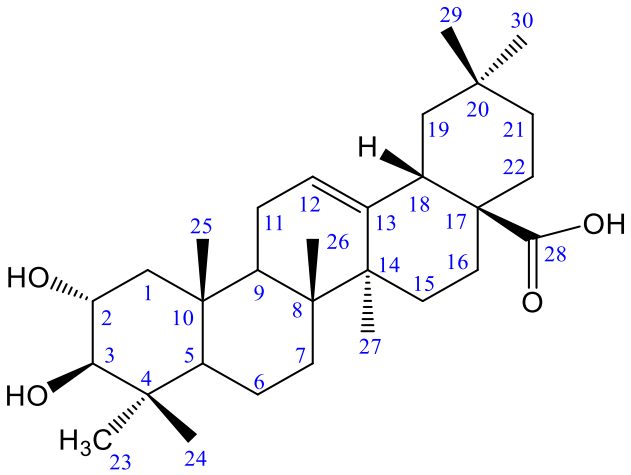
C	**$^{a}\delta_C$**	**$\delta_C^{b,c}$**	**$\delta_H^{b,d}$** dạng tín hiệu (*J*= Hz)	**HMBC** (H → C)
1	47,8	47,9	0,93 m/1,95 m	
2	68,8	69,7	3,72 m	
3	78,3	78,3	3,38 br d (9,5)	2, 4, 23, 24
4	43,6	44,1	-	
5	48,2	48,2	1,32 m	
6	18,6	19,2	1,43 m/1,48 m	
7	33,1	33,5	1,30 m/1,68 m	
8	40,4	41,0	-	
9	47,9	48,4	1,81 m	
10	38,3	39,0	-	
11	24,1	24,7	2,03 m	
12	128,0	129,1	5,31 t (3,0)	
13	140,0	140,2	-	
14	42,1	42,7	-	
15	29,2	29,6	1,02 m/1,83 m	
16	26,3	26,6	1,53 m/2,58 m	
17	48,2	49,1	-	
18	54,5	55,1	2,53 s	12, 13, 19, 28
19	72,6	73,6	-	
20	42,3	43,0	1,37 m	
21	27,0	27,3	1,25 m/1,75 m	
22	38,4	39,0	1,64 m/1,74 m	
23	66,5	66,4	3,29 d (11,5)/3,53 d (11,5)	3, 4, 5, 24
24	14,2	13,8	0,73 s	3, 4, 5, 23
25	17,2	17,5	1,06 s	1, 5, 9, 10
26	17,3	17,6	0,83 s	7, 8, 9, 14
27	24,6	24,8	1,37 s	8, 13, 14, 15
28	180,7	nd	-	
29	26,8	27,0	1,22 s	18, 19, 20
30	16,7	16,6	0,95 d (6,5)	19, 20, 21

[a]δ của 23-hydroxytormentic acid đo trong pyridin-d_5 [96], [b]đo trong CD_3OD, [c]125 MHz, [d]500 MHz. nd: tín hiệu không ghi nhận được trên phổ.

Xem xét cấu trúc hóa học của **BR6** cho phép dự đoán **BR6** là 23-hydroxytormentic acid. Dự đoán này được chứng minh bởi sự tương đồng về giá trị phổ ^{13}C-NMR của **BR6** với các giá trị đã đăng tải của axit 23-hydroxytormentic [96]. Các phổ NMR của **BR6** xem tại Phụ lục 7.

4.2.8. Hợp chất BR8: Maslinic acid

Giá trị phổ ^{1}H-NMR và ^{13}C-NMR của **BR8** cũng đặc trưng cho một triterpen. Phân tích so sánh cho thấy, các giá trị phổ ^{13}C- và ^{1}H-NMR của **BR8** tương tự như các giá trị phổ của **BR7**, ngoài việc thiếu hụt các tín hiệu của một nhóm oximethin và thay vào đó là của một nhóm methylen.



Hình 4.2.8. Cấu trúc hóa học của **BR8**

Bảng 4.2.8. Giá trị phổ NMR của **BR8** và hợp chất so sánh

C	**$^{a}\delta$**	**$\delta^{b,c}$**	**$\delta^{b,d}$** dạng tín hiệu (*J* = Hz)	**HMBC** (H → C)
1	47,3	48,1	0,82 m/1,96 m	
2	68,0	69,5	3,64 m	
3	83,2	84,4	2,93 br d (9,5)	
4	39,4	40,4	-	
5	55,4	56,7	0,86 m	
6	18,4	19,5	1,45 m/1,56 m	
7	32,8	33,9	1,35 m/1,76 m	
8	39,3	40,6	-	
9	47,7	49,0	1,64 m	
10	38,0	39,2	-	
11	23,5	24,6	1,95 m	
12	121,7	123,4	5,27 t (3,5)	
13	144,4	145,3	-	
14	41,7	42,9	-	
15	27,8	28,8	1,10 m/1,79 m	
16	23,3	24,0	1,62 m/2,02 m	
17	46,2	47,6	-	
18	41,5	42,7	2,88 dd (4,5, 14,0)	
19	46,0	47,2	1,15 m/1,70 m	

C	[a]δ	δ[b,c]	δ[b,d] dạng tín hiệu (*J* = Hz)	**HMBC** (H → C)
20	30,5	31,6	-	
21	33,8	34,9	1,22 m/1,40 m	
22	32,7	33,8	1,54 m/1,56 m	
23	28,9	29,3	1,04 s	3, 4, 5, 24
24	17,1	17,4	0,83 s	3, 4, 5, 23
25	16,4	17,0	1,03 s	1, 5, 9, 10
26	17,2	17,7	0,84 s	7, 8, 9, 14
27	25,7	26,4	1,19 s	8, 13, 14, 15
28	179,0	181,8	-	
29	32,8	33,5	0,93 s	19, 20, 21, 30
30	23,3	23,98	0,96 s	19, 20, 21, 29

[a]δ của axit maslinic đo trong CD_3OD[97], [b]đo trong CD_3OD, [c]125 MHz, [d]500 MHz.

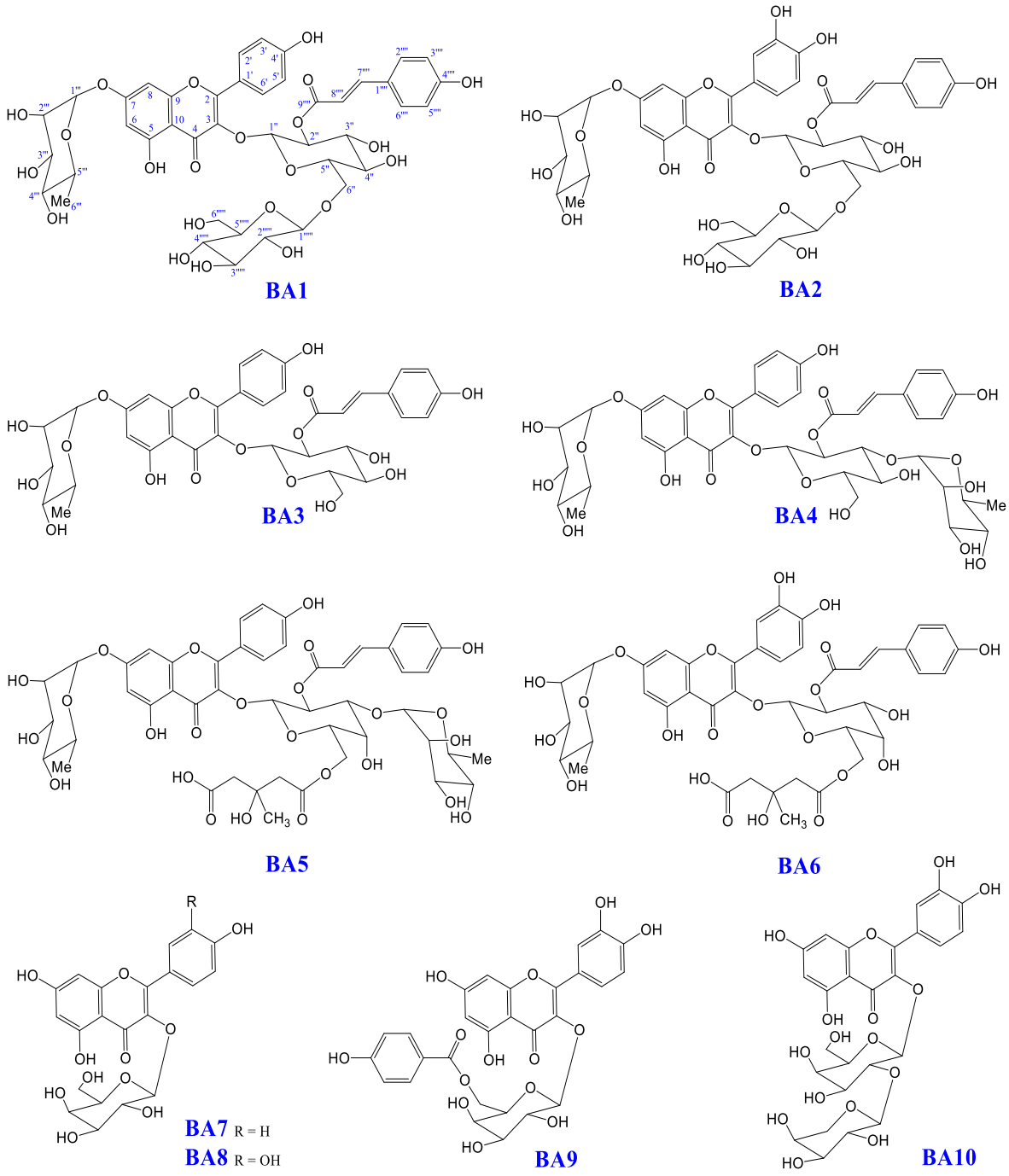
So sánh chi tiết giá trị phổ ^{13}C-NMR của **BR8** với các tài liệu tham khảo công bố, cùng với phân tích cụ thể các tín hiệu trên phổ HSQC và HMBC xác định hợp chất này là maslinic acid [97, 98]. Các phổ NMR của **BR8** xem tại Phụ lục 9.

4.2.9. Cấu trúc hóa học các hợp chất đã phân lập từ hai loài nghiên cứu

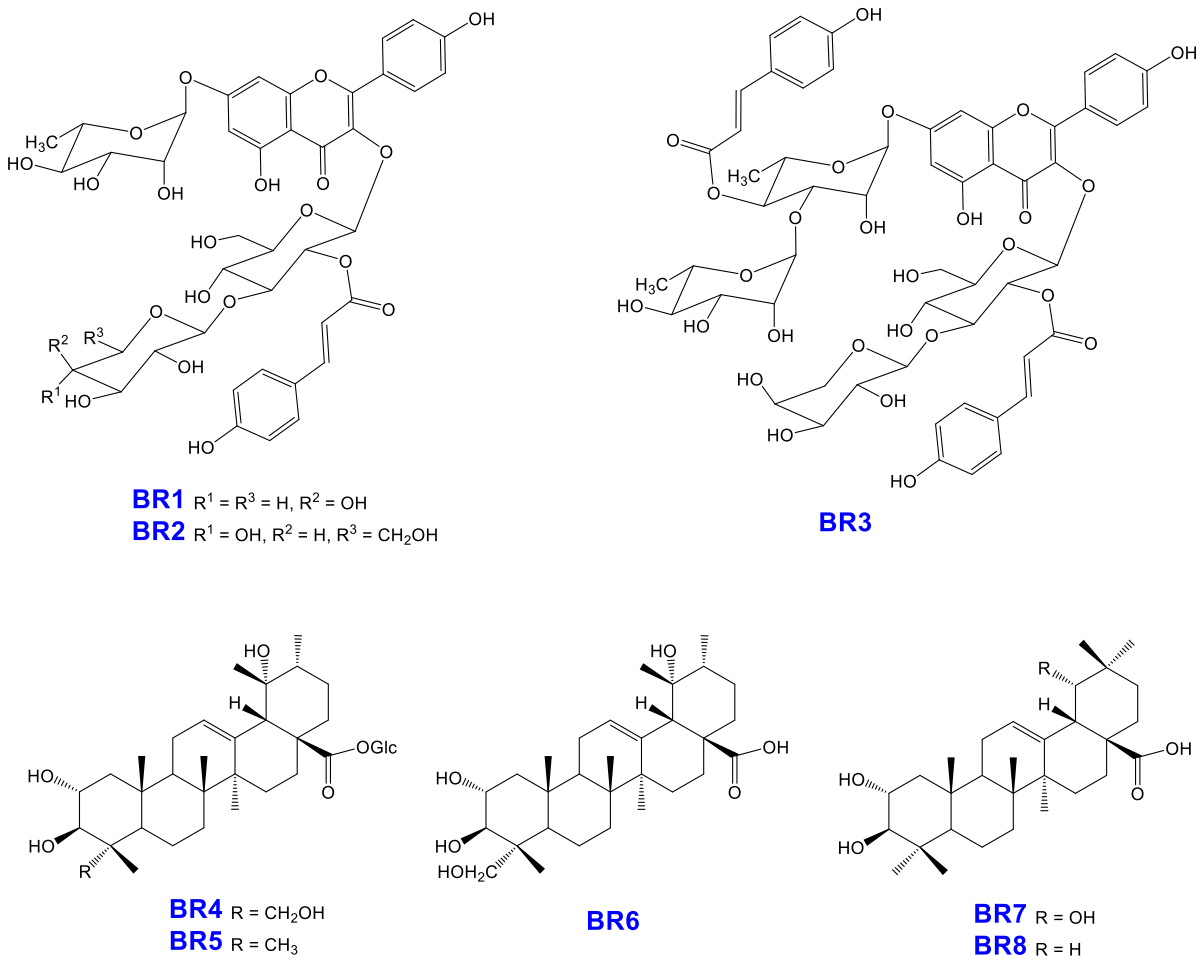
Như vậy, thông qua dữ liệu các phương pháp phổ, tác giả đã chứng minh được cấu trúc hóa học của 18 hợp chất đã tách được bao gồm:

+ 10 hợp chất từ loài chiếc đỏ - *B. acutangula* (**BA1-BA10**) đều là các hợp chất flavonoid glycoside trong đó đáng lưu ý là có tới 6 hợp chất flavonoid glycoside bị acyl hóa có cấu trúc hóa học mới và được gọi tên là barringoside A-F (**BA1-BA6**). Các hợp chất đã biết là kaempferol 3-*O*-*β*-D-galactopyranoside (**BA7**), quercetin-3-*O*-*β*-D-galactopyranoside (**BA8**), quercetin 3-*O*-*β*-D-(6-*p*-hydroxybenzoyl)galacto-pyranoside (**BA9**) và quercetin 3-*O*-*α*-L-arabinopyranosyl-(1→2)-*β*-D-galacto-pyranoside (**BA10**).

+ 8 hợp chất từ loài chiếc chùm - *B. racemosa* trong đó có 3 hợp chất flavonoid glycoside bị acyl hóa có cấu trúc hóa học mới và được gọi tên là barringoside G-I (**BR1-BR3**) và 5 dẫn xuất tritecpen đã biết là niga-ichigoside F1 (**BR4**), rosamultin (**BR5**), 23-hydroxytormentic acid (**BR6**), arjunic acid (**BR7**) và maslinic acid (**BR8**).



Hình 4.2.9.a. Cấu trúc hóa học của các hợp chất từ loài *B. acutangula*



Hình 4.2.9.b. Cấu trúc hóa học của các hợp chất từ loài *B. racemosa*

Khi đánh giá tổng quan các nghiên cứu về loài Chiếc đỏ - *B. acutangula* và Chiếc chùm - *B. racemosa* trên thế giới TPHH chính của các loài này là các triterpen và saponin. Trong khi đó các kết quả của luận án về loài *B. acutangula* và *B. racemosa* mọc ở Việt Nam cho thấy sự có mặt của nhóm chất flavonoid glycoside bị acyl hóa, điều này gợi mở về tính đặc thù về TPHH của các loài *Barringtonia* ở Việt Nam so với các loài tương ứng trên thế giới, hứa hẹn tiềm năng có nhiều hợp chất mới mang hoạt tính sinh học sẽ được phát hiện ở những loài của Việt Nam trong quá trình nghiên cứu tiếp theo.

4.3. Kết quả thử hoạt tính sinh học của các hợp chất phân lập được từ hai loài nghiên cứu

4.3.1. Hoạt tính ức chế sản sinh NO định hướng kháng viêm

18 hợp chất tách được từ 2 loài *B. acutangula* và *B. racemosa* được thử nghiệm định hướng kháng viêm dựa trên khả năng ức chế sản sinh NO trên dòng tế bào RAW246.7 được kích thích bởi LPS theo phương pháp được trình bày ở mục 2.2.3.1. thu được kết quả như sau:

Bảng 4.3.1. Kết quả đánh giá tác dụng ức chế sản sinh NO của 18 hợp chất

STT	Ký hiệu	Giá trị IC_{50} (µM)	STT	Ký hiệu	Giá trị IC_{50} (µM)
1	**BA1**	>100	11	**BR1**	>100
2	**BA2**	>100	12	**BR2**	>100
3	**BA3**	>100	13	**BR3**	**52,48 ± 1,04**
4	**BA4**	>100	14	**BR4**	>100
5	**BA5**	>100	15	**BR5**	>100
6	**BA6**	>100	16	**BR6**	>100
7	**BA7**	>100	17	**BR7**	>100
8	**BA8**	>100	18	**BR8**	>100
9	**BA9**	**20,00±1,68**	19	**Cardamonin***	2,2±0,27
10	**BA10**	>100			

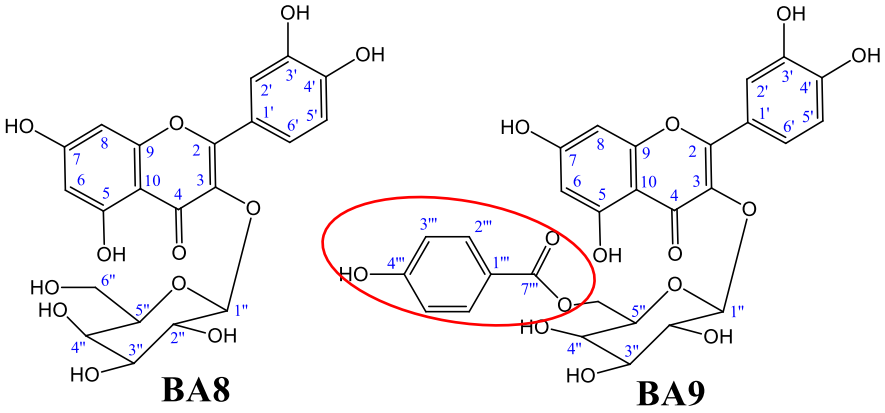
*chất đối chứng dương

Kết quả cho thấy: **BA1-BA8, BA10** được tách từ loài *B. acutangula* và **BR1-BR2, BR4-BR8** từ loài *B. racemosa* không ảnh hưởng tới sự phát triển bình thường của tế bào RAW246.7. Do đó lượng NO sinh ra trong môi trường nuôi cấy được coi như không ảnh hưởng làm phát triển quá mức hay sự chết đi của tế bào RAW246.7 khi được ủ với 16 hợp chất trên. Chất chuẩn dương hoạt động ổn định trong thử nghiệm.

Hợp chất là **BA9** thể hiện hoạt tính ức chế tạo ra NO trong tế bào RAW264.7 tốt nhất với IC_{50} là 20,00±1,68 µM. Hợp chất **BA9** là một hợp chất đã biết. Theo tra cứu tài liệu, **BA9** đã được công bố thể hiện tác dụng kháng nấm *Cryptococcus neoformans* (MIC = 31 µg/ml), *Saccharomyces cerevisiae* (MIC = 31 µg/ml),

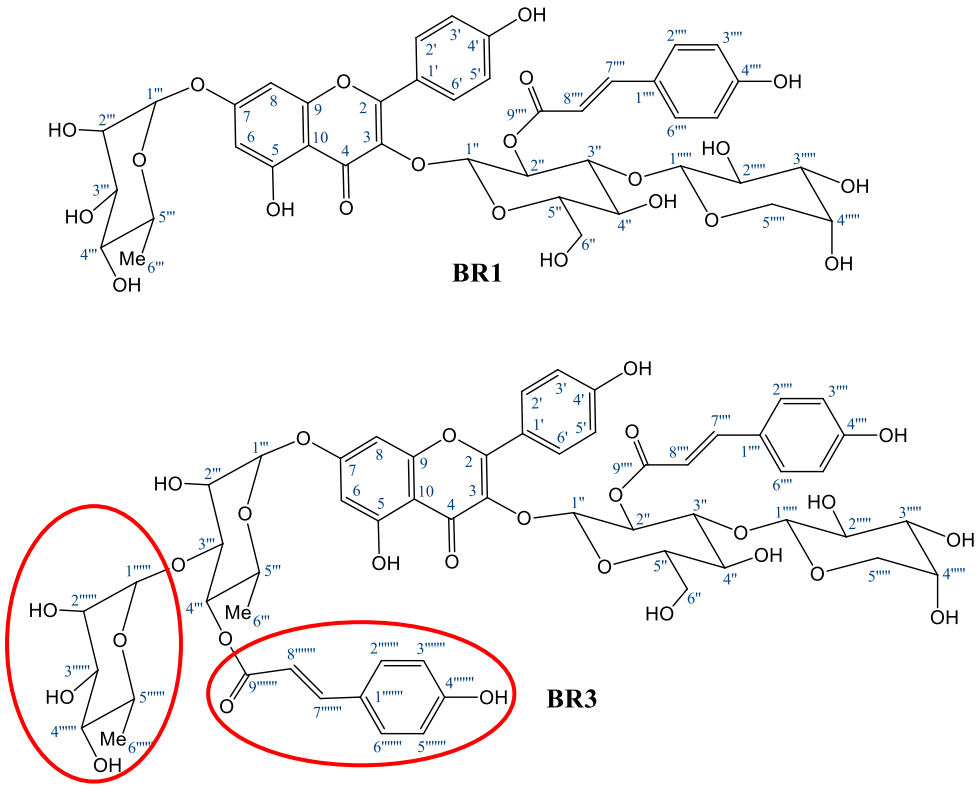
Aspergillus niger (MIC = 63 µg/ml) và *Candida albicans* (MIC = 250 µg/ml) và gây độc tế bào trên dòng KB (TD_{50} = 63,5 µg/ml) [88]. Tuy nhiên, đến nay chưa có báo cáo kết quả nghiên cứu nào về hoạt tác dụng viêm của **BA9** dựa trên sự ức chế tạo ra NO trên dòng tế bào RAW246.7. Các nghiên cứu về hoạt tính kháng viêm của chi *Barringtonia* chủ yếu thử nghiệm ở dạng cặn chiết.

Hợp chất là **BA9** thể hiện khả năng ức chế sinh NO ở tế bào RAW264.7 ở mức trung bình, trong khi **BA8** không thể hiện hoạt tính này. Phân tích cụ thể các phổ NMR cho thấy **BA9** khác **BA8** duy nhất ở phần đường. **BA9** có thêm 1 nhóm 6-*p*-hydroxybenzoyl tại δ_C 121,9 (C, C-2‴) so với **BA8**. Điều này thấy sự có mặt nhóm 6-*p*-hydroxybenzoyl trong hợp chất **BA9** và **BA8** có thể ảnh hưởng tới khả năng ức chế tạo ra NO trong tế bào RAW264.7.



Hình 4.3.1. Cấu trúc hóa học 2 hợp chất **BA8** và **BA9**

Hợp chất mới **BR3** có thể hiện tác dụng ức chế sinh NO ở tế bào RAW264.7 với IC_{50} = 52,48 ± 1,04 µM. Trong khi đó, hợp chất mới **BR1** không thể hiện hoạt tính này. So sánh cho thấy cấu trúc hóa học của **BR3** tương tự như của **BR1**, ngoài việc có thêm một đường *α*-L-rhamnopyranosyl và một nhánh (*E*)-*p*-coumaroyl. Điều này cho gợi ý sự hiện diện của đường *α*-L-rhamnopyranosyl và nhánh (*E*)-*p*-coumaroyl trong hợp chất **BR3** có thể gây tăng cường tác dụng ức chế tạo ra NO trong tế bào RAW264.7 của hợp chất này.



Hình 4.3.2. Cấu trúc hóa học 2 hợp chất **BR1** và **BR3**

Kết quả cho thấy **BA9** có tác dụng ức chế sinh NO trong tế bào RAW264.7 với IC_{50} là 20,00±1,68 (µM), có thể được chọn để nghiên cứu tiếp theo hướng đánh giá cơ chế tác động và tính an toàn trong liều sử dụng, để chứng minh được khả năng giảm đau tiêu viêm mà y học cổ truyền đã sử dụng.

4.3.2. Hoạt tính gây độc tế bào

Tất cả 18 hợp chất từ 2 loài *B. acutangula* và *B. racemosa* được thử nghiệm hoạt tính gây độc trên 2 dòng TBUT ở người là LNCaP và MCF-7. Kết quả thể hiện trong Bảng 4.3.2.

Bảng 4.3.2. Kết quả thử nghiệm gây độc TBUT của các chất có hoạt tính

Dòng tế bào	**Giá trị IC_{50} (µM) của hợp chất**			
	BA8	**BR6**	**BR7**	**Ellipticine***
LNCaP	41,76±4,86	29,98±2,40	58,58±5,08	1,91±0,08
MCF-7	54,11±5,67	37,11±2,07	84,99±7,37	1,99±0,12

*Chất đối chứng dương

BR6 thể hiện tác dụng gây độc mạnh nhất trên cả 2 dòng tế bào thử nghiệm, trong đó hoạt tính ức chế mạnh hơn với dòng tế bào LNCaP với IC_{50} là 29,98 µM và hoạt tính ức chế yếu hơn với dòng tế bào MCF-7 \ IC_{50} là 37,11 µM. **BR6** là hợp chất triterpen đã biết và đã báo cáo kết quả hoạt tính sinh học khá thú vị. Nghiên cứu trước đây cho thấy xử lý tế bào LLC-PK_1 bằng 23-hydroxytormentic acid (23-HTA) (**BR6**) đã ngăn chặn quá trình gây độc tế bào và apoptosis do cisplatin gây ra. Ngoài ra, xử lý 23-HTA đã cải thiện những thay đổi liên quan đến độc tính của cisplatin bằng cách tăng mức glutathione (GSH) và giảm mức độ malondialdehyde (MDA) và các loại oxy phản ứng (ROS). Hoạt động của các enzym chống oxy hóa bao gồm catalase (CAT) và superoxide dismutase (SOD) giảm đi trong các tế bào LL-PK_1 được việc xử lý 23-HTA; đồng thời, làm tăng hoạt động của các enzym này và mức protein và mRNA của CAT và mangan SOD (MnSOD). Hơn nữa, xử lý với 23-HTA làm giảm sự chuyển vị Nrf2 do cisplatin gây ra trong các tế bào LLC-PK_1 [99]. Bên cạnh đó, 23-HTA có tác dụng chống oxy hóa qua trung gian quét ROS (generate reactive oxygen species) và điều chỉnh biểu hiện gen liên quan đến chống oxy hóa. Hơn nữa, phân tích SA-β-gal và biểu hiện mRNA của metalloproteinase và procollagen loại I cho thấy rằng 23-HTA điều chỉnh sự biểu hiện gen của các protein ECM và sự già đi của tế bào trong điều kiện chiếu tia UVA [100]. Nghiên cứu mới đây vào năm 2021, kết quả cho thấy 23-HTA làm giảm khối lượng nhồi máu, hàm lượng nước trong não và sự thiếu hụt thần kinh ở chuột phụ thuộc vào liều lượng. 23-HTA cũng có thể làm giảm đáng kể số lượng tế bào dương tính với TUNEL, mức độ biểu hiện của Bax, caspase-3, peroxy hóa lipid, Sod 1, Sod 2, catalase, và các cytokine tiền viêm TNF và IL-1β và tăng biểu hiện mức Bcl-2 và p-Akt. 23-HTA có khả năng bảo vệ thần kinh do tác dụng chống apoptotic, chống oxy hóa và chống viêm [101]. Tuy nhiên, trong các tài liệu chưa công bố kết quả nào liên quan đến khả năng gây độc trên 2 dòng tế bào LNCaP và MCF-7.

BA8 thể hiện hoạt tính gây độc tế bào trung bình trên cả 2 dòng tế bào thử nghiệm, trong đó tác dụng ức chế mạnh hơn đối với dòng LNCaP với IC_{50} là 41,76 µg/mL và tác dụng ức chế yếu hơn đối với dòng MCF-7 vớ IC_{50} là 54,11 µg/mL. Điều thú vị có thể nhận thấy là hợp chất **BA8** gây độc trên 2 dòng TBUT còn hợp chất **BA9** thì không. Điều này ngược lại với kết quả hoạt tính ức chế sinh NO trong tế bào RAW264.7. Như vậy sự khác biệt của nhóm 6-*p*-hydroxybenzoyl trong hợp chất **BA9** và **BA8** ảnh hưởng tới hoạt tính sinh học của hai hợp chất này.

BR7 có khả năng gây độc yếu trên cả 2 dòng tế bào, trong đó tác dụng ức chế mạnh hơn với dòng tế bào LNCaP (IC_{50} là 58,58 µg/mL) và ức chế rất yếu với dòng tế bào MCF-7 (IC_{50} là 84,99 µg/mL). Hợp chất **BR7** là một hợp chất tritecpen đã biết.

Các kết quả hoạt tính gây độc trên 2 dòng TBUT thử nghiệm tương đồng với kết quả thử hoạt tính gây độc tế bào của các chất phân lập từ chi đặc biệt là các hợp chất triterpen.

Như vậy, hợp chất **BR6** có tác dụng gây độc tế bào tốt nhất trong số các hợp chất đã thu được trên hai dòng TBUT người thử nghiệm nên có thể được lựa chọn để tiến hành các nghiên cứu tiếp theo theo hướng đánh giá cơ chế tác động.

TÍNH MỚI CỦA LUẬN ÁN

1. Đã làm sạch và xác định được chính xác cấu trúc hóa học của 06 flavonoid glycoside bị acyl hóa mới là barringoside A-F (**BA1**-**BA6**) từ loài chiếc đỏ - *Barringtonia acutangula* và 03 hợp chất flavonoid glycoside bị acyl hóa mới là barringoside G-I (**BR1**-**BR3**) từ loài chiếc chùm - *B. racemosa*.

2. Lần đầu tiên phân lập được và công bố các chất thuộc nhóm flavonoid glycoside bị acyl hóa từ các loài thuộc chi *Barringtonia*.

3. Lần đầu tiên phát hiện ra hợp chất quercetin 3-*O*-*β*-D-(6-*p*-hydroxybenzoyl)galactopyranoside (**BA9**) có khả năng kháng viêm khá tốt thông qua ức chế sinh NO ở tế bào RAW264.7 được kích thích bằng LPS với giá trị IC_{50} là 20,00±1,68 µM.

KẾT LUẬN

1. Nghiên cứu về thành phần hóa học

Sử dụng kết hợp các phương pháp sắc ký và các phương pháp phổ đã phân lập và xác định được cấu trúc hóa học của 10 hợp chất từ loài *B. acutangula* và 8 hợp chất từ loài *B. racemosa.*

+ Từ loài *B. acutangula*: 10 hợp chất flavonoid glycoside trong đó có 6 hợp chất mới đặt tên là barringoside A-F (**BA1**-**BA6**) và 4 hợp chất đã biết là kaempferol 3-O-β-D-galactopyranoside (**BA7**), quercetin-3-O-β-D-galactopyranoside (**BA8**), quercetin 3-O-β-D-(6-p-hydroxybenzoyl)galacto-pyranoside (**BA9**) và quercetin 3-O-α-L-arabinopyranosyl-(1→2)-β-D-galacto-pyranoside (**BA10**).

+ Từ loài *B. racemosa*: 3 hợp chất flavonoid glycoside mới đặt tên là barringoside G-I (**BR1**-**BR3**) và 5 hợp chất đã biết là niga-ichigoside F1 (**BR4**), rosamultin (**BR5**), 23-hydroxytormentic acid (**BR6**), arjunic acid (**BR7**) và maslinic acid (**BR8**).

Các hợp chất flavonoid glycoside bị acyl hóa được phát hiện lần đầu tiên từ các loài thuộc chi *Barringtonia*.

2. Nghiên cứu về hoạt tính sinh học

Đã tiến hành đánh giá hoạt tính kháng viêm của tất cả các hợp chất phân lập được thông qua ức chế sản sinh NO ở tế bào RAW264.7 được kích thích bằng LPS. Kết quả cho thấy 2 hợp chất là quercetin 3-O-β-D-(6-p-hydroxybenzoyl) galactopyranoside (**BA9**) và barringoside I (**BR3**) thể hiện hoạt tính kháng viêm thông qua ức chế sự sản sinh NO ở tế bào RAW264.7 được kích thích bằng LPS với giá trị IC_{50} tương ứng là 20,00±1,68 và 52,48±1,04 μM.

Đã tiến hành đánh giá hoạt tính gây độc tế bào trên 2 dòng TBUT người là LNCaP và MCF-7 của các hợp chất đã phân lập được. Kết quả thu được cho thấy chỉ có các hợp chất chất quercetin-3-O-β-D-galactopyranoside (**BA8**), 23-hydroxytormentic acid (**BR6**) và arjunic acid (**BR7**) thể hiện hoạt tính với giá trị IC_{50} từ 29,98-84,99 μM trên hai dòng TBUT được thử nghiệm.

KIẾN NGHỊ

Hợp chất quercetin 3-O-β-D-(6-p-hydroxybenzoyl)galacto-pyranoside (**BA9**) thể hiện hoạt tính kháng viêm khá tốt thông qua ức chế sự sản sinh NO ở tế bào RAW264.7 được kích thích bằng LPS với giá trị IC_{50} là 20,00±1,68 μM nên cần tiếp tục tiến hành các nghiên cứu theo hướng xác định cơ chế tác dụng. Các hợp chất flavonoid glycoside bị acyl hóa đã phân lập được có cấu trúc hóa học độc đáo, do đó cần mở rộng nghiên cứu thêm các loại hoạt tính khác để định hướng cho các nghiên cứu ứng dụng.

DANH MỤC CÔNG TRÌNH ĐÃ ĐĂNG TẢI LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. *Flavonoid glycosides from Barringtonia acutangula*, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, **2017**, 27, 3776–3781.
2. *Acylated flavonoid glycosides from Barringtonia racemosa*, Natural Product Research, **2020**, 34(9), 1276–1281.
3. *Structural elucidation of four flavonoid glycosidesfrom Barringtonia acutangula*, Vietnam Journal of Chemistry, **2018**, 56(2), 187-190.
4. *Triterpenoid derivatives from Barringtonia racemosa*, Vietnam Journal of Chemistry, **2019**, 57(1), 96-100.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] T.J. Thomas, B. Panikkar, A. Subramoniam, M.K. Nair, K.R. Panikkar. *Antitumour property and toxicity of Barringtonia racemosa Roxb seed extract in mice*. J Ethnopharmacol, 2002, 82, 2-3, 223-227.

[2] S.K. Samanta, K. Bhattacharya, C. Mandal, B.C. Pal. *Identification and quantification of the active component quercetin 3-O-rutinoside from Barringtonia racemosa, targets mitochondrial apoptotic pathway in acute lymphoblastic leukemia*. J Asian Nat Prod Res, 2010, 12, 8, 639-648.

[3] C. Ragasa, D. Espineli, C.-C. Shen. *Cytotoxic Triterpene from Barringtonia asiatica*. Pharmaceutical Chemistry Journal, 2014, 48, 8, 529-533.

[4] P.M. Gowri, A.K. Tiwari, A.Z. Ali, J.M. Rao. *Inhibition of alpha-glucosidase and amylase by bartogenic acid isolated from Barringtonia racemosa Roxb. seeds*. Phytother Res, 2007, 21, 8, 796-799.

[5] M.R. Khan, A.D. Omoloso. *Antibacterial, antifungal activities of Barringtonia asiatica*. Fitoterapia, 2002, 73, 3, 255-260.

[6] M.M. Rahman, D. Polfreman, J. MacGeachan, A.I. Gray. *Antimicrobial activities of Barringtonia acutangula*. Phytother Res, 2005, 19, 6, 543-545.

[7] S. Sahoo, P.K. Panda, S.R. Mishra, R.K. Parida, P. Ellaiah, S.K. Dash. *Antibacterial Activity of Barringtonia acutangula against Selected Urinary Tract Pathogens*. Indian J Pharm Sci, 2008, 70, 5, 677-679.

[8] C.Y. Ragasa, D.L. Espineli, C.C. Shen. *A new triterpene from Barringtonia asiatica*. Nat Prod Res, 2012, 26, 20, 1869-1875.

[9] C.Y. Ragasa, D.L. Espineli, C.C. Shen. *New triterpenes from Barringtonia asiatica*. Chem Pharm Bull, 2011, 59, 6, 778-782.

[10] V.D. Nguyen, T.L. Nguyen, H.T. Tran, T.A. Ha, V.H. Bui, H.N. Nguyen, T.D. Nguyen. *Flavan-3-ols from the barks of Barringtonia acutangula*. Biochemical Systematics and Ecology, 2014, 55, 0, 219-221.

[11] Đỗ Huy Bích và cs. *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam*, NXB Khoa học và Kỹ thuật, 2004, Hà Nội.

[12] Trần Thị Phương Anh, Nguyễn Tiến Bân, Lê Kim Biên, và cs. *Danh lục Các loài Thực vật Việt Nam*, Nhà xuất bản Nông nghiệp, 2003, Hà Nội.

[13] Phạm Hoàng Hộ. *Cây cỏ Việt Nam*, Nhà xuất bản Trẻ, 2003, Thành phố Hồ Chí Minh.

[14] H.C. Ong, Nordiana, M. *Malay ethno-medico botany in Machang, Kelantan, Malaysia*. Fitoterapia, 1999, 70, 502–513.

[15] H.C. Ong. *Tumbuhan liar: khasiat ubatan & kegunaan lain*, Utusan Publications, 2004.

[16] C. Orwa, A. Mutua, R. Kindt, R. Jamnadass, A. Simons. *Agroforestree Database: a tree reference and selection guide version 4.0*. Agroforestree Database: a tree reference and selection guide version 4.0, 2009.

[17] Nguyễn Phạm Tuấn, Nguyễn Thị Ái Lan. *Khả năng kháng oxy hóa, ức chế enzyme α-amylase và α-glucosidase của cao chiết từ lá cây lộc vừng (Barringtonia acutangula)*. Tạp Chí Khoa học Và công nghệ nông nghiệp Trường Đại học Nông Lâm Huế, 2022, 6, 2, 2983–2993.

[18] L. Weil. *Contributions for the knowledge of the Saponin substances and their expansion*. Archiv der Pharmazie, 1901, 239, 363-373.

[19] W.P.H. van den Driessen-Mareeuw. *The seeds of Barringtonia speciosa Gaertn.* Pharmaceutisch Weekblad, 1903, 40, 729-735.

[20] T. Nozoe, N.K. Zasshi. *Saponins from the seeds of Barringtonia recemosa, Blume.on Neutral Sapogenin*. Journal of the Chemical Society Japan, 1934, 55, 746.

[21] B.C. Pal, T. Chaudhuri, K. Yoshikawa, S. Arihara. *Saponins from Barringtonia acutangula*. Phytochemistry, 1994, 35, 5, 1315-1318.

[22] A.J. Herlt, L.N. Mander, E. Pongoh, R.J. Rumampuk, P. Tarigan. *Two major saponins from seeds of Barringtonia asiatica: putative antifeedants toward Epilachna sp. larvae*. J Nat Prod, 2002, 65, 2, 115-120.

[23] C. Mills, A.R. Carroll, R.J. Quinn. *Acutangulosides A-F, monodesmosidic saponins from the bark of Barringtonia acutangula*. J Nat Prod, 2005, 68, 3, 311-318.

[24] H.Y. Sun, L.J. Long, J. Wu. *Chemical constituents of mangrove plant Barringtonia racemosa*. Zhong Yao Cai, 2006, 29, 7, 671-672.

[25] N. Hussin, R. Muse, S.A. Ahmad, J. Ramli, M. Mahmood, M. Sulaiman, Y. Shukor, M. Rahman, K. Aziz. *Antifungal activity of extracts and phenolic*

compounds from Barringtonia racemosa L. (Lecythidaceae). African Journal of Biotechnology, 2009, 8.

[26] K.W. Kong, S. Mat-Junit, A. Ismail, N. Aminudin, A. Abdul-Aziz. *Polyphenols in Barringtonia racemosa and their protection against oxidation of LDL, serum and haemoglobin*. Food Chemistry, 2014, 146, 85-93.

[27] T. Iwashina, G. Kokubugata. *Flavonoid properties in the leaves of Barringtonia asiatica (Lecythidaceae)*. Bulletin of the National Museum of Nature and Science, 2016, 42, 1, 41-47.

[28] J.K. Lahiri, S. Ghosh. *Chemical examination of the seeds of barringtonia acutangula gaertn*. Journal of The American Pharmaceutical Association, 1942, 31, 7, 193-194.

[29] Y.-T. Lin, T.-B. Lo, S.-C. Su. *Triterpenoids. II Isolation of Triterpenoid Sapogenins from the Fruits of Barringtonia Racemosa Blume*. Journal of the Chinese Chemical Society, 1957, 4, 1-2, 77-81.

[30] H. Itokawa, N. Sawada, T. Murakami. *The structures of camelliagenin A, B, and C obtained from camellia japonica L*. Tetrahedron Letters, 1967, 8, 7, 597-601.

[31] S. Itô, M. Kodama, M. Konoike. *Structure of camelliagenins*. Tetrahedron Letters, 1967, 8, 7, 591-596.

[32] A.K. Barua, P.C. Maiti, Chakraborti, S. K. *Triterpenoids XI. New Triterpenoid Sapogenins from the Fruits of Barringtonia acutangula*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 1961, 50, 11, 937-940.

[33] S.K. Chakraborti, A.K. Barua. *Triterpenoids. XVI. Constitution of barringtogenol D, a new triterpenoid sapogenin from Barringtonia acutangula*. Tetrahedron, 1963, 19, 11, 1727-1732.

[34] A.K. Barua, P. Chakrabarti. *Triterpenoids—XIX: The constitution of barringtogenol C—A new triterpenoid sapogenin from barringtonia acutangula gaertn*. Tetrahedron, 1965, 21, 3, 381-387.

[35] A.K. Barua, S.P. Dutta, B.C. Das. *Triterpenoids—XXIX: The structure of barringtogenol B—A new triterpenoid sapogenin from Barringtonia acutangula Gaertn*. Tetrahedron, 1968, 24, 3, 1113-1117.

[36] Lowry. *Anthocyanins of the Melastomataceae, Myrtaceae and some allied families*. Phytochemistry, 1976, 15, 513-516.

[37] Y. Yang, Z. Deng, P. Proksch, W. Lin. *Two new 18-en-oleane derivatives from marine mangrove plant, Barringtonia racemosa*. Pharmazie, 2006, 61, 4, 365-366.

[38] P.M. Gowri, S.V. Radhakrishnan, S.J. Basha, A.V. Sarma, J.M. Rao. *Oleanane-type isomeric triterpenoids from Barringtonia racemosa*. J Nat Prod, 2009, 72, 4, 791-795.

[39] M.G. Ponnapalli, S. Sukki, S.C.H.V.A.R. Annam, M. Ankireddy, H. Tirunagari, V.R. Tuniki, V.V.P. Bobbili. *α-Glucosidase inhibitory monoacylated polyhydroxytriterpenoids from the fruits of Barringtonia racemosa*. Tetrahedron Lett., 2015, 56, 12, 1570-1574.

[40] Enamul Haque Md., Zimam Mahmud, Mahbub Hasan A.K.M., M. Roman Sardar, Luful Kabir, Sheikh Tanzina Haque. *Betulin-3-caffeate and amyrin from the stem bark of Barringtonia acutagula (L)*. Bioresearch Communications, 2015, 1, 121-123.

[41] A. Jutiviboonsuk, H.-J. Zhang, T.P. Kondratyuk, A. Herunsalee, W. Chaukul, J.M. Pezzuto, H.H.S. Fong, N. Bunyapraphatsara. *Isolation and Characterization of Cancer Chemopreventive Compounds from Barringtonia maunwongyathiae*. Pharmaceutical Biology, 2007, 45, 3, 185-194.

[42] S.C.V.A.R. Annam, A. Madhu, P. Mangala Gowri, T.V. Raju, B.V.V. Pardhasaradhi. *Regioisomeric acylated polyhydroxy triterpenoids from the stems of Barringtonia racemosa*. Phytochemistry Letters, 2015, 13, 370-374.

[43] C.M. Hasan, S. Khan, A. Jabbar, M.A. Rashid. *Nasimaluns A and B: neo-clerodane diterpenoids from Barringtonia racemosa*. J Nat Prod, 2000, 63, 3, 410-411.

[44] M.G. Ponnapalli, N. Dangeti, M.B. Sura, H. Kothapalli, V.S.S. Akella, J.B. Shaik. *Self gelating isoracemosol A, new racemosaceramide A, and racemosol E from Barringtonia racemosa*. Natural Product Research, 2017, 31, 1, 63-69.

[45] S. Yoshikawa, L.G. Chen, M. Yoshimura, Y. Amakura, T. Hatano, S. Taniguchi. *Barricyclin D1-a dimeric ellagitannin with a macrocyclic structure-*

and accompanying tannins from Barringtonia racemosa. Biosci Biotechnol Biochem, 2021, 85, 7, 1609-1620.

[46] H. Xia, X.L. Zhang, G.H. Wang, Y.C. Tong, L. He, H.F. Wang, Y.H. Pei, Y.J. Chen, Y. Sun. *Chemical constituents from Barringtonia racemosa*. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi, 2016, 41, 13, 2460-2465.

[47] A.K. Barua, P.C. Maiti, S.K. Chakraborti. *Triterpenoids. XI. New triterpenoid sapogenins from the fruits of Barringtonia acutangula*. J Pharm Sci, 1961, 50, 937-940.

[48] A.K. Barua, P. Chakrabarti, A.S.D. Gupta, S.K. Pal, A. Basak, S.K. Banerjee, K. Basu. *The structure and stereochemistry of barrigenic acid, a new triterpene acid sapogenin from Barringtonia acutangula*. Phytochemistry, 1976, 15, 11, 1780-1781.

[49] A. Murakami, A.M. Ali, K. Mat-Salleh, K. Koshimizu, H. Ohigashi. *Screening for the In Vitro Anti-tumor-promoting Activities of Edible Plants from Malaysia*. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2000, 64, 1, 9-16.

[50] D. Sharma, A. Pramanik, P.K. Agrawal. *Evaluation of bioactive secondary metabolites from endophytic fungus Pestalotiopsis neglecta BAB-5510 isolated from leaves of Cupressus torulosa D.Don*. 3 Biotech, 2016, 6, 2, 210.

[51] Md. Omar Faruk, Roman Sardar, Sheikh Tanzina Haque, Md. Enamul Haque. *Antimicrobial, cytotoxic and antioxidant activities of Barringtonia acutangula (L)*. Bioresearch Communications, 2016, 2, 1, 205-209.

[52] N. Amran, A.N.A. Rani, R. Mahmud, K.B. Yin. *Antioxidant and Cytotoxic Effect of Barringtonia racemosa and Hibiscus sabdariffa Fruit Extracts in MCF-7 Human Breast Cancer Cell Line*. Pharmacognosy Res, 2016, 8, 1, 66-70.

[53] F.M.F. Roleira, E.J. Tavares-da-Silva, C.L. Varela, S.C. Costa, T. Silva, J. Garrido, F. Borges. *Plant derived and dietary phenolic antioxidants: Anticancer properties*. Food Chemistry, 2015, 183, 235-258.

[54] K.W. Kong, A. Abdul Aziz, N. Razali, N. Aminuddin, S. Mat Junit. *Antioxidant-rich leaf extract of Barringtonia racemosa significantly alters the in vitro expression of genes encoding enzymes that are involved in methylglyoxal degradation III*. PeerJ, 2016, 4, e2379.

[55] A. Petronelli, G. Pannitteri, U. Testa. *Triterpenoids as new promising anticancer drugs*. Anticancer Drugs, 2009, 20, 10, 880-892.

[56] A. Norliyana, R. Anis Najwa Abdul, M. Roziahanim, Y. Khoo Boon. *Antioxidant and cytotoxic effect of Barringtonia racemosa and Hibiscus sabdariffa fruit extracts in MCF-7 human breast cancer cell line*. Pharmacognosy Research, 2016, 8, 1.

[57] V.K. Dubey, A. Budhauliya, M. Jaggi, A.T. Singh, S.K. Rajput. *Tumor-suppressing effect of bartogenic acid in ovarian (SKOV-3) xenograft mouse model*. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, 2021, 394, 8, 1815-1826.

[58] M.-H. Yu, J.-H. Choi, I.-G. Chae, H.-G. Im, S.-A. Yang, K. More, I.-S. Lee, J. Lee. *Suppression of LPS-induced inflammatory activities by Rosmarinus officinalis L*. Food Chemistry, 2013, 136, 2, 1047-1054.

[59] K.W. Kong, S. Mat-Junit, A.A. Abdul, N. Aminudin, F.A. Hassan, A. Ismail. *Protective effects of the extracts of Barringtonia racemosa shoots against oxidative damage in HepG2 cells*. PeerJ, 2016, 4, e1628.

[60] B. ana, M.A. Abdul, M. Radzali, B.M. Noorjahan. *Anti-oxidant and anti-inflammatory activities of leaves of Barringtonia racemosa*. Journal of Medicinal Plants Research, 2007, 1, 5, 095-102.

[61] S.C. Mohan, M. Chaudhari, N. Jain, T. Anand. *In-vitro anti-inflammatory and anti-arthritic activity ofBarringtonia acutangula leaves.* Journal of Advanced Scientific Research, 2020, 11, Suppl.5, 145-148.

[62] M. Jo, J. Lee, H.G. Kim, J.K. Kim, H. Kim, K.K. Shin, T.T. Bach, S.M. Eum, J.S. Lee, E.S. Choung, Y. Yang, K.H. Kim, G.H. Sung, B.C. Yoo, J.Y. Cho. *Anti-inflammatory effect of Barringtonia angusta methanol extract is mediated by targeting of Src in the NF-κB signalling pathway*. Pharm Biol, 2021, 59, 1, 799-810.

[63] S.H. Ryu, M.J. Kim, T.T. Bach, S.K. Jung. *Anti-inflammatory and antioxidant effects of Barringtonia augusta Kurz extract*. Korean Journal of Food Science and Technology, 2021, 53, 2, 154–159.

[64] S.A. Deraniyagala, W.D. Ratnasooriya, C.L. Goonasekara. *Antinociceptive effect and toxicological study of the aqueous bark extract of Barringtonia racemosa on rats*. J Ethnopharmacol, 2003, 86, 1, 21-26.

[65] M. Zafar Imam, S. Sultana, S. Akter. *Antinociceptive, antidiarrheal, and neuropharmacological activities of Barringtonia acutangula*. Pharm Biol, 2012, 50, 9, 1078-1084.

[66] S. Khan, A. Jabbar, C.M. Hasan, M.A. Rashid. *Antibacterial activity of Barringtonia racemosa*. Fitoterapia, 2001, 72, 2, 162-164.

[67] Zaman K.A., K.A. A. *Free radical scavenging activity of some Bangladeshi medicinal plants*. PhamacologyOnline, 2015, 3, 29-32.

[68] N.A. Sultana, F.I. Aovi, M.S. Rahman. *Bioactivity assessment of a widely distributed mangrove plant: Barringtonia acutangula*. Pharmacology Online, 2019, 3, 301-308.

[69] N. Syuhada Che Omar, F. Izzany Abu Bakar, M. Fadzelly Abu Bakar, L. Sin Yee, M. Abdul Mutalib. *Antigout potential of selected Malaysian traditional vegetables/ulam*. Asian Journal of Chemistry, 2021, 33, 11, 2813-2816.

[70] Âu Dương Tuyết Mai, Nguyễn Thị Thanh Giang, Nguyễn Minh Nhựt, Nguyễn Phạm Tuấn, Nguyễn Phạm Tú, Nguyễn Đăng Quân. *Ảnh hưởng của cao chiết cây lộc vừng (Barringtonia acutangula) đến nồng độ glucose máu trên chuột nhắt trắng đái tháo đường* Hội nghị công nghệ sinh học toàn quốc 12/2020, 2020.

[71] K. Leelavathi, A. Chitra. *Antidiabetic activity of ethanolic leaf extract of Barringtonia acutangula*. International Journal of Research in Pharmacology & Pharmacotherapeutics, 2019, 8, 4, 453-465.

[72] V.S. Patil, N.A. Khatib. *Triterpene saponins from Barringtonia acutangula (L.) Gaertn as a potent inhibitor of 11β-HSD1 for type 2 diabetes mellitus, obesity, and metabolic syndrome*. Clinical Phytoscience, 2020, 6, 1, 61.

[73] N.A. Sitohang, E.D.L. Putra, H. Kamil, M. Musman. *Acceleration of wound healing by topical application of gel formulation of Barringtonia racemosa (L.) Spreng kernel extract*. F1000Res, 2022, 11, 191.

[74] V.M. Dirsch, H. Stuppner, A.M. Vollmar. *The Griess assay: suitable for a bio-guided fractionation of anti-inflammatory plant extracts?* Planta Med, 1998, 64, 5, 423-426.

[75] A. Monks, D. Scudiero, P. Skehan, R. Shoemaker, K. Paull, D. Vistica, C. Hose, J. Langley, P. Cronise, A. Vaigro-Wolff, M. Gray-Goodrich, H. Campbell, J. Mayo, M. Boyd. *Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines*. Journal of the National Cancer Institute, 1991, 83, 11, 757-766.

[76] M.M. Manir, J.K. Kim, B.G. Lee, S.S. Moon. *Tea catechins and flavonoids from the leaves of Camellia sinensis inhibit yeast alcohol dehydrogenase*. Bioorg Med Chem, 2012, 20, 7, 2376-2381.

[77] M. Veit, G.F. Pauli. *Major flavonoids from Arabidopsis thaliana leaves*. J Nat Prod, 1999, 62, 9, 1301-1303.

[78] K.H. Shaker, K. Dockendorff, M. Bernhardt, K. Seifert. *A new triterpenoid saponin from Ononis spinosa and two new flavonoid glycosides from Ononis vaginalis*. Z. Naturforsch. B, 2004, 59, 1, 124-128.

[79] K.W. Woo, E. Moon, S.Y. Park, S.Y. Kim, K.R. Lee. *Flavonoid glycosides from the leaves of Allium victorialis var. platyphyllum and their anti-neuroinflammatory effects*. Bioorg Med Chem Lett, 2012, 22, 24, 7465-7470.

[80] J.M. McRae, Q. Yang, R.J. Crawford, E.A. Palombo. *Acylated flavonoid tetraglycoside from Planchonia careya leaves*. Phytochem Lett, 2008, 1, 2, 99-102.

[81] H.J. Kim, E.J. Kim, S.H. Seo, C.G. Shin, C. Jin, Y.S. Lee. *Vanillic acid glycoside and quinic acid derivatives from Gardeniae Fructus*. J Nat Prod, 2006, 69, 4, 600-603.

[82] J. Hu, J. Zhao, S.I. Khan, Q. Liu, Y. Liu, Z. Ali, X.C. Li, S.H. Zhang, X. Cai, H.Y. Huang, W. Wang, I.A. Khan. *Antioxidant neolignan and phenolic glucosides from the fruit of Euterpe oleracea*. Fitoterapia, 2014, 99, 178-183.

[83] N.T. Dat, N.H. Dang, L.N. Thanh. *New flavonoid and pentacyclic triterpene from Sesamum indicum leaves*. Nat Prod Res, 2016, 30, 3, 311-315.

[84] K.C. Wong, D.M. Hag Ali, P.L. Boey. *Chemical constituents and antibacterial activity of Melastoma malabathricum L*. Nat Prod Res, 2012, 26, 7, 609-618.

[85] Y.V. Roshchin. *Trifolin from Euphorbia condylocarpa*. Chemistry of Natural Compounds, 1977, 13, 4, 481-482.

[86] H.-H. Lee, J.-Y. Cho, J.-H. Moon, K.-H. Park. *Isolation and identification of antioxidative phenolic acids and flavonoid glycosides from Camellia japonica flowers*. Horticulture, Environment, and Biotechnology, 2011, 52, 3, 270-277.

[87] E.D. Rodrigues, D.B. da Silva, D.C. de Oliveira, G.V. da Silva. *DOSY NMR applied to analysis of flavonoid glycosides from Bidens sulphurea*. Magn Reson Chem, 2009, 47, 12, 1095-1100.

[88] C. Jin, W. Strembiski, Y. Kulchytska, R.G. Micetich, M. Daneshtalab. *Flavonoid glycosides from Ledum palustre L. subsp. decumbens (Ait.) Hulton*. DARU Journal of Pharmaceutical Sciences, 1999, 7, 4, 5-8.

[89] A.J. Chulia, B. Bennini, M. Kaouadji, D.P. Allais, C. Delage. *Two flavonol conjugates from Erica cinerea*. Journal of Natural Products, 1995, 58, 4, 560-563.

[90] A. Braca, J.M. Prieto, N. De Tommasi, F. Tome, I. Morelli. *Furostanol saponins and quercetin glycosides from the leaves of Helleborus viridis L*. Phytochemistry, 2004, 65, 21, 2921-2928.

[91] G. Corea, E. Fattorusso, V. Lanzotti. *Saponins and flavonoids of Allium triquetrum*. Journal of Natural Products, 2003, 66, 11, 1405-1411.

[92] M. Mizuno, Y. Kyotani, M. Iinuma, T. Tanaka, H. Kojima, K. Iwatsuki. *Kaempferol glycosides in Asplenium scolopendvium Newm.* Z. Naturforsch., 1990, 45c, 143-146.

[93] T. Seto, T. Tanaka, O. Tanaka, N. Naruhashi. *β-Glucosyl esters of 19α-hydroxyursolic acid derivatives in leaves of Rubus species*. Phytochemistry, 1984, 23, 12, 2829-2834.

[94] B.K. Ponou, R.B. Teponno, M. Ricciutelli, T.B. Nguelefack, L. Quassinti, M. Bramucci, G. Lupidi, L. Barboni, L.A. Tapondjou. *Novel 3-oxo- and 3,24-dinor-2,4-secooleanane-type triterpenes from Terminalia ivorensis A. Chev*. Chem Biodivers, 2011, 8, 7, 1301-1309.

[95] Z.-J. Jia, X.-Q. Liu, Z.-M. Liu. *Triterpenoids from Sanguisorba alpina*. Phytochemistry, 1992, 32, 1, 155-159.

[96] X.-H. Li, D.-D. Shen, N. Li, S.-S. Yu. *Bioactive triterpenoids from Symplocos chinensis*. Journal of Asian Natural Products Research, 2003, 5, 1, 49-56.

[97] K.W. Woo, J.Y. Han, S.U. Choi, K.H. Kim, K.R. Lee. *Triterpenes from Perilla frutescens var. acuta and their cytotoxic activity*. Natural Product Sciences, 2014, 20, 2, 71-75.

[98] A. Ikuta, K. Kamiya, T. Satake, Y. Saiki. *Triterpenoids from callus tissue cultures of Paeonia species*. Phytochemistry, 1995, 38, 5, 1203-1207.

[99] Y.-H. Kim, J.-H. Choi, H.-K. Rim, H.-J. Kang, S.-G. Chang, J.-H. Park, H.-J. Park, J.-W. Choi, S.-D. Kim, K.-T. Lee. *23-Hydroxytormentic Acid and Niga-Ichgoside F1 Isolated from Rubus coreanus Attenuate Cisplatin-Induced Cytotoxicity by Reducing Oxidative Stress in Renal Epithelial LLC-PK1 Cells*. Biological & pharmaceutical bulletin, 2011, 34, 906-911.

[100] H.J. Youn, K.B. Kim, H.S. Han, I.S. An, K.J. Ahn. *23-Hydroxytormentic acid protects human dermal fibroblasts by attenuating UVA-induced oxidative stress*. Photodermatol Photoimmunol Photomed, 2017, 33, 2, 92-100.

[101] Y. Wang, F. Liu, P. Liu. *23-Hydroxytormentic acid reduces cerebral ischemia/reperfusion damage in rats through anti-apoptotic, antioxidant, and anti-inflammatory mechanisms*. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, 2021, 394, 5, 1045-1054.