

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



TRẦN THỊ HOÀI VÂN

**NGHIÊN CỨU HÓA HỌC VÀ HOẠT TÍNH SINH HỌC
CỦA MỘT SỐ LOÀI THỰC VẬT VIỆT NAM THEO
ĐỊNH HƯỚNG KHÁNG CHỨNG
VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS VÀ GÂY ĐỘC TẾ BÀO**

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

TRẦN THỊ HOÀI VÂN

**NGHIÊN CỨU HÓA HỌC VÀ HOẠT TÍNH SINH HỌC
CỦA MỘT SỐ LOÀI THỰC VẬT VIỆT NAM THEO
ĐỊNH HƯỚNG KHÁNG CHỨNG
VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS VÀ GÂY ĐỘC TẾ BÀO**

Chuyên ngành: Hóa học các hợp chất thiên nhiên

Mã số: 9 44 01 17

LUẬN ÁN TIẾN SĨ HÓA HỌC

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:

1. PGS.TS. Phạm Thị Hồng Minh
2. GS.TS. Phạm Quốc Long

HÀ NỘI – 2023

LỜI CẢM ƠN

Luận án này được hoàn thành tại Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, có sự hỗ trợ kinh phí của Đề tài cấp Nhà nước - mã số 04HĐ/KHCN-VP - Bộ Nông nghiệp và phát triển nông thôn thuộc *Chương trình trọng điểm phát triển và ứng dụng công nghệ Sinh học trong lĩnh vực nông nghiệp và phát triển nông thôn đến năm 2020*. Trong quá trình nghiên cứu, tác giả đã nhận được sự giúp đỡ quý báu của các Thầy cô, những nhà khoa học trong và ngoài nước cũng như các đồng nghiệp, bạn bè và gia đình.

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc, cảm phục và kính trọng nhất tới PGS.TS. Phạm Thị Hồng Minh và GS.TS. Phạm Quốc Long, những người Thầy đã hướng dẫn tận tình, chu đáo và tạo mọi điều kiện thuận lợi giúp đỡ tôi trong thời gian thực hiện Luận án.

Tôi xin chân thành cảm ơn Ban lãnh đạo Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên, Học viện Khoa học và Công nghệ và cán bộ các phòng ban đã tạo mọi điều kiện thuận lợi để tôi hoàn thành các thủ tục trong quá trình thực hiện và bảo vệ Luận án.

Tôi xin trân trọng cảm ơn các cán bộ Trung tâm Phát triển công nghệ sạch và Vật liệu, Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên đã nhiệt tình giúp đỡ và tạo mọi điều kiện cho tôi trong quá trình làm thực nghiệm và hoàn thành Luận án.

Tôi xin trân trọng cảm ơn Ban Giám đốc Học viện Y Dược học cổ truyền Việt Nam, Khoa Khoa học Cơ bản, Bộ môn Hóa đã tạo điều kiện, chia sẻ và động viên trong suốt thời gian tôi thực hiện Luận án.

Cuối cùng, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn chân thành và sâu sắc nhất tới gia đình, bạn bè và người thân đã luôn quan tâm, động viên, khích lệ tôi trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu.

Tôi xin trân trọng cảm ơn!

Hà Nội, ngày tháng năm 2023
Tác giả luận án

Trần Thị Hoài Vân

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan Luận án này là công trình nghiên cứu của riêng tôi dưới sự hướng dẫn khoa học của PGS.TS. Phạm Thị Hồng Minh và GS.TS. Phạm Quốc Long. Các số liệu, kết quả trong Luận án là trung thực và chưa được công bố trong bất kỳ công trình nào khác.

Hà Nội, ngày tháng năm 2023

Tác giả luận án

Trần Thị Hoài Vân

MỤC LỤC

TRANG PHỤ BÌA	
LỜI CẢM ƠN	
LỜI CAM ĐOAN	
MỤC LỤC	
DANH MỤC KÝ HIỆU, CHỮ VIẾT TẮT	
DANH MỤC CÁC SƠ ĐỒ	
DANH MỤC HÌNH VẼ	
DANH MỤC BẢNG	
MỞ ĐẦU	1
Chương 1. TỔNG QUAN	3
1.1. Giới thiệu về 7 loài thực vật nghiên cứu	3
1.1.1. Loài <i>Aralia armata</i>	3
1.1.2. Loài <i>Cronton tonkinensis</i>	3
1.1.3. Loài <i>Polygonum chinense</i>	4
1.1.4. Loài <i>Pouzolzia zeylanica</i>	6
1.1.5. Loài <i>Ricinus communis</i>	7
1.1.6. Loài <i>Solanum xanthocarpum</i>	9
1.1.7. Loài <i>Urena lobata</i>	10
1.2. Tình hình nghiên cứu về hoạt tính kháng vi sinh vật và gây độc tế bào ung thư	12
1.2.1. Tình hình nghiên cứu về hoạt tính kháng vi sinh vật	12
1.2.2. Tình hình nghiên cứu về hoạt tính gây độc tế bào ung thư	17
1.3. Các nghiên cứu thuốc thực vật chống chủng <i>Vibrio</i> gây bệnh trong nuôi trồng thủy sản	21
1.3.1. Bệnh hoại tử gan tụy cấp (AHPND)	21
1.3.2. Các nghiên cứu thuốc thực vật chống <i>Vibrio</i> gây bệnh trong NTTS	22
1.4. Sàng lọc ảo dự đoán hoạt chất định hướng hoạt tính kháng khuẩn, gây độc tế bào	27
Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	29
2.1. Nguyên liệu và phương pháp phân lập xác định cấu trúc hóa học	30
2.1.1. Mẫu thực vật	30
2.1.2. Phương pháp xử lý và chiết mẫu	32
2.1.3. Phương pháp phân tích, phân lập các hợp chất từ mẫu cây	32
2.1.4. Phương pháp xác định cấu trúc hóa học	32
2.2. Phương pháp thử nghiệm hoạt tính kháng vi khuẩn <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	33
2.2.1. Vật liệu	33
2.2.2. Phương pháp thử nghiệm hoạt tính kháng khuẩn <i>in vitro</i>	33
2.2.3. Phương pháp thử nghiệm hoạt tính kháng khuẩn <i>in vivo</i>	34
2.2.4. Thử nghiệm hoạt tính gây độc tế bào	35
2.3. Phương pháp mô phỏng lắp ghép phân tử	35
2.3.1. Docking phân tử trên đích tác dụng PDH	35
2.3.2. Docking phân tử trên đích tác dụng con đường tín hiệu PI3K	36

Chương 3. THỰC NGHIỆM	38
3.1. Thân lá Đơn châu chấu (<i>Aralia armata</i>)	38
3.1.1. Thu nhận các cao chiết từ thân lá Đơn châu chấu.....	38
3.1.2. Phân lập và tinh chế các hợp chất từ thân lá Đơn châu chấu	38
3.2. Cành lá Khổ sâm (<i>Croton tonkinensis</i>)	40
3.2.1. Thu nhận các cao chiết từ cành lá Khổ sâm.....	40
3.2.2. Phân lập và tinh chế các hợp chất từ cành lá Khổ sâm	40
3.3. Cành lá Thồm lồm (<i>Polygonum chinense</i>).....	43
3.3.1. Thu nhận các cao chiết từ cành lá Thồm lồm	43
3.3.2. Phân lập và tinh chế các hợp chất từ cành lá Thồm lồm.....	43
3.4. Thân lá Bọ mắm (<i>Pouzolzia zeylanica</i>)	44
3.4.1. Thu nhận các cao chiết từ thân lá Bọ mắm	44
3.4.2. Phân lập và tinh chế các hợp chất từ thân lá Bọ mắm.....	45
3.5. Lá Thầu dầu (<i>Ricinus communis</i>).....	47
3.5.1. Thu nhận các cao chiết từ lá Thầu dầu.....	47
3.5.2. Phân lập và tinh chế các hợp chất từ lá Thầu dầu	47
3.6. Quả Cà trái vàng (<i>Solanum xanthocarpum</i>).....	49
3.6.1. Thu nhận các cao chiết từ quả Cà trái vàng	49
3.6.2. Phân lập và tinh chế các hợp chất từ quả Cà trái vàng.....	50
3.7. Thân Ké hoa đào (<i>Urena lobata</i>)	51
3.7.1. Thu nhận các dịch chiết từ thân Ké hoa đào	51
3.7.2. Phân lập và tinh chế các hợp chất từ thân Ké hoa đào.....	52
3.8. Mô phỏng docking phân tử	54
3.9. Hoạt tính kháng khuẩn, gây độc tế bào của các Cao chiết và các chất sạch.....	54
Chương 4. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	56
A. HOẠT TÍNH KHÁNG KHUẨN <i>VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS</i>	56
4.1. Kết quả tác dụng kháng <i>V. parahaemolyticus</i> các cao chiết <i>in vitro</i>	56
4.2. Thành phần hóa học chính các thực vật có hoạt tính	59
4.2.1. Các hợp chất phân lập từ thân lá Đơn châu chấu (<i>Aralia armata</i>)	59
4.2.2. Các hợp chất phân lập từ lá Khổ sâm (<i>Croton tonkinensis</i>).....	62
4.2.3. Các hợp chất phân lập từ cành lá Thồm lồm (<i>Polygonum chinens</i>).....	64
4.2.4. Các hợp chất phân lập từ thân lá Bọ mắm (<i>Pouzolzia zeylanica</i>).....	67
4.2.5. Các hợp chất phân lập từ lá Thầu dầu (<i>Ricinus communis</i>)	70
4.2.6. Các hợp chất phân lập từ quả Cà trái vàng (<i>Solanum xanthocarpum</i>).....	74
4.2.7. Các hợp chất phân lập từ thân Ké hoa đào (<i>Urena lobata</i>).....	76
4.3. Kết quả tác dụng kháng <i>V. parahaemolyticus</i> của các chất sạch.....	85
4.4. Mô phỏng docking phân tử tìm hiểu cơ chế tác động của một số hoạt chất đến sự chuyển hóa proline của vi khuẩn <i>V. parahaemolyticus</i>	86
4.5. Kết quả tác dụng kháng <i>V. parahaemolyticus</i> các dịch chiết <i>in vivo</i>	89
4.5.1. Cao chiết Thồm lồm và Thầu dầu được bổ sung vào môi trường nước.....	90
4.5.2. Cao chiết Khổ sâm, Đơn châu chấu, Bọ mắm, và Ké hoa đào được bổ sung vào môi trường nước	90

4.5.3. Tác dụng kháng khuẩn <i>V. parahaemolyticus</i> trộn thức ăn nuôi tôm	92
4.5.3.1. Cao chiết Thồm lồm (PC.M) trộn thức ăn nuôi tôm	93
4.5.3.2. Cao chiết Khổ sâm (CT.M) trộn thức ăn nuôi tôm	93
B. DOCKING PHÂN TỬ VÀ HOẠT TÍNH GÂY ĐỘC TẾ BÀO <i>IN VITRO</i>	95
4.6. Nghiên cứu docking phân tử các hợp chất <i>ent</i> -kaurane diterpenoid định hướng ức chế con đường tín hiệu PI3K.....	95
4.7. Hoạt tính các <i>ent</i> -kaurane diterpenoid từ Khổ sâm gây độc trên dòng tế bào ung thư phổi người A549	113
KẾT LUẬN	114
KIẾN NGHỊ	115
CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN	116
TÀI LIỆU THAM KHẢO	117

DANH MỤC KÝ HIỆU, CHỮ VIẾT TẮT

Kí hiệu	Tiếng Anh	Tiếng Việt
Các phương pháp sắc ký		
CC	Column Chromatography	Sắc ký cột thường
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	Sắc ký lỏng hiệu năng cao
TLC	Thin Layer Chromatography	Sắc ký bản mỏng
Các phương pháp phổ		
¹ H-NMR	Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân proton
¹³ C-NMR	Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân carbon 13
COSY	Correlation Spectroscopy	Phổ tương tác hai chiều ¹ H- ¹ H
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarisation Transfer	Phổ DEPT
ESI-MS	Electron Ionization Mass Spectrometry	Phổ khối ion hóa phun mù điện tử
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation	Phổ tương tác dị hạt nhân qua nhiều liên kết
HR-ESI-MS	High Resolution – Electron Ionization - Mass Spectrometry	Phổ khối phân giải cao ion hóa phun mù điện tử
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence	Phổ tương tác dị hạt nhân qua một liên kết
<i>J</i> (Hz)	Coupling constant	Hằng số tương tác spin-spin (kí hiệu <i>J</i>)
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy	Phổ NOESY
δ (ppm)	(ppm = part per million)	Độ dịch chuyển hóa học tính bằng phần triệu
Các dòng tế bào		
Hep-G2	Human hepatoma	Ung thư gan
Lu-1	Human bronchogenic carcinoma	Ung thư phổi
MCF-7	Human breast Adenocarcinoma	Ung thư vú
Các kí hiệu khác		
IC ₅₀	Inhibitory Concentration 50%	Nồng độ ức chế 50%
LD ₅₀	Lethal Dose 50	Liều độc cấp tính
ED ₅₀	Effective Dose at 50%	Liều gây chết hiệu quả
MIC	Minimum Inhibitory Concentration	Nồng độ ức chế tối thiểu
SI	Selectivity Index	Độ chọn lọc, được tính bằng tỉ số IC ₅₀ /MIC
TMS	Tetramethyl Silan	Chất chuẩn nội
NCI	National Cancer Institute	Viện Ung thư Quốc gia Hoa kỳ
δ_H	Proton chemical shift	Độ dịch chuyển hóa học của proton
δ_C	Carbon chemical shift	Độ dịch chuyển hóa học của carbon

Ghi chú: Tên các hợp chất, lớp chất, nhóm thế, chức hóa học được viết theo nguyên bản Tiếng Anh để đảm bảo tính thống nhất và chính xác.

DANH MỤC CÁC SƠ ĐỒ

<i>Sơ đồ 3.1.</i> Phân lập các hợp chất từ thân lá cây Đơn châu chấu	39
<i>Sơ đồ 3.2.</i> Phân lập các hợp chất từ cành lá cây Khổ sâm	41
<i>Sơ đồ 3.3.</i> Phân lập các hợp chất từ cành lá cây Thôm lôm.....	43
<i>Sơ đồ 3.4.</i> Phân lập các hợp chất từ thân cây Bộ mắm	45
<i>Sơ đồ 3.5.</i> Phân lập các hợp chất từ thân lá cây Thầu dầu	49
<i>Sơ đồ 3.6.</i> Phân lập các hợp chất từ quả Cà trái vàng	51
<i>Sơ đồ 3.7.</i> Phân lập các hợp chất từ thân lá cây Ké hoa đào	53

DANH MỤC HÌNH VẼ

<i>Hình 4.1.</i> Các hợp chất phân lập được từ thân lá Đơn châu chấu	59
<i>Hình 4.2.</i> Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC (H→C) chính của A4	60
<i>Hình 4.3.</i> Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC (H→C) chính của A3	61
<i>Hình 4.4.</i> Cấu trúc hóa học của A1 và A2	62
<i>Hình 4.5.</i> Các hợp chất phân lập được từ lá Khổ sâm.....	62
<i>Hình 4.6.</i> Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC (H→C) chính của C1	63
<i>Hình 4.7.</i> Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC (H→C) chính của C2	64
<i>Hình 4.8.</i> Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC (H→C) chính của C3	64
<i>Hình 4.9.</i> Các hợp chất phân lập được từ cành lá Thồm lồm.....	65
<i>Hình 4.10.</i> Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC (H→C) chính của P3	65
<i>Hình 4.11.</i> Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC (H→C) chính của P1	66
<i>Hình 4.12.</i> Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC (H→C) chính của P2	67
<i>Hình 4.13.</i> Các hợp chất phân lập được từ thân lá Bọ mấm.....	67
<i>Hình 4.14.</i> Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC (H→C) chính của Z1	68
<i>Hình 4.15.</i> Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC (H→C) chính của Z2	69
<i>Hình 4.16.</i> Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC (H→C) chính của Z3	70
<i>Hình 4.17.</i> Các hợp chất phân lập được từ lá Thầu dầu	70
<i>Hình 4.18.</i> Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC (H→C) chính của R3	71
<i>Hình 4.19.</i> Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC (H→C) chính của R1	72
<i>Hình 4.20.</i> Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC (H→C) chính của R2	73
<i>Hình 4.21.</i> Cấu trúc hóa học của R4 và R5	73
<i>Hình 4.22.</i> Các hợp chất phân lập được từ quả Cà trái vàng.....	74
<i>Hình 4.23.</i> Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC (H→C) chính của S1	75
<i>Hình 4.24.</i> Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC (H→C) chính của S2	76
<i>Hình 4.25.</i> Các hợp chất phân lập được từ thân Ké hoa đào	77
<i>Hình 4.26.</i> Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC (H→C) chính của U1	78
<i>Hình 4.27.</i> Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC (H→C) chính của U2	80
<i>Hình 4.28.</i> Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC (H→C) chính của U3	80
<i>Hình 4.29.</i> Đồ thị biểu diễn tương quan năng lượng liên kết tính toán và tỷ lệ ức chế <i>Vibrio parahaemolyticus</i> của các chất nghiên cứu	87
<i>Hình 4.30.</i> Liên kết tạo thành giữa các hợp chất và vùng hoạt động PDH.	88

<i>Hình 4.31.</i> Tỷ lệ % tôm chết khi ngâm trong PC.M (M4) và RC.M (M5)	90
<i>Hình 4.32.</i> Tỷ lệ sống trung bình của tôm được ghi nhận trong 7 ngày cảm nhiễm	91
<i>Hình 4.33.</i> Tỷ lệ tôm sống trung bình sau 7 ngày gây nhiễm	91
<i>Hình 4.34.</i> Tỷ lệ sống trung bình của tôm được ghi nhận sau 7 ngày cảm nhiễm	91
<i>Hình 4.35.</i> Tỷ lệ tôm sống trung bình sau 7 ngày gây nhiễm	91
<i>Hình 4.36.</i> Tỷ lệ (%) tôm chết trong khi cho tôm ăn thức ăn chứa PC.M	93
<i>Hình 4.37.</i> Bổ sung chế phẩm vào thức ăn cho ăn 7 ngày liên tục trước công cường độ	93
<i>Hình 4.38.</i> Tỷ lệ sống trung bình của tôm được ghi nhận trong 7 ngày cảm nhiễm khi ăn cao chiết Khổ sâm 7 ngày	94
<i>Hình 4.39.</i> Tỷ lệ tôm sống trung bình sau 7 ngày gây nhiễm được ghi nhận khi ăn cao chiết Khổ sâm 12 ngày	94
<i>Hình 4.40.</i> Liên kết hydro hình thành giữa các hợp chất với các amino acid trong vùng hoạt động của protein mTor	99
<i>Hình 4.41.</i> Liên kết hydro hình thành giữa các hợp chất (với các amino acid trong vùng hoạt động của protein AKT)	100
<i>Hình 4.42.</i> Liên kết hydro hình thành giữa các hợp chất với các amino acid trong vùng hoạt động của protein COX-2	101
<i>Hình 4.43.</i> Liên kết hydro hình thành giữa các hợp chất với các amino acid trong vùng hoạt động của protein MDM2	102
<i>Hình 4.44.</i> Liên kết hydro hình thành giữa các hợp chất với các amino acid trong vùng hoạt động của protein PDK1	103
<i>Hình 4.45.</i> Liên kết không phân cực hình thành giữa hợp chất với các amino acid trong vùng hoạt động của protein AKT	106
<i>Hình 4.46.</i> Liên kết không phân cực hình thành giữa với các amino acid trong vùng hoạt động của protein mToR	108
<i>Hình 4.47.</i> Liên kết không phân cực hình thành các chất với các amino acid trong vùng hoạt động của protein COX-2	109
<i>Hình 4.48.</i> Liên kết không phân cực hình thành giữa các chất với các amino acid trong vùng hoạt động của protein MDM2	110
<i>Hình 4.49.</i> Liên kết không phân cực hình thành giữa các chất với các amino acid trong vùng hoạt động của protein PDK1	112
<i>Hình 4.50.</i> Các tương tác không phân cực tương đồng của hợp chất 2 và oxaliplatin với các amino acid trong vùng hoạt động của protein AKT ...	112

DANH MỤC BẢNG

<i>Bảng 1.1.</i> Một số thuốc thực vật kháng khuẩn <i>Vibrio</i>	23
<i>Bảng 2.1.</i> Danh sách các loài thực vật nghiên cứu.....	30
<i>Bảng 4.1.</i> Kết quả thử nghiệm kháng <i>V. parahaemolyticus</i> của các cao chiết thô	56
<i>Bảng 4.2.</i> Dữ liệu phổ của chất A4 và chất tham khảo	60
<i>Bảng 4.3.</i> Dữ liệu phổ của chất C1 và chất tham khảo	63
<i>Bảng 4.4.</i> Dữ liệu phổ NMR của P3 và chất tham khảo	66
<i>Bảng 4.5.</i> Dữ liệu phổ NMR của Z1 và chất tham khảo	68
<i>Bảng 4.6.</i> Dữ liệu phổ NMR của R3 và chất tham khảo.....	71
<i>Bảng 4.7.</i> Dữ liệu phổ NMR của S1 và chất tham khảo	75
<i>Bảng 4.8.</i> Dữ liệu phổ NMR của U1 và chất tham khảo.....	79
<i>Bảng 4.9.</i> Tổng hợp các hợp chất phân lập được từ 7 loài nghiên cứu	81
<i>Bảng 4.10.</i> Hiệu quả ức chế của các chất sạch đến sự phát triển <i>V. parahaemolyticus</i> (VP) được nuôi cấy trong môi trường ISB sau 24 giờ...85	
<i>Bảng 4.11.</i> Điểm năng lượng liên kết và tương tác tạo thành của các chất với PDH	86
<i>Bảng 4.12.</i> Tỷ lệ chết (trung bình \pm sai số chuẩn) của tôm thí nghiệm xác định LC ₅₀ sau khi tiếp xúc với cao chiết khổ sâm với các nồng độ khác nhau.	92
<i>Bảng 4.13.</i> Tỷ lệ tôm chết sau sử dụng cao chiết khổ sâm ở các nồng độ khác nhau	94
<i>Bảng 4.14.</i> Điểm năng lượng dock của các hợp chất diterpenoid và oxaliplatin với các đích protein AKT, mToR, COX-2, MDM2, PDK1	96
<i>Bảng 4.15.</i> Các liên kết không phân cực hình thành giữa các hợp chất diterpenoid và oxaliplatin với các đích protein AKT, mToR, COX-2, MDM2, PDK1	104

MỞ ĐẦU

Hiện nay, nghề nuôi tôm công nghiệp ở nước ta đang phát triển lớn mạnh và đóng góp quan trọng vào mức tăng trưởng kinh tế hàng năm của đất nước. Mặc dù ngành tôm đã đạt được kết quả rất ấn tượng trong những năm vừa qua nhưng sự phát triển vẫn chưa thực sự bền vững. Nghề nuôi tôm đang phải đối mặt với vấn đề sự phát sinh các loại dịch bệnh gây ra những thiệt hại cho nghề nuôi như bệnh hoại tử gan tụy cấp, đốm trắng, đỏ thân, bệnh còi, bệnh phân trắng...

Từ cuối năm 2010, đầu năm 2011 đến nay, dịch bệnh nguy hiểm trên tôm được ghi nhận là bệnh hoại tử gan tụy cấp (AHPND). Bệnh gây thiệt hại lớn về kinh tế đối với các quốc gia sản xuất tôm ở khu vực Đông Nam Á, trong đó có Việt Nam. Tác nhân gây bệnh AHPND được cho là do vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* mang plasmid có chứa gen độc lực gây hoại tử gan tụy cấp [1,2].

Cùng xu hướng phát triển của thế giới về vấn đề ứng dụng sản phẩm có nguồn gốc từ thực vật, đặc biệt trong nghề nuôi tôm công nghiệp thì ở Việt Nam đang trong quá trình nghiên cứu tìm kiếm các loài thực vật có tác dụng tốt phòng trị bệnh trong nuôi trồng thủy sản nói chung và tôm nuôi nói riêng.

Trên cơ sở sàng lọc hoạt tính kháng *Vibrio parahaemolyticus* kết hợp với kinh nghiệm đã được sử dụng trong dân gian các loài thảo dược: Đơn châu chấu (*Aralia armata*), Bọ mả (*Pouzolzia zeylanica*), Khổ sâm (*Croton tonkinensis*), Ké hoa đào (*Urena lobata*), Thồm lồm (*Polygonum chinense*), Thầu dầu (*Ricinus communis*) và Cà trái vàng (*Solanum xanthocarpum*) thể hiện hoạt tính tốt và nhiều ưu điểm hơn cả [3,4,5].

Bên cạnh đó, nghiên cứu thuốc sử dụng công cụ hỗ trợ máy tính (Computer aided drug design) đã trở nên rất phổ biến và có nhiều đóng góp quan trọng trong nghiên cứu và phát triển thuốc. Dựa trên sự tiến bộ của công nghệ thông tin, công cụ mô phỏng hóa sinh hiện đại đã được sử dụng để sàng lọc ảo (*in silico*), nghiên cứu cơ chế hoạt động và dự đoán các hợp chất cấu trúc mới được cho là có hoạt tính mạnh. Đây là một kỹ thuật đáng tin cậy và hiệu quả trong phát triển thuốc mới trong tương lai. Trong số các loài thực vật đề cập ở trên, thành phần hóa học của chúng đã được xác định chủ yếu bao gồm các lớp chất diterpenoid, triterpenoid và polyphenol với nhiều hoạt tính sinh học tốt: kháng khuẩn, kháng viêm, chống oxy hóa và đặc biệt

hoạt tính gây độc trên một số dòng tế bào ung thư như: gan, phổi... [6,7]. Từ những lí do trên, đề tài định hướng sử dụng kĩ thuật sàng lọc ảo (*in silico*) nhằm dự đoán các hợp chất có tiềm năng hoạt tính kháng khuẩn và kháng u từ các loài thực vật nghiên cứu, đồng thời nghiên cứu về cơ chế hoạt động, mối tương quan hoạt tính – cấu trúc của các hoạt chất trên các đích sinh học cụ thể.

Chính vì vậy, đề tài “**Nghiên cứu hóa học và hoạt tính sinh học của một số loài thực vật Việt Nam theo định hướng kháng chủng *Vibrio parahaemolyticus* và gây độc tế bào**” được thực hiện và nhằm thực hiện các mục tiêu chính sau:

- Nghiên cứu thành phần hóa học chính định hướng kháng vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* gây bệnh hoại tử gan tụy cấp ở tôm nuôi và hoạt tính kháng u của một số loài thực vật Việt Nam bao gồm: Đơn châu chấu (*Aralia armata*), Bộ mắt (*Pouzolzia zeylanica*), Khô sâm (*Croton tonkinensis*), Ké hoa đào (*Urena lobata*), Thồm lồm (*Polygonum chinense*), Thầu dầu (*Ricinus communis*) và Cà trái vàng (*Solanum xanthocarpum*).

- Nghiên cứu hoạt tính sinh học theo định hướng tạo chế phẩm chống bệnh AHPND do vi khuẩn *V. parahaemolyticus* gây ra cho tôm và nghiên cứu hoạt tính sinh học theo định hướng gây độc tế bào ung thư phổi A549 của các *ent*-kaurane diterpenoid phân lập được.

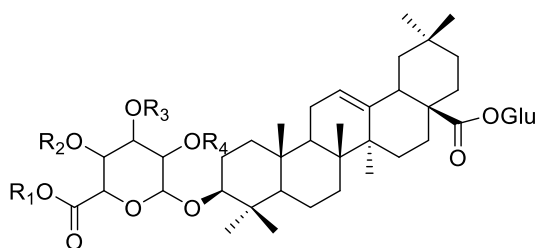
- Sàng lọc *in silico* cơ sở dữ liệu hợp chất từ các loài thực vật nghiên cứu dự đoán nhanh các hoạt chất tiềm năng tác dụng trên một số đích sinh học cụ thể sử dụng trong điều trị kháng khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* và kháng u. Nghiên cứu cơ chế hoạt động và xác định mối tương quan hoạt tính – cấu trúc của các hoạt chất tiềm năng.

Chương 1. TỔNG QUAN

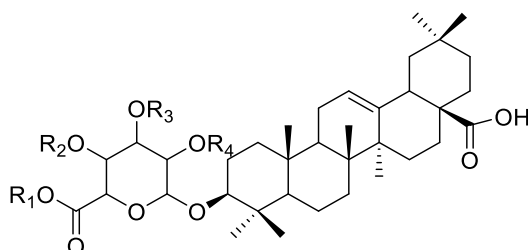
1.1. Giới thiệu về 7 loài thực vật nghiên cứu

1.1.1. Loài *Aralia armata*

Cây Đơn châu châu (*Aralia armata*), họ Nhân sâm (Araliaceae) hay còn gọi là cây cuồng, cây đuông, cây răng, rau gai,... Cho đến nay đã có hơn 70 hợp chất được phân lập và nhận dạng. Thành phần hóa học chính là các saponin triterpen như silphioside A (**1**), taibaiensis IV (**2**), calenduloside H methyl ester (**3**), armatoside (**4**), calenduloside E (**5**), momordin Ia (**6**), calenduloside G (**7**), 3-O-[-D-galactopyranosyl-(13)-6-O-butyl-D-glucuronopyranoside] (**8**) [8,9,10]



- | | |
|----------|---|
| 1 | R ₁ =CH ₃ , R ₂ =H, R ₃ =H, R ₄ =H |
| 2 | R ₁ =C ₂ H ₅ , R ₂ =H, R ₃ =H, R ₄ =H |
| 3 | R ₁ =CH ₃ , R ₂ =H, R ₃ =D-Gal, R ₄ =H |
| 4 | R ₁ =H, R ₂ =H, R ₃ =H, R ₄ =L-Ara-(12)-β-D-Glu |



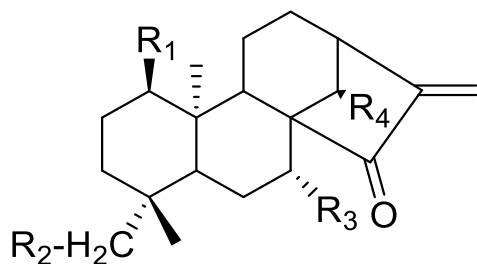
- | | |
|----------|---|
| 5 | R ₁ =H, R ₂ =H, R ₃ =H, R ₄ =H |
| 6 | R ₁ =CH ₃ , R ₂ =H, R ₃ =H, R ₄ =H |
| 7 | R ₁ =H, R ₂ =H, R ₃ =D-Glu, R ₄ =H |
| 8 | R ₁ =CH ₃ , R ₂ =L-Ara, R ₃ =H, R ₄ =H |

Lá Đơn châu châu dùng chữa mụn nhọt, trị rắn cắn. Vỏ rễ có những tác dụng chống viêm, đặc biệt tác dụng ức chế khá mạnh giai đoạn mạn tính của phản ứng viêm. Kích thích sự chuyển dạng lympho bào trong thí nghiệm nuôi cấy *in vitro*, điều này chứng tỏ Đơn châu châu có tác dụng kích thích miễn dịch. Kháng khuẩn đối với phế cầu, liên cầu khuẩn tan máu. Các saponin triterpen và genin acid oleanolic từ rễ Đơn châu châu là thành phần có hoạt tính chống viêm cấp, viêm mạn và gây thu teo tuyến ức chuột cống trắng đực non. Thí nghiệm với acid oleanolic được phân lập từ rễ Đơn châu châu, liều 60 mg/kg (tiêm dưới da), kết quả thu được tỷ lệ giảm trọng lượng tuyến ức là 40,9% [8].

1.1.2. Loài *Croton tonkinensis* [11,12]

Cây Khổ sâm cho lá hay còn gọi là Khổ sâm Bắc bộ với tên khoa học là *Croton tonkinensis*, họ Thầu dầu (Euphorbiaceae).

Hiện nay, có hơn 13 hợp chất khung *ent*-kauran diterpenoid được phân lập được từ loài *Croton tonkinensis*, phần lớn thuộc dẫn xuất hydroxy của khung *ent*-kauran-16-*ent*-15-on, tiêu biểu như *ent*-18-axetoxy-7 β -hydroxykaur-16-en-15-on (**9**), *ent*-1 α -axetoxy-7 β ,14 α -dihydroxykaur-16-en-15-on (**10**), *ent*-1 α ,7 β ,14 α -triacetoxykaur-16-en-15-on (**11**), *ent*-7 β ,14 α -dihydroxykaur-16-en-15-on (**12**), *ent*-18 α -axetoxy-7 α ,14 β -dihydroxykaur-16-en-15-on (**13**), *ent*-7 β ,18-dihydroxykaur-16-*ent*-15-on (**14**) và *ent*-1 α ,14 α -diacetoxy-7 β -hydroxykaur-16-en-15-on (**15**)



- | | |
|-----------|--|
| 9 | R ₁ =H, R ₂ =OAc, R ₃ =OH, R ₄ =H |
| 10 | R ₁ =OAc, R ₂ =H, R ₃ =OH, R ₄ =OH |
| 11 | R ₁ =OAc, R ₂ =H, R ₃ =OAc, R ₄ =OAc |
| 12 | R ₁ =H, R ₂ =H, R ₃ =OH, R ₄ =OH |
| 13 | R ₁ =H, R ₂ =OAc, R ₃ =OH, R ₄ =OH |
| 14 | R ₁ =H, R ₂ =OH, R ₃ =OH, R ₄ =H |
| 15 | R ₁ =OAc, R ₂ =H, R ₃ =OH, R ₄ =OAc |

Ngoài ra, từ cây Khổ sâm đã phân lập và nhận dạng được một số alkaloid, triterpenoid và steroid khác

Khổ sâm cho lá được nhân dân sử dụng để chữa bệnh đường ruột cho người và gia súc. Nhân dân dùng lá tươi nhai sống, vò hoặc giã nát để lấy nước uống chữa bệnh đau bụng, đi ngoài, phụ nữ bị bệnh hậu sản, lở loét người ngoài da, chữa các vết thương nhiễm trùng, chữa viêm loét hành tá tràng, đau dạ dày, trị sốt rét. Ngoài ra, cành, lá khô đem sao vàng, sắc lấy nước uống để chữa bệnh tê thấp.

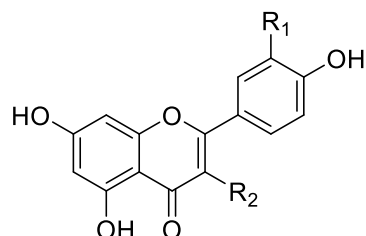
Phân đoạn alkaloid từ lá *C. tonkinensis* thể hiện hoạt tính ức *Plasmodium falciparum* và *Plasmodium berghei*. Các hợp chất *ent*-kauran diterpenoid phân lập từ lá *C. tonkinensis* kháng vi khuẩn *S. aureus* và *S. aureus* kháng methicillin. Phân đoạn dicloromethane từ lá Khổ sâm cho lá thể hiện hoạt tính gây độc trên các dòng tế bào ung thư gan (Hep-G2), màng tử cung (FI), biểu mô (KB), ung thư vú (MCF-7) và phổi (NCI-H460, SF-268). Các diterpenoid *ent*-kauran từ Khổ sâm cho lá còn có tác dụng kích thích trực tiếp vào nguyên bào xương. Đó là các phân tử điều trị tiềm năng chống lại các bệnh về xương như loãng xương.

1.1.3. Loài *Polygonum chinense* [3,13,14]

Loài *Polygonum chinense* L., họ Rau răm (Polygonaceae). Tên gọi thông thường: Thồm lồm, Lá lồm, đuôi tôm, mía bẹm, mía mung, xôm cúng (Thái), nú mí (Tày), xích địa lợi, hoả mẫu thảo, cơ đô (K'ho).

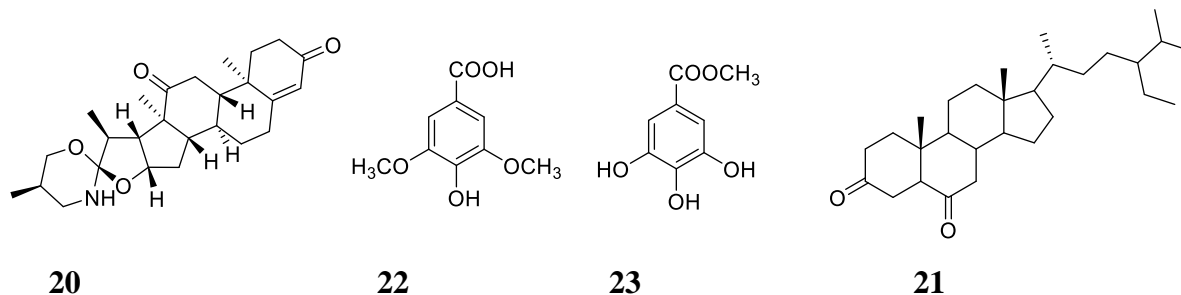
Thành phần hóa học chính của loài Thồm lồm gồm các hợp chất flavonoid, triterpenoid, phenolic với nhiều hoạt tính sinh học đáng lưu ý.

Các hợp chất flavonoid gồm apigenin (**16**), isorhamnetin (**17**), quercitrin (**18**), hyperoside (**19**) được phân lập từ loài *Polygonum chinense*



- 16** R₁=H, R₂=H
17 R₁=OCH₃, R₂=OH
18 R₁=H, R₂= α -L-Rha
19 R₁=OAc, R₂= β -D-gal

Các hợp chất triterenoid được phân lập từ loài *Polygonum chinense*, gồm 25R-spirost-4-ene-3,12-dione (**20**), stigmastane-3,6-dione (**21**), các hợp chất phenolic đã được phân lập và xác nhận cấu trúc từ *Polygonum chinense* syringic acid (**22**) và gallicin (**23**).



Theo Đông Y, Thồm lồm có vị hơi ngọt, cay, tính mát, thường dùng chữa mụn nhọt, lở loét, lở vành tai, chốc đầu, chốc mép, chàm, bệnh nhiễm liên cầu khuẩn ở da.

Trong dân gian cũng thường dùng rễ làm thuốc tiêu độc chữa chứng xích bạch lỵ và ung nhọt, mài với giấm đắp vào để trị vết thương do rắn, côn trùng, chó cắn; nó cũng là loại thuốc chữa chân thương do ngã. Cành lá hoặc rễ giã đắp sẽ làm tan máu ứ rất nhanh. Quả cây và lõi thân còn non dùng ăn giải được khát. Cành lá cũng có thể dùng làm thuốc gây nôn khi bị ngộ độc.

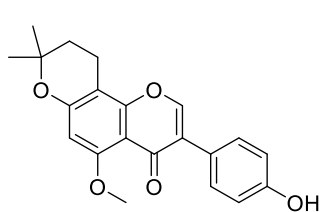
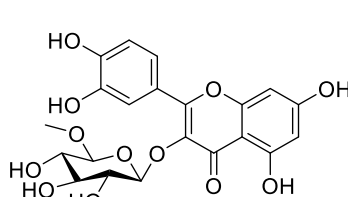
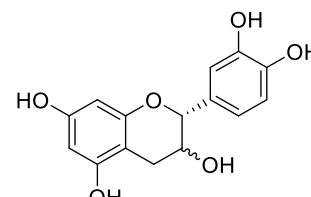
Cây Thồm lồm có hoạt tính kháng vi sinh vật mạnh mẽ. Ngoài ra, cao chiết ethyl acetate có hoạt tính kháng virus HSV-1 tới 100% bằng với thuốc đối chứng acyclovir ở cùng nồng độ 50 μ g/ml. Kem bôi Thomlom PSVH có khả năng ức chế virus cao hơn gấp 5 lần acyclovir tại nồng độ 0,5% và gấp 30 lần tại nồng độ 1% trong thử nghiệm *in vitro*.

1.1.4. Loài *Pouzolzia zeylanica* [4,15,16]

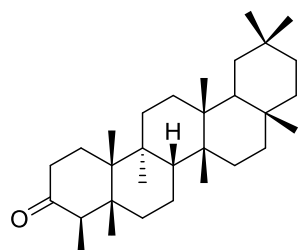
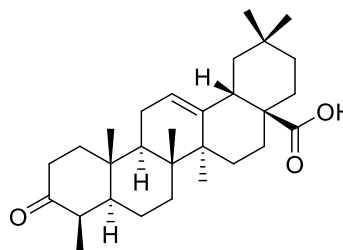
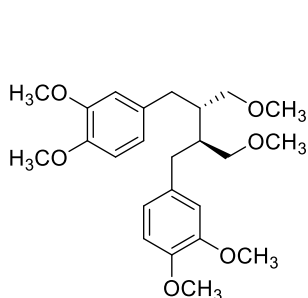
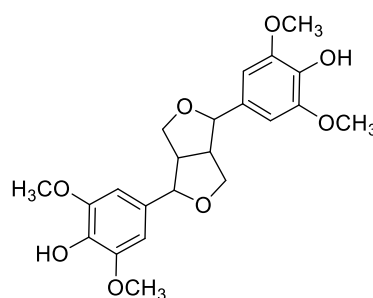
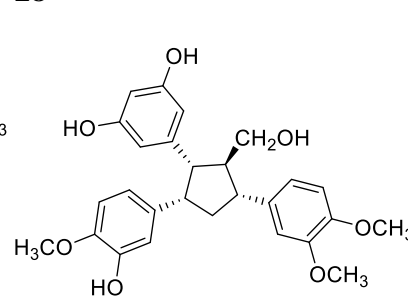
Cây bộ mắm còn được gọi là Thuốc dòi, Bơ nước tương, Đại kích biển. Tên khoa học: *Pouzolzia zeylanica* Beth.

Thành phần hóa học chính của cây Bộ mắm là các hợp chất flavonoid, steroid, triterpen và lignan.

Một số hợp chất flavonoid phân lập được từ thân lá cây Bộ mắm gồm có: 5-methoxy-4'-hydroxy-2'',2''-dimethoxyprano(3'',4'',7,8) isoflavon (**24**), quercetin-3-O- β -D-glucopyranoside (**25**) và kaempferol (**26**).

**24****25****26**

Một số hợp chất triterpenoid phân lập được từ thân lá cây Bộ mắm như friedelin (**27**), oleanolic acid (**28**), các hợp chất lignan như phylanthin (**29**), syringaresinol (**30**) và hợp chất stilbene là pouzolignan D (**31**).

**27****28****29****30****31**

Từ lâu, Bộ mắm được nhân dân sử dụng bằng cây tươi giã nhỏ cho vào vại mắm bảo quản chống giòi bọ. Ngoài ra, còn được dùng trong điều trị các bệnh lý: Cảm ho, hoặc ho lâu ngày, viêm họng, bệnh về phổi lý, viêm ruột, nhiễm trùng đường tiết niệu, bí tiểu tiện, đau răng, nấm da cứng. Trong y học hiện đại, Bộ mắm biểu hiện hoạt tính kháng vi sinh vật, kháng viêm, hạ đường huyết, chống oxi hóa, gây độc tế bào, ...

Cao chiết ethanol của *P. zeylanica* ở nồng độ 1g/ml cho thấy tác dụng kháng vi khuẩn gram dương và gram âm như *B. subtilis*, *B. megaterium*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. dysenteriae* và *S. typhi* với đường kính vòng kháng khuẩn khoảng 7,0-26 mm và *A. Niger* là loài nấm nhạy cảm nhất.

Cao chiết (aceton, ethyl acetate và ether dầu hoả) đều thể hiện hoạt tính chống oxy hoá, trong đó cao chiết ethyl acetate cho tác dụng chống oxy hoá tốt nhất với khả năng bắt giữ gốc tự do DPPH là 64,9%. Đối với gốc tự do ABTS, dịch chiết này cũng thể hiện hoạt tính tốt với khả năng bắt giữ trên 50% ở nồng độ 1,2 mg/ml. Cao chiết ethyl acetate thể hiện khả năng bắt giữ các gốc hydroxyl rất mạnh. Ở nồng độ thấp hơn 0,2 mg/ml, hiệu quả ức chế chỉ 10,9% nhưng khi tăng nồng độ lên đến 1,2 mg/ml thì hiệu quả đã tăng đến 90,5%.

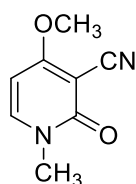
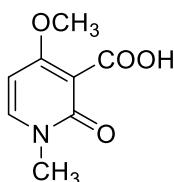
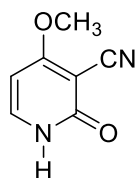
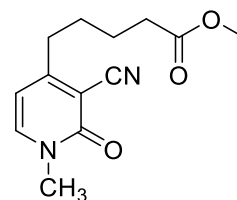
Cao chiết ethyl acetate, *n*-butanol và hợp chất friedelin cho hoạt tính gây độc tế bào tốt với giá trị LC₅₀ lần lượt là 3,32; 3,44 và 2,80 µg/ml. Kết quả bước đầu gợi ý đến tiềm năng phát triển nguồn nguyên liệu cũng như hoạt chất có tác dụng kháng ung thư mới sử dụng trong công nghệ dược phẩm.

1.1.5. Loài *Ricinus communis* [5,17,18]

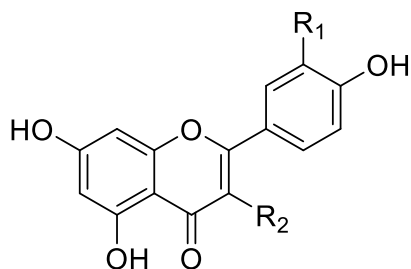
Thầu dầu hay đu đủ tía có tên khoa học là *Ricinus communis* L. là một loài thực vật trong họ Thầu dầu (Euphorbiaceae) và là thành viên duy nhất trong chi *Ricinus* cũng như của phân tông *Ricininae*. *R. communis* có nguồn gốc từ châu Phi, phổ biến ở các vùng có khí hậu nhiệt đới hoặc cận nhiệt đới [43].

Hơn 80 hợp chất đã được phân lập và xác định cấu trúc từ quả, lá, thân và rễ loài *R. Communis* thuộc các nhóm: alkaloid, terpenoid, flavonoid, dẫn xuất acid benzoic, coumarin, toco-pherol, terpenoid và acid béo, với nhiều hoạt tính đáng quan tâm.

Hợp chất alkaloid, ricinine (**32**) được phân lập từ hạt, rễ, lá mầm, lá, hoa, quả và thân *R. communis*. Đây là một alkaloid có độc tính, 3-carboxy-4-methoxy-N-methyl-2-pyridone (**33**) có tác dụng làm giảm sức sống của muỗi *Anopheles*. Hợp chất *N*-demethylricinine (**34**) được phân lập từ lá *R. communis*; methyl 5-(3-cyano-1-methyl-2-oxo-1,2-dihydropyridine-4-yl) pentanoate (**35**) từ hạt loài *R. communis*.

**32****33****34****35**

Hợp chất flavonol, quercetin (**36**) được phân lập từ rễ và lá thầu dầu, Các flavon glycoside: kaempferol-3-*O*- β -*D*-xylopyranoside (**37**), quercetin-3-*O*- β -*D*-xylopyranoside (**38**), quercetin-3-*O*- β -*D*-glucopyranoside (**39**), kaempferol-3-*O*- β -rutoside (**40**), quercetin-3-*O*- β -rutoside (**41**) được phân từ hoa, rễ, lá *R. communis*.



- 36** R₁=OH, R₂=OH
37 R₁=H, R₂=*O*- β -*D*-Xyl
38 R₁=OH, R₂=*O*- β -*D*-Xyl
39 R₁=OH, R₂=*O*- β -*D*-Glu
40 R₁=H, R₂=*O*- β -Rut
41 R₁=OH, R₂=*O*- β -Rut

Hạt Thầu dầu dùng chữa sa tử cung và trực tràng, ly, sót nhau, đẻ khó, liệt thần kinh mắt, viêm mủ da, viêm hạch lao, dằm đâm vào thịt; dầu hạt trị mụn nhọt thũng độc, hàu tê, đại tiện táo kết, tràng nhạc. Lá được dùng trị viêm da, ngứa, nhọt, viêm đau khớp, diệt dòi và diệt bọ gậy. Rễ dùng chữa phong thấp đau nhức khớp, đòn ngã sưng đau, sài uôn ván, động kinh, tinh thần phân liệt. Các bột lá được sử dụng để xoa đuôi rệp, muỗi, ruồi trắng và bọ ve, ngoài ra lá còn được sử dụng thuốc đắp trên các vết loét, sung.

Trong y học hiện đại, *Ricinus communis* thể hiện hoạt tính phong phú như: tránh thai, giảm đau, chống oxy hóa, điều hòa miễn dịch, bảo vệ gan, kháng viêm, kháng khuẩn, kháng histamin, chống hen suyễn, làm lành vết thương, ...

Chiết xuất hạt *R. communis* thể hiện hoạt tính chống oxy hóa bằng phương pháp FTC, khả năng bắt gốc tự do DPPH và gốc hydroxyl được sinh ra từ hydrogen peroxide (H₂O₂). Hoạt tính chống oxy hóa mạnh của *R. communis* ở nồng độ thấp cho thấy chúng có thể rất hữu ích trong điều trị bệnh do stress oxy hóa. Thành phần hóa học chính của *R. communis* có hoạt tính chống oxy hóa là methyl ricinoleate, ricinoleic acid, 12-octadecadienoic acid và methyl este của chúng.

Cao chiết từ *R. communis* cho thấy khả năng kháng khuẩn kháng lại nhiều loại vi sinh vật khác nhau như *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *S. typhimurium*, *P. vulgaris*, *B. subtilis*, *C. albicans* và *A. niger*.

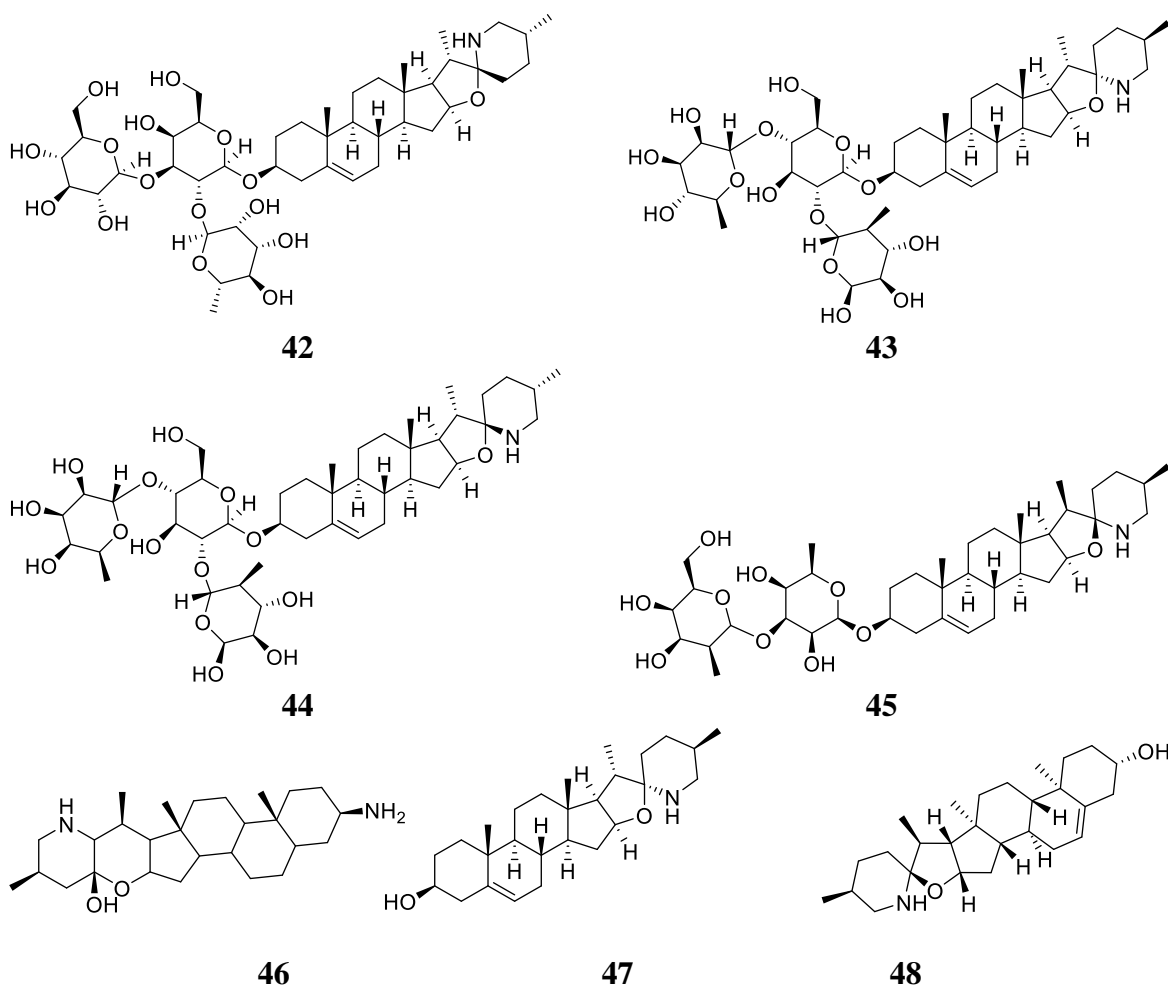
Trong các thử nghiệm so sánh, thứ tự hoạt động diệt côn trùng gây hại cho gỗ *Mangifera indica* và *Pinus longifolia* là: dầu thầu dầu + sáp thầu dầu (1:1) > dầu thầu dầu > lá thầu dầu > sáp thầu dầu > dầu neem > lá neem.

1.1.6. Loài *Solanum xanthocarpum* [3,19,20]

Cà Tàu, còn gọi là cà trái vàng có tên khoa học *Solanum xanthocarpum* Schrad và VVondl, thuộc họ Cà Solanaceae.

Thành phần hóa học chính gồm các hợp chất alkaloid, Ngoài ra, cà trái vàng còn chứa các hợp chất steroid, triterenoid, sapogenin, flavonoid, phenolic và comarin khác.

Quả loài *S. xanthocarpum* chứa solasonine (42), solamargine (43), β -solamargine (44), solasurine (45), solanocarpin (46), solasodine (47) và tomatidenol (48), trong đó steroid alkaloid solasodine là alkaloid chính.



Trong y học cổ truyền, thuốc sắc *S. xanthocarpum* được sử dụng hạ sốt, chống giun sán, thuốc chữa bệnh dạ dày, thuốc chữa bệnh dạ dày, thuốc nhuận tràng, trẻ hóa và tăng khả năng thụ thai. Rễ của cây này được sử dụng thuốc bổ cho bà mẹ cho con bú và phòng ngừa thủy đậu và sởi. Rễ được sử dụng bởi các bộ lạc Mukundara của Rajasthan để điều trị thoát vị. Lá được áp dụng tại chỗ để giảm đau. Nước ép quả tươi dùng trong đau họng, quả sấy khô được dùng hút như thuốc lá để chữa viêm răng hoặc đau răng và giảm béo.

Trong y học hiện đại, *S. xanthocarpum* biểu hiện hoạt tính chống hen, hạ đường huyết, bảo vệ gan, chống nấm, diệt muỗi,...

Cao chiết ethanol của *S. xanthocarpum* có tác dụng giảm hen suyễn và chống dị ứng. Cao chiết ethanol của hoa *S. xanthocarpum* ở liều 50 và 100 mg/kg giảm bạch cầu ái toan. *S. xanthocarpum* ở liều (50-100 mg/kg) cho thấy hoạt tính ổn định tế bào mast. Bộ lạc Kondh ở Orissa, Ấn Độ sử dụng chiết xuất nước nóng của quả để điều trị tiểu đường. Cao chiết nước cho thấy tác dụng hạ đường huyết đáng kể trên chuột bị tiểu đường (do streptozotocin gây ra) ở liều 100 và 200 mg/kg.

Thử nghiệm *in vivo* cho thấy cao chiết ethanol của *S. xanthocarpum* có tác dụng dọn gốc tự do DPPH, bảo vệ gan, chống oxy hóa và giảm độc gan do galactosamine gây ra ở chuột.

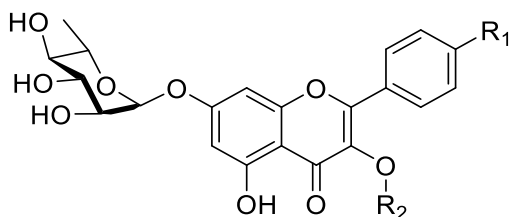
Cao chiết quả *S. xanthocarpum* được sử dụng diệt nấm và côn trùng hiệu quả, thân thiện với môi trường. Chiết xuất methanol từ quả khô *Solanum xanthocarpum* cho thấy hoạt tính kháng nấm *A. brassicae*.

Cao chiết từ quả *S. xanthocarpum* có tác dụng diệt *Anopheles stephensi*, *Culex quivayefasciatus* và *Aedes aegypti*. Tinh dầu được sử dụng làm thuốc chống muỗi *Cx. quivayefasciatus* ở nồng độ rất thấp. Giá trị LC₅₀ và LC₉₀ của cao chiết quả *Solanum xanthocarpum* ức chế *An. culicifacies*, *An. stephensi* và *Ae. aegypti* được xác định là 0,112 và 0,258, 0,058 và 0,289 và 0,052 và 0,218%.

1.1.7. Loài *Urena lobata*

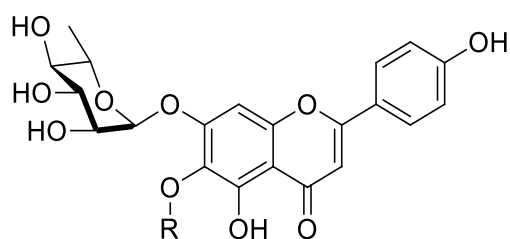
Loài *Urena lobata* có tên thường là Ké hoa đào (hay ké hoa đỏ) còn gọi là phan thiên hoa, tiêu phan thiên hoa, dã đào hoa,... Thành phần hóa học của các loài thuộc chi *Urena* chủ yếu thuộc nhóm flavonoid, ngoài ra còn có các hợp chất khác thuộc nhóm lignan, glycerid, furocoumarin, ... [4].

Đến nay có 13 hợp chất flavonoid glycoside được phân lập từ phần trên mặt đất loài *Urena lobata*, tiêu biểu là các chất kaempferol-3-*O*- β -D-apiofuranosyl(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranosyl-7-*O*- α -L-rhamnopyranoside (49), kaempferol-4'-*O*- β -D-apiofuranosyl-3-*O*- β -D-glucopyranosyl-7-*O*- α -L-rhamnopyranoside (50), 6,7,4'-tetrahydroxyflavone-6-*O*- β -D-arabinopyranosyl-7-*O*- α -L-rhamnopyranoside (51) và 5,6,7,4'-tetrahydroxy-flavone-6-*O*- β -D-xylopyranosyl-7-*O*- α -L-rhamnopyranoside (52) [21].



49 $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \beta\text{-D-Api (1}\rightarrow\text{2)-}\beta\text{-D-Glu}$

50 $R_1 = \beta\text{-D-Api}$, $R_2 = \beta\text{-D-Glu}$



51 $R = \beta\text{-D-apiofuranoside}$

52 $R = \beta\text{-D-xylopyranoside}$

Ngoài ra, nhóm nghiên cứu ở Ấn Độ đã phân lập được một furocoumarin [22]. Morelli và cộng sự đã phân lập được 2 triglyceride [23] từ ké hoa đào

Urena lobata có vị nhạt, hơi ngọt, dịu, tính mát, không độc, có tác dụng thanh nhiệt, tiêu viêm, trừ thấp, lợi tiêu. Rễ *U. lobata* được dùng chữa thấp khớp, khí hư, bạch đới, ly, tiêu hóa kém, cảm cúm, amidan, sốt rét, hen, bứu giáp. Hoa chữa thủy đậu, sốt, và rối loạn trí não. Cành lá hoặc toàn cây dùng ngoài chữa chấn thương bầm dập, thấp khớp, viêm vú, rắn cắn [24,25].

Trong y học hiện đại, Ké hoa đào có tác dụng kháng khuẩn, chống viêm, amoebicidal, lợi tiểu, viêm dạ dày, ho, viêm thận, tiêu chảy, sốt, viêm phổi, viêm nước, làm mềm da, rong kinh và điều kinh. Nó cũng được sử dụng cho bệnh lậu, đau răng và cũng được sử dụng làm thực phẩm cho động vật cũng như con người [24].

Cao chiết methanol của *U. lobata* có phổ kháng khuẩn rộng. Các hợp chất phân lập được từ lá *U. lobata*: kaempferol, quercetin, và tiliroside có hoạt tính kháng khuẩn *E. coli*, *B. subtilis* và *K. pneumonia* mạnh. Nghiên cứu này giải thích kinh nghiệm dân gian để điều trị các bệnh truyền nhiễm [26].

Cao chiết ethanol *U. lobata* có tác dụng chống lại peroxy hóa lipid và các gốc superoxide tự do trong thử nghiệm *in vitro* [27]. Nghiên cứu cao chiết methanol của

U. lobata cho thấy tính chống tăng sinh nội mạc và oxi hóa đáng kể trên dòng tế bào ung thư vú MB-MDA435 [28].

Nghiên cứu đánh giá cao chiết methanol cho hoạt tính chữa lành vết thương ở chuột bạch. Kết quả cho thấy làm lành vết thương đáng kể ở vết cắt bỏ, vết mổ, vết bỏng so sánh với Povidone-Iodine [29]. Hạt *U. lobata* có hoạt tính ức chế đáng kể chống lại tiêu chảy do dầu castor và sự tích tụ dịch ngoại bào do prostaglandin E2 (PGE2) gây ra. Cả hai đều thấy giảm đáng kể chuyển động dạ dày, ruột và không độc tính. Kết quả giúp giải thích nó sử dụng trong y học cổ truyền chữa tiêu chảy [30].

Dựa vào kết quả sàng lọc sơ bộ hoạt tính kháng sinh vi khuẩn kết hợp với tìm hiểu tài liệu về kinh nghiệm sử dụng trong dân gian, phân bố, các nghiên cứu về thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của 7 đối tượng nghiên cứu chúng tôi nhận thấy: Chúng thể hiện hoạt tính kháng sinh và kháng ung thư tốt, với thành phần hóa học chủ yếu thuộc lớp chất terpenoid (diterpenoid và triterpenoid), flavonoid, alkaloid, steroid. Đây là nguồn hoạt chất đã được chứng minh có tác dụng kháng sinh và kháng ung thư rất tốt. Bên cạnh đó, đây đều là nguồn nguyên liệu phổ biến, dễ trồng ở Việt Nam, đáp ứng được yêu cầu sản xuất sản phẩm.

Dựa trên đó, đề tài phân lập các hợp chất chính từ các đối tượng nghiên cứu để tiếp tục thử nghiệm hoạt tính kháng khuẩn *Vibrio* nhằm tìm ra được thành phần hóa học chính quyết định hoạt tính thảo dược. Định hướng nghiên cứu sâu hơn phát triển thành thuốc. Hơn nữa, kết hợp với ứng dụng mô hình sàng lọc ảo để tìm hiểu mối quan hệ giữa lý thuyết và thực nghiệm, từ đó góp phần tối ưu hóa quá trình phát triển thuốc của các đối tượng và đích đến nghiên cứu.

1.2. Tình hình nghiên cứu về hoạt tính kháng vi sinh vật và gây độc tế bào ung thư

1.2.1. Tình hình nghiên cứu về hoạt tính kháng vi sinh vật

1.2.1.1. Tình hình nghiên cứu trên thế giới

Loài *Polygonum aviculare* và *Polygonum cuspidatum* thuộc chi *Polygonum* thể hiện hoạt tính kháng khuẩn *Staphylococcus aureus* [37]. Thành phần tinh dầu của *Polygonum hydropiper* có các cấu tử chính là aliphatic, decanal và dodecanal thể hiện hoạt tính kháng khuẩn tốt [38]. Phần trên mặt đất của *Polygonum acuminatum* được dùng để chữa lành vết thương và chống lại các loại nấm men [39]. Loài *Polygonum*

ferrugineum trong y học cổ truyền dân tộc Argentina được sử dụng để chữa lành vết thương và là chất khử trùng, kháng nấm [39]

Rễ loài *Polygonum cuspidatum* ngăn chặn sự chết cấp tính, ngăn ngừa tổn hại về hình thái của tế bào HeLa và RAW 264.7 gây bởi *Vibrio vulnificus*, ức chế tăng trưởng và tỷ lệ sống của *Vibrio vulnificus* trong nước ngọt và nước biển. Các chất resveratrol, picied, resveratrolisid, emodin, physcion, emodin-1-O-glucoside phân lập được từ *Polygonum cuspidatum* cũng được chứng minh có tác dụng diệt khuẩn đối với các vi khuẩn gây độc thực phẩm *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* và *Salmonella anatum* [40].

Loài *Datura stramonium* có chứa saponin, tannin, alkaloid và glycoside, và cao chiết ethanol thể hiện hoạt tính kháng khuẩn *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumonia* và *Escherichia coli* [41]. Cao chiết methanol của *Solanum palinacanthum* có hoạt tính kháng khuẩn chống lại *S. aureus* với giá trị MIC 2500 µg/ml, và các hợp chất phân lập rutin và 3,5-dicaffeoylquinic acid có giá trị MIC > 1000 µg/ml [42].

Cao chiết acetone của *Solanum tomentosum* thể hiện hoạt tính kháng vi khuẩn gram (-) và cao chiết methanol kháng vi khuẩn gram (+) [42]. Loài *Cestrum diurnum* có hoạt tính kháng khuẩn đối với chủng *S. aureus* và *P. aeruginosa*, và có tính độc. *Physalis* là một chi trong họ Solanaceae, hầu hết có nguồn gốc ở Bắc và Nam Mỹ, và hợp chất Physalin B được phân lập từ *Physalis angulata* đã được chứng minh là có tác dụng ức chế *S. aureus* và *N. gonorrhoeae* [43].

Hợp chất kaempferol glycoside là tiliroside được phân lập từ loài *Herissantia tiubae* mặc dù không hiển thị hoạt tính kháng khuẩn (MIC = 256 µg/ml), nhưng nó đã điều chỉnh hoạt tính của kháng sinh, tức là kết hợp với kháng sinh, giá trị MIC giảm đã được thử nghiệm với norfloxacin (16 lần), ciprofloxacin (16 lần), lomefloxacin (4 lần) và ofloxacin (2 lần). Kết quả này gợi ý rằng các hợp chất kaempferol glycoside có thể đóng vai trò là nguồn sản phẩm tự nhiên có nguồn gốc từ thực vật điều chỉnh khả năng kháng khuẩn, tức là một nguồn bổ trợ kháng sinh tiềm năng [44].

Hoạt tính kháng khuẩn của cao chiết ethanol 90% của phần trên mặt đất *Sida acuta* (Malvaceae) đã được thử nghiệm để giải thích việc sử dụng loài này trong y học cổ truyền điều trị nhiễm khuẩn. Kết quả thử nghiệm cho thấy hoạt tính ức chế

đáng kể chống lại các chủng *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* và *Streptococcus faecalis* với giá trị MIC trong khoảng 5,0 - 10,0 mg/ml [45].

Cao chiết nước của loài *Hibiscus sabdariffa* thể hiện hoạt tính ức chế đáng kể các chủng vi khuẩn *Helicobacter pylori* được thử nghiệm với giá trị MICs trong khoảng từ 9,18 đến 16,68 µg/ml. Hiệu quả của sử dụng hiệp đồng của cao chiết nước của loài *Hibiscus sabdariffa* với thuốc kháng sinh clarithromycin hoặc metronidazole kết quả thu được 4/7 chủng *Helicobacter pylori* có giá trị MICs trong khoảng từ 0,21 đến 0,39 µg/ml, với amoxicillin kết quả thu được 5/7 chủng *Helicobacter pylori* có giá trị MICs trong khoảng từ 0,61 đến 0,91 µg/ml [46].

Cao chiết từ vỏ và lá cây *Guazuma ulmifolia* thể hiện hoạt tính kháng nấm *Candida* sp. thấp ở nồng độ từ 1024 đến 1 µg / ml [47]. Cao chiết ethanol của *Hibiscus sabdariffa* thể hiện tính kháng khuẩn mạnh đối với tất cả các chủng vi sinh vật thử nghiệm. Đáng chú ý, hoạt tính mạnh nhất đối với chủng *Proteus mirabilis* (đường kính vòng vô khuẩn 15 mm) trong khi Ampiclox (chất kháng sinh chuẩn) thể hiện hoạt tính, hoạt tính thấp nhất đối với chủng *Enterobacter aerogenes* (7 mm) [48].

Hợp chất 4-((3S,4R,5S)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl) tetrahydro-2H-pyran-2-yloxy) phenazine-1-carboxylic acid được phân lập từ *Neesia altissima* (Malvaceae) được thử nghiệm hoạt tính ức chế *in vitro* đối với các chủng *Streptomyces* sp., *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri* và *Staphylococcus aureus* [49].

Cao chiết ethanol từ vỏ rễ *Polyscias fulva* thể hiện hoạt tính kháng khuẩn chống lại các chủng *S. typhi*, *E. aerogenes*, *P. aeruginosa* và *E. coli* với giá trị MIC từ 2000 đến 8000 µg/ml. Các phân đoạn ethyle acetate và *n*-butanol cho hoạt tính tốt hơn cao chiết ethanol tổng (MIC = 500 đến 1000 µg/ml). Hợp chất β -sitosterol và 3-O- α -L-arabinopyranosyl-hederagenin thể hiện hoạt tính kháng khuẩn mạnh nhất (MIC= 6,25-100 µg/ml) và *P. aeruginosa* (MIC= 6,25-400 µg/ml) [50].

Cao chiết methanol của 13 loài thuộc chi *Cussonia* đã được thử nghiệm hoạt tính kháng khuẩn. Kết quả cho thấy, tất cả các cao chiết đều thể hiện hoạt tính kháng *Pseudomonas aeruginosa* (MIC= 1,0-1,5 mg/ml), *Trichomonas vagis* (MIC= 0,8-1,3 mg/ml), *Neisseria gonorrhoeae* (MIC= 0,02-0,7 mg/ml). Cao chiết methanol của *Cussonia arborea* thể hiện hoạt tính mạnh nhất kháng *Plasmodium falciparum* (MIC= 13,68 µg/ml) [51].

Hoạt tính kháng nấm của saponin triterpenoid được nghiên cứu *in vitro* bằng phương pháp pha loãng agar. Các dẫn xuất monodesmosidic hederagenin thể hiện một hoạt động phổ rộng chống lại nấm men cũng như các loài dermatophyte. Hợp chất α -hederin là hợp chất có hoạt tính mạnh nhất và *Candida glabrata* là chủng dễ bị ảnh hưởng nhất. Hợp chất α -hederin đã được phát triển thành thuốc kháng caspofungin, ức chế sự tổng hợp của thành tế bào nấm. Chiết xuất cây *Hedera helix* với hàm lượng hederasaponin F cao kết hợp với oseltamivir làm giảm viêm phổi ở chuột nhiễm virus cúm A/PR/8 (PR8). Hợp chất hederasaponin B và 30% chiết xuất ethanol của *Hedera helix* có chứa hederasaponin B cho thấy hoạt tính chống virus đáng kể chống lại Virus EV71 kiểu gene C3 và C4a bằng cách giảm sự hình thành CPE. Hederasaponin B cũng ức chế biểu hiện protein VP2 của virus, cho thấy sự ức chế tổng hợp vỏ ngoài protein của virus [52].

Hợp chất continentalic acid được phân lập từ cao chiết chloroform của rễ cây *Aralia continentalis* thể hiện hoạt tính mạnh chống lại *Staphylococcus aureus* thường và *Staphylococcus aureus* kháng methicillin. Với giá trị MIC khoảng 8-16 μ g/ml. Do đó, continentalic acid có tiềm năng điều trị vi khuẩn kháng kháng sinh [53].

Hợp chất ursolic acid 3-O- α -L-arabinopyranoside được phân lập từ lá loài *Acanthopanax henryi* (Oliv.) Harms thể hiện hoạt tính kháng *Staphylococcus aureus* với giá trị MIC bằng 6,25 μ g/ml. Hiệp đồng của ursolic acid 3-O- α -L-arabinopyranoside (0,09 μ g/ml) với 0,00001% Triton X-100 hoặc 250 μ g/ml N,N'-dicyclohexylcarbodiimide tỷ lệ ức chế vi khuẩn *Staphylococcus aureus* đạt tương ứng 56,6 và 85.9% [54].

Các Monodesmoside (α -hederin, sapindoside B và sapindoside C) được phân lập từ lá của *Kalopanax pictum* var. *chinense* cho thấy tác dụng kháng nấm đáng kể chống lại *microsporum canis*, *Coccidioides immitis*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Cryptococcus neoformans* và *Candida albicans* ở nồng độ ức chế tối thiểu 6,25-25 μ g/ml [55].

Hầu hết các loài và chi trong họ Thầu dầu có các hoạt chất thuộc các nhóm triterpenoid, alkaloid, diterpenoid, diterpen ester, phorbol diterpen, flavonoid... Rất nhiều hợp chất mới có hoạt tính sinh học cao đã được phân lập và xác định. Đó là những hợp chất có triển vọng ứng dụng trong công nghiệp dược.

Cao chiết vỏ thân cây *M. dusenii* cho thấy tác dụng ức chế cao nhất đối với chủng *P. aeruginosa* với đường kính vòng vô khuẩn 37 mm, cao hơn cả thuốc cloramphenicol. Cao chiết vỏ cây *R. heudelotii*, lá *T. conophora*, lá *A. laxiflora*, vỏ *M. dusenii* ức chế chủng *A. flavus*. Ogundipe và cộng sự đã nghiên cứu về hoạt tính kháng khuẩn tốt của cao chiết lá *A. laxiflora* và xác định quercetin, rutin và quercitrin là flavonoid là các thành phần chính gây ra hoạt tính đó. Tương tự, hoạt tính kháng khuẩn tốt của *E. heterophylla* và *R. heudelotii* cũng được báo cáo [56].

Các hợp chất hoạt tính sinh học chịu trách nhiệm về tác dụng ức chế của những cây này đã được phát hiện trong sàng lọc hóa chất thực vật, một số được báo cáo trong tài liệu là thành phần kháng khuẩn. Flavonoid được biết đến là chất kháng khuẩn trong tự nhiên. Flavonoid phân lập từ lá của *Euclea crispa* đã được báo cáo thể hiện hoạt tính kháng khuẩn. Tannin được xác định từ *Vaccinium vitis*, terpene từ *Vernonia amygdalina* và saponin từ *Allium minutifolium* là thành phần thể hiện hoạt tính kháng khuẩn của cây. Điều này đã giải thích được kinh nghiệm trong dân gian sử dụng một số loài họ Euphorbiaceae để điều trị nhiễm trùng [56].

Cao chiết của *E. macroclada* giàu flavonoid có hoạt tính kháng khuẩn và kháng nấm với đường kính vòng vô khuẩn 8-23 mm. Giá trị MIC của *E. macroclada* được xác định từ 31,2-1000 μ g/ml [70]. Cao chiết của *E. denticulata* không thể hiện hoạt tính ức chế vi khuẩn *E. coli* và *B. megaterium* nhưng thể hiện hoạt tính với các chủng *S. aureus* (17 mm) và *C. albicans* (20 mm). Cao chiết lá và nhựa của *E. cheiradenia* cho thấy tác dụng ức chế đối với các chủng vi sinh vật thử nghiệm với đường kính vòng vô khuẩn khoảng 8-14 mm. Giá trị MIC của *E. cheiradenia* bằng 31,2-1000 μ g/ml. Nhựa của loài *E. virgata* cho thấy hoạt tính mạnh kháng *K. pneumoniae* (24 mm) và *C. albicans* (21 mm). Cao chiết của *E. petiolata* cho thấy hoạt tính kháng *E. coli* (11 mm) với giá trị MIC khoảng 31,2-1000 μ g/ml [57].

1.2.1.2. Tình hình nghiên cứu trong nước

Cao chiết *Ricinus communis* cho hiệu quả tốt đối với các chủng *Vibrio harveyi* và *Vibrio parahaemolyticus* với đường kính vòng kháng khuẩn từ 17 - 18 mm, tương ứng với giá trị MIC và MBC là 1,25 mg/ml và 2,5 mg/ml; 2,5 mg/ml và 5,0 mg/ml. Cao chiết *Vernonia amygdalina*, *Moringa oleifera*, *Acanthus ilicifolius* và *Wedelia calendulacea* thể hiện hoạt tính ở mức trung bình với đường kính vòng kháng khuẩn từ 10 - 11 mm [58].

Thử nghiệm các cao chiết lá, vỏ thân, cành, rễ của cây mít lá đen đều có hoạt tính kháng chủng vi sinh vật gram (+) với IC₅₀ trong khoảng 3,65- 95,09 µg/ml. Artochamin B là hợp chất phân lập được có hoạt tính tốt nhất; với khả năng ức chế *Bacillus subtilis* (IC₅₀ là 21,79 µg/ml), *Staphylococcus aureus* (IC₅₀ là 25,14µg/ml), gây độc trên cả bốn dòng tế bào ung thư KB, HepG2, Lu và MCF7 với các giá trị IC₅₀ lần lượt là 1,18; 3,6; 20,0; 4,59 µg/ml, hoạt tính chống oxy hóa mạnh với giá trị EC₅₀ là 20,51 µg/ml [59].

Cây Trinh nữ hoàng cung (*Crinum latifolium*) chứa các chủng *Streptomyces* nội sinh. Một trong các chủng *Streptomyces* này là SS004 cho thấy có khả năng kháng lại các vi sinh vật gây bệnh kháng kháng sinh [60].

Các Cao chiết methanol của 9 loài thuộc chi Cơm nguội (*Ardisia*) có ở Việt Nam đã được sàng lọc về hoạt tính kháng vi sinh vật và gây độc tế bào. Kết quả thu được cho thấy, Cao chiết methanol từ lá *Ardisia incarnata* có hoạt tính gây độc tế bào mạnh nhất, có khả năng ức chế cả 5 dòng tế bào ung thư thử nghiệm với các giá trị IC₅₀ nằm trong khoảng 5,26 đến 8,46 µg/ml, đồng thời có hoạt tính ức chế chủng nấm mốc *A. niger* với giá trị MIC là 200 µg/ml. Các Cao chiết methanol từ lá *A. balansana*, *A. caudata*, *A. insularis*, *A. pseudocrispa* và *A. splendens* có hoạt tính vi sinh vật và gây độc tế bào trung bình [61]

Cao chiết methanol từ cành và lá các loài *Kandelia obovata*, *Pluchea pteropoda*, *Aegiceras corniculatum*, *Lumnitzera racemosa*, *Sonneratia caseolaris*, *Sonneratia apetala*, *Bruguiera gymnorrhiza*, *Rhizophora stylosa* và *Avicennia marina* từ Vườn quốc gia Xuân Thủy, tỉnh Nam Định đều thể hiện hoạt tính ức chế 4 chủng *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris* và *Staphylococcus aureus* [62].

1.2.2. Tình hình nghiên cứu về hoạt tính gây độc tế bào ung thư

1.2.2.1. Tình hình nghiên cứu trên thế giới

Cao chiết methanol, ethyl acetate và chloroform của *Aralia elata* thể hiện hoạt tính gây độc mạnh đối với tế bào ung thư dạ dày, da và buồng trứng ở nồng độ 200 µg/ml; làm giảm khả năng sống sót của tế bào ung thư dạ dày lần lượt là 12,0%, 25,1% và 16,0%, tương ứng với giá trị IC₅₀ là 62,83, 153,3 và 41,2 µg/ml. Cao chiết methanol (200 µg/ml) của *Aralia elata* ức chế đáng kể khả năng sống của tế bào hắc tố da lên đến 95,6%. Ngoài ra, chiết xuất methanol và ethyl acetate (200 µg/ml) của

Aralia elata đã ức chế đáng kể khả năng sống sót của tế bào ung thư buồng trứng lần lượt là 2,7% và 4,3% [63].

Cao chiết acetone và ethanol của *Croton gratissimus* đã được chứng minh thể hiện hoạt tính gây độc trên các dòng tế bào A549 (ung thư phổi), MCF-7 (ung thư vú), Caco-2 (ung thư ruột kết) và HeLa (ung thư cổ tử cung). So với các loài *Croton* khác như *Croton pseudopulchellus* và *Croton sylvaticus* thì *Croton gratissimus* có chỉ số chọn lọc (SI) cao hơn trên các dòng tế bào ung thư (ngoại trừ MCF-7). Ngoài ra, cembranolides được phân lập từ vỏ cây *Croton gratissimus* đã cho thấy hoạt động hợp lý chống lại dòng tế bào ung thư buồng trứng (PE01) và dòng tế bào kháng paclitaxel-PE01TaxR. Ngoài ra, tác dụng chống tăng sinh tế bào bạch cầu ở người của *Croton gratissimus* wil-2 có thể so sánh bằng với hiệu quả thuốc chống ung thư doxorubicin. Độc tính tế bào của một số diterpenoid loại trachylobane và isopimarane được phân lập từ *Croton zambesicus* leaf đã được chứng minh: Hợp chất *ent*-trachyloban-3 β -ol thể hiện hoạt tính gây độc tế bào HeLa với giá trị IC₅₀ 7,3 mg/ml). Hợp chất *ent*-18-hydroxy-trachyloban-3-one, *ent*-trachyloban-3-one và isopimara-7,15-dien-3 β -ol thể hiện độc tính tế bào không chọn lọc chống lại cả hai dòng tế bào ung thư tử cung (HeLa), bạch cầu (HL-60) và không ung thư (WI-38) [64]

Các hoạt tính chống ung thư của các loài thuộc chi *Polygonum* đã được nghiên cứu trên khắp thế giới. Nhiều loài trong số này có khả năng ức chế chống lại các dòng tế bào gây ung thư khác nhau như bạch cầu, biểu mô tế bào gan, ruột kết, vú, biểu mô cổ tử cung, biểu mô tuyến tiền liệt, biểu mô phổi, dạ dày, biểu mô tuyến tụy, biểu mô chuyển tiếp bàng quang, thận, thanh quản, buồng trứng,... Các flavonoid glucoside từ các loài *P. amphibia*, *P. amplexicaulis*, *P. decipiens*, *P. glabra*, *P. limbata* và *P. senegalensis* thể hiện hoạt tính gây độc tế bào với giá trị IC₅₀ từ 0,01 đến 100 μ m tùy thuộc vào loại tế bào được nghiên cứu. Một số hợp chất như amplexicaule A, vanicoside B, lapathoside A và polygonumin A được phân lập từ *P. amplexicaulis*, *P. lapathifolia* và *P. minor* cho thấy hoạt tính chống ung thư đầy hứa hẹn với giá trị IC₅₀ tương đương với thuốc tiêu chuẩn [65]

Cao chiết *n*-butanol từ *Ricinus communis* để ngăn chặn sự di căn trong các tế bào MCF-7. Nghiên cứu đã chứng minh rằng cao chiết *n*-butanol của *R. communis* có thể ức chế các bước chính của dòng di căn và điều chỉnh các protein điều hòa di

căn. Do đó, phân đoạn này có thể được coi là một nguồn tiềm năng trong điều trị ung thư ác tính [66].

Cao chiết methanol từ quả *Solanum xanthocarpum* được đã được thử nghiệm về tác dụng ức chế tế bào ung thư HeLa. Cao chiết methanol của *Solanum xanthocarpum* có tác dụng gây độc tế bào đáng kể trên tế bào HeLa trong khoảng nồng độ từ 10 mg/ml đến 0,0196 mg/ml. Giá trị IC₅₀ của *Solanum xanthocarpum* đối với dòng tế bào HeLa và Vero là 847,8 và 0,8724 mg/ml theo phương pháp SRB; là 265,0 và 0,9496 mg/ml theo phương pháp MTT [67]

Việc tìm kiếm liệu pháp điều trị ung thư bằng các sản phẩm tự nhiên tiếp tục là một nỗ lực toàn cầu. Nhiều sản phẩm tự nhiên đã được thử nghiệm trên toàn cầu chống lại các dòng tế bào ung thư khác nhau. Loài *Urena lobata* đã được sử dụng như một thành phần trong các công thức khác nhau của thuốc y học cổ truyền để điều trị ung thư. Cao chiết methanol của *Urena lobata* được thử nghiệm *in vivo* trên chuột chống lại dòng tế bào ung thư biểu mô cổ trướng Ehrlich (EAC) bằng đường uống (200 mg/kg và 400 mg/kg) trong 13 ngày liên tục. kết quả cho thấy sự giảm đáng kể về thể tích khối u, số lượng tế bào sống sót, trọng lượng khối u, thời gian sống sót trung bình tăng lên, số lượng hồng cầu, bạch cầu và huyết sắc tố đã được phục hồi về mức bình thường ở những con chuột được điều trị [68].

Những thành công bước đầu trong nghiên cứu hợp chất thiên nhiên đã tạo động lực cho cuộc tìm kiếm các thuốc điều trị ung thư từ thực vật. Khám phá và phát triển thuốc điều trị ung thư vinblastine, vincristine, và podophyllotoxin là nền tảng cho hàng loạt những nghiên cứu về hợp chất thiên nhiên trong điều trị ung thư sau này. Nổi tiếp thành công là một loạt thuốc mới có nguồn gốc thực vật được tìm thấy, tiêu biểu là taxol, etoposide, camptothecin.

1.2.2.2. Tình hình nghiên cứu ở Việt Nam

Trong giai đoạn 1996-2005, 1157 mẫu cao chiết thô của các thực vật được lựa chọn trên cơ sở kinh nghiệm dân gian trong điều trị kháng ung thư (các dòng tế bào ung thư Hep-G2 (gan), KB (biểu mô), Lu (phổi) và RD (Sarcoma cơ vân)) và kháng viêm đã được sàng lọc *in vitro* tại Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên (VAST). Kết quả cho biết hơn 25% số mẫu thử có hoạt tính gây độc lớn hơn 1 dòng tế bào ung thư. Một số mẫu có hoạt tính tốt như lá bạch đồng nữ, diếp cá, bùm bụp, gừng gió,

thành ngành,.. được phân đoạn, sàng lọc hoạt tính giai đoạn 2 và đánh giá trên mô hình động vật thực nghiệm và thu được nhiều kết quả đáng chú ý [69,70].

Kết quả sàng lọc hoạt tính chống ung thư phổi A549 của 80 loài thực vật thu hái ở Hoà Bình ở nồng độ 100 μ g/ml đã thu được các kết quả sau: cao chiết methanol của lá cây *Meliosma pinnata*, lá và rễ cây *Goniothalamus vietnamensis* đã thể hiện hoạt tính gây độc tế bào rất mạnh với tỷ lệ tế bào sống sót từ 0 đến 4%. Hỗn hợp govietnin A và govietnin B từ rễ cây *Goniothalamus vietnamensis* có tác dụng kháng ung thư mạnh với giá trị ED₅₀ là 0, 29 μ g/ml [71].

Cao chiết cây *Panax cipleamatus* có tác dụng tiêu diệt trên 90% tế bào ung thư, trong đó có spinasaponin A methylester kháng mạnh đối với 2 dòng tế bào ung thư bạch cầu cấp tính HL-60 và ung thư đại tràng HCT-116 với giá trị IC₅₀ tương ứng là 0,44 μ M và 0,63 μ M. Hợp chất này không những làm tăng lượng DR5 (protein liên quan đến sự tự chết của tế bào ung thư theo kiểu bên ngoài) mà còn kích hoạt sự tự chết theo kiểu bên trong qua việc làm giảm Bcl-2 (protein kháng tự chết và làm tăng Bax - protein gây tự chết tế bào) [71].

Nghiên cứu về sàng lọc hoạt tính gây độc tế bào trên dòng tế bào ung thư B16 của 50 thực vật trong các bài thuốc chống u và viêm khớp. Kết quả cho biết,

Cao chiết loài *Siegesbeckia orientals*, *Notopterygium incisium* và *Mimosa pudica* thể hiện hoạt tính gây độc tế bào ung thư B16 mạnh với các giá trị IC₅₀ 17,08; 11,99 và 13,17 μ g/ml tương ứng [72].

Hợp chất 8,13-epoxy-3-en-7-hydroxy-6,11-O-dibenzoyl-15,16-derodanolid từ cây *Scutellaria barbata* thể hiện hoạt tính tốt trên các dòng tế bào ung thư: MCF7 (ví, IC₅₀ = 2, 15 μ M), LU (phôi, IC₅₀ = 7, 2 μ M), LNCaP (tuyến tiền liệt, IC₅₀ = 7, 5 μ M) và KB (biểu mô, IC₅₀ = 8, 3 μ M) [73].

Ba hợp chất *ent*-kaurane là *ent*-(16S)-18 acetoxy-7 β -hydroxykauran-15-one; *ent*- α , 14 α -diacetoxy-7 β -hydroxykauran-16-en-15-one và *ent*-1 -acetoxy-7 β , 14 α -dihydroxy kauran-16-en-15-one từ *Croton tonkinensis* gây độc mạnh trên các dòng tế bào ung thư κ B, Hep-G2, LU và Fl ở mô hình thử nghiệm độc tính trên artemia với tỷ lệ chết sau 24h tương ứng là 100%, 96,7% và 96,7% ở nồng độ 100 μ g/ml [74].

Hai hợp chất alkaloid (10-methoxy-normacusin-B và 10-methoxy-affinisin-N(4)oxid) từ *Catharanthus roseus* gây độc mạnh đối với dòng tế bào ung thư gan Hep-G2 với giá trị IC₅₀ 1,95 và 1,77 μ g/ml tương ứng [75]. Hợp chất andrographslide

từ lá cây *Andrographis paniculata* ức chế sự phát triển của tế bào Hep-G2 (ung thư gan) với giá trị IC_{50} 3,06 $\mu\text{g/ml}$ [76].

Ricin từ hạt của cây *Ricinus communis* cho thấy độc tính tế bào mạnh chống lại các tế bào u ác tính; IC_{50} tại 48h là 34,1 ng/ml đối với tế bào SKMEL28 và 5,2 ng/ml đối với tế bào HaCaT. Ở nồng độ thấp (<3 ng/ml) tổng ricin không gây tử vong. Mặc dù ricin được liệt kê là chất độc nhưng nó có tiềm năng về y học để điều trị u ác tính [77].

Hợp chất degalactotigonin được phân lập từ cây *Solanum nigrum*, gây độc tính tế bào mạnh đối với những dòng tế bào ung thư tuyến tụy của con người (PANC1 và MIA-PaCa2) và các dòng tế bào ung thư phổi (A549, NCI-H1975 và NCI-H1299). Hợp chất này gây ra quá trình apoptosis trong tế bào PANC1 và A549. Nghiên cứu thêm về cơ chế hoạt động của nó trong PANC1 tế bào đã chứng minh rằng 1 ức chế đáng kể sự tăng sinh và di chuyển do EGF gây ra theo cách phụ thuộc vào nồng độ. Xử lý tế bào PANC1 bằng degalactotigonin gây bất giữ chu kỳ tế bào ở pha G0/G1. Hợp chất degalactotigonin tạo ra điều hòa giảm của cyclin D1 và điều hòa p21 theo cách phụ thuộc vào thời gian và nồng độ và ức chế quá trình phosphoryl hóa do EGF gây ra và kích hoạt các phân tử tín hiệu xuôi dòng EGFR như Akt và ERK [78].

1.3. Các nghiên cứu thuốc thực vật chống chủng *Vibrio* gây bệnh trong nuôi trồng thủy sản

1.3.1. Bệnh hoại tử gan tụy cấp (AHPND)

Bệnh hoại tử gan tụy cấp trên tôm (Acute hepatopancreatic necrosis disease-AHPND) hay còn gọi là Hội chứng tôm chết sớm (Early mortality syndrome- EMS). Hội chứng liên quan đến quản lý môi trường ao nuôi tôm, được gây ra bởi nhóm vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* mang gen độc lực PirA và PirB đã gây thiệt hại nghiêm trọng về sản lượng của ngành công nghiệp nuôi tôm ở Đông Nam Á và Mexico kể từ khi nó được phát hiện đầu tiên ở Trung Quốc từ năm 2009. Sau đó, bệnh này xuất hiện ở Việt Nam năm 2010, Malaysia năm 2011, Thailand năm 2012, Mexico năm 2013, Philippine năm 2014, Bangladesh và Hoa Kỳ năm 2017. Thiệt hại do AHPND ước tính hơn 1 tỷ USD/năm [79]

Vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* họ Vibrionaceae, mang đặc điểm gram (-), hình que thẳng hoặc hơi uốn cong, sống ở vùng nước biển ven bờ và cửa sông [80]. Có thời gian thế hệ ngắn trong khoảng 8-9 phút ở nhiệt độ 37°C, có thể tăng sinh lên đến nồng độ nhiễm trùng là 10^6 tế bào [79,81]. Nhiễm trùng vi khuẩn này thường

hiện diện với 1 trong 3 hội chứng lâm sàng chủ yếu là nhiễm trùng đường ruột chiếm 61%, nhiễm trùng vết thương chiếm 34% và nhiễm trùng máu chiếm 5% [82].

Bệnh hoại tử gan tụy cấp tính gây chết tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*) với tỷ lệ chết cao, có thể lên đến 100% trong vài ngày, chủ yếu ở giai đoạn từ 10-45 ngày thả nuôi [83,84].

Ở Việt Nam năm 2010, bệnh AHPND được ghi nhận ở các tỉnh như Ninh Thuận (16 ha), Sóc Trăng (1,719 ha), Bạc Liêu (346 ha) và Cà Mau (3,493 ha). Sau đó, bệnh này tiếp tục xảy ra và lan rộng đến 19 tỉnh thành năm 2012, 22 tỉnh thành năm 2015, 25 tỉnh thành năm 2017 với diện tích nuôi tôm bị nhiễm bệnh lần lượt tương ứng là 28.005 ha, 9.284 ha và 6.793 ha, làm giảm đáng kể sản lượng tôm nuôi của Việt Nam [85]. Năm 2018, trên địa bàn tỉnh Hà Tĩnh diện tích bị bệnh hoại tử gan tụy cấp trên tôm là 24,25ha, chiếm 0,9% diện tích nuôi [86].

Tuy nhiên, cho đến nay vẫn chưa có một biện pháp phòng trị nào thực sự hiệu quả. Vì vậy, các vấn đề liên quan đến các chủng *Vibrio* gây bệnh, các yếu tố kháng nguyên, độc tố cũng đã và đang được quan tâm nghiên cứu.

1.3.2. Các nghiên cứu thuốc thực vật chống chủng *Vibrio* gây bệnh trong NTTS

Hiện nay trên thế giới đang quan tâm nghiên cứu ứng dụng thảo mộc vào trong lĩnh vực nuôi trồng thủy sản, trong số đó phải kể đến Ấn Độ và Trung Quốc. Ở Ấn Độ, các nhà khoa học sử dụng Cao chiết ethanol của 3 loài *Ocimum sanctum*, *Withania somnifera* và *Myristica fragrans* trộn vào thức ăn với các nồng độ tăng dần (100, 200, 400 và 800 mg/kg thức ăn) cho cá Song (*Epinephelus tauvina*) bị nhiễm khuẩn *Vibrio harveyi* ăn, bước đầu thu được kết quả ức chế vi khuẩn *V. harveyi* tốt [87]. Một nghiên cứu khác tại Ấn Độ cho thấy cao chiết từ lá ổi và quả ổi có tác dụng chống lại các chủng vi khuẩn *Staphylococcus*, *Shigella*, *Salmonella*, *Bacillus*, *Escherichia coli*, *Clostridium* và *Pseudomonas* [88].

Cao chiết petroleum ether, chloroform, acetone, ethyl acetate, methanol và nước của 10 loài thực vật rừng ngập mặn: *Acanthus ilicifolius*, *Avicennia marina*, *Avicennia officinalis*, *Ceriops decandra*, *Rhizophora apiculata*, *Rhizophora mucronata*, *Sesuvium portulacastrum*, *Suaeda maritime*, *Clerodendrum inerme* và *Thespesia populneoides* được thử nghiệm *in vitro* chống vi khuẩn *Vibrio harveyi* được sử dụng làm mầm bệnh thử nghiệm. Kết quả cho biết, cao chiết acetone của lá *Acanthus ilicifolius* (đường kính vòng kháng khuẩn: 16,4 mm, MIC 125 µg/ml) thể hiện hoạt tính chống vi khuẩn *Vibrio* mạnh hơn các cao chiết từ lá khác. Cao chiết methanol của quả *Rhizophora apiculata*, thân cây *Avicennia marina* và *Avicennia*

ofcinalis thể hiện hoạt tính tốt nhất với đường kính vòng vô khuẩn lần lượt là 12,1 mm, 10,2 mm và 10,2 mm [89]

Cao chiết lá *Dialium guineense* thể hiện hoạt tính chống 14 trong tổng số 18 chủng *Vibrio* spp. được thử nghiệm ở nồng độ 20 mg/ml, đường kính vòng vô khuẩn từ 12 đến 20 mm, giá trị MIC trong khoảng từ 0,313 đến 5,0 mg/ml và giá trị MBC trong khoảng 0,625 đến 10 mg/ml. Kết quả định tính sơ bộ cho biết thành phần hóa học của lá loài này gồm các lớp chất tanin, alkaloid, flavonoid, saponin, steroid và glycoside tim. Các kết quả thu được từ nghiên cứu này có thể cung cấp bằng chứng về tính hữu ích của *D. guineense* trong việc điều trị các bệnh khác nhau do *Vibrio* spp. gây ra. [90].

Đến nay, hầu hết các nghiên cứu đều tập trung vào thử hoạt tính kháng khuẩn *Vibrio cholerae* và *Vibrio parahaemolyticus* ngoài ra, còn có một số nghiên cứu đề cập đến hoạt tính kháng khuẩn *Vibrio vulnificus* và *Vibrio harveyi*. Những nghiên cứu đã chỉ ra rằng *Allium sativum*, *Thymus vulgaris*, *Syzygium aromaum*, *Zataria multiflora*, *Zingiber officinale*, *Satureja bachtiarica* Bunge, *Punica granatum*, *Mentha spicata*, *Cumin cyminum*, *Eucalyptus globulus*, *Camellia sinensis*, *Rosmarinus officinalis*... là các loài quan trọng nhất thể hiện hoạt tính chống vi khuẩn *Vibrio*. Một số kết quả nghiên cứu được thống kê như bảng 1.1 [91].

Bảng 1.1. Một số thuốc thực vật kháng khuẩn *Vibrio* [91].

TT	Tên loài	Phần	Phần hoạt chất	<i>Vibrio</i> spp.	Diễn giải
1	<i>Albizia lebbek</i>	Vỏ	Dịch methanol	<i>V. cholera</i>	MIC và MBC 24 mg/ml d= 12 mm.
		Lá	Dịch acetone	<i>V. cholerae</i>	MIC 0,5 mg/ml và MBC 0,65 mg/ml
2	<i>Allium cepa</i>	Củ	Dịch ethanol	<i>V. cholera</i>	d= 25,83 mm. MIC 19,20 mg/ ml
3	<i>Allium sativum</i>	Củ	Dịch methanol	<i>V. harveyi</i>	d= 22 và 24 mm.
		Củ	Dịch nước	<i>V. cholerae</i>	MIC 10 mg/ml
4	<i>Aristolochia bracteata</i>	Lá	Dịch chloroform	<i>V. harveyi</i> <i>V. vulnificus</i>	d= 7,4 mm d= 7,0 mm
5	<i>Azadirachta indica</i>	Lá	Dịch methanol	<i>V. cholera</i>	d= 16,5 mm, MIC 2.5 mg/ml và MBC 10 mg/ml
		Lá	Dịch ethanol	<i>V. parahaemolyticus</i>	d= 12,8 mm, MIC 6,5 mg/ml và MBC 7 mg/ml
6	<i>Bauhinia variegata</i>	Vỏ	Dịch ethanol	<i>V. cholera</i>	d= 12 mm MBC 1,56 mg/ml
		Vỏ	Tinh dầu	<i>V. cholerae</i>	d= 24 mm

7	<i>Camellia sinensis</i>	Lá Lá	Dịch nước Dịch nước	<i>V. parahaemolyticus</i> <i>V. cholerae</i>	d= 16,33 mm MIC 0,25µg/µl
8	<i>Chaetomorpha antennina</i>	Lá	Dịch ethanol	<i>V. parahaemolyticus</i>	d= 28 và 36mm ở 150 µl và 200 µl.
9	<i>Cleistanthus collinus</i>	Lá	Dịch nước	<i>V. cholera</i>	d= 16mm MIC 177µg/µl
		Lá	Dịch acetone	<i>V. cholerae</i>	d= 13 mm MIC 0,40 mg/ml MBC 0,60 mg/ml
10	<i>Cordia globosa</i>	Trên mặt đất	Tinh dầu	<i>V. cholerae</i>	d= 13 mm MIC 0,060 mg/ml
11	<i>Costus spiralis</i>	Lá	Dịch ethanol	<i>V. cholera</i>	MIC 1–5 mg/ml
12	<i>Cuminum cyminum</i>	Hạt	Tinh dầu	<i>V. cholera</i>	d= 23 mm MIC 0,078 mg/ml MBC 1,25 mg/ml
		Hạt	Tinh dầu	<i>V. parahaemolyticus</i>	d= 11,67 mm MIC 12 mg/ml MBC 25 mg/ml
13	<i>Cymbopogon nardus</i>	Trên mặt đất	Tinh dầu	<i>V. cholera</i>	MIC 0.244 µg/ml
14	<i>Eucalyptus globulus</i>	Lá	Tinh dầu	<i>V. harveyi</i>	MIC 7,81µg/ml MBC 62.5µg/ml
		Hoa	Tinh dầu	<i>V. cholera</i>	d= 14,7 mm MIC 250 µg/ml MBC 1000 µg/ml
15	<i>Foeniculum vulgare</i>	Lá	Dịch methanol	<i>V. parahaemolyticus</i>	MIC 4 mg/ml MBC 8 mg/ml
16	<i>Helianthemum glomeratum</i>	Lá	Dịch methanol	<i>V. cholerae</i> <i>V. parahaemolyticus</i>	MIC 2,5 mg/ml MIC 2,5 mg/ml
17	<i>Jatropha neopaucifloa</i>	Vỏ	Nhựa	<i>V. cholerae</i>	d= 7,3 mm MIC 4,0 mg/ml MBC 6,0 mg/ml
18	<i>Mentha piperita</i>	Lá	Tinh dầu	<i>V. parahaemolyticus</i>	d= 18,20 mm MIC 0,0030 ppm
		Lá	Dịch ethanol	<i>V. cholerae</i>	MIC 6,25 ppm MBC 12,5 ppm
19	<i>Mentha pulegium</i>	Trên mặt đất	Tinh dầu	<i>V. cholerae</i>	d= 13 mm MIC 0,5 µg/ml MBC 1 µg/ml
		Lá	Tinh dầu	<i>V. cholerae</i>	d= 20 mm
20	<i>Mentha spicata</i>	Trên mặt đất	Tinh dầu	<i>V. alginolyticus</i>	d= 18,67 mm MIC 0,047 mg/ml
		Lá	Dịch ethanol	<i>V. cholerae</i>	d= 12 mm
21	<i>Myrtus communis</i>	Lá	Dịch ethanol	<i>V. cholerae</i>	d= 12,4 mm MIC 2 mg/ml MBC 20 mg/ml
		Lá	Tinh dầu	<i>V. parahaemolyticus</i>	d= 11,34 mm MIC 200 mg/ml MBC 200 mg/ml

22	<i>Nigella sativa</i>	Hạt hạt	Tinh dầu Dịch ethanol	<i>V. parahaemolyticus</i> <i>V. cholerae</i>	d= 23,9 mm d= 11,15 mm
23	<i>Ocimum basilicum</i>	Cả cây Rễ	Dịch ethanol Tinh dầu	<i>V. cholerae</i> <i>V. parahaemolyticus</i>	d= 1,4 cm MBC 3 mg/ml d= 15,3 mm MIC 250µg/ml
24	<i>Ocimum gratissimum</i>	Lá Trên mặt đất	Dịch nước Dịch ethanol	<i>V. parahaemolyticus</i> <i>V. cholerae</i>	d= 15 mm. MIC 1.25 mg/ml MBC 5 mg/ml d= 12,5 mm ở nồng độ 1000 µg/ml
25	<i>Origanum majorana</i>	Trên mặt đất	Tinh dầu	<i>V. alginolyticus</i>	d= 12,33 mm MIC 0,39 mg/ml MBC 3,125 mg/ml
26	<i>Petroselinum crispum</i>	Trên mặt đất Lá	Tinh dầu Tinh dầu	<i>V. cholerae</i> <i>V. cholera</i>	d= 12 mm MIC 0,011 mg/ml MBC 11,25 mg/ml d= 15 mm MIC 0,125 mg/ml MBC 0,125 mg/ml
27	<i>Punica granatum</i>	Quả Lá	Dịch methanol Dịch nước	<i>V. cholerae</i> <i>V. parahaemolyticus</i>	d= 26 mm d= 11 mm MIC 10 mg/ml
28	<i>Rosmarinus officinalis</i>	Trên mặt đất Lá	Tinh dầu Tinh dầu	<i>V. alginolyticus</i> <i>V. alginolyticus</i>	d= 10.66 mm MIC 0,625 mg/ml MBC 2,5 mg/ml d= 26,33 mm MIC 25 mg/ml MBC 50 mg/ml
29	<i>Satureja bachtiarica Bunge</i>	Trên mặt đất Lá	Tinh dầu Tinh dầu	<i>V. parahaemolyticus</i> <i>V. parahaemolyticus</i>	MIC 31µg/ml MBC 31µg/ml d= 16,2 mm MIC 12,5 mg/ml MBC 25 mg/ml
30	<i>Solanum nigrum</i>	Lá Quả	Dịch ethanol Dịch methanol	<i>V. cholera</i> <i>V. cholerae</i>	MIC 50 ppm MBC 100 ppm MIC 8 mg/ml MBC 12 mg/ml.
31	<i>Spondias mombin</i>	Lá	Dịch ethanol	<i>V. cholerae</i>	d= 22 mm. MIC 83,13 mg/ml MBC 166,25 mg/ml
32	<i>Stevia rebaudiana</i>	Lá Lá	Dịch ethyl acetate Dịch ethanol	<i>V. cholerae</i> <i>V. parahaemolyticus</i>	d= 18 mm d= 12,18 mm MIC 100 µg/disc
33	<i>Syringodium isoetifolium</i>	Lá Lá	Dịch ethanol Dịch methanol	<i>V. parahaemolyticus</i> <i>V. parahaemolyticus</i>	d= 7 mm MIC 1000 µg/ml MBC 1000 µg/ml
34	<i>Syzygium aromaticum</i>	Lá Lá	Tinh dầu Tinh dầu	<i>V. parahaemolyticus</i> <i>V. parahaemolyticus</i>	MIC 0,125% d= 10,33 mm MIC 2 mg/ml MBC 4 mg/ml,

35	<i>Thymus vulgaris</i>	Trên mặt đất	Tinh dầu	<i>V. parahaemolyticus</i>	d= 22,33 mm MIC 0,156 mg/ml MBC 0,312 mg/ml
		Lá	Tinh dầu	<i>V. alginolyticus</i>	d= 32 mm MIC 3,12 mg/ml MBC 3,12 mg/ml
36	<i>Tinospora cordifolia</i>	Trên mặt đất	Dịch ethanol	<i>V. parahaemolyticus</i>	d= 15 mm MIC 50 ppm
37	<i>Vitis vinifera</i>	Quả	Dịch methanol	<i>V. cholerae</i>	d= 6 mm
38	<i>Withania somnifera</i>	Lá	Dịch ethanol	<i>V. cholerae</i>	MIC 12,5 ppm MBC 25 ppm
		Rễ	Dịch methanol	<i>V. harveyi</i>	d= 24,3 mm
39	<i>Zataria multiflora</i>	Lá	Dịch methanol	<i>V. cholera</i>	d= 10 mm
		Trên mặt đất	Tinh dầu	<i>V. parahaemolyticus</i>	MIC 12,5 mg/ml MBC 31 và 125 µg/ml
40	<i>Zingiber officinale</i>	Rễ	Tinh dầu	<i>V. cholera</i>	d= 9 mm
		Cả cây	Dịch nước	<i>V. cholerae</i>	MIC 500 µg/ml

Dựa vào kết quả sàng lọc sơ bộ hoạt tính kháng sinh vi khuẩn *Vibrio* kết hợp với tìm hiểu tài liệu về kinh nghiệm sử dụng trong dân gian, phân bố, các nghiên cứu về thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của 7 đối tượng nghiên cứu chúng tôi nhận thấy: Chúng thể hiện hoạt tính kháng sinh tốt, với thành phần hóa học chủ yếu thuộc lớp chất terpenoid (diterpenoid và triterpenoid), flavonoid, alkaloid, steroid. Đây là nguồn hoạt chất đã được chứng minh có tác dụng kháng sinh và kháng ung thư rất tốt. Bên cạnh đó, đây đều là nguồn nguyên liệu phổ biến, dễ trồng ở Việt Nam, đáp ứng được yêu cầu sản xuất sản phẩm. Dựa trên đó, đề tài phân lập các hợp chất chính từ các đối tượng nghiên cứu để tiếp tục thử nghiệm hoạt tính kháng khuẩn *Vibrio* nhằm tìm ra được thành phần hóa học chính quyết định hoạt tính thảo dược. Định hướng nghiên cứu sâu hơn phát triển thành thuốc. Hơn nữa, kết hợp với ứng dụng mô hình sàng lọc ảo để tìm hiểu mối quan hệ giữa lý thuyết và thực nghiệm, từ đó tối ưu hóa quá trình phát triển thuốc của các đối tượng và đích đến nghiên cứu.

Trên cơ sở tham khảo tài liệu, các loài thực vật: Đơn châu chấu (*Aralia armata*), Bộ mắt (*Pouzolzia zeylanica*), Khổ sâm (*Croton tonkinensis*), Ké hoa đào (*Urena lobata*), Ké hoa vàng (*Sida rhombifolia*), Thồm lồm (*Polygonum chinense*), Thầu dầu (*Ricinus communis*), Cà trái vàng (*Solanum xanthocarpum*), Hàn the (*Desmodium heterophyllum*), Đơn buốt (*Biidens pilosal*), Nghệ vàng (*Curcuma longa*), Dầu giun (*Chenopodia abrosioides*) và Thuốc dẫu (*Euphorbia tithymaloides*) có những đặc trưng về các lớp chất diterpenoid, triterpenoid và polyphenol, phổ biến trong tự nhiên và được nhân dân ta sử dụng làm thuốc chữa bệnh chống nhiễm trùng,

kháng viêm, kháng khuẩn tốt. Đặc biệt, loài *Ricinus communis* chữa bệnh đường ruột cho thủy sản tốt. Loài *Pouzolzia zeylanica* chống giòi bọ. Loài *Croton tonkinensis* chữa bệnh kiết lỵ, đau bụng đi ngoài. Thêm nữa, một vài loại thảo dược như *Aralia armata*, *Polygonum chinense*, *Urena lobata*, *Euphorbia hirta*,...được sử dụng trong phòng trị bệnh cho động vật nuôi thủy sản, đây là nguồn nguyên liệu quý cho các nghiên cứu về thành phần hoá học và hoạt tính kháng khuẩn và ung thư.

1.4. Sàng lọc ảo dự đoán hoạt chất định hướng hoạt tính kháng khuẩn và gây độc tế bào

Trong các mô hình sàng lọc hoạt chất hiện đại, từ đầu những năm 2010 đã xuất hiện phương pháp sàng lọc ảo (virtual screening) và ngay lập tức đóng góp vai trò quan trọng trong lĩnh vực nghiên cứu tìm kiếm và phát triển thuốc. Phương pháp trên sử dụng các tiến bộ tin học trong lĩnh vực hóa sinh để sàng lọc ảo, tìm hiểu cơ chế hoạt động và dự đoán các hợp chất được cho là có hoạt tính mạnh trên những đích sinh học cụ thể. Phương pháp có ưu điểm là giúp giảm thiểu chi phí và thời gian trong quá trình phát hiện và phát triển thuốc. Quy trình thực hiện bao gồm nhiều bước theo tuần tự thông qua các tiêu chí sàng lọc khác nhau để từ đó thu hẹp dần đối tượng và lựa chọn các hợp chất có tiềm năng phát triển làm thuốc với những hoạt tính sinh học mong muốn [92,93].

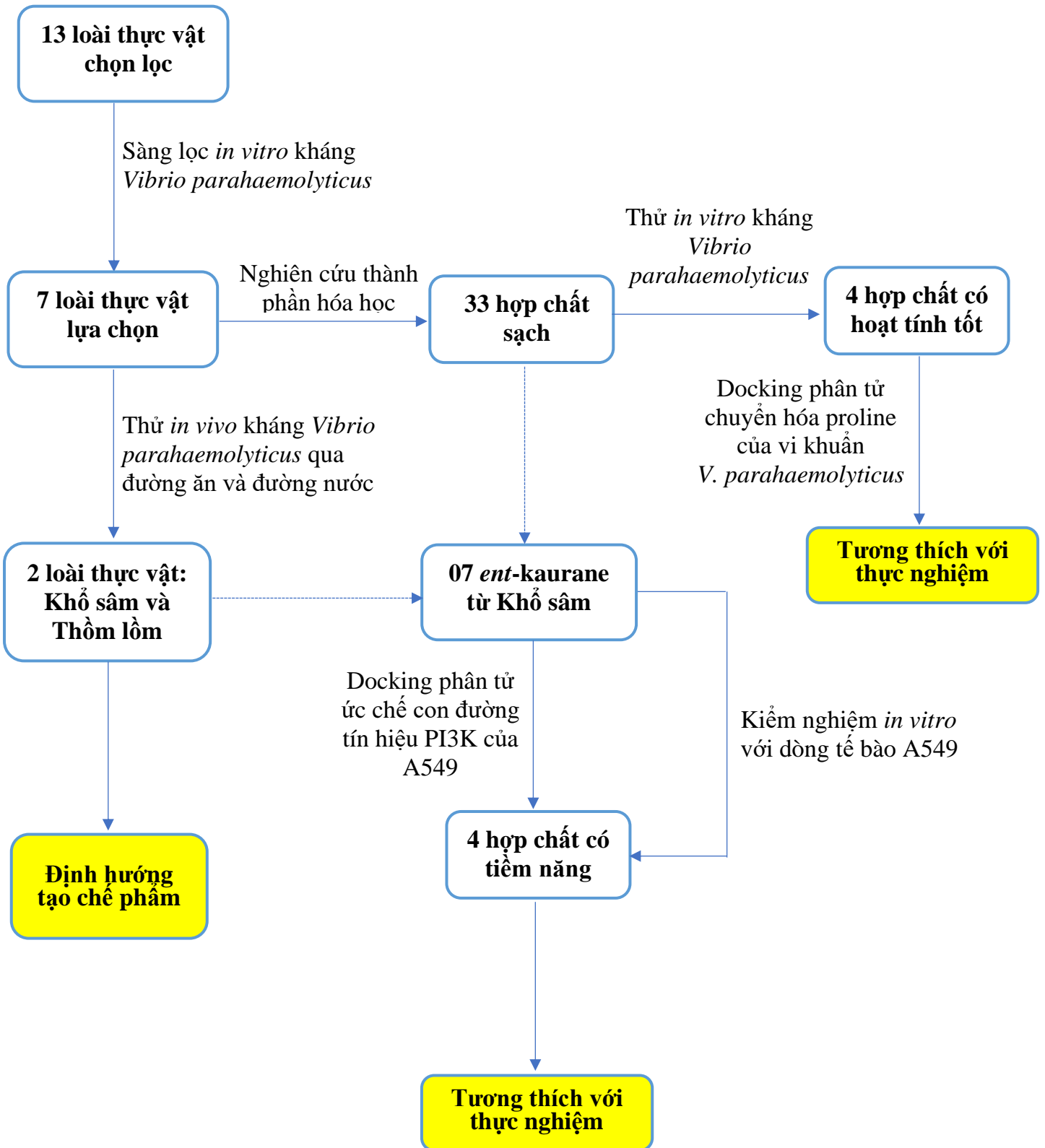
Docking phân tử (Molecular docking) là một phương pháp mô hình hóa sự tương tác giữa phối tử và một protein ở cấp độ nguyên tử. Từ đó, có thể mô tả, tìm hiểu về cơ chế hoạt động của các phối tử trong vùng liên kết của protein đích. Quá trình docking bao gồm hai bước cơ bản: dự đoán cấu hình liên kết của phối tử gồm vị trí và hướng của nó trong các liên kết này (thường được gọi là dock pose) và đánh giá ái lực liên kết của phối tử với protein đích. Trong số các công cụ dùng trong sàng lọc ảo, AutoDock 4.2.6 và Molegro Virtual Docker là hai công cụ được sử dụng nhiều nhất trong các công bố khoa học với hơn 13,000 trích dẫn trong 10 năm qua. Đây là các phần mềm mã nguồn mở được phát triển bởi Viện nghiên cứu của các chính phủ trên thế giới [93,94]. Từ những yếu tố trên, luận án sử dụng các phần mềm này trong sàng lọc ảo, dự đoán hoạt chất tiềm năng định hướng hoạt tính kháng khuẩn và gây độc tế bào theo các hướng sau:

Hoạt tính kháng u: Ung thư mang đến nhiều hệ lụy về sức khỏe, có thể gây ra cái chết cho bệnh nhân nếu không được chẩn đoán và điều trị kịp thời. Theo GLOBOCAN 2020, 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). Ở Việt Nam có hơn 182 ngàn ca mắc mới và gần 115 ngàn ca tử vong do ung thư hàng năm. Ung thư thường gặp nhất là gan (14,5%), phổi (14,4%) và vú (11,8%) [95]. Tại Việt Nam, ung thư phổi là bệnh ung thư thường gặp thứ 1 ở nam giới và đứng thứ 2 trong những bệnh ung thư ở phụ nữ hay mắc [95]. Qua nghiên cứu, các nhà khoa học trên thế giới đã xác định phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) là một con đường truyền tín hiệu nội bào quan trọng để các tế bào tồn tại và phát triển. Tuy nhiên, sự đột biến, khuếch đại và dịch chuyển có thể làm sai lệch con đường tín hiệu PI3K thông thường của tế bào dẫn đến làm tế bào ung thư tăng trưởng mạnh, kháng thuốc và di căn đến các cơ quan trọng yếu như não, phổi, gan. Chính vì vậy, nghiên cứu thuốc điều trị chống ung thư nói chung và ung thư phổi nói riêng định hướng tác dụng trên con đường tín hiệu PI3K là một hướng nghiên cứu mới có nhiều ý nghĩa và hiệu quả [96,97].

Hoạt tính kháng khuẩn *Vibrio parahaemolyticus*: Proline dehydrogenase (PDH) là một enzyme điều hòa và giới hạn tỷ lệ quan trọng trong quá trình tích lũy và chuyển hóa proline, được công nhận rộng rãi là đóng vai trò quan trọng trong việc tự tổ chức protein. Sự vắng mặt của proline có thể dẫn đến rối loạn cấu trúc protein. Đã có nhiều nghiên cứu chỉ ra proline là chất điều hòa chính của nhiều quá trình sinh hóa và sinh lý trong tế bào vi sinh vật [98]. Tuy nhiên, cho đến nay số công trình nghiên cứu tìm hiểu mối tương quan hoạt tính – cấu trúc của các hoạt chất định hướng trên đích sinh học này vẫn còn hạn chế. Do đó, trong luận án này, cơ chế hoạt động trên đích sinh học PDH của các hoạt chất có hoạt tính kháng khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* sẽ được làm rõ sử dụng phương pháp docking phân tử.

Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU






SƠ ĐỒ NGHIÊN CỨU CHUNG CỦA LUẬN ÁN





2.1. Nguyên liệu và phương pháp phân lập xác định cấu trúc hóa học

2.1.1. Mẫu thực vật

Mẫu thực vật được TS. Nguyễn Quốc Bình, Bảo tàng thiên nhiên –VAST xác định tên khoa học, tiêu bản lưu tại Viện Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật - VAST.

Bảng 2.1. Danh sách các loài thực vật nghiên cứu (nguồn ảnh internet)

STT	Mẫu	Tên khoa học và mẫu tiêu bản	Ảnh mẫu	Địa điểm và thời gian thu mẫu
1	Đơn châu chấu (AA)	<i>Aralia armata</i> (họ Nhân sâm Araliaceae) AA0315		Sơn Dương – Tuyên Quang Tháng 03/2015
2	Bộ mắt (PZ)	<i>Pouzolzia zeylanica</i> (Họ Gai Urticaceae) PZ0315		Đại Từ – Thái Nguyên Tháng 03/2015
3	Khô sâm (CT)	<i>Croton tonkinensis</i> Gagnep. (Họ Thầu dầu Euphorbiaceae) CT0715		Nho Quan – Ninh Bình Tháng 07/2015

4	Ké hoa đào (UL)	<i>Urena lobata</i> L. (Họ Bông Malvaceae) UL1016		Sơn Dương – Tuyên Quang Tháng 10/2016
5	Thồm lồm (PC)	<i>Polygonum chinense</i> I. (Họ Rau răm Polygonaceae) PC1015		Sơn Dương – Tuyên Quang Tháng 10/2015
6	Thầu dầu (RC)	<i>Ricinus communis</i> L. (Họ Thầu dầu Euphorbiaceae) RC0815		Mê Linh – Hà Nội Tháng 08/2015
7	Cà trái vàng (SX)	<i>Solanum xanthocarpum</i> Schrad Wendl., (Họ Cà Solanaceae) SX0815		Đà Lạt – Lâm Đông Tháng 08/2015

2.1.2. Phương pháp xử lý và chiết mẫu

Các mẫu sau khi thu hái đều được xử lý chung theo các bước như sau:

Mẫu sau khi thu hái, thái nhỏ, phơi trong bóng mát, được sấy khô ($< 60\text{ }^{\circ}\text{C}$) đến khi khối lượng không đổi, sau đó đem nghiền nhỏ. Mẫu được ngâm 3 lần với ethanol trong thiết bị siêu âm. Dịch tổng thu được cất kiệt dung môi thu được cao ethanol. Cao ethanol bổ sung nước và chiết lần lượt với *n*-hexane và etyl axetat. Sau khi cất loại dung môi thu được cao dịch *n*-hexane, etyl axetat và nước tương ứng.

2.1.3. Phương pháp phân lập các hợp chất từ mẫu cây

Việc phân lập các cao chiết thực vật được thực hiện bằng các phương pháp sắc ký khác nhau: sắc ký lớp mỏng (TLC), sắc ký lớp mỏng điều chế (PTLC), sắc ký cột thường (CC) với pha tĩnh là silica gel (Merck), sắc ký cột pha đảo với pha tĩnh là YMC RP 18 (Merck) và sắc ký ray phân tử với pha tĩnh là sephadex LH-20 (Merck).

Sắc ký lớp mỏng (TLC): được thực hiện trên bản mỏng DC-Alufolien 60 F254 (0,25 mm; Merck) và RP-18 F254S (0,25 mm; Merck). Phát hiện các chất bằng đèn tử ngoại (bước sóng 254 và 365 nm) hoặc dùng thuốc thử là dung dịch vanilin - H_2SO_4 5% trong methanol.

Sắc ký cột thường (CC): pha tĩnh là silica gel 60 (cỡ hạt 0,040 - 0,063 mm) của hãng Merck, dung môi là loại công nghiệp. Sắc ký cột ray phân tử với pha tĩnh là sephadex LH-20. Sắc ký cột pha đảo sử dụng loại YMC RP-18 (cỡ hạt 30-50 μm).

2.1.4. Phương pháp xác định cấu trúc hóa học

Cấu trúc hóa học của các chất được xác định dựa vào việc nghiên cứu các đặc trưng hóa lý (R_f trên bản mỏng, trạng thái, màu sắc, điểm nóng chảy) kết hợp với phân tích phổ NMR, MS của các chất và so sánh với dữ liệu trong tài liệu tham khảo. Các thiết bị hiện đại và phương pháp sử dụng xác định cấu trúc hóa học các chất gồm:

Điểm nóng chảy (mp): đo trên máy Kofler micro-hotstage tại Viện Hóa học - VAST.

Phổ khối lượng (MS): Phổ khối LC-ESI-MS được đo trên máy Agilent 1200 TRAP. Phổ khối HR-ESI-MS được đo trên máy FT-ICR-Mass spectrophotometer tại Viện Hóa học - VAST.

Phổ cộng hưởng từ nhân (NMR): được đo trên máy Bruker avance 500 MHz tại Viện Hoá học – VAST với các kỹ thuật: 1D-NMR (^1H -, ^{13}C -NMR và DEPT) và 2D-NMR (HSQC, HMBC, COSY và NOESY). Các loại dung môi được sử dụng: DMSO-d_6 , CD_3OD và CDCl_3 .

2.2. Phương pháp thử nghiệm hoạt tính kháng vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus*

2.2.1. Vật liệu

Chủng vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* KC12.020 được cung cấp bởi Trung tâm Quan trắc môi trường và bệnh thủy sản Miền Bắc, Viện NCNTTS I.

Chủng *Vibrio parahaemolyticus* ST8T được cung cấp bởi Trung tâm Quan trắc Môi trường và Bệnh Thủy sản Nam Bộ, Viện NCNTTS II.

Tôm thẻ chân trắng được nuôi từ tôm ấu trùng đến khi đạt trọng lượng từ 2-3 gram, được cung cấp từ Trung tâm Nghiên cứu Hải sản miền Bắc, Viện NCNTTS I và Trung tâm Giống Hải sản Nam Bộ, Viện NCNTTS II.

2.2.2. Phương pháp thử nghiệm hoạt tính kháng khuẩn *in vitro*

2.2.2.1. Phương pháp lập kháng sinh đồ trên đĩa thạch của Kirby-Bauer [99]

Chủng vi khuẩn (nồng độ 10^8 cfu/ml) được trang đều trên các đĩa thạch MHA. Sử dụng nồng độ vi khuẩn đạt 10^8 cfu/ml trang lên đĩa lòng để thử kháng sinh đồ là phương pháp chuẩn, ở mật độ này đủ đảm bảo vi khuẩn phát triển kín đầy đĩa lòng, nếu mật độ thấp hơn vi khuẩn không mọc kín đĩa lòng, không đảm bảo lập kháng sinh đồ. Xác định mật độ vi khuẩn đạt 10^8 cfu/ml được thực hiện như sau: Lấy 1 khuẩn lạc vi khuẩn cho vào môi trường nuôi cấy tăng sinh lỏng Nutrient broth (100ml). Nuôi cấy trong điều kiện lắc ở 290 vòng/phút, nhiệt độ 29°C trong 18 tiếng. Sau đó kiểm tra mật độ vi khuẩn bằng máy so màu quang điện. Tiến hành đo bước sóng tương ứng $\text{OD}_{600\text{nm}} = 1$ có mật độ vi khuẩn tương ứng 10^8 cfu/ml, trong trường hợp này sử dụng mẫu chuẩn (blank) là môi trường Nutrient broth, vì vi khuẩn được nuôi cấy trong môi trường Nutrient Broth.

Sau khi đã có mật độ vi khuẩn cần thiết, tiến hành lập kháng sinh đồ. Sử dụng 1ml dung dịch huyền phù chứa vi khuẩn 10^8 cfu/ml trang đều lên đĩa thạch, sau đó nhỏ 20 μ l sản phẩm cao chiết thô với hàm lượng tương ứng + DMSO được nhỏ trên các đĩa giấy thấm vô trùng tiếp tục đặt trên đĩa thạch đã có vi khuẩn. Đối chứng âm DMSO được sử dụng. Sau đó đĩa thạch được ủ ủ ấm khoảng $27-29^{\circ}\text{C}$, sau 24 giờ đĩa thạch được lấy để đo đường kính vòng kháng khuẩn (d, mm). Nếu $d \leq 11$ mm: không thể hiện hoạt tính, d từ 12-15 mm: trung bình, $d \geq 16$ mm: nhạy.

2.2.2.2. Phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch của Chawee-pack (2015) [100]

Một khuẩn lạc đơn được tăng sinh trong 100 ml NB+1,5% NaCl, ủ ở 30°C , lắc 200 rpm, trong khoảng 3-4 giờ. Dịch vi khuẩn được kiểm tra $\text{OD}_{600\text{nm}}$ trong khoảng 0,6 - 0,7. Dựa vào phương trình hồi qui tương quan tuyến tính giữa chỉ số $\text{OD}_{600\text{nm}}$ và mật độ vi khuẩn (Mật độ vi khuẩn $\times 10^8$ CFU/ml = $9,4 \times \text{OD}_{600\text{nm}} - 3,6$) của thí nghiệm

trên để suy ra mật độ vi khuẩn tương ứng từ $2,04 \times 10^8$ CFU/ml đến $2,98 \times 10^8$ CFU/ml. Dịch vi khuẩn được pha loãng đến nồng độ vi khuẩn 10^6 CFU/ml, rồi trải 1 ml dịch vi khuẩn lên môi trường thạch MHA (Media, Ấn Độ), đặt vào tủ cấy vô trùng khoảng 5 phút để khô mặt thạch. Tẩm 60 μ l (2% trong cồn tuyệt đối, w/v) mỗi cao chiết thực vật vào trong đĩa giấy (đường kính 0,6 cm; Công ty Nam Khoa) để khô cả 2 mặt đĩa giấy trong tủ cấy vô trùng. Đặt đĩa giấy lên môi trường thạch đã trải vi khuẩn, ủ 30°C từ 18-24 giờ. Hiệu quả được đánh giá dựa vào vòng vô khuẩn bao quanh đĩa giấy với đường kính vùng ức chế sự phát triển vi khuẩn dựa theo Lorian (1995): Kháng ≤ 9 mm; kháng vừa $\geq 10-13$ mm; nhạy ≥ 14 mm.

2.2.3. Phương pháp thử nghiệm hoạt tính kháng khuẩn in vivo

2.2.3.1. Xây dựng đường chuẩn mật độ vi khuẩn [101]

Mật độ *Vibrio parahaemolyticus* (VP) dùng cho thí nghiệm cảm nhiễm thực nghiệm được ước lượng bằng cách xây dựng phương trình hồi vi tuyến tính ($Y=aX + b$) giữa các giá trị chỉ số mật độ quang (Optical Density) ở bước sóng 600 nm ($OD_{600\text{nm}}$) và mật độ vi khuẩn (CFU/ml) nuôi cấy trong môi trường Nutrient Broth bổ sung 1,5% NaCl (NB+1,5%NaCl) được đếm số tế bào sống tương ứng. VP được cấy ria lên môi trường TCBS từ ống giống. Một khuẩn lạc đơn được tăng sinh trong 100 ml NB+1,5%NaCl, ủ 30°C , trong 2 giờ, lắc 200 rpm. Chuyển mỗi 1 ml dịch nuôi cấy vào 4 bình khác nhau có chứa 100 ml môi trường NB+1,5%NaCl. Sau đó, 4 bình này được ủ ở 30°C , lắc 200 rpm, trong khoảng 2-3 giờ, và được đo các chỉ số $OD_{600\text{nm}}$ độc lập với nhau, bao gồm 0,6; 0,7; 0,8; và 0,9 tương ứng cho mỗi bình. Mỗi giá trị $OD_{600\text{nm}}$ của dịch nuôi cấy vi khuẩn được đếm số lượng tế bào sống bằng cách pha loãng dãy nồng độ theo cơ số 10 từ 10^{-1} đến 10^{-6} , mỗi nồng độ pha loãng (10^{-4} , 10^{-5} , và 10^{-6}) được dùng để trải trên 3 đĩa môi trường thạch TCBS với thể tích 0,1 ml trên mỗi đĩa. Đĩa thạch được ủ ở 30°C trong thời gian 18-24 giờ. Đếm các đĩa có khuẩn lạc mọc rời có số lượng từ 30 đến 300.

2.2.3.2. Thí nghiệm xác định giá trị LC_{50}

Thí nghiệm được thực hiện dựa theo phương pháp của APHA (2005) [102]. Thí nghiệm được bố trí 5 nồng độ cao chiết khổ sâm nằm trong khoảng gây độc được xác định từ thí nghiệm thăm dò. Nghiệm thức đối chứng, tôm được cho ăn thức ăn không trộn với cao chiết. Mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần trong bể nhựa 90 lít có chứa 30 lít nước biển, mỗi bể thí nghiệm có 20 con tôm. Tôm được cho ăn 3 lần/ngày với tỷ lệ 3% trọng lượng thân, các bể được sục khí liên tục, không thay nước, và tôm chết được vớt ra ngay để không ảnh hưởng xấu đến chất lượng nước trong suốt thời

gian thí nghiệm. Ghi nhận số tôm chết hàng ngày và theo dõi trong suốt 96 giờ để xác định giá trị LC₅₀ (nồng độ gây chết 50%) bằng chương trình máy tính (Stephan & Rodgers, 1985) theo hướng dẫn của ASTM (American Society for Testing and Materials, Philadelphia) (1993) [103,104].

2.2.4. Thử nghiệm hoạt tính gây độc tế bào [105]

2.2.4.1. Dòng tế bào và môi trường nuôi cấy

Dòng tế bào ung thư phổi người A549 được lấy từ Trung tâm Dinh dưỡng và nguyên liệu Dược phẩm, Đại học Myongji, Hàn Quốc và được nuôi cấy trong môi trường dung dịch Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Hyclone, USA) bổ sung 10% huyết thanh bào thai bò (Hyclone), penicillin 100 U/ml và streptomycin 100 µg/ml ở 37°C trong môi trường ẩm với 5% CO₂ và độ ẩm 95%.

2.2.4.2. Đánh giá hoạt tính gây độc tế bào

Hoạt tính gây độc tế bào được xác định theo phương pháp MTT. Tế bào ung thư phổi (A549) được cấy lên đĩa 96 giếng với thể tích 100 µL mỗi giếng, sau đó ủ trong 48 tiếng ở nhiệt độ 37°C để tế bào phát triển đạt 80% diện tích giếng. Tiếp theo, hợp chất nghiên cứu được cho vào ủ với tế bào ở 4 nồng độ khác nhau gồm 100, 10, 5, và 1 µg/ml. Hợp chất oxaliplatin được sử dụng làm chất đối chứng dương. Mỗi hợp chất được thử nghiệm 3 lần và mỗi lần trên 3 giếng để giảm thiểu sai số. Nồng độ ức chế 50% (IC₅₀) được tính sử dụng phần mềm Graphpad Prism software (Graphpad Software, Inc. San Diego, CA, USA).

❖ Tất cả các thí nghiệm được thực hiện ít nhất ba lần lặp lại. Các giá trị được biểu thị bằng độ lệch chuẩn trung bình (\pm SD). Nồng độ ức chế tối đa một nửa (IC₅₀) được xác định bằng phần mềm Graphpad Prism (Graphpad Software, Inc. San Diego, CA, USA). Sự khác biệt được phân tích bằng cách sử dụng Student's t-test. Sự khác biệt với P <0,05 hoặc P <0,001 được coi là có ý nghĩa thống kê.

2.3. Phương pháp mô phỏng lắp ghép phân tử

2.3.1. Docking phân tử trên đích tác dụng PDH [98]

2.3.1.1. Chuẩn bị cấu trúc protein

Cấu trúc tinh thể của proline dehydrogenase - PDH (PDB ID: 2EKG) được lấy từ cơ sở dữ liệu Protein Data Bank. Các hợp chất flavonoid và diterpenoid dùng trong nghiên cứu này được xây dựng cấu trúc ba chiều sử dụng phần mềm MarvinSketch 19.27.0 và PyMOL 2.2.2. Cực tiểu hóa năng lượng các hợp chất sử dụng phần mềm Gabedit 2.5.0. Chất ức chế PDH đã biết là naucleidinal được sử dụng làm chất chuẩn.

2.3.1.2. Mô phỏng docking phân tử

Các mô phỏng được thực hiện bằng phần mềm AutoDock 4.2.6. Phần mềm Graphical User Interface program "Auto-Dock Tools" được sử dụng để chuẩn bị, xử lý và phân tích các mô phỏng đã thực hiện. Mô hình enzyme PDH (PDB ID: 2EKG) được chuẩn bị cho mô phỏng tương tác bằng cách gán điện tích, các tham số hòa tan và hydro cho protein. Các phân tử nước và phối tử mẫu được loại bỏ khỏi phân tử protein để biến nó thành một thụ thể tự do. Vì các phối tử (hợp chất nghiên cứu) không phải là peptide, nên điện tích Gasteiger được tính và các hydro không phân cực được hợp nhất. Các tham số hòa tan được gán cho protein sử dụng tham số mặc định. Hộp lưới vùng mô phỏng được tạo ra xung quanh vùng liên kết phối tử. Tất cả mô phỏng này được thực hiện sử dụng CPU Intel Core™ i7-9700 @ 3,60 GHz với RAM 32 GB DDR4.

2.3.2. Docking phân tử trên đích tác dụng con đường tín hiệu PI3K [106,107]

2.3.2.1. Chuẩn bị cấu trúc protein và ligand

Cấu trúc tinh thể của các protein trong con đường tín hiệu PI3K gồm AKT (PDB ID: 1UNQ), mTOR (PDB ID: 4JSV), COX-2 (PDB ID: 3NT1), MDM2 (PDB ID: 4JRG) và PDK1 (PDB ID: 5L) được lấy từ cơ sở dữ liệu Protein Data Bank. Phần mềm Molegro Virtual Docker (MVD) (6.0, Molergo-a CLC Bio Company, Denmark) được sử dụng để chuẩn bị cấu trúc các protein bằng cách bổ sung các liên kết, thứ tự liên kết, điện tích và trạng thái lai hóa. Quá trình này đã loại bỏ các phân tử nước và các ion kim loại sau đó thêm các liên kết hydro và các nguyên tử tripos trong bước tiếp theo. Thế năng tuyến tính từng đoạn (PLP) được áp dụng để cực tiểu các chuỗi bên cho các tương tác hydro và steric. Thế năng Coulomb được sử dụng cho các lực tĩnh điện với mạch carbon chính giữ cố định và các góc xoắn khác nhau. Kích thước vùng mô phỏng liên kết là khối hộp có kích thước 1,2 Å và khoảng cách điểm 0,8 Å. oxaliplatin được dùng làm chất chuẩn so sánh.

2.3.2.2. Mô phỏng docking phân tử

Để tính điểm cho các hợp chất, hệ thống tính điểm MolDock Score [GRID] của phần mềm MVD được sử dụng. Thuật toán tìm kiếm sử dụng là Moldock SE (Simplex Evolution). Điểm số được tính như sau :

$$E_{(score)} = E_{(inter)} + E_{(intra)}$$

$$E_{(inter)} = \sum_{(a \in ligands)} \sum_{(b \in proteins)} \left[E_{(PLP)}(r_{ab}) + 332.0 \frac{q_a q_b}{4r_{ab}^2} \right]$$

Trong đó: $E_{(score)}$ = năng lượng docking; $E_{(inter)}$ = năng lượng tương tác protein-ligand

Điểm số các hợp chất sau đó được dùng để xếp hạng các cấu hình liên kết, cấu hình có điểm số cao nhất sẽ được sử dụng để tính ái lực liên kết. Quy trình được áp dụng cho toàn bộ các hợp chất và tất cả các đích protein. Ái lực liên kết của cấu hình liên kết tốt nhất đối với từng hợp chất sẽ được đánh giá sử dụng Molregio Data Modeller 3.0(MDM).

2.3.2.3. Tính toán các liên kết không phân cực

Các amino acid tham gia vào hình thành liên kết không phân cực được phân tích bằng phần mềm Ligplot⁺ v2.1 cho toàn bộ các hợp chất nghiên cứu cùng chất chuẩn.

Chương 3. THỰC NGHIỆM

3.1. Thân và lá Đơn châu chấu (*Aralia armata*)

3.1.1. Thu nhận các cao chiết từ thân và lá Đơn châu chấu

Thân và lá *Aralia armata* được sấy khô, xay nhỏ thu được 2,4kg bột mẫu khô, đem ngâm chiết với ethanol, ở nhiệt độ thường, trong thiết bị chiết siêu âm. Dịch chiết được lọc, gom lại và cất loại dung môi thu được cao chiết tổng của cây Đơn châu chấu (300g). Cao tổng sau đó được tiến hành chiết phân bố lần lượt với *n*-hexane, etyl axetat, methanol thu được các dịch chiết tương ứng. Cất loại dung môi dưới áp suất giảm thu được các cao chiết tương ứng là **AAH** (Cao *n*-hexane, 20g), **AAE** (Cao etyl acetate, 30g), **AAM** (Cao methanol, 220g).

3.1.2. Phân lập và tinh chế các hợp chất từ thân lá Đơn châu chấu

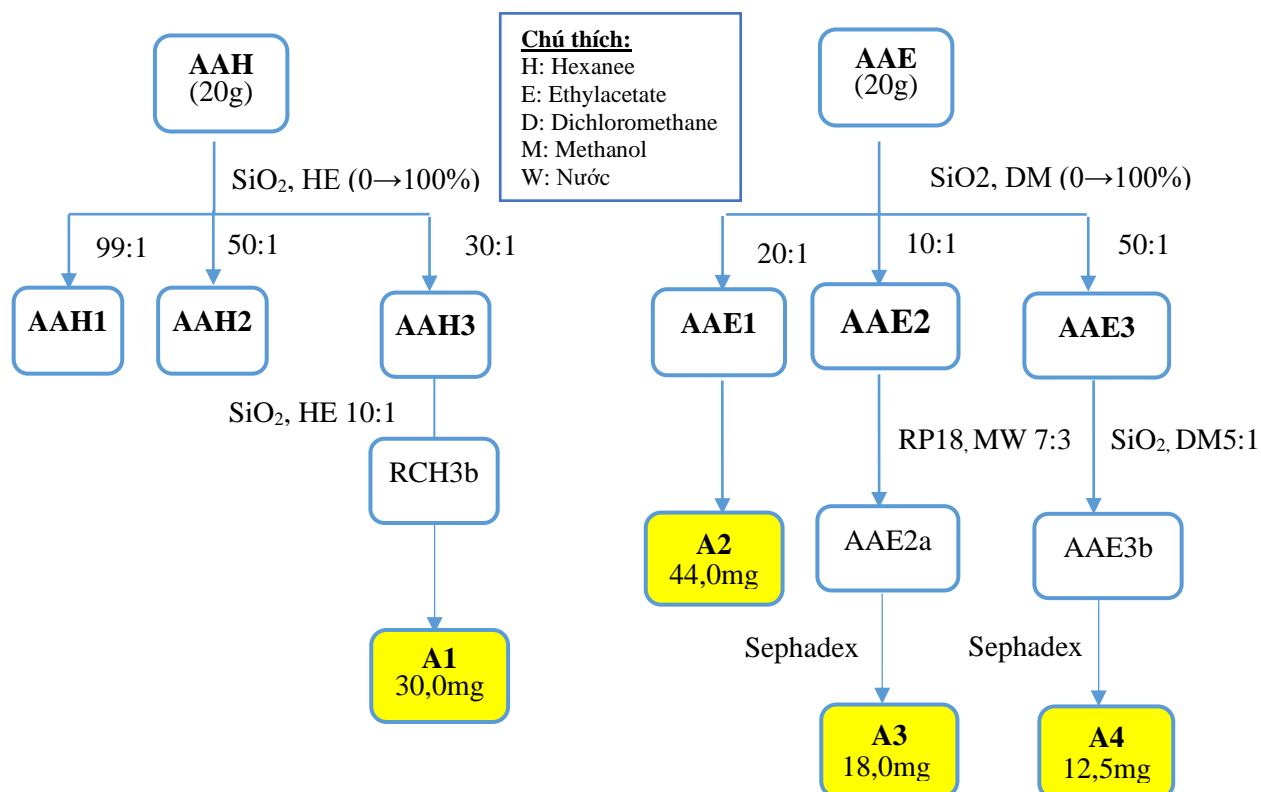
Sử dụng 20g cao *n*-hexane (**AAH**) được tách trên cột silica gel với hệ dung môi *n*-hexane-etyl acetate, và hàm lượng etyl axetat tăng dần từ 0→100% thu được 3 phân đoạn (**AAH1**→**AAH3**). Phân đoạn **AAH3** (1,2g) được tách lại trên cột silica gel với hệ dung môi *n*-hexane/EtOAc (40:1) được 3 phân đoạn nhỏ (**AAH3a**→**AAH3c**). Kết tinh phân đoạn **AAH3b** trong dung môi acetone thu được hợp chất β -sitosterol (30 mg: **A1**), dạng tinh thể hình kim, không màu, nhiệt độ nóng chảy 138-140 °C, $R_f = 0,45$ (hệ dung môi H/E: 4/1).

Lấy 20g cao etyl acetate (**AAE**) được tách trên cột silica gel bằng hệ dung môi clorofom-methanol (0→100% methanol) thu được 4 phân đoạn (**AAE1**→**AAE4**). Phân đoạn **AAE1** (1,3 g) được kết tinh lại trong dung môi methanol thu được hợp chất β -sitosterol-3-O- β -D-glucopyranoside (44,0 mg: **A2**) dạng bột, màu trắng, điểm chảy 269-270°C, $R_f = 0,65$ (hệ dung môi C/M : 9/1).

Phân đoạn **AAE2** (1,2g) được tách lại bằng cột RP-18, với hệ dung môi MeOH/H₂O (7:3) thu được 4 phân đoạn (**AAE2a**→**AAE2d**). Từ phân đoạn **AAE2a** tinh chế lại bằng Sephadex LH-20 với dung môi methanol sau đó kết tinh lại trong acetone thu được oleanolic acid (18 mg: **A3**), dạng hình kim, không màu, điểm chảy: 262-263°C.

Phân đoạn **AAE3** (2,0g) được tinh chế lại trên cột silicagel với hệ dung môi chloroform/MeOH (5:1) được 3 phân đoạn (**AAE3a**→**AAE3c**). Phân đoạn **AAE3b**

được triển khai qua cột Sephadex LH-20 với dung môi methanol, thu được lirioidendrin (12,5 mg: **A4**), dạng hình kim, không màu, điểm chảy: 265-266 °C.



Sơ đồ 3.1. Phân lập các hợp chất từ thân lá cây Đơn châu chấu

- *Hợp chất β -sitosterol (A1):*

Tinh thể màu trắng. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 0,68 (3H, s, CH_3 -18); 1,01 (3H, s, CH_3 -19); 0,81-0,88 ($2 \times 3\text{H}$, d, $J = 7,7\text{Hz}$, CH_3 -26 và 27- CH_3); 0,83 (3H, t, $J = 7,3\text{Hz}$, 29- CH_3); 0,92 (3H, d, $J = 10,0\text{Hz}$, 21- CH_3); 3,52 (1H, m, H-3 α); 5,35 (1H, d, $J = 5,0\text{Hz}$, H-6), $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 37,3 (C-1); 31,7 (C-2); 71,8 (C-3); 42,3 (C-4); 140,8 (C-5); 121,7 (C-6); 31,9 (C-7); 33,9 (C-8); 50,2 (C-9); 36,5 (C-10); 21,1 (C-11); 39,8 (C-12); 42,3 (C-13); 56,8 (C-14); 24,3 (C-15); 28,3 (C-16); 56,1 (C-17); 11,9 (C-18); 19,4 (C-19); 36,2 (C-20); 18,8 (C-21); 34,0 (C-22); 26,2 (C-23); 45,9 (C-24); 29,2 (C-25); 19,8 (C-26); 19,1 (C-27); 23,1 (C-28); 11,9 (C-29).

- *Hợp chất β -sitosterol-3-O- β -D-glucopyranoside (A2):*

Chất bột màu trắng. $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, $\text{DMSO-}d_6$); δ (ppm): 4,20 (1H, d, $J = 8,0\text{ Hz}$, H-1'); 2,8 ~ 3,1 (4H, m); 3,57 (1H, m, H-3); 5,34 (1H, br s, H-6); 0,65 (3H, s, H-18); 0,93 (3H, s, H-19); 0,94 (3H, d, $J = 6,6\text{Hz}$, H-21); 0,83 (3H, d, $J = 7,1\text{Hz}$, H-29); 0,85 (3H, d, $J = 6,6\text{Hz}$, H-26); 0,80 (3H, d, $J = 6,6\text{Hz}$, H-27). $^{13}\text{C-NMR}$ (125MHz,

DMSO-*d*₆); δ (ppm): 37,6 (C-1); 29,9 (C-2); 76,8 (C-3); 39,1 (C-4); 140,6 (C-5); 121,3 (C-6); 32,2 (C-7); 32,3 (C-8); 50,7 (C-9); 37,1 (C-10); 21,4 (C-11); 40,2 (C-12); 42,7 (C-13); 57,2 (C-14); 23,9 (C-15); 28,5 (C-16); 56,5 (C-17); 12,0 (C-18); 19,2 (C-19); 35,6 (C-20); 19,0 (C-21); 34,4 (C-22), 26,7 (C-23); 46,4 (C-24); 29,7 (C-25); 19,9 (C-26); 19,5 (C-27); 23,5 (C-28); 12,1 (C-29); 100,9 (C-1'); 74,0 (C-2'); 76,2 (C-3'); 70,8 (C-4'); 76,9 (C-5'); 61,1 (C-6').

- *Hợp chất oleanolic acid (A3):*

Phổ ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 5,27 (1H, H-12), 3,23 (1H, dd, *J*= 12,5 và 4,0Hz, H-3), 2,83 (1H, dd, *J*= 13,5 và 4,0Hz, H-18), 1,13 (3H, s, 27-CH₃), 0,98 (3H, s, 25-CH₃), 0,92 (3H, s, 30-CH₃), 0,91 (3H, s, 29-CH₃), 0,90 (3H, s, 23-CH₃), 0,77 (3H, s, 24-CH₃), 0,75 (3H, s, 26-CH₃). ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 38,4 (C-1), 27,2 (C-2), 79,1 (C-3), 38,8 (C-4), 55,2 (C-5), 18,3 (C-6), 32,64 (C-7), 39,3 (C-8), 47,7 (C-9), 37,1 (C-10), 23,4 (C-11), 122,6 (C-12), 143,6 (C-13), 41,6 (C-14), 27,7 (C-15), 23,0 (C-16), 46,5 (C-17), 41,0 (C-18), 45,9 (C-19), 30,7 (C-20), 33,8 (C-21), 32,45 (C-22), 28,1 (23-CH₃), 15,6 (24-CH₃), 15,3 (25-CH₃), 17,1 (26-CH₃), 25,9 (27-CH₃), 183,0 (C-28), 33,1 (29-CH₃), 23,6 (30-CH₃).

- *Hợp chất liriiodendrin (A4):*

Phổ ESI-MS *m/z*: 743,1 [M+H]⁺

Dữ liệu phổ ¹H- và ¹³C-NMR của **A4** xem bảng 4.2 (trang 63)

3.2. Cành lá Khổ sâm (*Croton tonkinensis*)

3.2.1. Thu nhận các cao chiết từ cành lá Khổ sâm

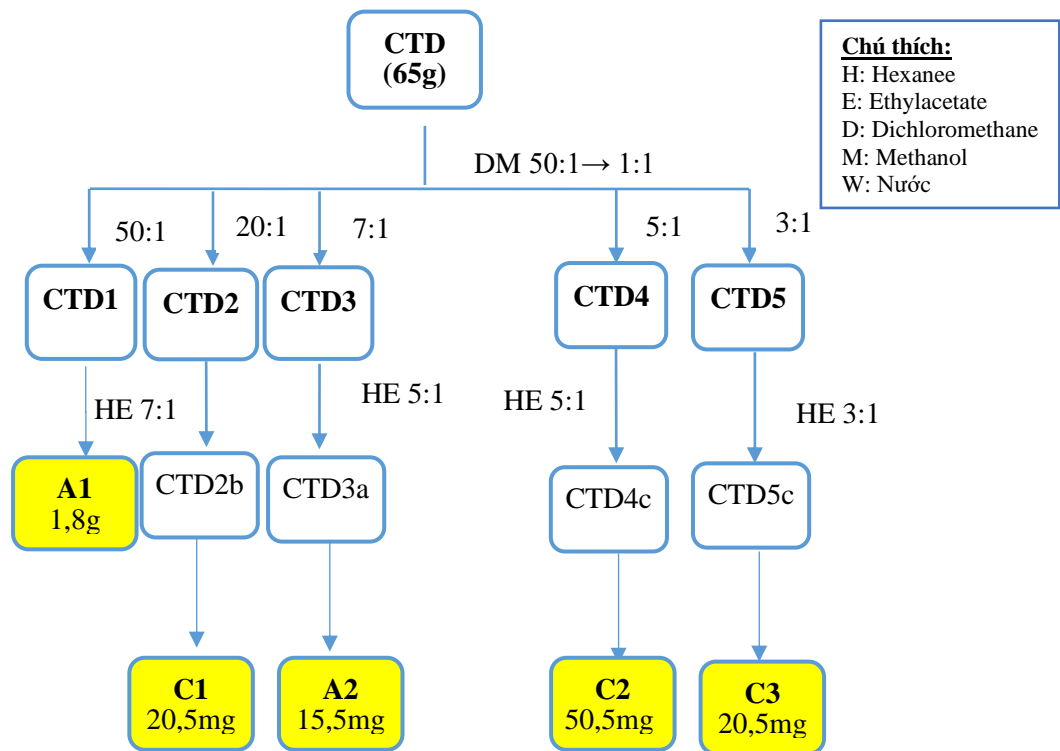
Cành lá Khổ sâm được sấy khô, xay nhỏ thu được 12 kg bột mẫu khô, đem ngâm chiết với ethanol (4 lần x 5L). Dịch chiết được gom lại và cất loại dung môi dưới áp suất giảm thu được cao chiết tổng của cành lá Khổ sâm (520g). Cao tổng sau đó được tiến hành chiết phân bố lần lượt với dichloromethane, ethyl acetate thu được ba dịch chiết tương ứng. Cất loại dung môi dưới áp suất giảm thu được các cao chiết tương ứng là **CTD** (Cao dichloromethane, 130g), **CTE** (Cao ethyl acetate, 160g), **CTM** (Cao methanol, 215 g).

3.2.2. Phân lập và tinh chế các hợp chất từ cành lá Khổ sâm

Lấy 65g cao dichloromethane (**CTD**) đem tách trên cột silica gel, rửa giải cột bằng hệ dung môi dichloromethane-methanol tăng dần theo độ phân cực (50:1 → 1:1) thu được 5 phân đoạn (**CTD1** → **CTD5**).

Phân đoạn **CTD1** được kết tinh với dung môi acetone thu nhận được hợp chất β -sitosterol (1,8g, **A1**). Phân đoạn **CTD2** được phân tách trên cột silica gel bằng hệ dung môi *n*-hexane : ethyl acetate (tỷ lệ 7:1), thu được ba phân đoạn nhỏ từ CTD2a→CTD2c. Kết tinh lại phân đoạn CTD2b trong dung môi acetone thu được hợp chất *ent*-18-axetoxi-7 β -hydroxy-kauran-15-on (**C1**; 20,5 mg), dạng tinh thể hình kim không màu, $R_f = 0,55$ (hệ dung môi *n*-hexane : EtOAc 2:1).

Phân đoạn **CTD3** được tách lại trên cột silica gel với hệ dung môi *n*-hexane-EtOAc (5:1) thu được khối chất vô định hình. Khối chất này được kết tinh lại trong dung môi methanol thu được hợp chất β -sitosteryl 3-O- β -D-glucopyranoside dạng tinh thể hình kim không màu (15,5 mg: **A2**).



Sơ đồ 3.2. Phân lập các hợp chất từ cành lá cây Khổ sâm

Phân đoạn **CTD4** được tách trên cột silica gel bằng hệ dung môi *n*-hexane :ethyl acetate tỷ lệ (5:1), thu được ba phân đoạn nhỏ từ CTD4a→CTD4c. Kết tinh lại phân đoạn CTD4c trong dung môi acetone thu được hợp chất *ent*-1 α -axetoxi-7 β ,14 α -dihydroxykaur-16-en-15-on (**C2**; 50,5 mg), tinh thể hình kim không màu, $R_f = 0,42$ (hệ dung môi *n*-hexane : EtOAc 2:1).

Phân đoạn **CTD5** được phân tách trên cột silica gel bằng hệ dung môi *n*-hexane : ethyl acetate tỷ lệ (3:1), thu được ba phân đoạn nhỏ từ CTD5a→CTD5c. Kết tinh

lại phân đoạn CTD5c trong dung môi acetone thu được hợp chất *ent*-18-axetoxi-7 β -hydroxykaur-16-en-15-on (**C3**; 20,3 mg), dạng tinh thể hình kim màu vàng nhạt, $R_f = 0,40$ (hệ dung môi *n*-hexane : EtOAc 2:1).

- Hợp chất *ent*-18-axetoxi-7 β -hydroxy-kauran-15-on (**C1**)

Dữ liệu phổ ^1H - và ^{13}C -NMR của **C1** xem bảng 4.3 (trang 66)

- Hợp chất *ent*-18-axetoxi-7 β -hydroxykaur-16-en-15-on (**C3**):

^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3); δ (ppm): 5,94 (1H, t, $J=1,0\text{Hz}$, H-17 β); 5,25 (1H, t, $J=1,0\text{Hz}$, H-17 α); 4,00 (1H, dd, $J=4,5$ và $11,7\text{Hz}$, H-7 β); 3,84 (1H, d, $J=11,1\text{Hz}$, H-18 β); 3,62 (1H, d, $J=11,1\text{Hz}$, H-18 α); 3,08 (1H, m, H-13); 2,03 (1H, d, $J=2,3\text{Hz}$, H-14); 1,955 (1H, tdd, $J=2,7$ và $6,2\text{Hz}$, $13,2\text{Hz}$, H-12); 1,74 (1H, ddd, $J=3,2$; $3,1$ và $12,8\text{Hz}$, H-1 α); 1,67 (1H, ddd, $J=1,9$; $4,7$ và $11,8\text{Hz}$, H-6 β); 1,411 (1H, q, $J=12,0\text{Hz}$, H-6 α); 1,36 (1H, d, $J=4,3\text{Hz}$, H-3 α); 1,25 (1H, dd, $J=1,6$ và $12,3\text{Hz}$, H-5); 0,82 (3H, s, CH_3 -19), 1,11 (3H, s, CH_3 -20); 1,19 (1H, d, $J=8,5\text{Hz}$, H-9); 0,71 (1H, td, $J=0,9$ và $3,8\text{Hz}$, $12,9\text{Hz}$, H-1 β). ^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3); δ (ppm): 209,8 (C-15); 171,2 (OCOCH_3); 149,1 (C-16); 114,9 (C-17); 72,2 (C-18); 70,7 (C-7); 58,3 (C-8); 51,7 (C-9); 46,2 (C-5); 39,6 (C-10); 38,8 (C-1); 37,5 (C-13); 36,4 (C-4); 35,4 (C-3); 32,8 (C-12); 27,8 (C-14); 27,6 (C-6); 21,0 (CH_3CO); 18,1 (C-20); 17,9 (C-11); 17,5 (C-19); 17,5 (C-2).

- Hợp chất *ent*-1 α -axetoxi-7 β ,14 α -dihydroxykaur-16-en-15-on (**C2**)

Phổ khối EI-MS m/z : 377 $[\text{M}+\text{H}]^+$ tương ứng với công thức phân tử $\text{C}_{22}\text{H}_{32}\text{O}_5$.

Phổ ^1H -NMR (600 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm): 6,04 (d, 1H, $J=4,9$, OH); 6,16 (s, 1H, OH); 5,92 (s, 1H); 5,38 (s, 1H); 4,73 (s, 1H); 4,68 (m, 1H); 4,00 (td, 1H, $J=4,9$ và $12,4\text{Hz}$); 1,38 (dt, $J=4,1$ và $14,0\text{Hz}$); 2,91 (s, 1H); 1,84 (m, 1H); 1,51 (d, 1H, $J=8,8\text{Hz}$); 1,28 (dd, $J=5,8$ và $16,4\text{Hz}$); 1,24 (dd, $J=1,7$ và $12,4\text{Hz}$); 0,90 (s, CH_3); 0,83 (s, CH_3); 1,06 (s, CH_3).

Phổ ^{13}C -NMR (150MHz, DMSO) δ (ppm): 207,9 (C-1); 170,2 (COCH_3); 147,4 (C-16); 118,2 (C-17); 72,9 (C-1); 74,6 (C-7); 74,9 (C-14); 46,8 (d); 46,3 (C-9); 61,4 (C-8); 45,9 (C-13); 42,8 (C-10); 35,0 (C-3); 33,0 (C-4); 31,0 (C-12); 33,3 (C-18); 27,7 (C-6); 22,7 (C-2); 21,5 (C-19); 21,2 (CH_3CO); 18,6 (C-20); 16,8 (C-11).

- Hợp chất β -sitosterol-3-*O*- β -*D*-glucopyranoside (**A2**):

Dữ liệu phổ ^1H - và ^{13}C -NMR được trình bày như mục 3.1.2.

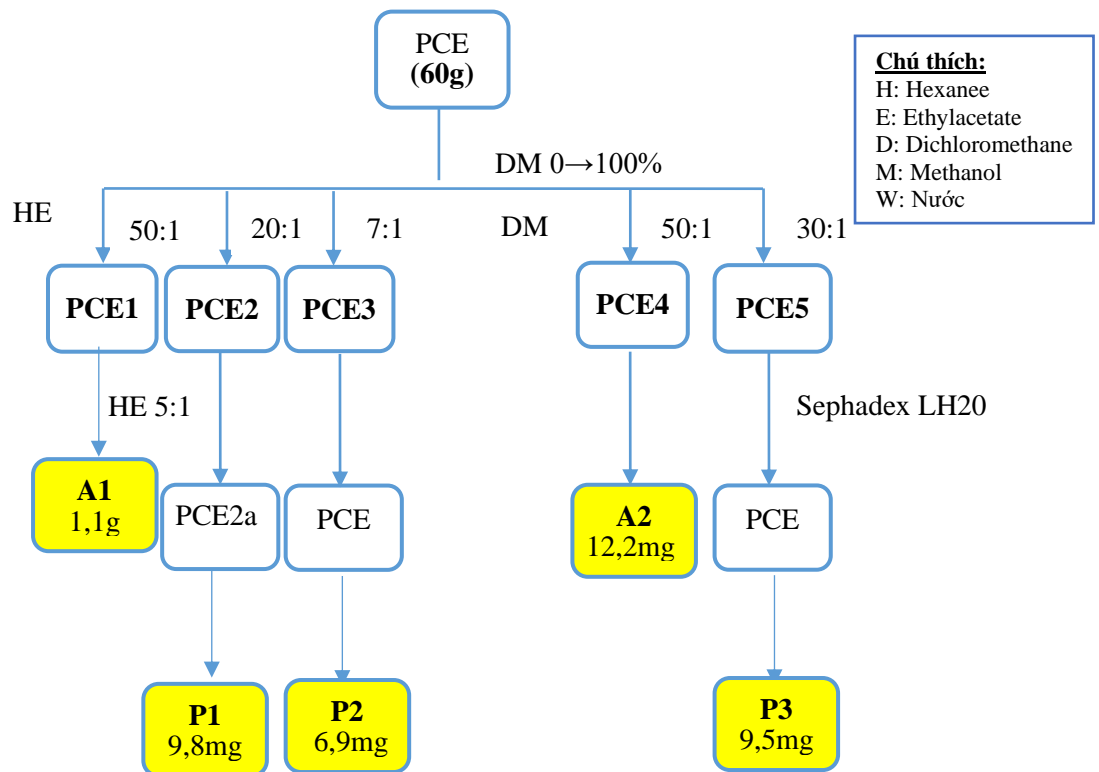
3.3. Cành lá Thồm lồm (*Polygonum chinense*)

3.3.1. Thu nhận các cao chiết từ cành lá Thồm lồm

Cành lá cây Thồm lồm được sấy khô, xay nhỏ thu được 3,1kg bột mẫu khô, đem ngâm chiết với ethanol. Dịch chiết được lọc, gom lại và cất loại dung môi thu được cao chiết tổng của cây Thồm lồm (180g). Cao tổng sau đó được tiến hành chiết phân bố lần lượt với ethyl acetate, methanol thu được các dịch chiết tương ứng. Cất loại dung môi dưới áp suất giảm thu được các cao chiết tương ứng là **TLE** (Cao ethyl acetate, 105g), **TLM** (Cao methanol, 70g).

3.3.2. Phân lập và tinh chế các hợp chất từ cành lá Thồm lồm

Cao chiết ethyl axetat **PCE** (60 g) được tiến hành tách thô trên sắc ký cột silica gel pha thường với hệ dung môi rửa giải CH₂Cl₂/MeOH (tỷ lệ MeOH tăng từ 0→100%) thu được 6 phân đoạn (**PCE1**→**PCE6**).



Sơ đồ 3.3. Phân lập các hợp chất từ cành lá cây Thồm lồm

Phân đoạn **PCE1** (4,8 g) được kết tinh với dung môi *n*-hexanee thu nhận được hợp chất β -sitosterol (1,1g, **A1**). Phân đoạn **PCE2** (3,2 g) phân tách trên sắc ký cột silica gel pha thường với hệ dung môi *n*-hexanee-EtOAc (5:1→2:1) sau đó kết tinh lại trong dung môi axeton thu được hợp chất quercetin (9,8 mg: **P1**). Phân đoạn **PCE3** (1,3 g) phân tách trên sắc ký cột silica gel pha thường với hệ dung môi *n*-hexanee-EtOAc (5:1→2:1) thu được sau đó kết tinh lại trong dung môi axeton thu được hợp

chất (-)-epicatechine (6,9 mg: **P2**). Phân đoạn **PCE4** (3,3g) được tách lại trên cột silica gel với hệ dung môi $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (99:1→50:1) thu được khối chất vô định hình. Khối chất này được kết tinh lại trong dung môi methanol thu được hợp chất β -sitosterol-3-O- β -D-glucopyranoside (12,2 mg: **A2**).

Phân đoạn **PCE5** (5,6 g) phân tách trên sắc ký cột silica gel pha thường với hệ dung môi $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (30:1→10:1) thu được 3 phân đoạn nhỏ (PCE5a→PCE5c). Phân đoạn PCE5a được tinh chế bằng sắc ký cột sephadex LH-20 với dung môi rửa giải methanol thu được hợp chất quercetin-3-O- β -D-glucopyranoside (9,5 mg: **P3**).

- Hợp chất β -sitosterol (**A1**) và β -sitosterol-3-O- β -D-glucopyranoside (**A2**):

Dữ liệu phổ ^1H - và ^{13}C -NMR được trình bày như mục 3.1.2.

- Hợp chất quercetin (**P1**):

Chất bột màu vàng. ^1H -NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$), δ (ppm): 12,48 (1H, s, 5-OH); 10,79 (1H, s, 7-OH); 9,59 (1H, s); 9,36 (1H, s); 9,30(1H, s) 7,67 (1H, d, $J = 2,5$ Hz, H-2'); 7,54 (1H, dd, $J = 2,0$ và 8,5 Hz, H-6'); 6,87 (1H, d, $J = 8,5$ Hz, H-5'); 6,40 (1H, d, $J = 1,5$ Hz, H-8); 6,18 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-6), ^{13}C -NMR (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$), δ (ppm): 146,8 (C-2); 135,7 (C-3); 175,8 (C-4); 160,7 (C-5); 98,2 (C-6); 163,9 (C-7); 93,3 (C-8); 156,1 (C-9); 103,0 (C-10); 121,9 (C-1'); 115,0 (C-2'); 145,0 (C-3'); 147,7 (C-4'); 115,6 (C-5'); 120,0 (C-6').

- Hợp chất (-)-epicatechine (**P2**):

Chất bột màu trắng. ^1H -NMR (500 MHz, Acetone- d_6): 7,04 (1H, d, $J = 1,5$ Hz, H-2') 6,82 (1H, d, 8,0 Hz, H-5'), 6,81 (1H, dd, $J = 1,0, 8,0$ Hz, H-6'), 6,01 (1H, d, $J = 2,5$ Hz, H-8), 5,91 (1H, d, $J = 2,5$ Hz, H-6), 4,45 (1H, s, H-2), 4,21 (1H, m, H-3), 2,86 (1H, dd, $J = 2,6$ Hz, H-4a), 2,74 dd (1H, d, $J = 3,6$ Hz, H-4b).

^{13}C -NMR (125 MHz, Acetone- d_6) δ_{ppm} : 157,6 (C-5), 157,6 (C-7), 157,1 (C-9), 145,4 (C-4'), 145,3 (C-3'), 132,2 (C-2'), 119,3 (C-6'), 115,5 (C-2'), 115,2 (C5'), 99,8 (C-10), 96,2 (C-6), 95,7 (C-8), 79,4 (C-2), 66,9 (C-3), 29,0 (C-4).

- Hợp chất quercetin-3-O- β -D-glucopyranoside (**P3**):

Dữ liệu phổ ^1H - và ^{13}C -NMR của **P3** xem bảng 4.4 (trang 68)

3.4. Thân lá Bộ mắt (*Pouzolzia zeylanica*)

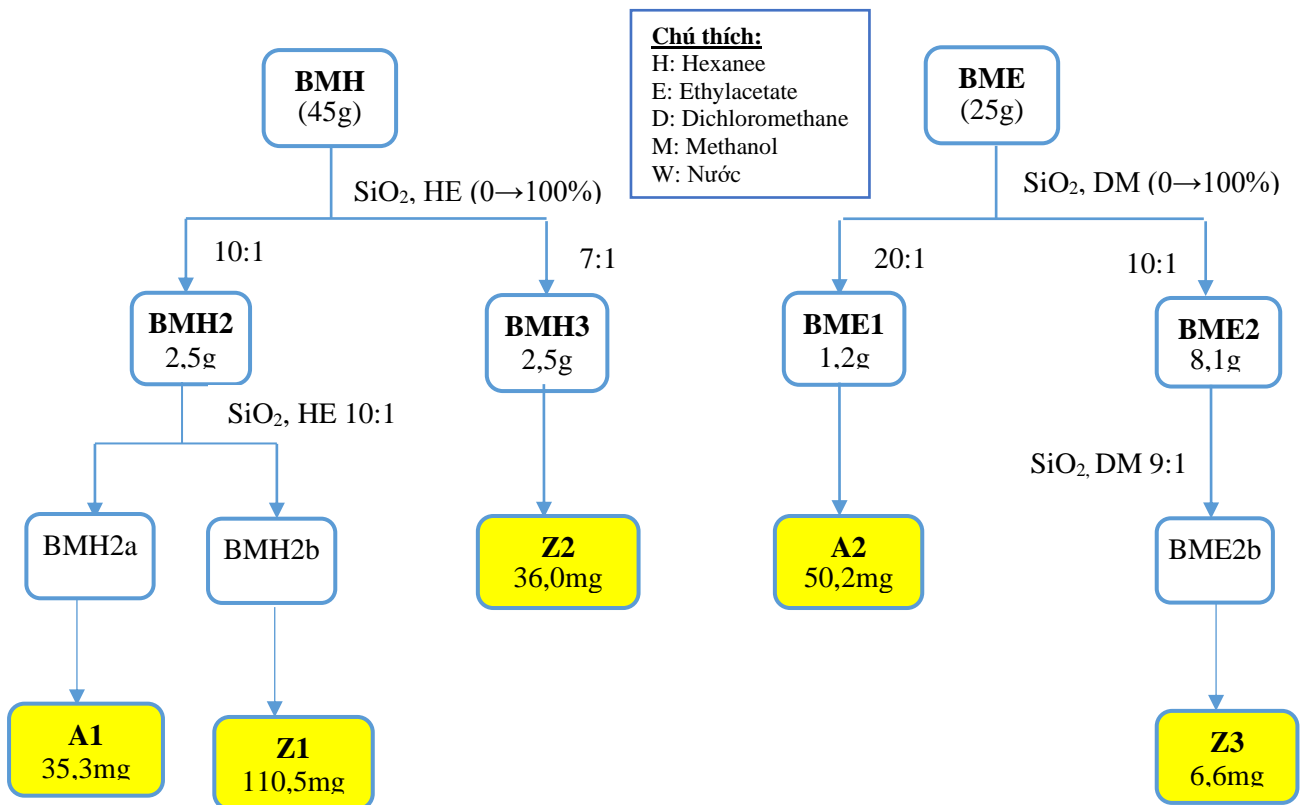
3.4.1. Thu nhận các cao chiết từ thân lá Bộ mắt

Mẫu thân lá cây Bộ mắt khô (3,0kg), được nghiền nhỏ và chiết với EtOH (5x6 l) trong thiết bị siêu âm, ở nhiệt độ phòng, cất loại dung môi bằng áp suất giảm thu được 190 g Cao chiết EtOH. Cao này được hòa vào nước cất và tiến hành chiết phân bố với *n*-hexane, etyl axetat sau đó cô khô chiết lại bằng methanol thu được các

Cao chiết tương ứng: Cao *n*-hexane ký hiệu là **BMH** (50 g), Cao ethyl axetat ký hiệu là **BME** (26 g) và Cao methanol **BMM** (110 g).

3.4.2. Phân lập và tinh chế các hợp chất từ thân lá Bọ mả

Cao chiết *n*-hexane (**BMH**, 45g) được tiến hành tách thô trên sắc ký cột silica gel pha thường với hệ dung môi rửa giải *n*-hexane, *n*-hexane/ethyl axetat (tỷ lệ EtOAc tăng từ 5→100%), thu được 4 phân đoạn (BMH1→BMH4).



Sơ đồ 3.4. Phân lập các hợp chất từ thân cây Bọ mả

Phân đoạn **BMH2** (2,5g) được phân tách lại trên cột silica gel pha thường với hệ dung môi rửa giải *n*-hexane/ethyl axetat (10:1), thu được 3 phân đoạn (BMH2a→BMH2c). Phân đoạn BMH2a kết tinh lại trong ethyl acetate thu được hợp chất β -sitosterol (35,3 mg, **A1**) và phân đoạn BMH2b kết tinh lại trong acetone thu được hợp chất friedelan-3-one (110,5mg, **Z1**). Phân đoạn **BMH3** (5,5g) được kết tinh lại trong acetone thu được hợp chất 3β -friedelanol (36 mg: **Z2**).

Cao chiết ethyl acetate (**BME**, 25g) được tiến hành tách thô trên sắc ký cột silica gel pha thường với hệ dung môi rửa giải $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (tỷ lệ MeOH tăng từ 5→100%) thu được 3 phân đoạn (BME1→BME4). Phân đoạn **BME1** (1,2g) là khối chất vô định hình, rửa và kết tinh lại trong MeOH thu được hợp chất β -sitosterol-3-*O*- β -*D*-glucopyranoside (50,2 mg: **A2**). Từ phân đoạn **BME2** (8,1g) tiếp tục phân

tách trên sắc ký cột silica gel pha thường với hệ dung môi rửa giải CH₂Cl₂/MeOH (9:1) thu được hợp chất pouzolignan F (6,6 mg: **Z3**)

- Hợp chất β -sitosterol (**A1**) và β -sitosterol-3-O- β -D-glucopyranoside (**A2**):

Dữ liệu phổ ¹H- và ¹³C-NMR được trình bày như mục 3.1.2.

- Hợp chất friedelan-3-one (**Z1**):

ESI-MS (*m/z*): 427 [M+H]⁺.

Dữ liệu phổ ¹H- và ¹³C-NMR của **Z1** xem bảng 4.5 (trang 71)

- Hợp chất 3 β -friedelanol (**Z2**)

ESI-MS (*m/z*): 411[M+H-H₂O]⁺ ứng với công thức phân tử C₃₀H₅₂O.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, TMS, δ ppm): 0,86 (3H, s, H-25); 0,93 (3H, d, *J* = 7,5 Hz, H-23); 1,00 (3H, s, H-26); 0,92 (3H, s, H-29); 0,96 (3H, s, H-24); 0,994 (3H, s, H-27); 0,996 (3H, s, H-30); 1,17 (3H, s, H-28); 3,72 (1H, d, *J* = 2,5 Hz, H-3).

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃, TMS, δ ppm): 17,6 (C-1); 35,1 (C-2); 72,7 (C-3); 49,2 (C-4); 37,9 (C-5); 41,8 (C-6); 15,9 (C-7); 53,2 (C-8); 37,2 (C-9); 61,4 (C-10); 36,2 (C-11); 30,7 (C-12); 39,8 (C-13); 38,5 (C-14); 32,9 (C-15); 35,4 (C-16); 30,1 (C-17); 42,9 (C-18); 35,6 (C-19); 28,2 (C-20); 32,4 (C-21); 39,4 (C-22); 11,6 (C-23); 16,4 (C-24); 18,3 (C-25); 18,7 (C-26); 20,2 (C-27); 32,1 (C-28); 35,1 (C-29); 31,8 (C-30).

- Hợp chất pouzolignan F (**Z3**)

ESI-MS (*m/z*): 521 [M+Na]⁺ ứng với công thức phân tử C₂₇H₃₀O₉Na.

¹H-NMR (500MHz, CDCl₃, TMS, δ ppm): 4,04 (1H, dd, *J* = 3,0 và 11,5 Hz, H-1a), 3,73 (1H, dd, *J* = 3,5 và 11,5 Hz, H-1b), 3,12 (1H, brs, H-2), 3,03 (1H, m, H-3), 3,96 (1H, dd, *J* = 7,5 và 11,0 Hz, H-4a) 3,84 (1H, dd, *J* = 7,0 và 11,0 Hz, H-4b), 3,69 (1H, d, *J* = 11,5Hz, H-5). Vòng A: 7,03 (1H, s, H-2'), 6,82 (1H, d, *J* = 8,0 Hz, H-5'), 6,95 (1H, d, *J* = 8,0 Hz, H-6'), 3,91 (3H, s, 3'-OCH₃). Vòng B: 6,84 (1H, m, H-2''), 6,65 (1H, d, *J* = 8,0 Hz, H-5''), 6,69 (1H, d, *J* = 8,0 Hz, H-6''), 3,80 (3H, s, 3''-OCH₃). Vòng C: 6,10 (2H, m, H-2'''), 6,19 (1H, s, H-4'''), 6,10 (2H, m, H-6''').

¹³C-NMR (125MHz, CDCl₃, TMS, δ ppm): 65,4 (C-1), 42,3 (C-2), 48,8 (C-3), 65,4 (C-4), 53,4 (C-5). Vòng A: 137,0 (C-1'), 113,2 (C-2'), 149,2 (C-3'), 145,9 (C-4'), 116,5 (C-5'), 122,0 (C-6'), 56,4 (3'-OCH₃). Vòng B: 137,3 (C-1''), 112,6 (C-2''), 148,8 (C-3''), 145,7 (C-4''), 116,1 (C-5''), 121,4 (C-6''), 56,5 (3''-OCH₃).

Vòng C: 142,9 (C-1'''), 108,9 (C-2'''), 160,0 (C-3'''), 102,1 (C-4'''), 160,0 (C-5'''), 108,9 (C-6''').

3.5. Lá Thầu dầu (*Ricinus communis*)

3.5.1. Thu nhận các cao chiết từ lá Thầu dầu

Mẫu lá cây Thầu dầu khô (5,8 kg), được nghiền nhỏ và chiết với EtOH (5x6 l) trong thiết bị siêu âm, ở nhiệt độ phòng, cất loại dung môi bằng áp suất giảm thu được 225 g Cao chiết EtOH. Sau đó, bổ sung nước và chiết với *n*-hexane, etyl axetat sau đó cô khô chiết lại bằng methanol thu được các cao chiết tương ứng: Cao *n*-hexane ký hiệu là **RCH** (55 g), etyl axetat ký hiệu là **RCE** (50 g) và methanol **RCM** (125 g).

3.5.2. Phân lập và tinh chế các hợp chất từ lá Thầu dầu

Cao chiết *n*-hexane **RCH** (55g) được tiến hành tách thô trên sắc ký cột silica gel pha thường với hệ dung môi rửa giải *n*-hexane, *n*-hexane/etyl axetat (tỷ lệ EtOAc tăng từ 0→100%) thu được 4 phân đoạn (**RCH1**→**RCH4**). Phân đoạn **RCH1** (3,9g) phân tách trên sắc ký cột silica gel pha thường với hệ dung môi *n*-hexane-EtOAc (15:1) thu nhận được hợp chất lupeol (13,0mg: **R1**). Từ phân đoạn **RCH2** (3,0g) kết tinh lại trong axeton thu được β -sitosterol (28,1mg: **A1**). Phân đoạn **RCH3** (5g) phân tách trên sắc ký cột silica gel pha thường với hệ dung môi *n*-hexane-EtOAc (10:1) thu được hai phân đoạn nhỏ RCH3a và RCH3b. Hai phân đoạn nhỏ này được kết tinh lại trong hệ dung môi *n*-hexane-EtOAc (5:1) thu nhận được hai hợp chất tương ứng epialeuritolic acid (20,5mg: **R2**) và ergosterol peroxide (19,2mg: **R3**).

Cao chiết **RCE** (50g) được tiến hành tách thô trên sắc ký cột silica gel pha thường với hệ dung môi rửa giải CH₂Cl₂/MeOH (tỷ lệ MeOH tăng từ 0→100%) thu được 6 phân đoạn (**RCE1**→**RCE6**). Phân đoạn **RCE1** (2,5g) thu được khối chất vô định hình, rửa và kết tinh lại trong MeOH thu được daucosterol (13,4mg: **A2**). Phân đoạn **RCE2** (1,2g) phân tách trên sắc ký cột silica gel pha thường với hệ dung môi CH₂Cl₂/MeOH (9:1) thu được hợp chất ricinine (16,2mg: **R4**). Phân đoạn **RCE3** (3,1g) phân tách trên sắc ký cột silica gel pha thường với hệ dung môi CH₂Cl₂/MeOH (9:1) thu được hợp chất 3-carboxy-4-methoxy-N-methyl-2-pyridone (10,1mg: **R5**).

- *Hợp chất lupeol (R1)*

Hợp chất **R1** thu được dưới dạng hình kim, không màu. $R_f = 0,55$ (*n*-hexane: EtOAc = 4:1), nhiệt độ nóng chảy 213-214 °C.

ESI-MS (*m/z*): 426 [M]⁺

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 4,68 (1H, s, H-29a), 4,56 (1H, s, H-29b), 3,19 (1H, dd, $J = 5,0$ và $6,5$ Hz, H-3), 2,38 (1H, m, $J = 4,7$ và $1,5$ Hz, H-19), 0,68 (1H, d, $J = 9,5$ Hz, H-5), 0,76 (3H, s, H-24), 0,78 (3H, s, H-28), 0,82 (3H, s, H-25), 0,94 (3H, s, H-27), 0,96 (3H, s, H-23), 1,02 (3H, s, H-26), 1,68 (3H, s, H-30).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 38,7 (C-1), 27,4 (C-2), 79,0 (C-3), 38,9 (C-4), 55,3 (C-5), 18,3 (C-6), 34,2 (C-7), 40,8 (C-8), 50,4 (C-9), 37,2 (C-10), 20,9 (C-11), 25,1 (C-12), 38,0 (C-13), 42,8 (C-14), 27,4 (C-15), 35,6 (C-16), 43,0 (C-17), 48,3 (C-18), 48,0 (C-19), 151,0 (C-20), 29,8 (C-21), 40,0 (C-22), 28,0 (C-23), 15,4 (C-24), 16,1 (C-25), 16,0 (C-26), 14,5 (C-27), 18,0 (C-28), 109,3 (C-29), 19,3 (C-30)

- *Hợp chất epialeuritolic acid (R2)*

Hợp chất **R2** thu được dưới dạng chất bột, không màu. $R_f = 0,40$ (*n*-hexanee : EtOAc = 4 : 1). ESI-MS (m/z): 456 $[\text{M}]^+$.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 5,53 (1H, dd, $J = 3,5$ và $8,0$ Hz, H-15), 3,20 (1H, dd, $J = 5,0$ và $11,0$ Hz, H-3), 2,38 (1H, dd, $J = 8,0$ và $14,0$ Hz, H-16), 2,29 (1H, d, $J = 11,0$ Hz, H-18), 1,4 (1H, m, H-9), 0,79 (1H, d, $J = 12,0$ Hz, H-5), 0,80 (3H, s, H-25), 0,91 (3H, s, H-30), 0,92 (3H, s, H-24), 0,93 (3H, s, H-29), 0,95 (3H, s, H-26), 0,97 (6H, s, H-23, H-27).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 37,7 (C-1), 27,1 (C-2), 79,0 (C-3), 38,8 (C-4), 55,5 (C-5), 18,8 (C-6), 40,9 (C-7), 39,0 (C-8), 49,1 (C-9), 38,0 (C-10), 17,3 (C-11), 33,4 (C-12), 37,3 (C-13), 160,7 (C-14), 116,7 (C-15), 31,4 (C-16), 51,4 (C-17), 41,4 (C-18), 35,4 (C-19), 29,3 (C-20), 33,7 (C-21), 30,7 (C-22), 28,0 (C-23), 15,6 (C-24), 15,5 (C-25), 26,2 (C-26), 22,5 (C-27), 183,3 (C-28), 31,9 (C-29) và 28,7 (C-30).

- *Hợp chất ergosterol peroxide (R3)*

Hợp chất **R3** thu được dưới dạng hình kim, không màu, $R_f = 0,69$ (*n*-hexanee : EtOAc = 2 : 1, v/v); nhiệt độ nóng chảy $180-181$ °C;

ESI-MS m/z : 428 $[\text{M}]^+$

Dữ liệu phổ ^1H - và ^{13}C -NMR của **R3** xem bảng 4.6 (trang 74)

- *Hợp chất ricinine (R4)*

Hợp chất **R4** thu được dưới dạng hình kim, không màu, $R_f = 0,61$ (chloroform : methanol = 12 : 1, v/v), nhiệt độ nóng chảy $192-193$ °C;

ESI-MS (m/z): $[\text{M}]^+$ 164.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, MeOD) δ_{H} (ppm): 7,98 (1H, d, $J = 7,5$ Hz, H-6), 6,46 (1H, d, $J = 7,5$ Hz, H-5), 4,06 (3H, s, 4-OCH₃), 3,63 (3H, s, N-CH₃),

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, MeOD) δ_{C} (ppm): 174,7 (C-4), 163,8 (C-2), 146,8 (d, C-6), 114,7 (3-CN), 95,7 (C-5), 88,3 (C-3), 58,2 (4-OCH₃), 37,8 (N-CH₃).

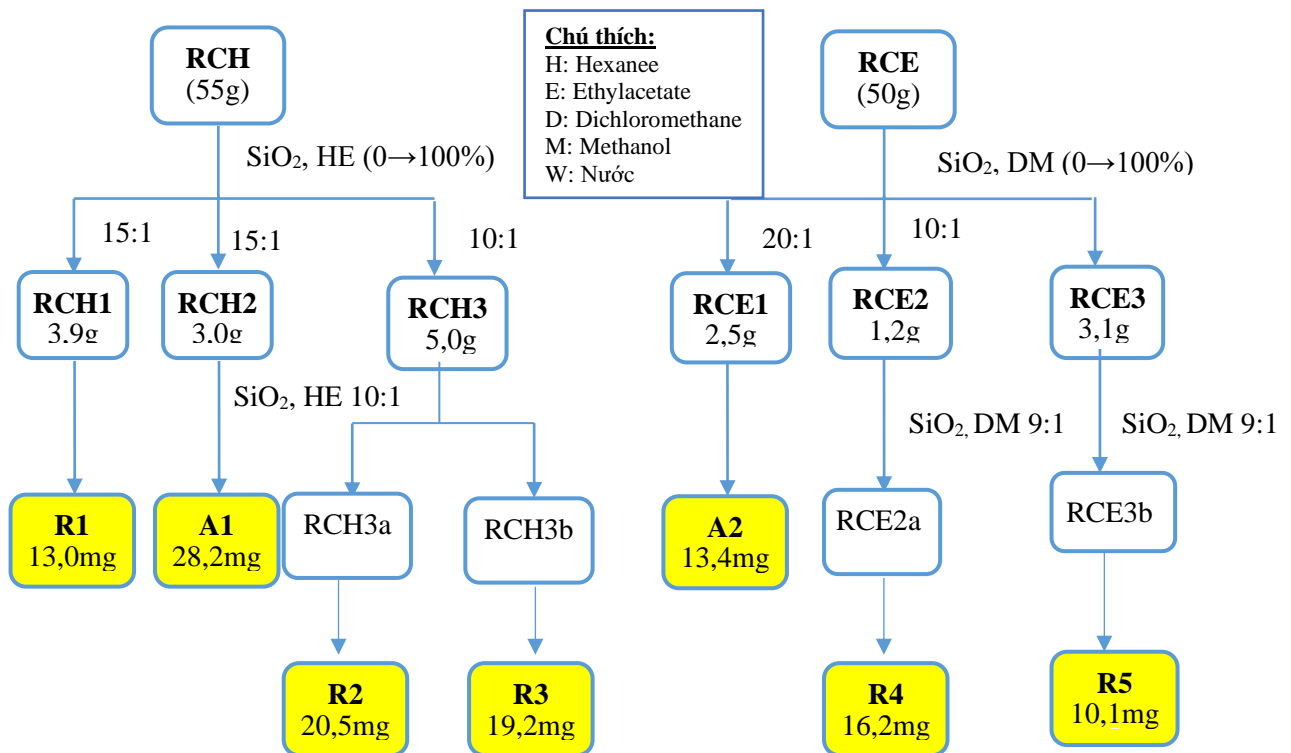
- *Hợp chất 3-carboxy-4-methoxy-N-methyl-2-pyridone (R5)*

Hợp chất **R5** thu được dưới dạng hình kim, không màu, $R_f = 0,5$ (chloroform : methanol = 12 : 1, v/v), nhiệt độ nóng chảy 192-193 °C;

ESI-MS (m/z): $[\text{M}]^+$ 183.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, MeOD) δ_{H} (ppm): 8,00 (1H, d, $J = 7,5$ Hz, H-4), 6,61 (1H, d, $J = 7,5$ Hz, H-6), 4,04 (3H, s, 4-OCH₃), 3,63 (3H, s, N-CH₃).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, MeOD) δ_{C} (ppm): 167,7 (C-2), 102,0 (C-3), 173,3 (C-4), 98,1 (C-5), 145,7 (C-6), , 57,9 (4-OCH₃), 38,7 (N-CH₃), 167,4 (3-COOH)



Sơ đồ 3.5. Phân lập các hợp chất từ thân lá cây Thầu dầu

3.6. Quả Cà trái vàng (*Solanum xanthocarpum*)

3.6.1. Thu nhận các cao chiết từ quả Cà trái vàng

Bột mẫu khô của quả Cà trái vàng (0,7kg) được ngâm chiết với methanol trong thiết bị chiết siêu âm, ở nhiệt độ phòng. Dịch chiết được lọc, gom lại và cất loại dung môi thu được Cao chiết tổng của quả Cà trái vàng (86g). Cao tổng sau đó được tiến

hành chiết phân bố lần lượt với *n*-hexane, ethyl axetat thu được các dịch chiết tương ứng. Cát loại dung môi dưới áp suất giảm thu được cao chiết tương ứng là **SXH** (Cao *n*-hexane, 12g), **SXE** (Cao ethyl axetat, 18g), **SXM** (Cao MeOH, 50g).

3.6.2. Phân lập và tinh chế các hợp chất từ quả Cà trái vàng

Cao chiết **SXM** (45g) cho qua cột dianion với dung môi rửa giải là H₂O/MeOH (MeOH từ 0→100%) thu được 3 phân đoạn (SXM1→SXM3). Phân đoạn SXM3 (9g) tiến hành sắc ký cột trên chất hấp phụ là silicagel pha thường, hệ dung môi rửa giải là dichloromethane/methanol (MeOH từ 5→100%) thu được 4 phân đoạn chính (SXM3.1→SXM3.4).

Phân đoạn SXM3 (9g) được cho qua cột silicagel giải hấp với hệ dung môi bắt đầu từ tỷ lệ dichloromethane/methanol (99:1→5:1) thu được 4 phân đoạn (SXM3.1→SXM3.4). Phân đoạn SXM3.3 được tinh chế bằng cột Sephadex LH-20, giải hấp bằng dung môi MeOH thu được 3 phân đoạn (SXM3.3.1→SXM3.3.3). Phân đoạn SXM3.3.1 được kết tinh lại trong MeOH thu được hợp chất solasonine (50,0mg: **S1**) dạng tinh thể hình kim nhỏ màu vàng nhạt, $R_f = 0,5$ (CHCl₃/MeOH = 3:1). Phân đoạn SXM3.3.2 được kết tinh lại trong MeOH thu được hợp chất solamargine (9,0mg: **S2**), dạng vô định hình màu trắng vàng, $R_f = 0,51$ (CHCl₃/MeOH = 3:1).

- **Hợp chất solasonine (S1)**

Dữ liệu phổ ¹H- và ¹³C-NMR của **S1** xem bảng 4.7 (trang 77)

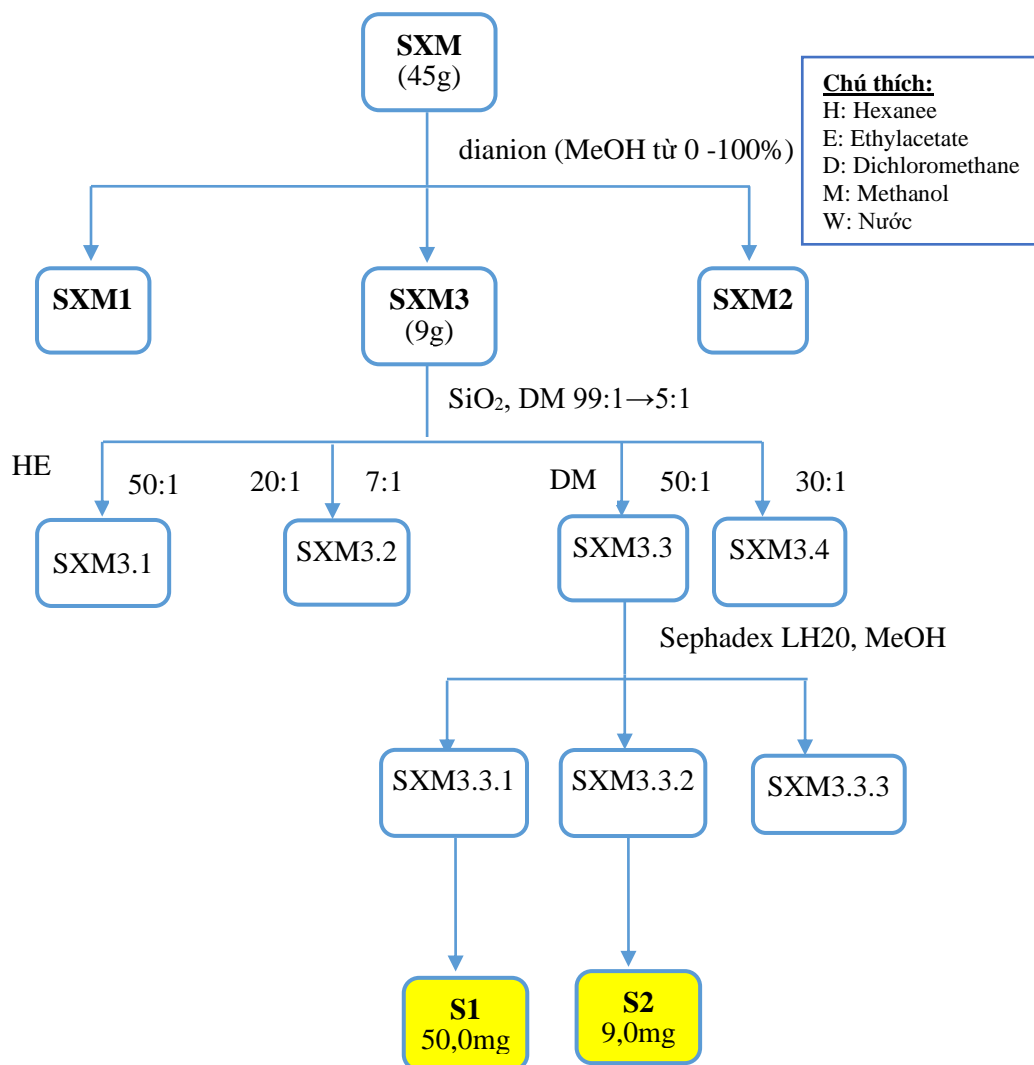
- **Hợp chất solamargine (S2)**

Rửa giải cột bằng dung môi CHCl₃:MeOH (95:5) thu được khối chất bột, làm sạch khối chất rắn này trong dung môi ethyl acetat rồi kết tinh lại trong methanol thu được chất bột màu trắng có khối lượng 9mg, nhiệt độ nóng chảy > 300 °C, $R_f = 0,51$ (hệ dung môi CHCl₃:MeOH (3:1)).

¹H-NMR (500MHz, MeOD, TMS, δ (ppm)): 0,83 (3H, s, H-18), 1,07 (3H, s, H-19), 0,99 (3H, d, $J=6,5$, H-27), 1,28 (6H, m, rhamnosyl CH₃), 1,39–2,49 (overlap), 3,03–4,1 (overlap proton đường), 4,14 (1H, m, H-16), 4,52 (1H, d, $J=7,5$, H-1'), 5,22 (1H, d, $J=1,5$, H-1'''), 5,23 (1H, d, $J=1,5$, H-1''), 5,41 (1H, d, $J=5,0$, H-6).

¹³C-NMR (125MHz, MeOD, TMS, δ (ppm)): 38,5 (C-1); 29,0 (C-2); 79,3 (C-3); 39,5 (C-4); 142,0 (C-5); 122,4 (C-6); 33,1 (C-7); 32,8 (C-8); 51,6 (C-9); 38,0 (C-10); 21,9 (C-11); 40,4 (C-12); 42,1 (C-13); 57,7 (C-14); 33,3 (C-15); 79,3 (C-16); 63,1 (C-17); 16,5 (C-18); 19,8 (C-19); 42,8 (C-20); 14,8 (C-21); 100,2 (C-22), 30,7

(C-23); 29,6 (C-24); 33,1 (C-25); 46,8 (C-26); 18,7 (C-27); 100,5 (C-1'); 78,0 (C-2'); 79,3 (C-3'); 76,6 (C-4'); 80,1 (C-5'); 62,0 (C-6'); 103,0 (C-1''); 72,4 (C-2''); 73,7 (C-3''); 73,9 (C-4''); 70,7 (C-5''); 18,0 (C-6''); 102,3 (C-1'''); 72,2 (C-2'''); 72,4 (C-3'''); 72,4 (C-4'''); 69,8 (C-5'''); 17,9 (C-6''').



Sơ đồ 3.6. Phân lập các hợp chất từ quả Cà trái vàng

3.7. Thân Ké hoa đào (*Urena lobata*)

3.7.1. Thu nhận các cao chiết từ thân Ké hoa đào

Bột mẫu khô của phần thân cây Ké hoa đào (3,1kg) được ngâm chiết với ethanol trong thiết bị chiết siêu âm. Dịch chiết được lọc, gom lại và cất loại dung môi thu được cao chiết tổng của cây Ké hoa đào (235g). Cao tổng sau đó được tiến hành chiết phân bố lần lượt với *n*-hexane, etyl axetat, methanol thu được ba dịch chiết tương ứng. Cất loại dung môi dưới áp suất giảm thu được cao chiết tương ứng là **ULH** (Cao *n*-hexane, 50g), **ULE** (Cao etyl axetat, 140g), **ULM** (Cao MeOH, 45g).

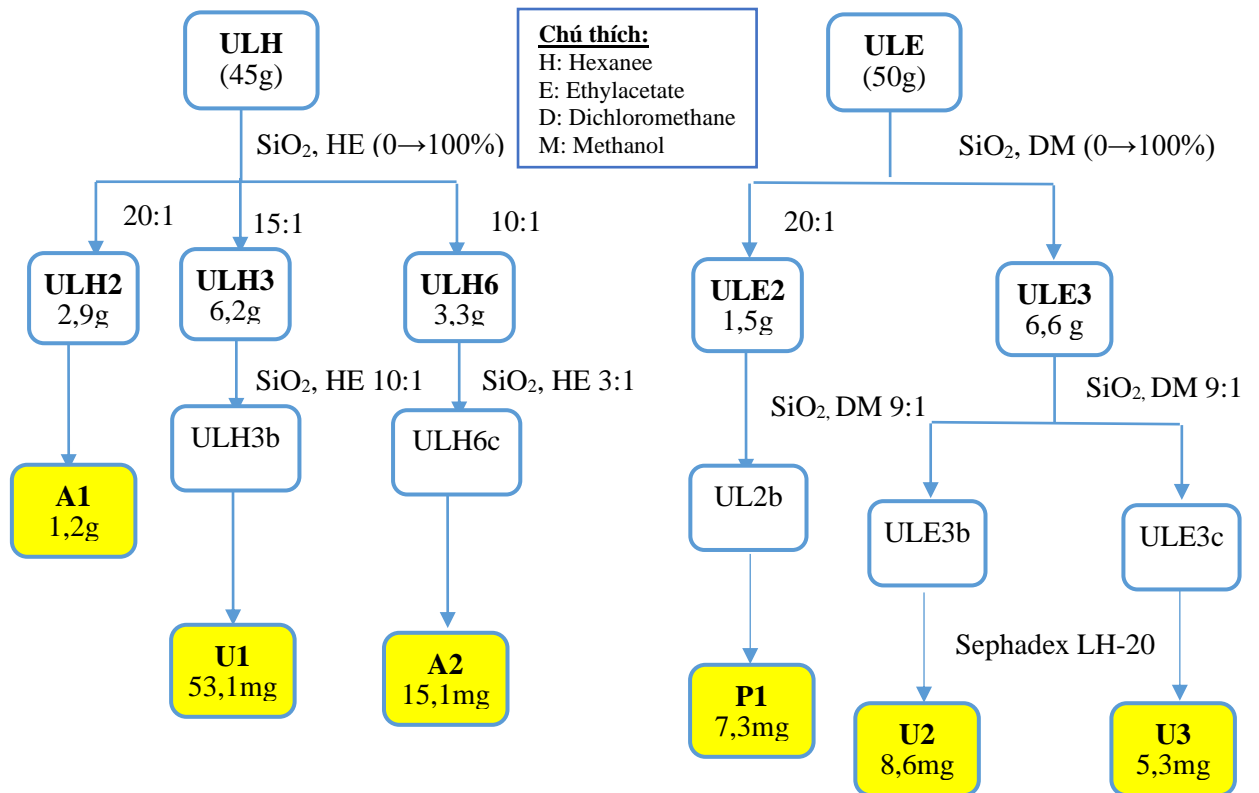
3.7.2. Phân lập và tinh chế các hợp chất từ thân Kế hoa đào

Cao chiết *n*-hexanee **UL** (45 g) được tiến hành tách thô trên sắc ký cột silica gel pha thường với hệ dung môi rửa giải *n*-hexane, *n*-hexane/ethyl axetat (tỷ lệ EtOAc tăng từ 0→100%) thu được 6 phân đoạn (**ULH1**→**ULH6**). Phân đoạn **ULH2** (2,9 g) được kết tinh với dung môi *n*-hexanee thu nhận được hợp chất β -sitosterol (1,2g, **A1**). Phân đoạn **ULH3** (6,2 g) phân tách trên sắc ký cột silica gel pha thường với hệ dung môi *n*-hexanee-EtOAc (10:1→5:1) thu được 4 phân đoạn nhỏ (**ULH3a**→**ULH3d**). Phân đoạn nhỏ **ULH3b** kết tinh lại trong dung môi axeton thu được hợp chất α -acetylamino-phenylpropyl α -benzoylamino-phenylpropanoate (53,1 mg: **U1**).

Phân đoạn **ULH6** (3,3 g) tách trên cột silica gel với hệ dung môi *n*-hexanee-EtOAc (5:1→1:1) thu được 4 phân đoạn (**ULH6a**→**ULH6e**). Phân đoạn nhỏ **ULH6c** được tách lại trên cột silica gel với hệ dung môi *n*-hexanee-EtOAc (3:1→2:1) thu được khối chất vô định hình. Khối chất này được kết tinh lại trong dung môi methanol thu được hợp chất β -sitosterol-3-O- β -D-glucopyranoside ((15,1 mg: **A2**).

Cao chiết ethyl axetat **ULE** (50 g) được tiến hành tách thô trên sắc ký cột silica gel pha thường với hệ dung môi rửa giải CH₂Cl₂/MeOH (tỷ lệ MeOH tăng từ 0→100%) thu được 6 phân đoạn (**ULE1**→**ULE6**). Phân đoạn **ULE2** (1,5 g) phân tách trên sắc ký cột silica gel pha thường với hệ dung môi CH₂Cl₂/MeOH (10:1→100% MeOH) thu được 3 phân đoạn nhỏ (**ULE2a**→ **ULE2c**). Phân đoạn **ULE2b** (52 mg) được tách lại trên cột silica gel pha thường với hệ dung môi CH₂Cl₂/MeOH (99:1→9:1) thu được hợp chất quercetin (7,3 mg: **P1**).

Phân đoạn **ULE3** (6,6 g) phân tách trên sắc ký cột silica gel pha thường với hệ dung môi CH₂Cl₂/MeOH (30:1→100% MeOH) thu được 4 phân đoạn nhỏ (**ULE3a**→ **ULE3d**). Phân đoạn **ULE3b** (1,2 g) được tinh chế bằng sắc ký cột sephadex LH-20 với dung môi rửa giải methanol, sau đó tách lại trên cột silica gel pha thường với hệ dung môi CH₂Cl₂/MeOH (99:1→9:1) thu được hợp chất *trans*-tiliroside (8,6 mg: **U2**), chất vô định hình, màu vàng nhạt. R_f = 0,65 (hệ dung môi chloroform: methanol 9:1). Phân đoạn **ULE3c** (1,0 g) được tinh chế bằng sắc ký cột sephadex LH-20 với dung môi rửa giải methanol thu được hợp chất *cis*-tiliroside (5,3 mg: **U3**), chất vô định hình, màu vàng nhạt. R_f = 0,47 (hệ dung môi chloroform: methanol 9:1).



Sơ đồ 3.7. Phân lập các hợp chất từ thân lá cây Ké hoa đào

- *Hợp chất β -sitosterol (A1) và β -sitosterol-3-O- β -D-glucopyranoside (A2):*
Dữ liệu phổ ^1H - và ^{13}C -NMR được trình bày như mục 3.1.2.
- *Chất α -acetylamino-phenylpropyl α -benzoylamino-phenylpropanoate (U1):*
Là chất có dạng tinh thể màu trắng. Dữ liệu phổ ^1H - và ^{13}C -NMR của **S1** xem bảng 4.8 (trang 81)
- *Hợp chất quercetin (P1):*
Dữ liệu phổ ^1H - và ^{13}C -NMR được trình bày như mục 3.3.2.
- *Hợp chất trans-tiliroside (U2):*
Chất bột màu vàng. ^1H -NMR (500MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 12,56 (1H, s, 5-OH); 6,15 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-6); 6,38 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-8); 7,99 (2H, m, H-2'/6'); 6,86 (2H, m, H-3'/5'); 5,45 (1H, d, $J = 7,5$ Hz, H-1''); 3,20-3,27 (2H, m, H-2''/3''); 3,17 (1H, m, H-4''); 3,3 (1H, m, H-5''); 4,28 (1H, dd, $J = 2,0$ and 12,5 Hz, H-6a''); 4,02 (1H, dd, $J = 6,0$ và 12,5 Hz, H-6b''); 7,37 (2H, m, H-2''',6'''); 6,78 (2H, m, H-3''',5'''); 7,32 (1H, d, $J = 15,5$ Hz, H-7'''); 6,12 (1H, d, $J = 15,5$ Hz, H-8''').
 ^{13}C -NMR (125MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 156,4 (C-2); 133,0 (C-3); 177,4 (C-4); 161,1 (C-5); 98,7 (C-6); 164,2 (C-7); 93,6 (C-8); 156,3 (C-9); 103,8 (C-10); 120,7

(C-1'); 130,8 (C-2',6'); 115,0 (C-3',5'); 159,9 (C-4'); 101,0 (C-1''); 74,1 (C-2''); 76,2 (C-3''); 69,9 (C-4''); 74,2 (C-5''); 62,9 (C-6''); 124,9 (C-1'''); 130,1 (C-2''',6'''); 115,7 (C-3''',5'''); 159,7 (C-4'''); 144,5 (C-7'''); 113,6 (C-8'''); 166,1 (C-9''').

- *Hợp chất cis-tiliroside (U3):*

Chất bột màu vàng. ¹H-NMR (500MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 12,56 (1H, s, 5-OH); 6,15 (1H, d, *J* = 2,0 Hz, H-6); 6,38 (1H, d, *J* = 2,0 Hz, H-8); 7,99 (2H, m, H-2'/6'); 6,86 (2H, m, H-3'/5'); 5,45 (1H, d, *J* = 7,5 Hz, H-1''); 3,20-3,27 (2H, m, H-2''/3''); 3,17 (1H, m, H-4''); 3,3 (1H, m, H-5''); 4,28 (1H, dd, *J* = 2,0 and 12,5 Hz, H-6a''); 4,02 (1H, dd, *J* = 6,0 and 12,5 Hz, H-6b''); 7,37 (2H, m, H-2''',6'''); 6,78 (2H, m, H-3''',5'''); 7,32 (1H, d, *J* = 15,5 Hz, H-7'''); 6,12 (1H, d, *J* = 15,5 Hz, H-8''').

¹³C-NMR (125MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 156,4 (C-2); 133,0 (C-3); 177,4 (C-4); 161,1 (C-5); 98,7 (C-6); 164,2 (C-7); 93,6 (C-8); 156,3 (C-9); 103,8 (C-10); 120,7 (C-1'); 130,8 (C-2',6'); 115,0 (C-3',5'); 159,9 (C-4'); 101,0 (C-1''); 74,1 (C-2''); 76,2 (C-3''); 69,9 (C-4''); 74,2 (C-5''); 62,9 (C-6''); 124,9 (C-1'''); 130,1 (C-2''',6'''); 115,7 (C-3''',5'''); 159,7 (C-4'''); 144,5 (C-7'''); 113,6 (C-8'''); 166,1 (C-9''').

3.8. Mô phỏng docking phân tử

Mô phỏng docking phân tử tìm hiểu cơ chế hoạt động trên đích tác dụng PDH: Cấu trúc tinh thể của proline dehydrogenase được lấy từ cơ sở dữ liệu Protein Data Bank. Các hợp chất flavonoid và diterpenoid dùng trong nghiên cứu này được xây dựng cấu trúc ba chiều. Chất ức chế PDH đã biết là naucleidinal được sử dụng làm chất chuẩn. Các mô phỏng được thực hiện bằng phần mềm AutoDock 4.2.6.

Mô phỏng docking phân tử trên đích tác dụng con đường tín hiệu PI3K : Cấu trúc tinh thể của các protein trong con đường tín hiệu PI3K gồm AKT, mToR, COX-2, MDM2 và PDK1 được lấy từ cơ sở dữ liệu Protein Data Bank. Để tính điểm cho các hợp chất, hệ thống tính điểm MolDock Score [GRID] của phần mềm MVD được sử dụng. Thuật toán tìm kiếm sử dụng là Moldock SE (Simplex Evolution). Oxaliplatin được dùng làm chất chuẩn so sánh. Các amino acid tham gia vào hình thành liên kết không phân cực được phân tích bằng phần mềm Ligplot⁺ v2.1 cho toàn bộ các hợp chất nghiên cứu cùng chất chuẩn.

3.9. Hoạt tính kháng khuẩn và gây độc tế bào của các Cao chiết và các hợp chất phân lập được

Phương pháp thử nghiệm hoạt tính kháng khuẩn in vitro: theo phương pháp lập kháng sinh đồ trên đĩa thạch của Kirby-Bauer và phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch của Chawee-pack (2015). Hiệu quả được đánh giá dựa vào vòng vô khuẩn

Phương pháp thử nghiệm hoạt tính kháng khuẩn in vivo: theo Phương pháp thí nghiệm sử dụng chiết phẩm thô trộn vào thức ăn cho tôm ăn và cho môi trường nước.

Xác định giá trị LC₅₀ của cao chiết Khổ sâm: được thực hiện dựa theo phương pháp của APHA (2005). Ghi nhận số tôm chết hàng ngày và theo dõi trong suốt 96 giờ để xác định giá trị LC₅₀ (nồng độ gây chết 50%) bằng chương trình máy tính (Stephan & Rodgers, 1985).

Thử nghiệm hoạt tính gây độc tế bào theo phương pháp MTT: dòng tế bào ung thư phổi người A549 được lấy từ Trung tâm Dinh dưỡng và nguyên liệu Dược phẩm, Đại học Myongji, Hàn Quốc. Hoạt tính gây độc tế bào được thực hiện theo phương pháp MTT. Nồng độ ức chế 50% (IC₅₀) được tính sử dụng phần mềm Graphpad Prism software (Graphpad Software, Inc. San Diego, CA, USA).

Hoạt tính kháng khuẩn *Vibrio parahaemolyticus in vitro* và *in vivo* của các Cao chiết và các hợp chất sạch được thử nghiệm tại Viện Nghiên cứu nuôi trồng thủy sản I và Viện Nghiên cứu nuôi trồng thủy sản II.

Hoạt tính gây độc trên dòng tế bào ung thư phổi (A-549) được thử nghiệm tại Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên, VAST.

Chương 4. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

A. HOẠT TÍNH KHÁNG KHUẨN *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS*

4.1. Kết quả tác dụng kháng *V. parahaemolyticus* các cao chiết thô *in vitro*

Trên cơ sở tham khảo tài liệu 13 loài thực vật: Thồm lồm, Thầu dầu, Cà trái vàng, Ké hoa đào, Đơn châu châu, Bộ mắm, Khổ sâm, Ké hoa vàng, Hàn the, Đơn buốt, Nghệ vàng, Dầu giun và Thuốc dấu có những đặc trưng về các lớp chất diterpenoid, triterpenoid và polyphenol phổ biến trong tự nhiên, được nhân dân ta sử dụng làm thuốc chữa bệnh và có tác dụng kháng sinh tốt. Do đó, đề tài lựa chọn các đối tượng trên để sàng lọc về hoạt tính kháng khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* gây bệnh AHPND *in vitro* nhằm lựa chọn các đối tượng tiềm năng cho các nghiên cứu sâu hơn về hóa học và hoạt tính sinh học.

Các cao chiết ethanol tổng của 13 mẫu, gồm Đơn châu châu (*Aralia armata*, AA.M), Khổ sâm (*Croton tonkinensis*, CT.M), Bộ mắm (*Pouzolzia zeylanica*, PZ.M), Ké hoa đào (*Urena lobata*, UL.M), Hàn the (*Desmodium heterophyllum*, DM.M) và Thuốc dấu (*Euphorbia tithymaloides*, ET.M) được thử hoạt tính kháng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* gây bệnh AHPND theo phương pháp của Chawee-pack (2015) và Thồm lồm (*Polygonum chinense*, PC.M), Thầu dầu (*Ricinus communis*, RC.M), Cà trái vàng (*Solanum xanthocarpum*, SX.M), Ké hoa vàng (*Sida rhombifolia*, SR.M), Đơn buốt (*Biidens pilosal*, BP.M), Nghệ vàng (*Curcuma longa*, CL.M) và Dầu giun (*Chenopodia abrosioides*, CA.M) được thử hoạt tính kháng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* gây bệnh AHPND theo phương pháp của W. Kirby và A. Bauer (1961) như mục 3.9. Kết quả thử nghiệm được thể hiện như bảng 4.1.

Bảng 4.1. Kết quả thử nghiệm kháng *V. parahaemolyticus* của các cao chiết thô

Mẫu	Nồng độ	Đường kính vòng kháng khuẩn (mm)	Phương pháp	Kết luận
AA.M	1,2 mg/ cồn 2%	25 ± 0,3	Chawee-pack (2015)	nhạy*
CT.M	1,2 mg/ cồn 2%	18 ± 0,3	Chawee-pack (2015)	nhạy*
PZ.M	1,2 mg/ cồn 2%	17 ± 0,3	Chawee-pack (2015)	nhạy*
UL.M	1,2 mg/ cồn 2%	15 ± 0,3	Chawee-pack (2015)	nhạy*
DM.M	1,2 mg/ cồn 2%	7 ± 0,0	Chawee-pack (2015)	kháng*
ET.M	1,2 mg/ cồn 2%	7 ± 0,1	Chawee-pack (2015)	kháng*
PC.M	200 µg	20,6 ± 0,41	W. Kirby và A. Bauer (1961)	nhạy**
	66,7 µg	19,8 ± 0,45		nhạy**
	40 µg	15,3 ± 0,16		trung bình**
	22,2 µg	0		không **

RC.M	200 µg	15,3 ± 0,55	W. Kirby và A. Bauer (1961)	trung bình**
	66,7 µg	14,3 ± 0,22		trung bình**
	40 µg	11,0 ± 0,37		kháng**
	22,2 µg	0		không **
SX.M	200 µg	14,4 ± 0,24	W. Kirby và A. Bauer (1961)	trung bình**
	66,7 µg	14,2 ± 0,37		trung bình**
	40 µg	10,4 ± 0,24		kháng**
	22,2 µg	0		không **
SR.M	200 µg	0	W. Kirby và A. Bauer (1961)	không **
	66,7 µg	0		
	40 µg	0		
	22,2 µg	0		
CL.M	200 µg	11,2 ± 0,24	W. Kirby và A. Bauer (1961)	kháng **
	66,7 µg	10,3 ± 0,14		kháng **
	40 µg	8,9 ± 0,11		kháng**
	22,2 µg	0		không **
CA.M	200 µg	0	W. Kirby và A. Bauer (1961)	không **
	66,7 µg	0		
	40 µg	0		
	22,2 µg	0		
BP.M	200 µg	0	W. Kirby và A. Bauer (1961)	không **
	66,7 µg	0		
	40 µg	0		
	22,2 µg	0		

Ghi chú: * Đường kính vòng ức chế sự phát triển vi khuẩn: Kháng: ≤ 9 mm; trung bình ≥ 10-13 mm; nhạy ≥ 14 mm. ** Đường kính vòng vô khuẩn: Kháng ≤ 11 mm, trung bình: 12-15 mm, nhạy: ≥ 16 mm

Bảng 4.1 cho thấy:

❖ **Đối với thử nghiệm theo phương pháp của Chawee-pack (2015):**

Trong các mẫu thử nghiệm, mẫu chiết Ké hoa đào (*Urena lobata*, **UL**), Bọ mắ (*Pouzolzia zeylanica*, **PZ**), Khổ sâm (*Croton tonkinensis*, **CT**) và Đơn châu châu (*Aralia armata*, **AA**) có khả năng ức chế sự phát triển của vi khuẩn *V. parahaemolyticus in vitro* tốt nhất với đường kính trung bình vòng ức chế lần lượt là 15 mm, 17 mm, 18 mm, và 25 mm. Mẫu Hàn the (*Desmodium heterophyllum*, **DM.M**) và Thuốc dẫu (*Euphorbia tithymaloides*, **ET.M**) thể hiện hoạt tính ở mức trung bình với đường kính trung bình vòng ức chế vi khuẩn là 7 mm.

Vì vậy, lựa chọn các loài Ké hoa đào (*Urena lobata*, **UL**), Bọ mắm (*Pouzolzia zeylanica*, **PZ**), Khổ sâm (*Croton tonkinensis*, **CT**) và Đơn châu chấu (*Aralia armata*, **AA**) để nghiên cứu sâu hơn về thành phần hóa học và thử nghiệm khả năng ức chế sự phát triển của vi khuẩn *V. parahaemolyticus* trên tôm thẻ chân trắng (*in vivo*).

❖ **Đối với thử nghiệm theo phương pháp của W. Kirby và A. Bauer (1961):**

Ở tất cả các nồng độ thử nghiệm, cao chiết Dầu giun (*Chenopodia abrosioides*, **CA.M**) và Đơn buốt (*Biidens pilosal*, **BP.M**) đều không có hoạt tính kháng khuẩn *V. parahaemolyticus*. Ở nồng độ 22,2µg các cao chiết Thồm lồm (*Polygonum chinense*, **PC.M**), Thầu dầu (*Ricinus communis*, **RC.M**), Cà trái vàng (*Solanum xanthocarpum*, **SX.M**), Ké hoa vàng (*Sida rhombifolia*, **SR.M**), Đơn buốt (*Biidens pilosal*, **BP.M**), Nghệ vàng (*Curcuma longa*, **CL.M**), Dầu giun (*Chenopodia abrosioides*, **CA.M**) đều không có hoạt tính kháng khuẩn AHPND nhưng ở nồng độ 40-200µg/khoanh đều có hoạt tính kháng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* theo các mức độ khác nhau.

Cao chiết cây Thầu dầu (*Ricinus communis*) và cao chiết cây Cà trái vàng (*Solanum xanthocarpum*) có hoạt tính kháng khuẩn trung bình với đường kính vòng vô khuẩn khoảng 11,0 - 15,3 mm và 10,4 - 14,4mm. Cao chiết cây Thồm lồm (*Polygonum chinense*) có đường kính vòng vô khuẩn bình quân dao động từ 15,3 - 20,6 mm tương ứng với nồng độ 40-200µg. Điều này cho thấy mẫu cao chiết cây Thồm lồm có khả năng diệt chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* gây bệnh AHPND cao nhất trong số các mẫu thử nghiệm.

Vì vậy, lựa chọn các loài Thồm lồm (*Polygonum chinense*, **PC.M**), Thầu dầu (*Ricinus communis*, **RC.M**) và Cà trái vàng (*Solanum xanthocarpum*, **SX.M**) để nghiên cứu sâu hơn về thành phần hóa học và lựa chọn Thồm lồm (*Polygonum chinense*, **PC.M**) và Thầu dầu (*Ricinus communis*, **RC.M**) thử nghiệm khả năng ức chế sự phát triển của vi khuẩn *V. parahaemolyticus* trên tôm thẻ chân trắng (*in vivo*).

Tóm lại, từ kết quả sàng lọc hoạt tính năng ức chế sự phát triển của vi khuẩn *V. parahaemolyticus* của 13 mẫu: Đơn châu chấu, Khổ sâm, Bọ mắm, Ké hoa đào, Hàn the, Thồm lồm, Thầu dầu, Cà trái vàng, Ké hoa vàng, Đơn buốt, Khổ sâm và Thuốc dẫu theo phương pháp của Chawee-pack (2015) và W. Kirby và A. Bauer (1961) đã lựa chọn được:

- 07 loài Thồm lồm (*Polygonum chinense*, **PC.M**), Thầu dầu (*Ricinus communis*, **RC.M**), Ké hoa đào (*Urena lobata*, **UL.M**), Đơn châu chấu (*Aralia armata*, **AA.M**), Bọ mắm (*Pouzolzia zeylanica*, **PZ.M**) và Khổ sâm (*Croton*

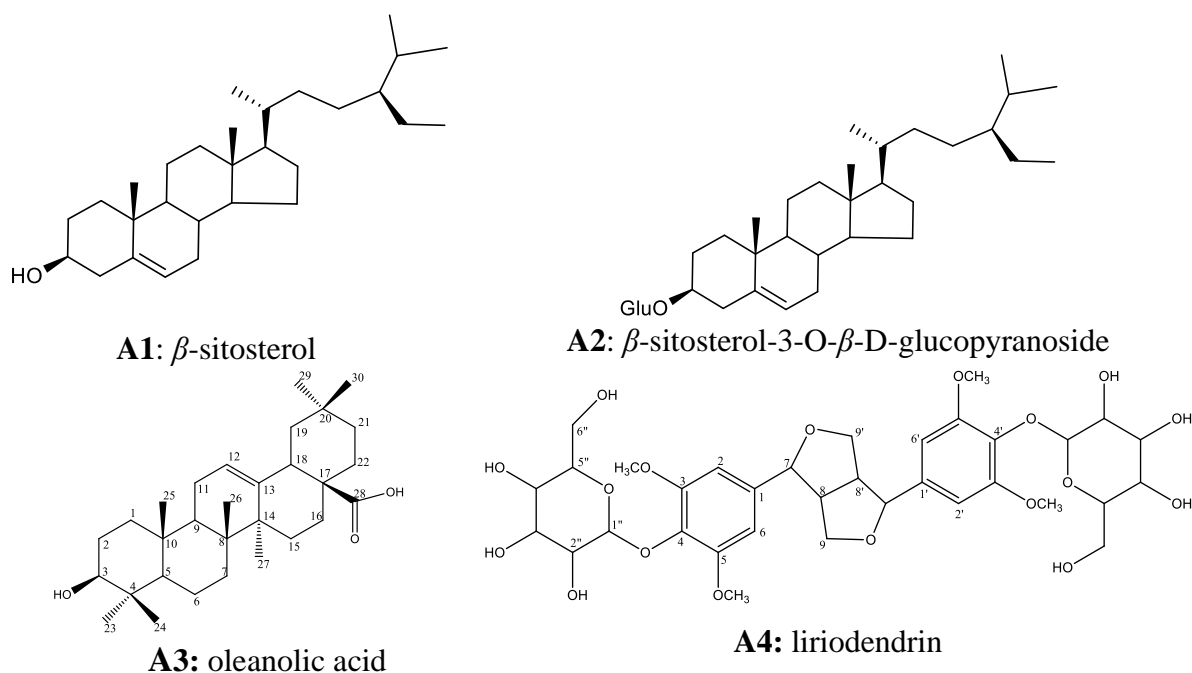
tonkinensis, **CT.M**) được lựa chọn ưu tiên nghiên cứu tiếp theo về thành phần hóa học nhằm tìm ra các hoạt chất có tác dụng ức chế sự phát triển của vi khuẩn *V. parahaemolyticus* tốt.

- Ké hoa đào (*Urena lobata*, **UL**), Bọ mắm (*Pouzolzia zeylanica*, **PZ**), Khổ sâm (*Croton tonkinensis*, **CT**) và Đơn châu chấu (*Aralia armata*, **AA**), Thồm lồm (*Polygonum chinense*, **PC.M**) và Thầu dầu (*Ricinus communis*, **RC.M**) thử nghiệm khả năng ức chế sự phát triển của vi khuẩn *V. parahaemolyticus* trên tôm thẻ chân trắng (*in vivo*) theo dạng cho môi trường nước và thức ăn với các liều lượng khác nhau.

4.2. Thành phần hóa học chính các thực vật có hoạt tính

4.2.1. Các hợp chất phân lập từ thân lá Đơn châu chấu (*Aralia armata*)

Từ Cao chiết *n*-hexanee và ethyl acetate thân lá Đơn châu chấu đã phân lập và xác định cấu trúc hóa học của 04 hợp chất, gồm 01 hợp chất lignan: liriodendrin (**A4**), 01 hợp chất triterpenoid: oleanolic acid (**A3**) và 02 hợp chất steroid: β -sitosterol (**A1**) và β -sitosterol-3-O- β -D-glucopyranoside (**A2**). Các hợp chất phân lập được từ cây đơn châu chấu cho thấy ngoài các hợp chất sterol có mặt trong cây còn có các hợp chất triterpen và lignan. Trong đó, hợp chất lignan: liriodendrin (**A4**) có cấu trúc đặc biệt nhất.



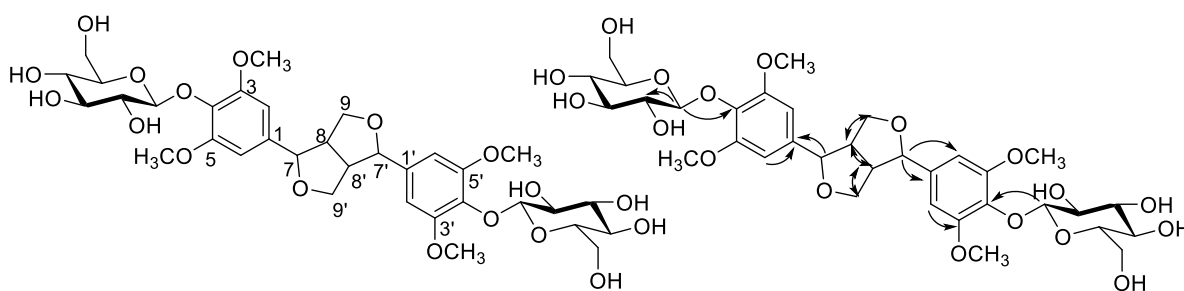
Hình 4.1. Các hợp chất phân lập được từ thân lá Đơn châu chấu

❖ Hợp chất lignan: liriodendrin (**A4**)

Phổ khối lượng ESI-MS của **A4** cho pic ion phân tử với m/z : 743,1 $[M+H]^+$

Phổ $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ và DEPT đã cho biết trong **A4** có 17 carbon gồm có 02 nhóm CH_3 , 02 nhóm metylen (CH_2), 10 nhóm metilen (CH) và 4 nguyên tử carbon bậc 4. Phổ $^1\text{H-NMR}$ quan sát được tín hiệu hai proton olephinic tại δ_{H} 6,65 (2H, s, H-2,6) với δ_{C} 104,3 ppm (C-2 và 6), tín hiệu dạng doublet nhóm methin liên kết với oxy tại δ_{H} 4,67 ppm (d, $J = 4,0$ Hz, H-7) và tín hiệu nhóm metylen liên kết với hydroxy tại δ_{H} 4,20 (1H, dd, $J = 7,0$ và $10,5$ Hz), 3,83 (1H, dd, $J = 4,0$ và $10,5$ Hz). Trên phổ $^{13}\text{C-NMR}$ cho biết phần lớn các tín hiệu của carbon có cường độ cao gấp đôi, điều có thường xuất hiện khi có những carbon giống nhau, trong đó, tín hiệu carbon bậc 4 tại độ chuyển dịch δ_{C} 152,6 ppm có cường độ gấp 2 lần so với các tín hiệu carbon khác, suy ra trong **A4** có 4 nhóm OCH_3 đối xứng nhau.

Trên cơ sở phân tích các dữ liệu phổ (^1H -, ^{13}C -, DEPT, HSQC, HMBC và MS) kết hợp các dữ kiện phổ cùng với tài liệu tham khảo [108] có thể khẳng định **A4** có 2 vòng thơm tương đương nhưng không liên kết trực tiếp với nhau có tên gọi là liriodendrin hay 3,3',5,5'-tetramethoxy,7,9';7',9'-diepoxy lignan-4,4'-di- O - β -D-glucopyranoside. Hợp chất này được phân lập đầu tiên từ loài *Liriodendron tulipifera* [109].



Hình 4.2. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC (H \rightarrow C) chính của **A4**

Bảng 4.2. Dữ liệu phổ của chất **A4** và chất tham khảo [108]

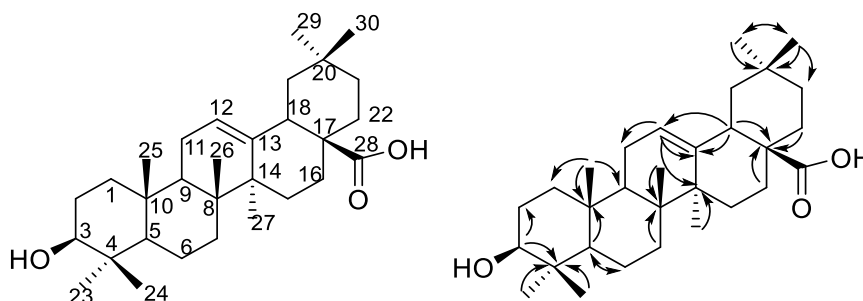
STT	A4			[108]
	δ_{C}	δ_{H}	H \rightarrow C (HMBC)	
1,1'	133,7	-		134,0
2,2'	104,3	6,65 (2H, s)	1, 3, 4, 7/1', 3',4',7'	104,4
3,3'	152,6	-		152,6
4,4'	137,1	-		137,1
5,5'	152,6	-		152,6
6,6'	104,3	6,65 (2H, s)	1, 5, 4, 7/1', 5',4',7'	104,4
7,7'	85,1	4,67 (1H, d, $J = 4,0$ Hz)	1, 2, 8, 9/1',2',8',9'	85,0
8,8'	53,6	3,09 (1H, m)	7, 9 / 7', 9'	53,6
9,9'	71,4	4,20 (1H, dd, $J = 7,0$ và $10,5$)	7,8 / 7',8'	71,4

		3,83 (1H, dd, $J = 3,5$ và $10,5$)		
OCH ₃	56,4	3,75 (6H, s)	3,5/ 3',5'	56,5
<i>Gluc</i>				
1'', 1'''	102,7	4,88 (2H, m)		102,8
2'', 2'''	74,2	3,19 (2H, m)		74,2
3'', 3'''	76,5	3,19 (2H, m)		76,5
4'', 4'''	69,9	3,12 (2H, m)		70,0
5'', 5'''	77,2	3,02 (2H, m)		77,1
6'', 6'''	60,9	3,60 (2H, m) và 3,40 (2H, m)		61,0

δ_H và # δ_C của lirioidendrin (1H : 400 MHz, ^{13}C : 125 MHz, CDCl₃) [108]

❖ Hợp chất triterpenoid: oleanolic acid (A3)

Hợp chất **A3** có công thức phân tử là C₃₀H₄₈O₃. Đây là một triterpen có 5 vòng cùng với một liên kết đôi, một acid. Biện luận cấu trúc hóa học của **A3** được trình bày chi tiết trong Phụ lục. Kết hợp so sánh các dữ liệu phổ thu được với tài liệu phổ của acid oleanolic, đã cho thấy hoàn toàn phù hợp [109]. Điều này cho phép khẳng định cấu trúc của chất **A3** là oleanolic acid với tên gọi 3 β -hydroxy-12-oleanen-28-oic acid với cấu trúc hóa học như sau:

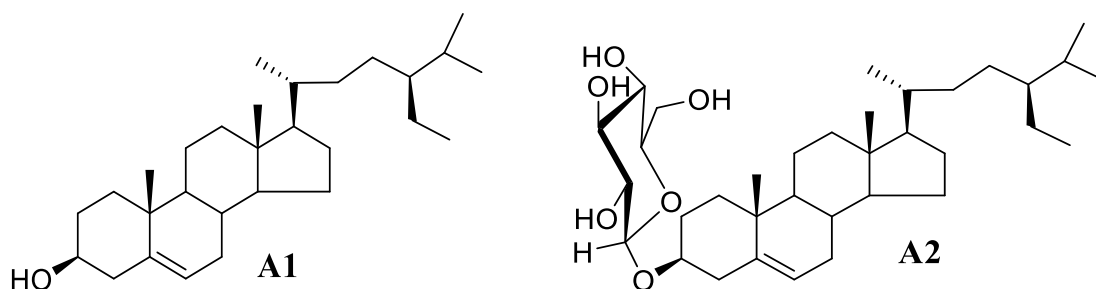


Hình 4.3. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC (H→C) chính của **A3**

❖ Hợp chất steroid: β -sitosterol (A1), β -sitosterol-3-O- β -D-glucopyranoside (A2)

Hợp chất **A1** và **A2** thu được dưới dạng tinh thể hình kim, điểm nóng chảy so với chất mẫu không thay đổi. Biện luận cấu trúc hóa học của **A1** và **A2** được trình bày chi tiết trong Phụ lục.

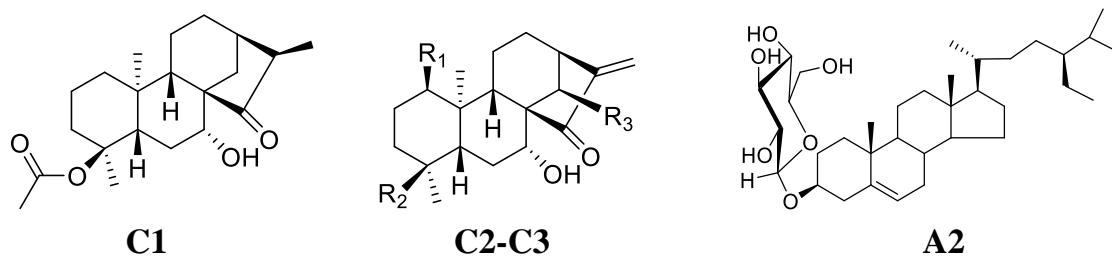
Trên cơ sở phân tích các dữ liệu phổ, kết hợp so sánh dữ liệu phổ chuẩn [110] và điểm nóng chảy của β -sitosterol; kết hợp so sánh dữ liệu phổ chuẩn [111] và điểm nóng chảy của β -sitosterol 3-O- β -D-glucopyranoside chuẩn cho phép khẳng định hợp chất **A1** là β -sitosterol hay stigmast-5-en-24R-3 β -ol và **A2** là β -sitosterol 3-O- β -D-glucopyranoside



Hình 4.4. Cấu trúc hóa học của A1 và A2

4.2.2. Các hợp chất phân lập từ lá Khổ sâm (*Croton tonkinensis*)

Từ Cao chiết dichloromethane lá Khổ sâm đã phân lập và xác định cấu trúc hóa học của 04 hợp chất, gồm 03 hợp chất diterpenoid: *ent*-18-axetoxy-7 β -hydroxy-kauran-15-on (C1), *ent*-1 α -axetoxy-7 β ,14 α -dihydroxykaur-16-en-15-on (C2) và *ent*-18-axetoxy-7 β -hydroxykaur-16-en-15-on (C3); và 01 hợp chất steroid: β -sitosterol-3-O- β -D-glucopyranoside (A2). Các hợp chất phân lập được từ cây Khổ sâm chủ yếu là các diterpenoid. Theo tài liệu nghiên cứu cho rằng thành phần chính có mặt trong cây là các hợp chất *ent*-kauran diterpenoid, ngoài ra một vài hợp chất alkaloid và flavonoid cũng có mặt trong cây nhưng không chiếm khối lượng lớn so với diterpenoid. Tiêu biểu là hợp chất *ent*-18-axetoxy-7 β -hydroxy-kauran-15-on (C1).



TT Tên khoa học

C1 *ent*-18-axetoxy-7 β -hydroxy-kauran-15-on

C2 *ent*-1 α -axetoxy-7 β ,14 α -dihydroxykaur-16-en-15-on

C3 *ent*-18-axetoxy-7 β -hydroxykaur-16-en-15-on

R₁ R₂ R₃

OAc H OH

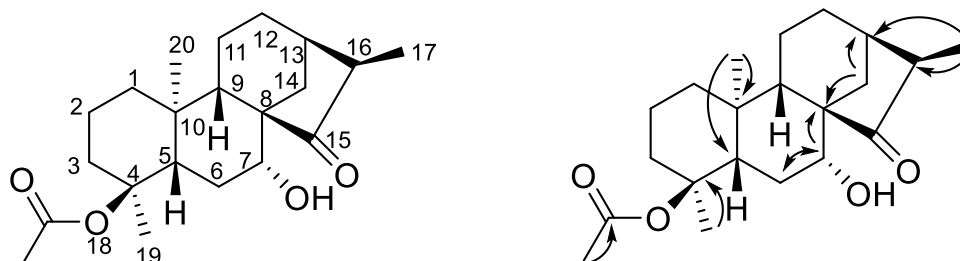
H OAc H

Hình 4.5. Các hợp chất phân lập được từ lá Khổ sâm

❖ Hợp chất *ent*-18-axetoxy-7 β -hydroxy-kauran-15-on (C1)

Trên phổ $^1\text{H-NMR}$ của C1 cho biết tín hiệu đặc trưng của 3 nhóm methyl dưới dạng singlet tại δ_{H} 0,83 (s, H-19); 1,11 (s, H-20) và 2,08 (s, CH_3CO) và một nhóm methyl dưới dạng doublet tại δ_{H} 1,11 (d, H-17). Trên phổ $^{13}\text{C-NMR}$ xuất hiện tín hiệu của nhóm ketone carbonyl tại δ_{C} 223,9 (C-15) dịch chuyển xuống trường thấp do ảnh hưởng liên hợp với liên kết đôi C-16/C-17 trong khung *ent*-kaurane [112]. Ngoài ra,

trên phổ ^1H - và ^{13}C -NMR còn quan sát được tín hiệu của nhóm acetyl (δ_{H} 2,08; δ_{C} 171,3 và 21,1) và nhóm hydroxyl tại C-18 (δ_{H} 3,65, 3,87; δ_{C} 72,3) và tại C-7 (δ_{H} 3,92; δ_{C} 71,2), và nhóm 17- CH_3 định hướng α được xác định bằng cách so sánh dữ liệu phổ ^1H - và ^{13}C -NMR với các hóa học của *ent*-(16*S*)-kauran-15 trong tài liệu tham khảo [84]. Hơn nữa, trên phổ NOESY còn quan sát được tương tác giữa H-16 và H-13, H-14a (δ_{H} 2,08); H-20 và H-14b; và H-17 và H-12 và giữa H-7 và H-5.



Hình 4.6. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC (H \rightarrow C) chính của **C1**

So sánh với các dữ kiện phổ thu được cho phép xác định hợp chất **C1** hoàn toàn phù hợp với cấu trúc *ent*-18-axetoxy-7 β -hydroxykaur-16-en-15-on [112,113].

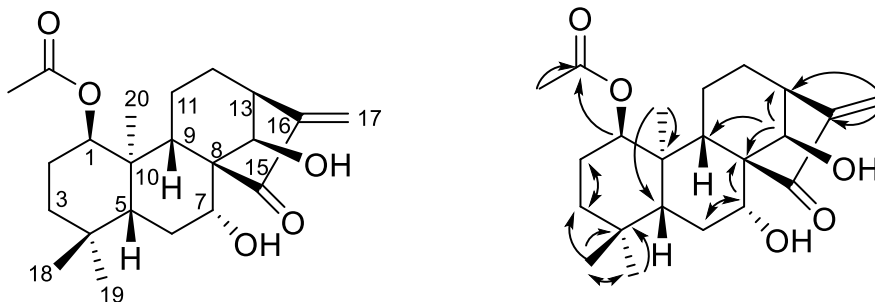
Bảng 4.3. Dữ liệu phổ của chất **C1** và chất tham khảo [113]

STT	C1		[113]
	δ_{C}	δ_{H} (mult, J Hz)	# δ_{C}
1	38,6	1,76 m và 0,71 ddd (13,0; 3,5; 9,5)	38,7
2	17,5	1,64 m và 1,50 m	17,5
3	35,5	1,37 m và 1,35m	35,5
4	36,4	-	36,4
5	46,4	1,27 d (12,5)	46,5
6	28,3	1,42 m và 1,72 m	28,3
7	71,2	3,92 dd (4,0; 11,5)	71,3
8	58,4	-	58,4
9	51,7	1,10 d (2,5)	51,8
10	39,2	-	39,2
11	17,8	1,47 m và 1,69 m	17,8
12	25,2	1,72 m	25,3
13	34,4	2,48 m	34,4
14	28,4	2,08 m và 1,98 dd (4,0; 12,0)	28,4
15	223,9	-	224,8
16	48,3	2,24 q (2,0; 14,0)	48,4
17	10,0	1,11d (2,5)	9,98
18	72,3	3,65 d (11,0) và 3,87 d (11,0)	72,3
19	17,5	0,83 s	17,5
20	18,2	1,11 s	18,2
CH_3CO	171,3	-	171,2
CH_3CO	21,1	2,08 s	21,1

δ_{C} của *ent*-18-axetoxy-7 β -hydroxy-kauran-15-on (^{13}C : 250 MHz, CDCl_3) [113]

❖ **Hợp chất *ent-1 α -axetoxy-7 β ,14 α -dihydroxykaur-16-en-15-on (C2)***

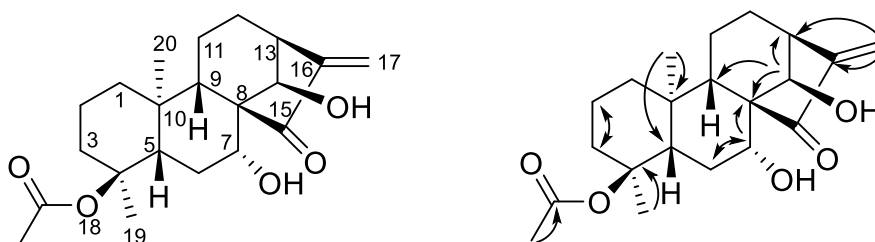
Hợp chất **C2** cũng gần tương tự như hợp chất **C1**. Biện luận cấu trúc hóa học của **C2** được trình bày chi tiết trong Phụ lục. Phân tích dữ liệu phổ NMR của **C2** kết hợp với so sánh với dữ liệu phổ chất chuẩn trong tài liệu tham khảo có thể khẳng định **C2** có tên gọi là *ent-1 α -axetoxy-7 β ,14 α -dihydroxykaur-16-en-15-on* [112,113].



Hình 4.7. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC (H→C) chính của **C2**

❖ **Hợp chất *ent-18-axetoxy-7 β -hydroxykaur-16-en-15-on (C3)***

Biện luận cấu trúc hóa học của **C3** được trình bày chi tiết trong Phụ lục. Phân tích các số liệu phổ của **C3** kết hợp so sánh với các dữ kiện phổ của *ent-18-axetoxy-7 β -hydroxykaur-16-en-15-on* trong các tài liệu đã công bố cho thấy hoàn toàn phù hợp [112,113]. Điều này cho phép xác định **C3** là một hợp chất *ent*-kaurane diterpenoid có tên gọi (-)-epicatechine *ent-18-axetoxy-7 β -hydroxykaur-16-en-15-on*.



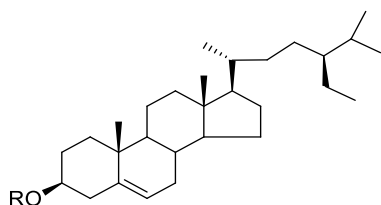
Hình 4.8. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC (H→C) chính của **C3**

❖ **Hợp chất steroid: β -sitosterol-3-O- β -D-glucopyranoside (A2)**

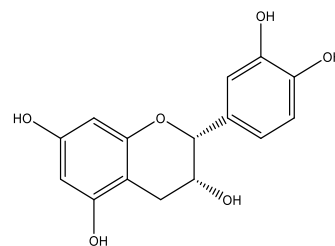
Biện luận và cấu trúc hóa học của hợp chất: β -sitosterol-3-O- β -D-glucopyranoside (**A2**) được trình bày như mục 4.2.1.3.

4.2.3. Các hợp chất phân lập từ cành lá Thồm lồm (*Polygonum chinens*)

Từ Cao chiết *n*-hexanee và ethyl acetatee cành lá Thồm lồm đã phân lập và xác định cấu trúc hóa học của 05 hợp chất, gồm 03 hợp chất flavonoid: quercetin (**P1**), (-)-epicatechine (**P2**) và quercetin-3-O- β -D-glucopyranoside (**P3**); và 02 hợp chất steroid: β -sitosterol (**A1**) và β -sitosterol-3-O- β -D-glucopyranoside (**A2**).

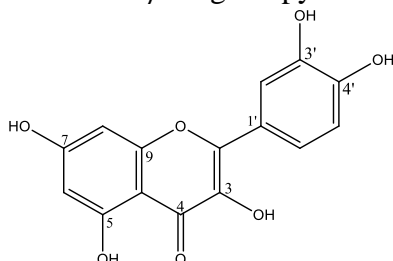


A1: β -sitosterol
A2: β -sitosterol-3-O- β -D-glucopyranoside

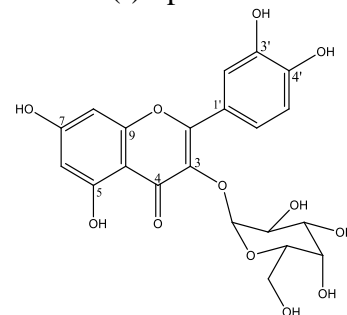


R
H
 Gluc

P2: (-)-epicatechine



P1: quercetin



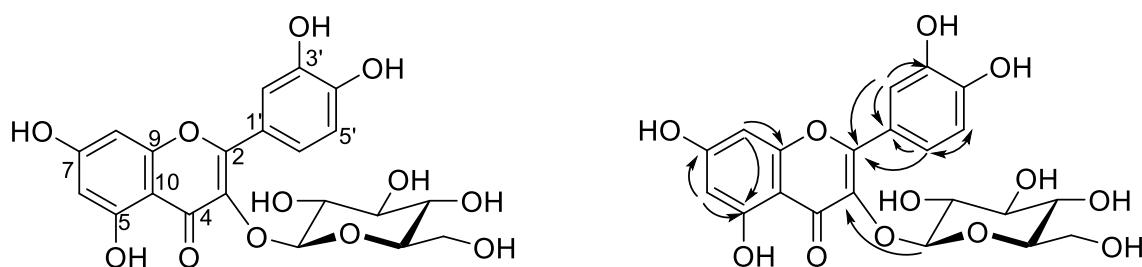
P3: quercetin-3-O- β -D-glucopyranoside

Hình 4.9. Các hợp chất phân lập được từ cành lá Thồm lồm

Các hợp chất phân lập được từ cây Thồm lồm chủ yếu là các hợp chất flavonoid. Tiêu biểu là hợp chất quercetin-3-O- β -D-glucopyranoside (**P3**).

❖ Hợp chất quercetin-3-O- β -D-glucopyranoside (**P3**)

Trên phổ $^1\text{H-NMR}$ của **P3** cho biết tín hiệu của 3 proton vòng thơm tại 7.72 (d, $J=2$ Hz, H-2'), 6.88 (d, $J=8.5$ Hz, H-5') và 7.59 (dd, $J=2.0$ và 8.5 Hz) trong hệ vòng ABD của flavonol bị thế ở vị trí 3' và 4' ở vòng B và tín hiệu của 2 proton ở vị trí meta tại 6.22 (d, $J=2.0$ Hz, H-6) và 6.41 (d, $J=2.0$ Hz, H-8) tại vòng A. Tín hiệu đặc trưng của phân tử đường liên kết β -glucose tại 5.28 (d, $J=8.0$, H-1''). Trên phổ $^{13}\text{C-NMR}$ kết hợp với phổ DEPT cho biết trong phân tử 1 có 21 carbon, bao gồm tín hiệu nhóm carbonyl tại 179.50 (C-4), 5 tín hiệu carbon thế oxy của khung flavone tại 135.61 (C-3), 163.05 (C-5), 166.01 (C-7), 145.91 (C-3'), 149.85 (C-4'). Ngoài ra trên phổ còn cho biết tín hiệu của các carbon của phân tử đường tại 104.26 (C-1''), 75.71 (C-2''), 78.10 (C-3''), 71.20 (C-4''), 78.39 (C-5''), 62.53 (C-6''). Phân tích dữ liệu phổ của **P3**, kết hợp với so sánh số liệu trong tài liệu tham khảo [114,115] có thể quy kết, hợp chất **P3** có tên gọi là quercetin-3-O- β -D-glucopyranoside.



Hình 4.10. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC (H \rightarrow C) chính của **P3**

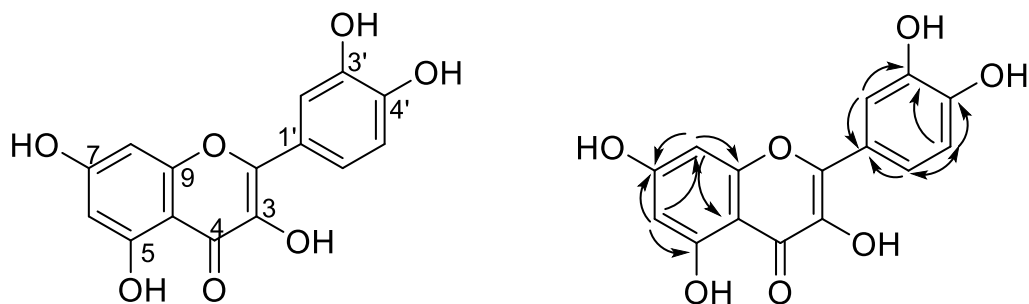
Bảng 4.4. Dữ liệu phổ NMR của **P3** và chất tham khảo [114]

TT	P3		[114]
	δ_C	δ_H (mult., J Hz)	# δ_C
2	159,0	-	158,4
3	135,6	-	135,6
4	179,5	-	179,5
5	163,1	-	163,0
6	99,9	6,22 (d, $J=2,0$ Hz)	99,9
7	166,0	-	165,97
8	94,7	6,41 (d, $J=2,0$ Hz)	94,7
9	158,5	-	158,4
10	105,7	-	105,7
1'	123,1	-	123,1
2'	117,5	7,72 (d, $J=2$ Hz)	117,6
3'	145,9	-	145,9
4'	149,9	-	149,8
5'	116,0	6,88 (d, $J=8,5$ Hz)	116,0
6'	123,2	7,59 (dd, $J=2,0$ và $8,5$ Hz)	123,2
1''	104,3	5,28 (d, $J=8,0$ Hz);	104,4
2''	75,7	3,48 (t, $J=9,5$ Hz)	75,7
3''	78,1	3,37(t, $J=9,0$ Hz)	78,1
4''	71,2	3,44(t, $J=9,0$ Hz)	71,2
5''	78,4	3,24(m)	78,4
6''	62,5	3,72 (dd, $J=2, 12,0$) 3,57 (dd, $J=5,5$ và $12,0$ Hz)	62,6

δ_C của quercetin-3-O- β -D-glucopyranoside (1H : 500 MHz, ^{13}C : 125 MHz, MeOD) [114]

❖ Hợp chất quercetin (**P1**)

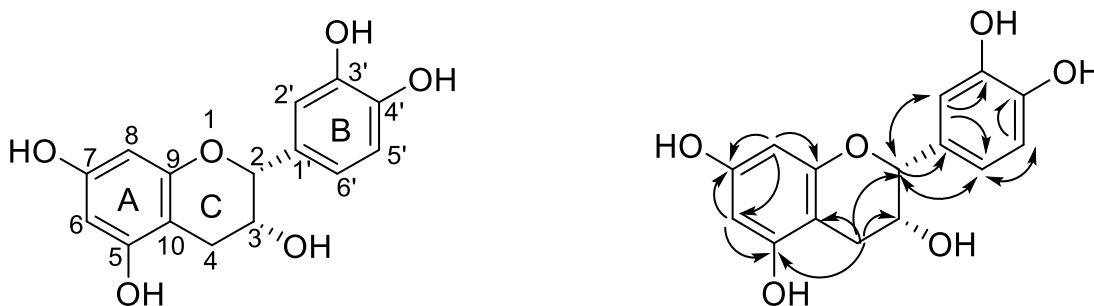
Hợp chất **P1** thu được dưới dạng bột màu vàng, điểm chảy 314-316 °C. Biện luận cấu trúc hóa học của **P1** được trình bày chi tiết trong Phụ lục. Các dữ liệu phổ cho biết đây là một hợp chất flavonoid. Kết hợp với so sánh với tài liệu tham khảo, cho phép xác định **P1** có tên gọi là quercetin [115].



Hình 4.11. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC (H→C) chính của **P1**

❖ Hợp chất (-)-epicatechine (P2)

Hợp chất **P2** công thức phân tử là $C_{15}H_{14}O_6$. Biện luận cấu trúc hóa học của **P2** được trình bày chi tiết trong Phụ lục.



Hình 4.12. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC (H→C) chính của **P2**

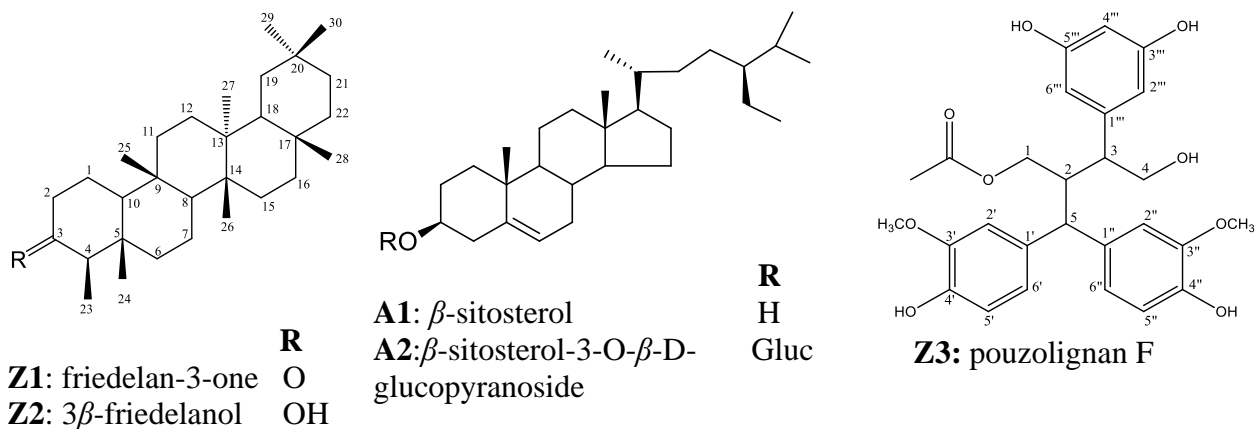
Phân tích các số liệu phổ của **P2** kết hợp so sánh với các dữ kiện phổ của (-)-epicatechine trong các tài liệu đã công bố cho thấy hoàn toàn phù hợp [116]. Điều này cho phép xác định **P2** là (-)-epicatechine.

❖ Hợp chất β -sitosterol (A1) và daucosterol (A2)

Biện luận và cấu trúc hóa học của hợp chất: β -sitosterol (**A1**) và β -sitosterol-3-O- β -D-glucopyranoside (**A2**) được trình bày như mục 4.1.3.

4.2.4. Các hợp chất phân lập từ thân lá Bọ mắm (*Pouzolzia zeylanica*)

Từ Cao chiết *n*-hexanee và ethyl acetate thân lá Bọ mắm đã phân lập và xác định cấu trúc hóa học của 05 hợp chất, gồm 02 hợp chất triterpenoid: friedelan-3-one (**Z1**) và 3β -friedelanol (**Z2**), 01 hợp chất lignan: pouzolignan F (**Z3**) và 02 hợp chất steroid: β -sitosterol (**A1**) và β -sitosterol-3-O- β -D-glucopyranoside (**A2**). Các hợp chất phân lập được từ cây Bọ mắm là các sterol, triterpen thuộc lớp chất terpen và lignan thuộc lớp chất polyphenol. Hợp chất triterpen là thành phần chủ yếu.



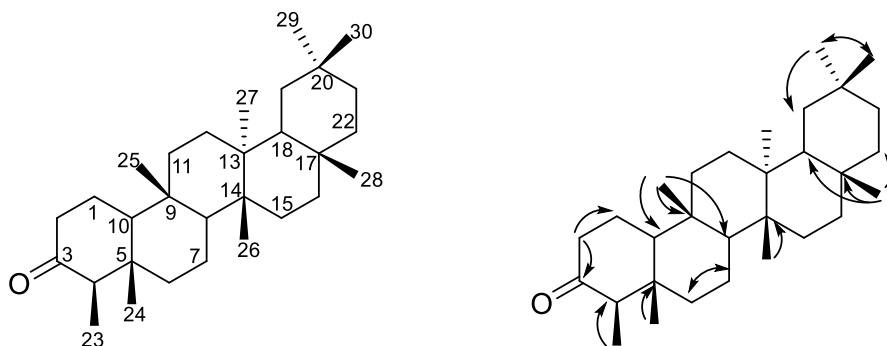
Hình 4.13. Các hợp chất phân lập được từ thân lá Bọ mắm

❖ Hợp chất friedelan-3-one (**Z1**)

Phổ $^1\text{H-NMR}$ của **Z1** cho biết xuất hiện tín hiệu của 8 nhóm methyl, trong đó có 7 nhóm methyl bậc 3 dạng singlet tại δ_{H} 0,72 (3H, s, H-24); 0,87 (3H, s, H-25); 0,95 (3H, s, H-29); 1,00 (3H, s, H-30); 1,059 (3H, s, H-26); 1,05 (3H, s, H-27); 1,18 (3H, s, H-28); và một nhóm methyl dạng double tại δ_{H} 0,88 (3H, d, $J= 6,5\text{Hz}$, H-23). Những tín hiệu này đặc trưng cho hợp chất có dạng triterpenoid khung friedelan.

Trên phổ $^{13}\text{C-NMR}$ kết hợp với phổ DEPT cũng cho biết trong phân tử có 30 nguyên tử carbon, bao gồm 8 nhóm methyl (CH_3), 4 nhóm methin (CH); 11 nhóm methylen (CH_2) và 7 nguyên tử carbon bậc 4. Đặc biệt trên phổ $^{13}\text{C-NMR}$ còn quan sát thấy tín hiệu đặc trưng của nhóm $\text{C}=\text{O}$ carbonyl ở δ_{C} 213,21ppm (C-3), ngoài ra là tín hiệu của nhóm methyl tại $\delta_{\text{C-23}}$ 6,82/ $\delta_{\text{H-23}}$ 0,88 (d, $J= 6,5\text{ Hz}$) đặc trưng cho nhóm methyl liên kết với C-4 của khung friedelan.

Kết quả phân tích các dữ kiện phổ $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ và DEPT đã cho phép dự đoán hợp chất **Z1** là friedelan-3-one. So sánh các dữ kiện phổ của **Z1** với friedelan-3-one thấy hoàn toàn phù hợp [117]. Như vậy hợp chất **Z1** được khẳng định là friedelan-3-one được phát hiện thêm từ loài *Pouzolzia zeylanica*.



Hình 4.14. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC (H→C) chính của **Z1**

Bảng 4.5. Dữ liệu phổ NMR của **Z1** và chất tham khảo [117]

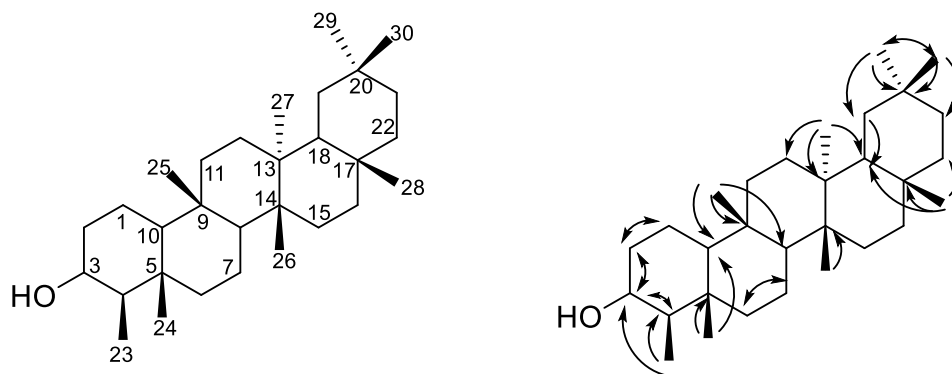
TT	Z1		[117]
	δ_{C}	δ_{H} (mult., J Hz)	# δ_{C}
1	22,3	1,96 (1H, m) và 1,67 (1H, dd, $J = 5,0$ và 13,0)	22,3
2	41,5	2,32/2,22 (2H, m)	41,6
3	213,3	-	213,3
4	58,3	2,24 (1H, m)	58,2
5	42,2	-	42,2
6	41,3	2,41/2,37 (1H, dd, $J = 5,0$ và 2,0)	41,3
7	18,3	1,74 (m)	18,3
8	53,1	1,38 (m)	53,1
9	37,5	-	37,5

10	59,5	1,53 (m)	59,5
11	35,7	1,47 (m)	35,6
12	30,5		30,5
13	39,7	-	39,7
14	38,3	-	38,3
15	32,5	1,59 (m)	32,5
16	36,0		36,0
17	30,0	-	30,0
18	42,8	1,75 (1H, dd, J = 3,0 và 15,0)	42,8
19	35,4		35,4
20	28,2	-	28,2
21	32,8	1,53/1,38 (m)	32,3
22	39,3	0,94 (m)	39,3
23	6,8	0,88 (3H, d, J= 6,5Hz)	6,9
24	14,7	0,72 (3H, s, H-24)	14,2
25	18,0	0,87 (3H, s, H-25)	18,1
26	20,3	1,01 (3H, s, H-26)	20,3
27	18,7	1,05 (3H, s, H-27)	18,7
28	32,1	1,18 (3H, s, H-28)	32,1
29	35,0	0,95 (3H, s, H-29)	35,1
30	31,8	1,00 (3H, s, H-30)	31,8

δ_C của friedelan-3-one (^1H : 500 MHz, ^{13}C : 125 MHz, CDCl_3) [117]

❖ Hợp chất 3 β -friedelanol (**Z2**)

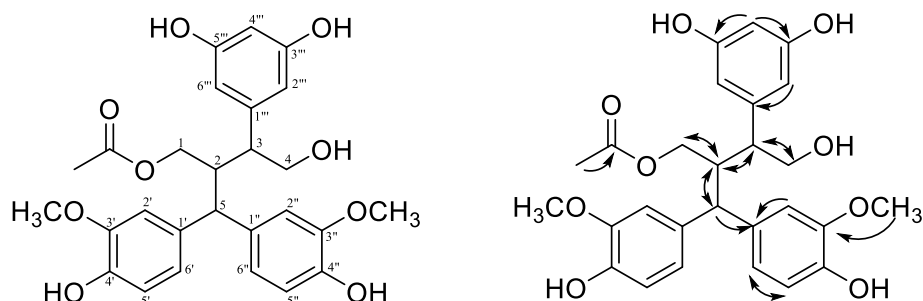
Hợp chất **Z2** cũng tương tự như **Z1**, nhưng trên phổ ^{13}C -NMR của **Z2** mất đi tín hiệu của nhóm C=O, thay vào đó là tín hiệu của carbon thuộc nhóm CH-OH ở δ_C 72,78 ppm (C-3), ngoài ra là tín hiệu của nhóm methyl đặc trưng cho nhóm methyl liên kết với C-4 của khung friedelan. Biện luận cấu trúc hóa học của **Z2** được trình bày chi tiết trong Phụ lục. So sánh các dữ kiện phổ của **Z2** với 3 β -friedelanol thấy hoàn toàn phù hợp [118]. Hợp chất **Z2** được khẳng định là 3 β -friedelanol được phân lập từ loài *Pouzolzia zeylanica*.



Hình 4.15. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC (H→C) chính của **Z2**

❖ Hợp chất lignan: pouzolignan F (**Z3**)

Chất **Z3** thu được ở dạng bột, màu vàng rất nhạt. Biện luận cấu trúc hóa học của **Z3** được trình bày chi tiết trong Phụ lục. Phân tích dữ liệu phổ của **Z3** kết hợp với tài liệu tham khảo [119] cho phép xác định **Z3** có tên gọi là pouzolignan F.



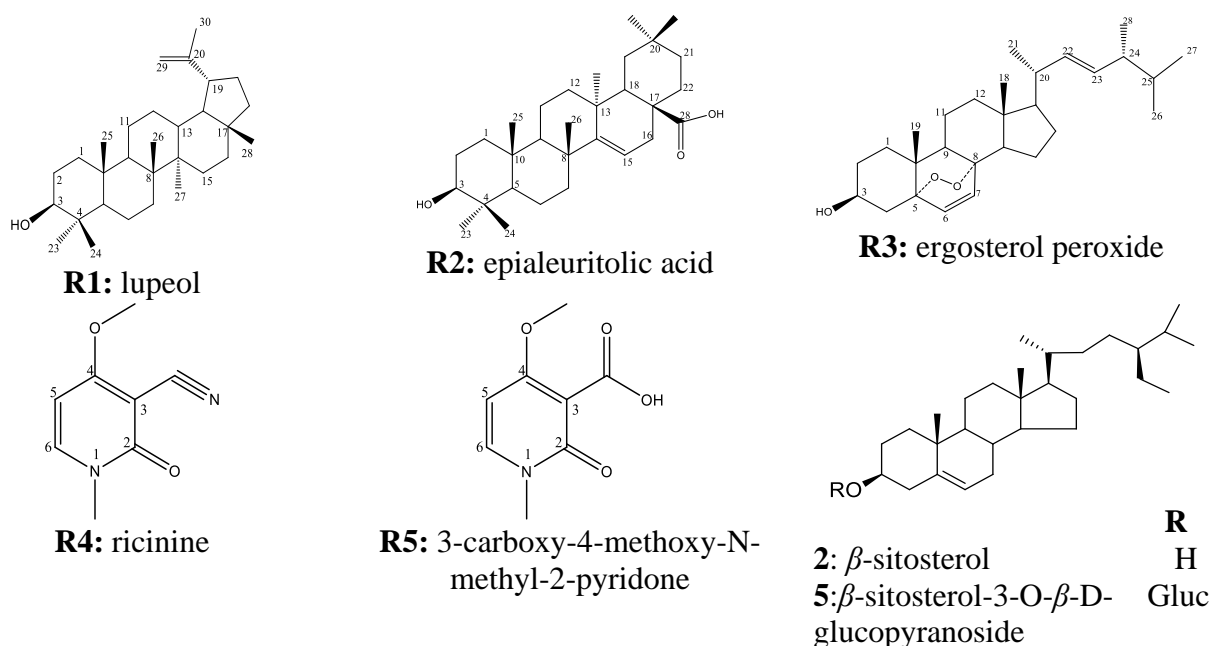
Hình 4.16. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC (H→C) chính của **Z3**

❖ Hợp chất β -sitosterol-3-O- β -D-glucopyranoside (**A2**)

Biện luận và cấu trúc hóa học của hợp chất: β -sitosterol-3-O- β -D-glucopyranoside (**A2**) được trình bày như mục 4.2.1.3.

4.2.5. Các hợp chất phân lập từ lá Thầu dầu (*Ricinus communis*)

Từ Cao chiết *n*-hexanee và ethyl acetate lá Thầu dầu đã phân lập và xác định cấu trúc hóa học của 07 hợp chất, gồm 02 hợp chất triterpenoid: lupeol (**R1**) epialeuritolic acid (**R2**), 02 hợp chất alkaloid: ricinine (**R4**) và 3-carboxy-4-methoxy-N-methyl-2-pyridone (**R5**), 03 hợp chất steroid: ergosterol peroxide (**R3**), β -sitosterol (**A1**) và β -sitosterol-3-O- β -D-glucopyranoside (**A2**).

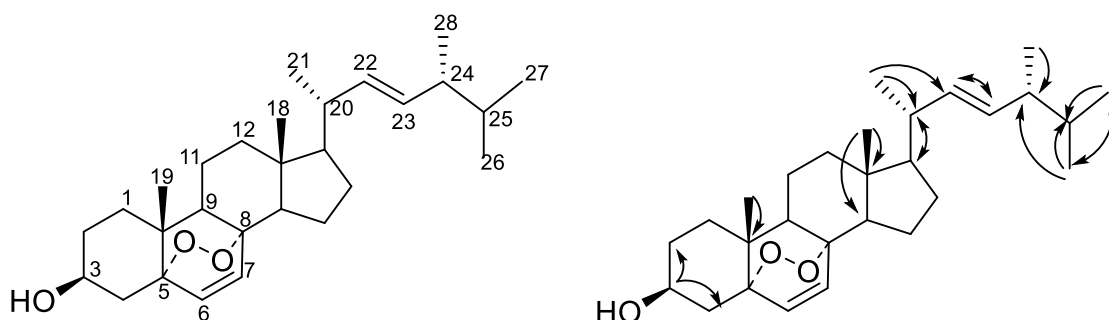


Hình 4.17. Các hợp chất phân lập được từ lá Thầu dầu

Các hợp chất phân lập được từ cây Thầu dầu với sự có mặt của các hợp chất: steroid, triterpene, và alkaloid. Trong đó khối lượng các hợp chất steroid chiếm ưu thế, theo tài liệu công bố trước đây hợp chất có mặt trong cây chủ yếu là ricinine (thuộc lớp chất alkaloid), tuy nhiên trên thực tế thì các hợp chất sterol, triterpene và alkaloid phân lập được có khối lượng tương đương nhau và bước đầu cho thấy thành phần chính có mặt trong cây thuộc lớp chất steroid.

❖ Hợp chất ergosterol peroxide (**R3**)

Hợp chất **R3** thu được dưới dạng chất bột màu trắng, có tính quang hoạt. Phổ ^{13}C -NMR kết hợp với phổ DEPT của **R3** xuất hiện tín hiệu của 28 carbon, bao gồm 6 nhóm methyl, 7 nhóm methylene, 11 nhóm methine và 4 carbon bậc 4. Phổ ^{13}C -NMR xuất hiện tín hiệu của 2 carbon chứa nối đôi ở trường thấp tại δ_{C} 82,2 (C-5); 79,44 (C-8); 64,49 (C-3), tín hiệu của 3 carbon gắn với oxi tại δ_{C} 82,16 (C-5); 79,44 (C-8); 64,49 (C-3), trong đó có 2 carbon bậc bốn gắn với oxi C-5, C-8. Phân tích số liệu phổ thực nghiệm của **R3** kết hợp so sánh với dữ liệu phổ trong tài liệu tham khảo [120,121] có thể khẳng định hợp chất 3 có tên gọi là ergosterol peroxide ($5\alpha,8\alpha$ -epidioxyergosta-6,22-dien- 3β -ol).



Hình 4.18. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC (H→C) chính của **R3**

Bảng 4.6. Dữ liệu phổ NMR của **R3** và chất tham khảo [120]

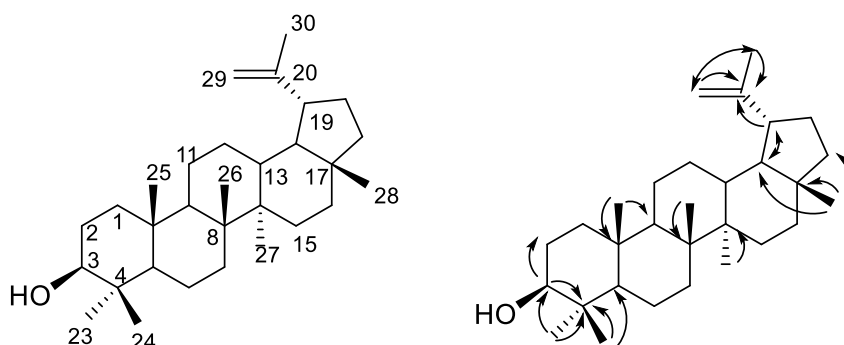
TT	R3		[120]
	δ_{C}	δ_{H} (mult., J Hz)	# δ_{C}
1	34,2	1,74 (2H, m)	34,7
2	30,2	-	30,1
3	64,5	3,97 (1H, m)	66,5
4	37,0	-	37,9
5	82,2	-	82,2
6	135,4	6,23 (1H, d, $J = 8,5$ Hz)	135,4
7	130,8	6,50 (1H, d, $J = 8,5$ Hz)	130,8
8	79,4	-	79,4

9	51,2	-	51,1
10	37,0	-	36,9
11	23,4	1,25 và 1,58 (2H, m)	23,4
12	39,4	1,27 và 1,99 (2H, m)	39,4
13	44,6	-	44,6
14	51,7	1,58 (1H, m)	51,7
15	20,7	1,42 và 1,66 (2H, m)	20,6
16	28,6	1,33 và 1,81 (2H, m)	28,7
17	56,3	1,25 (1H, m)	56,2
18	12,9	0,81 (3H, s)	12,9
19	18,2	0,88 (3H, s)	18,2
20	39,7	2,05 (1H, m)	39,7
21	20,9	1,00 (3H, d, $J = 6,5$ Hz)	20,9
22	135,2	5,24 (1H, dd, $J = 8,5$ và $15,0$ Hz)	135,2
23	132,4	5,18 (1H, dd, $J = 8,5$ và $15,0$ Hz)	132,3
24	42,9	1,86 (1H, m)	42,8
25	33,1	1,6 (1H, m)	33,1
26	19,7	0,91 (3H, s)	19,6
27	20,0	0,93 (3H, s)	20,1
28	17,6	0,97 (3H, s)	17,6

δ_C của ergosterol peroxide (^1H : 500 MHz, ^{13}C : 125 MHz, CDCl_3) [120]

❖ Hợp chất lupeol (R1)

Hợp chất **R1** thu được dưới dạng hình kim, không màu. Biện luận cấu trúc hóa học của **R1** được trình bày chi tiết trong Phụ lục. Phân tích dữ liệu phổ ^1H -, ^{13}C -NMR, DEPT, HSQC và HMBC kết hợp với so sánh với dữ liệu phổ trong tài liệu tham khảo, hợp chất **R1** được xác định là 3β -lup-20(29)-en-3-ol hay lupeol [122].

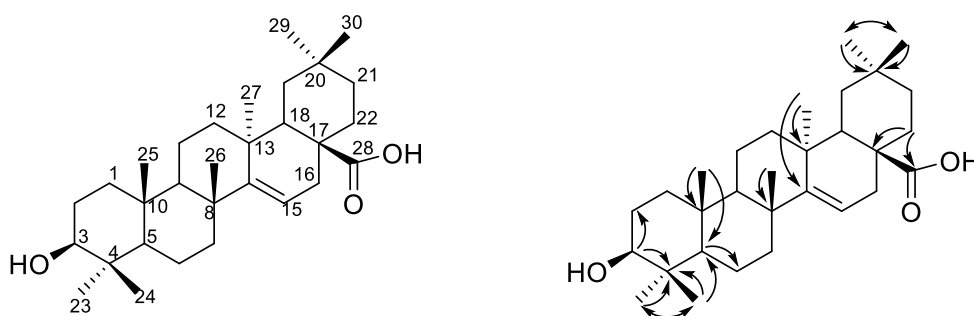


Hình 4.19. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC (H \rightarrow C) chính của **R1**

❖ Hợp chất epialeuritolic acid (R2)

Hợp chất **R2** thu được dưới dạng hình kim, không màu, công thức phân tử $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3$. Biện luận cấu trúc hóa học của **R2** được trình bày chi tiết trong Phụ lục.

Phân tích dữ liệu phổ ^1H -, ^{13}C -NMR, DEPT, HSQC và HMBC kết hợp với so sánh với dữ liệu phổ trong tài liệu tham khảo, hợp chất **R2** được xác định là epialeuritolic acid hay 3-hydroxy-14-taraxeren-28-oic acid [123,124].



Hình 4.20. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC (H \rightarrow C) chính của **R2**

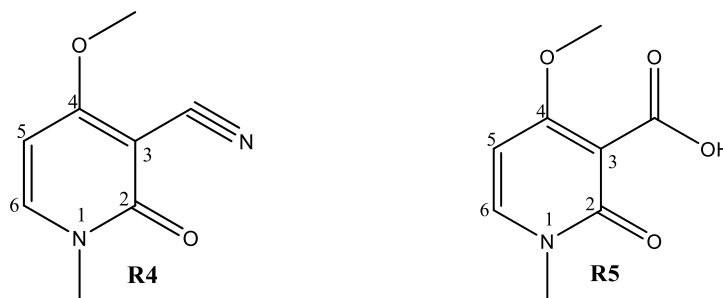
❖ Hợp chất ricinine (**R4**)

Hợp chất **R4** thu được dưới dạng hình kim, không màu, điểm chảy 200 °C. Biện luận cấu trúc hóa học của **R4** được trình bày chi tiết trong Phụ lục. Phân tích số liệu phổ thực nghiệm của **3** kết hợp so sánh với dữ liệu phổ trong tài liệu tham khảo [125] có thể khẳng định hợp chất **R4** có tên gọi là ricinine.

❖ Hợp chất 3-carboxy-4-methoxy-*N*-methyl-2-pyridone (**R5**)

Hợp chất **R5** thu được dưới dạng hình kim, không màu, nhiệt độ nóng chảy 193 °C. Phổ khối lượng ESI-MS (m/z): 183 [M]⁺ tương ứng với công thức phân tử C₈H₉NO₄. Biện luận cấu trúc hóa học của **R5** được trình bày chi tiết trong Phụ lục.

Phân tích số liệu phổ thực nghiệm của **R5** kết hợp so sánh với dữ liệu phổ trong tài liệu tham khảo [126,127] có thể khẳng định hợp chất **R5** có tên gọi là 3-carboxy-4-methoxy-*N*-methyl-2-pyridone.



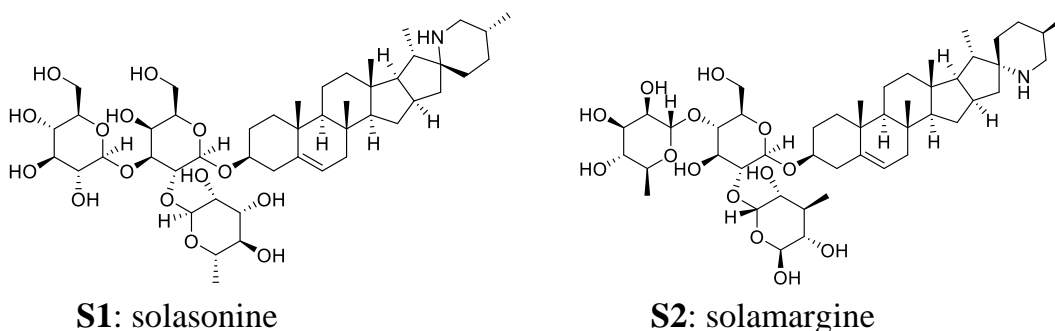
Hình 4.21. Cấu trúc hóa học của **R4** và **R5**

❖ Hợp chất β -sitosterol (**A1**) và β -sitosterol-3-O- β -D-glucopyranoside (**A2**)

Biện luận và cấu trúc hóa học của hợp chất: β -sitosterol (**A1**) và β -sitosterol-3-O- β -D-glucopyranoside (**A2**) được trình bày như mục 4.1.3.

4.2.6. Các hợp chất phân lập từ quả Cà trái vàng (*Solanum xanthocarpum*)

Từ Cao chiết methanol lá Thầu dầu đã phân lập và xác định cấu trúc hóa học của 02 hợp chất alkaloid: solasonine (**S1**) và solamargine (**S2**). Các hợp chất alkaloid là thành phần chính của các loài thực vật thuộc chi *Solanum*. Solasonine là thành phần hóa học chính của quả Cà trái vàng.



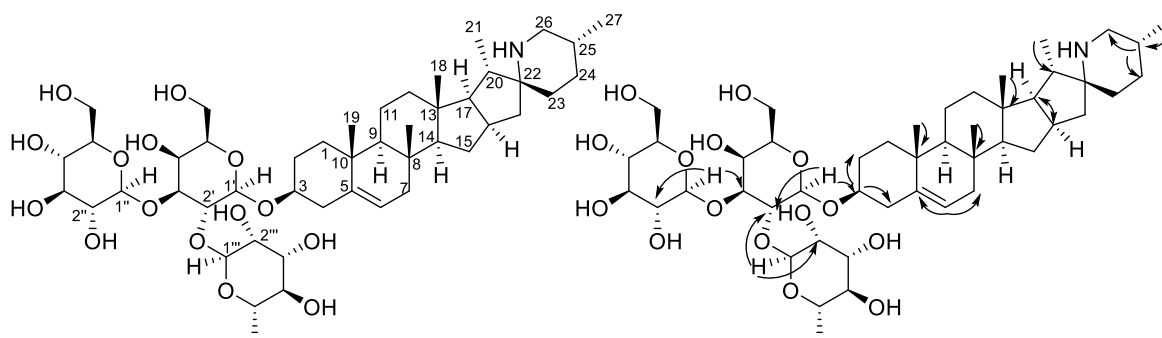
Hình 4.22. Các hợp chất phân lập được từ quả Cà trái vàng

❖ Hợp chất solasonine (**S1**)

Trên phổ $^1\text{H-NMR}$ của **S1** cho biết, tín hiệu đặc trưng của ba proton anome tại δ_{H} 5,23 (1H, d, $J= 1,5$ Hz, H-1''); 5,22 (1H, d, $J= 1,5$ Hz, H-1''') và 4,51 (1H, d, $J= 7,5$ Hz, H-1') và tín hiệu của proton olefin tại δ_{H} 5,41 (1H, d, $J= 5,0$ Hz, H-6).

Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ và DEPT cho biết **S1** có 45 carbon, gồm 4 carbon không có hidro, 24 nhóm CH, 12 nhóm CH_2 , và 5 nhóm CH_3 . Trong đó, tín hiệu của 27 carbon thuộc phần aglycon và tín hiệu của 18 carbon của 3 phân tử đường hexose. Tín hiệu nhóm methyl tại ($\delta_{\text{C}}/\delta_{\text{H}}$ 17,9/1,30) gợi ý đến đường rhamnose; tín hiệu của H-4' tại δ_{H} 3,94 (2H, m) đặc trưng cho đường galactose; và các tín hiệu cacbon của đơn vị đường còn lại tại đặc trưng cho một đơn vị đường glucopyranose. Cấu hình tại C-22 là R vì giá trị độ chuyển dịch hóa học của C-23 (δ_{C} 33,8) đặc trưng cho các hợp chất spirosolane [128].

Trên phổ HMBC của **S1** quan sát được, tương tác giữa proton H-1' (δ_{H} 4,51) với carbon C-3 (δ_{C} 79,7) cho biết phân tử đường liên kết với aglycone tại C-3. Tương tác HMBC giữa H-1'' (δ_{H} 5,23) với C-2' (δ_{C} 73,7); và H-1''' (δ_{H} 5,22) với C-3' (δ_{C} 83,5) cho biết các liên kết O-glycoside giữa Rha C-1'' và Gal C-2', giữa Glu C-1''' và Gal C-3'. Kết hợp các dữ liệu phổ của **S1** với chất đã biết trong tài liệu tham khảo [128] có thể khẳng định hợp chất **S1** phân lập được từ quả Cà trái vàng có tên gọi là solasonine.



Hình 4.23. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC (H→C) chính của **S1**

Bảng 4.7. Dữ liệu phổ NMR của **S1** và chất tham khảo [128]

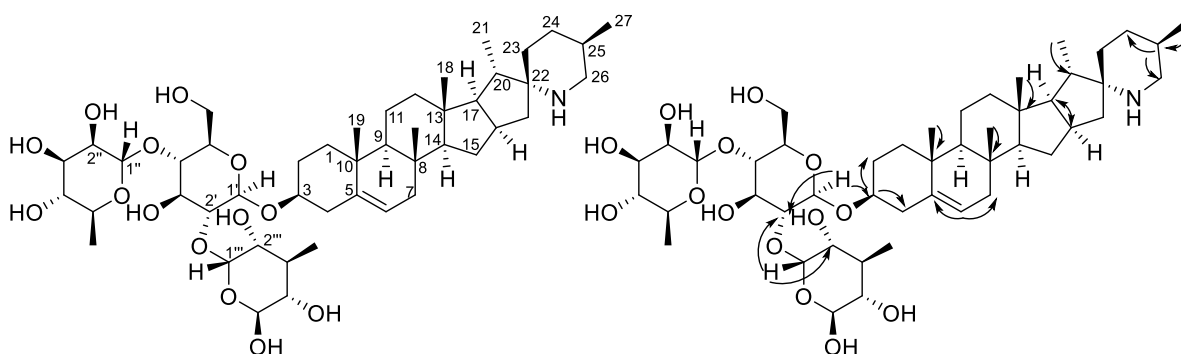
STT	S1			[128]
	DEPT	δ_C (ppm) δ_H (ppm)		# δ_C (ppm)
1	CH ₂	38,5	1,70 (m) và 0,91 (m)	37,5
2	CH ₂	31,0	2,09 (m)/1,86 (m)	30,1
3	CH	79,7	3,53 (1H, td, $J=9,5$ và $13,5$ Hz)	78,3
4	CH ₂	39,5	2,78 (m) và 2,73 (m)	38,8
5	C	141,9	-	140,8
6	CH	122,5	5,41(1H, d, $J=5,0$ Hz)	121,7
7	CH ₂	33,1	1,87 (m) và 1,20 (m)	32,4
8	CH	32,8	1,63 (m)	32,4
9	CH	51,7	0,86 (m)	50,3
10	C	38,0	-	37,1
11	CH ₂	21,9	1,40 (m)	21,1
12	CH ₂	40,7	1,70 (m) và 1,08 (m)	40,1
13	C	41,8	-	40,6
14	CH	57,7	1,07 (m)	56,7
15	CH ₂	33,1	2,03 (m) và 1,48 (m)	31,5
16	CH	79,3	3,41 (3H, m)	78,7
17	CH	63,6	1,74 (m)	63,4
18	CH ₃	16,7	0,85 (s)	16,5
19	CH ₃	17,9	1,0 (3H, d, $J=6,5$ Hz)	19,3
20	CH	42,8	1,95 (m)	41,6
21	CH ₃	15,2	1,07 (d, 7,0)	15,6
22	C	99,8	-	98,2
23	CH ₂	33,8	1,74 (m) và 1,69 (m)	34,6
24	CH ₂	30,7	1,62 (m) và 1,27 (m)	31,0
25	CH	30,7	1,52 (m)	31,7
26	CH ₂	47,1	2,73 (m)	48,0
27	CH ₃	19,8	1,07 (3H, s)	19,7
1'	CH	100,5	4,51 (1H, d, $J=7,5$ Hz)	100,3
2'	CH	73,7	3,04 (1H, m)	76,3
3'	CH	83,5	4,57 (1H, m)	84,8

4'	CH	69,8	3,94 (2H, m)	70,2
5'	CH	73,9	3,41 (3H, m)	74,9
6'	CH ₂	62,0	3,82; 3,66	62,4
1''	CH	103,0		105,7
2''	CH	73,4	3,41 (3H, m)	74,8
3''	CH	78,0	3,66 (5H, m)	78,7
4''	CH	70,7	3,66 (5H, m)	71,4
5''	CH	76,6	3,94 (2H, m)	78,3
6''	CH ₃	60,9	3,82; 3,66	61,8
1'''	CH	102,3	5,22 (1H, d, $J=1,5\text{Hz}$)	102,0
2'''	CH	72,4	3,58 (1H, m)	72,4
3'''	CH	72,2	3,66 (5H, m)	72,7
4'''	CH	72,4	4,15 (m)	74,0
5'''	CH	67,9	4,14 (1H, dd, $J=6,0$ và $9,5\text{Hz}$)	69,3
6'''	CH ₃	17,9	1,3 (3H, d, $J=6,0\text{Hz}$)	18,5

δ_C của solasonine (^{13}C : 125 MHz, DMSO) [128]

❖ Hợp chất solamargine (S2)

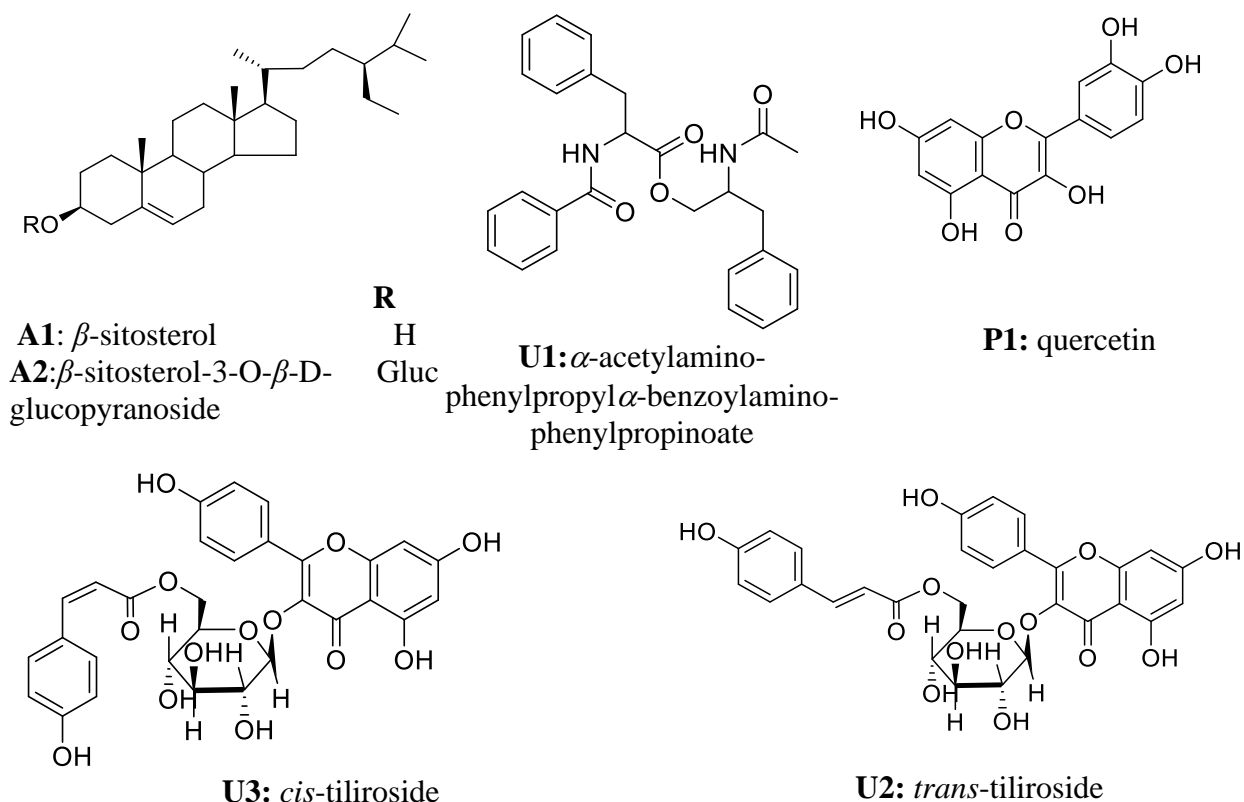
Biện luận cấu trúc hóa học của **S2** được trình bày chi tiết trong Phụ lục. Kết hợp các dữ liệu phổ của **S2** với chất đã biết trong tài liệu tham khảo [128] có thể khẳng định hợp chất **S2** phân lập được từ Cao chiết ethyl axetat của quả *Cà trái vàng* có tên gọi là solamargine.



Hình 4.24. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC (H→C) chính của **S2**

4.2.7. Các hợp chất phân lập từ thân Ké hoa đào (*Urena lobata*)

Từ Cao chiết *n*-hexanee và ethyl acetatee thân Ké hoa đào đã phân lập và xác định cấu trúc hóa học của 06 hợp chất, gồm 03 hợp chất flavonoid: quercetin (**P1**), *trans*-tiliroside (**U2**) và *cis*-tiliroside (**U3**), 01 hợp chất alkaloid: α -acetylaminophenylpropyl α -benzoylamino-phenylpropinoate (**U1**); và 02 hợp chất steroid: β -sitosterol (**A1**) và β -sitosterol-3-O- β -D-glucopyranoside (**A2**). Các hợp chất phân lập được từ cây Ké hoa đào với sự có mặt của hợp chất sterol, 01 hợp chất có chứa nitơ, còn lại chủ yếu là các hợp chất flavonoid.



Hình 4.25. Các hợp chất phân lập được từ thân Ké hoa đào

❖ Hợp chất α -acetylamino-phenylpropyl α -benzoylamino-phenylpropinoate

Trên phổ $^1\text{H-NMR}$ của **U1** có tín hiệu của 15 proton vòng thơm nằm trong vùng 7,06 - 7,71 ppm và một nhóm CH_3 nằm δ_{H} 2,02 ppm (3H, s, H-12'). Ngoài ra còn có các tín hiệu proton của 2 nhóm CH δ_{H} 4,75 (1H, ddd, $J = 6,0$; 13,5 và 2,5 Hz, H-8) và 4,35 (1H, m, H-8'). Có 3 nhóm CH_2 ở δ_{H} 3,93 ppm (1H, dd, $J = 5,0$ và 11,5 Hz), δ_{H} 3,82 ppm (1H, dd, $J = 4,0$ và 11,5 Hz); δ_{H} ở 2,75 ppm (2H, m), 6 nhóm CH_3 , 11 nhóm CH_2 , 7 nhóm CH và 3 nhóm C bậc bốn.

Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ và phổ DEPT cho tín hiệu cộng hưởng của 27 carbon, trong đó có 6 carbon bậc bốn (bao gồm 3 $\text{C}=\text{O}$ và 3 C sp^2), 17 nhóm OH (bao gồm 15 CH thuộc vòng thơm), 3 nhóm CH_2 và 1 nhóm CH_3 . 3 nhóm $\text{C}=\text{O}$ có độ chuyển dịch hóa học tại δ_{C} 170,2 ppm; 170,8 ppm; 167,1 ppm.

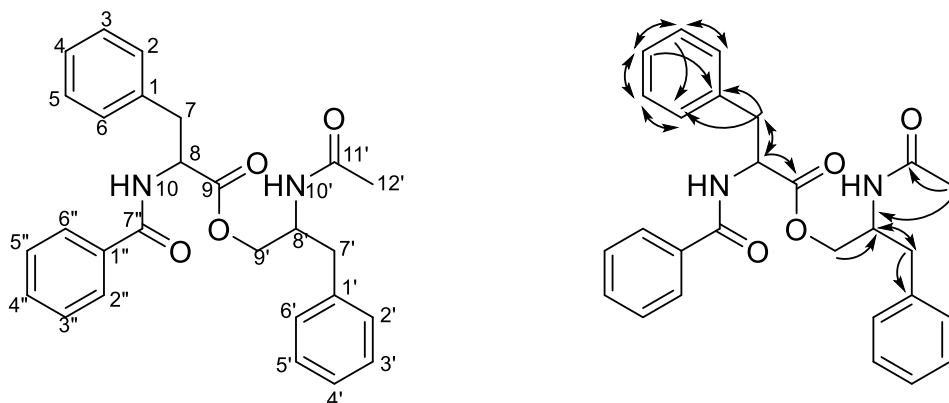
Phổ HSQC cho phép xác định các carbon liên kết trực tiếp với hydrogen tương ứng: CH (δ_{H} 4,75 ppm; δ_{C} 55,0 ppm); CH (δ_{H} 4,34 ppm; δ_{C} 49,5 ppm); CH_2 (δ_{H} 3,22 ppm; δ_{C} 38,4 ppm); CH_2 (δ_{H} 2,75 ppm; δ_{C} 3,75 ppm); CH_2 (δ_{H} 3,82 và 3,93 ppm; δ_{C} 64,6 ppm); CH_3 (δ_{H} 2,02 ppm; δ_{C} 20,8 ppm) và các nhóm CH thuộc vòng thơm.

Phổ HMBC cho thấy tín hiệu tương tác của proton CH_2 -7 (δ_{H} 3,22 và 3,05 ppm) với C thơm bậc bốn δ_{C} 136,6 ppm (C-1); proton CH-8 tại δ_{H} 4,75 ppm với C-7

của nhóm CH₂ (δ_H 3,22-3,05 ppm, δ_C 38,4 ppm) và C=O (δ_C 170,2) chứng tỏ có một vòng thơm có gắn với 1 nhóm CH₂(7)-CH(8)-C=O(9) (Mảnh A).

Tương tác của proton nhóm CH₂ (δ_H 2,75 ppm, H-7') với C bậc bốn (δ_C 136,7 ppm, C-1') và CH thơm (δ_C 129,1 ppm, C-2',6'); proton nhóm CH₂ (δ_H 3,93 và 3,82 ppm, H-9') với C-7' (δ_C 37,5 ppm) và CH-8' (δ_C 4,34 ppm); và cho phép thiết lập mảnh có 1 vòng thơm bất kỳ gắn với CH₂(7')-CH(8')-CH₂(9'). Nhóm C=O (C-11') có tương tác với NH (δ_H 5,91 ppm, H-10') và CH₃ (δ_H 2,02 ppm, H-12') chứng tỏ nhóm acetyl CH₃(12')-CO(11') gắn với NH(10'). C-11' có tương tác với H-9' cho phép xác định NH(10') gắn với CH-8'. CH₂-9' có độ dịch chuyển hóa học tại δ_H 3,93 và 3,82 chứng tỏ có gắn với oxi cho phép thiết lập mảnh B. Tương tác của C=O (δ_C 167,1 ppm, C-7'') với H (δ_H 7,71 ppm, H-2'',6'') và nhóm NH (δ_H 6,71 ppm, H-10) cho phép dự đoán có mảnh bao gồm 1 vòng thơm liên kết với C=O và nhóm NH-10, ta có mảnh C. Trên phổ HMBC, ta còn quan sát thấy tương tác của H-10(NH) với C-8, chứng tỏ mảnh C nối với mảnh A qua liên kết NH(10)-CH(8). Còn lại suy ra mảnh B gắn với mảnh C qua liên kết ester của nhóm CO(9)-O.

Kết hợp các dữ liệu phổ ¹H và ¹³C-NMR 1 chiều và 2 chiều, và so sánh tài liệu tham khảo được [129] cho phép khẳng định cấu trúc hợp chất **U1** là : α -acetyl-amino-phenylpropyl α -benzoylamino-phenylpropinoate. Sự có mặt của hợp chất α -acetyl-amino-phenylpropyl α -benzoylamino-phenylpropinoate, là hợp chất có chứa 2 nitơ lần đầu tiên được các nhà khoa học Trung Quốc phân lập từ loài *Gastrodia elata* Blumei vào năm 2002, và ở loài *Phyllanthus reticulatus* [129]. Kết quả nghiên cứu trên cho biết đây là **lần đầu tiên** trong chi *Urena* đã phân lập được hợp chất này và *Urena lobata* là loài thực vật thứ 4 trong thiên nhiên đã phân lập được nó [130].



Hình 4.26. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC (H→C) chính của **U1**

Bảng 4.8. Dữ liệu phổ NMR của **U1** và chất tham khảo [129]

STT	δ_C (ppm)		δ_H (ppm, J Hz)	
	[105]	U1	[105]	U1
Vòng A				
1	136,6	136,6	-	-
2	129,3	129,3	7,20 -7,30 (5H, m)	7,24 (1H, m, overlap)
3	128,8	128,8		7,28 (1H, m)
4	127,1	127,2		7,21 (1H, m)
5	128,8	128,8		7,28 (1H, m)
6	129,3	129,3		7,24 (1H, m, overlap)
7	38,4	38,4		3,22 (1H, dd, $J = 13,5; 5,7$) 3,06 (1H, dd, $J = 13,5; 8,5$)
8	55,0	55,0		4,75 (1H, m)
9	170,2	170,2	-	-
10			6,72 (1H, d, $J = 7,8$)	6,71 (1H, d, $J = 7,5$)
Vòng B				
1'	136,7	136,7		
2'	129,1	129,1	7,07 (1H, m)	7,07 (1H, m)
3'	128,6	128,7	7,16 (1H, m)	7,16 (1H, m)
4'	126,7	126,8	7,14 (1H, m)	7,14 (1H, m)
5'	128,6	128,7	7,16 (1H, m)	7,16 (1H, m)
6'	129,1	129,1	7,07 (1H, m)	7,07 (1H, m)
7'	37,4	37,5	2,75 (2H, m)	2,75 (2H, dd, $J = 13,7; 7,5$)
8'	49,4	49,5	4,35 (1H, m)	4,34 (1H, m)
9'	64,6	64,6	3,93 (1H, dd, $J = 11,2; 4,8$) 3,82 (1H, dd, $J = 11,2; 4,3$)	3,93 (1Ha, dd, $J = 11,5; 5,0$) 3,82 (1Hb, dd, $J = 11,5; 4,0$)
10'			5,91 (1H, d, $J = 7,8$)	5,91 (1H, d, $J = 8,5$)
10'-CO		170,8	-	-
COCH ₃		20,8		2,02 (3H, s)
Vòng C				
1''	133,6	133,7	-	--
2''	127,0	127,0	7,71 (1H, m)	7,71 (1H, dd, $J = 7,0; 1,0$)
3''	128,6	128,6	7,44 (1H, m)	7,42 (1H, dd, $J = 7,0; 8,0$)
4''	131,9	131,9	7,53 (1H, tt, $J = 7,6; 1,1$)	7,52 (1H, ddd, $J = 7,0; 8,0; 1,0$)
5''	128,6	128,6	7,44 (1H, m)	7,42 (1H, dd, $J = 7,0; 8,0$)
6''	127,0	127,0	7,71 (1H, m)	7,71 (1H, d, $J = 7,0$)
7''	167,1	167,1	-	-

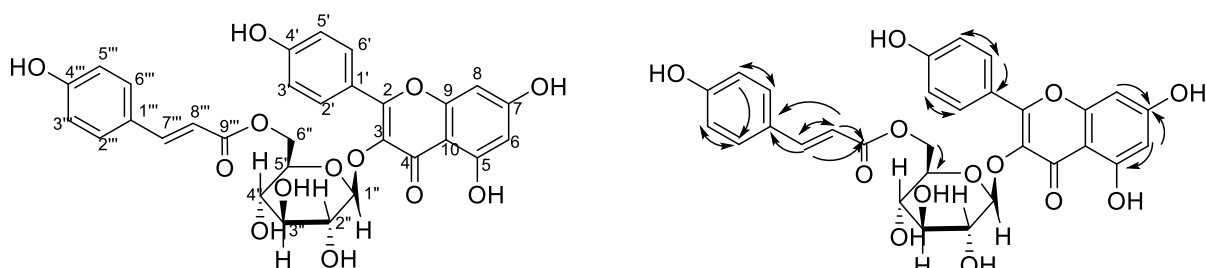
δ_H và # δ_C của α -acetylamino-phenylpropyl α -benzoylamino-phenylpropinoate (1H : 400 MHz, ^{13}C : 125 MHz, CDCl₃) [129]

❖ Hợp chất quercetin (P1)

Biện luận và cấu trúc hóa học của hợp chất quercetin (**P1**) được trình bày như mục 4.2.3.1.

❖ Hợp chất *trans*-tiliroside (U2)

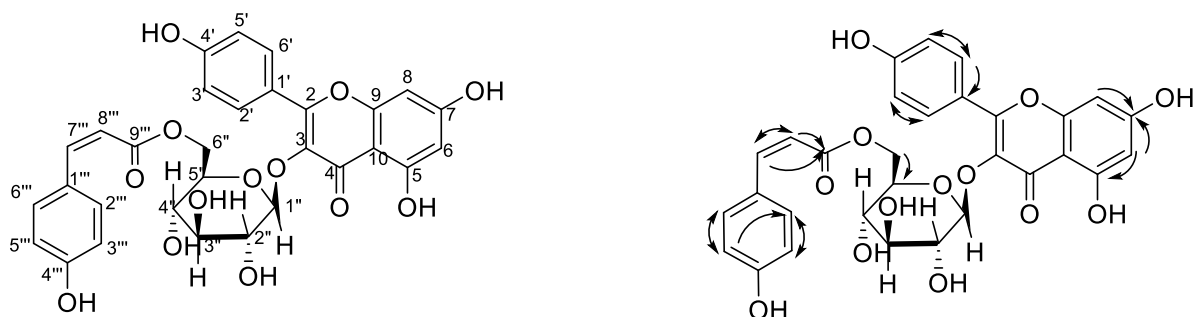
Biện luận cấu trúc hóa học của **U2** được trình bày chi tiết trong Phụ lục. Qua việc phân tích các dữ kiện phổ và đối chiếu với dữ liệu phổ thu thập được trong tài liệu tham khảo, cấu trúc của hợp chất **U2** được xác định là một flavonol có tên gọi *trans*-tiliroside, hợp chất này lần đầu tiên được phân lập từ loài *Tilia argenta* và gần đây nó cũng được phân lập từ loài *Lasiopetalum macrophyllum* [131], [132].



Hình 4.27. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC (H→C) chính của **U2**

❖ Hợp chất *cis*-tiliroside (U3)

Biện luận cấu trúc hóa học của **U2** được trình bày chi tiết trong Phụ lục. Kết hợp phân tích phổ ^{13}C -NMR cùng với các phổ 2 chiều HSQC và HMBC của **U3** và so sánh với các dữ liệu phổ của *cis*-tiliroside đã khẳng định cấu trúc của hợp chất **U3** là flavonol có tên gọi *cis*-tiliroside hay kaempferol-3-*O*- β -D-(6-*O*-*cis*-*p*-coumaroyl) glucopyranoside, hợp chất này phân lập từ loài *Fragaria ananassa* vào năm 2004 [131,132,133].



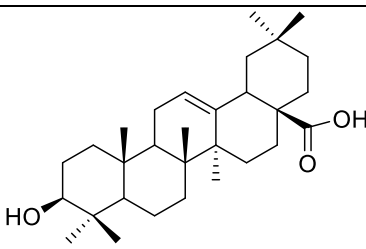
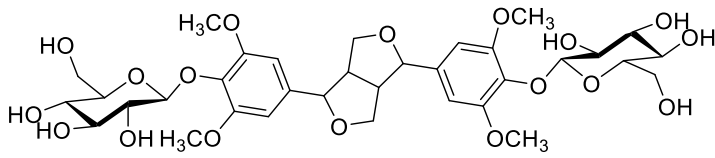
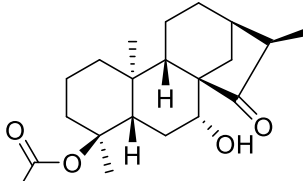
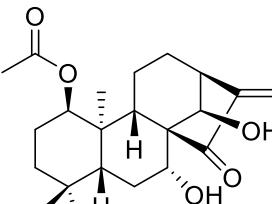
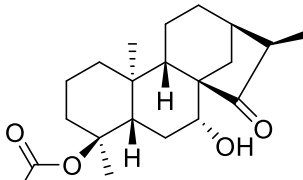
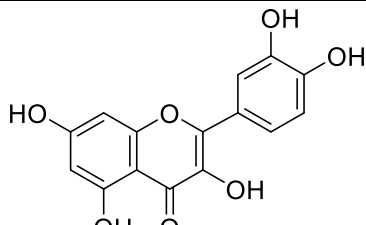
Hình 4.28. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC (H→C) chính của **U3**

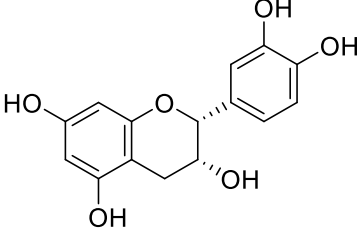
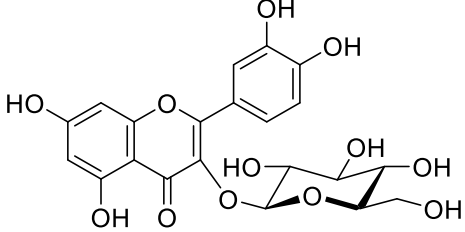
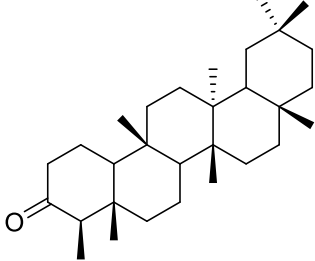
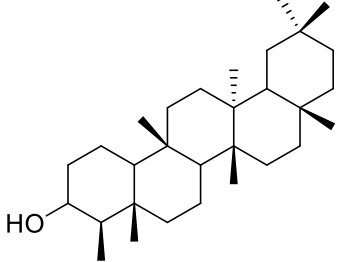
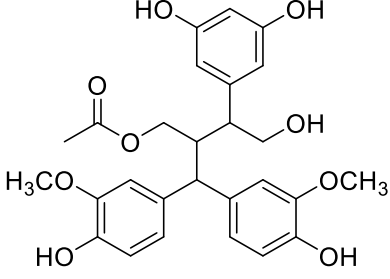
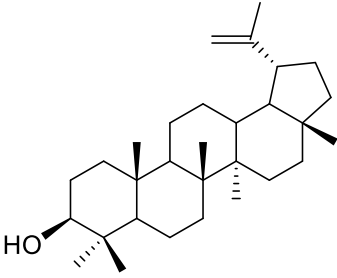
❖ Hợp chất β -sitosterol (A1) và β -sitosterol-3-*O*- β -D-glucopyranoside (A2)

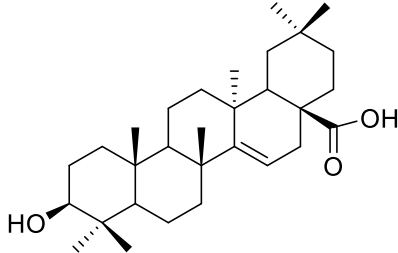
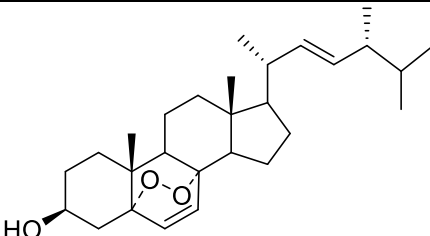
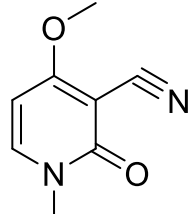
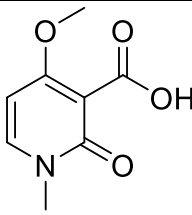
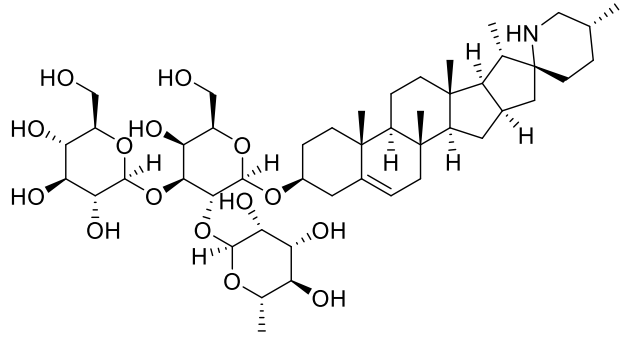
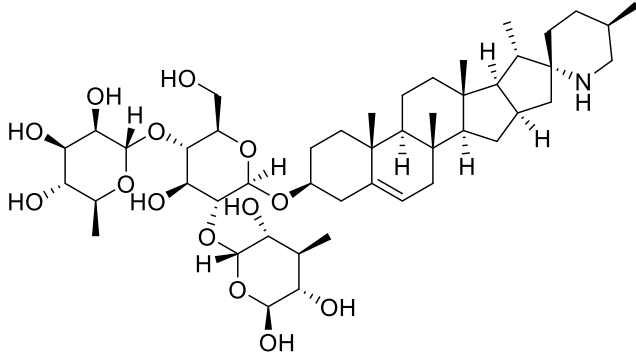
Biện luận và cấu trúc hóa học của hợp chất: β -sitosterol (**A1**) và β -sitosterol-3-*O*- β -D-glucopyranoside (**A2**) được trình bày như mục 4.2.1.3.

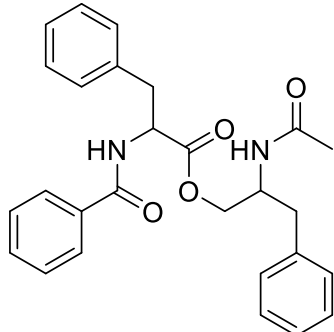
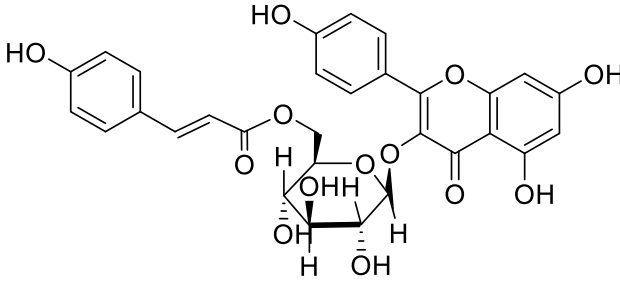
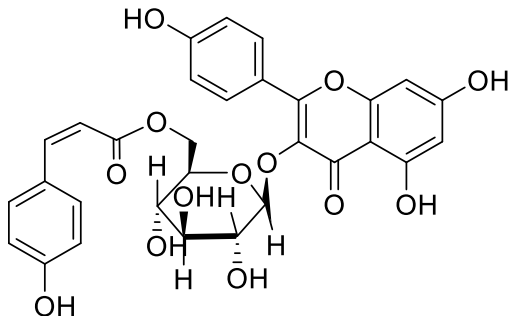
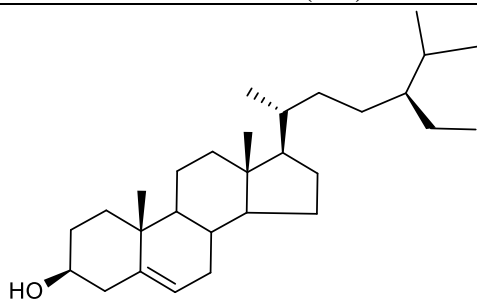
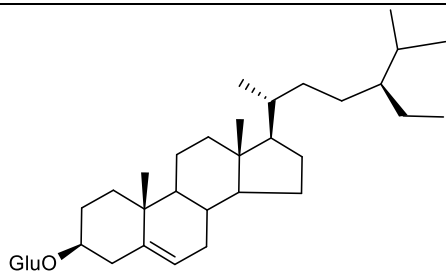
Kết quả phân lập và xác định cấu trúc các hợp chất trong 7 loài đã nghiên cứu
 được tóm tắt ở bảng 4.9.

Bảng 4.9. Tổng hợp các hợp chất phân lập được từ 7 loài nghiên cứu

TT	Tên hợp chất	Lớp chất	Loài phân lập	KL (mg)	Tính mới
1	 oleanolic acid (A3)	Triterpenoid	<i>A. armata</i>	18,0	
2	 liriodendrin (A4)	Lignan	<i>A. armata</i>	12,5	L
3	 ent-18-acetoxy-7β-hydroxy-kauran-15-on (C1)	Diterpenoid	<i>C. tonkinensis</i>	20,5	
4	 ent-1α-acetoxy-7β,14α-dihydroxykaur-16-en-15-on (C2)	Diterpenoid	<i>C. tonkinensis</i>	50,5	
5	 ent-18-acetoxy-7β-hydroxykaur-16-en-15-on (C3)	Diterpenoid	<i>C. tonkinensis</i>	20,3	
6	 quercetin (P1)	Flavonoid	<i>P. chinense</i> <i>U. lobata</i>	9,8 7,3	

7	 <p>(-)-epicatechine (P2)</p>	Flavonoid	<i>P. chinense</i>	6,9	L
8	 <p>quercetin-3-O-β-D-glucopyranoside (P3)</p>	Flavonoid	<i>P. chinense</i>	9,5	L
9	 <p>friedelan-3-one (Z1)</p>	Triterpenoid	<i>P. zeylanica</i>	110,5	L
10	 <p>3β-friedelanol (Z2)</p>	Triterpenoid	<i>P. zeylanica</i>	36,0	L
11	 <p>pouzolignan F (Z3)</p>	Lignan	<i>P. zeylanica</i>	6,6	H
12	 <p>lupeol (R1)</p>	Triterpenoid	<i>R. communis</i>	13,0	

13	 <p>epialeuritolic acid (R2)</p>	Triterpenoid	<i>R. communis</i>	20,5	L
14	 <p>ergosterol peroxide (R3)</p>	Steroid	<i>R. communis</i>	19,2	L
15	 <p>ricinine (R4)</p>	Alkaloid	<i>R. communis</i>	16,2	
16	 <p>3-carboxy-4-methoxy-N-methyl-2-pyridone (R5)</p>	Alkaloid	<i>R. communis</i>	10,1	H
17	 <p>solasonine (S1)</p>	Alkaloid	<i>S. xanthocarpum</i>	50,0	
18	 <p>solamargine (S2)</p>	Alkaloid	<i>S. xanthocarpum</i>	9,0	

19	 <p>α-acetylamino-phenylpropyl α-benzoylamino-phenylpropanoate (U1)</p>	Alkaloid	<i>U. lobata</i>	53,1	H
20	 <p><i>trans</i>-tiliroside (U2)</p>	Flavonoid	<i>U. lobata</i>	8,6	H
21	 <p><i>cis</i>-tiliroside (U3)</p>	Flavonoid	<i>U. lobata</i>	5,3	H
22	 <p>β-sitosterol (A1)</p>	Steroid (Phytosterol)	<i>A. armata</i> <i>C. tonkinensis</i> <i>P. chinense</i> <i>P. zeylanica</i> <i>R. communis</i> <i>U. lobata</i>	30,0 1800 1100 35,3 28,1 1200	
23	 <p>Daucosterol (A2)</p>	Steroid (Phytosterol)	<i>A. armata</i> <i>C. tonkinensis</i> <i>P. chinense</i> <i>P. zeylanica</i> <i>R. communis</i> <i>U. lobata</i>	44,0 15,5 9,5 50,2 13,4 15,1	

L: Lần đầu tiên phân lập từ loài

H: Lần đầu tiên phân lập từ họ

4.3. Kết quả tác dụng kháng *V. parahaemolyticus* của các chất sạch

Các hợp chất sạch thu được từ 7 loài nghiên cứu tiếp tục được thử nghiệm *in vitro* tác dụng kháng *V. parahaemolyticus* gây bệnh AHPND. Chuẩn bị chủng khuẩn *V. parahaemolyticus* và phương pháp thử nghiệm được thực hiện như mục 3.9.

Kết quả thử nghiệm của các chất sạch: oleanolic acid, liriiodendrin (từ cây Đơn châu chấu), 3-friedelanone, 3 β -friedelanol, pouzolignan F (từ cây Bọ mắm), lupeol, epialeuritolic acid, ergosterol peroxide, ricinine (từ cây Thầu dầu) và solasonine và solamagine (từ Cà trái vàng) đối với vi khuẩn *V. parahaemolyticus* ở 4 nồng độ 50, 100, 200 và 300 μ g/khoanh tằm bằng phương pháp khoanh giấy kháng sinh khuếch tán trên đĩa thạch theo W. Kirby và A. Bauer (1961) trong phòng thí nghiệm, đều không có hiệu quả kháng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* gây bệnh AHPND.

Kết quả thử nghiệm tác dụng kháng *V. parahaemolyticus* các chất sạch: *ent*-18-axetoxy-7 β -hydroxykauran-15-on (**C1**, hàm lượng 0,012%), *ent*-1 α -axetoxy-7 β ,14 α -dihydroxykaur-16-en-15-on (**C2**, hàm lượng 0,80%) và *ent*-18-axetoxy-7 β -hydroxykaur-16-en-15-on (**C3**, hàm lượng 0,52%) (từ cây Khô sâm) và quercetin-3-O- β -D-glucopyranoside (**P3**, hàm lượng 1,11%) bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch theo Chaweepack (2015) được thể hiện như bảng 4.10.

Bảng 4.10. Hiệu quả ức chế của các chất sạch đến sự phát triển *V. parahaemolyticus* (VP) được nuôi cấy trong môi trường ISB sau 24 giờ.

Tên chất	Nồng độ chất	Mật độ (CFU/ml)	Tỷ lệ ức chế vi khuẩn sau 24h
Còn tuyệt đối + VP + ISB		1,37 x 10 ⁸	
P3	0,1%	2,4 x 10 ⁷	82,5%
C1		4,0 x 10 ⁷	70,8%
C2		7,6 x 10 ⁷	44,5%
C3		6,8 x 10 ⁷	50,4%

Kết quả bảng 4.10 cho thấy tỷ lệ ức chế *V. parahaemolyticus* ở nghiệm thức chứa quercetin-3-O- β -D-glucopyranoside (**P3**) là 82,5% và kể đến là nghiệm thức chứa chất *ent*-1 α -axetoxy-7 β ,14 α -dihydroxykaur-16-en-15-on (**C1**) chiếm 70,8% ở nồng độ 0,1%. Ở các nghiệm thức chứa các chất tinh *ent*-18-axetoxy-7 β -hydroxykaur-16-en-15-on (**C3**) và *ent*-1 α -axetoxy-7 β ,14 α -dihydroxykaur-16-en-15-on (**C2**) có tỷ lệ ức chế vi khuẩn *V. parahaemolyticus* lần lượt là 50,4% và 44,5%. Điều này cho thấy quercetin-3-O- β -D-glucopyranoside (**P3**) và *ent*-1 α -axetoxy-

7 β ,14 α -dihydroxykaur-16-en-15-on (**C1**) ở nồng độ 0,1% có khả năng ức chế sự phát triển của *V. parahaemolyticus* tốt. Tiếp theo nghiên cứu tập trung vào sử dụng mô phỏng docking phân tử tìm để hiểu lý thuyết cơ chế tác động của các hoạt chất này đến sự chuyển hóa proline của vi khuẩn *V. parahaemolyticus* và so sánh với kết quả thực nghiệm.

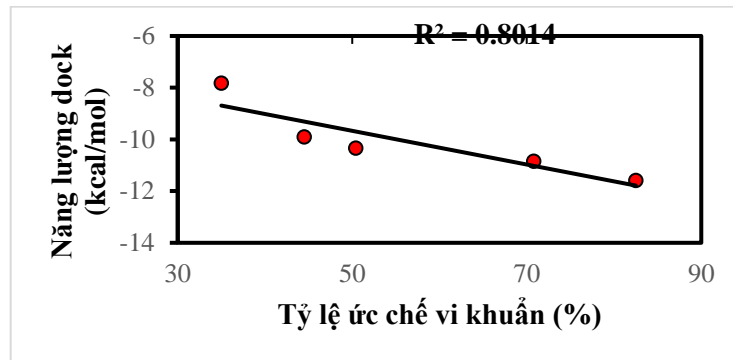
4.4. Mô phỏng docking phân tử tìm hiểu cơ chế tác động của một số hoạt chất đến sự chuyển hóa proline của vi khuẩn *V. parahaemolyticus*

Proline dehydrogenase (PDH) là một enzyme điều hòa đóng vai trò quan trọng trong việc tự tổ chức protein trong vi khuẩn. Cơ chế hoạt động của các hoạt chất *ent*-1 α -axetoxy-7 β ,14 α -dihydroxykaur-16-en-15-on (**C2**), *ent*-18-axetoxy-7 β -hydroxykauran-15-on (**C1**), *ent*-18-axetoxy-7 β -hydroxykaur-16-en-15-on (**C3**) và quercetin-3-O- β -D-glucopyranoside (**P3**) sẽ được phân tích sử dụng phương pháp mô phỏng lắp ghép phân tử giữa các hợp chất với đích enzyme PDH.

Bảng 4.11. Điểm năng lượng liên kết và tương tác tạo thành của các chất với PDH

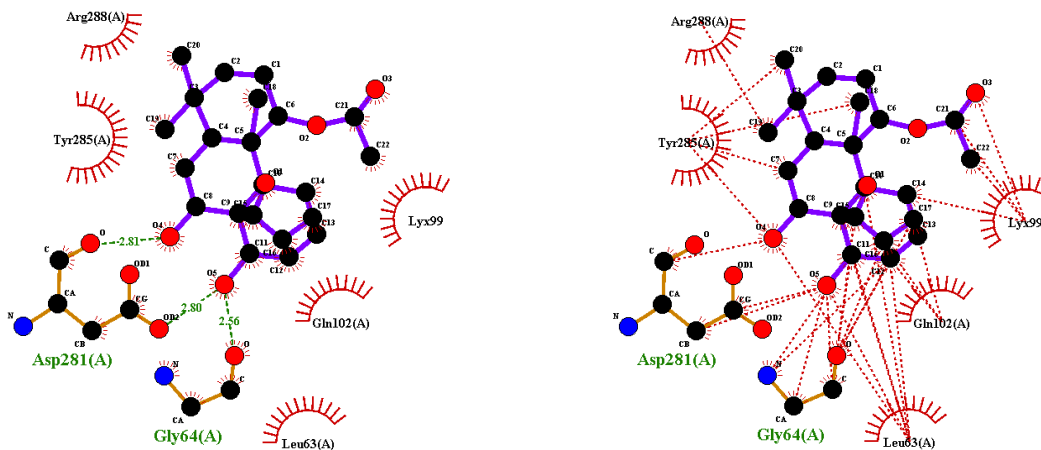
Hợp chất	Năng lượng liên kết tự do ΔG (kcal/mol)	Số liên kết Hydrogen	Amino acid tham gia tạo liên kết Hydrogen
C2	-9.9100	2	Gly64; Asp281
C1	-10.8500	2	Gly64; Gln102
C3	-10.3400	3	Gly64; Asp281; Arg289
P3	-11.5900	8	Asp61; Leu62; Gly64; Leu98; Leu100; Gln102 ; Arg288 ; Arg289
Naucleidinal	-7.8200	2	Gly64; Arg289

Kết quả mô phỏng tương tác giữa các hợp chất tiềm năng với vùng hoạt động của enzyme proline dehydrogenase được trình bày tại bảng 4.11. Theo thuật toán của phần mềm Autodock 4.2.6, hợp chất có điểm năng lượng liên kết tự do càng âm nhiều có nghĩa ái lực liên kết của hợp chất với đích tác dụng càng lớn. Xét theo tiêu chí trên, cả bốn hợp chất sau mô phỏng đều cho kết quả ái lực liên kết tại vùng hoạt động của PDH tốt hơn so với chất chuẩn naucleidinal, trong đó hợp chất **P3** cho thấy ái lực liên kết cao nhất (-11.5900 kcal/mol), hợp chất **C2** có ái lực liên kết thấp nhất trong bốn chất nghiên cứu (-9.9100 kcal/mol). Những số liệu ban đầu này cho thấy độ tương quan cao giữa tính toán với thực nghiệm thể hiện qua hệ số tương quan $R^2 = 0.8014$ (Hình 4.29). Điều này gợi ý mô hình tính toán sử dụng trong nghiên cứu này có tiềm năng ứng dụng trong dự đoán các hợp chất có khả năng ức chế *V. parahaemolyticus*.

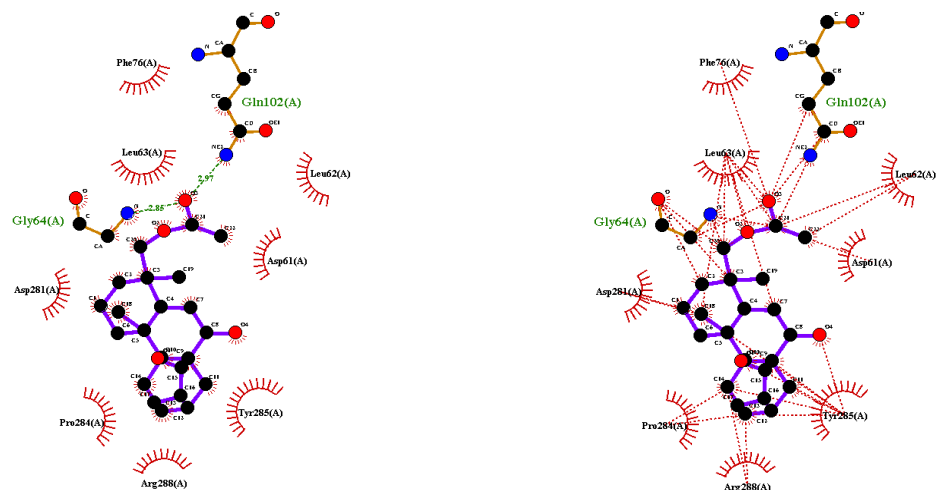


Hình 4.29. Đồ thị biểu diễn tương quan năng lượng liên kết tính toán và tỷ lệ ức chế *Vibrio parahaemolyticus* của các chất nghiên cứu

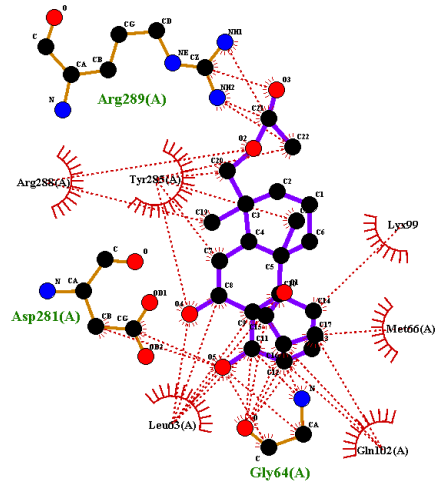
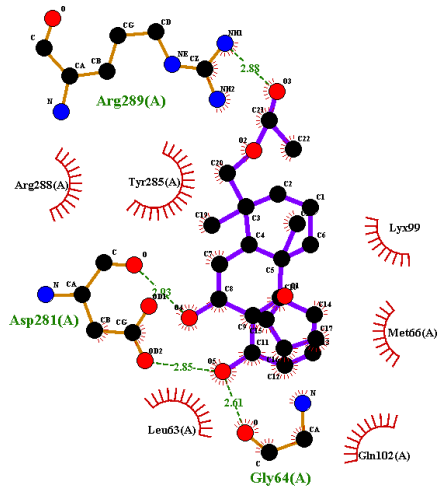
Liên kết tạo thành giữa các hợp chất và vùng hoạt động của enzyme proline dehydrogenase của các hợp chất *ent*-1 α -axetoxy-7 β ,14 α -dihydroxykaur-16-en-15-on (C2), *ent*-18-axetoxy-7 β -hydroxy-kauran-15-on (C1), *ent*-18-axetoxy-7 β -hydroxykaur-16-en-15-on (C3), quercetin-3-O- β -D-glucopyranoside (P3) và đôi chúng Naucleidinal được thể hiện như hình 4.28.



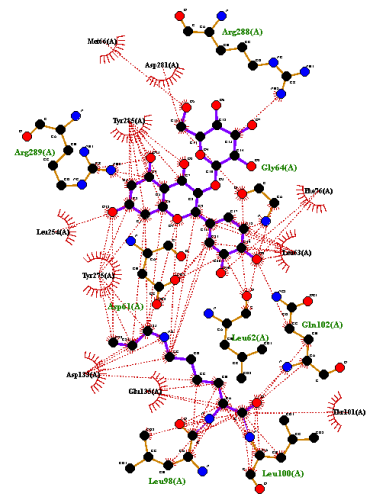
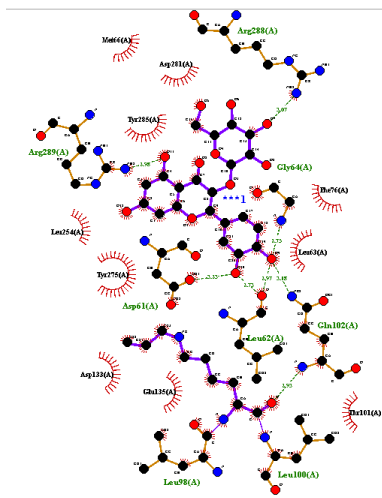
(A)



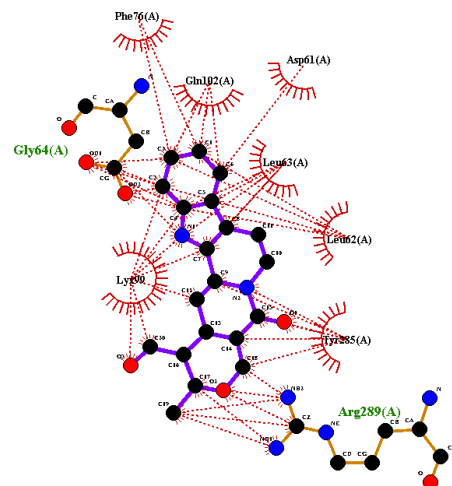
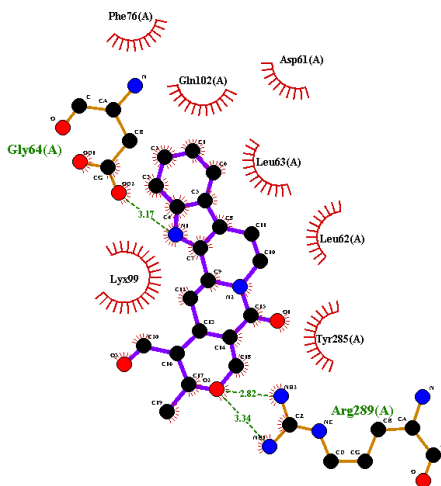
(B)



(C)



(D)



(E)

Hình 4.30. Liên kết tạo thành giữa các hợp chất và vùng hoạt động PDH. (A) Hợp chất C2; (B) Hợp chất C1; (C) Hợp chất C3; (D) Hợp chất P3; (E) Naucleidinal; Liên kết Hydrogen – gạch đứt xanh; Liên kết không phân cực – gạch đứt đỏ

Hình 4.30 biểu diễn tương tác gồm liên kết hydrogen và liên kết không phân cực giữa enzyme PDH với các hợp chất tiềm năng hoạt tính. Năm 2017, nhóm nghiên cứu của Ding L. và cộng sự đã chỉ ra các amino acid đóng vai trò quan trọng trong vùng hoạt động của PDH gồm Gly64, Tyr285; Arg288; Arg289 và Glu292. Trong nghiên cứu này, chất chuẩn nucleidinal hình thành 2 liên kết hydrogen với các amino acid Gly64 và Arg289 tại vùng hoạt động của PDH, điều này chứng minh phần mềm mô phỏng sử dụng là đáng tin cậy. Chất P3 tạo ra 8 liên kết hydrogen với PDH, điều này phù hợp với ái lực liên kết mạnh giữa hợp chất và enzyme đích, ngoài ra, liên kết còn được củng cố thêm thông qua tương tác không phân cực với các amino acid Asp61, Leu62, Leu63, Phe76, Lys99, Gln102. Chất C1 hình thành liên kết hydrogen với Gly64 và Gln102 đi kèm là liên kết kỵ nước với một số amino acid thiết yếu khác trong vùng hoạt động như Asp61, Leu62, Leu63, Ph76, Asp281, Pro284, Tyr285 và Arg 288 để tạo nên ái lực tương tác mạnh của chất với enzyme PDH. Gly64, Asp281 và Arg289 là ba amino acid của PDH tham gia tạo liên kết hydrogen với hợp chất C3, ngoài ra, các liên kết không phân cực khác bao gồm Leu63, Met66, Lys99, Gln102, Tyr285, Arg288. Chất C2 tương tác với enzyme PDH thông qua 2 liên kết hydrogen tại Gly64 và Asp281, các amino acid tham gia vào liên kết không phân cực của chất gồm Leu63, Lys99, Gln102, Tyr285, Arg288.

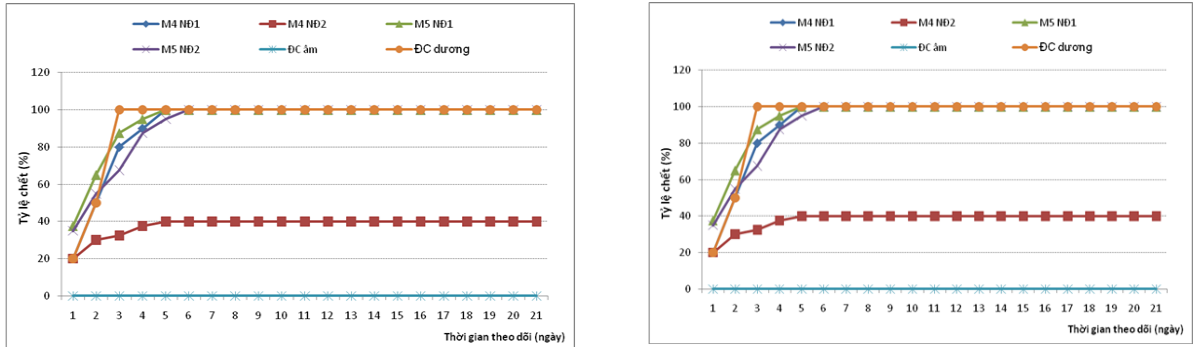
Nhìn chung, các hợp chất đều hình thành liên kết với các amino acid quan trọng nằm trong vùng hoạt động của enzyme PDH, điều này gợi ý sự giải thích hợp lý cho cơ chế tạo ra hoạt tính kháng khuẩn của các hợp chất nghiên cứu.

4.5. Kết quả tác dụng kháng *V. parahaemolyticus* các cao chiết thô *in vivo*

Dựa trên kết quả sàng lọc và nhận định về hoạt tính kháng *V. parahaemolyticus in vitro* của các cao chiết thô ở mục 4.1. Các loài Thồm lồm (*Polygonum chinense*, **PC.M**) và Thầu dầu (*Ricinus communis*, **RC.M**) tiếp tục được thử nghiệm khả năng kháng vi khuẩn *V. parahaemolyticus in vivo* trên tôm thẻ dưới dạng bổ sung vào môi trường nước ở các nồng độ ($25-40\text{g/m}^3$) tại Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản I; Các loài Ké hoa đào (*Urena lobata*, **UL**), Bộ mắt (*Pouzolzia zeylanica*, **PZ**), Khổ sâm (*Croton tonkinensis*, **CT**) và Đơn châu chấu (*Aralia armata*, **AA**) tiếp tục được thử nghiệm khả năng kháng vi khuẩn *V. parahaemolyticus in vivo* trên tôm thẻ dưới dạng bổ sung vào môi trường nước với liều 20 ppm tại Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản II.

4.5.1. Cao chiết Thôm lôm và Thầu dầu được bổ sung vào môi trường nước

Cao chiết ethanol tổng Thôm lôm (**PC.M**) và Thầu dầu (**RC.M**) được sử dụng bổ sung vào môi trường nước ở các nồng độ **PC.MNĐ1** (25g/m^3), **PC.MNĐ2** (30g/m^3), **RC.MNĐ1** (35g/m^3) và **RC.MNĐ2** (40g/m^3) tại 2 thời điểm (lần 1 tại thời điểm bắt đầu công cường độc và lần 2 cách lần 1 là 24h).



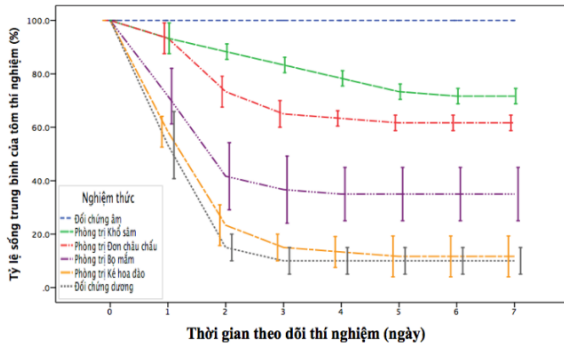
Hình 4.31. Tỷ lệ % tôm chết khi ngâm trong **PC.M** (M4) và **RC.M** (M5)

Kết quả nghiên cứu thử nghiệm chỉ rõ, lô thí nghiệm sử dụng chiết phẩm **PC.M** ở nồng độ 25g/m^3 ; **RC.M** ở nồng độ 35g/m^3 và 40g/m^3 có tỷ lệ tôm chết 100% sau 6 ngày gây nhiễm, trong khi đó lô đối chứng dương tôm chết 100% sau 3 ngày công cường độc vi khuẩn gây AHPND (Hình 4.31). Các mẫu tôm thu tái phân tích vi khuẩn cho kết quả 100% dương tính AHPND bằng phương pháp PCR. Như vậy thời gian tôm chết ở lô thí nghiệm sử dụng chiết phẩm thô chậm hơn so với lô đối chứng dương là 3 ngày. Điều đó có nghĩa các cao chiết đã có hiệu quả diệt vi khuẩn trong môi trường nước nhưng chưa hoàn toàn. Bên cạnh đó, kết quả nghiên cứu cũng chỉ rõ lô sử dụng chiết phẩm **PC.M** với nồng độ 30g/m^3 , có tỷ lệ chết tích lũy đến ngày thứ 21 là 40%. Số tôm còn lại sau ngày thứ 21 được ghi nhận phản xạ nhanh, gan sáng màu.

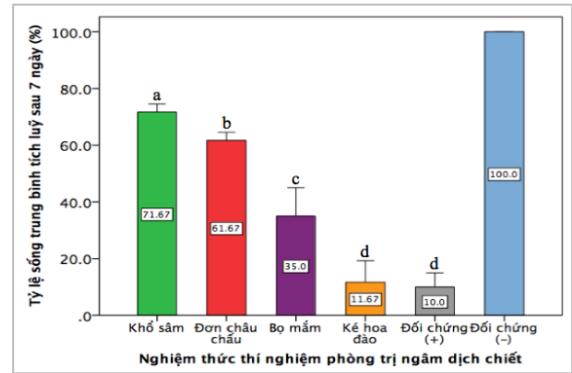
Hình 4.30 có thể thấy cao chiết **PC.M** ở nồng độ 30g/m^3 sử dụng pha vào nước nuôi tôm có mầm bệnh AHPND ở 2 thời điểm (bắt đầu xuất hiện mầm bệnh và lặp lại sau 24h) đã nâng cao tỷ lệ sống tôm 60% so với lô đối chứng dương, tốt hơn so với dịch chiết **RC.M** ở nồng độ 35g/m^3 và 40g/m^3 .

4.5.2. Cao chiết Khổ sâm, Đơn châu chấu, Bộ mắm, và Ké hoa đào được bổ sung vào môi trường nước

Bể tôm được ngâm cao chiết ethanol tổng của các loài Khổ sâm (**CT.M**), Đơn châu chấu (**AA.M**), Bộ mắm (**PZ.M**), và Ké hoa đào (**UL.M**) trước khi gây nhiễm 1 giờ và ngâm lần 2 sau 24 giờ gây nhiễm với liều 20 ppm. Số lượng tôm chết được ghi nhận trong 7 ngày gây nhiễm và tỷ lệ sống của tôm thí nghiệm được thể hiện như hình 4.32 và hình 4.33.



Hình 4.32. Tỷ lệ sống trung bình của tôm được ghi nhận trong 7 ngày cảm nhiễm

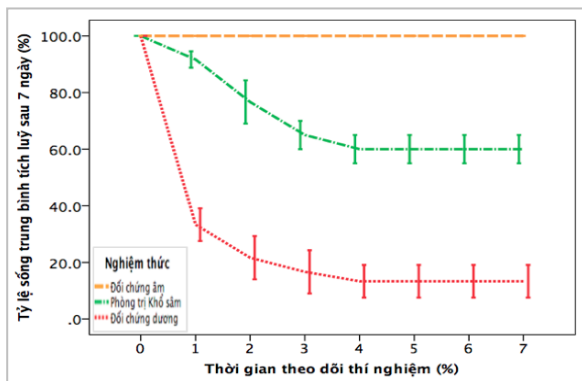


Hình 4.33. Tỷ lệ tôm sống trung bình sau 7 ngày gây nhiễm

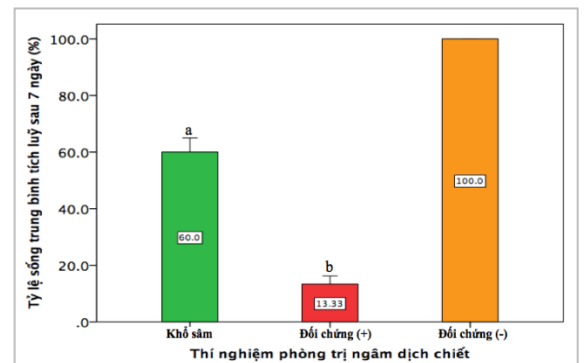
Hình 4.32 cho thấy, tôm chết nhanh từ ngày 1 đến ngày thứ 3 sau cảm nhiễm, và tôm ngưng chết từ ngày thứ 4 trở đi ở các nghiệm thức ngâm dịch chiết Bọ mắ, Ké hoa đào. Tỷ lệ sống trung bình của tôm sau 7 ngày gây nhiễm được ghi nhận cao nhất là $71,7 \pm 2,9\%$ ở nghiệm thức ngâm cao chiết thô Khổ sâm; kế đến là nghiệm thức ngâm cao chiết Đơn châu châu $61,7 \pm 2,9\%$; nghiệm thức ngâm cao chiết Bọ mắ là $35\% \pm 10,0\%$; và thấp nhất là nghiệm thức ngâm cao chiết Ké hoa đào $11,7 \pm 7,6\%$. Trong khi đó, tỷ lệ sống trung bình ở nghiệm thức đối chứng dương là $10 \pm 5,0\%$ và đối chứng âm tôm vẫn sống 100% sau kết thúc thí nghiệm.

Các thí nghiệm đã chỉ ra rằng, cao chiết tổng Khổ sâm cho hiệu quả kháng khuẩn *V. parahaemolyticus* tốt nhất. Nên các nghiên cứu tiếp theo tập trung vào cao chiết tổng này.

Nghiên cứu tiếp theo ngâm cao chiết Khổ sâm (CT.M) trước khi gây nhiễm 1 giờ và ngâm lần 2 sau 24 giờ gây nhiễm với liều 15 ppm. Số lượng tôm chết được ghi nhận sau 7 ngày gây nhiễm, tỷ lệ sống của tôm thí nghiệm được thể hiện ở hình 4.34 và hình 4.35 cho thấy tỷ lệ sống trung bình của tôm ở nghiệm thức ngâm cao chiết thô Khổ sâm sau 7 ngày gây nhiễm được ghi nhận là $60,0 \pm 5,0\%$. Trong khi đó, tỷ lệ sống trung bình ở nghiệm thức đối chứng dương là $13,3 \pm 5,8\%$ và đối chứng âm tôm vẫn sống 100% sau kết thúc thí nghiệm.



Hình 4.34. Tỷ lệ sống trung bình của tôm được ghi nhận sau 7 ngày cảm nhiễm



Hình 4.35. Tỷ lệ tôm sống trung bình sau 7 ngày gây nhiễm

Nghiên cứu tiếp theo về kết quả thử nghiệm LC₅₀ của cao chiết khổ sâm qua đường nước. Tỷ lệ chết của tôm thí nghiệm khi tiếp xúc với các nồng độ cao chiết khổ sâm khác nhau ở các thời điểm 24, 48, 72, và 96 giờ, được trình bày ở bảng 4.12.

Bảng 4.12. Tỷ lệ chết (trung bình \pm sai số chuẩn) của tôm thí nghiệm xác định LC₅₀ sau khi tiếp xúc với cao chiết khổ sâm với các nồng độ khác nhau.

Nồng độ cao chiết	Tỷ lệ (%) trung bình tôm chết thời gian thí nghiệm			
	24h	48h	72h	96h
0 ppm	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
30 ppm	0 ^a \pm 0	6,67 \pm 2,89	11,67 \pm 2,89	11,67 \pm 2,89
60 ppm	10 \pm 5	18,33 \pm 7,64	30 \pm 15	30 \pm 15
90 ppm	18,33 \pm 2,89	36,67 \pm 12,58	50 \pm 5	50 \pm 5
120 ppm	18,33 \pm 5,77	86,67 \pm 11,55	93,33 \pm 7,64	93,33 \pm 7,64
150 ppm	28,33 \pm 5,77	90 \pm 8,66	100 \pm 0	100 \pm 0
LC₅₀ (ppm)	-	93,02	81,25	81,25

Từ số liệu bảng 4.12 về tỷ lệ gây chết tôm được thu nhận, giá trị LC₅₀ được xác định ở các thời điểm 48, 72 và 96 giờ lần lượt là 93,02ppm, 81,25ppm, và 81,25ppm. Trong khi, ở thời điểm 24 giờ, giá trị LC₅₀ không xác định được do tỷ lệ chết thấp.

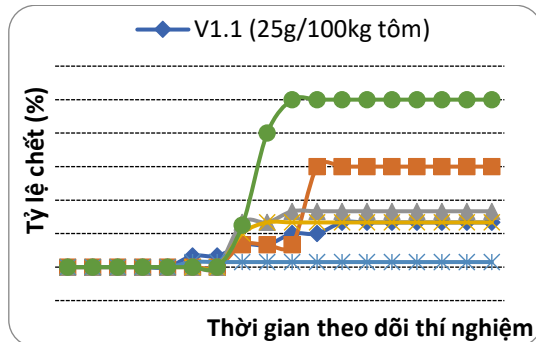
4.5.3. Tác dụng kháng khuẩn *V. parahaemolyticus* trên thức ăn nuôi tôm

Cao chiết Thồm lồm (**PC.M**) bổ sung vào môi trường nước *in vivo* cho kết quả *V. parahaemolyticus* tốt hơn cả (đã nâng cao tỷ lệ sống tôm 60% so với lô đối chứng dương) so với cao chiết Thầu dầu (**RC.M**), hơn nữa, hoạt chất quercetin-3-O- β -D-glucopyranoside (**P3**) (có hàm lượng 1,11% trong Thồm lồm (**PC.M**)) thể hiện hoạt tính kháng *V. parahaemolyticus in vitro* cao nhất (ức chế 82,5% vi khuẩn *V. parahaemolyticus* trong vòng 24 giờ). Bên cạnh đó, cao chiết Khổ sâm bổ sung vào môi trường nước *in vivo* cho kết quả kháng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* cao nhất (tỷ lệ sống 71,7 %) so với cao chiết Đơn châu chấu, Bọ mấm và Ké hoa đào, hơn nữa, kết quả thử hoạt tính kháng khuẩn *V. parahaemolyticus in vitro* của các chất sạch cho thấy, hợp chất *ent*-18-axetoxyl-7 β -hydroxykauran-15-on (**C1**, hàm lượng 0,012%), *ent*-1 α -axetoxyl-7 β ,14 α -dihydroxykaur-16-en-15-on (**C2**, hàm lượng 0,80%) và *ent*-18-axetoxyl-7 β -hydroxykaur-16-en-15-on (**C3**, hàm lượng 0,52%) từ cây Khổ sâm thể hiện hoạt tính kháng *V. parahaemolyticus* lần lượt là 70,8%, 44,5% và 50,4%. Điều đó, đã góp phần làm sáng tỏ thành phần quyết định hoạt tính chính của Thồm

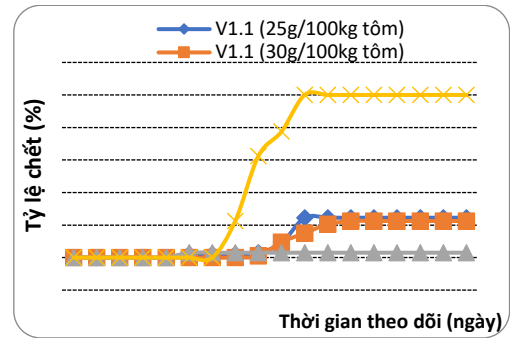
lôm và Khổ sâm. Do đó, nghiên cứu tiếp theo tập trung làm sáng tỏ tác dụng kháng khuẩn *V. parahaemolyticus* của cao chiết Thồm lôm và Khổ sâm theo dạng trộn vào thức ăn nuôi tôm tại Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản I và II.

4.5.3.1. Cao chiết Thồm lôm (PC.M) trộn thức ăn nuôi tôm

Đối với công thức phối trộn cao chiết Thồm lôm (PC.M) vào thức ăn: tôm được ăn với 2 nồng độ 25 và 30g/100kg tôm liên tục trong 6 ngày, sau đó công cường độc vi khuẩn bằng bổ sung vi khuẩn vào nước nuôi với mật độ 10^5 - 10^6 cfu/ml.



Hình 4.36. Tỷ lệ (%) tôm chết trong khi cho tôm ăn thức ăn chứa PC.M (V1.1)



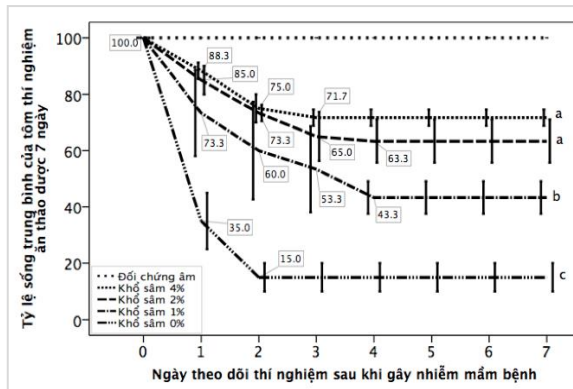
Hình 4.37. Bổ sung chế phẩm vào thức ăn cho ăn 7 ngày liên tục trước công cường độc vi khuẩn

Kết quả cho thấy bằng biện pháp cho ăn ở nồng độ 25g/100kg tôm tỷ lệ chết 27%, trong khi đó lô ăn 30g/100kg tôm có tỷ lệ chết 60%. Tỷ lệ chết cao ở lô cho ăn 30g/100kg tôm được ghi nhận do ở ngày thứ 3 sau khi công cường độc. Như vậy qua mô hình thí nghiệm này nhận thấy thảo dược Thồm lôm (PC.M) có hiệu quả phòng bệnh AHPND với tỷ lệ sống đạt cao >60% so với lô đối chứng dương.

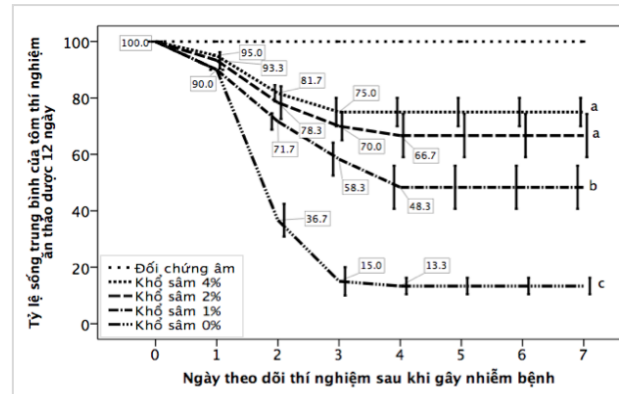
4.5.3.2. Cao chiết Khổ sâm (CT.M) trộn thức ăn nuôi tôm

Kết quả thí nghiệm phòng bệnh bằng cao chiết khổ sâm trộn vào thức ăn và cho tôm ăn suốt 7 ngày với các nồng độ 0%, 1%, 2% và 4% lượng thức ăn hàng ngày của tôm được trình bày ở hình 4.38 và 4.39. Kết quả cho thấy tôm chết nhiều ở ngày thứ hai và thứ ba sau gây nhiễm, và tôm ngưng chết từ ngày thứ năm sau gây nhiễm của thí nghiệm. Trong khi, ở đối chứng dương tôm chết nhiều ở ngày thứ nhất và thứ hai. Tỷ lệ sống của tôm ở nghiệm thức đối chứng dương (tôm ăn thức ăn không trộn cao chiết) là $15 \pm 5\%$ và tỷ lệ sống trung bình của tôm ở nghiệm thức đối chứng âm là 100%. Trong khi đó, các nghiệm thức phòng bệnh bằng cao chiết ở các nồng độ 1%; 2% và 4% có tỷ lệ tôm sống lần lượt là $43,3 \pm 5,8\%$; $63,3 \pm 7,6\%$ và $71,7 \pm 2,9\%$. Điều này có thể nói rằng cao chiết Khổ sâm có hiệu quả phòng bệnh hoại tử gan tụy cấp ở tôm thẻ chân trắng với cả hai liều 2% và 4% trộn vào thức ăn với tỷ lệ sống trung

binh trên 60%. Tỷ lệ tôm sống trung bình sau 7 ngày gây nhiễm được ghi nhận khi ăn cao chiết Khổ sâm 12 ngày cũng không có sự khác biệt so với tôm ăn cao chiết khổ sâm trong 7 ngày.



Hình 4.38. Tỷ lệ sống trung bình của tôm được ghi nhận trong 7 ngày cảm nhiễm khi ăn cao chiết Khổ sâm 7 ngày



Hình 4.39. Tỷ lệ tôm sống trung bình sau 7 ngày gây nhiễm được ghi nhận khi ăn cao chiết Khổ sâm 12 ngày

Kết quả phân tích mô bệnh học các mẫu tôm thí nghiệm phòng bệnh AHPND cho thấy gan tụy tôm ăn thức ăn trộn 2% và 4% Khổ sâm có cấu trúc bình thường.

Kết quả thử nghiệm LC₅₀ của cao chiết khổ sâm qua đường thức ăn: Tỷ lệ chết trung bình của tôm thí nghiệm ở các thời điểm 24, 48, 72, và 96 giờ được trình bày ở bảng 4.13. Tôm được cho ăn hàng ngày với các nồng độ cao chiết khổ sâm được trộn vào thức ăn bao gồm 0, 25, 30, 35, 40, và 45%.

Bảng 4.13. Tỷ lệ tôm chết sau sử dụng cao chiết khổ sâm ở các nồng độ khác nhau

Nồng độ cao chiết	Tỷ lệ (%) trung bình tôm chết theo thời gian thí nghiệm			
	24h	48h	72h	96h
0 %	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
25 %	3,33 ± 2,89	11,67 ± 2,89	15 ± 5	16,67 ± 2,89
30 %	1,67 ± 2,89	10 ± 0	18,33 ± 2,89	18,33 ± 2,89
35 %	3,33 ± 2,89	6,67 ± 2,89	15 ± 5	18,33 ± 5,77
40 %	5 ± 0	10 ± 0	18,33 ± 5,77	20 ± 5
45 %	3,33 ± 2,89	15 ^b ± 5	21,67 ± 2,89	21,6 ± 2,89
LC ₅₀	-	-	-	-

Kết quả thí nghiệm cho thấy không có tôm chết ở nghiệm thức đối chứng (0%) trong suốt 96 giờ thí nghiệm. Ở tất cả các nghiệm thức ăn cao chiết, tôm chết sau 24 giờ, có tỷ lệ chết trung bình từ 1,67±2,89% đến 5±0%. Tỷ lệ trung bình tôm bị chết sau 48 giờ ở nồng độ cao chiết cao nhất (45%) là 15±5%. Ở thời điểm 72 và 96 giờ,

tỷ lệ trung bình tôm chết ở nồng độ cao nhất của thí nghiệm (45%) là tương đương nhau ($21,67 \pm 2,89\%$). Do các kết quả tỷ lệ tôm chết $< 22\%$, nên số liệu này không xác định được giá trị LC_{50} ở các thời điểm quan sát (bảng 4.13).

Ảnh hưởng của cao chiết khổ sâm đến gan tôm qua đường ăn: Sau 96 giờ, tôm được cho ăn cao chiết khổ sâm, tôm sống được cố định bằng dung dịch Davidson để phân tích cấu trúc mô học. Gan tụy tôm ở nhóm đối chứng có cấu trúc bình thường bao gồm có nhiều tế bào tiết hay tế bào B (chứa một không bào lớn). Gan tụy của tôm ăn thức ăn có trộn 2% cao chiết của khổ sâm, 4% và 45% vẫn duy trì cấu trúc bình thường như nhóm đối chứng. Các kết quả trên cho thấy cao chiết khổ sâm không gây ảnh hưởng đến cấu trúc gan tụy của tôm.

Các nghiên cứu trên đã chỉ ra rằng, Khổ sâm và Thồm lồm là cây thảo dược tiềm năng lớn để có thể phát triển thành sản phẩm có tác dụng kháng khuẩn *V. parahaemolyticus* trên tôm nuôi.

B. DOCKING PHÂN TỬ VÀ HOẠT TÍNH GÂY ĐỘC TẾ BÀO *IN VITRO*

4.6. Nghiên cứu docking phân tử các hợp chất *ent*-kaurane diterpenoid định hướng ức chế con đường tín hiệu PI3K

Mục tiêu của nghiên cứu này là tiến hành docking phân tử sử dụng phần mềm Molegro Virtual Docker để xác định các hợp chất diterpenoid có khả năng ức chế con đường tín hiệu PI3K, sau đó, nghiên cứu hoạt tính gây độc tế bào của chúng trên dòng tế bào ung thư phổi người (A549).

Dựa trên các hợp chất đã phân lập từ lá cây Khổ sâm và tài liệu công bố quốc tế, tiến hành docking phân tử cho 7 hợp chất *ent*-kaurane diterpenoid gồm: *ent*-18-axetoxy-7 β -hydroxykaur-15-one (**C1**), *ent*-1 α -axetoxy-7 β ,14 α -dihydroxykaur-16-en-15-one (**C2**), *ent*-18-axetoxy-7 β -hydroxykaur-16-en-15-one (**C3**); *ent*-7 β ,14 α -dihydroxykaur-16-en-15-one (**4**); *ent*-18 α -axetoxy-7 α ,14 β -dihydroxykaur-16-en-15-one (**5**); *ent*-1 α ,14 α -diacetoxy-7 β -hydroxykaur-16-en-15-one (**6**); và *ent*-1 α ,7 β -diacetoxy-14 α -hydroxykaur-16-en-15-one (**7**) định hướng ức chế trên các protein chính thuộc con đường tín hiệu PI3K gồm: AKT (PDB ID: 1UNQ), mToR (PDB ID: 4JSV), COX-2 (PDB ID: 3NT1), MDM2 (PDB ID: 4JRG) và PDK1 (PDB ID: 5LOV) trong điều trị ung thư phổi tế bào không nhỏ.

Trong quá trình phân tích kết quả mô phỏng, ái lực tương tác và các liên kết hydro sẽ được phân tích cụ thể cho những cấu hình liên kết tối ưu. Đối với cấu hình

liên kết tối ưu của hợp chất được xếp hạng cao nhất, MVD và Ligplot⁺ v2.1 sẽ được sử dụng để phân tích cụ thể về trạng thái của hợp chất trong vùng hoạt động của protein, nhận diện các liên kết hình thành với amino acid của protein.

Bảng 4.14. Điểm năng lượng dock của các hợp chất diterpenoid và oxaliplatin với các đích protein AKT, mToR, COX-2, MDM2, PDK1

Protein đích	Phối tử	Điểm năng lượng dock (kcal/mol)	Amino acid tham gia liên kết Hydro	Ái lực liên kết (kJ/mol)
AKT (PDB ID: 1UNQ)	Hợp chất 7	-84.0	O28-O-SER56; O28-O-LEU78; O18-ALA58; O25-O-LEU110; O25-LEU110; O25-GLU114; O23-OSER56	-13.2
	Hợp chất 6	-81.4	O25-O-GLU114; O25-LEU110; O29-ALA58; O29-SER56	-12.5
	Hợp chất C2	-80.3	O25-O-GLU114; O25-LEU110; O29-N-ALA58; O29-C-SER56	-11.9
	Hợp chất 4	-54.3	O25-O-ASP32; O23-O-LEU110; O17-O-GLN104; O22-O-CYS60	-10.0
	Hợp chất C1	-53.4	O22-O-ASP32	-8.9
	Hợp chất 5	-56.3	O25-O-GLN59; O25-N-LYS111; O25-O-GLU114	-10.7
	Hợp chất C3	-85.9	O24-O-GLU114; O24-N-GLN59; O24-N-LYS111	-12.7
ĐỐI CHỨNG	oxaliplatin	-77.0	NIL	-18.5
mToR (PDB IB: 4JSV)	Hợp chất 7	-72.3	O18-N-VAL2227	-16.1
	Hợp chất 6	-124.5	NIL	-14.4
	Hợp chất C2	-104.9	O25-N-VAL2227; O18-O-VAL2227; O23-O-GLU2196; O18-O-GLU2196	-13.2
	Hợp chất 4	-84.7	O18-O-GLU2196	-10.5
	Hợp chất C1	-84.8	O8-O-GLU2196	-11.6
	Hợp chất 5	-89.8	O22-O-LEU1936; O22-O-GLN1937; O18-N-GLN2200	-10.5
	Hợp chất C3	-108.7	O24-N-THR2143; O24-N-TYR2144; O18-N-VAL2227; O8-O-GLU2196	-15.8
ĐỐI CHỨNG	oxaliplatin	-94.7	O13-O-PRO2229; O14-O-PRO2229	-20.0
COX-2 (PDB ID: 3NTI)	Hợp chất 7	-108.8	H64-ON-HIS388; O25-N-GLN289; O18-O-PHE210; O25-O-PHE210; O18-N-HIS207	-13.7
	Hợp chất 6	-109.5	O17-N-HIS207; O17-O-PHE210; O29-O-THR212; O23-O-THR-212; O29-N-ASN382; O23-N-N-ASN382; O18-O-THR212; O23-O-TYR148	-14.8
	Hợp chất C2	-89.7	O25-O-ASN382; O25-O-HIS386; O18-N-HIS207; O18-N-GLN203	-11.6

	Hợp chất 4	-81.7	O22-N-THR212; O22-O-THR212; O17-N-HIS214; O18-N-GLN289	-11.5
	Hợp chất C1	-81.5	O18-O-PHE210; O18-N-GLN289; O17-N-HIS214; O22-N-THR212; O22-N-THR212	-10.9
	Hợp chất 5	-107.3	O17-O-PHE210; O17-N-GLN289; O25-C-HIS386	-10.4
	Hợp chất C3	-110.2	O17-O-PHE210; O17-N-GLN289; H1-O-TYR385	-13.0
ĐỐI CHỨNG	oxaliplatin	-113.6	O14-O-HIS386; O13-O-HIS386; O13-O-ASN382; O13-O-ASN382; N6-O-TYR385	-21.8
MDM2 (PDB ID: 4JRG)	Hợp chất 7	-92.8	O18-O-LEU50; O25-O-TYR51; O17-O-VAL89; H64-N-HIS92	-13.0
	Hợp chất 6	-104.5	O23-O-VAL89; O25-O-LYS47; O25-N-TYR51	-12.0
	Hợp chất C2	-75.6	O25-H-LYS47; O18-O-VAL89; O18-N-HIS92	-10.4
	Hợp chất 4	-58.5	O17-O-VAL89; O18-O-LEU50	-9.0
	Hợp chất C1	-67.4	O18-O-LYS47; O22-O-LEU50	-8.5
	Hợp chất 5	-72.4	O25-N-HIS92	-9.6
	Hợp chất C3	-78.1	NIL	-10.1
ĐỐI CHỨNG	oxaliplatin	-82.4	H1-O-LEU50	-20.3
PDK1 (PDB ID: 5LOV)	Hợp chất 7	-87.9	O28-N-LYS207; O28-O-ASP205; O28-N-ASN210; O28-O-ASN210; O17-O-ASP223; O18-N-SER92; O19-O-TYR161; O25-O-SER94	-15.0
	Hợp chất 6	-101.0	O23-O-GLU90; O17-O-GLU166; O25-O-THR222	-13.0
	Hợp chất C2	-71.4	O17-O-THR222; O23-O-ASN210; O23-O-GLU209	-10.2
	Hợp chất 4	-72.7	H44-O-ALA162; O22-N-GLU166; O17-O-LEU88	-15.0
	Hợp chất C1	-72.7	H44-O-ALA162; O22-N-GLU166; O17-O-LEU88	-10.2
	Hợp chất 5	-85.9	O22-O-GLU209; O22-O-ASN210; O17-O-THR222; O25-O-ALA162; O25-N-ALA162	-11.5
	Hợp chất C3	-91.8	O24-O-ALA162; O24-N-ALA162; O21-O-LEU212; O21-O-ASN210; O17-O-THR222	-13.0
ĐỐI CHỨNG	oxaliplatin	-87.9	N7-O-ALA162; N6-O-LEU88; O14- N-LYS86; O14-O-TYR161; O10-O- TYR161	-21.9

Chi tiết về liên kết hydro tạo thành giữa hợp chất nghiên cứu với các đích protein được trình bày từ các hình 4.37 đến hình 4.41. Phân tích điểm năng lượng cho thấy trong số các hợp chất nghiên cứu, hợp chất *ent-1 α ,14 α -diacetoxy-7 β -*

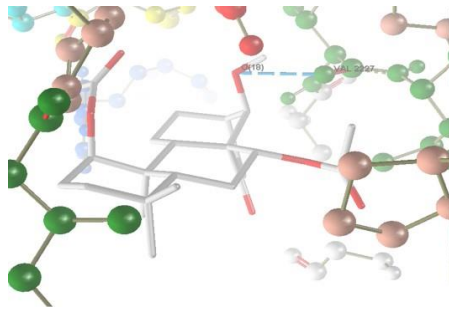
hydroxykaur-16-en-15-one (**6**) có điểm năng lượng dock với mToR cao nhất là -124,5 kcal/mol, đứng thứ hai là *ent*-18-axetoxy-7 β -hydroxykaur-16-en-15-one (**C3**) liên kết với COX-2 có điểm năng lượng dock -110,2 kcal/mol. Xét trên phương diện liên kết hydro, hợp chất **6** không tạo liên kết hydro với mToR do đó tương tác với mToR không bền vững mặc dù điểm năng lượng dock cao hơn so với các chất khác. Trong khi đó, hợp chất **C3** tạo liên kết hydro với Phe210, Gln289 and Tyr385 thông qua vị trí O17 và H1. Tương tự, kết quả tính ái lực liên kết chỉ ra hợp chất *ent*-1 α ,7 β -diacetoxy-14 α -hydroxykaur-16-en-15-one (**7**) và *ent*-18-axetoxy-7 β -hydroxykaur-16-en-15-one (**C3**) có ái lực liên kết mạnh nhất với mToR lần lượt là -16,1 kJ/mol và -15,8 kJ/mol. Nhìn chung, trong số 7 hợp chất nghiên cứu, ngoại trừ chất chuẩn oxaliplatin thể hiện ái lực liên kết tốt với tất cả các protein, chúng tôi nhận thấy *ent*-1 α ,7 β -diacetoxy-14 α -hydroxykaur-16-en-15-one (**7**) có ái lực liên kết mạnh nhất với AKT, mToR, MDM2 và PDK1, trong lúc đó, hợp chất có ái lực tốt nhất với COX-2 là *ent*-1 α ,14 α -diacetoxy-7 β -hydroxykaur-16-en-15-one (**6**).

So sánh kết quả với chất chuẩn, chúng tôi nhận thấy đối với protein AKT, 4 hợp chất có điểm năng lượng dock cao hơn oxaliplatin bao gồm: *ent*-18-axetoxy-7 β -hydroxykaur-16-en-15-one (**C3**); *ent*-1 α ,7 β -diacetoxy-14 α -hydroxykaur-16-en-15-one (**7**); *ent*-1 α ,14 α -diacetoxy-7 β -hydroxykaur-16-en-15-one (**6**) and *ent*-1 α -acetoxy-7 β ,14 α -dihydroxykaur-16-en-15-one (**C2**) với điểm số lần lượt là -85,9 kcal/mol, -84,0 kcal/mol, -81,4 kcal/mol, và -80,3 kcal/mol. Quan sát thấy oxaliplatin không tạo liên kết hydrogen với AKT, tuy nhiên, 4 hợp chất nói trên đều tạo liên kết hydrogen với Glu114 và hợp chất **7** cho thấy khả năng liên kết bền vững nhất khi tạo ra tổng số 7 liên kết hydrogen với protein AKT.

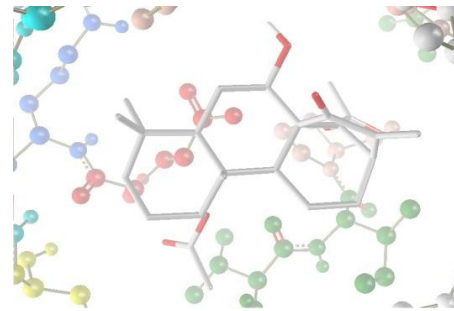
Đối với đích protein thứ hai là mToR, kết quả mô phỏng cho thấy 3 hợp chất *ent*-1 α ,14 α -diacetoxy-7 β -hydroxykaur-16-en-15-one (**6**), *ent*-1 α -axetoxy-7 β ,14 α -dihydroxykaur-16-en-15-one (**C2**) và *ent*-18-axetoxy-7 β -hydroxykaur-16-en-15-one (**C3**) có điểm năng lượng dock cao hơn oxaliplatin mặc dù tương tác chúng tạo ra với các amino acid của mToR không giống với chất chuẩn. Mặt khác, hợp chất **7** nổi bật lên với ái lực liên kết mạnh -16,1 kJ/mol và liên kết hydro tạo ra với mToR tại Val2227.

Tiếp theo là kết quả mô phỏng với COX-2, đáng chú ý trong trường hợp này là tất cả các hợp chất nghiên cứu đều ghi nhận điểm năng lượng docking và ái lực liên kết khá thấp so với chất chuẩn oxaliplatin. Trong trường hợp này, hợp chất **6**

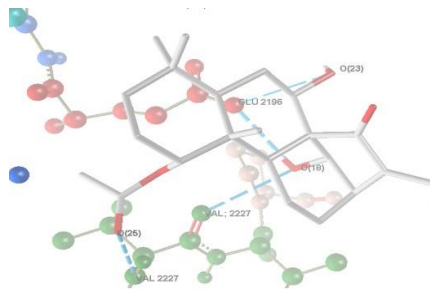
được coi là tiềm năng nhất dựa trên kết hợp 2 tiêu chí điểm số và amino acid tạo tương tác: Asn382 và His386.



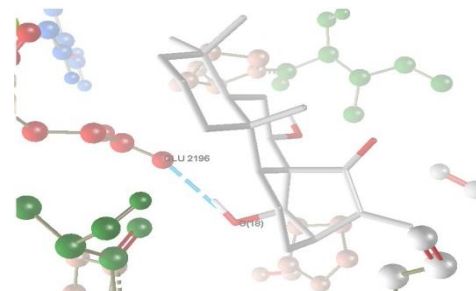
(A)



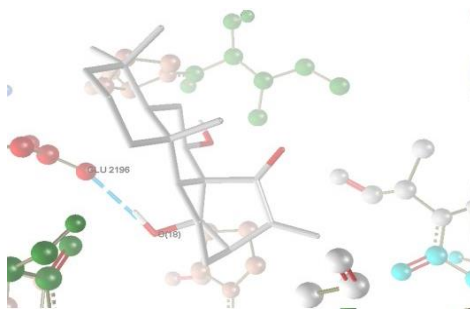
(B)



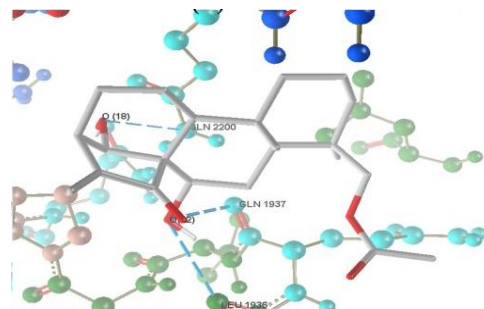
(C)



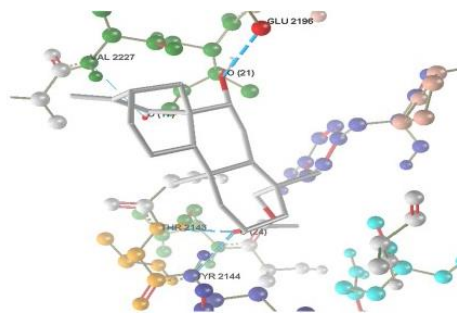
(D)



(E)

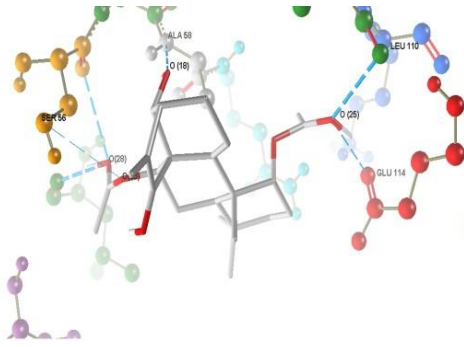


(F)

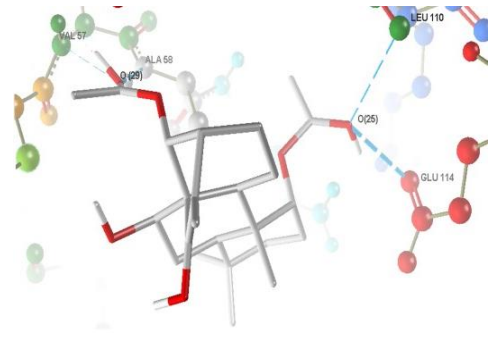


(G)

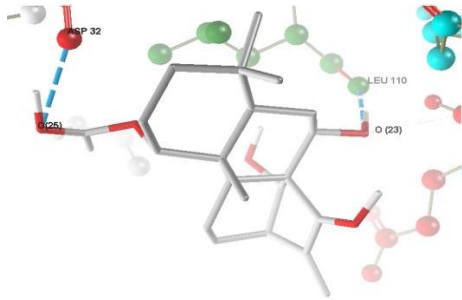
Hình 4.40. Liên kết hydro hình thành giữa các hợp chất (A) Hợp chất 7; (B) Hợp chất 6; (C) Hợp chất C2; (D) Hợp chất 4; (E) Hợp chất C1; (F) Hợp chất 5; (G) Hợp chất C3 với các amino acid trong vùng hoạt động của protein mTor



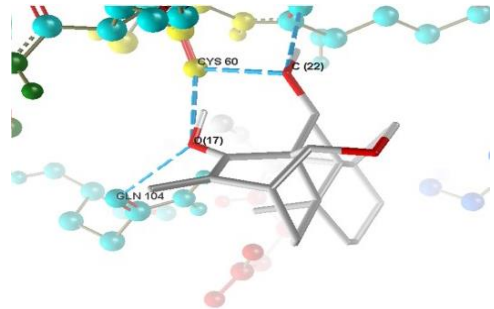
(A)



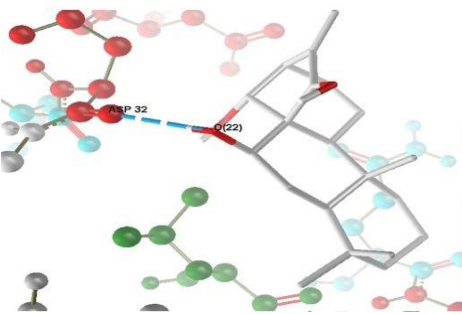
(B)



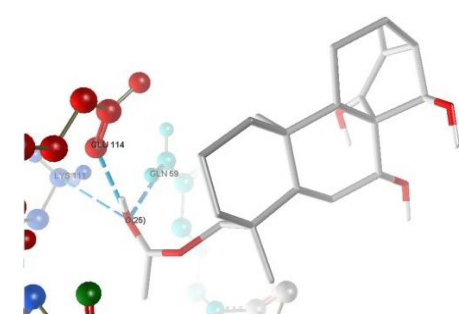
(C)



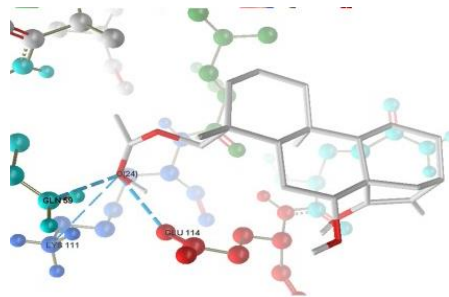
(D)



(E)

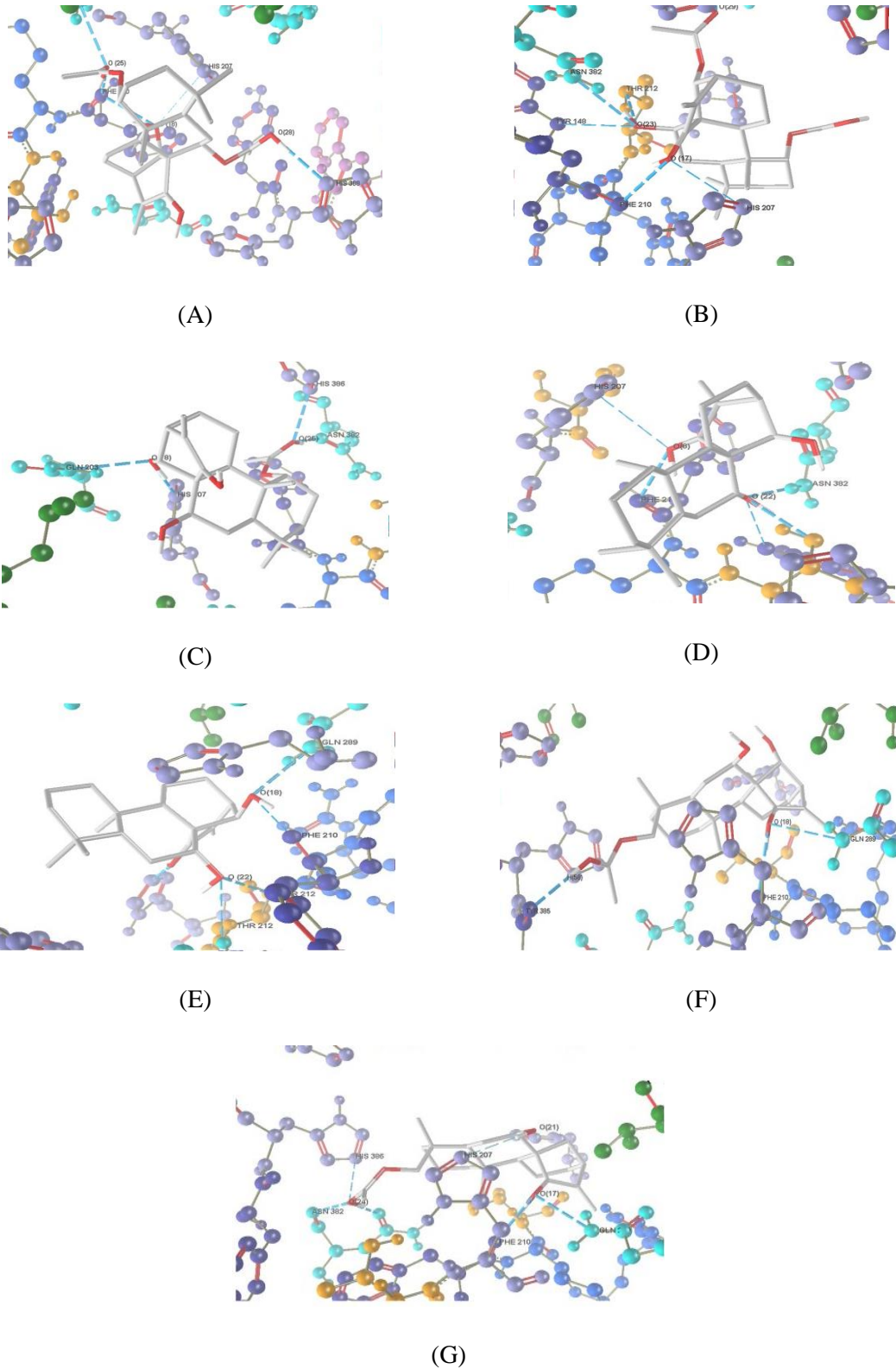


(F)



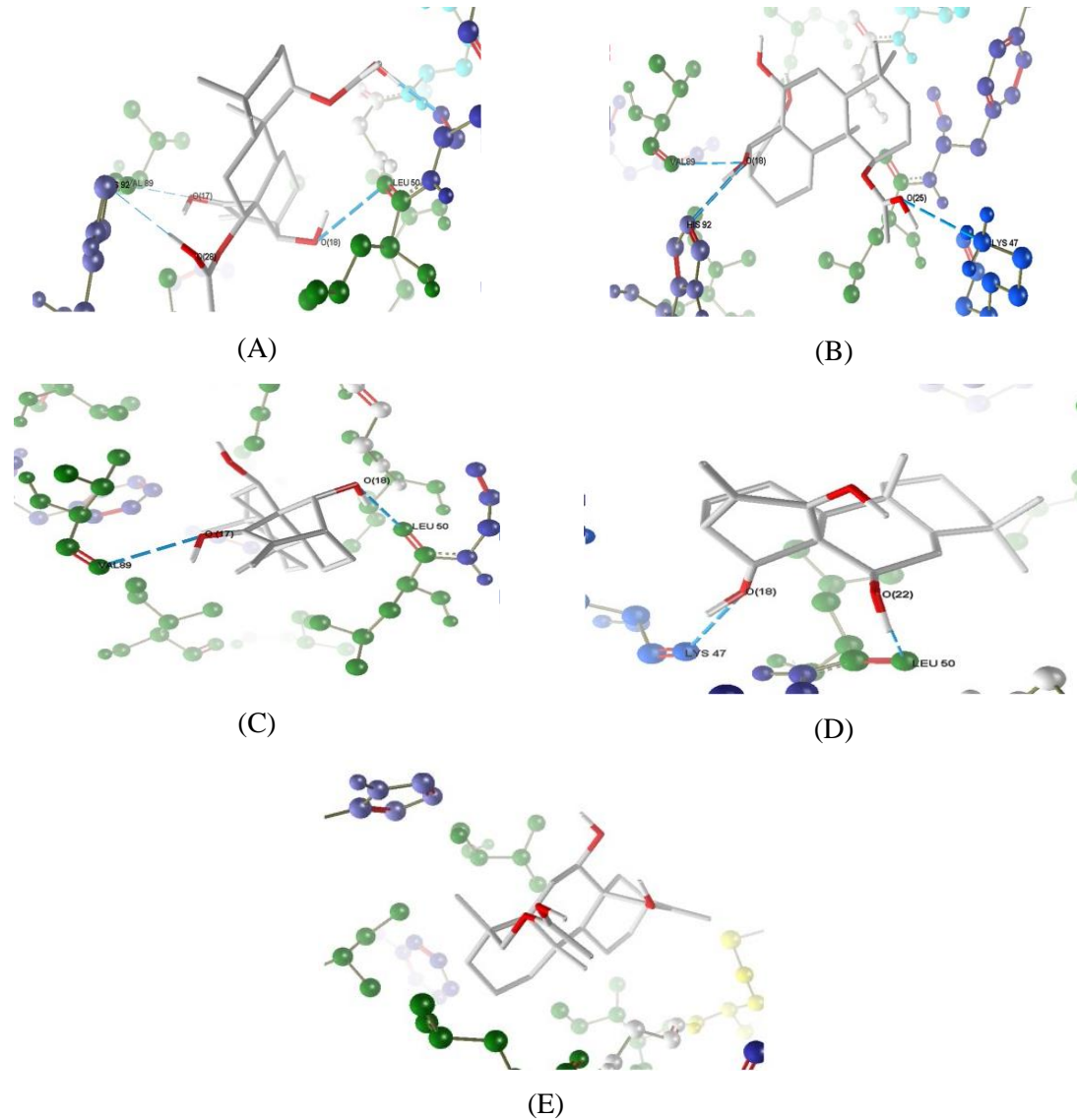
(G)

Hình 4.41. Liên kết hydro hình thành giữa các hợp chất (A) Hợp chất 7; (B) Hợp chất 6; (C) Hợp chất C2; (D) Hợp chất 4; (E) Hợp chất C1; (F) Hợp chất 5; (G) Hợp chất C3 với các amino acid trong vùng hoạt động của protein AKT



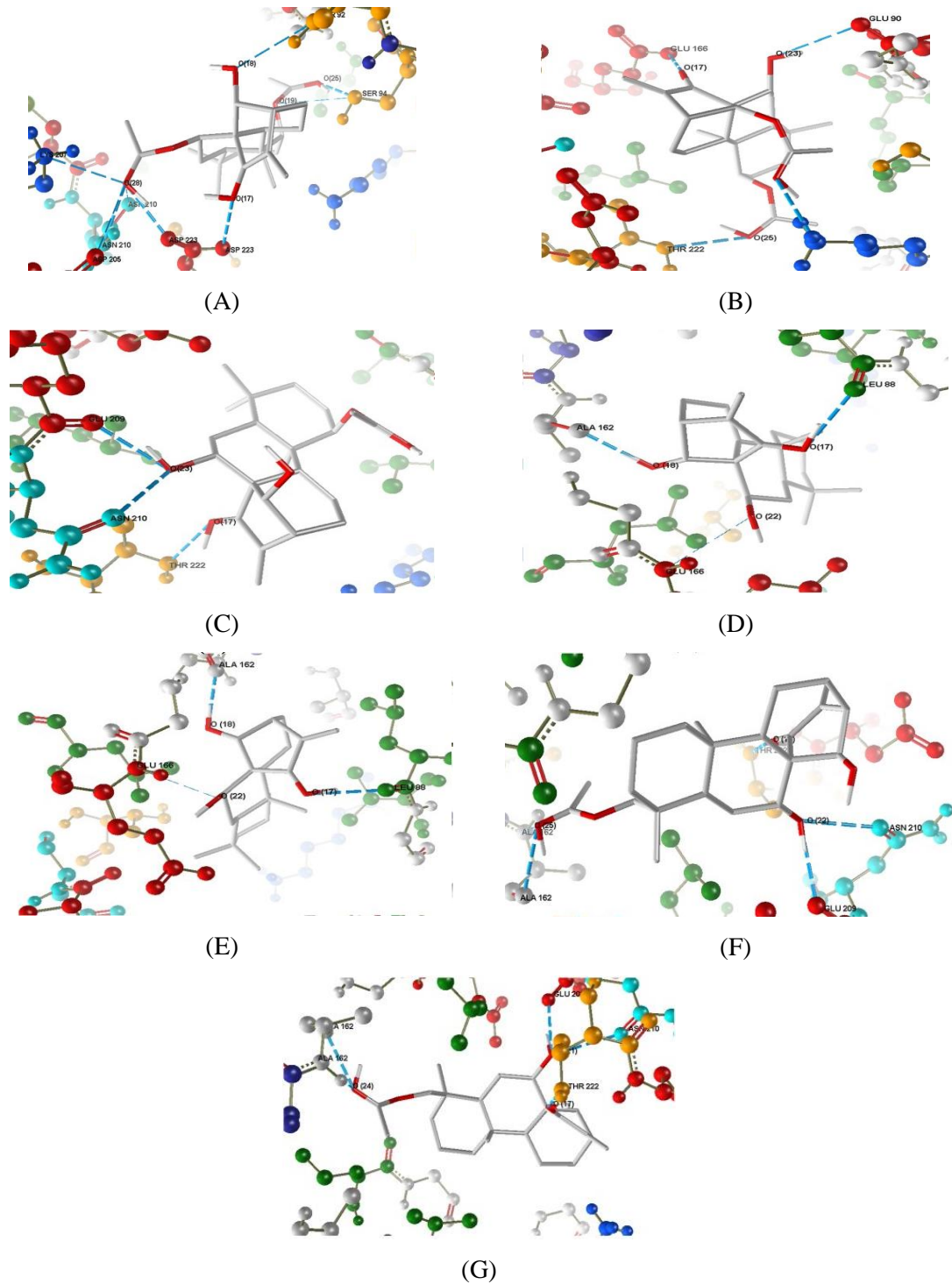
Hình 4.42. Liên kết hydro hình thành giữa các hợp chất (A) Hợp chất 7; (B) Hợp chất 6; (C) Hợp chất C2; (D) Hợp chất 4; (E) Hợp chất C1; (F) Hợp chất 5; (G) Hợp chất C3 với các amino acid trong vùng hoạt động của protein COX-2

Với đích protein MDM2, hợp chất **7** và **6** có điểm năng lượng dock cao vượt trội so với các chất còn lại lần lượt là -92,8 kcal/mol và -104,5 kcal/mol. Ái lực liên kết của hợp chất **7** và **6** thấp hơn nhiều so với chất chuẩn oxaliplatin, tuy nhiên **7** có hình thành liên kết với amino acid Leu50 giống với chất chuẩn tại vùng liên kết.



Hình 4.43. Liên kết hydro hình thành giữa các hợp chất (A) Hợp chất 7; (B) Hợp chất C2; (C) Hợp chất 4; (D) Hợp chất C1; (E) Hợp chất C3 với các amino acid trong vùng hoạt động của protein MDM2

Cuối cùng là kết quả mô phỏng với PDK1, số liệu thu được chỉ ra rằng hợp chất **6**, **C3**, **7** có điểm năng lượng dock cao hơn so với Oxaliplatin lần lượt là -101,0 kcal/mol, -91,8 kcal/mol và -87,9 kcal/mol. Hợp chất **7** hình thành 8 liên kết hydrogen tại vùng hoạt động với protein PDK1 và có ái lực liên kết -15,0 kJ/mol do đó có thể được coi là chất tiềm năng.



Hình 4.44. Liên kết hydro hình thành giữa các hợp chất (A) Hợp chất 7; (B) Hợp chất 6; (C) Hợp chất C2; (D) Hợp chất 4; (E) Hợp chất C1; (F) Hợp chất 5; và (G) Hợp chất C3 với các amino acid trong vùng hoạt động của protein PDK1

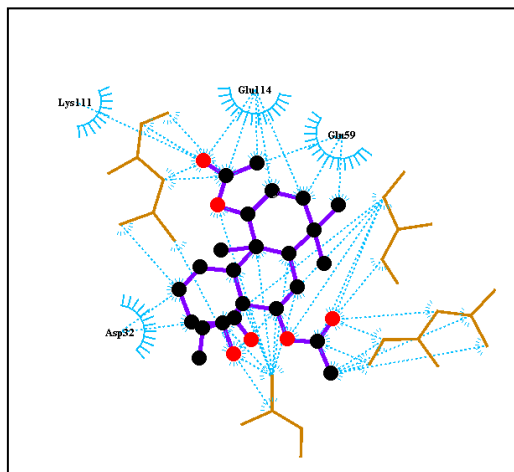
Phân tích cho thấy tất cả các hợp chất đều tạo tương tác không phân cực tại vùng hoạt động của các protein đích. Các amino acid tham gia vào liên kết không phân cực được trình bày tại bảng 4.15 và từ các hình 4.45 đến hình 4.50.

Bảng 4.15. Các liên kết không phân cực hình thành giữa các hợp chất diterpenoid và oxaliplatin với các đích protein AKT, mToR, COX-2, MDM2, PDK1

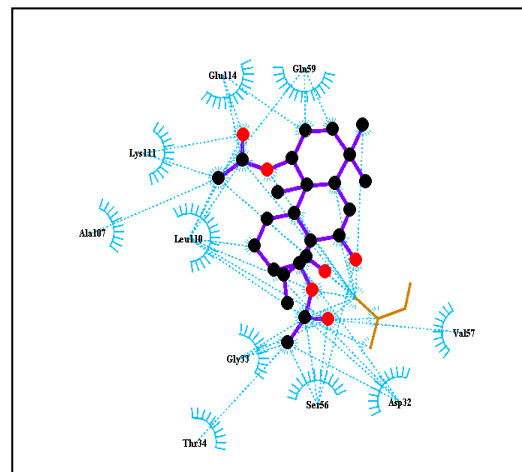
Protein đích	Hợp chất	Amino acid tham gia liên kết không phân cực
AKT (PDB ID: 1UNQ)	Hợp chất 7	Lys111, Glu114, Glu59, Asp 32
	Hợp chất 6	Glu114, Glu59, Lys111, Leu110, Ala107, Gly33, Thr34, Ser56, Asp32, Val157
	Hợp chất C2	Ala58, Gln113, Glu114
	Hợp chất 4	Asp108, Gln61, Gln104, Cys40, Ala107, Glu59, Lys111, Asp108
	Hợp chất C1	Asp3, Asp32, Leu110, Gln113, Glu114
	Hợp chất 5	Ala58, Leu110, Ala107
	Hợp chất C3	Lys111, Ala107, Ala58, Leu110, Gln113
ĐỐI CHỨNG	oxaliplatin	Glu114, Gln113, Leu110
mToR (PDB IB: 4JSV)	Hợp chất 7	Gln1937, Leu1936, Ile1939, Pro2229, Try1974, Ile2228, Ala2226, Glu2196, Gly2142, Gln2200
	Hợp chất 6	Met2199, Ala2226, Ile2228, Val2227, Tyr2225, Gly2142, Pro2229, Pro1976, Ala1971, Tyr1974, Glu1970, Ile1939, Glu2196, Gln1937, Pro1940, Gln2200
	Hợp chất C2	Ala2226, Met 2199, Gln2200, Gln1937, Glu2126, Pro1940, Pro1975, Gly2142, Ile2228, Pro2229, Ala1971, Gln1970
	Hợp chất 4	Gln2200, Pro1940, Val2227, Ile2228, Gln1970, Pro1975, Pro2229, Ile1939
	Hợp chất C1	Leu1900, Gly2203, Arg2224, Met2199, Glu2200, Pro1940, Glu2196, Glu1937
	Hợp chất 5	Leu1900, Gly2203, Arg2224, Glu2200, Met2199, Pro1940, Glu2196, Glu2196, Glu1937
	Hợp chất C3	Ala2139, Ala1971, Tyr1974, Pro1975, Gly2142, Gln1970, Pro2229, Tyr2225, Ala2226, Ile2228
ĐỐI CHỨNG	oxaliplatin	Val978, Pro1975, Tyr1974, Ile2228
COX-2 (PDB ID: 3NTI)	Hợp chất 7	His214, Gln283, Leu194, His207, Gln289, Arg222, Thr212, Val291, Lys211, His336, Tyr385
	Hợp chất 6	Arg222, Val291, Lys211, Gln289, Gln454, His207, His386
	Hợp chất C2	The212, Phe210, His214, Lys211, Gln289, Val291, His388, Val447, Leu294
	Hợp chất 4	Arg222, His214, Val214, Val291, Lys211, Gln289, His386, His207, Phe210
	Hợp chất C1	Lys 211, His386, His388, His207, Phe210, Val291
	Hợp chất 5	Asn382, Phe210, His386, His207, Thr212, Val 291, Lys211, Gln289, His386, Phe210
	Hợp chất C3	Tyr285, Thr266, Phe210, His267, His386, His214, Thr212, Val291, Lys 211, Arg222
ĐỐI CHỨNG	oxaliplatin	Phe210, Tyr385, His207, His386
MDM2 (PDB ID: 4JRG)	Hợp chất 7	Tyr61, Gly54, Leu53, Val189, Ile57, Phe87, Ile95, His92, Tyr96
	Hợp chất 6	Tyr51, Gly54, Ile57, Leu50, Phe37, Ile95, His92, Tyr96
	Hợp chất C2	Tyr51, Leu50, Gly54, Ile95, Ile57, Val89

	Hợp chất 4	Phe82, Leu78, Val89, Gly54, Ile95, Leu50, Ile99, Leu53, Ile57, Phe87
	Hợp chất C1	His92, Ile95, Val89, Lys47, Leu50
	Hợp chất 5	Phe87, Leu50, Ile95, His92, Val89, Ile57, Ile95, Tyr51, Met58, Gly54
	Hợp chất C3	Ile95, His92, Gly54, Val89, Ile57, Met58, Leu50
ĐỐI CHỨNG	oxaliplatin	Leu50
PDK1 (PDB ID: 5LOV)	Hợp chất 7	Gly89, Glu 90, Phe93, Gly91, Ser92, Lys207, Val96, Lys111, Thr222
	Hợp chất 6	Leu88, Gly89, Val96, Leu212, Leu159, Asp223, Ser94, Gly91, Asn210
	Hợp chất C2	Gly91, Leu88, Gly89, Val96, Glu166, Leu212, Glu90, Lys111, Asp223
	Hợp chất 4	Thr222, Glu209, Val96, Ala162, Gly165, Glu166, Leu212, Leu88, Tyr161
	Hợp chất C1	Glu209, Val96, Thr222, Gly165, Gly165, Glu166, Ala162, Leu212, Leu88, Tyr161, Ala162
	Hợp chất 5	Tyr161, Leu212, Asn210, Lys111, Asp223, Glu209, Val96, Gly89, Glu166, Leu88
ĐỐI CHỨNG	oxaliplatin	Tyr161, Leu88

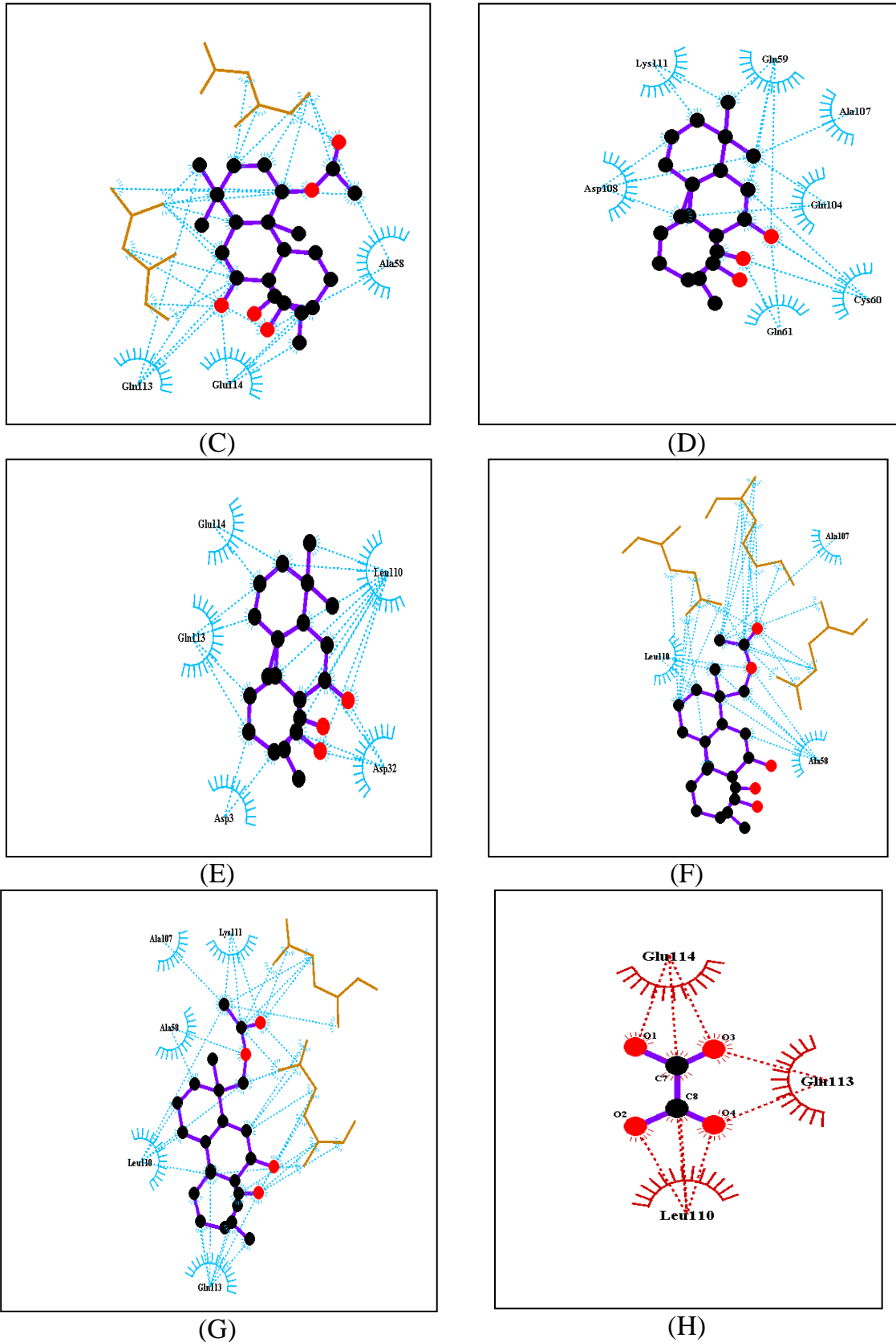
Như đã phân tích, chất 7 được dự đoán có tiềm năng cao nhất, do đó chúng tôi tập trung phân tích sâu hơn cho hợp chất này. Đối với protein AKT, bên cạnh các liên kết hydrogen tạo thành, tương tác giữa hợp chất 7 và AKT được củng cố bền vững thêm thông qua các liên kết không phân cực với các amino acid Lys111, Glu114, Glu59, Asp 32. Phân tích tương tác với mTOR cho thấy có 10 amino acid tham gia liên kết không phân cực gồm Gln1937, Leu1936, Ile1939, Pro2229, Try1974, Ile2228, Ala2226, Glu2196, Gly2142, Gln2200. Với protein MDM2, các amino acid chính trong tương tác không phân cực với hợp chất 7 là Tyr61, Gly54, Leu53, Val189, Ile57, Phe87, Ile95, His92, Tyr96. Cuối cùng với PDK1, các amino acid tham gia liên kết gồm Gly89, Glu 90, Phe93, Gly91, Ser92, Lys207, Val96, Lys111, Thr222.



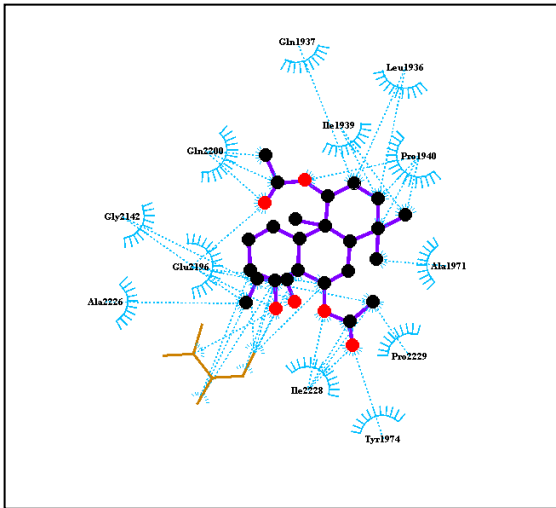
(A)



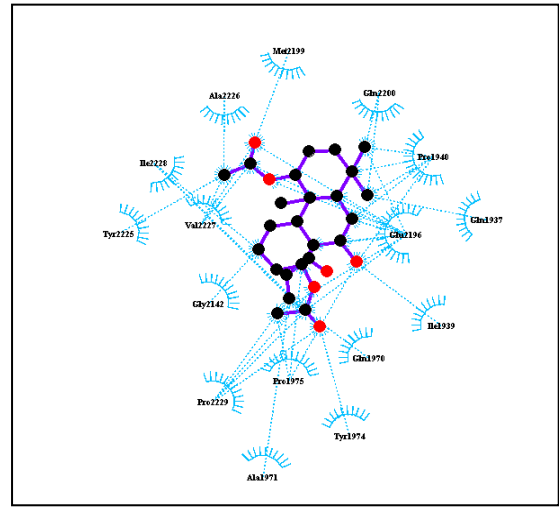
(B)



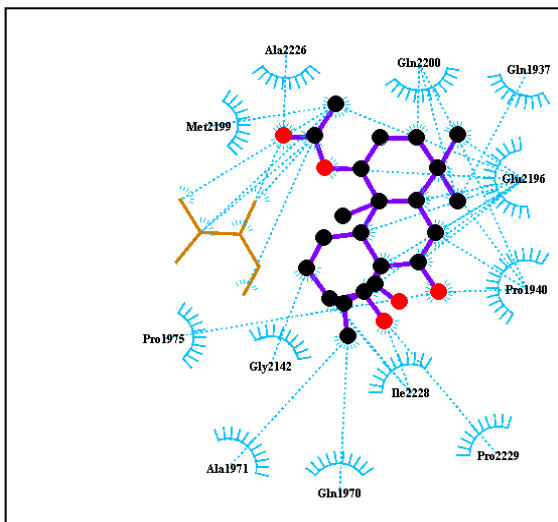
Hình 4.45. Liên kết không phân cực hình thành giữa (A) Hợp chất 7; (B) Hợp chất 6; (C) Hợp chất C2; (D) Hợp chất 4; (E) Hợp chất C1; (F) Hợp chất 5; (G) và Hợp chất C3; (H) oxaliplatin với các amino acid trong vùng hoạt động của protein AKT



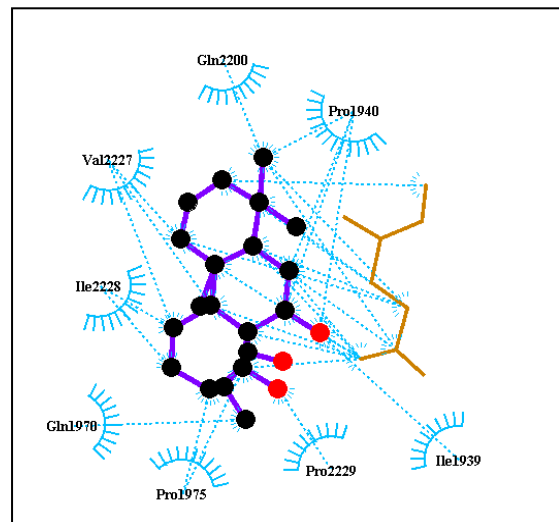
(A)



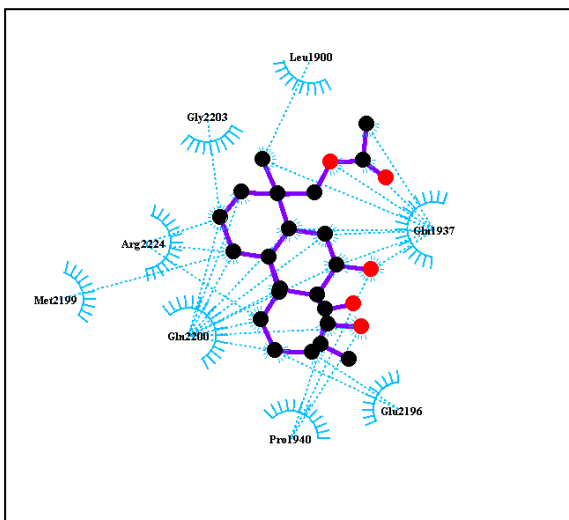
(B)



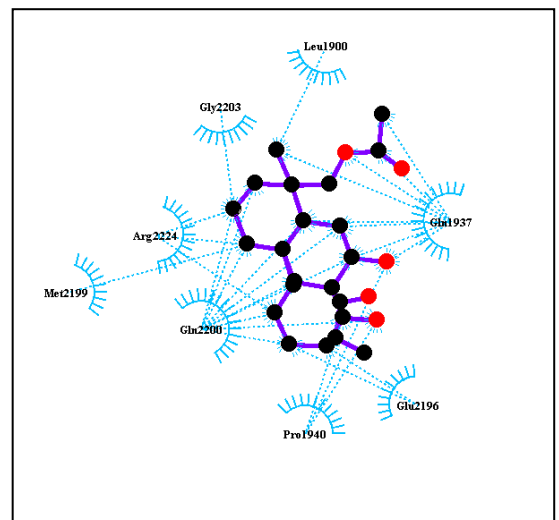
(C)



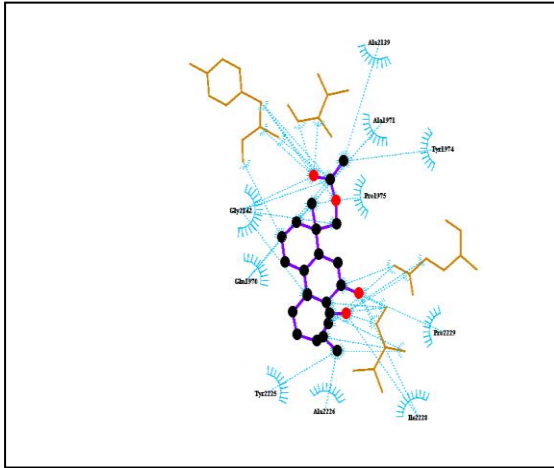
(D)



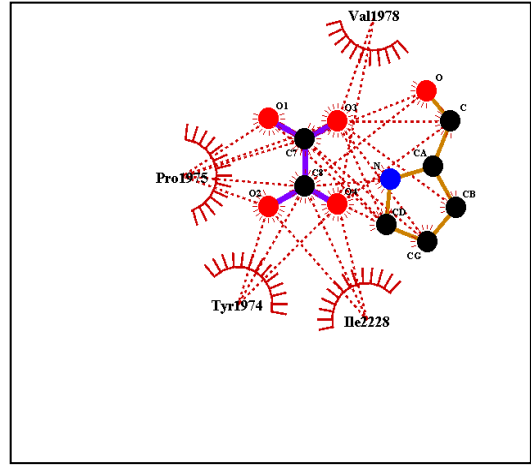
(E)



(F)

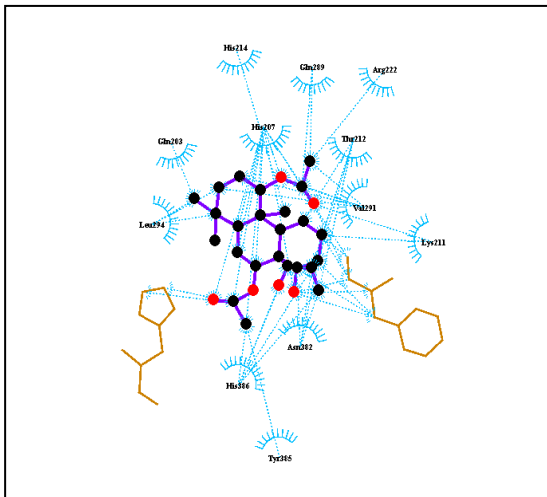


(G)

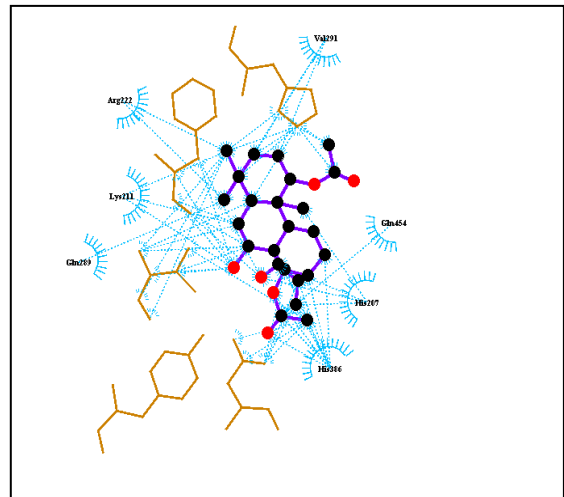


(H)

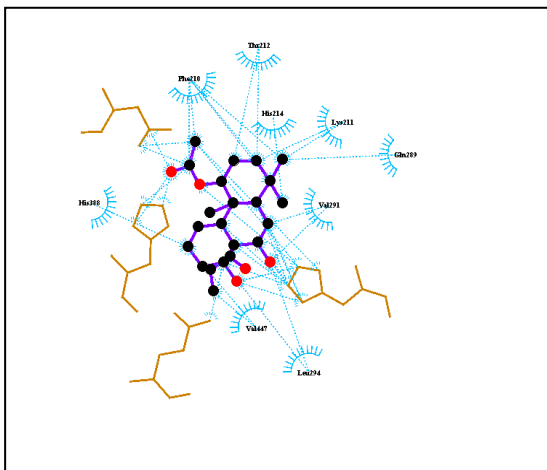
Hình 4.46. Liên kết không phân cực hình thành giữa (A) Hợp chất 7; (B) Hợp chất 6; (C) Hợp chất C2; (D) Hợp chất 4; (E) Hợp chất C1; (F) Hợp chất 5; và (G) Hợp chất C3; (H) oxaliplatin với các amino acid trong vùng hoạt động của protein mTOR



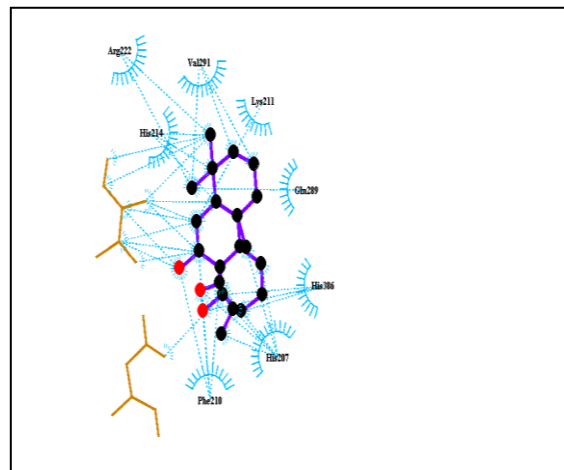
(A)



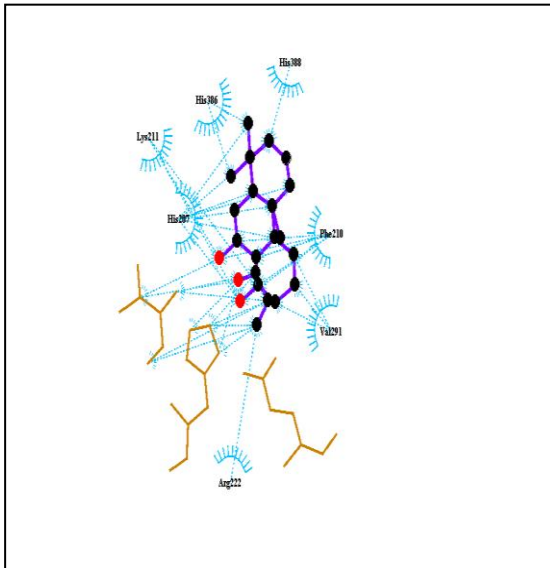
(B)



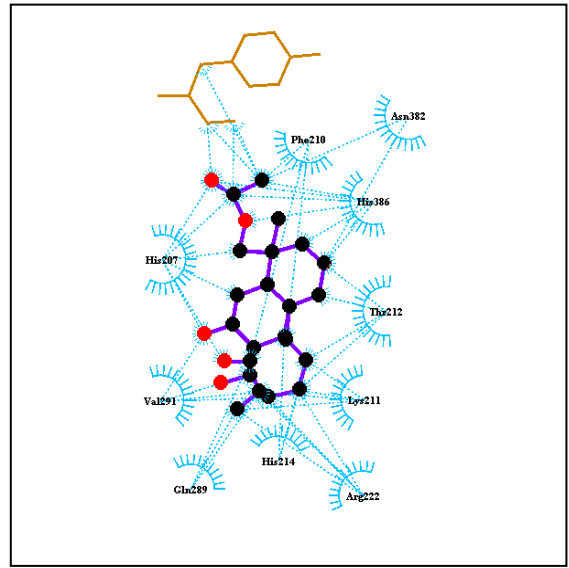
(C)



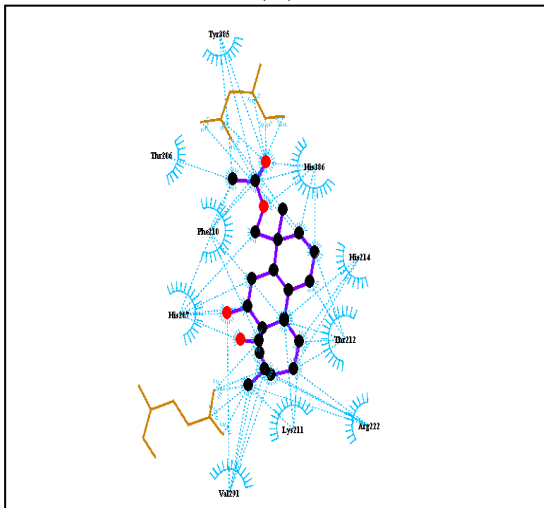
(D)



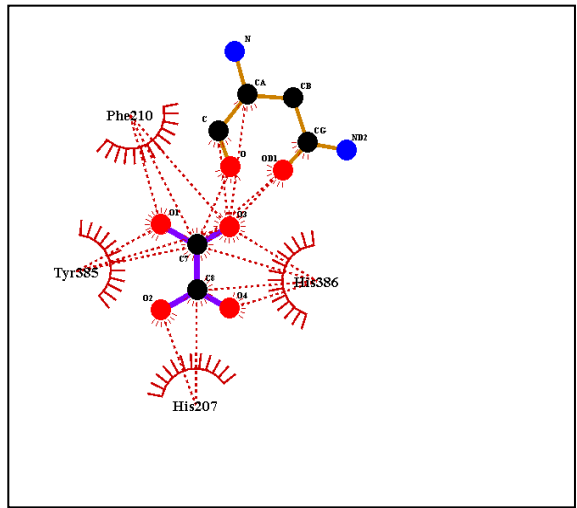
(E)



(F)

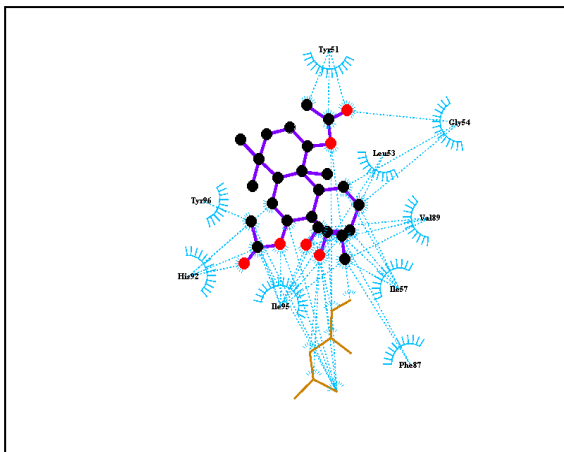


(G)

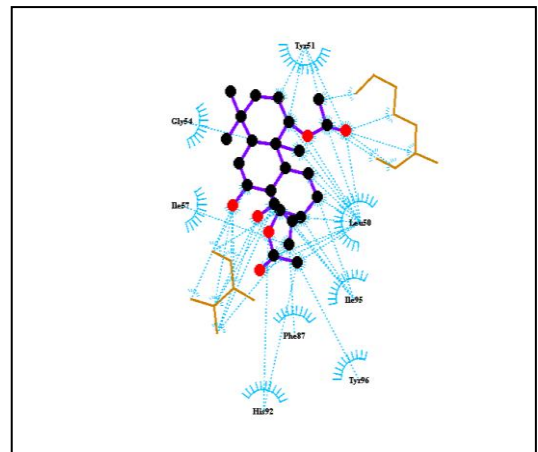


(H)

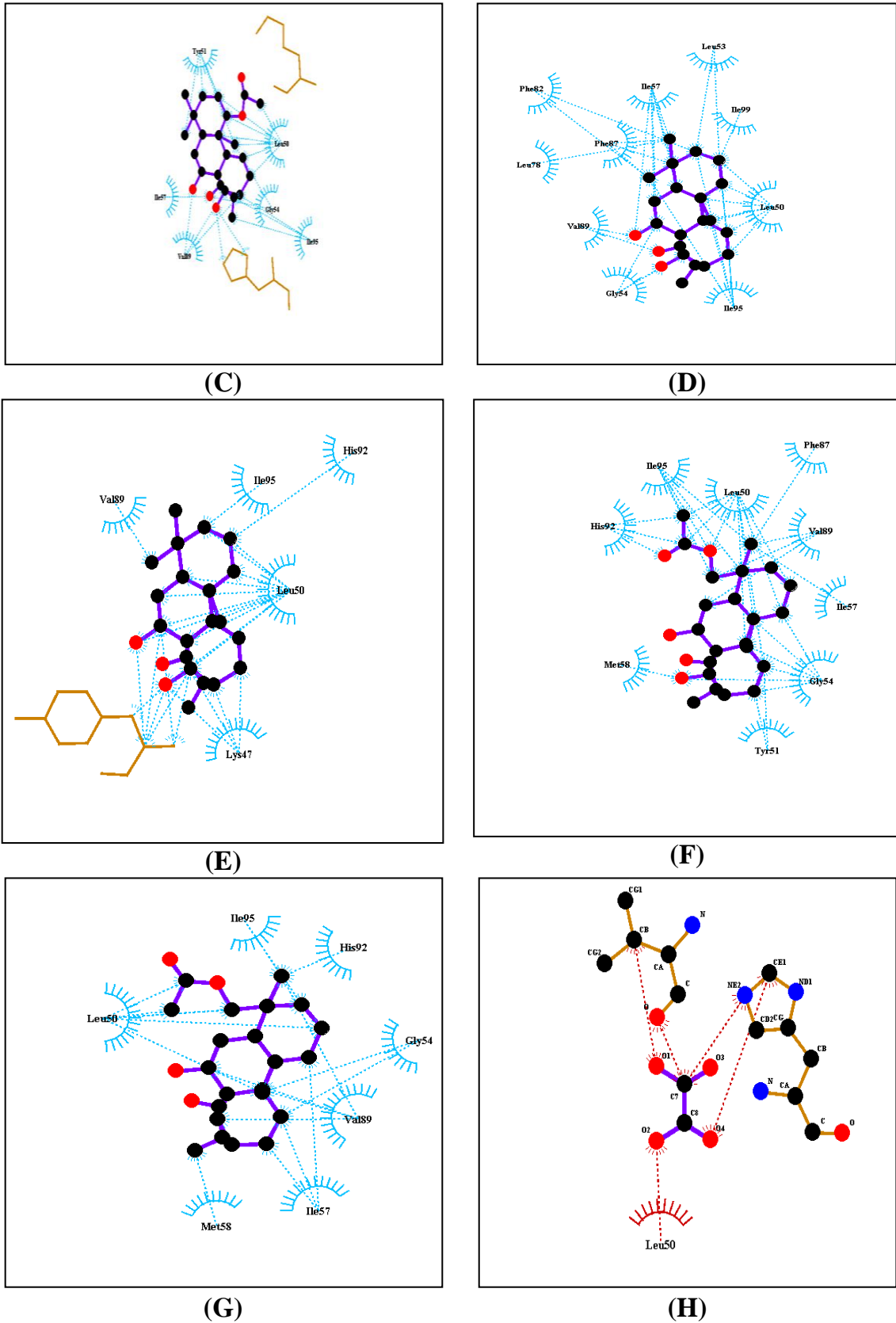
Hình 4.47. Liên kết không phân cực hình thành giữa (A) Hợp chất 7; (B) Hợp chất 6; (C) Hợp chất C2; (D) Hợp chất 4; (E) Hợp chất C1; (F) Hợp chất 5; (G) Hợp chất C3; (H) oxaliplatin với các amino acid trong vùng hoạt động của protein COX-2



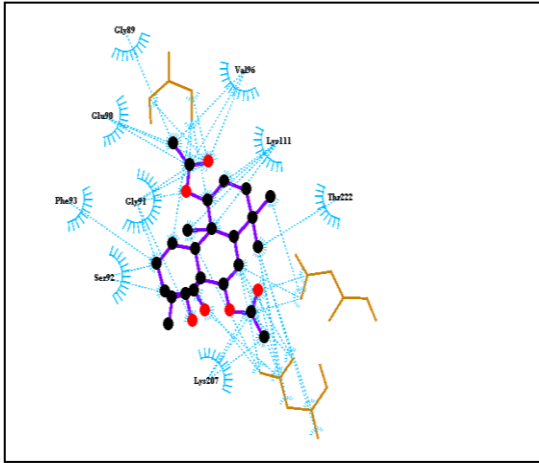
(A)



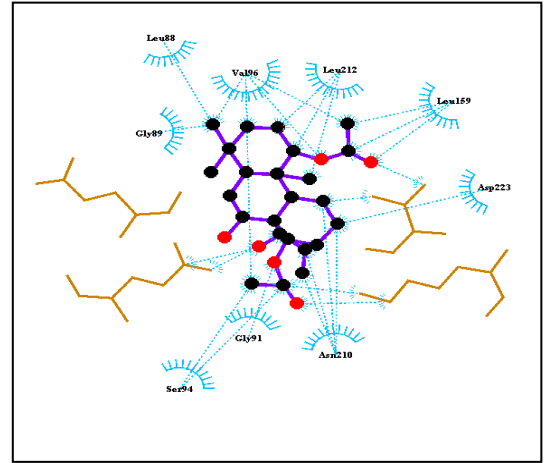
(B)



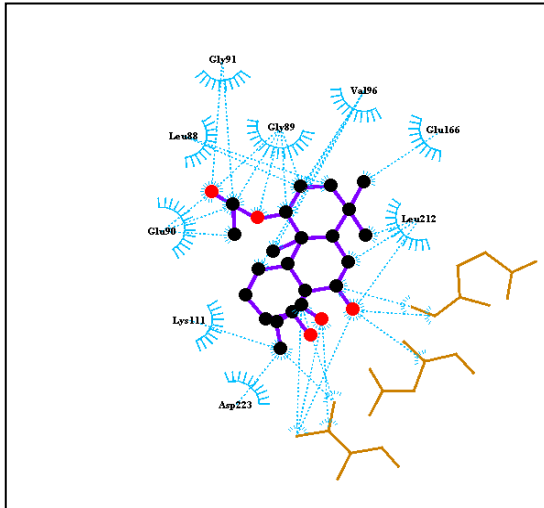
Hình 4.48. Liên kết không phân cực hình thành giữa (A) Hợp chất 7; (B) Hợp chất 6; (C) Hợp chất C2; (D) Hợp chất 4; (E) Hợp chất C1; (F) Hợp chất 5; (G) Hợp chất C3; (H) oxaliplatin với các amino acid trong vùng hoạt động của protein MDM2



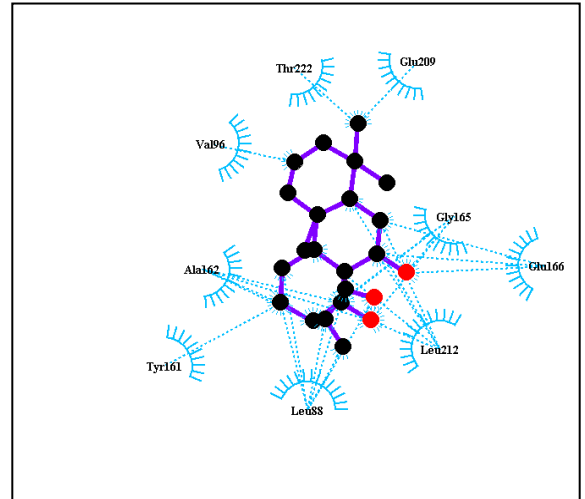
(A)



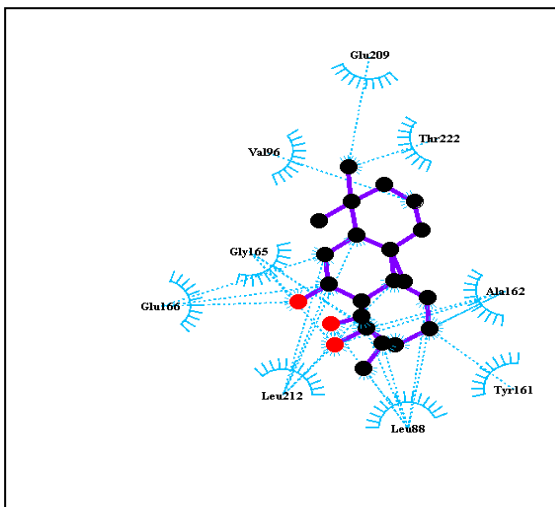
(B)



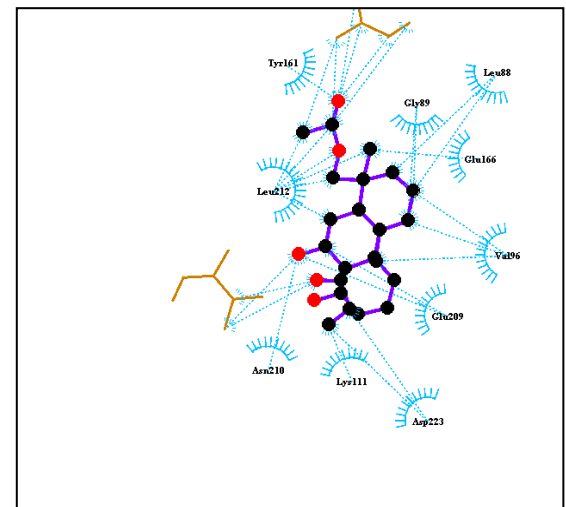
(C)



(D)



(E)



(F)

PI3K thông qua cơ chế tín hiệu phản hồi. Điều này cũng dẫn tới kích hoạt chức năng của AKT. Từ kết quả mô phỏng, hợp chất **C2** cũng thể hiện năng lượng dock cao với AKT, MToR và MDM2, chỉ đứng sau hợp chất **6** và **7**. Do đó, tổng kết lại, các hợp chất **C2**, **C3**, **6** và **7** có thể dự đoán có tiềm năng trong điều trị qua con đường tín hiệu PI3K.

4.7. Hoạt tính các *ent*-kaurane diterpenoid từ Khổ sâm gây độc trên dòng tế bào ung thư phổi người A549

Các hợp chất: *ent*-1 α ,7 β -diacetoxy-14 α -hydroxykaur-16-en-15-one (**7**); *ent*-1 α ,14 α -diacetoxy-7 β -hydroxykaur-16-en-15-one (**6**); *ent*-18 α -axetoxy-7 α ,14 β -dihydroxykaur-16-en-15-one (**5**); *ent*-7 β ,14 α -dihydroxykaur-16-en-15-one (**4**); *ent*-18-axetoxy-7 β -hydroxykaur-16-en-15-one (**C3**); *ent*-1 α -axetoxy-7 β ,14 α -dihydroxykaur-16-en-15-one (**C2**); và *ent*-18-axetoxy-7 β -hydroxykaur-15-one (**C1**); phân lập từ Khổ sâm được đem thử hoạt tính gây độc tế bào trên dòng tế bào ung thư phổi người A549.

Bảng 4.16. Hoạt tính độc tế bào của các hợp chất *ent*-kaurane diterpenoid trên dòng tế bào A549 sau thời gian ủ 48 tiếng

Hợp chất	IC ₅₀ (μ M)
<i>ent</i> -18-axetoxy-7 β -hydroxykaur-15-one (C1)	231,04 \pm 1,8
<i>ent</i> -1 α -axetoxy-7 β ,14 α -dihydroxykaur-16-en-15-one (C2)	20,70 \pm 0,8
<i>ent</i> -18-axetoxy-7 β -hydroxykaur-16-en-15-one (C3)	18,55 \pm 1,3
<i>ent</i> -7 β ,14 α -dihydroxykaur-16-en-15-one (4)	118,89 \pm 2,2
<i>ent</i> -18 α -axetoxy-7 α ,14 β -dihydroxykaur-16-en-15-one (5)	67,15 \pm 1,6
<i>ent</i> -1 α ,14 α -diacetoxy-7 β -hydroxykaur-16-en-15-one (6)	12,87 \pm 0,3
<i>ent</i> -1 α ,7 β -diacetoxy-14 α -hydroxykaur-16-en-15-one (7)	11,17 \pm 0,8
oxaliplatin	22,12 \pm 1,1

Dòng tế bào A549 là một dòng tế bào ung thư biểu mô phổi ở người được lựa chọn sử dụng trong nghiên cứu này. Khả năng sống sót tế bào được đánh giá bằng phương pháp MTT. Tế bào được ủ với các hợp chất nghiên cứu trong 48 tiếng ở các nồng độ khác nhau. Từ bảng 4.30, giá trị IC₅₀ của hợp chất **7**, **6**, **C3** và **C2** lần lượt là 11,17 \pm 0,8; 12,87 \pm 0,3; 18,55 \pm 1,3 và 20,07 \pm 0,8 μ M, cao hơn chất chuẩn oxaliplatin (22,12 \pm 1,1 μ M). Các kết quả ban đầu này cho thấy tiềm năng ức chế tăng sinh tế bào ung thư phổi của các chất nghiên cứu và có sự tương đồng cao với kết quả mô phỏng docking phân tử.

KẾT LUẬN

Luận án đã thu được các kết quả chính như sau:

1. Nghiên cứu về hóa học:

Từ 07 loài thực vật được khảo sát, gồm có Bọ mắm (*Pouzolzia zeylanica*), Thầu dầu (*Ricinus communis*), Ké hoa đào (*Urena lobata*), Khổ sâm (*Croton tonkinensis*), Thôm lôm (*Polygonum chinense*), Đơn châu chấu (*Aralia armata*) và Cà trái vàng (*Solanum xanthocarpum*) đã phân lập và xác định cấu trúc 33 hợp chất (trong đó trùng lặp 10 hợp chất, còn lại 23 hợp chất) chủ yếu thuộc các lớp chất diterpenoid (3 hợp chất), triterpenoid (5 hợp chất), alkaloid (5 hợp chất), flavonoid (5 hợp chất), steroid (3 hợp chất) và lignan (2 hợp chất).

2. Nghiên cứu hoạt tính sinh học theo định hướng tạo chế phẩm chống bệnh hoại tử gan tụy cấp do vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* gây ra cho tôm:

2.1. Kết quả khảo sát sơ bộ khả năng ức chế vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus in vitro* của các cao chiết ethanol thô của 13 loài thực vật được lựa chọn cho thấy 07 loài: Ké hoa đào, Bọ mắm, Khổ sâm và Đơn châu chấu (đường kính trung bình vòng ức chế lần lượt là 15 mm, 17 mm, 18 mm, và 25 mm theo phương pháp của Chawee-pack-2015); Thầu dầu và Thôm lôm (đường kính vòng vô khuẩn lần lượt là 10,4 - 15,3 mm và 15,3 - 20,6 mm tương ứng với nồng độ 40-200 μ g/khoanh theo phương pháp của W. Kirby và A. Bauer - 1961) thể hiện hoạt tính tốt nhất, được lựa chọn cho nghiên cứu kháng khuẩn *V. parahaemolyticus* trên tôm (*in vivo*) bổ sung vào môi trường nước và thức ăn. Kết quả thử hoạt tính *in vivo* cho biết, cao chiết Khổ sâm (CT.M) ở với liều 15 ppm và Thôm lôm (PC.M) ở nồng độ 30g/m³ bổ sung vào môi trường nước nuôi tôm có mầm bệnh AHPND *in vivo* cho kết quả kháng khuẩn tốt nhất, nâng cao tỷ lệ sống tôm hơn 60%. Cao chiết Khổ sâm (ở liều 2% (20g/kg thức ăn) và 4% (40g/kg thức ăn)) và Thôm lôm (ở liều 25-30g/100kg tôm) bổ sung vào thức ăn cho tôm có hiệu quả nâng tỷ lệ sống của tôm lên trên 70,4%.

2.2. Kết quả thử nghiệm hoạt tính sinh học *in vitro* cho thấy các hợp chất quercetin-3-O- β -D-glucopyranoside, *ent*-18-axetoxy-7 β -hydroxykaur-16-en-15-on, *ent*-18 α -axetoxy-7 α ,14 β -dihydroxykaur-16-en-15-on và *ent*-1 α -axetoxy-7 β ,14 α -dihydroxykaur-16-en-15-on ở nồng độ 0,1% có khả năng ức chế sự phát triển của vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* gây bệnh AHPND lần lượt là 82,5; 70,8; 50,4; 44,5 và 35,5%.

2.3. Bước đầu tìm hiểu cơ chế ảnh hưởng của các hợp chất *ent*-1 α -axetoxy-7 β ,14 α -dihydroxykaur-16-en-15-on (C2), *ent*-18-axetoxy-7 β -hydroxy-kauran-15-on (C1), *ent*-18-axetoxy-7 β -hydroxykaur-16-en-15-on (C3) và quercetin-3-O- β -D-glucopyranoside (P3) đến sự chuyển hóa proline của vi khuẩn *Vibrio*

parahaemolyticus, kết quả mô phỏng docking phân tử cho thấy ái lực liên kết tại vùng hoạt động của protein PDH tốt hơn so với chất chuẩn naucleidinal, trong đó hợp chất **P3** cho thấy ái lực liên kết cao nhất (-11.5900 kcal/mol), hợp chất **C2** có ái lực liên kết thấp nhất trong bốn chất nghiên cứu (-9.9100 kcal/mol), những số liệu thu được có độ tương đồng cao so với kết quả thực nghiệm.

3. Nghiên cứu hoạt tính sinh học theo định hướng gây độc tế bào:

3.1. Khảo sát hoạt tính gây độc tế bào *in vitro* trên dòng tế bào ung thư phổi người A549 các ent-kaurane diterpenoid phân lập từ cây Khổ sâm gồm: *ent*-1 α ,7 β -diacetoxy-14 α -hydroxykaur-16-en-15-one (**7**); *ent*-1 α ,14 α -diacetoxy-7 β -hydroxykaur-16-en-15-one (**6**); *ent*-18 α -axetoxy-7 α ,14 β -dihydroxykaur-16-en-15-one (**5**); *ent*-7 β ,14 α -dihydroxykaur-16-en-15-one (**4**); *ent*-18-axetoxy-7 β -hydroxykaur-16-en-15-one (**C3**); *ent*-1 α -axetoxy-7 β ,14 α -dihydroxykaur-16-en-15-one (**C2**); và *ent*-18-axetoxy-7 β -hydroxykaur-15-one (**C1**). Kết quả chỉ ra các hoạt chất có tiềm năng ức chế tăng sinh tế bào ung thư phổi là các hợp chất **7**, **6**, **C3** và **C2** với lần lượt IC 50 là $11,17 \pm 0,8$; $12,87 \pm 0,3$; $18,55 \pm 1,3$ và $20,07 \pm 0,8$ μM , cao hơn chất chuẩn oxaliplatin ($22,12 \pm 1,1$ μM).

3.2 Kết quả mô phỏng docking phân tử 7 hợp chất *ent*-kaurane diterpenoid nguồn gốc từ lá cây Khổ sâm định hướng ức chế con đường tín hiệu PI3K trong ung thư phổi tế bào cũng chỉ ra 4 hợp chất: *ent*-18-axetoxy-7 β -hydroxykaur-16-en-15-one (**C3**), *ent*-1 α -axetoxy-7 β ,14 α -dihydroxykaur-16-en-15-one (**C2**), *ent*-1 α ,14 α -diacetoxy-7 β -hydroxykaur-16-en-15-one (**6**) và *ent*-1 α ,7 β -diacetoxy-14 α -hydroxykaur-16-en-15-one (**7**) thể hiện tiềm năng ức chế các protein khi so sánh với chất chuẩn oxaliplatin, như vậy có sự tương đồng cao giữa kết quả mô phỏng docking phân tử với kết quả thực nghiệm.

KIẾN NGHỊ

Các kết quả nghiên cứu trong luận án cho thấy Khổ sâm và Thòmm lỏmm là nguồn giàu có các hợp chất thiên nhiên có cấu trúc hóa học và hoạt tính sinh học thú vị. Vì vậy, trong tương lai tiếp tục đánh giá hiệu quả phòng bệnh AHPND của sản phẩm cao chiết thô thảo dược Khổ sâm và Thòmm lỏmm để tạo ra các sản phẩm phòng bệnh AHPND do vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* gây ra nói riêng và các bệnh do vi khuẩn *Vibrio* ssp. gây ra nói chung, phục vụ chăm sóc sức khỏe cộng đồng. Các kết quả nghiên cứu về hoạt tính gây độc trên dòng tế bào ung thư phổi A549 cho thấy, các hợp chất *ent*-kaurane diterpenoid có tiềm năng phát triển thành thuốc điều trị ung thư.

CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

❖ Bài báo quốc tế (ISI/Scopus):

1. Pham Thi Hong Minh, **Tran Thi Hoai Van**, Tran Quoc Toan, Le Minh Bui, Nguyen Hoang Thuan Anh, and Pham Minh Quan, Identification of *ent-*kaurane diterpenoid compounds as potential inhibitors of the PI3K pathway in nonsmall cell lung cancer through molecular docking simulations, *Natural Product Communications* (2021), 16(9): 1–8. (SCIE)

❖ Bài báo trong nước:

2. **Trần Thị Hoài Vân**, Đỗ Tiến Lâm, Luân Thị Thu, Trần Thị Thu Thủy, Đoàn Lan Phương, Cẩm Thị Ính, Phạm Quốc Long, Phạm Thị Hồng Minh. "Đóng góp vào kết quả nghiên cứu thành phần hóa học cây Bọ mắ *Pouzolzia zeylanica* (L.) Benn)". *Tạp chí Hóa học*, (2015), 53 (6e 1,2), p. 149 - 153. ISSN: 0866-7144.

3. Đỗ Tiến Lâm, Vũ Thị Thu Lê, **Trần Thị Hoài Vân**, Luân Thị Thu, Nguyễn Thị Ngân, Đoàn Lan Phương, Lành Thị Ngọc, Phạm Quốc Long, Phạm Thị Hồng Minh. "Các kết quả nghiên cứu ban đầu về thành phần hóa học của thân cây Đơn châu chấu (*Aralia armata*) ở Thái nguyên.". *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, Trường ĐH Thái Nguyên, KHTN-KT, (2016), 150 (05), p. 9-14. ISSN: 1859-2171.

4. **Tran Thi Hoai Van**, Luan Thi Thu, Do Tien Lam, Doan Lan Phuong, Cam Thi Inh, Lanh Thi Ngoc, Nguyen Van Tuyen Anh, Pham Thi Hong Minh, Pham Quoc Long. "Contribution to results of the chemical constituents of *Ricinus communis*". *Tạp chí Khoa học và Công nghệ* (2016), 54 (2C), p. 523-529. ISSN: 1859-2171.

5. Trương Thị Mỹ Hạnh, Phạm Thị Yên, Phạm Thị Huyền, Huỳnh Thị Mỹ Lệ, Phạm Thị Hồng Minh, Đỗ Tiến Lâm, **Trần Thị Hoài Vân**, Phan Thị Vân. "Tác dụng diệt khuẩn của dịch chiết thân lá Thồm lồm (*Polygonum chinenses* L.) đối với vi khuẩn gây bệnh hoại tử gan tụy cấp ở tôm nuôi nước lợ". *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam* (2017), 17 (6), p. 20-24. ISSN: 1859-4794.

6. Phạm Minh Quan, **Tran Thi Hoai Van**, Do Tien Lam, Doan Lan Phuong, Cam Thi Inh, Pham Quoc Long, Pham Thi Hong Minh. "Study on the chemical composition of *Urena lobata* (L.) growing in Vietnam". *Tạp chí Vietnam Journal of Science and Technology* (2019), 57 (2), p.162-169.

7. **Tran Thi Hoai Van**, Pham Thi Hong Minh, Pham Quoc Long, Do Tien Lam, Ha Viet Hai, Le Thi Thuy Huong, Le Duc Anh, Pham Minh Quan, "Effect of some phyto-flavonoids and terpenoid on proline metabolism of *Vibrio parahaemolyticus*: inhibitory mechanism and interaction with molecular docking simulation". *Vietnam Journal of Science and Technology* (2020), 58 (6A) p. 189-198.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Vengadesh Letchumanan, Kok-Gan Chan and Learn-Han Lee, *Vibrio parahaemolyticus*: a review on the pathogenesis, prevalence, and advance molecular identification techniques, *Front Microbiol.*, **2014**, 5: 705.
2. Majid aminzare, Mohammad Hashemi, Zahra Abbasi, Mehran Mohseni, Elham Amiri, Vibriosis phytotherapy: A review on the most important world medicinal plants effective on *Vibrio* spp., *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, **2018**, 8(1):170-177.
3. Võ Văn Chi, Từ điển cây thuốc Việt Nam, NXB Y học, Hà Nội, **2012**, tập III.
4. Nguyễn Tiến Bân và cs “Danh lục các loài thực vật Việt Nam”, *NXB Nông nghiệp*, Hà Nội **2003**, Tập II.
5. Phạm Hoàng Hộ, *Cây cỏ Việt Nam tập II*, Nxb Trẻ Thành phố Hồ Chí Minh, **2000**, 602-603.
6. Duangjai Tungmunnithum, Areeya Thongboonyou, Apinan Pholboon and Aujana Yangsabai, Flavonoids and Other Phenolic Hợp chấts from Medicinal Plants for Pharmaceutical and Medical Aspects: An Overview, *Medicines*, **2018**, 5, 93, 1-16.
7. Madiha Saleem, Mehr Un Nisa , Mehmood Khan , Fouzia Karam Khan , Kaleem Imdad , Bilqees Fatima , Aamir Rasool, Isolation and structural characterization of novel terpenoids from different plant species: a review, *Indo American Journal Of Pharmaceutical Sciences*, **2019**, 06 (02), 4711-4726.
8. Jason A. Clement and Ella S.H. Clement, The Medicinal Chemistry of Genus *Aralia*, *Current Topics in Medicinal Chemistry*, **2014**, 14, 2783-2801
9. Shigeru Sakai, Masumi Katsumata (Nee Ohtsuka), Yohko Satoh, Miki Nagasao, Masazumi Miyakoshi, Yoshiteru Ida and Junzo Shoji, Oleanolic acid saponins from root bark of *Aralia elata*, *Phytochemistry*, **1994**, 35 (5), 1319-1324.
10. Mei Hu, Kazunori Ogawa, Yutaka Sashida and Pei-Gen Xiao, Triterpenoid glucuronide saponins from root bark of *Aralia armata*, *Phytochemistry*, **1995**, 39 (1), 179-184
11. Wen-Hui Xu, Wei-Yi Liu and Qian Liang, Chemical Constituents from *Croton* Species and Their Biological Activities, *Molecules*, **2018**, 23, 2333; doi:10.3390/molecules23092333.
12. Phan Tổng Sơn, Văn Ngọc Hương, Phan Minh Giang, Taylor W. C, Đóng góp vào việc nghiên cứu hoạt chất sinh học từ cây Khổ sâm cho lá *Croton tonkinensis* Gagnep., Euphorbiaceae, *Tạp chí Hoá học*, **1999**, 37(4), 1-2.
13. Ganapathi Narasimhulu, Kesireddy Kathyvevelu Reddy, Jamaludin Mohamed, The genus *Polygonum* (Polygonaceae): An ethnopharmacological and phytochemical perspectives –review, *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, **2014**, 6 (2), 21-45
14. Tsai PL, Wang JP, Chang CW, Kuo SC, Chao PD, Constituents and bioactive principles of *Polygonum chinensis*, *Phytochemistry*, **1998**, 49(6),1663-6.
15. Fu Ming, Niu YY, et al., Study on the chemical constituents in *Pouzolzia zeylanica*, *Zhongyaoca- Journal of Chinese medicinal materials*, **2012**, 35(11), 1778-1781.

16. Sarkar Brazendranath, Raihan SM Abu, et al., Phytochemical and Biological Activity Studies on *Pouzolzia zeylanica* (Linn.) Benn, *National University Journal of Science*, **2014**, 1(1), 51–58.
17. Paulo R. Ribeiroa, Renato D. de Castro, Luzimar G. Fernandez. Chemical constituents of the oilseed crop *Ricinus communis* and their pharmacological activities: A review. *Industrial Crops and Products*, **2016**, 91, 358–376.
18. Waseem Mohammed Abdul, Nahid H Hajrah, Jamal S.M. Sabir, Saleh M Al-Garni, Meshaal J Sabir, Saleh A Kabli, Kulvinder Singh Saini, Roop Singh Bora, Therapeutic role of *Ricinus communis* L. and its bioactive Hop chát in disease prevention and treatment *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, **2018**, 11(3), 177-185.
19. Sachin Parmar, Amit Gangwal, Navin Sheth, *Solanum xanthocarpum* (Yellow Berried Night Shade): A review, *Der Pharmacia Lettre*, **2010**, 2(4), 373-383.
20. R. Paul, Animesh Kumar Datta, An updated overview of *Solanum xanthocarpum* Schrad and Wendl, *International Journal of Research in Ayurveda and Pharmacy*, **2011**, 2(3), 730-735,.
21. Jia, L., Bi, Y.F., Jing, L.L., Zhou, S.A., Kong, D.Y. (2011), Three new flavonoid glycosides from *Urena lobata*, *J. Asian. Nat. Prod. Res.*, **2011**, 13(10), 7-14.
22. Keshab Ghosh, A furocoumarin, Imperatorin isolated from *Urena lobata* L. (Malvaceae), *Molbank*, **2004**, M382
23. Morelli CF, Cairoli P, Speranza GM, Rajia S., Triglycerides from *U.lobata*, *Fitoterapia*, **2006**, 77(4), 296-299
24. Dhanapal R, Ratna JV, Gupta M, Sarathchandran I, Preliminary study on antifertility activity of *Enicostemma axillare* leaves and *Urena lobata* root used in Indian traditional folk medicine, *Asian Pac. J. Trop. Med.*, **2012**, 5, 16-22.
25. Đỗ Thị Xuyên, Nguyễn Khắc Khôi, Đặc điểm và phân bố của các loài cây thuộc họ Bông ở Việt Nam, *Tạp chí Dược Liệu*, **2002**, 5(7), 133-137
26. Adeloye, O. Adewale, Akinpelu, A. David, Ogundaini, O. Abiodun, Obafemi, A. Craig, Studies on antimicrobial, antioxidant and phytochemical analysis of *Urena lobata* leaves extract, *Journal of Physical and Natural Sciences*, **2007**, 1(2), 12-20.
27. Omonkhua AA, Onoagbe IO., Effects of *Irvingia grandifolia*, *Urena lobata* and *Carica papaya* on the oxidative status of normal rabbits, *Internet J Nutr Wellness*, **2008**, 6(2), 2.
28. Pieme CA, Ngogang J, Costache M, *In vitro* antiproliferative and anti-oxidant activities of methanol extracts of *Urena lobata* and *Viscum album* against breast cancer cell lines, *Toxicol. Environ. Chem.*, **2012**, 94(5), 1-13.
29. Yadav AK, Tangpu V, Antidiarrheal activity of *Lithocarpus dealbata* and *Urena lobata* extracts: Therapeutic implications, *Pharm Biol*, **2007**, 45(3), 223-229.
30. A.R. McCutcheon, R.W. Stokes, L.M. Thorson, S.M. Ellis, R.E.W. Hancock & G.H.N. Towers, Anti-Mycobacterial Screening of British Columbian Medicinal Plants, *International Journal of Pharmacognosy*, **1997**, 35:2, 77-83.

31. Mohan N Thakare, Pharmacological screening of some medicinal plants as antimicrobial and feed additives, Thesis of Master of Science In Animal and Poultry Sciences (Pharmacology), Department of Animal and Poultry Science Virginia Polytechnic Institute and State University, Virginia USA.
32. Hà Ký, Phòng và trị bệnh cho tôm cá, Bệnh học thủy sản, NXB Nông Nghiệp, Hà Nội, **1995**
33. Daniels, N.A., Mackiman, L., Bishop, R., Altekruze, S., Ray, B., Hammo, nd R.M., Thompson, S., Wilson, S., Bean, N.H., Griffin, P .M. and Slutsker, L., *Vibrio parahaemolyticus* infections in the United States, *Journal of Infectious Diseases*, **2000**, 181, 1661-1666.
34. Joseph Sakah Kaunda & Ying-Jun Zhang. The Genus Solanum: An Ethnopharmacological, Phytochemical and Biological Properties Review, *Natural Products and Bioprospecting*, **2019**, 9, 77–137 .
35. Kowalczyk, T.; Merecz-Sadowska, A.; Rijo, P.; Mori, M.; Hatziantoniou, S.; Górski, K.; Szemraj, J.; Piekarski, J.; Śliwiński, T.; Bijak, M.; Sitarek, P. Hidden in Plants—A Review of the Anticancer Potential of the Solanaceae Family in *In Vitro* and *In Vivo* Studies. *Cancers*, **2022**, 14, 1455. <https://doi.org/10.3390/cancers14061455>
36. R. Yadav, M. Rathi, A. Pednekar and Y. Rewachandani, A detailed review on Solanaceae family, *European Journal of Pharmaceutical and Medical Research*, **2016**, 3(1), 369-378.
37. Alzoreky, N.S. and Nakahara, K.. Antibacterial Activity of Extracts from Some Edible Plants Commonly Consumed in Asia. *International Journal of Food, Microbiology*, **2003**, 80, 223-230. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00169](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00169).
38. Tamokou, J.D., Chouna, J.R., Fischer-Fodor, E., Chereches, G., Barbos, O., Damian, G., Benedec, D., Duma, M., Efouet, A.P.N., Wabo, H.K., Kulate, J.R., Mot, A. and Silaghi-Dumitrescu, R. Anticancer and Antimicrobial Activities of Some Antioxidant-Rich Cameroonian Medicinal Plants. PLoS ONE, **2013**, 8, e55880. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055880>
39. Orsolya Orbán-Gyapai Pharm.D.; PhD Thesis: Pharmacological screening of Polygonaceae species and isolation of biologically active Hợp chấts from *Rumex aquaticus* L. and *Rumex thyriflorus* Fingerh., University of Szeged, 2017.
40. Lipeng Dong, Wenjuan Guo, Lin Li Zhou & Jing Xu, Chemical Constituents of *Polygonum cuspidatum*, *Chemistry of Natural Hợp chấts*, **2017**, 53, 368–370.
41. Banso, A, and Adeyemo, S, Phytochemical screening and antimicrobial assessment of *Abutilon mauritanum*, *Bacopa monnifera* and *Datura stramonium*, *Nigerian Society for experimental Biology*, **2006**, 18(1):39-44.
42. Pereira, A C, Oliveira, D F, Silva, G H, Figueiredo, H C P, Cavalheiro, A J, Carvalho, D A, Souza, L P, and Chalfoun, S M, Identification of the antimicrobial substances produced by *Solanum palinacanthum* (Solanaceae), *Annals of the Brazilian Academy of Science*, **2008**, 80(3):427-432
43. Silva, M, T, G, Simas, S, M, Batista, T, G, F, M, Cardarelli, P, and Tomassini, T,C, B, Studies on antimicrobial activity, in vivo, of *Physalis angulata* L Solanaceae fraction and physalin B bringing out the importance of assay determination Mem Inst Oswaldo Cruz, *Rio de Janeiro*, **2005**, 100(7):779-781

44. Vivyanne S. Falcão-Silva, Davi A. Silva, Maria de Fátima V. Souza , José P. Siqueira-Junior, Modulation of drug resistance in staphylococcus aureus by a kaempferol glycoside from *Herissantia tiubae* (Malvaceae), *Phytotherapy Research*, **2009**, <https://doi.org/10.1002/ptr.2695>.
45. Israel Emakhu ObohJohn O AkereleJohn O AkereleOsahon ObasuyiOsahon Obasuyi, Antimicrobial activity of the ethanol extract of the aerial parts of *Sida acuta* burm.f. (Malvaceae), *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, **2007**, 6 (4), 809-813.
46. Sherif T. S. Hassan, Kateřina Berchová, Michaela Majerová, Marie Pokorná & Emil Švajdlenka, *In vitro* synergistic effect of *Hibiscus sabdariffa* aqueous extract in combination with standard antibiotics against *Helicobacter pylori* clinical isolates, *Pharm Biol.*, **2016**, 1736-1740.
47. Morais, S.M., Calixto-Júnior, J.T., Ribeiro, L.M., Sousa, H.A., Silva, A.A.S., Figueiredo, F.G., Matias, E.F.F., Boligon, A.A., Athayde, M.L., Morais-Braga, M.F.B., Coutinho, H.D.M., Phenolic composition and antioxidant, anticholinesterase and antibiotic-modulating antifungal activities of *Guazuma ulmifolia* Lam. (Malvaceae) ethanol extract, *South African journal of botany*, **2017**, 110, 251-257.
48. Abdulkadir Nasiru, Adedokun Oluwasegun, Adeniyi-Akee Mukaram and Okogun Joseph, *In vitro* evaluation of antilipid peroxidation and antimicrobial potentials of methanol extract of *Hibiscus sabdariffa* (Malvaceae): An index of potential use in male infertility treatment, *American Journal of Essential Oils and Natural Products*, **2016**, 4(4), 23-27
49. P. Sharavana Kumar, J. Vanitha, K. Venkateshwaran, Srikanth Reddy, K.T. Simon, Jopsy, D. Karthikeyan, Isolation and structure elucidation of phenazine derivative from *Streptomyces* sp. strain UICC B-92 isolated from *Neesia altissima* (Malvaceae), *Iranian Journal of Microbiology*, 2020.
50. Guy Sedar Singor Njateng, Antibacterial and antioxidant properties of crude extract, fractions and Høp chát from the stem bark of *Polyscias fulva* Hiern (Araliaceae) *Arch Clin Microbiol*, 2017, 8:5.
51. B.J. De Villiers, S.F. Van Vuuren, R.L. Van Zyl, B.-E. Van Wy, Antimicrobial and antimalarial activity of *Cussonia species* (Araliaceae), *Journal of Ethnopharmacology*, **2010**, 129 189–196
52. Ali Esmail Al-Snafi, Pharmacological and therapeutic activities of *Hedera helix*- A review, *OSR Journal Of Pharmacy*, **2018**, 8 (5), , 41-53
53. Seung-Il Jeong, Wan-Soo Han, Yeon-Hee Yun and Kang-Ju Kim, Continentalic Acid from *Aralia continentalis* shows Activity against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Phytother. Res.*, **2006**, 20, 511–514.
54. Tian Zhou, Zhi Li, Ok Hwa Kang, Su Hyun Mun, Yun Soo Seo, Ryong Kong, Dong-Won Shin, Xiang Qian Liu, Dong Yeul Kwon, Antimicrobial activity and synergism of ursolic acid 3-O- α -L-arabinopyranoside with oxacillin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *International Journal of Molecular Medicine*, **2017**, 1285-1293.

55. Min-Won Lee, Sung Uk Kim and Dug-Ryoung Hahn, Antifungal Activity of Modified Hederagenin Glycosides from the Leaves of *Kalopanax pictum* var. chinense, *Biol. Pharm. Bull.*, 2001, 24(6) 718—719.
56. Uduak, A. Essiett, Kola', K. Ajibes, Antimicrobial Activities of Some Euphorbiaceae Plants Used in the Traditional Medicine of Akwa Ibom State of Nigeria, *Ethnobotanical Leaflets*, 2010, 14: 654-64.
57. Sevda Kirbag, Pinar Erecevit, Fikriye Kirbag Zengin, Ayşe Nilay Guvenc, Antimicrobial Activities of Some Euphorbia Species, *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, **2003**, 10(5):305-309
58. Hồng Mộng Huyền, Võ Tân Huy, Trần Thị Tuyết Hoa, Hoạt tính kháng khuẩn của một số cao chiết thảo dược kháng vi khuẩn gây bệnh ở tôm nuôi, Tập 54, Số CĐ Thủy sản, 2018, trang 143-150, DOI: 10.22144/ctu.jsi.2018.047
59. Lê Thị Tú Anh, Luận văn Thạc sĩ: Hoạt chất sinh học loài mít lá đen *Artocarpus nigrifolius* C.Y.WU, Hà Nội, 2012.
60. Trương Minh Phụng, Lê Thị Thúy Hằng, Phạm Thị Hào, Nguyễn Thị Huỳnh My, Nguyễn Hoàng Chương, Nghiên cứu hoạt tính kháng khuẩn của các chủng xạ khuẩn nội sinh trong cây Trinh nữ hoàng cung (*Crinum latifolium*), *Tạp chí phát triển KH & CN*, 2017, tập 20, số T5-2017, 69-75.
61. Trịnh Anh Viên, Nguyễn Thị Hồng Vân, Đỗ Thị Thảo, Trần Thị Như Hằng, Nguyễn Anh Tuấn, Phạm Quốc Long. Hoạt tính kháng nấm, kháng khuẩn và gây độc tế bào của một số loài trong chi com ngui (*Ardisia*) ở Việt Nam, *Tạp chí Sinh học*, **2016**, 38(1):75-80.
62. Trần Mỹ Linh, Vũ Hương Giang, Lê Quỳnh Liên, Nguyễn Tường Vân, Ninh Khắc Bản, Châu Văn Minh. Đánh giá hoạt tính ức chế vi khuẩn kiềm định của một số loài thực vật ngập mặn tại vườn quốc gia Xuân Thủy, Nam Định, *Tạp chí Sinh học*, **2013**, 35(3): 342-347.
63. Je-Hyuk LEE, Suppression of cellular adhesion and the anticancer activity of *Aralia elata* extract, *Food Sci. Technol* (Campinas), **2022**, 42, <https://doi.org/10.1590/fst.30821>
64. Joseph O.Erhabor, Omolola R.Oyenihi, Ochuko L.Erukainure, Motlalepula G.Matsabisa, *Croton gratissimus* Burch. (Lavender croton): A Review of the Traditional Uses, Phytochemistry, Nutritional Constituents and Pharmacological Activities. *Trop J Nat Prod Res*, **2022**, 6(6):842-855
65. Seimandi, G.; Álvarez, N.; Stegmayer, M.I.; Fernández, L.; Ruiz, V.; Favaro, M.A.; Derita, M. An Update on Phytochemicals and Pharmacological Activities of the Genus *Persicaria* and *Polygonum*. *Molecules*, **2021**, 26, 5956. <https://doi.org/10.3390/molecules26195956>.
66. Rixile Mabasa, Kholofelo Malemela, MSc, Karabo Serala, Mante Kgakishe, Thabe Matsebatlela, Matlou Mokgotho, and Vusi Mbazima, *Ricinus communis* Butanol Fraction Inhibits MCF-7 Breast Cancer Cell Migration, Adhesion, and Invasiveness, *Integrative Cancer Therapies*, **2021**, 20, <https://doi.org/10.1177/1534735420977684>
67. Ranjan Kumar Singh, Ajay Garg, Khushboo Shrimali, Vivek Jain, Saurabh K. Sinha, Joohee Pradhan. A brief review on along with phytochemical and *Solanum xanthocarpum* pharmacological profile, *Advance Pharmaceutical Journal*, **2022**, 7(1):23-31.
68. Rinku Mathappan, Kesavanarayanan Krishnan, SelvarajanKesavanarayanan, Krishnan SelvarajanSabitha, SujeetSourav Tribedi, Evaluation of antitumor

- activity of *Urena lobata* against Ehrlich ascites carcinoma treated mice, *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*, **2018**, 19(1). DOI: 10.1007/s13596-018-0342-x
69. Lê Mai Hương, Lê Thị Xuân, Hoàng Thanh Hương, Phạm Quốc Long Châu Văn Minh, *Xây dựng và triển khai các phương pháp thử nghiệm sinh học hiện đại phục vụ đánh giá sàng lọc và nghiên cứu hoá học theo định hướng hoạt chất sinh học các hợp chất có nguồn gốc thiên nhiên*. Hội nghị Khoa học Kỹ thuật 30 năm Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam, Hà Nội, 2005, 3, 125-136.
 70. Hoàng Thanh Hương, Châu Văn Minh (2007), *Nghiên cứu hoá học theo định hướng hoạt tính sinh học các cây thuốc dân tộc Việt Nam nhằm tạo ra những sản phẩm có giá trị cao phục vụ cuộc sống*. Báo cáo tổng kết KHKT Đề tài hợp tác Quốc tế theo Nghị định thư Việt Nam-Hàn Quốc
 71. Nguyễn Mạnh Cường (2010), *Nghiên cứu phát hiện các hoạt chất từ các cây thuốc, bài thuốc Việt Nam tác dụng trên các phân tử đích có tác dụng chống các bệnh ung thư, AIDS, tim mạch và tiểu đường*, Báo cáo tổng kết Đề tài HTQT theo Nghị định thư Việt Nam-Hàn Quốc (2007-2010).
 72. Nguyen Hai Nam, Hwan-Mook Kim, Ki-Hwan Bae, Byung-Zun Ahn, Inhibitory effects of Vietnamese medicinal plants on tube-like formation of human umbilical venous cells, *Phytotherapy Research*, **2003**, 17(2):107-11. DOI: 10.1002/ptr.934
 73. Đỗ Thị Thảo, Trịnh Thị Thanh Vân, Nguyễn Quyết Chiến, Nguyễn Văn Hùng, Đỗ Khắc Hiếu, Nghiên cứu *in vitro* hoạt chất kháng ung thư của cây bán liên chi (*Scutellaria barbata* D. Don), *Tạp chí Dược học*, **2005**, 355, 10-13
 74. Phan Minh Giang, Phan Tong Son, Hamada Y., and Otsuka H., Cytotoxic diterpenoids from the Vietnamese medicinal plant *Croton tonkinensis* Gagnep. *Chem Pharm. Bull.*, **2005**, 53 (3), 296 – 300.
 75. Mai Lương Bích Ngọc, Lâm Thanh Phong và Nguyễn Ngọc Hạnh, Phân lập và xác định cấu trúc ba alcaloid trong rễ cây dừa cạn (*Catharanthus roseus* (G, Don) và khảo sát độc tính trên tế bào, *Tạp chí Dược học*, **2006**, 365, 10-13.
 76. Nguyễn Văn Đậu và Lê Duy Hiếu, Phân lập và khảo sát hoạt tính sinh học của các diterpen lacton từ lá xuyên tâm liên (*Andrographis paniculata* Needs), *Tạp chí Hóa học*, **2007**, 45 (1), 12-17.
 77. Ngo Ngoc Trung, Nguyen Thi Tho, Bui Thi Thuy Dung, Hoang Thi My Nhung, Nguyen Dinh Thang, Effects of ricin extracted from seeds of the castor bean (*Ricinus communis*) on cytotoxicity and tumorigenesis of melanoma cells, *Biomedical Research and Therapy*, **2016**, 3(5): 633-644.
 78. Hoang Le Tuan Anh, Phuong Thao Tran, Do Thi Thao, Duong Thu Trang, Nguyen Hai Dang, Pham Van Cuong, Phan Van Kiem, Chau Van Minh and Jeong-Hyung Lee, Degalactotigonin, a Steroidal Glycoside from *Solanum nigrum*, Induces Apoptosis and Cell Cycle Arrest via Inhibiting the EGFR Signaling Pathways in Pancreatic Cancer Cells, *BioMed Research International*, **2018**, Article ID 3120972, 1-9, doi.org/10.1155/2018/3120972

79. Vengadesh Letchumanan, Kok-Gan Chan and Learn-Han Lee, *Vibrio parahaemolyticus*: a review on the pathogenesis, prevalence, and advance molecular identification techniques, *Front Microbiol.*, **2014**, 5: 705
80. Y.W. Lam, H.X.Wang, T.B.Ng, A Robust Cysteine-Deficient Chitinase-like Antifungal Protein from Inner Shoots of the Edible Chive *Allium tuberosum*, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **2000**, 279, 74-80
81. Shawon Ahmmed, Md. Abdullah-Al-Kamran Khan, Md. Mostavi Enan Eshik, Nusrat Jahan Punom, Abul Bashar Mir Md. Khademul Islam and Mohammad Shamsur Rahman, Genomic and evolutionary features of two AHPND positive *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from shrimp (*Penaeus monodon*) of south-west Bangladesh, *BMC Microbiol.*, **2019**, 19 (270).
82. Daniels, N.A., Mackiman, L., Bishop, R., Altekruze, S., Ray, B., Hammo, nd R.M., Thompson, S., Wilson, S., Bean, N.H., Griffin, P .M. and Slutsker, L., *Vibrio parahaemolyticus* infections in the United States, *Journal of Infectious Diseases*, **2000**, 181, 1661-1666.
83. Zhihong Zheng, Jude Juventus Aweya, Fan Wang, Defu Yao, Jingsheng Lun, Shengkang Li, Hongyu Ma and Yueling Zhang, Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) related microRNAs in *Litopenaeus vannamei* infected with AHPND-causing strain of *Vibrio parahemolyticus*, *BMC Genomics*, **2018**, 19:335, 1-11.
84. Benedict A Maralit, Phattarunda Jaree, Pakpoom Boonchuen, Anchalee Tassanakajon, Kunlaya Somboonwiwat, Differentially expressed genes in hemocytes of *Litopenaeus vannamei* challenged with *Vibrio parahaemolyticus* AHPND (VP AHPND) and VP AHPND toxin, *Fish & Shellfish Immunology*, **2018**, 81, 284-296.
85. Trương Hồng Việt, Ajaree Nilawongse, Kallaya Sritunyalucksana, Timothy W. Flegel, Siripong Thitamadee. Nghiên cứu vi khuẩn không thuộc nhóm *Vibrio* có khả năng kết hợp với *Vibrio parahaemolyticus* gây bệnh hoại tử gan tụy cấp trên tôm thẻ chân trắng ở Thái Lan, *Tạp chí Nghề cá Sông Cửu long*, **2017**, 9, 26-42.
86. Tổng cục Thủy sản (2018), Báo cáo tổng kết năm 2018 của Phòng Thú y Thủy sản.
87. V. Sivaram, MM Babu, G Immanuel, S Murugadass, T Citarasu, MP Marian, Growth and immune response of juvenile greasy groupers (*Epinephelus tauvina*) fed with herbal antibacterial active principle supplemented diets against *Vibrio harveyi* infections, *Aquaculture*, **2004**, 237 (1-4), 9-20.
88. Nurul Alia Azizan, Noor Zarina Abd Wahab, Noor Ayunie Mohamad, Azlin Sham Shambely, Ahmad Syibli Othman, Antimicrobial activity of *Psidium guajava* leaves extract against foodborne pathogens, *International Journal of Psychosocial Rehabilitation*, **2020**, 24(7), 318-326.
89. K. Ramesh, M. Natarajan, H. Sridhar, M. Uma Vanitha and S. Umamaheswari, Anti-*Vibrio* Activity of Mangrove and Mangrove Associates on Shrimp Pathogen, *Vibrio harveyi* VSH5, *Global Veterinaria*, **2014**, 12 (2), 270-276.
90. Akinpelu A. David, Awotorebo T. Olaniyi, Agunbiade O. Mayowa, Aiyegoro A. Olayinka and Okoh I. Anthony, *Anti-Vibrio* and preliminary phytochemical characteristics of crude methanolic extracts of the leaves of

- Dialium guineense* (Wild), *Journal of Medicinal Plants Research*, **2011**, 5(11), 2398-2404.
91. Majid Aminzare, Mohammad Hashemi, Zahra Abbasi, Mehran Mohseni, Elham Amiri, Vibriosis phytotherapy: A review on the most important world medicinal plants effective on *Vibrio* spp., *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, **2018**, 8 (01), 170-177.
 92. Hứa Thị Toàn, Nguyễn Thị Thủy, Trương Đức Cường, Công nghệ sàng lọc ảo, docking protein và một số ứng dụng tiêu biểu, *Tạp chí Khoa Học & Công Nghệ*, **2017**, 169(09): 29 – 32).
 93. Newman, D.J.; Cragg, G.M.; Snader, K.M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *J. Nat. Prod.*, **2003**, 66(7), 1022-1037.
 94. Song, C. M.; Lim, S. J.; Tong, J. C. Recent advances in computeraided drug design. *Brief. Bioinform.*, **2009**, 10(5), 579-591.
 95. Globocan 2020, The Global Cancer Observatory- May, **2020**, 1-2.
 96. Engelman JA, Luo J, Cantley LC, The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism, *Nat Rev Genet*, **2006**, 7, 606–619.
 97. Utomo D.H., Widodo N., Rifa'i M., Identifications small molecules inhibitor of p53-mortalin complex for cancer drug using virtual screening, *Bioinformation*, **2012**, 8, 426–429
 98. Walid S., Kaouthar F., Ines Y., Faıçal B., Bridging Between Proline Structure, Functions, Metabolism, and Involvement in Organism Physiology, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **2015**, 176(8), 2107-2119.
 99. Jan Hudzicki, Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol, *American Society for Microbiology* © **2016**, 1-23.
 100. Tidaporn Chaweepack, Boonyee Muenthaisong, Surachart Chaweepack, Kaeko Kamei, The Potential of Galangal (*Alpinia galanga* Linn.) Extract against the Pathogens that Cause White Feces Syndrome and Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) in Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*), *International Journal of Biology*, **2015**, 7(3), 8-17.
 101. Newman, D.J.; Cragg, G.M.; Snader, K.M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *J. Nat. Prod.*, **2003**, 66(7), 1022-1037.
 102. APHA. Standard methods for the examination of water and wastewater, 21sted. Washington, DC, New York: American Public Health Association; **2005**.
 103. Walter G. Stephan, Intergroup Anxiety: Theory, Research, and Practice, *Personality and Social Psychology Review*, **2004**, 18(3), 1-17.
 104. Clifford Goodman, American Society for Testing and Materials, Medical Technology Assessment Directory: A Pilot Đối chứng to Organizations, Assessments, and Information Resources, National Academy Press Washington, D.C. **1988**.
 105. Mosmann T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods*, **1983**, 65, 55–63.
 106. Wadhwa R., Takano S., Robert M. et al. Inactivation of tumor suppressor p53 by mot-2, a hsp70 family member, *J. Biol. Chem.*, **1998**, 273, 29586–29591.

107. Butt, A. A., Aldridge, K. E., & Sanders, C. V., Infections related to the ingestion of seafood Part I: Viral and bacterial infections. *The Lancet Infectious Diseases*, **2004**, 4(4), 201-212.
108. Edgar E. Dickey, Liriodendrin, a New Lignan Diglucoside from the Inner Bark of Yellow Poplar (*Liriodendron tulipifera* L.), *J. Org. Chem.* **1958**, 23, 2, 179–184.
109. Kyeong Wan Woo, Ji Young Han, Sang Un Choi, Ki Hyun Kim, and Kang Ro Lee, Triterpenes from *Perilla frutescens* var. *acuta* and Their Cytotoxic Activity, *Natural Product Sciences*, **2014**, 20(2), 71-75.
110. Sai V, Chaturvedula P, & Prakash I. Isolation of Stigmasterol and β -Sitosterol from the dichloromethane extract of *Rubus suavissimus*, *International current pharmaceutical journal*, **2012**, 1(9), 239–242.
111. Tania Peshin¹ and H. K. Kar, Isolation and Characterization of β -Sitosterol-3-O- β -D-glucoside from the Extract of the Flowers of *Viola odorata*, *British Journal of Pharmaceutical Research*, **2017**, 16(4), 1-8.
112. Pham Thi Hong Minh, Pham Hoang Ngoc, Dang Ngoc Quang, Toshihiro Hashimoto, Shigeru Takaoka, Yoshinori Asakawa, A Novel ent-Kaurane Diterpenoid from the *Croton tonkinensis* GAGNEP, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **2003**, 51 (5), 590-591.
113. Phan Tong Son, Phan Minh Giang and Walter C. Taylor, An ent-Kaurane Diterpenoid from *Croton tonkinensis* Gagnep, *Aust. J. Chem.*, **2000**, 53, 1003–1005.
114. Monirul Islam, Md.Al-Amin, M. Mahboob Ali Siddiqi, Shakila Akter, Mohammad Majedul Haque, Nasim Sultana and A. M. Sarwaruddin Chowdhury, Isolation of Quercetin-3-O- β -D-glucopyranoside from the Leaves of *Azadirachta Indica* and Antimicrobial and Cytotoxic screening of the Crude Extracts, *Dhaka Univ. J. Sci.*, **2012**, 60(1), 11-14.
115. Sudha Srivastava, Girjesh Govil, Modifying effect of quercetin on model biomembranes: Studied by molecular dynamic simulation, DSC and NMR, *International Journal of Current Pharmaceutical Research*, 2012, 4 (1), 70-79.
116. Abdullahi Usman, Vera Thoss, Mohammed Nur-e-Alam, Isolation of (-) -Epicatchin from *Trichilia emetica* Whole Seeds, *American Journal of Organic Chemistry*, **2016**, 6(3), 81-85.
117. Trinh Thi Thuy, Nguyen Huy Cuong, Tran Van Sung, Triterpenes from *Celastrus hindsii* Benth, *Journal of Chemistry*, **2007**, 45 (3), 373 – 376
118. Zhuo-Han Chen, Hui Zhang, Shu-Hong Tao, Zhao Luo, Chu-Qian Zhong, Li-Bing Guo, Norlignans from *Pouzolzia zeylanica* var. *microphylla* and their nitric oxide inhibitory activity, *J Asian Nat Prod Res*, **2015**, 17(10), 959-66.
119. Aline Teixeira Maciel e Silva, Cássia Gonçalves Magalhães, Lucienir Pains Duarte, Wagner da Nova Mussel, Ana Lucia Tasca Gois Ruiz, Larissa Shiozawa, João Ernesto de Carvalho, Izabel Cristina Trindade, Sidney Augusto Vieira Filho, Lupeol and its esters: NMR, powder XRD data and in vitro evaluation of cancer cell growth, *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, **2017**, 53(3), 1-10:e00251.
120. Sang-Wook Kim, Sang-Shin Park , Tae-Jin Min, and Kook-Hyun Yu. Antioxidant activity of Ergosterol peroxide (5,8-epidioxy-5,8-ergosta-6,22-dien-3-ol) in *Armillariella mellea*, *Bull. Korean. Chem. Soc.*, **1999**, 20 (7), 819-823.

121. Yoshihisa Takaishi, Minoru Uda, Takaishi Ohashi, Kimiko Nakano, Koutarou Murakami and Toshiaki Tomimatsu, Glycosides of ergosterol derivatives from *Hericum erinacens*, *Phytochemistry*, **1991**, 30(12), 4117-20
122. Aline Teixeira Maciel e Silva, Cássia Gonçalves Magalhães, Lucienir Pains Duarte, Wagner da Nova Mussel, Ana Lucia Tasca Gois Ruiz, Larissa Shiozawa, João Ernesto de Carvalho, Izabel Cristina Trindade, Sidney Augusto Vieira Filho, Lupeol and its esters: NMR, powder XRD data and in vitro evaluation of cancer cell growth, *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, **2017**, 53(3), 1-10:e00251
123. Andrew T. McPhail, Donald R. McPhail, Mansukh C. Wani, Monroe E. Wall, and Allan W. Nicholas, Identity of Maprounic Acid with Aleuritolic Acid. Revision of the Structure of Maprounic Acid: X-ray Crystal Structure of p-Bromobenzyl Acetylmaprounate, *J. Nat. Prod.*, **1989**, 52(1), 212–216.
124. Rosmawati Abdul Aziz and Norizan Ahmat, Isolation of acetyl aleuritolic acid from *Pimeleodendron griffithianum* (Euphorbiaceae), *Malaysian Journal of Analytical Sciences*, **2016**, 20 (3), 573-577.
125. Vasakon B., Toxicity of ethyl acetate extract and ricinine from *Jatropha gossypifolia* senescent leaves against *Spodoptera exigua* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), *Journal of Pesticide Science*, **2011**, 36(2), 260-263.
126. Beatriz Pilar Fernández Díaz-Roperro, New functionalisation chemistry of 2- and 4-pyridones and related heterocycles, Doctoral Thesis of Loughborough University Institutional Repository (**2016**).
127. Wachira, S.W., Omar, S., Jacob, J.W., Wahome, M., Alborn, H.T., Spring, D.R., Masiga, D.K., Torto, B., Toxicity of six plant extracts and two pyridine alkaloids from *Ricinus communis* against the malaria vector *Anopheles gambiae*, *Parasites & Vectors*, **2014**, 7, 312-319.
128. Raman Puri, Tuck C. Wong, and Ravi K. Puri, ¹H- and ¹³C-Nmr Assignments and Structural Determination of a Novel Glycoalkaloid from *Solanum platanifolium*, *J. Nat. Prod.*, **1994**, 57(5), 587–596
129. Yong-Qing Xiao, Li Li, Xiao-Lin You, Bao-Lin Bian, Xin-Miao Liang, Yi-Tao Wang, A new Hợp chất from *Gastrodia elata* Blume, *Journal of Asian Natural Products Research*, **2002**, 4(1), 73-79.
130. Komarov P.G., Komarova E.A., Kondratov R.V. et al. A chemical inhibitor of p53 that protects mice from the side effects of cancer therapy, *Science*, **1999**, 285, 1733–1737.
131. Michael Timmers and Sylvia Urban, On –line (HPLC - NMR) and Off-line phytochemical Profiling of the Australian plant, *Lasipetalum macrophyllum*, *Natural Product Communications*, **2011**, 7(5), 551-560.
132. Jia, L., Bi, Y.F., Jing, L.L., Zhou, S.A., Kong, D.Y.), Three new flavonoid glycosides from *Urena lobata*, *J. Asian. Nat. Prod. Res.*, **2011**, 13(10), 7-14.
133. Yong-Qing Xiao, Li Li, Xiao-Lin You, Bao-Lin Bian, Xin-Miao Liang, Yi-Tao Wang, A new Hợp chất from *Gastrodia elata* Blume, *Journal of Asian Natural Products Research*, **2002**, 4(1), 73-79