

**BỘ GIÁO DỤC  
VÀ ĐÀO TẠO**

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC  
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

**HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ**



**VŨ MAI THẢO**

**NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN HÓA HỌC VÀ KHẢO SÁT HOẠT  
TÍNH SINH HỌC CỦA LOÀI BIẾN HOA SÔNG HỒNG (*Asystasia  
gangetica* (L.) T. Anderson)**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ NGÀNH HÓA HỌC**

*Hà Nội - 2023*

**VŨ MAI THẢO**

**HÓA HỮU CƠ**

**2023**

**BỘ GIÁO DỤC  
VÀ ĐÀO TẠO**

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC  
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

---

**HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ**



**Vũ Mai Thảo**

**NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN HÓA HỌC VÀ KHẢO SÁT HOẠT TÍNH  
SINH HỌC CỦA LOÀI BIẾN HOA SÔNG HỒNG (*Asystasia gangetica* (L.)  
T. Anderson)**

Chuyên ngành : Hóa hữu cơ

Mã số : 8 44 01 14

**LUẬN VĂN THẠC SĨ NGÀNH HÓA HỌC**

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC :

TS. Nguyễn Thị Minh Hằng

***Hà Nội – 2023***

## **LỜI CAM ĐOAN**

*Tôi xin cam đoan đề tài nghiên cứu trong luận văn này là công trình nghiên cứu của tôi dựa trên những tài liệu, số liệu do chính tôi tự tìm hiểu và nghiên cứu. Chính vì vậy, các kết quả nghiên cứu đảm bảo trung thực và khách quan nhất. Đồng thời, kết quả này chưa từng xuất hiện trong bất cứ một nghiên cứu nào. Các số liệu, kết quả nêu trong luận văn là trung thực nếu sai tôi hoàn chịu trách nhiệm trước pháp luật.*

**Hà Nội, ngày      tháng      năm 2023**

**Học viên**

**Vũ Mai Thảo**

## LỜI CẢM ƠN

*Luận văn được hoàn thành tại Viện Hóa sinh biển, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Để hoàn thành luận văn tốt nghiệp này, bên cạnh sự cố gắng nỗ lực của bản thân, tôi đã nhận được sự động viên và giúp đỡ rất lớn của nhiều cá nhân và tập thể.*

*Tôi xin chân thành cảm ơn đề tài thuộc Viện Hóa sinh biển mã số HSB22-CS04 đã hỗ trợ tôi thực hiện thành công luận văn này.*

*Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới TS. Nguyễn Thị Minh Hằng – Viện Hoá sinh biển, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã tận tình hướng dẫn, giúp đỡ tôi trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu. Tôi cũng xin gửi lời cảm ơn tới các đồng nghiệp thuộc Trung tâm Nghiên cứu và phát triển thuốc, Viện Hoá sinh biển đã tạo điều kiện, hướng dẫn và giúp đỡ tôi trong suốt thời gian làm luận văn.*

*Tôi xin chân thành cảm ơn Ban lãnh đạo và các thầy cô giáo tại Học viện Khoa học và Công nghệ đã giúp đỡ, tạo điều kiện và truyền đạt vốn kiến thức quý báu cho chúng tôi trong suốt thời gian tôi học tập và hoàn thành luận văn.*

*Tôi trân trọng và biết ơn sâu sắc tới gia đình, bạn bè đã động viên, luôn giúp đỡ tôi vượt qua mọi khó khăn để hoàn thành luận văn này.*

*Xin trân trọng cảm ơn!*

## MỤC LỤC

MỞ ĐẦU .....	1
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU .....	3
1.1. GIỚI THIỆU VỀ LOÀI BIẾN HOA SÔNG HẰNG ( <i>Asystasia gangetica</i> (L.) T. Anderason) .....	3
1.1.1. Đặc điểm thực vật .....	3
1.1.2. Bộ phận dùng, tính vị.....	4
1.1.2.1. Bộ phận dùng.....	4
1.1.2.2. Tính vị, quy kinh .....	4
1.1.3. Tác dụng dược lý.....	4
1.2. CÁC CÔNG TRÌNH NGHIÊN CỨU VỀ THÀNH PHẦN HÓA HỌC VÀ HOẠT TÍNH SINH HỌC CỦA LOÀI BIẾN HOA SÔNG HẰNG ( <i>Asystasia gangetica</i> (L.) T. Anderson) .....	4
1.2.1. Các công trình nghiên cứu trên thế giới .....	4
1.2.1.1. Các công trình nghiên cứu về thành phần hóa học.....	4
1.2.1.2. Các công trình nghiên cứu về hoạt tính sinh học.....	7
1.2.2. Tình hình nghiên cứu ở Việt Nam.....	11
CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU .....	12
2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU .....	12
2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU .....	12
2.2.1. Phương pháp nghiên cứu thành phần hóa học.....	12
2.2.2. Phương pháp đánh giá hoạt tính sinh học .....	13
2.2.2.1. Phương pháp đánh giá khả năng thu dọn gốc tự do DPPH[17].....	13
2.2.2.2. Phương pháp nghiên cứu hoạt tính ức chế enzyme $\alpha$ - glucosidase[18]..	13
2.2.2.3. Phương pháp thử hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định[19].....	14
2.3. HÓA CHẤT – THIẾT BỊ .....	15
2.3.1. Hóa chất.....	15
2.3.2. Dụng cụ - Thiết bị .....	15
CHƯƠNG 3. THỰC NGHIỆM .....	17
3.1. ĐIỀU CHẾ CÁC CAO CHIẾT .....	17
3.2. SÀNG LỌC HOẠT TÍNH SINH HỌC.....	18

3.2.1. Hoạt tính chống oxy hóa.....	18
3.2.2. Hoạt tính ức chế $\alpha$ -glucosidase.....	19
3.2.3. Hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định.....	19
<b>3.3. PHÂN LẬP CÁC HỢP CHẤT.....</b>	<b>21</b>
<b>CHƯƠNG 4. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....</b>	<b>23</b>
<b>4.1. KẾT QUẢ.....</b>	<b>23</b>
4.1.2. Danh sách các hợp chất phân lập được từ loài <i>A. gangetica</i> .....	24
4.1.3. Hằng số vật lý của các hợp chất phân lập được .....	24
4.1.3.1. Hợp chất AGE1: 3 $\alpha$ ,24-dihydroxy-olean-12-en-28-oic acid.....	24
4.1.3.2. Hợp chất AGE2: Ursolic acid .....	25
4.1.3.3. Hợp chất AGE3: Pomolic acid.....	25
4.1.3.4. Hợp chất AGE4: Verbascoside .....	25
4.1.3.5. Hợp chất AGE5: Indol-3-carboxylic acid.....	25
4.1.3.6. Hợp chất AGE6: Lutein .....	25
<b>4.2. THẢO LUẬN .....</b>	<b>26</b>
4.2.1. Xác định cấu trúc các hợp chất được phân lập từ loài <i>A. gangetica</i> ....	26
4.2.1.1. Hợp chất AGE1: 3 $\alpha$ ,24-dihydroxy-olean-12-en-28-oic acid.....	26
4.2.1.2. Hợp chất AGE2: Ursolic acid .....	31
4.2.1.3. Hợp chất AGE3: Pomolic acid.....	35
4.2.1.4. Hợp chất AGE4: Verbascoside .....	40
4.2.1.5. Hợp chất AGE5: Indol-3-carboxylic acid.....	45
4.2.1.6. Hợp chất AGE6: Lutein .....	47
4.2.2. Hoạt tính sinh học của các hợp chất phân lập được .....	53
<b>CHƯƠNG 5. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....</b>	<b>54</b>
<b>5.1. KẾT LUẬN .....</b>	<b>54</b>
<b>5.2. KIẾN NGHỊ.....</b>	<b>54</b>
<b>TÀI LIỆU THAM KHẢO .....</b>	<b>55</b>
<b>PHỤ LỤC PHỔ .....</b>	<b>58</b>
<b>1. PHỤ LỤC PHỔ CỦA HỢP CHẤT AGE1 .....</b>	<b>58</b>
<b>2. PHỤ LỤC PHỔ CỦA HỢP CHẤT AGE2 .....</b>	<b>63</b>
<b>3. PHỤ LỤC PHỔ CỦA HỢP CHẤT AGE3 .....</b>	<b>68</b>
<b>4. PHỤ LỤC PHỔ CỦA HỢP CHẤT AGE4 .....</b>	<b>74</b>

<b>5. PHỤ LỤC PHỔ CỦA HỢP CHẤT AGE5 .....</b>	<b>76</b>
<b>6. PHỤ LỤC PHỔ CỦA HỢP CHẤT AGE6 .....</b>	<b>77</b>

## DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU VÀ CHỮ VIẾT TẮT

<b>Ký hiệu</b>	<b>Tiếng Anh</b>	<b>Diễn giải</b>
NMR	Nuclear Magnetic Resonance	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân
<sup>13</sup> C-NMR	Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân cacbon 13
<sup>1</sup> H-NMR	Proton Nuclear Magnetic Resonance	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân proton
COSY	Correlation Spectroscopy	Phổ COSY
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer	Phổ DEPT
HSQC	Heteronuclear Single-Quantum Coherence	Phổ tương tác dị hạt nhân qua 1 liên kết
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Connectivity	Phổ tương tác dị hạt nhân qua nhiều liên kết
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy	Phổ NOESY
CC	Column chromatography	Sắc ký cột
DMSO	Dimethylsulfoxide	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> SO
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
IC <sub>50</sub>	Inhibitory concentration at 50%	Nồng độ ức chế 50% đối tượng thử nghiệm
MIC	Minimum inhibitory concentration	Nồng độ ức chế tối thiểu
MS	Mass Spectroscopy	Phổ khối lượng
MTT	(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazol brom)	(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazol brom)
TLC	Thin Layer Chromatography	Sắc ký bản lớp mỏng
ppm	Part per million	Phần triệu



## DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 3.1. Hoạt tính chống oxy hóa của các cao chiết thông qua phương pháp DPPH .....	18
Bảng 3.2. Hoạt tính ức chế enzyme $\alpha$ -glucosidase của các cao chiết.....	19
Bảng 3.3. Hoạt tính kháng vi sinh vật kiềm định của các cao chiết .....	20
Bảng 4.1. Số liệu phổ NMR của hợp chất <b>AGE1</b> và hợp chất tham khảo .....	27
Bảng 4.2. Số liệu phổ NMR của hợp chất <b>AGE2</b> và hợp chất tham khảo .....	31
Bảng 4.3. Số liệu phổ NMR của hợp chất <b>AGE3</b> và hợp chất tham khảo .....	36
Bảng 4.4. Số liệu phổ NMR của hợp chất <b>AGE4</b> và hợp chất tham khảo .....	41
Bảng 4.5. Số liệu phổ NMR của hợp chất <b>AGE5</b> và hợp chất tham khảo .....	45
Bảng 4.6. Số liệu phổ NMR của hợp chất <b>AGE6</b> và hợp chất tham khảo .....	48

## DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ

Hình 1.1. Cây Biển hoa sông hằng ( <i>Asystasia gangetica</i> (L.) T. Anderson).....	3
Hình 3.1. Loài Biển hoa sông hằng được thu hái ở Hà Nội. ....	17
Hình 3.2. Sơ đồ điều chế các cao chiết từ loài Biển hoa sông hằng.....	18
Hình 3.3. Sơ đồ quá trình phân lập hợp chất từ cao chiết ethyl acetate.....	22
Hình 4.1. Cấu trúc hóa học của các hợp chất phân lập từ cao chiết ethyl acetate của loài Biển hoa sông hằng.....	24
Hình 4.2. Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC chính của hợp chất <b>AGE1</b> .	26
Hình 4.3. Phổ <sup>1</sup> H-NMR của hợp chất <b>AGE1</b> .....	28
Hình 4.4. Phổ <sup>13</sup> C-NMR của hợp chất <b>AGE1</b> .....	29
Hình 4.5. Phổ HSQC của hợp chất <b>AGE1</b> .....	29
Hình 4.6. Phổ HMBC của hợp chất <b>AGE1</b> .....	30
Hình 4.7. Phổ HR-ESI-MS của hợp chất <b>AGE1</b> .....	30
Hình 4.8. Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC chính của hợp chất <b>AGE2</b> .	31
Hình 4.9. Phổ <sup>1</sup> H-NMR của hợp chất <b>AGE2</b> .....	33
Hình 4.10. Phổ <sup>13</sup> C-NMR của hợp chất <b>AGE2</b> .....	34
Hình 4.11. Phổ HSQC của hợp chất <b>AGE2</b> .....	34
Hình 4.12. Phổ HMBC của hợp chất <b>AGE2</b> .....	35
Hình 4.13. Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC chính của hợp chất <b>AGE3</b> .....	35
Hình 4.14. Phổ <sup>1</sup> H-NMR của hợp chất <b>AGE3</b> .....	38
Hình 4.15. Phổ <sup>13</sup> C-NMR của hợp chất <b>AGE3</b> .....	38
Hình 4.16. Phổ HSQC của hợp chất <b>AGE3</b> .....	39
Hình 4.17. Phổ HMBC của hợp chất <b>AGE3</b> .....	39
Hình 4.18. Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC chính của hợp chất <b>AGE4</b> .....	40
Hình 4.19. Phổ <sup>1</sup> H-NMR của hợp chất <b>AGE4</b> .....	43
Hình 4.20. Phổ <sup>13</sup> C-NMR của hợp chất <b>AGE4</b> .....	43
Hình 4.21. Phổ HSQC của hợp chất <b>AGE4</b> .....	44
Hình 4.22. Phổ HMBC của hợp chất <b>AGE4</b> .....	44
Hình 4.23. Cấu trúc hóa học của hợp chất <b>AGE5</b> .....	45
Hình 4.24. Phổ <sup>1</sup> H-NMR của hợp chất <b>AGE5</b> .....	46
Hình 4.25. Phổ <sup>13</sup> C-NMR của hợp chất <b>AGE5</b> .....	46

Hình 4.26. Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC chính của hợp chất <b>AGE6</b>	47
Hình 4.27. Phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất <b>AGE6</b>	50
Hình 4.28. Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ của hợp chất <b>AGE6</b>	50
Hình 4.29. Phổ DEPT của hợp chất <b>AGE6</b>	51
Hình 4.30. Phổ HSQC của hợp chất <b>AGE6</b>	51
Hình 4.31. Phổ HMBC của hợp chất <b>AGE6</b>	52
Hình 4.32. Phổ COSY của hợp chất <b>AGE6</b>	52
Phụ lục 1.1. Phổ $^1\text{H-NMR}$ giãn của hợp chất <b>AGE1</b>	58
Phụ lục 1.2. Phổ $^1\text{H-NMR}$ giãn của hợp chất <b>AGE1</b>	58
Phụ lục 1.3. Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ giãn của hợp chất <b>AGE1</b>	59
Phụ lục 1.4. Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ giãn của hợp chất <b>AGE1</b>	59
Phụ lục 1.5. Phổ HSQC giãn của hợp chất <b>AGE1</b>	60
Phụ lục 1.6. Phổ HSQC giãn của hợp chất <b>AGE1</b>	60
Phụ lục 1.7. Phổ HMBC giãn của hợp chất <b>AGE1</b>	61
Phụ lục 1.8. Phổ HMBC giãn của hợp chất <b>AGE1</b>	61
Phụ lục 1.9. Phổ HMBC giãn của hợp chất <b>AGE1</b>	62
Phụ lục 1.10. Phổ HMBC giãn của hợp chất <b>AGE1</b>	62
Phụ lục 2.1. Phổ $^1\text{H-NMR}$ giãn của hợp chất <b>AGE2</b>	63
Phụ lục 2.2. Phổ $^1\text{H-NMR}$ giãn của hợp chất <b>AGE2</b>	63
Phụ lục 2.3. Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ giãn của hợp chất <b>AGE2</b>	64
Phụ lục 2.4. Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ giãn của hợp chất <b>AGE2</b>	64
Phụ lục 2.5. Phổ DEPT giãn của hợp chất <b>AGE2</b>	65
Phụ lục 2.6. Phổ DEPT giãn của hợp chất <b>AGE2</b>	65
Phụ lục 2.7. Phổ HSQC giãn của hợp chất <b>AGE2</b>	66
Phụ lục 2.8. Phổ HMBC giãn của hợp chất <b>AGE2</b>	66
Phụ lục 2.9. Phổ HMBC giãn của hợp chất <b>AGE2</b>	67
Phụ lục 2.10. Phổ HMBC giãn của hợp chất <b>AGE2</b>	67
Phụ lục 2.11. Phổ HMBC giãn của hợp chất <b>AGE2</b>	68
Phụ lục 3.1. Phổ $^1\text{H-NMR}$ giãn của hợp chất <b>AGE3</b>	68
Phụ lục 3.2. Phổ $^1\text{H-NMR}$ giãn của hợp chất <b>AGE3</b>	69
Phụ lục 3.3. Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ giãn của hợp chất <b>AGE3</b>	69
Phụ lục 3.4. Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ giãn của hợp chất <b>AGE3</b>	70

Phụ lục 3.5. Phổ DEPT giãn của hợp chất <b>AGE3</b> .....	70
Phụ lục 3.6. Phổ HSQC giãn của hợp chất <b>AGE3</b> .....	71
Phụ lục 3.7. Phổ HSQC giãn của hợp chất <b>AGE3</b> .....	71
Phụ lục 3.8. Phổ HMBC giãn của hợp chất <b>AGE3</b> .....	72
Phụ lục 3.9. Phổ HMBC giãn của hợp chất <b>AGE3</b> .....	72
Phụ lục 3.10. Phổ HMBC giãn của hợp chất <b>AGE3</b> .....	73
Phụ lục 3.11. Phổ HMBC giãn của hợp chất <b>AGE3</b> .....	73
Phụ lục 4.1. Phổ <sup>1</sup> H-NMR giãn của hợp chất <b>AGE4</b> .....	74
Phụ lục 4.2. Phổ <sup>1</sup> H-NMR giãn của hợp chất <b>AGE4</b> .....	74
Phụ lục 4.3. Phổ <sup>13</sup> C-NMR giãn của hợp chất <b>AGE4</b> .....	75
Phụ lục 4.4. Phổ <sup>13</sup> C-NMR giãn của hợp chất <b>AGE4</b> .....	75
Phụ lục 5.1. Phổ <sup>1</sup> H-NMR giãn của hợp chất <b>AGE5</b> .....	76
Phụ lục 5.2. Phổ <sup>13</sup> C-NMR giãn của hợp chất <b>AGE5</b> .....	76
Phụ lục 6.1. Phổ <sup>1</sup> H-NMR giãn của hợp chất <b>AGE6</b> .....	77
Phụ lục 6.2. Phổ <sup>1</sup> H-NMR giãn của hợp chất <b>AGE6</b> .....	77
Phụ lục 6.3. Phổ <sup>13</sup> C-NMR giãn của hợp chất <b>AGE6</b> .....	78
Phụ lục 6.4. Phổ <sup>13</sup> C-NMR giãn của hợp chất <b>AGE6</b> .....	78
Phụ lục 6.5. Phổ DEPT giãn của hợp chất <b>AGE6</b> .....	79
Phụ lục 6.6. Phổ DEPT giãn của hợp chất <b>AGE6</b> .....	79
Phụ lục 6.7. Phổ HSQC giãn của hợp chất <b>AGE6</b> .....	80
Phụ lục 6.8. Phổ HSQC giãn của hợp chất <b>AGE6</b> .....	80
Phụ lục 6.9. Phổ HSQC giãn của hợp chất <b>AGE6</b> .....	81
Phụ lục 6.10. Phổ HMBC giãn của hợp chất <b>AGE6</b> .....	81
Phụ lục 6.11. Phổ HMBC giãn của hợp chất <b>AGE6</b> .....	82
Phụ lục 6.12. Phổ HMBC giãn của hợp chất <b>AGE6</b> .....	82
Phụ lục 6.13. Phổ HMBC giãn của hợp chất <b>AGE6</b> .....	83
Phụ lục 6.14. Phổ COSY giãn của hợp chất <b>AGE6</b> .....	83
Phụ lục 6.15. Phổ COSY giãn của hợp chất <b>AGE6</b> .....	84
Phụ lục 6.16. Phổ COSY giãn của hợp chất <b>AGE6</b> .....	84

## MỞ ĐẦU

Thời xa xưa, cây thuốc giữ vai trò trọng yếu trong việc duy trì sức khỏe của loài người. Ngày nay, con người vẫn tiếp tục dựa vào dược tính của các loại thảo mộc để bào chế các loại thuốc. Một số lượng lớn loài thực vật trên thế giới được dùng để phòng ngừa và chữa trị bệnh tật do chúng có chứa các thành phần hoạt chất có tác dụng sinh học đối với cơ thể con người. Các loài thực vật này thường được sử dụng dưới dạng các bài thuốc đông y với nhiều công dụng mà thuốc Tây y không có được.

Thành phần hóa học của các loài thực vật thường rất đa dạng và có mối quan hệ tương tác phức tạp với nhau. Cách thức tác động của một loại thảo dược nào đó trong cơ thể con người vẫn còn chưa được làm sáng tỏ ngay cả khi chúng ta biết rõ về tác dụng chữa bệnh của nó.

Chính vì vậy, việc đi sâu nghiên cứu thành phần hóa học để hiểu rõ nguồn gốc hoạt tính của các loại thảo mộc chữa bệnh có vai trò rất quan trọng trong việc bào chế ra các loại thuốc đạt hiệu quả tốt nhất. Sự hiểu biết về những thành phần hóa học của các loài thực vật sẽ là cơ sở cho chúng ta hiểu được cơ chế hoạt động của chúng bên trong cơ thể con người.

Ở Việt Nam, việc sử dụng các loài thực vật trong tự nhiên để phòng và điều trị bệnh tật đã tạo nên ngành y học cổ truyền dân tộc gọi là Đông y. Tuy nhiên, sự kết hợp giữa các vị thuốc này trong Đông y chủ yếu dựa trên các kinh nghiệm dân gian. Việt Nam là một trong những nước có một hệ thực vật đa dạng và phong phú. Đây là nguồn tài nguyên thiên nhiên quý báu của đất nước có tác dụng lớn đối với sức khỏe của con người đồng thời mở ra tiềm năng trong nghiên cứu về các hợp chất thiên nhiên có nguồn gốc từ thực vật của Việt Nam. Cho đến nay, còn rất nhiều loài thực vật của Việt Nam vẫn chưa được nghiên cứu hoặc được nghiên cứu chưa đầy đủ về thành phần hóa học và hoạt tính sinh học. Cây Biền hoa sông hằng - *Asystasia gangetica* (L.) T. Anderson là một trong những loài cây như vậy.

Cây Biền hoa sông hằng được trồng làm rau ăn với tên gọi “Rau ngót Nhật”. Những năm gần đây, cùng với phong trào “Hãy để thức ăn là thuốc, đừng biến thuốc thành thức ăn”, cây Rau ngót nhật đã được sử dụng nhiều ở Hà Nội và một số tỉnh, thành phố khác. Trong đông y, cây Biền hoa sông hằng được đánh giá có nhiều tác dụng như thanh nhiệt, giải độc, lợi tiểu, cầm huyết, nhuận tràng,... Tuy có

nhiều công dụng và khá phổ biến nhưng cho đến nay, ở Việt Nam, các nghiên cứu về thành phần hóa học và tác dụng dược lý của loài cây này vẫn còn rất hạn chế.

Từ những lý do đó, chúng tôi đã lựa chọn đề tài “**Nghiên cứu thành phần hóa học và khảo sát hoạt tính sinh học của loài Biền hoa sông hằng (*Asystasia gangetica* (L.) T. Anderson)**”. Nghiên cứu này sẽ góp phần làm rõ một số thành phần hóa học có trong loài Biền hoa sông hằng (*A. gangetica*) và đánh giá một số hoạt tính sinh học của loài cây này, từ đó có định hướng cho việc trồng và sử dụng loài cây này có hiệu quả hơn.

Mục tiêu của đề tài bao gồm:

- Phân lập và xác định cấu trúc hóa học của một số hợp chất từ loài Biền hoa sông hằng (*A. gangetica*);
- Khảo sát được một số hoạt tính sinh học của các cao chiết phân đoạn từ phân trên mặt đất loài Biền hoa sông hằng.

## Chương 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

### 1.1. GIỚI THIỆU VỀ LOÀI BIẾN HOA SÔNG HẰNG (*Asystasia gangetica* (L.) T. Anderason)

Bộ: Lamiales

Họ: Acanthaceae

Chi: *Asystasia*

#### 1.1.1. Đặc điểm thực vật

Cây thảo, cao 0.5 m; thân 4 cạnh, có lông tơ dày. Lá hình trứng đến hình bầu dục, nhẵn hoặc có lông tơ dày đặc biệt dọc gân, mặt trên lá nhiều nang thạch nổi rõ; cuống lá dài 3-5 mm, có lông tơ thưa. Cụm hoa hình chùm ở nách lá hoặc đầu cành, dài đến 15 cm; lá bắc hình tam giác, cỡ 5 mm, có lông tơ dày. Cuống hoa dài 2-3 mm, lông tơ dày. Đài dài 7 mm; thùy đài hình đường-hình mác, cỡ 5-6 x 1 mm. Tròng hoa hình chuông, cỡ 3-3.5 cm, màu vàng, trắng hoặc tím nhạt, mặt ngoài có lông tuyến, mặt trong nhẵn; gốc ống tràng hình trụ, dài cỡ 3 mm, rộng 8 mm sau đó mở rộng ra; miệng tràng 5 thùy; thùy tràng hình trứng ngược hoặc hình bán nguyệt; thùy giữa môi dưới có đốm tím hoặc đốm khác màu. Nhị không thò ra khỏi ống tràng; chỉ nhị nhẵn, cặp nhị dài cỡ 5 mm, cặp nhị ngắn hơn cỡ 3 mm. Bầu hình bầu dục, cỡ 3.5 mm; vòi nhụy dài 1.8 cm, có lông tơ dày; núm nhụy hình đầu, 2 thùy. Quả nang, dài cỡ 2 cm, hình chùy, lông tơ thưa. Hạt gần như hình trứng ngược hoặc tròn, cỡ 3-4 x 1-3 mm, bề mặt mạng lưới[1, 2].



Hình 1.1. Cây Biến hoa sông hằng (*Asystasia gangetica* (L.) T. Anderson)

*Phân bố:* Hà Nội (Ba Vì), Hòa Bình, Ninh Bình, Nghệ An (Vinh), Thừa Thiên – Huế, Kon Tum, Khánh Hòa (Nha Trang), Đồng Nai (Biên Hòa), Long An. Còn

có ở Trung Quốc (Vân Nam), Ấn Độ, Lào, Thái Lan, Philippines, Malaysia, Indonesia, Australia và Châu Phi. Cây trồng nhiều ở Việt Nam; có thể có nhiều màu sắc khác nhau từ trắng, vàng nhạt đến tím.

*Sinh thái:* Mùa hoa tháng 9 đến tháng 1 năm sau, có quả tháng 11 đến tháng 3 năm sau. Cây ưa sáng mọc ven đường, bờ rào.

### **1.1.2. Bộ phận dùng, tính vị**

#### **1.1.2.1. Bộ phận dùng**

Toàn bộ phần trên mặt đất.

#### **1.1.2.2. Tính vị, quy kinh**

Có tác dụng trừ giun, tiêu sưng, trừ thấp.

### **1.1.3. Tác dụng dược lý**

Ở Ấn Độ, dịch lá được dùng làm thuốc trừ giun và dùng xoa để trị sưng viêm và đau thấp khớp. Ở Vân Nam (Trung Quốc), toàn cây dùng trị đòn ngã tổn thương và gãy xương. Trong đông y, cây Biển hoa sông hằng được đánh giá có tác dụng thanh nhiệt, giải độc, hoạt huyết hoá ứ, lợi tiểu ...

## **1.2. CÁC CÔNG TRÌNH NGHIÊN CỨU VỀ THÀNH PHẦN HÓA HỌC VÀ HOẠT TÍNH SINH HỌC CỦA LOÀI BIỂN HOA SÔNG HẰNG (*Asystasia gangetica* (L.) T. Anderson)**

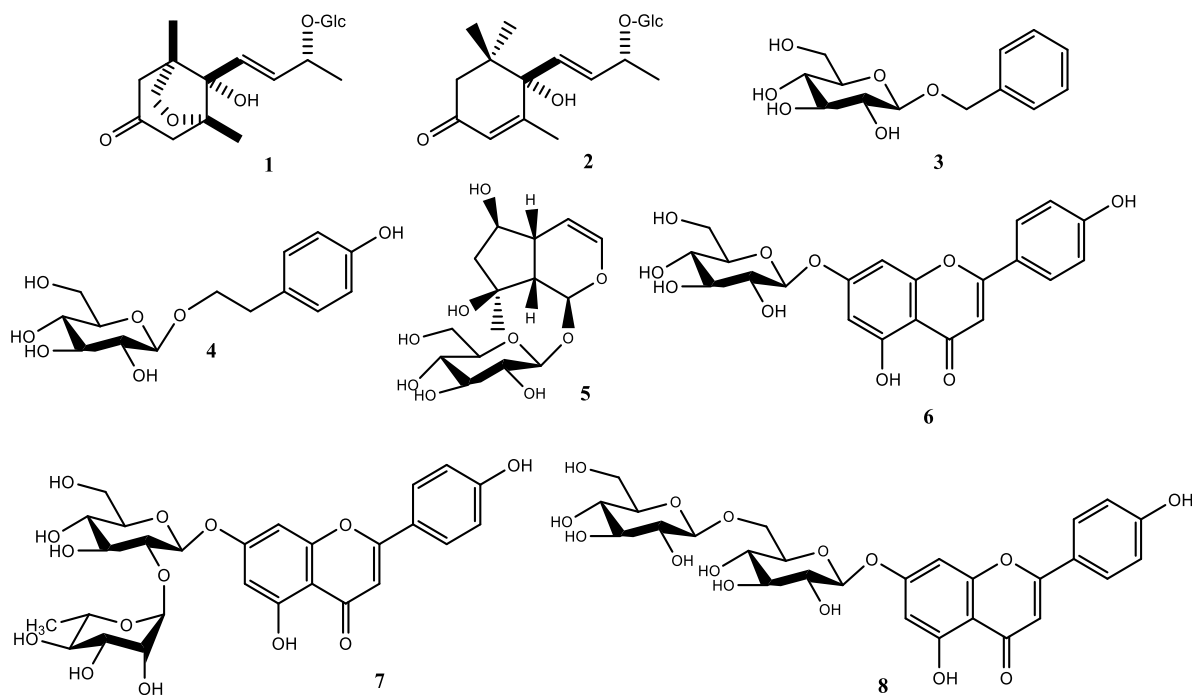
### **1.2.1. Các công trình nghiên cứu trên thế giới**

#### **1.2.1.1. Các công trình nghiên cứu về thành phần hóa học**

Cây Biển hoa sông hằng (*A. gangetica*) còn chưa được nghiên cứu nhiều về thành phần hóa học cả trên thế giới và ở Việt Nam. Các nghiên cứu trước đây cho biết cây *A. gangetica* đa dạng về thành phần hóa học.

Năm 2007, Kanchanapoom và Ruchirawat đã phân lập từ phần trên mặt đất của cây *A. gangetica* tám hợp chất bao gồm 5,11-epoxymegastigmane glucoside (asysgangoside) (**1**), (6*S*,9*R*)-roseoside (**2**), benzyl  $\beta$ -D-glucopyranoside (**3**), salidroside (**4**), ajugol (**5**), apigenin 7-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside (**6**), apigenin 7-*O*-neohesperidoside (**7**), và apigenin 7-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl (1 $\rightarrow$ 6)-  $\beta$ -D-glucopyranoside (**8**)[3].



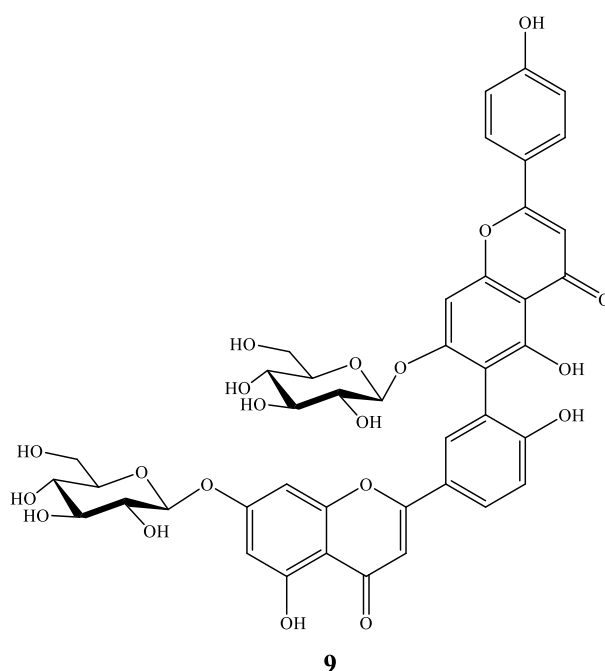


Năm 2011, tinh dầu từ các bộ phận trên mặt đất, hạt và rễ của cây *A. gangetica* đã được Moronkola và cộng sự phân tích bằng phương pháp sắc ký khí và sắc ký khí kết hợp với khối phổ. Năm mươi tư hợp chất đã được phân lập trong tinh dầu từ phần trên mặt đất, 21 hợp chất trong tinh dầu hạt và 15 hợp chất trong tinh dầu rễ, tương ứng với 96,80%, 65,11% và 78,50% lượng dầu trong mỗi loại. Tinh dầu từ phần trên mặt đất chiếm ưu thế bởi phthalate (39,00%), cycloalkane (28,23%) và hợp chất thơm (17,14%), trong đó các hợp chất chiếm ưu thế là toluene (9,12%), methylcyclohexane (9,02%) và bisisodecylphthalate (6,05%). Các thành phần khác là alkane phân nhánh (6,13%) và alkane mạch thẳng (3,24%), ester (1,71%), alcohol (0,72%), acid (0,36%), hợp chất dị vòng (0,27%), ketone (0,18%) và terpenoid (0,09%). Trong tinh dầu hạt, nhóm có hàm lượng lớn nhất là phthalate (24,67%), alcohol (16,28%) và alkane mạch thẳng (8,56%), với dinonylphthalate (9,40%), 1-octenol (8,05%) và methylcyclohexane (6,04%) là các thành phần quan trọng nhất. Ngoài ra, nó còn chứa xycloalkane (6,04%), hợp chất thơm (5,03%), terpenoid (4,03%), ester (3,02%), acid (1,01%), amide (1,01%) và alkane phân nhánh (0,50%). Trong tinh dầu rễ có alcohol (27,32%), alkane mạch thẳng (23,61%) và aldehyde (15,91%) là đáng chú ý nhất, trong đó các hợp chất chiếm ưu thế là abietal (11,67%), *n*-tetracosan (10,08%) và palustrol (9,02%). Nó cũng có chứa phthalate (5,83%), hợp chất thơm (5,83%) và xycloalkane (4,24%). Các dẫn xuất của phthalate đều có mặt trong cả ba loại tinh dầu. Không có aldehyde trong

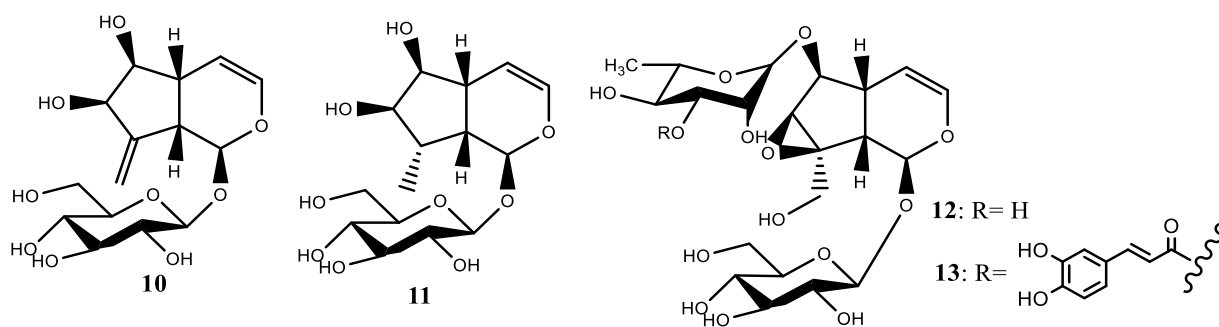
tinh dầu từ phần trên mặt đất; không có ketone và aldehyde trong tinh dầu hạt; không có terpenoid, ester, ketone, acid và các hợp chất dị vòng trong tinh dầu rễ. Đáng chú ý là lượng thấp terpenoid phổ biến trong tinh dầu hạt và phần trên mặt đất nhưng không có trong tinh dầu rễ. Hợp chất không no và ether không có trong thành phần các tinh dầu[4].

Cũng năm 2011, Hamid và cộng sự đã sàng lọc sơ bộ hóa thực vật của dịch chiết *n*-hexane, ethyl acetate và methanol từ toàn bộ cây *A. gangetica*. Kết quả cho thấy, dịch chiết *n*-hexane có chứa đường khử, steroid, glycoside, flavonoid và anthraquinon, trong khi saponin, tannin và alkaloid không có trong dịch chiết này. Dịch chiết ethyl acetate và methanol có saponin, đường khử, steroid, glycoside, flavonoid và anthraquinon, trong khi tannin và alkaloid không có trong cả hai dịch chiết[5].

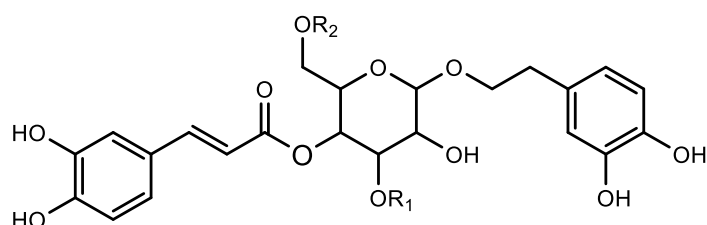
Cũng trong năm 2011, Senthamilselvi và cộng sự đã xác định được sự có mặt một hợp chất biflavone glycoside chưa từng được phân lập trước đó là apigenin 7-*O*-glucosyl(3'→6'')luteolin 7''-*O*-glucoside (**9**) từ cao chiết ethyl acetate của hoa *A. gangetica*[6].



Năm 2012, Worawittayanon và cộng sự đã phân lập được 5 hợp chất iridoid từ cao chiết methanol của phần trên mặt đất cây *A. gangetica* subsp. *micrantha* là 6 $\beta$ -hydroxyantirrhoid (**10**), angeloside (**11**), ajugol (**5**), 6-*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-catapol (**12**) và 6-*O*- $\alpha$ -(3''-*O*-*trans*-caffeoyl)-L-rhamnopyranosyl-catapol (**13**)[7].

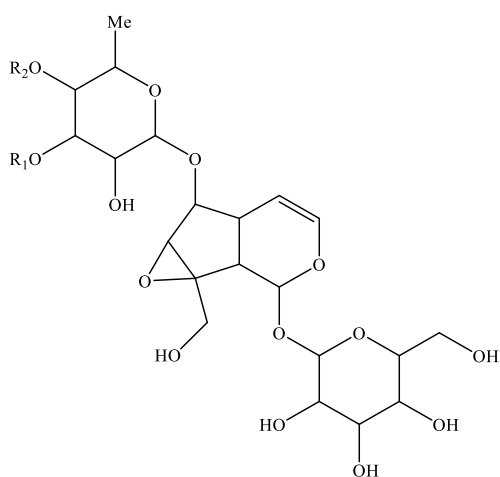


Năm 2020, 5 hợp chất là salidroside (**4**), verbascoside (**14**), forsythiaside (**15**), 3''-*O*-caffeoyl-6-*O*-rhamnopyranosyl catalpol (**16**), và 4''-*O*-caffeoyl-6-*O*-rhamnopyranosyl catalpol (**17**) đã được chứng minh có nguồn gốc từ dịch chiết methanol của lá *A. gangetica*[8].



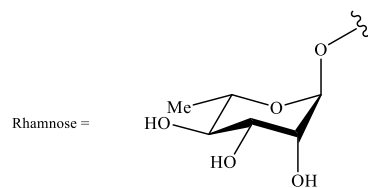
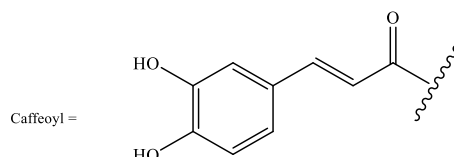
**14:** R<sub>1</sub>=Rhamnose, R<sub>2</sub> = H

**15:** R<sub>1</sub> = H, R<sub>2</sub>=Rhamnose



**16:** R<sub>1</sub>=Caffeoyl, R<sub>2</sub> = H

**17:** R<sub>1</sub> = H, R<sub>2</sub>=Caffeoyl



### 1.2.1.2. Các công trình nghiên cứu về hoạt tính sinh học

Các công trình nghiên cứu trên thế giới chỉ ra rằng loài Biển hoa sông hằng (*A. gangetica*) có nhiều hoạt tính sinh học như kháng khuẩn, kháng nấm, hạ huyết áp,

chống hen suyễn, giảm đau, kháng viêm, ức chế enzyme tyrosinase, chống ôxi hóa, chống tiểu đường.

**Hoạt tính kháng khuẩn và kháng nấm:** Năm 2011, các dịch chiết *n*-hexane, ethyl acetate và methanol từ toàn bộ cây *A. gangetica* đã được đánh giá hoạt tính kháng khuẩn và kháng nấm trên 4 chủng vi khuẩn Gram (-) *Salmonella typhi* (UCH4801), *Escherichia coli* (UCH 00260), *Pseudomonas aeruginosa* (UCH 1102) và *Klebsiella pneumoniae* (UCH 2894) và 2 chủng vi khuẩn Gram (+) *Bacillus subtilis* (UCH 74230) và *Staphylococcus aureus* (UCH 2473); và 6 chủng nấm *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus stolon*, *Penicillium notatum*, *Tricophyton rubrum* và *Epidermophyton floccosum*. Cả ba dịch chiết đều ức chế sự phát triển của 6 chủng vi sinh vật ở các mức độ khác nhau. Dịch chiết MeOH ở nồng độ 25 đến 200 mg/ml đều có hoạt tính ức chế tất cả các chủng vi khuẩn. Dịch *n*-hexane và ethyl acetate thể hiện hoạt tính ở nồng độ cao hơn 100 và 200 mg/ml. Tất cả các dịch chiết không ức chế sự phát triển của các vi khuẩn này ở nồng độ thấp 6,25 và 12,5 mg/ml, ngoại trừ dịch *n*-hexane và ethyl acetate ức chế yếu đối với chủng *P. aeruginosa* ở nồng độ 12,5 mg/ml. Như vậy, hoạt tính kháng khuẩn của dịch chiết *n*-hexane, ethyl acetate và methanol phụ thuộc vào nồng độ, hoạt tính tốt khi nồng độ dịch chiết lớn. Các dịch chiết này thể hiện hoạt tính kháng nấm cao hơn so với đối chứng tioconazole đối với hai chủng nấm *T. rubrum* và *E. floccosum* và ức chế sự phát triển của 4 chủng nấm *C. albicans*, *A. niger*, *R. stolon* và *P. notatum* ở nồng độ 50-200 mg/ml nhưng không có hoạt tính đối với cả 6 chủng nấm ở nồng độ thấp hơn 6,25 và 12,5 mg/ml[5].

**Tác dụng hạ huyết áp:** Năm 2013, Mugabo và cộng sự đã nghiên cứu tác dụng *in vivo* của dịch chiết nước lá *A. gangetica* (ALE) trên huyết áp (HA) và nhịp tim (HR) ở chuột đực tăng huyết áp tự phát (SHR) và cơ chế hoạt động khả thi của nó. Kết quả cho thấy, *A. gangetica* làm giảm huyết áp tâm thu, tâm trương và huyết áp trung bình phụ thuộc vào liều ALE. Sự giảm nhịp tim ( $p < 0,05$ ) không phụ thuộc vào liều lượng. Cả ANG I (Angiotensin I human acetate salt hydrate) và ANG II (angiotensin II human) đều làm tăng huyết áp phụ thuộc vào liều dùng. Khi truyền đồng thời dịch chiết nước của lá *A. gangetica* (200 mg/kg) với ANG I hoặc ANG II thấy có tác dụng ngăn chặn sự tăng huyết áp tương ứng của cả ANG I và ANG II, và giảm nhịp tim. Như vậy, *A. gangetica* làm giảm huyết áp và nhịp tim ở chuột đực được kích thích tăng huyết áp tự phát. Tác dụng này có thể là do sự ức chế

ACE (Angiotensin I Converting Enzyme) và các thụ thể ANG II. Nó cũng có thể liên quan đến một tác dụng ức chế trực tiếp lên cơ tim[9].

**Tác dụng chống bệnh hen suyễn:** Năm 2003, Akah và cộng sự đã nghiên cứu tác dụng chống bệnh hen suyễn của chiết xuất *n*-hexane, ethyl acetate và methanol lá cây *A. gangetica* thu được bằng cách chiết Soxhlet liên tiếp. Các kết quả chỉ ra rằng các dịch chiết không thể hiện hoạt động co bóp hoặc thư giãn trong mô; tuy nhiên, chúng ức chế sự co thắt do các chất gây co thắt gây ra. Các dịch chiết làm thư giãn các dải khí quản liên quan đến histamine theo mức độ hiệu lực như sau: dịch chiết ethyl acetate > dịch chiết *n*-hexane = dịch chiết methanol. Các dịch chiết cũng thể hiện hoạt tính chống viêm theo thứ tự mức độ: dịch chiết methanol > dịch chiết *n*-hexane > dịch chiết ethyl acetate. Thử nghiệm độc tính cấp tính ước tính LD<sub>50</sub> là 2150 mg/kg ở chuột đối với dịch chiết methanol trong khi sàng lọc hóa thực vật chỉ ra sự có mặt của carbohydrate, protein, alkaloid, tannin, aglycone steroid, saponin, flavonoid, đường khử và triterpenoid trong dịch chiết này. Nghiên cứu đã chứng minh việc sử dụng lá *A. gangetica* trong việc kiểm soát bệnh hen suyễn trong y học dân gian Nigeria. Rõ ràng là cơ chế của đặc tính chống hen suyễn của các dịch chiết từ lá *A. gangetica* có thể liên quan đến sự ức chế hoạt động của các chất gây co thắt và ức chế miễn dịch[10].

**Tác dụng giảm đau và kháng viêm:** Nghiên cứu của Hussain và cộng sự năm 2016 chỉ ra rằng dịch chiết cồn và dịch chiết nước của toàn bộ cây *A. gangetica* có tiềm năng về tác dụng giảm đau và chống viêm. Đối với tác dụng giảm đau, theo phương pháp ngâm đuôi chuột (tail immersion test), ở liều 200, 400 mg/kg dịch chiết *A. gangetica* thể hiện sự ức chế 50% so với đối chứng dương ức chế 93%. Như vậy là cả hai dịch chiết đều cho thấy tác dụng giảm đau vừa phải khi so sánh với đối chứng dương Tramadol. Kết quả thử nghiệm theo phương pháp đĩa nóng (hot plate method) trên chuột cho thấy thời gian trễ đáng kể nhất là ở liều 400 mg/kg, tỷ lệ phần trăm ức chế được tìm thấy là 51,73% đối với dịch chiết nước, 49,56%, đối với dịch chiết ethanol trong khi đối chứng Tramadol ức chế 83,91%. Kết quả nghiên cứu hoạt tính kháng viêm cho thấy ở nồng độ 200 và 400 mg/kg dịch chiết ethanol và dịch chiết nước có các giá trị ức chế sự hình thành mô u hạt lần lượt là 37,50%, 52,88%, 31,73%, 56,73%. Diclofenac (thuốc đối chứng dương) ức chế sự hình thành mô u hạt với giá trị 93,31%. Các tác dụng trên có thể do sự có mặt của các thành phần hóa học chủ yếu là flavonoid, saponin trong các dịch chiết

này. Flavonoid và saponin nổi tiếng với khả năng ức chế cảm nhận cơn đau cũng như chống viêm do chúng có tác dụng ức chế đối với các enzyme tham gia vào quá trình sản xuất các chất trung gian hóa học của chứng viêm[11].

Năm 2020, các cao chiết *n*-hexane, ethyl acetate, methanol và nước của cây *A. gangetica* đã được nghiên cứu hoạt tính kháng viêm cũng như khả năng ức chế enzyme tyrosinase. Tất cả các cao chiết đều thể hiện hoạt tính kháng viêm, trong đó cao chiết methanol có hoạt tính tốt nhất. Ba cao chiết *n*-hexane, ethyl acetate và methanol có hoạt tính ức chế enzyme tyrosinase, trong đó cao chiết ethyl acetate có hoạt tính tốt nhất với  $0,19 \pm 0,013$  mg/ml. Do đó, *A. gangetica* có tiềm năng là một tác nhân chống lão hóa và làm trắng da có thể nghiên cứu sâu hơn để sử dụng trong mỹ phẩm xanh (green cosmetic)[12].

**Hoạt tính chống oxy hóa:** Năm 2009, Kuma và cộng sự đã nghiên cứu tác dụng của dịch chiết ethanol 70% của lá *A. gangetica* đối với tình trạng stress oxy hóa ở ruột non của chuột mắc bệnh tiểu đường. Kết quả cho thấy khi uống dịch chiết ethanol lá *A. gangetica* mỗi ngày một lần (100 mg/kg và 200 mg/kg thể trọng) trong 28 ngày ở chuột mắc bệnh tiểu đường tăng đáng kể ( $P < 0,05$ ) mức độ chống oxy hóa của catalase, superoxyde dismutase, glutathione peroxydase, glutathione, enzyme chuyển hóa carbohydrate, glucose-6-phosphat dehydrogenase. Sự gia tăng hàm lượng protein carbonyl, quá trình peroxy hóa lipid và xanthine oxydase/xanthine dehydrogenase ở chuột mắc bệnh tiểu đường đã trở lại gần như mức độ bình thường khi điều trị bằng dịch chiết ethanol lá *A. gangetica*. Cả hai liều dịch chiết ethanol lá *A. gangetica* sử dụng đều cho hoạt tính đáng kể ( $P < 0,01$ ) chống lại các tổn hại do oxy hóa và có thể so sánh với glibenclamide (chất đối chứng dương). Như vậy, các kết quả cho thấy sự tồn tại của stress oxy hóa trong ruột non ở chuột bị bệnh tiểu đường và cho thấy tiềm năng của dịch chiết ethanol lá *A. gangetica* như một chất chống oxy hóa trong việc bảo vệ hệ thống mô phòng thủ chống lại các tổn thương bởi oxy hóa trong bệnh tiểu đường do streptozotocin gây ra[13].

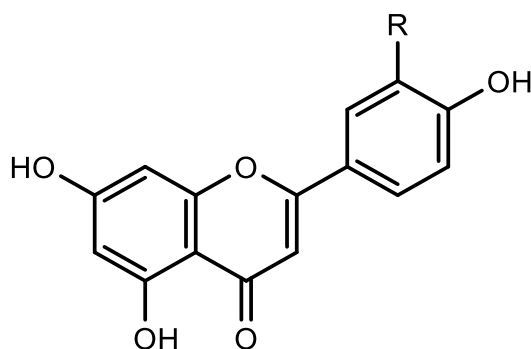
**Hoạt tính chống tiểu đường:** Năm 2013, Sama và cộng sự đã nghiên cứu về tác dụng ức chế enzyme  $\alpha$ -amylase và  $\alpha$ -glucosidase của cao chiết anthocyanin được chiết bằng ethanol, acid hóa bằng citric acid từ hoa *A. gangetica*. Kết quả cho thấy, ở nồng độ 400  $\mu$ g/ml, dịch chiết anthocyanin có tác dụng ức chế hoạt động của enzyme  $\alpha$ -glucosidase và  $\alpha$ -amylase đáng kể ( $71,46 \pm 1,21\%$  và  $76,85 \pm 0,75\%$ )

với IC<sub>50</sub> lần lượt là 260 µg/ml và 244 µg/ml. Do vậy, cao chiết chứa anthocyanin của *A. gangetica* có tiềm năng trong việc phân lập các hoạt chất chống tiểu đường tự nhiên[14].

Đến năm 2016, Kavitha và cộng sự đã nhận thấy dịch chiết chứa anthocyanin từ hoa *A. gangetica* ở mức liều 250 mg/kg làm giảm đáng kể mức đường huyết và tăng mức insulin ở chuột mắc bệnh tiểu đường và cũng làm giảm tổng lượng cholesterol (TC), triglyceride (TG), lipoprotein tỷ trọng thấp (LDL) và tăng lipoprotein tỷ trọng cao (HDL) ở chuột mắc bệnh tiểu đường do streptozotocin. Nó cũng làm giảm đáng kể sự gia tăng mức độ hoạt động của GPx, SOD và CAT ở cả gan và thận. Hàm lượng vitamin C và vitamin E đã tăng lên đáng kể ở những con chuột bị tiểu đường được điều trị bằng dịch chiết chứa anthocyanin so với nhóm đối chứng[15].

### 1.2.2. Tình hình nghiên cứu ở Việt Nam

Cho đến nay, ở Việt Nam mới có một công trình nghiên cứu vào năm 2019 của Võ Thị Thu Nga và cộng sự phân lập được 2 flavonoid từ phân đoạn ethyl acetate của cây *A. gangetica* là apigenin (**18**) và luteolin (**19**).[16]



**18:** R = OH

**19:** R=H

Như vậy, cây Biền hoa sông hằng (*Asystasia gangetica* (L.) T. Anderson) là cây dược liệu có nhiều hoạt tính sinh học thú vị nhưng còn chưa được quan tâm nghiên cứu đầy đủ ở Việt Nam.

## **Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

### **2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU**

Cây Biển hoa sông hằng - *Asystasia gangetica* (L.) T. Anderson được thu hái tại Hà Nội vào tháng 12 năm 2021 và được TS. Đỗ Thị Xuyên, Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội định danh. Mẫu tiêu bản thực vật hiện đang được lưu trữ tại Trung tâm Nghiên cứu và phát triển thuốc, Viện Hóa sinh biển, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

### **2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

#### **2.2.1. Phương pháp nghiên cứu thành phần hóa học**

##### ***- Phương pháp xử lý và chiết xuất mẫu:***

Mẫu thực vật, cụ thể là phần trên mặt đất của loài Biển hoa sông hằng, sau khi làm khô và nghiền nhỏ sẽ đem đi ngâm chiết bằng methanol nhiều lần. Dịch chiết methanol được loại bỏ dung môi rồi chiết phân bố với các dung môi phân cực tăng dần *n*-hexane, ethyl acetate để tạo ra các cao chiết phân đoạn.

##### ***- Phương pháp phân tích và phân tách các hỗn hợp và phân lập chất sạch:***

Các phương pháp sắc ký, cụ thể gồm sắc ký lớp mỏng (TLC Silica gel 60 F<sub>254</sub>, dùng để khảo sát), sắc ký cột thường và sắc ký cột nhanh với pha tĩnh là silica gel có kích cỡ hạt 0,040-0,063 mm (230 - 400 Mesh) của hãng Merck và Sephadex LH-20 (Sigma), Diaion (Supelco) đã được áp dụng để phân tích và phân tích các hỗn hợp cùng với phân lập chất sạch.

Sắc ký lớp mỏng là phương pháp sắc ký được thực hiện trên bản mỏng để nhôm được phủ sẵn Silica gel 60 F<sub>254</sub> của hãng Merck có độ dày 0,2 mm. Dung môi dùng triển khai là hỗn hợp các dung môi như *n*-hexane, dichloromethane (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), ethyl acetate (EtOAc), acetone, methanol (MeOH).

Sắc ký cột chủ yếu dùng cột thường với pha tĩnh là silica gel, sử dụng dung môi rửa giải thường là hỗn hợp của *n*-hexane, dichloromethane, ethyl acetate, acetone, methanol. Khi pha tĩnh là Sephadex LH-20 thì rửa giải bằng methanol, hỗn hợp methanol/dichloromethane, methanol/nước...

##### ***- Các phương pháp xác định cấu trúc của các hợp chất phân lập được:***

Cấu trúc của các hợp chất phân lập được được xác định bằng các phương pháp phổ như: các phương pháp phổ khối (ESI-MS, HR-MS) và các phương pháp phổ



cộng hưởng từ hạt nhân NMR, gồm phổ một chiều (<sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR và DEPT) và phổ 2 chiều (COSY, HSQC, HMBC và NOESY)...

## 2.2.2. Phương pháp đánh giá hoạt tính sinh học

### 2.2.2.1. Phương pháp đánh giá khả năng thu dọn gốc tự do DPPH[17]

*Nguyên lý:* 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) là chất tạo ra gốc tự do. Hoạt tính chống oxy hóa của một hợp chất được thể hiện thông qua việc làm giảm cường độ màu của DPPH khi thực hiện đo mật độ quang tại bước sóng  $\lambda = 517 \text{ nm}$ .

*Các bước tiến hành:*

- DPPH được pha dưới dạng dung dịch có nồng độ 0,25  $\mu\text{M}$  trong MeOH. Chất thử thì được pha trong dung môi DMSO 100% để thu được một dãy các nồng độ 0,002 - 1 mg/ml.
- Ascorbic acid được sử dụng như đối chứng tham khảo và được pha thành dải nồng độ (0,8 ; 4; 20 và 100  $\mu\text{g/ml}$ ) với nước cất khử ion.
- Đĩa thí nghiệm 96 giếng, bao gồm:
  - + Giếng phản ứng: Hút mẫu thử đã pha ở các nồng độ trên vào đĩa 96 giếng. Sau đó cho thêm dung dịch DPPH đã chuẩn bị ở trên vào các giếng đã có sẵn mẫu thử (tỉ lệ 1:1).
  - + Giếng chứng: 100  $\mu\text{l}$  methanol và 100  $\mu\text{l}$  DPPH.
  - + Chất đối chứng được sử dụng là resveratrol và quercetin.
- Thời gian diễn ra phản ứng là 30 phút ở nhiệt độ 37<sup>0</sup>C, sau đó tiến hành đọc mật độ hấp thụ của DPPH bằng máy quang phổ ở bước sóng 517 nm.

*Xử lý số liệu:*

Khả năng trung hòa các gốc oxy hóa tự do được tạo ra từ DPPH (Scavenging Activities – ký hiệu: SA) của mẫu thử được tính theo công thức sau:

$$\%SA = (\text{OD}_{\text{chứng}} - \text{OD}_{\text{mẫu thử}}) * 100 / \text{OD}_{\text{chứng}} (\%).$$

Với:  $\text{OD}_{\text{chứng}}$  : Độ hấp thụ tại giếng không chứa chất thử

$\text{OD}_{\text{mẫu thử}}$  : Độ hấp thụ tại giếng chứa chất thử

### 2.2.2.2. Phương pháp nghiên cứu hoạt tính ức chế enzyme $\alpha$ -glucosidase[18]

Phương pháp nghiên cứu hoạt tính ức chế enzym  $\alpha$ -glucosidase trong điều trị đái tháo đường type 2 được ưu tiên sử dụng là do có cơ chế an toàn và đơn giản, chỉ xảy ra trong bộ phận tiêu hóa mà không ảnh hưởng tới quá trình chuyển hóa đường, cải thiện chức năng của insulin ... như khi thực hiện các phương pháp khác.

*Cách tiến hành:* Hoạt tính ức chế enzyme  $\alpha$ -glucosidase được thực hiện như sau:

- Cao chiết được hòa tan trong DMSO 100% để có dung dịch gốc (20 mg/ml) và pha loãng trong phosphate buffer 10 mM (pH 6,8) để tạo dải nồng độ. Tiếp theo, 50  $\mu$ L mẫu đã pha loãng được bơm vào khay 96 giếng để chuẩn bị thử nghiệm;
- Thêm vào từng giếng 20  $\mu$ L  $\alpha$ -glucosidase (0,5U/ml) và 130  $\mu$ L phosphate buffer 100 mM (pH 6,8), sau đó trộn đều và ủ trong 15 phút ở nhiệt độ 37°C. Như vậy, nồng độ mẫu thử đạt được cuối cùng trong giếng lần lượt là 500-100-20-4  $\mu$ g/ml;
- Cơ chất *p*-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside (pNPG) sau đó được bơm thêm lần lượt vào từng giếng và tiếp tục ủ ở nhiệt độ 37 °C trong 60 phút.
- Giếng thí nghiệm chỉ chứa DMSO 10%, phosphate buffer, enzyme  $\alpha$ -glucosidase và pNPG sẽ được lấy làm đối chứng (blank). Và giếng thí nghiệm cũng chỉ có phosphate buffer, pNPG và mẫu thử cũng được tính là đối chứng (blank). Thí nghiệm đối với mỗi khay 96 giếng sẽ được lặp đi lặp lại 3 lần để đảm bảo tính chính xác.
- Thí nghiệm được dừng lại bằng thao tác bơm thêm vào từng giếng 80  $\mu$ L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,2M và đo OD ở bước sóng 405 nm bằng máy đo ELISA Plate Reader (Biotek).
- Khả năng ức chế enzyme  $\alpha$ -glucosidase của mẫu thử được tính theo công thức:

$$\% \text{ Ức chế} = 100 - [(OD_{\text{mẫu thử}} / OD_{\text{đối chứng}}) \times 100]$$

Với:  $OD_{\text{đối chứng}} = OD_{\text{đối chứng}} - OD_{\text{blank}}$

$$OD_{\text{mẫu thử}} = OD_{\text{mẫu thử}} - OD_{\text{blank}}$$

- Giá trị IC<sub>50</sub> sẽ được xác định nhờ vào phần mềm máy tính TableCurve2Dv4.

### **2.2.2.3. Phương pháp thử hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định[19]**

*Nguyên lý:* Hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định được thực hiện dựa trên phương pháp pha loãng đa nồng độ của (Hadacek F, Greger H., 2000). Phương pháp thử hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định và nấm này nhằm đánh giá mức độ kháng khuẩn của các mẫu thử biểu hiện qua giá trị MIC (nồng độ ức chế tối thiểu).

*Cách tiến hành:*

- Pha dung dịch vi khuẩn hoặc nấm men có nồng độ  $2 \times 10^5$  CFU/ml
- Sau đó, lấy 5,12  $\mu$ l dung dịch mẫu thử có nồng độ 10 mg/ml vào hàng đầu tiên có chứa 100  $\mu$ l môi trường LB (thành phần gồm có peptone 10 g/L, yeast extract 5 g/L và muối NaCl 10 g/L) rồi pha loãng nối tiếp giảm một nửa nồng độ vào các hàng tiếp theo có chứa 50  $\mu$ l môi trường LB cho đến khi nồng độ

cuối cùng là 2 µg/ml, ta sẽ thu được một dải nồng độ giảm dần từ 256 xuống còn 2µg/ml. Sau đó thêm vào 50 µl dung dịch vi khuẩn và nấm ở nồng độ  $2 \times 10^5$  CFU/ml rồi ủ ở nhiệt độ 37°C. Số thí nghiệm được lặp đi lặp lại 3 lần để đảm bảo tính chính xác.

- Sau 24 giờ, giá trị MIC được xác định sơ bộ bằng quan sát. Giá trị **MIC** được hiểu là nồng độ chất thử thấp nhất tại giếng gây ra việc ức chế hoàn toàn sự phát triển của vi sinh vật sau 24 giờ nuôi cấy và được tính chính xác dựa trên việc đo độ đục tế bào bằng máy quang phổ Bioteck và xử lý bằng phần mềm Raw data.
- Chất đối chứng cho các chủng vi khuẩn là kháng sinh streptomycin và cho nấm men là cycloheximide.

### **2.3. HÓA CHẤT – THIẾT BỊ**

#### **2.3.1. Hóa chất**

- Dung môi: *n*-hexan, dichloromethane, ethyl acetate, acetone, methanol, sulfuric acid, nước cất.
- DPPH, ascorbic acid, resveratrol và quercetin (dùng cho thử nghiệm hoạt tính chống oxi hóa).
- DMSO, phosphate buffer 10 mM (pH 6,8), *p*-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside (pNPG), enzyme  $\alpha$ -glucosidase (dùng cho thử nghiệm hoạt tính ức chế enzyme  $\alpha$ -glucosidase).
- Môi trường LB (thành phần gồm có peptone 10 g/L, yeast extract 5 g/L và muối NaCl 10 g/L), streptomycin và cycloheximide (dùng cho thử nghiệm hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định).
- Các chủng vi sinh vật kiểm định: 3 chủng vi khuẩn Gram âm *Escherichia coli* ATCC25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Salmonella enterica* ATCC13076; 3 chủng Gram dương *Enterococcus faecalis* ATCC29212, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Bacillus cereus* ATCC14579; 1 chủng Nấm men *Candida albicans* ATCC10231. Nguồn gốc: American Type Culture Collection, Mỹ.

#### **2.3.2. Dụng cụ - Thiết bị**

- Máy cô quay chân không.
- Đèn tử ngoại (254 nm và 365 nm).

- Bình chạy sắc ký.
- Cột sắc ký.
- Silica gel 60 (0,04-0,063 mm) Merck.
- Silica gel pha đảo ODS hoặc YMC (30-50 nm)
- Bản mỏng pha thường, pha đảo.
- Máy đo phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR): Bruker Avance 500 MHz và Bruker Avance Neo 600 MHz.
- Máy đo phổ khối Agilent 6530 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS.

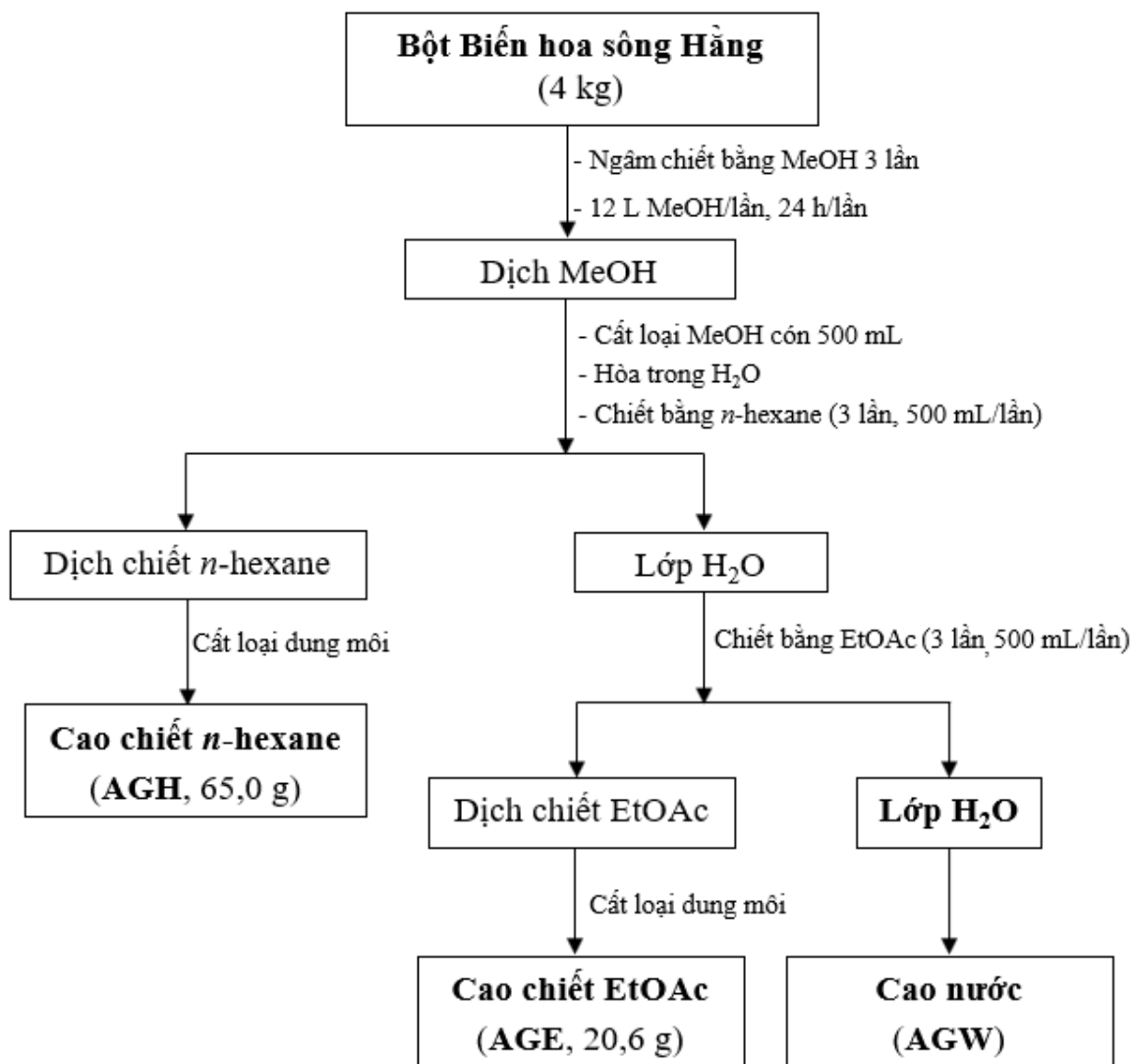
## Chương 3. THỰC NGHIỆM

### 3.1. ĐIỀU CHẾ CÁC CAO CHIẾT



Hình 3.1. Loài Biển hoa sông hằng được thu hái ở Hà Nội.

Phần trên mặt đất loài Biển hoa sông hằng (*A. gangetica*) sau khi thu hái được thái thành các đoạn dài khoảng 2-3 cm, sấy khô và nghiền nhỏ, thu được 4 kg bột mẫu khô. Bột mẫu (4 kg) được ngâm 3 lần bằng MeOH ở nhiệt độ phòng, mỗi lần sử dụng 12 L MeOH và ngâm trong 24h. Gộp các dịch chiết MeOH và cất loại dung môi xuống còn 500 ml. Hòa dịch chiết cô đặc với nước cất, sau đó chiết lần lượt với *n*-hexane và EtOAc theo tỉ lệ 1:1, mỗi dung môi chiết làm 3 lần và mỗi lần dùng 500 ml. Các dịch chiết của từng dung môi được gom chung và cất loại hoàn toàn dung môi thu được các cao chiết tương ứng là *n*-hexane (**AGH**, 65,0 g), ethyl acetate (**AGE**, 20,6 g) và lớp nước.



Hình 3.2. Sơ đồ điều chế các cao chiết từ loài Biennial hoa sông hằng

### 3.2. SÀNG LỌC HOẠT TÍNH SINH HỌC

Các cao chiết *n*-hexane (AGH), ethyl acetate (AGE) và nước (AGW) từ loài Biennial hoa sông hằng lần lượt được đánh giá các hoạt tính gồm hoạt tính chống oxy hóa theo phương pháp DPPH, hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định và hoạt tính ức chế enzyme  $\alpha$ -glucosidase.

#### 3.2.1. Hoạt tính chống oxy hóa

Kết quả xác định hoạt tính chống oxy hóa thông qua phép thử trung hòa gốc tự do theo phương pháp DPPH được trình bày trong bảng 3.7.

Bảng 3.1. Hoạt tính chống oxy hóa của các cao chiết thông qua phương pháp DPPH

Nồng độ (mg/ml)	0,002	0,01	0,1	0,25	0,5	1	IC <sub>50</sub> (mg/ml)
AGH	-	-	3,10	7,38	20,76	23,05	2,09
AGE	4,93	10,56	76,66	82,40	86,19	87,64	0,063
AGW	12,64	12,88	19,93	20,02	25,02	32,33	1,99

Chất đối chứng được sử dụng là ascorbic acid (VitC) hoạt động ổn định trong điều kiện thí nghiệm với giá trị IC<sub>50</sub> 11.93 µg/ml.

AGH-cao chiết n-hexane, AGE-cao chiết ethyl acetate, AGW-cao nước

### 3.2.2. Hoạt tính ức chế α-glucosidase

Kết quả nghiên cứu đánh giá hoạt tính ức chế enzyme α-glucosidase của các cao chiết AGH, AGE và AGW lần lượt được trình bày trong bảng 3.8.

Bảng 3.2. Hoạt tính ức chế enzyme α-glucosidase của các cao chiết

Nồng độ (µg/ml)	Acarbose		AGH		AGE		AGW	
	% ỨC	SD	% ỨC	SD	% ỨC	SD	% ỨC	SD
500	81,81	2,11	36,93	1,67	40,16	1,40	50,41	1,48
100	50,96	0,94	10,73	0,51	13,07	0,46	19,62	1,05
20	14,80	1,07	3,66	0,38	5,05	0,40	4,50	0,54
4	8,27	0,22	1,51	0,13	1,91	0,18	2,29	0,16
IC <sub>50</sub>	123,81 ± 3,58		>500		>500		490,38 ± 23,61	

Chất đối chứng dương acarbose hoạt động ổn định trong điều kiện thí nghiệm.

AGH-cao chiết n-hexane, AGE-cao chiết ethyl acetate, AGW-cao nước

### 3.2.3. Hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định

Các cao chiết n-hexane (AGH), ethyl acetate (AGE) và nước (AGW) từ phần trên mặt đất loài *A. gangetica* được đánh giá hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định trên các chủng vi sinh vật kiểm định thử nghiệm gồm: 3 chủng vi khuẩn Gram (+) (*Enterococcus faecalis* ATCC13124, *Staphylococcus aureus* ATCC25923 và *Bacillus cereus* ATCC 13245), 3 chủng vi khuẩn Gram (-) (*Escherichia coli* ATCC25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 và *Salmonella enterica* ATCC12228), và 1 chủng vi nấm (*Candida albicans* ATCC1023). Kết quả được trình bày trong bảng 3.9.

Bảng 3.3. Hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định của các cao chiết

Tên mẫu	Gram (+)			Gram (-)			Nấm men
	<i>E. faecalis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. enterica</i>	<i>C. albicans</i>
MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )							
<b>AGH</b>	128	-	-	-	-	-	-
<b>AGE</b>	128	-	256	-	128	128	128
<b>AGW</b>	128	-	-	-	-	-	-
<b>Streptomycin</b>	256	256	128	32	256	128	
<b>Cycloheximide</b>							32

AGH-cao chiết *n*-hexane, AGE-cao chiết ethyl acetate, AGW-cao nước

(-) không có hoạt tính (MIC > 256  $\mu\text{g/ml}$ )

Chất đối chứng streptomycin và cycloheximide hoạt động ổn định trong điều kiện thí nghiệm.



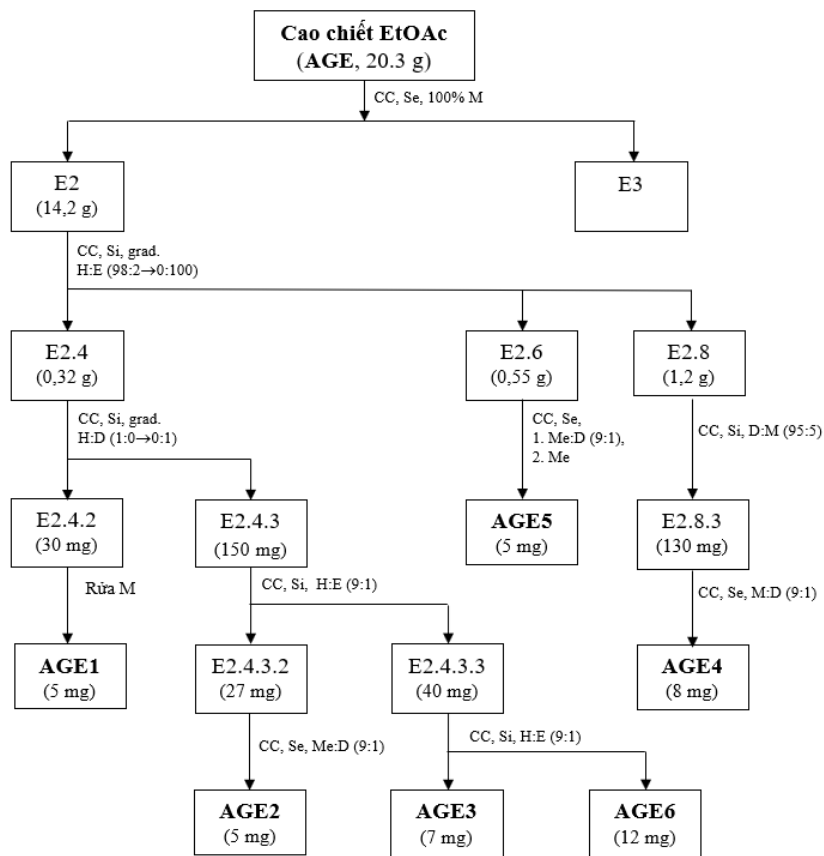
### 3.3. PHÂN LẬP CÁC HỢP CHẤT

Qua việc thử nghiệm hoạt tính sinh học, chúng tôi nhận thấy rằng cao chiết EtOAc (**AGE**) có hoạt tính sinh học nổi bật hơn. Do đó, chúng tôi lựa chọn cao chiết **AGE** để tiến hành phân lập.

Cao chiết EtOAc (**AGE**, 20,3 g, sau khi giữ lại 0,3 g để thử hoạt tính) được phân tách bằng cột Sephadex LH-20, rửa giải bằng MeOH thu lấy 3 phân đoạn E1-E3. Phân đoạn E2 (14,2 g) sau đó được phân tách trên cột sắc ký silica gel sử dụng gradient dung môi *n*-hexane:EtOAc (98:2→0:100) để rửa giải, thu lấy 8 phân đoạn, E2.1-E2.8. Phân đoạn E2.4 (0,32 g) được phân tách tiếp bằng cột silica gel, rửa giải gradient dung môi *n*-hexane:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:0 →0:1) rồi thu lấy 5 phân đoạn, E2.4.1-E2.4.5. Rửa phân đoạn E2.4.2 (30 mg) bằng MeOH thu được hợp chất **AGE1** (5 mg). Phân đoạn E2.4.3 (150 mg) tiếp tục được tinh chế với hệ dung môi *n*-hexane:EtOAc (9:1) trên cột silica gel, thu được 4 phân đoạn E2.4.3.1-E2.4.3.4. Phân đoạn E2.4.3.2 (27 mg) được tinh chế trên cột Sephadex LH-20 với dung môi MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (9:1) thu được hợp chất **AGE2** (5 mg). Phân đoạn E2.4.3.3 (40 mg) tiếp tục được tinh chế với hệ dung môi *n*-hexane:EtOAc (9:1) trên cột sắc ký silica gel, sau đó thu được hợp chất **AGE3** (7 mg) và **AGE6** (12 mg).

Hợp chất **AGE5** (5 mg) thu được bằng cách tinh chế 2 lần phân đoạn E2.6 (0,55 g) bằng cột Sephadex LH-20 lần lượt với hệ dung môi MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (9:1) và MeOH. Phân đoạn E2.8 (1,2 g) được phân tách trên cột sắc ký silica gel, rửa giải bằng dung môi CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: MeOH (95:5) và thu lấy 5 phân đoạn, E2.8.1-E2.8.5. Phân đoạn E2.8.3 (130 mg) được tinh chế với hệ dung môi MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (9:1) trên cột Sephadex LH-20, thu lấy hợp chất **AGE4** (8 mg).

CC Column chromatography  
 D Dichloromethane  
 E Ethyl acetate  
 H n-hexane  
 M Methanol  
 Se Sephadex LH-20  
 Si Silica gel



Hình 3.3. Sơ đồ quá trình phân lập hợp chất từ cao chiết ethyl acetate

## Chương 4. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 4.1. KẾT QUẢ

#### 4.1.1. Kết quả nghiên cứu hoạt tính sinh học của các cao chiết

Kết quả nghiên cứu hoạt tính quét gốc tự do DPPH trình bày trong bảng 3.1 cho thấy mẫu cao chiết **AGE** thể hiện hoạt tính chống oxy hóa mạnh với giá trị  $IC_{50}$  0,063 mg/ml, còn hai mẫu **AGW** và **AGH** thể hiện hoạt tính chống oxy hóa yếu hoặc không có hoạt tính ở nồng độ thử nghiệm, với giá trị  $IC_{50}$  lần lượt là 1.99 mg/ml và 2.09 mg/ml.

Kết quả đánh giá hoạt tính ức chế enzyme  $\alpha$ -glucosidase trình bày trong bảng 3.2 cho thấy trong ba mẫu cao chiết, chỉ có cao chiết **AGW** có khả năng hoạt tính ức chế enzyme  $\alpha$ -glucosidase yếu với giá trị  $IC_{50}$  là  $490,38 \pm 23,61$   $\mu$ g/ml. Hai cao chiết **AGH** và **AGE** đều chưa thể hiện hoạt tính ức chế enzyme  $\alpha$ -glucosidase ở nồng độ thử nghiệm.

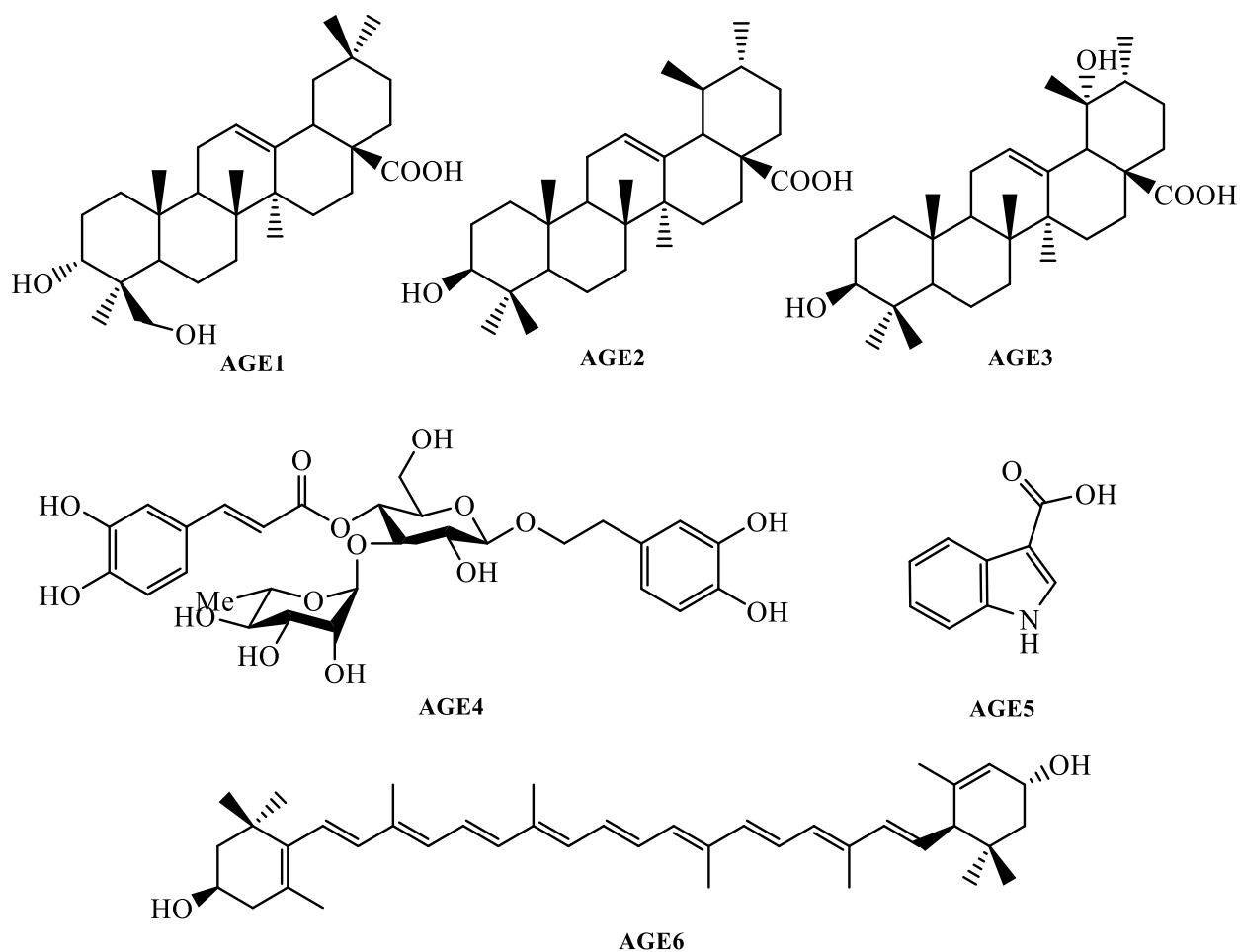
Kết quả nghiên cứu hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định trình bày trong bảng 3.3 cho thấy mẫu cao chiết **AGE** thể hiện hoạt tính kháng khuẩn tốt nhất, nó ức chế 4 trong số 6 chủng vi khuẩn thử nghiệm là *E. faecalis*, *B. cereus*, *P.aeruginosa* và *S. enterica* với giá trị MIC lần lượt là 128, 256, 128 và 128  $\mu$ g/ml và ức chế ở mức độ yếu vi nấm *C. anbicans* với giá trị MIC 128  $\mu$ g/ml, trong khi đó cao chiết **AGH** và **AGW** chỉ thể hiện hoạt tính kháng khuẩn tốt với một chủng vi khuẩn gram dương *E. faecalis* với giá trị MIC là 128  $\mu$ g/ml.

Các kết quả đánh giá hoạt tính sinh học trên cho thấy cao chiết ethyl acetate phân trên mặt đất loài Biển hoa sông Hằng (*A. gangetica*) có hoạt tính tốt nhất trong số 3 cao chiết. Chính vì vậy, cao chiết này được lựa chọn để nghiên cứu thành phần hóa học.

#### 4.1.2. Danh sách các hợp chất phân lập được từ loài *A. gangetica*

Từ cao chiết EtOAc phần trên mặt đất loài Biển hoa sông hồng (*A. gangetica*) đã phân lập và xác định cấu trúc của 6 hợp chất bao gồm 3 $\alpha$ ,24-dihydroxy-olean-12-en-28-oic acid (**AGE1**), ursolic acid (**AGE2**), pomolic acid (**AGE3**), verbascoside (**AGE4**), indol-3-carboxylic acid (**AGE5**) và lutein (**AGE6**).

Trong các hợp chất trên, chỉ có verbascoside (**AGE4**) đã được phân lập từ loài *A. gangetica*. Năm hợp chất còn lại lần đầu tiên được tìm thấy từ loài thực vật này.



Hình 4.1. Cấu trúc hóa học của các hợp chất phân lập từ cao chiết ethyl acetate của loài Biển hoa sông hồng

#### 4.1.3. Hằng số vật lý của các hợp chất phân lập được

##### 4.1.3.1. Hợp chất AGE1: 3 $\alpha$ ,24-dihydroxy-olean-12-en-28-oic acid

Công thức phân tử: C<sub>30</sub>H<sub>48</sub>O<sub>4</sub>. Khối lượng phân tử: 472

HR-ESI-MS: *negative m/z* 471,3465 [M-H]<sup>-</sup> (tính toán cho [C<sub>30</sub>H<sub>47</sub>O<sub>4</sub>]<sup>-</sup> 471,3474)  
<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) và <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): tại bảng 3.1.

#### **4.1.3.2. Họp chất AGE2: Ursolic acid**

Công thức phân tử: C<sub>30</sub>H<sub>48</sub>O<sub>3</sub>. Khối lượng phân tử: 456

<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) và <sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): xem bảng 3.2

#### **4.1.3.3. Họp chất AGE3: Pomolic acid**

Công thức phân tử: C<sub>30</sub>H<sub>48</sub>O<sub>4</sub>. Khối lượng phân tử: 472

HR-ESI-MS: *negative m/z* 471,3462 [M-H]<sup>-</sup> (tính toán cho [C<sub>30</sub>H<sub>47</sub>O<sub>4</sub>]<sup>-</sup> 471,3474)

<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD) và <sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, CD<sub>3</sub>OD): xem bảng 3.3

#### **4.1.3.4. Họp chất AGE4: Verbascoside**

Công thức phân tử: C<sub>29</sub>H<sub>36</sub>O<sub>15</sub>. Khối lượng phân tử: 622

<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD) và <sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, CD<sub>3</sub>OD): xem bảng 3.4

#### **4.1.3.5. Họp chất AGE5: Indol-3-carboxylic acid**

Công thức phân tử: C<sub>9</sub>H<sub>7</sub>O<sub>2</sub>N. Khối lượng phân tử: 161

<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD) và <sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, CD<sub>3</sub>OD): xem bảng 3.5

#### **4.1.3.6. Họp chất AGE6: Lutein**

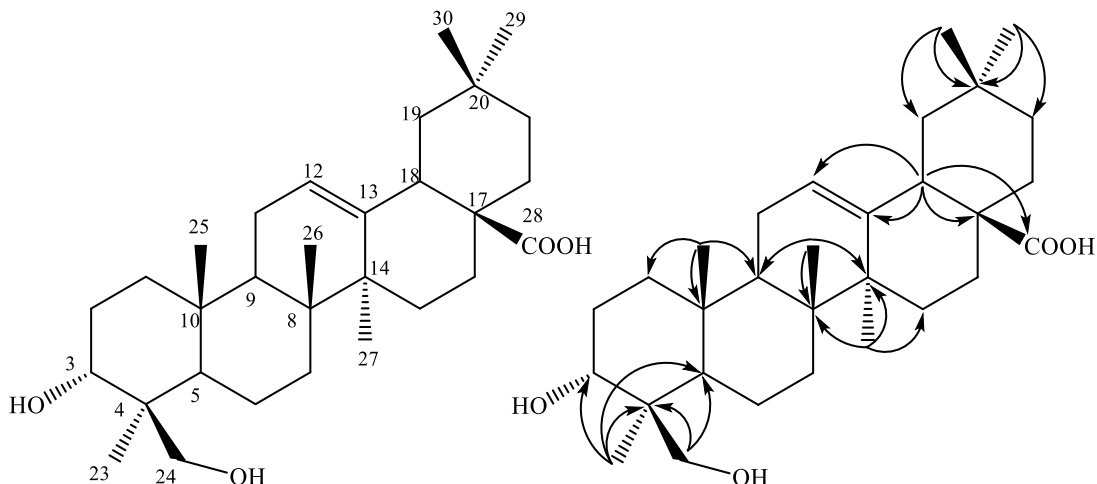
Công thức phân tử: C<sub>40</sub>H<sub>56</sub>O<sub>2</sub>. Khối lượng phân tử: 568

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) và <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): xem bảng 3.6

## 4.2. THẢO LUẬN

### 4.2.1. Xác định cấu trúc các hợp chất được phân lập từ loài *A. gangetica*

#### 4.2.1.1. Hợp chất AGE1: 3 $\alpha$ ,24-dihydroxy-olean-12-en-28-oic acid



Hình 4.2. Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC chính của hợp chất AGE1

Hợp chất **AGE1** được phân lập dưới dạng chất bột màu trắng. Phổ  $^1\text{H-NMR}$  xuất hiện tín hiệu cộng hưởng của 6 nhóm methyl bậc ba dạng singlet tại  $\delta_{\text{H}}$  0,68 (3H, s, H-26), 0,81 (3H, s, H-25), 0,87 (6H, s, H-23 và H-30), 0,88 (3H, s, H-29) và 1,10 (3H, s, H-27), một proton nhóm hydroxymethine tại  $\delta_{\text{H}}$  3,56 (1H, br.s, H-3), một proton của liên kết đôi thế 3 lần tại  $\delta_{\text{H}}$  5,15 (1H, br.s, H-12), hai proton của một nhóm oxymethylene tại  $\delta_{\text{H}}$  3,45 (1H, m, Ha-24)/3,19 (1H, m, Hb-24). Phổ  $^{13}\text{C-NMR}$  cho biết sự có mặt của 30 cacbon được quy gán bởi phổ HSQC thuộc về 6 nhóm methyl ( $\delta_{\text{C}}$  22,6, 15,3, 16,7, 25,6, 32,8, 23,3), 11 nhóm methylene trong đó có một nhóm oxymethylene ( $\delta_{\text{C}}$  64,1), 5 nhóm methine trong đó có một nhóm hydroxymethine ( $\delta_{\text{C}}$  68,3) và một nhóm methine olefin ( $\delta_{\text{C}}$  121,5), cùng với 8 cacbon không liên kết với hydro trong đó có một cacbon olefin ( $\delta_{\text{C}}$  143,8) và một cacbon nhóm carbonyl ( $\delta_{\text{C}}$  178,6). Phổ khối phân giải cao HR-ESI-MS *negative* cho pic giả ion phân tử  $[\text{M-H}]^-$  tại  $m/z$  471,3465 (tính toán cho  $\text{C}_{30}\text{H}_{47}\text{O}_4$  là 471,3474) cho phép xác định công thức phân tử của **AGE1** là  $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_4$ . Các dữ liệu phổ trên gợi ý cho cấu trúc của một hợp chất triterpene khung oleanane. Trên phổ HMBC, tương tác giữa H-12 ( $\delta_{\text{H}}$  5,15) với C-14 ( $\delta_{\text{C}}$  41,3) và C-18 ( $\delta_{\text{C}}$  40,7) cho biết vị trí của liên kết đôi tại C-12/C-13. Tương tác của H-23 ( $\delta_{\text{H}}$  0,87) với C-3 ( $\delta_{\text{C}}$  68,3), C-4 ( $\delta_{\text{C}}$  42,4) và C-

5 ( $\delta_C$  48,8); Ha-24 ( $\delta_H$  3,45) và Hb-24 ( $\delta_H$  3,19) với C-3 ( $\delta_C$  68,3), C-4 ( $\delta_C$  42,4) và C-5 ( $\delta_C$  48,8) cho biết vị trí của nhóm methyl (C-23) và nhóm hydroxymethylene (C-24) tại vị trí C-4. Tín hiệu của proton H-3 xuất hiện dưới dạng broad singlet gợi ý cho cấu hình  $\beta$  của H-3 và cấu hình  $\alpha$  của nhóm 3-OH. Kết hợp các dữ liệu phổ trên và so sánh số liệu phổ của **AGE1** với các số liệu có trong tài liệu tham khảo[20], hợp chất **AGE1** được xác định là 3 $\alpha$ ,24-dihydroxy-olean-12-en-28-oic acid.

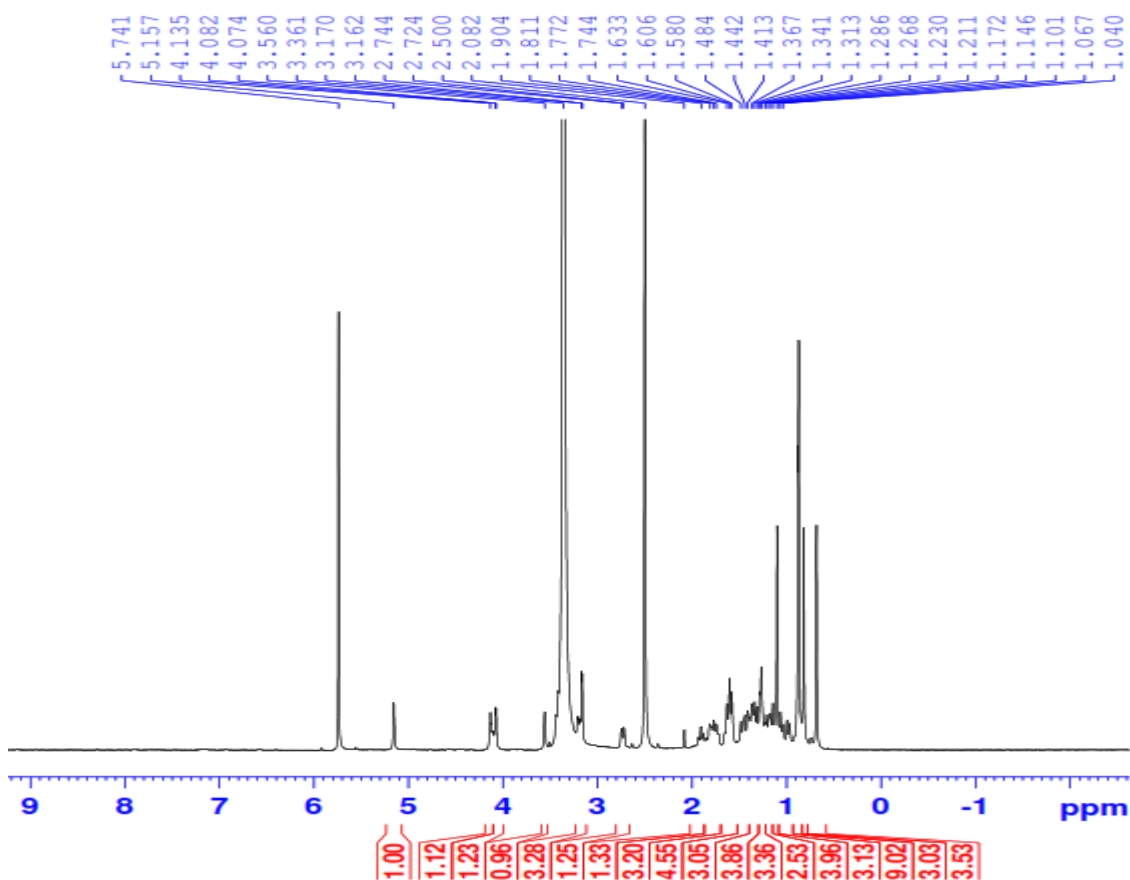
*Bảng 4.1. Số liệu phổ NMR của hợp chất AGE1 và hợp chất tham khảo*

C	$\delta_C^{\#}$	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ (mult, J = Hz)
1	33,9	32,1	1,42 (1H)/1,60* (1H)
2	26,5	27,1	0,98 (1H)/1,61* (1H)
3	70,0	68,3	3,56 (br.s)
4	43,9	42,4	-
5	50,2	48,8	1,25* (1H)
6	19,1	18,0	1,26* (1H)/1,39* (1H)
7	33,8	32,8	1,20* (1H)/1,31* (1H)
8	40,0	40,0	-
9	48,2	47,0	1,58 (1H)
10	37,5	36,5	-
11	24,0	23,0	1,78 (1H)/1,83 (1H)
12	122,6	121,5	5,15 (br.s)
13	144,8	143,8	-
14	42,2	41,3	-
15	28,3	25,2	1,35* (1H)/1,73 (1H)
16	23,7	22,6	1,47 (1H)/1,90 (1H)
17	46,7	45,4	-
18	42,0	40,7	*
19	46,5	45,7	1,02 (1H)/1,59 (1H)
20	31,0	30,4	-
21	34,3	33,3	1,12* (1H)/1,30* (1H)

22	33,2	32,8	1,21 (1H)/1,35* (1H)
23	23,6	22,6	0,87 (s)
24	65,8	64,1	3,45 * 3,19 ( m)
25	15,9	15,3	0,81 (s)
26	17,4	16,7	0,68 ( s)
27	26,1	25,6	1,10 (s)
28	180,2	178,6	-
29	33,2	32,8	0,88 (s)
30	23,8	23,3	0,87 (s)

<sup>a</sup>đo trong DMSO-d<sub>6</sub>, <sup>b</sup>125 MHz, <sup>c</sup>500 MHz, \* tín hiệu chập

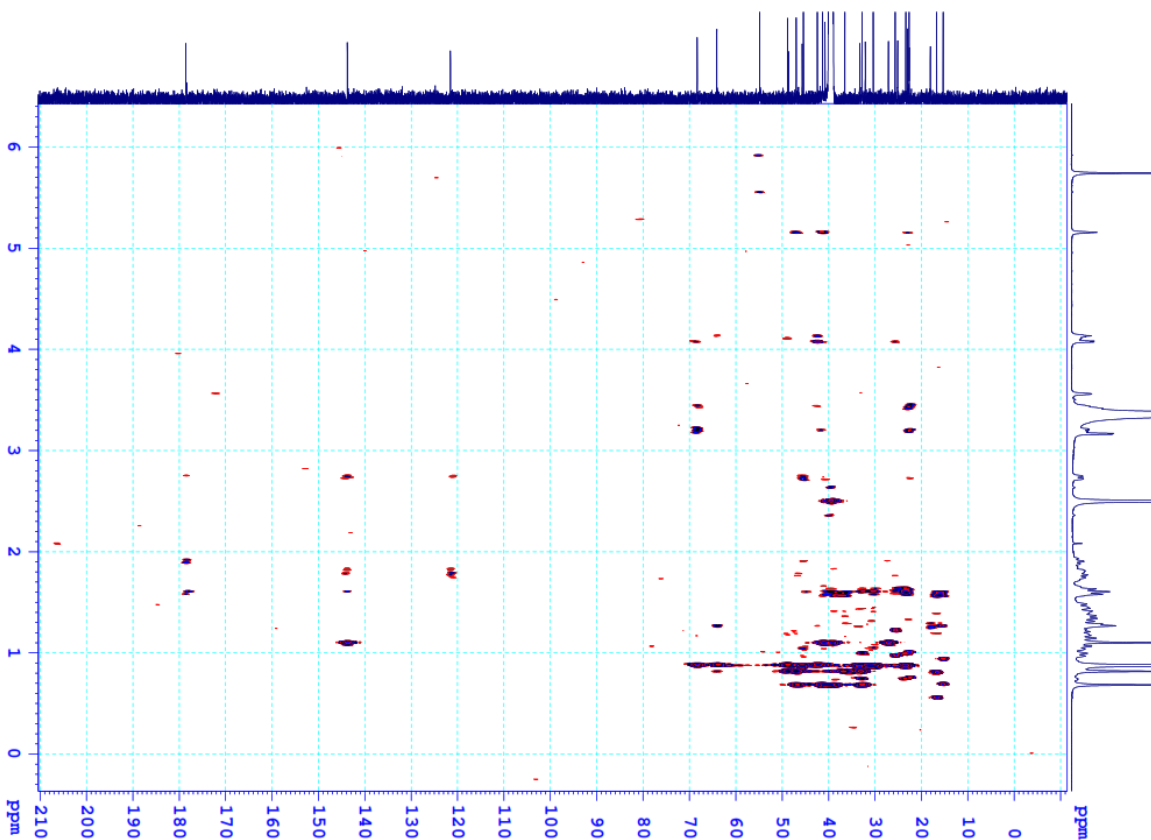
# $\delta_C$  của 3 $\alpha$ ,24-dihydroxy-olean-12-en-28-oic acid đo trong pyridine-d<sub>5</sub>[20]



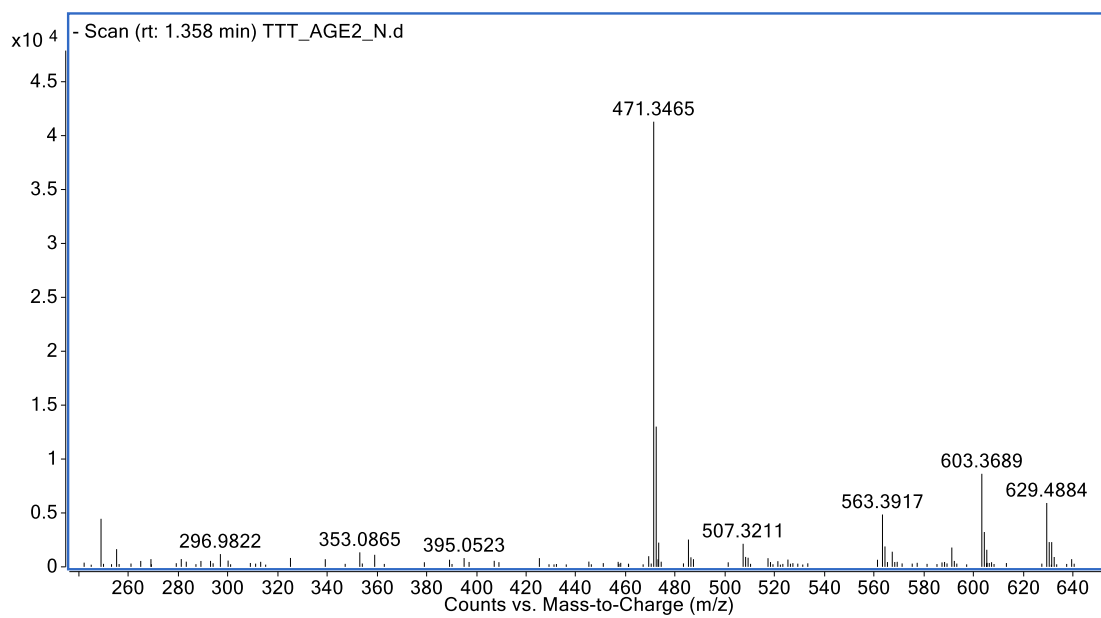
Hình 4.3. Phổ <sup>1</sup>H-NMR của hợp chất AGE1





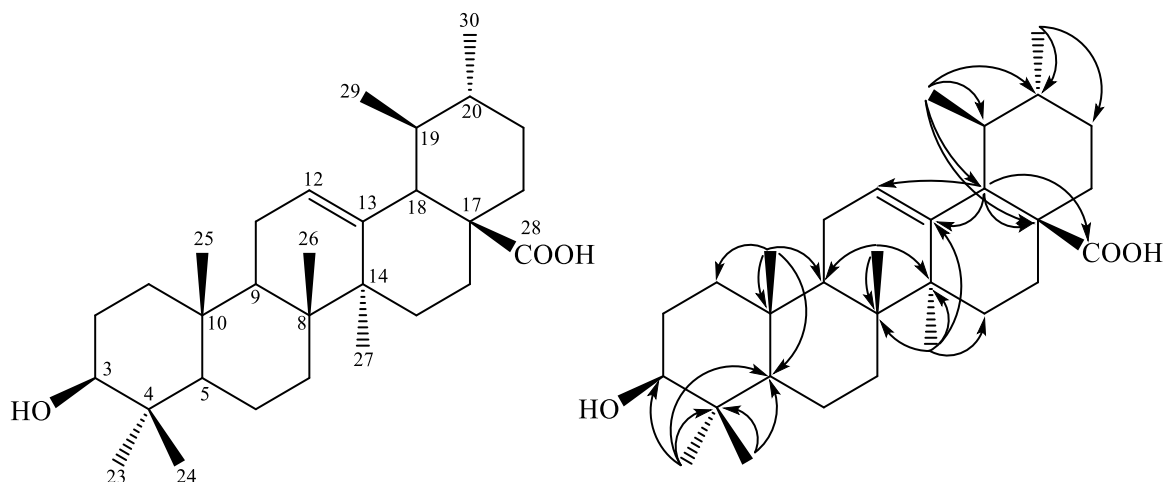


Hình 4.6. Phổ HMBC của hợp chất AGE1



Hình 4.7. Phổ HR-ESI-MS của hợp chất AGE1

#### 4.2.1.2. Hợp chất AGE2: Ursolic acid



Hình 4.8. Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC chính của hợp chất AGE2

Hợp chất **AGE2** được phân lập dưới dạng chất bột màu trắng. Phổ  $^1\text{H-NMR}$  cho biết tín hiệu cộng hưởng của 7 nhóm methyl trong đó có 5 nhóm methyl bậc ba tại  $\delta_{\text{H}}$  1,03 (3H, s, H-23), 0,67 (3H, s, H-24), 0,84 (3H, s, H-25), 0,74 (3H, s, H-26), 0,89 (3H, s, H-27) và 2 nhóm methyl bậc hai tại  $\delta_{\text{H}}$  0,81 (3H, d,  $J = 6,6$  Hz, H-29) và 0,91 (3H, d,  $J = 6,6$  Hz, H-30), một proton nhóm hydroxymethine tại  $\delta_{\text{H}}$  3,00 (1H, m), một proton nhóm methine olefin tại  $\delta_{\text{H}}$  5,14 (1H, br.s, H-12). Phổ  $^{13}\text{C-NMR}$  xuất hiện tín hiệu của 30 cacbon được quy gán nhờ phổ HSQC thuộc về 7 nhóm methyl, 9 nhóm methylene, 7 nhóm methine trong đó có một nhóm hydroxymethine ( $\delta_{\text{C}}$  76,8), một nhóm methine olefin ( $\delta_{\text{C}}$  124,5); và 7 cacbon không liên kết với hydro trong đó có một cacbon olefin ( $\delta_{\text{C}}$  138,1) và một cacbon nhóm carboxyl ( $\delta_{\text{C}}$  178,2). Khi so sánh với hợp chất **AGE1** thì thấy cấu trúc của hợp chất **AGE2** có ít hơn một nhóm hydroxymethylene, nhiều hơn 1 nhóm methyl, ít hơn một cacbon bậc 4 nhưng lại nhiều hơn 2 nhóm methine. Những dữ liệu trên dẫn đến gợi ý **AGE2** là một hợp chất triterpene khung ursane. Phân tích các tương tác trên phổ HMBC và so sánh số liệu phổ  $^{13}\text{C-NMR}$  của **AGE2** với các hợp chất triterpene dạng carboxylic acid khung ursane, sự tương đồng giữa các số liệu của **AGE2** với số liệu của ursolic acid[21] cho phép xác định hợp chất **AGE2** chính là ursolic acid.

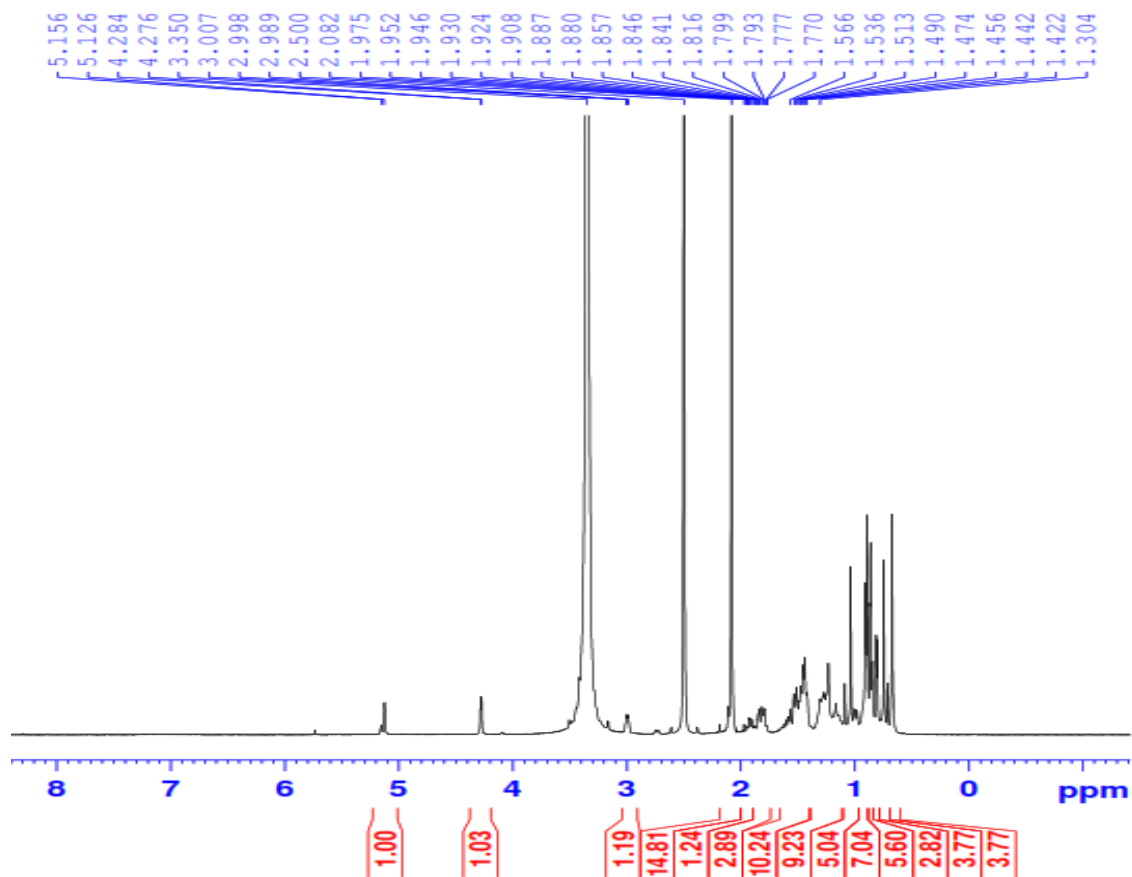
Bảng 4.2. Số liệu phổ NMR của hợp chất **AGE2** và hợp chất tham khảo

C	$\delta_C^{\#}$	$\delta_H^{\#}$ (mult, $J = \text{Hz}$ )	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ (mult, $J = \text{Hz}$ )
1	39,47		38,2	1,50 (1H)/1,53 (1H)
2	28,22		27,0	1,43 (1H)/1,48 (1H)
3	76,64	3,00 (1H, dd, 6,4, 12,0)	76,9	3,00 (1H, m)
4	38,42		38,4	-
5	54,75		54,8	0,66 (1H)
6	17,97		18,0	1,29 (1H)/1,46 (1H)
7	32,81		32,7	1,25 (1H)/1,42 (1H)
8	40,10		40,0	-
9	47,06		47,0	1,45 (1H)
10	36,57		36,5	-
11	23,23		22,8	1,82 (2H)
12	124,46	5,16 (1H, br.s)	124,6	5,14 (1H, br.s)
13	138,09		138,2	-
14	41,61		41,7	-
15	27,51		27,5	1,00 (1H)/1,80 (1H)
16	23,79		23,8	1,51 (1H)/1,92 (1H)
17	46,79		46,8	-
18	52,35	2,73 (1H, d, 16,0)	52,4	2,10 (1H)
19	39,89		38,4	1,30 (1H)
20	39,89		38,5	0,90 (1H)
21	30,12		30,2	1,25 (1H)/1,42 (1H)
22	36,49		36,3	1,52 (1H)/1,58 (1H)
23	28,22	1,04 (3H, s)	28,3	0,89 (3H, s)
24	15,19	0,85 (3H, s)	16,1	0,67 (3H, s)
25	15,99	0,72 (3H, s)	15,2	0,84 (3H, s)
26	16,90	0,90 (3H, s)	16,9	0,74 (3H, s)
27	23,23	0,92 (3H, s)	23,3	0,89 (3H, s)
28	178,30		178,3	1,03 (3H, s)
29	16,99	0,75 (3H, d, 4,0)	17,0	0,81 (3H, d, 6,6)

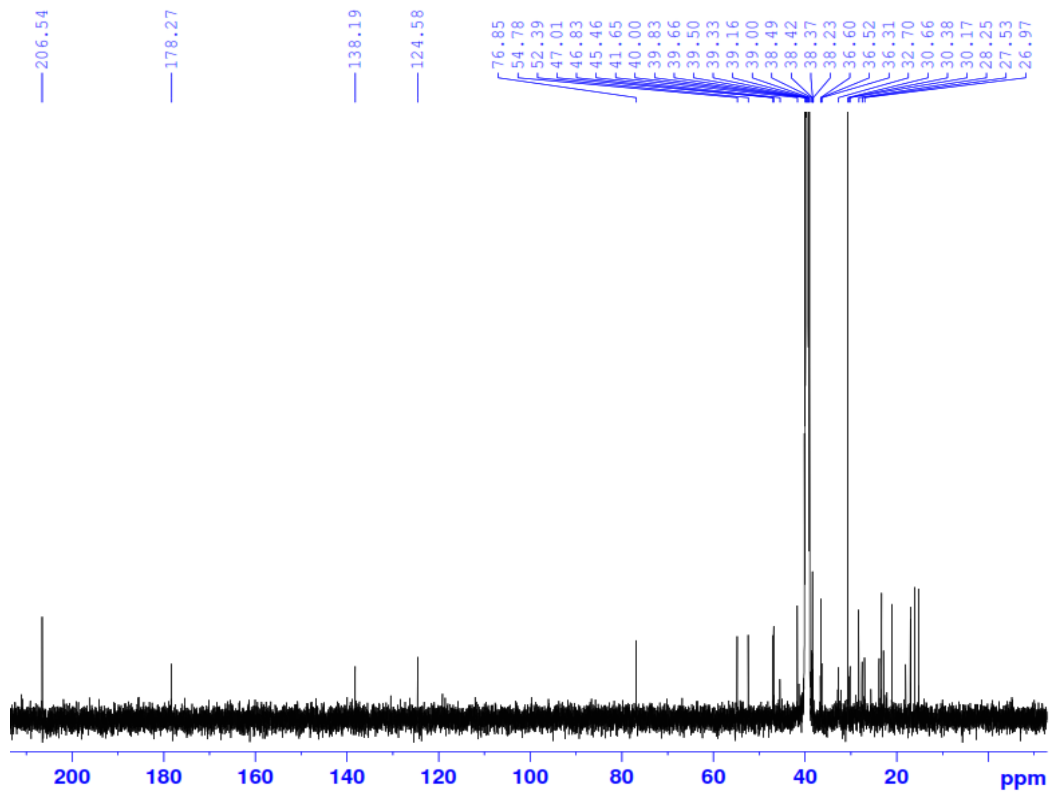
30	21,05	0,82 (3H, d, 5,0)	21,1	0,91 (3H, d, 6,6)
OH		4,31 (1H, br.s)		4,28 (1H, d, 4,8)

<sup>a</sup>đo trong DMSO-d<sub>6</sub>, <sup>b</sup>150 MHz, <sup>c</sup>600 MHz

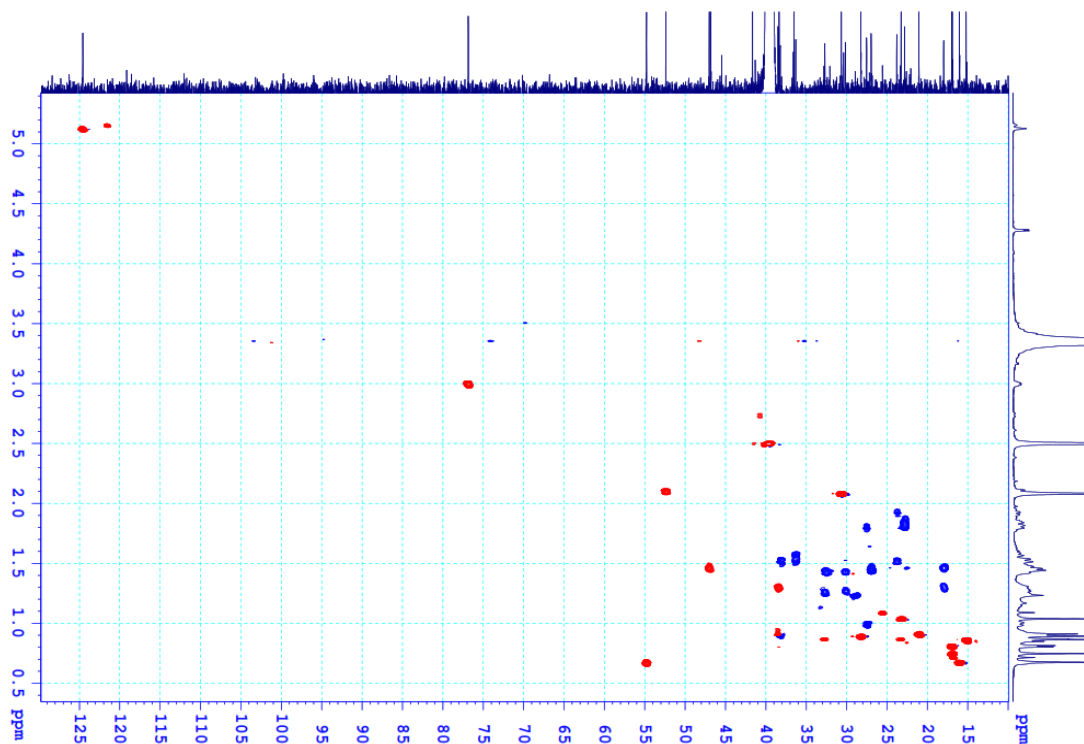
#δ<sub>C</sub> của ursolic acid đo trong DMSO-d<sub>6</sub>[21]



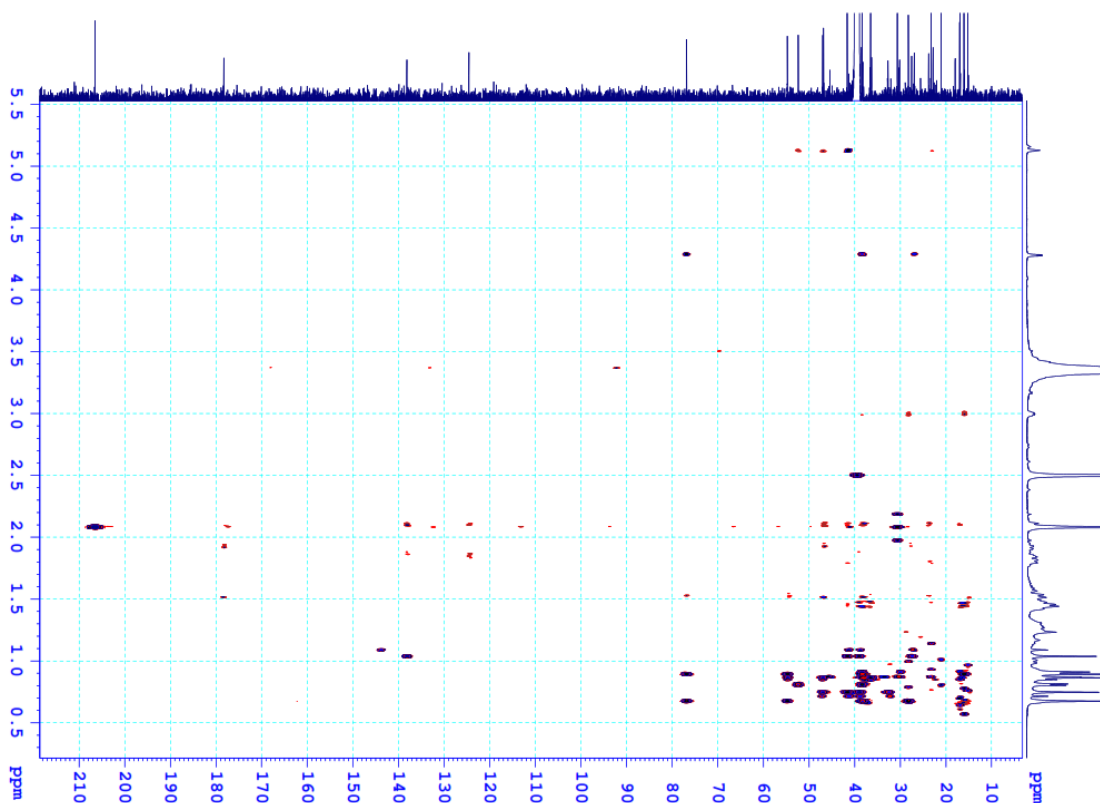
Hình 4.9. Phổ <sup>1</sup>H-NMR của hợp chất AGE2



Hình 4.10. Phổ  $^{13}\text{C}$ -NMR của hợp chất AGE2

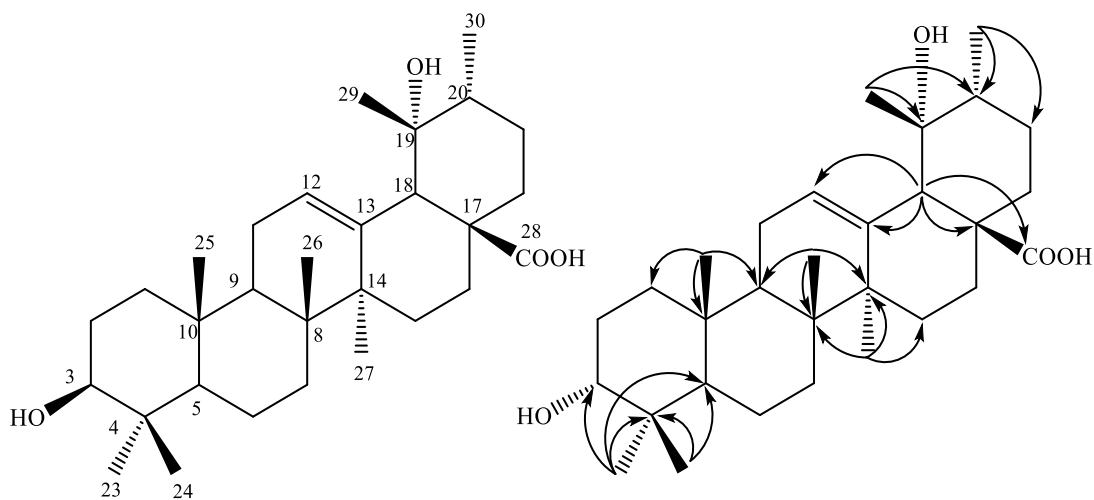


Hình 4.11. Phổ HSQC của hợp chất AGE2



Hình 4.12. Phổ HMBC của hợp chất AGE2

#### 4.2.1.3. Hợp chất AGE3: Pomolic acid



Hình 4.13. Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC chính của hợp chất AGE3

Hợp chất **AGE3** được phân lập dưới dạng chất bột, màu trắng. Phổ  $^1\text{H-NMR}$  cho biết tín hiệu của 7 nhóm methyl, bao gồm 6 nhóm methyl bậc ba tại  $\delta_{\text{H}}$  0,99 (3H, s, H-23), 0,80 (3H, s, H-24), 0,96 (3H, s, H-25), 0,81 (3H, s, H-26), 1,35 (3H, s, H-

27), 1,21 (3H, s, H-29) và một nhóm methyl bậc hai tại  $\delta_H$  0,93 (3H, d,  $J = 6,6$  Hz, H-30), một nhóm hydroxymethine tại  $\delta_H$  3,17 (1H, dd,  $J = 4,8, 11,4$  Hz, H-3), một nhóm methine olefin tại  $\delta_H$  5,30 (1H, t,  $J = 3,6$  Hz, H-12). Phổ  $^{13}\text{C}$ -NMR và DEPT xuất hiện tín hiệu của 30 cacbon bao gồm 7 nhóm methyl, 9 nhóm methylene, 6 nhóm methine trong đó có một nhóm hydroxymethine ( $\delta_C$  79,8) và một nhóm methine olefin ( $\delta_C$  129,4), cùng với 8 cacbon không liên kết với hydro trong đó có một cacbon liên kết với oxy ( $\delta_C$  73,6), một cacbon olefin ( $\delta_C$  139,9) và một cacbon nhóm carboxyl ( $\delta_C$  182,3). Phổ khối phân giải cao HR-ESI-MS xuất hiện pic  $[\text{M}-\text{H}]^-$  tại  $m/z$  471,3462 cho phép xác định công thức phân tử của **AGE3** là  $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_4$  cho biết độ bất bão hòa trong phân tử **AGE3** bằng 7 bao gồm 1 liên kết đôi, 1 nhóm  $\text{C}=\text{O}$  và 5 vòng. Các dữ liệu này gợi ý **AGE3** là một hợp chất triterpene 5 vòng có một liên kết đôi trong vòng và một nhóm carboxyl. So sánh phổ của **AGE3** với **AGE2** cho thấy **AGE3** có ít hơn **AGE2** một nhóm methine và nhiều hơn 1 cacbon bậc 4 gắn với oxy. Như vậy cấu trúc của **AGE3** có thể là dẫn xuất của **AGE2** trong đó một proton của nhóm methine đã bị thay thế bởi một nhóm  $-\text{OH}$ . Trên phổ HMBC, tương tác giữa H-29 ( $\delta_H$  1,21) với C-18 ( $\delta_C$  55,0), C-19 ( $\delta_C$  73,6), C-20 ( $\delta_C$  43,0) và H-30 ( $\delta_H$  0,93) với C-19 ( $\delta_C$  73,6), C-20 ( $\delta_C$  43,0), C-21 ( $\delta_C$  26,6) cho phép xác định vị trí của nhóm 29- $\text{CH}_3$  gắn vào khung tại vị trí C-19, nhóm 30- $\text{CH}_3$  gắn vào khung tại vị trí C-20 và tại vị trí C-19 có một nhóm  $-\text{OH}$ . Dạng tín hiệu của proton H-3 dưới dạng double doublet ( $J = 4,8, 11,4$  Hz) cho phép xác định cấu hình  $\beta$  của nhóm  $-\text{OH}$  tại vị trí C-3. Kết hợp các dữ liệu trên và so sánh số liệu phổ  $^{13}\text{C}$ -NMR của **AGE3** với các số liệu của hợp chất pomolic acid[22] (bảng 3.3), sự tương đồng giữa các số liệu cho phép xác định **AGE3** chính là pomolic acid.

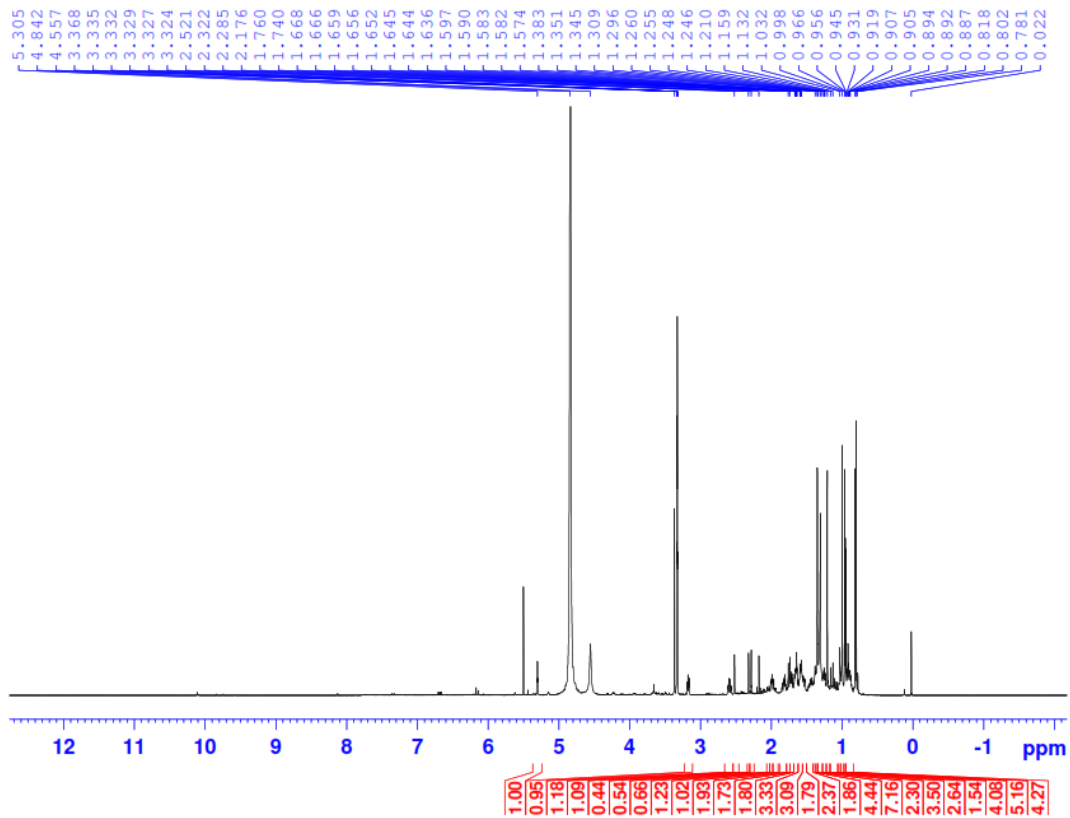
Bảng 4.3. Số liệu phổ NMR của hợp chất **AGE3** và hợp chất tham khảo

C	$\delta_C^{\#}$	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ (mult, $J = \text{Hz}$ )
1	39,4	39,8	1,01 (1H)/1,65 (1H)
2	28,1	27,2	1,22 (1H)/1,75 (1H)
3	78,2	79,8	3,17 (dd, 4,8, 11,4)
4	39,4	39,8	-
5	55,9	56,7	0,79 (1H)

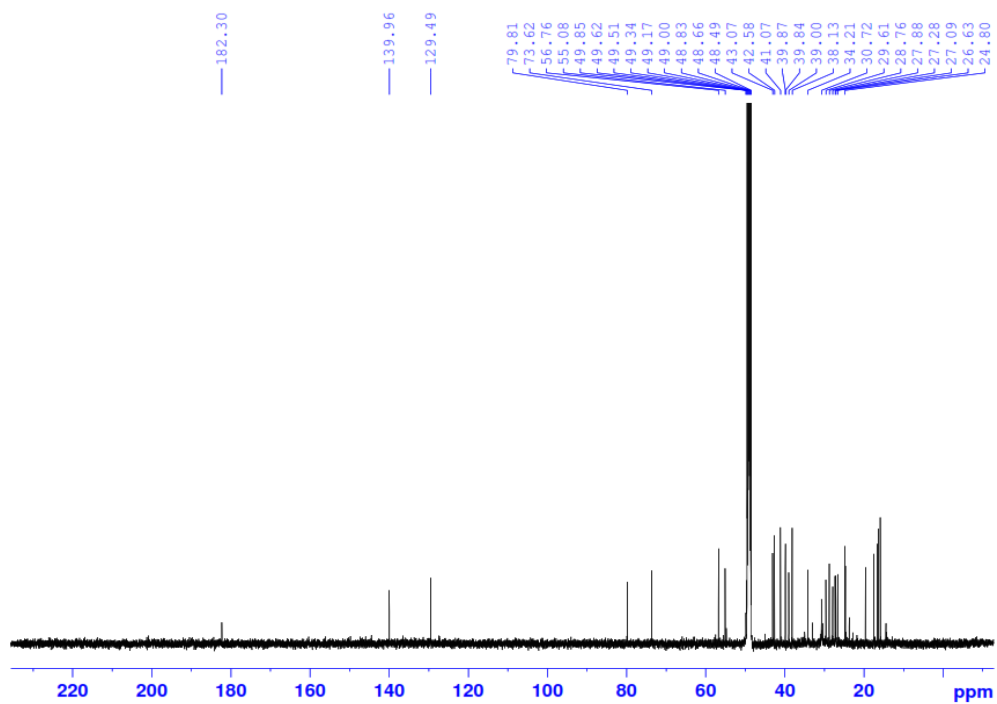


6	18,9	19,6	1,41 (1H)/1,59* (1H)
7	33,6	34,2	1,32 (1H)/1,58* (1H)
8	40,3	41,0	-
9	47,8	48,4	1,70 (1H)
10	37,3	38,1	-
11	24,0	24,6	2,00 (2H)
12	128,0	129,4	5,30 (t, 3,6)
13	140,0	139,9	-
14	42,1	42,5	-
15	29,3	29,6	1,01 (1H)/1,81 (1H)
16	26,4	27,8	1,59* (1H)/1,62* (1H)
17	48,4	49,6	-
18	54,6	55,0	2,52 (br.s)
19	72,7	73,6	-
20	42,4	43,0	1,39 (1H)
21	26,9	26,6	1,52 (1H)/2,59 (1H)
22	37,3	39,0	1,62* (1H)/1,73 (1H)
23	28,8	28,7	0,99 (s)
24	16,8	15,8	0,80 (s)
25	16,5	16,3	0,96 (s)
26	17,4	17,5	0,81 (s)
27	24,7	24,8	1,35 (s)
28	180,8	182,3	-
29	27,1	27,0	1,21 (s)
30	16,5	16,5	0,93 (d, 6,6)

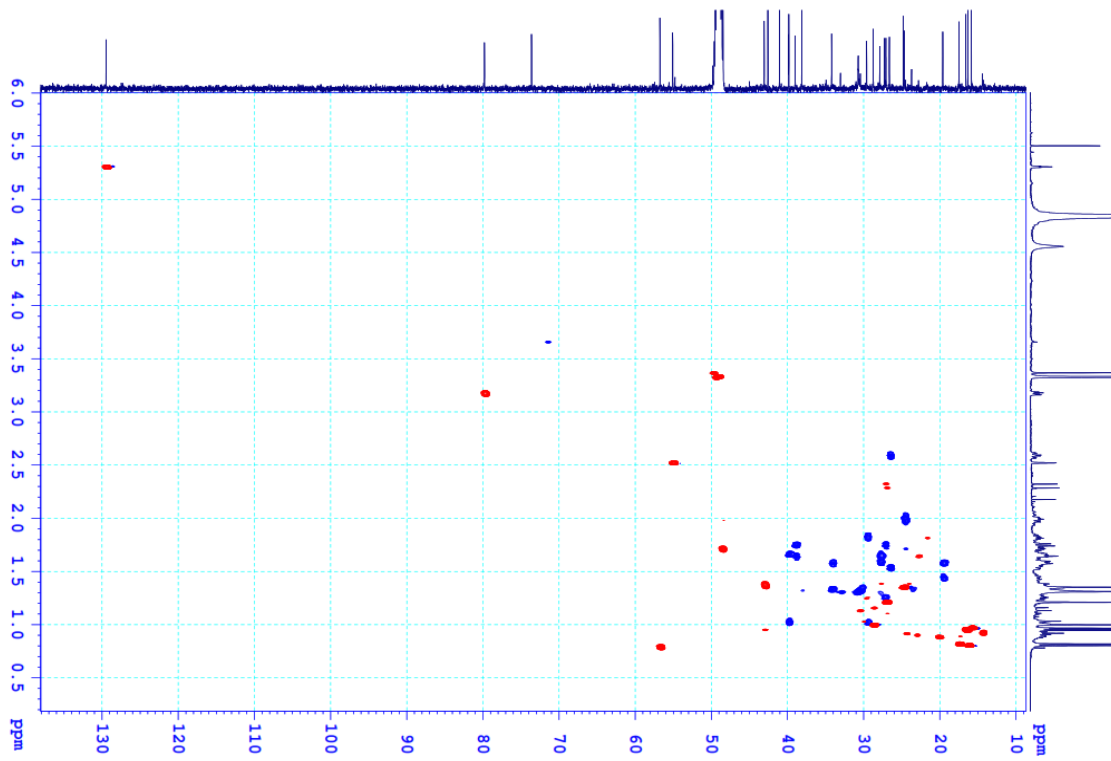
<sup>a</sup>đo trong CD<sub>3</sub>OD, <sup>b</sup>150 MHz, <sup>c</sup>600 MHz  
 $\delta_c^\#$  của pomolic acid đo trong pyridine-d<sub>5</sub>[22]



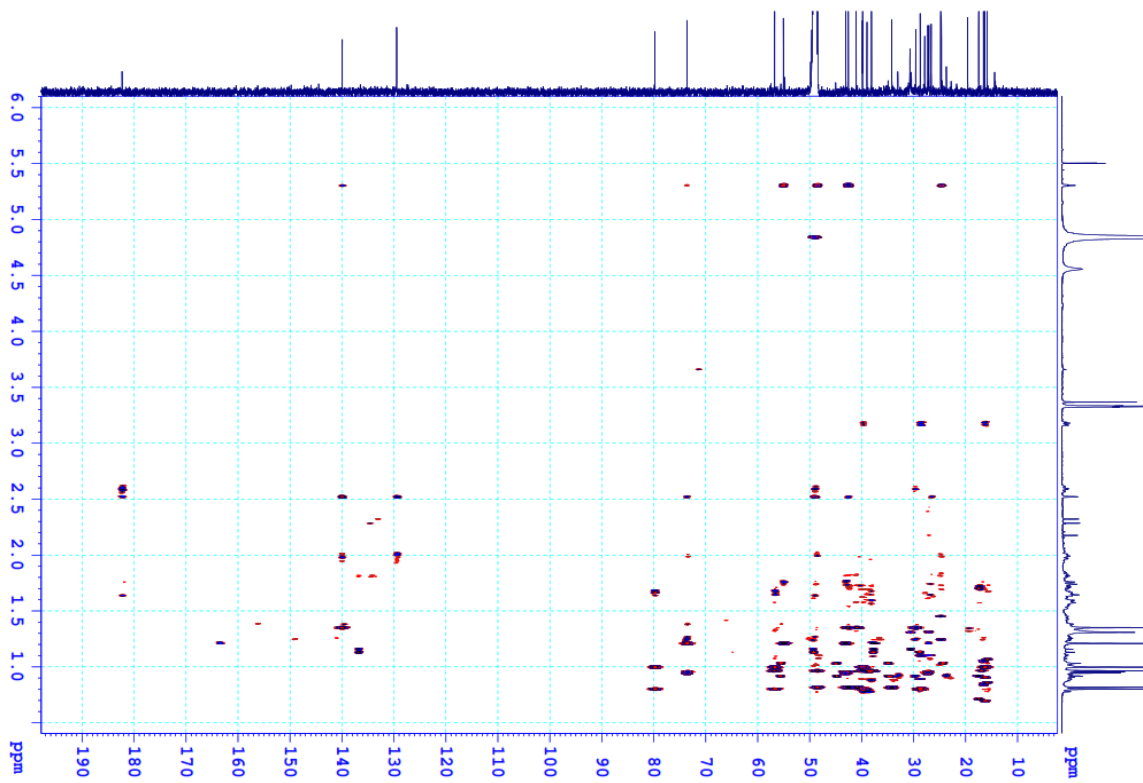
Hình 4.14. Phổ  $^1\text{H-NMR}$  của hợp chất AGE3



Hình 4.15. Phổ  $^{13}\text{C-NMR}$  của hợp chất AGE3

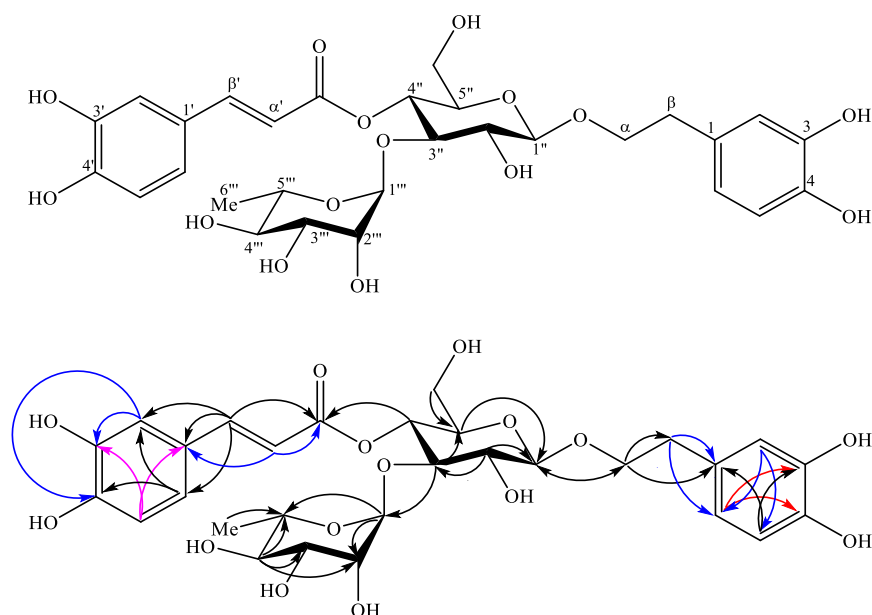


Hình 4.16. Phổ HSQC của hợp chất AGE3



Hình 4.17. Phổ HMBC của hợp chất AGE3

#### 4.2.1.4. Hợp chất AGE4: Verbascoside



Hình 4.18. Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC chính của hợp chất AGE4

Hợp chất AGE4 được phân lập dưới dạng chất rắn, màu vàng. Phổ  $^1\text{H-NMR}$  xuất hiện các tín hiệu tại  $\delta_{\text{H}}$  6,71 (1H, d,  $J = 2,0$  Hz, H-2), 6,69 (1H, d,  $J = 8,0$  Hz, H-5), 6,58 (1H, dd,  $J = 2,0, 8,0$  Hz, H-6), 4,07 (1H, m, Ha- $\alpha$ ), 3,74 (1H, m, Hb- $\alpha$ ), 2,81 (2H, dt,  $J = 3,0, 7,5$  Hz, H- $\beta$ ) của một nhóm 3,4-dihydroxyphenylethyl. Tín hiệu của 2 proton thuộc một liên kết đôi cấu hình *trans* tại  $\delta_{\text{H}}$  6,27 (1H, d,  $J = 16,0$  Hz, H- $\alpha'$ ) và 7,59 (1H, d,  $J = 16,0$  Hz, H- $\beta'$ ) cùng với tín hiệu của một hệ ABX tại  $\delta_{\text{H}}$  7,07 (1H, d,  $J = 1,8$  Hz, H-2'), 6,79 (1H, d,  $J = 8,2$  Hz, H-5'), 6,97 (1H, dd,  $J = 8,2, 1,8$  Hz, H-6') cho biết sự có mặt của một nhóm *trans*-caffeoyl. Ngoài ra, phổ  $^1\text{H-NMR}$  còn xuất hiện tín hiệu của một đơn vị đường glucose tại  $\delta_{\text{H}}$  4,39 (1H, d,  $J = 8,0$  Hz, H-1''), 3,41 (1H, dd,  $J = 8,0, 9,0$  Hz, H-2''), 3,83 (1H, t,  $J = 9,0$  Hz, H-3''), 4,93 (1H, t,  $J = 9,5$  Hz, H-4''), 3,54 (1H, m, H-5''), 3,63 (1H, m, Ha-6'') và 3,54 (1H, m, Hb-6''); cùng với một đơn vị đường rhamnose tại  $\delta_{\text{H}}$  5,20 (1H, d,  $J = 1,5$  Hz, H-1'''), 3,93 (1H, dd,  $J = 2,0, 3,5$  Hz, H-2'''), 3,60\* (1H, H-3'''), 3,32\* (1H, H-4'''), 3,57\* (1H, H-5'''), 1,10 (3H, d,  $J = 6,0$  Hz, H-6'''). Phổ  $^{13}\text{C-NMR}$  xuất hiện tín hiệu của 29 cacbon được quy gán nhờ phổ HSQC tương ứng với 8 cacbon của nhóm 3,4-dihydroxyphenylethyl, 9 cacbon của nhóm *trans*-caffeoyl trong đó nhóm carbonyl

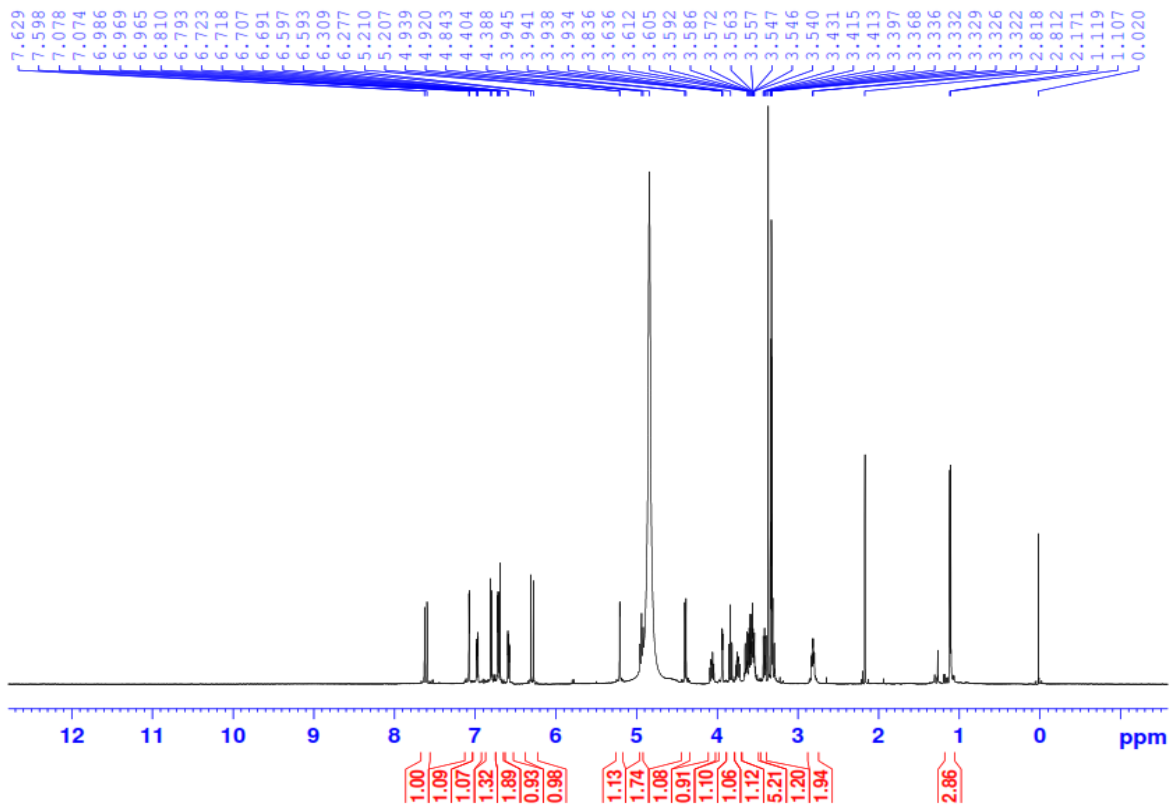
este xuất hiện tại  $\delta_C$  168,3, 6 cacbon của đơn vị đường glucose và 6 cacbon của đơn vị đường rhamnose. Các tương tác trên phổ HMBC cho phép kết nối các nhóm trong cấu trúc của **AGE4** với nhau. Tương tác giữa H-4'' ( $\delta_H$  4,93) với nhóm -COO ( $\delta_C$  168,3) cho biết nhóm *trans*-caffeoyl gắn vào đường glucose tại vị trí C-4''. Tương tác giữa H-1''' ( $\delta_H$  5,20) với C-3'' ( $\delta_C$  81,6) và H-3'' ( $\delta_H$  3,83) với C-1''' ( $\delta_C$  103,0) cho phép xác định nhóm rhamnosyl liên kết với nhóm glycosyl tại vị trí C-3''. Tương tác giữa H-1'' ( $\delta_H$  4,39) với C- $\alpha$  ( $\delta_C$  72,2) và H- $\alpha$  ( $\delta_H$  3,74/4,07) với C-1'' ( $\delta_C$  104,2) cho phép xác định nhóm glycosyl liên kết với nhóm 3,4-dihydroxyphenylethyl tại vị trí C- $\alpha$ . Kết hợp các dữ liệu phổ trên, cấu trúc của **AGE4** được xác định là hợp chất 3,4-dihydroxy- $\beta$ -phenylethoxy-*O*-[4''- $\beta$ -caffeoyl- $\alpha$ -rhamnopyranosyl-(1''',3'')-*O*- $\beta$ -glucopyranoside] được gọi là verbascoside. Số liệu phổ  $^1\text{H}$  và  $^{13}\text{C}$ -NMR của **AGE4** cũng được so sánh với các số liệu tương ứng của verbascoside[23] (bảng 3.4), sự tương đồng giữa các số liệu một lần nữa khẳng định cấu trúc của **AGE4** là verbascoside.

Bảng 4.4. Số liệu phổ NMR của hợp chất **AGE4** và hợp chất tham khảo

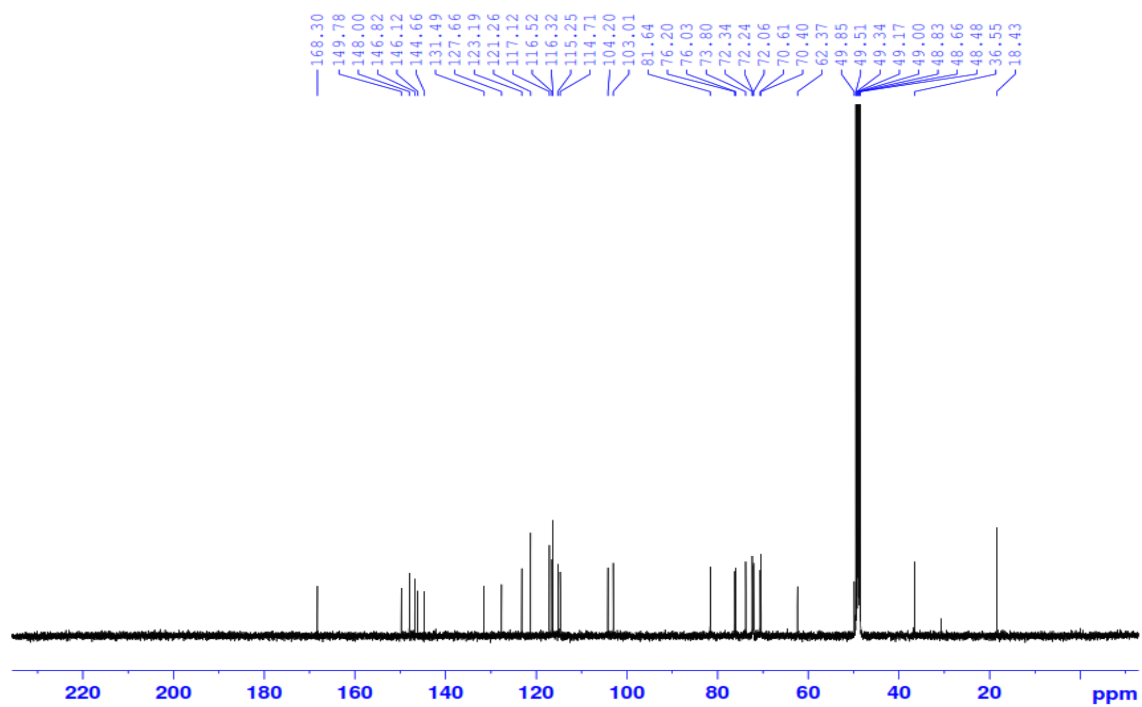
C	$\delta_C^{\#}$	$\delta_H^{\#}$ (mult, $J = \text{Hz}$ )	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ (mult, $J = \text{Hz}$ )
<i>Aglycone</i>				
1	131,5	-	131,4	-
2	116,3	6,69 (d, 2,2)	117,1	6,71 (d, 2,0)
3	144,7	-	146,1	-
4	146,1	-	144,6	-
5	117,1	6,69 (d, 8,6)	116,3	6,69 (d, 8,0)
6	121,3	6,57 (dd, 1,7, 8,0)	121,2	6,58 (dd, 2,0, 8,0)
$\alpha$	72,3	3,80 (m) 4,15 (m)	72,2	3,74 (m) 4,07 (m)
$\beta$	36,6	2,81 (t, 7,2)	36,5	2,81 (dt, 3,0, 7,5)
1'	127,7	-	127,6	-
2'	115,2	7,07 (d, 1,8)	115,2	7,07 (d, 2,0)
3'	148,0	-	146,8	-

4'	149,8	-	149,7	-
5'	116,5	6,79 (d, 8,2)	116,5	6,79 (d, 8,5)
6'	123,2	6,97 (dd, 1,6, 8,2)	123,1	6,96 (dd, 2,0, 8,5)
$\alpha'$	114,7	6,27 (d, 15,9)	114,7	6,27 (d, 16,0)
$\beta'$	146,8	7,54 (d, 15,9)	148,0	7,61 (d, 16,0)
C=O	168,3	-	168,3	-
<i>Glucose</i>				
1''	104,2	4,39 (d, 7,9)	104,2	4,39 (d, 8,0)
2''	76,0	3,41*	76,2	3,41 (dd, 8,0, 9,0)
3''	81,7	3,54 (m)	81,6	3,83 (t, 9,0)
4''	70,6	4,97 (m)	70,6	4,93 (t, 9,5)
5''	76,2	3,54 (m)	76,0	3,54 (m)
6''	62,4	3,63 (m) 3,84 (m)	62,3	3,54 (m) 3,63 (m)
<i>Rhamnose</i>				
1'''	103,3	5,20 (d, 1,1)	103,0	5,20 (d, 1,5)
2'''	72,3	3,94 (br.s)	72,3	3,93 (dd, 2,0, 3,5)
3'''	72,0	3,67*	72,0	3,60*
4'''	73,8	3,28*	73,8	3,32*
5'''	70,4	3,58*	70,4	3,57*
6'''	18,4	1,10 (d, 6,1)	18,4	1,10 (d, 6,0)

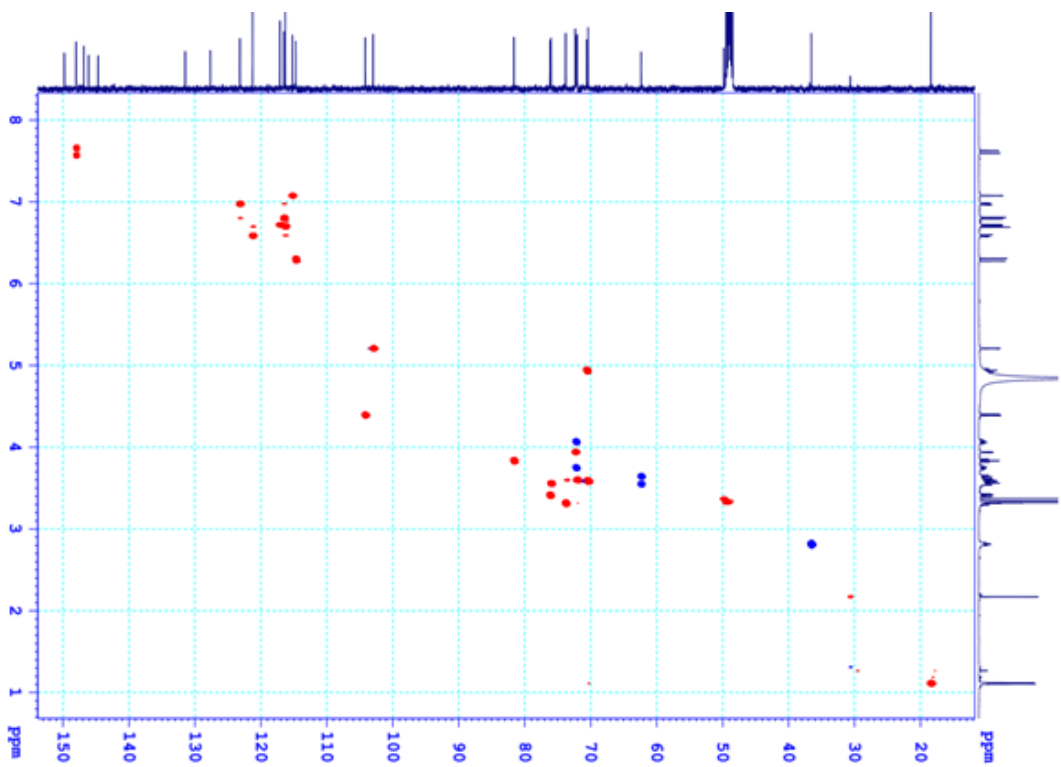
<sup>a</sup>đo trong CD<sub>3</sub>OD, <sup>b</sup>125 MHz, <sup>c</sup>500 MHz, \* tín hiệu chồng chập  
 $\delta_C^\#$ ,  $\delta_H^\#$  - độ chuyển dịch của verbascoside đo trong CD<sub>3</sub>OD[23]



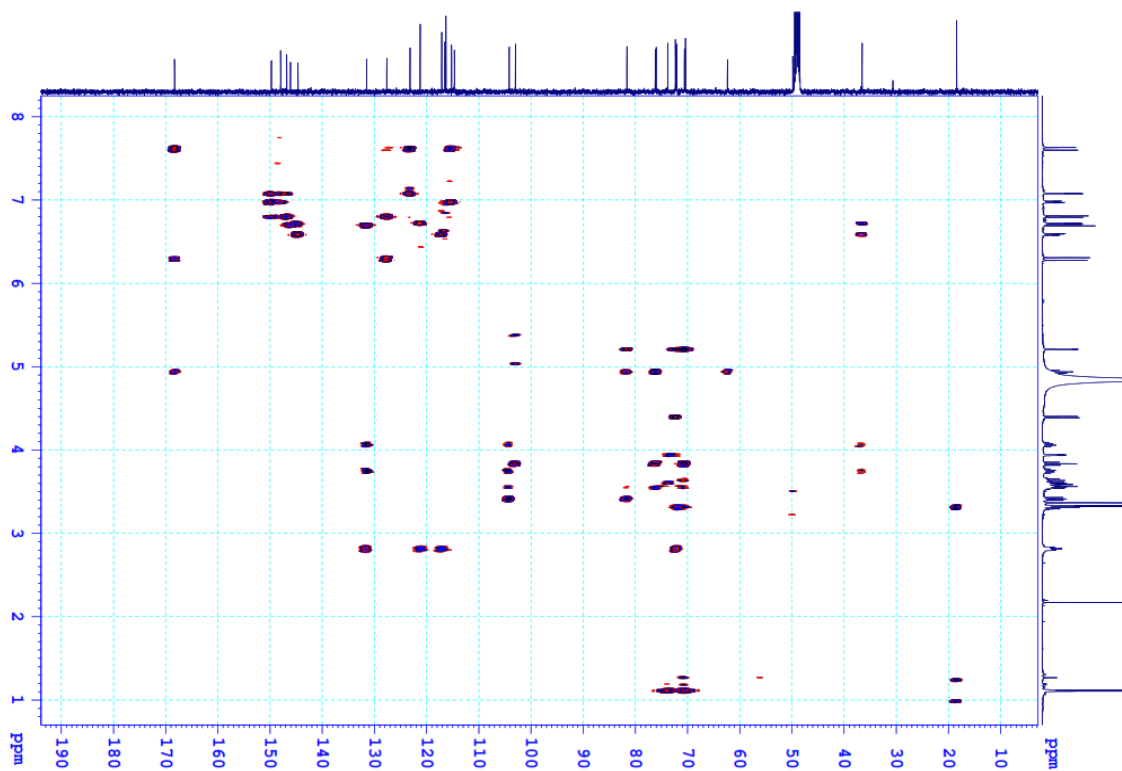
Hình 4.19. Phổ  $^1\text{H-NMR}$  của hợp chất AGE4



Hình 4.20. Phổ  $^{13}\text{C-NMR}$  của hợp chất AGE4



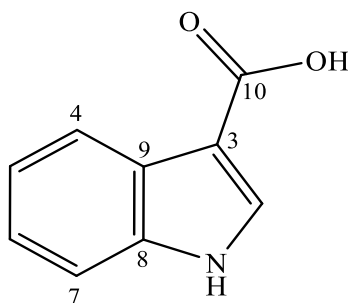
Hình 4.21. Phổ HSQC của hợp chất AGE4



Hình 4.22. Phổ HMBC của hợp chất AGE4



#### 4.2.1.5. Hợp chất AGE5: Indol-3-carboxylic acid



Hình 4.23. Cấu trúc hóa học của hợp chất AGE5

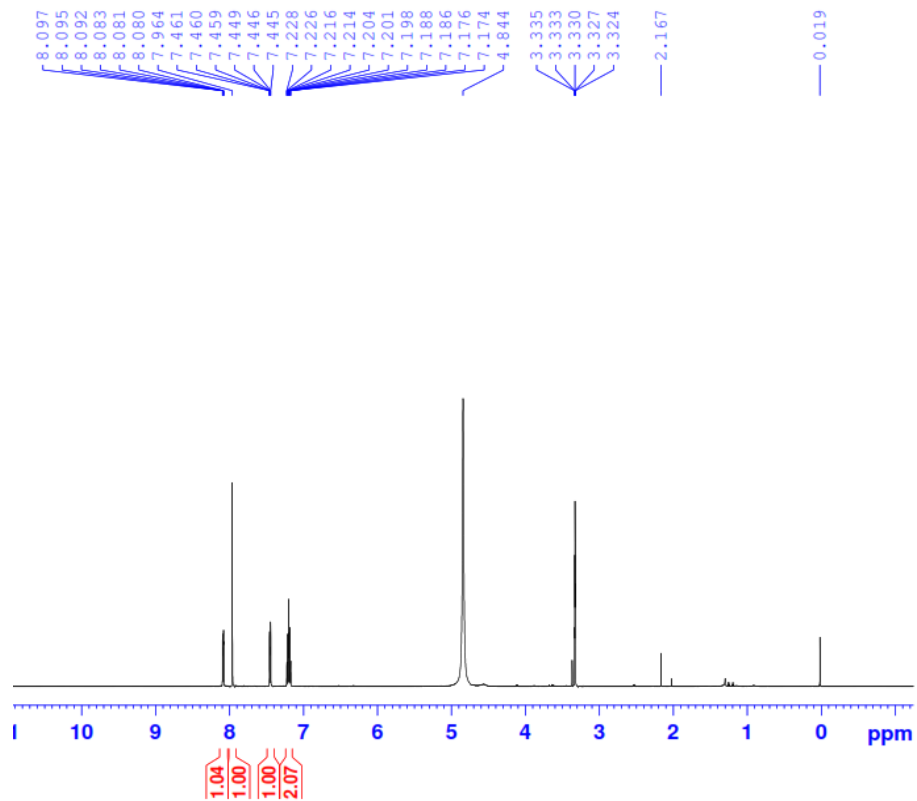
Hợp chất AGE5 được phân lập dưới dạng chất bột, màu trắng. Trên phổ  $^1\text{H-NMR}$  có tín hiệu của một vòng thơm thế 1,2 tại  $\delta_{\text{H}}$  7,18 (1H, dt,  $J = 1,2, 8,4$  Hz, H-5), 7,22 (1H, dt,  $J = 1,2, 8,4$  Hz, H-6), 7,44 (1H, dd,  $J = 1,2, 8,4$  Hz, H-7) và 8,09 (1H, dd,  $J = 1,2, 8,4$  Hz, H-4) và một proton olefin tại  $\delta_{\text{H}}$  7,96 (1H, s, H-2). Phổ  $^{13}\text{C-NMR}$  xuất hiện sự có mặt của 9 cacbon bao gồm một vòng benzen thế 1,2; một liên kết đôi và một nhóm carboxylic. Qua các dữ liệu phổ trên, AGE5 được xác định là một hợp chất carboxylic khung indole. So sánh số liệu phổ NMR của AGE5 với các số liệu của hợp chất indole-3-carboxylic acid[24], có sự tương đưng về mặt số liệu cho phép xác định hợp chất AGE5 chính là indol-3-carboxylic acid.

Bảng 4.5. Số liệu phổ NMR của hợp chất AGE5 và hợp chất tham khảo

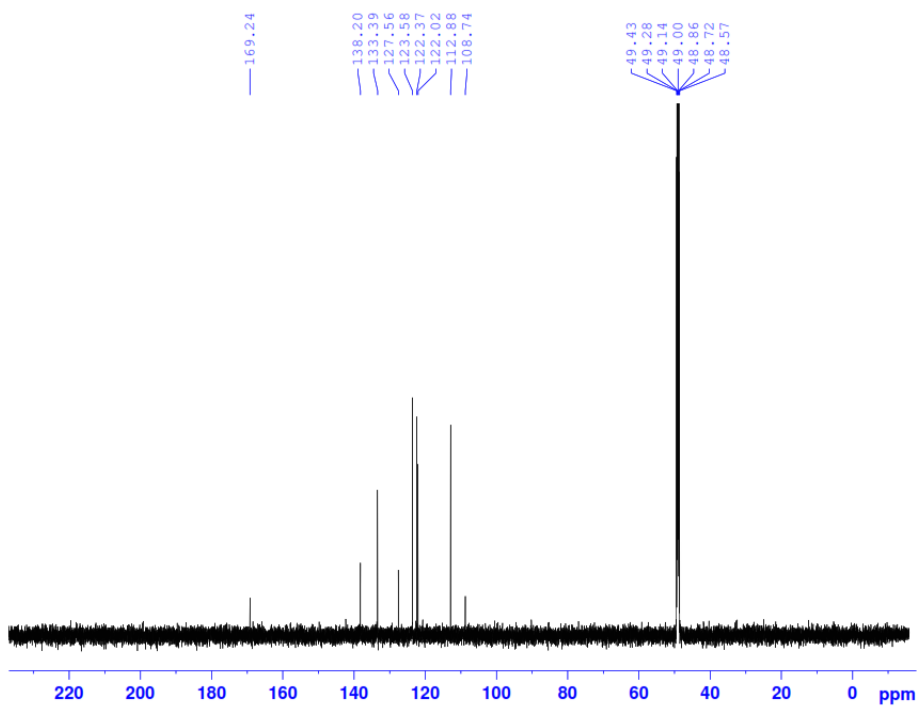
C	$\delta_{\text{C}}^{\#}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,c}}$ (mult, $J = \text{Hz}$ )
2	133,3	133,3	7,96 (s)
3	108,7	108,7	-
4	122,0	122,0	8,09 (dd, 1,2, 8,4)
5	122,3	122,3	7,18 (dt, 1,2, 8,4)
6	123,5	123,5	7,22 (dt, 1,2, 8,4)
7	112,8	112,8	7,44 (dd, 1,2, 8,4)
8	138,1	138,2	-
9	127,5	127,5	-
10	169,2	169,2	-

<sup>a</sup>đo trong  $\text{CD}_3\text{OD}$ , <sup>b</sup>150 MHz, <sup>c</sup>600 MHz

<sup>#</sup> $\delta_{\text{C}}$  của indol-3-carboxylic acid đo trong  $\text{CD}_3\text{OD}$ [24]

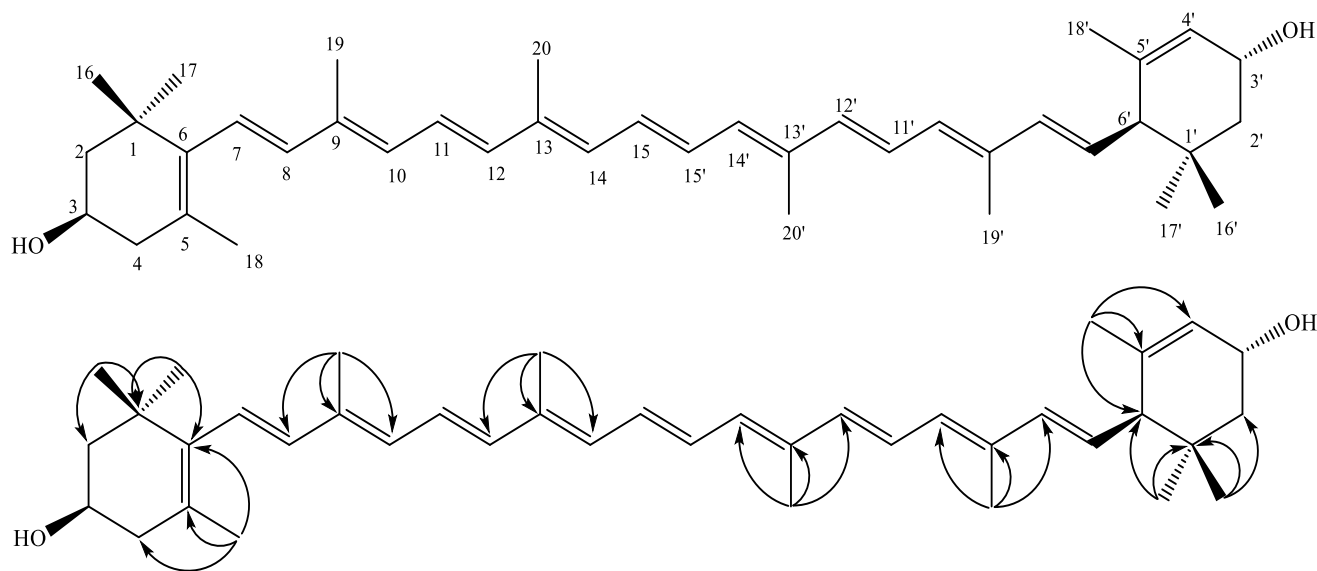


Hình 4.24. Phổ  $^1\text{H-NMR}$  của hợp chất AGE5



Hình 4.25. Phổ  $^{13}\text{C-NMR}$  của hợp chất AGE5

#### 4.2.1.6. Hợp chất AGE6: Lutein



Hình 4.26. Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC chính của hợp chất AGE6

Hợp chất AGE6 được phân lập dưới dạng chất rắn màu đỏ cam. Phổ  $^{13}\text{C}$ -NMR và DEPT của AGE6 cho biết sự có mặt của 40 carbon bao gồm 10 nhóm methyl tại  $\delta_{\text{C}}$  28,7 (C-16), 30,2 (C-17), 21,6 (C-18), 12,7 (C-19), 12,8 (C-20), 24,3 (C-16'), 29,5 (C-17'), 22,8 (C-18'), 13,1 (C-19'), 12,8 (C-20'), 3 nhóm methylene tại  $\delta_{\text{C}}$  48,4 (C-2), 42,5 (C-4) và 44,6 (C-2'), 15 nhóm methine olefin, 9 carbon bậc 4 trong đó có 7 carbon olefin bậc bốn tại  $\delta_{\text{C}}$  126,1 (C-5), 137,7 (C-6), 135,6 (C-9), 136,4 (C-13), 138,0 (C-5'), 135,0 (C-9') và 135,5 (C-13') và 2 carbon bậc bốn bão hòa tại  $\delta_{\text{C}}$  37,1 và 34,0; cùng với 3 carbon nhóm methine trong đó có 2 nhóm hydroxymethine tại  $\delta_{\text{C}}$  65,1 (C-3), 65,9 (C-3') và một nhóm methine gắn với nối đôi tại  $\delta_{\text{C}}$  54,9 (C-6'). Phổ  $^1\text{H}$ -NMR xuất hiện tín hiệu của các proton thuộc 10 nhóm methyl dưới dạng singlet tại  $\delta_{\text{H}}$  1,07 (3H, s, H-16), 1,07 (3H, s, H-17), 1,73 (3H, s, H-18), 1,97 (3H, s, H-19), 1,96 (3H, s, H-20), 0,84 (3H, s, H-16'), 0,99 (3H, s, H-17'), 1,62 (3H, s, H-18'), 1,90 (3H, s, H-19'), 1,97 (3H, s, H-20'). Các proton của 3 nhóm methylene xuất hiện tại  $\delta_{\text{H}}$  1,47 (1H, t,  $J = 12,0$  Hz, Ha-2), 1,76 (1H, m, Hb-2), 2,36 (1H, m, Ha-4), 1,76 (1H, m, Hb-4), 1,38 (1H, dd,  $J = 6,6, 13,2$  Hz, Ha-2') và 1,82 (1H, dd,  $J = 6,0, 13,2$  Hz, Hb-2'). Proton của hai nhóm hydroxymethine xuất hiện tại  $\delta_{\text{H}}$  4,00 (1H, m,

H-3), 2,25 (1H, br.s, H-3') và proton của nhóm methine bão hòa khác tại  $\delta_H$  2,41 (1H, d,  $J = 10,2$  Hz, H-6').

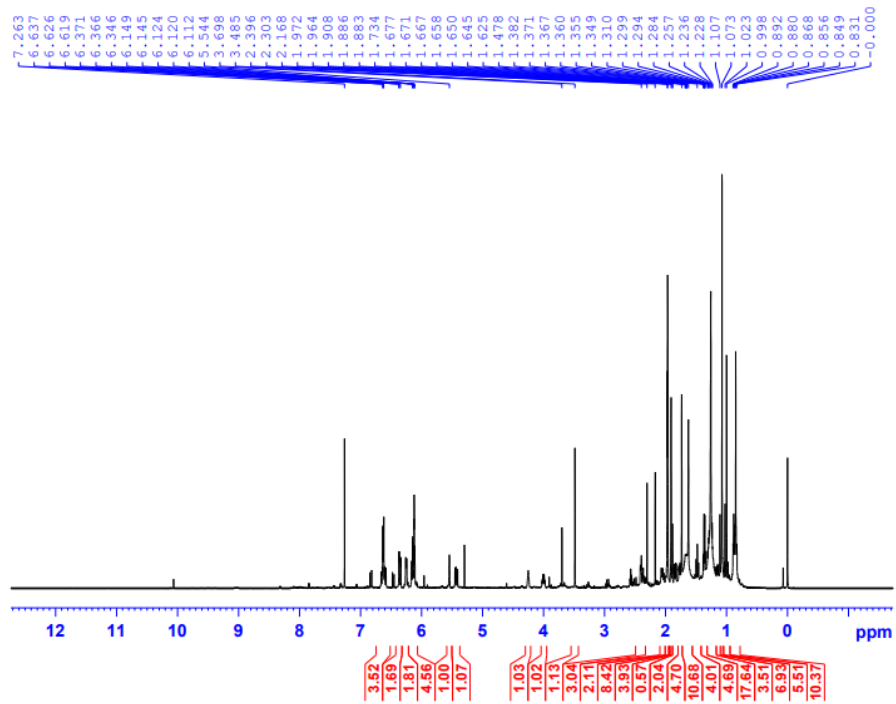
Các dữ liệu phổ trên gợi ý cho cấu trúc của một hợp chất carotenoid với 2 cấu trúc vòng chứa liên kết đôi và nhóm hydroxy ở 2 đầu. Phân tích phổ COSY cùng với các phổ HSQC, HMBC xác định được cấu trúc của **AGE6** là lutein. Khi so sánh số liệu phổ  $^{13}\text{C}$ -NMR của **AGE6** với các số liệu tương ứng của lutein[25] (bảng 3.6) có sự tương đồng, do đó cấu trúc của **AGE6** được xác định là lutein.

*Bảng 4.6. Số liệu phổ NMR của hợp chất AGE6 và hợp chất tham khảo*

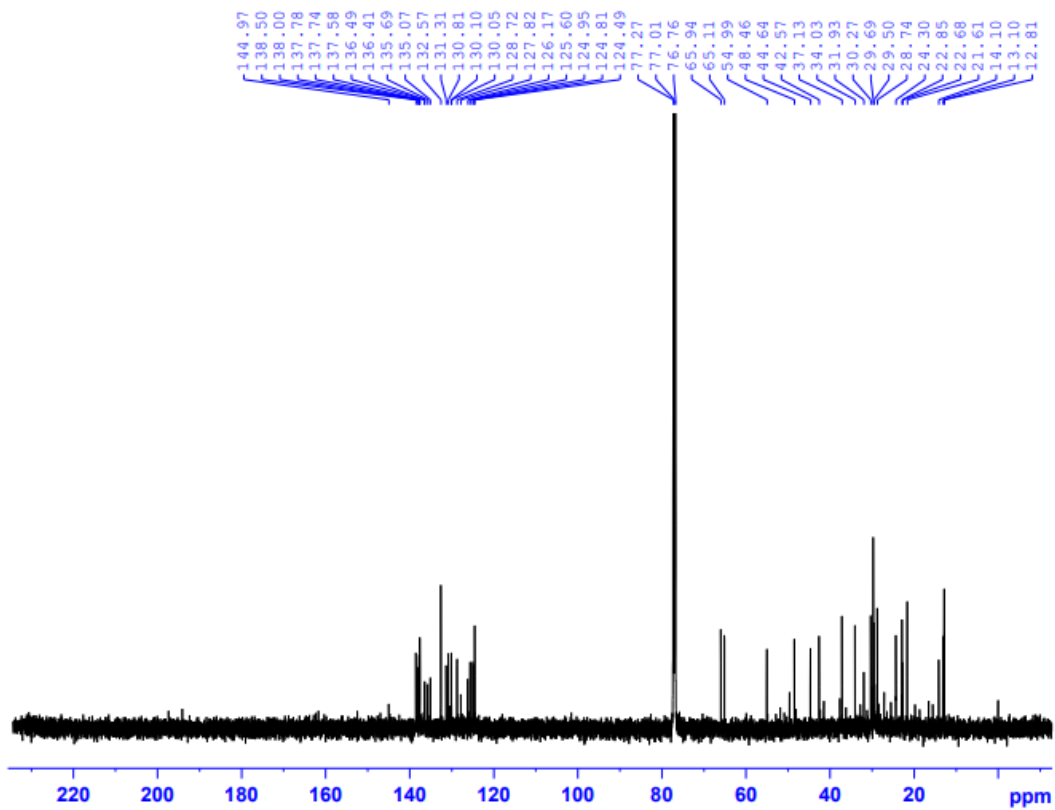
C	$\delta_C^{\#}$	$\delta_C^{a,c}$	$\delta_H^{a,b}$ (mult, $J = \text{Hz}$ )
$\beta$ -end			
1	37,1	37,1	-
2	48,4	48,4	1,47 (t, 12,0, Ha) 1,76 (m, Hb)
3	65,1	65,1	4,00 (m)
4	42,5	42,5	2,36 (m, Ha) 2,05 (dd, 7,2, 15,6, Hb)
5	126,2	126,1	-
6	137,6	137,7	-
7	125,6	125,6	6,12*
8	138,5	138,5	6,13*
9	135,6	135,6	-
10	131,3	131,3	6,15
11	124,9	124,9	6,62*
12	137,6	137,5	6,13*
13	136,5	136,4	-
14	132,6	132,5	6,24
15	130,0	130,0	6,62*
16	28,7	28,7	1,07 (s)
17	30,2	30,2	1,07 (s)

18	21,6	21,6	1,73 (s)
19	12,7	12,7	1,97 (s)
20	12,7	12,8	1,96 (s)
$\alpha$ -end			
1'	34,0	34,0	-
2'	44,7	44,6	1,38 (dd, 6,6, 13,2, Ha) 1,82 (dd, 6,0, 13,2, Hb)
3'	65,9	65,9	2,25 (br.s)
4'	125,6	125,6	5,54 (br.s)
5'	137,8	138,0	-
6'	55,0	54,9	2,41 (d, 9,6)
7'	128,6	128,7	5,43 (dd, 9,6, 15,0)
8'	137,8	137,7	6,36 (dd, 3.0, 15.0)
9'	135,0	135,0	-
10'	130,8	130,8	6,13*
11'	124,5	124,4	5,55
12'	137,6	137,6	6,13*
13'	136,5	135,5	-
14'	132,6	132,5	6,25 (d, 9,6)
15'	130,0	130,0	6,62
16'	24,3	24,3	0,84 (s)
17'	29,5	29,5	0,99 (s)
18'	22,8	22,8	1,62 (s)
19'	13,2	13,1	1,90 (s)
20'	12,7	12,8	1,97 (s)

<sup>a</sup> đo trong CDCl<sub>3</sub>, <sup>b</sup>150 MHz, <sup>c</sup>600 MHz,  $\delta_c^\#$  của lutein đo trong CDCl<sub>3</sub> [25]

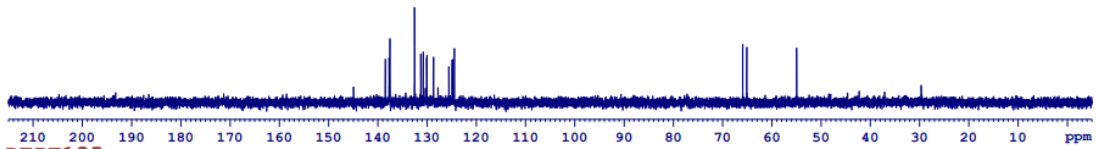


Hình 4.27. Phổ  $^1\text{H-NMR}$  của hợp chất AGE6



Hình 4.28. Phổ  $^{13}\text{C-NMR}$  của hợp chất AGE6

DEPT90

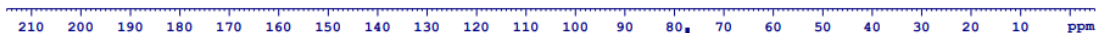


DEPT135

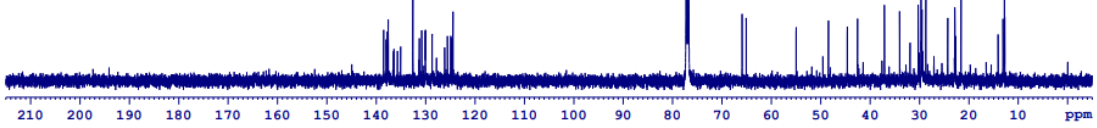


CH&CH3

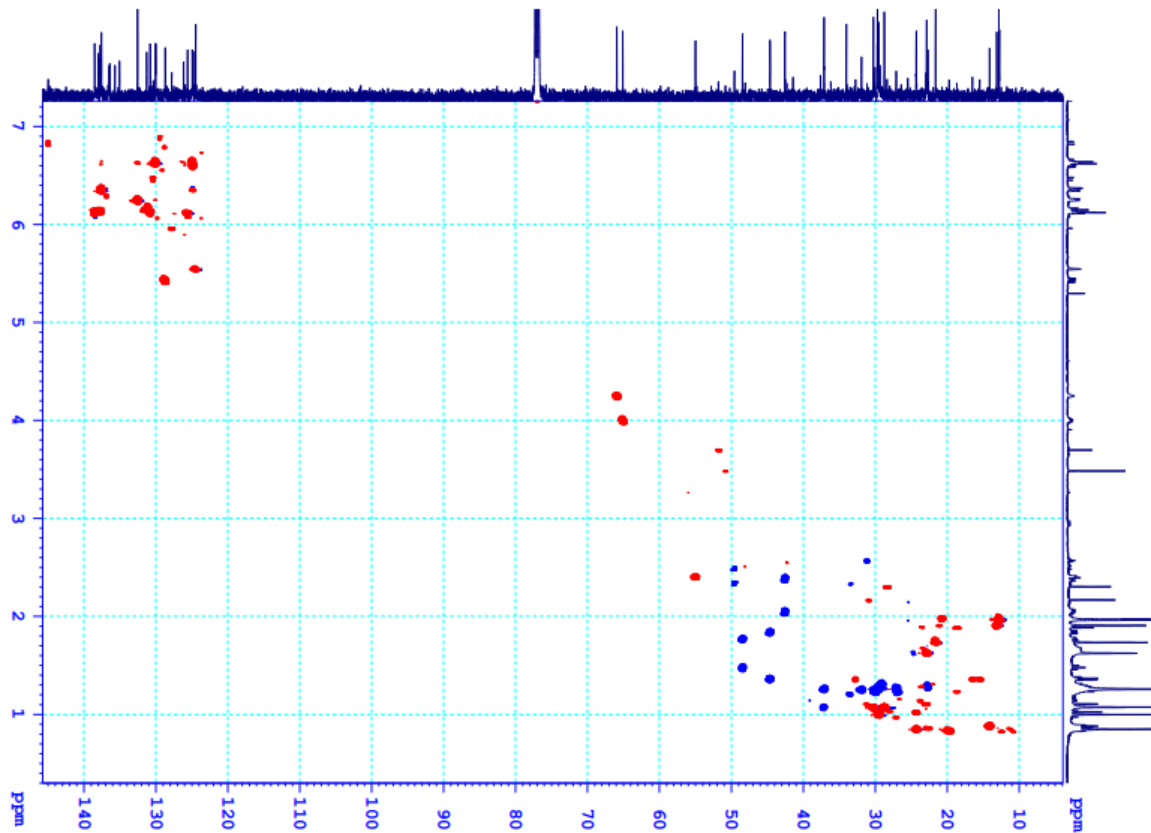
CH2



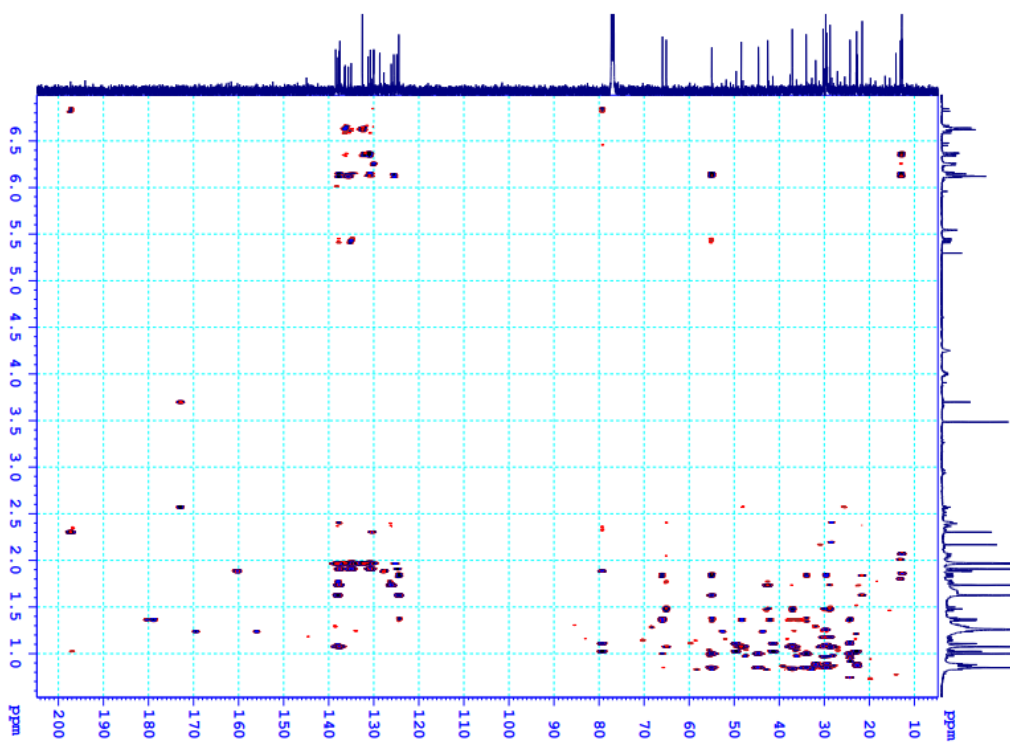
C13CPD



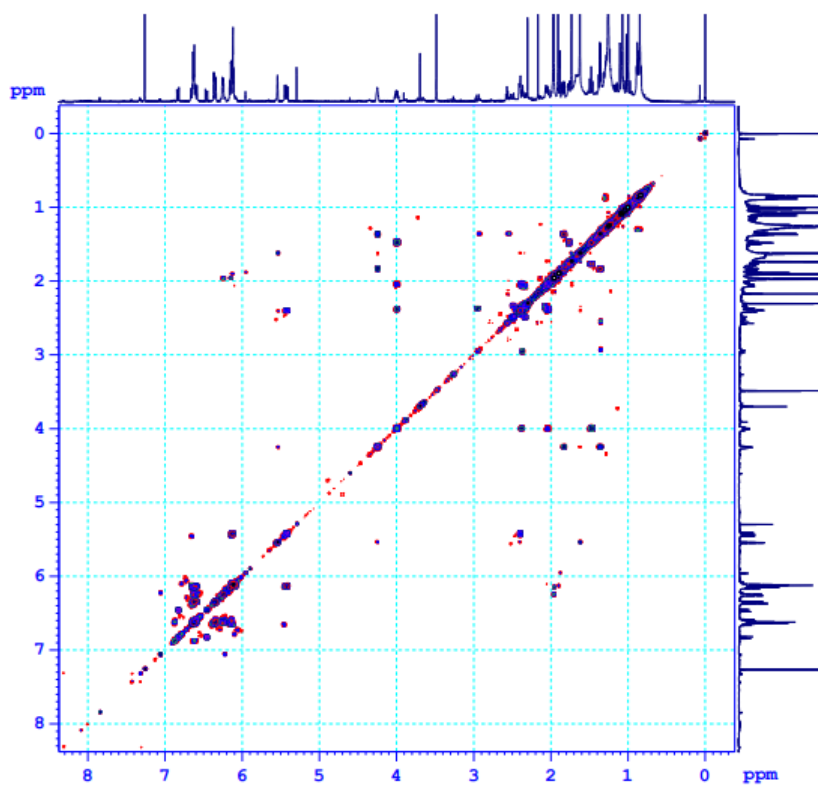
Hình 4.29. Phổ DEPT của hợp chất AGE6



Hình 4.30. Phổ HSQC của hợp chất AGE6



Hình 4.31. Phổ HMBC của hợp chất AGE6



Hình 4.32. Phổ COSY của hợp chất AGE6



#### 4.2.2. Hoạt tính sinh học của các hợp chất phân lập được

Các hợp chất phân lập được từ cao ethyl acetate **AGE** cũng được tìm hiểu về hoạt tính sinh học thông qua các công bố trước đây như sau:

Lutein (**AGE6**) đã được chứng minh là có tác dụng bảo vệ thần kinh, bảo vệ mắt, kháng vi sinh vật bao gồm vi khuẩn và virus, bảo vệ tim mạch, chống ký sinh trùng sốt rét, bảo vệ da, chữa lành vết thương và tăng sinh tế bào, chống loãng xương[26].

Verbascoside (**AGE4**) là một hợp chất thuộc nhóm phenylpropanoid glycoside có một số hoạt tính sinh học đáng chú ý như chống viêm, kháng khuẩn, chống ung thư và chống oxy hóa. Đặc biệt, khi verbascoside ở dạng dung dịch với polyvinylpyrrolidone và natri hyaluronate rất hữu ích trong việc tái tạo biểu mô và trong giảm đau, điểm viêm niêm mạc miệng, nóng rát và ban đỏ dựa trên hiệu ứng rào cản[27].

Ursolic acid (**AGE2**) đã được chứng minh là có nhiều lợi ích cho sức khỏe, bao gồm chống ung thư, chống viêm, chống oxy hóa, chống thấp khớp, kháng virus, chống khối u, diệt trypanosom. Tác dụng chống ung thư của acid ursolic đối với một số bệnh ung thư, bao gồm ung thư vú, da, phổi, tuyến tiền liệt và tuyến tụy đã được công bố nhiều[28].

Pomolic acid (**AGE3**) có một số hoạt tính sinh học nổi bật được xác định như tác dụng chống ung thư liên quan đến ung thư vú, phổi, buồng trứng, và các tế bào ung thư tuyến tiền liệt, bao gồm bệnh bạch cầu và u thần kinh đệm. Các hoạt tính sinh học khác của pomolic acid bao gồm chống lại virus gây suy giảm miễn dịch ở người (HIV), chống đái tháo đường, chống xơ hóa, chống kết tập tiểu cầu ở người, hạ huyết áp, tác nhân mới đối với các bệnh tim mạch, chống hủy xương, chống lão hóa, chống viêm, gel sản phẩm tự nhiên mới, chống béo phì và chống viêm khớp dạng thấp[29].

Hợp chất 3 $\alpha$ ,24-dihydroxy-olean-12-en-28-oic acid (**AGE1**) là một hợp chất triterpenoid acid lần đầu tiên được phân lập từ loài *Salvia nicolsoniana*[30], và cũng đã được tìm thấy ở loài *Tripterigium wilfordii*[20] và *Verbena officinalis*[31]. Hoạt tính sinh học của hợp chất này còn ít được nghiên cứu.

## Chương 5. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

### 5.1. KẾT LUẬN

Bằng cách kết hợp các phương pháp sắc ký và các phương pháp phổ hiện đại, sáu hợp chất đã được phân lập từ phân đoạn chiết ethyl acetate của phần trên mặt đất loài Biển hoa sông hằng (*Asystasia gangetica*), bao gồm 3 $\alpha$ ,24-dihydroxy-olean-12-en-28-oic acid (**AGE1**), ursolic acid (**AGE2**), pomolic acid (**AGE3**), verbascoside (**AGE4**), acid indol-3-carboxylic (**AGE5**) và lutein (**AGE6**). Đây là lần đầu tiên các hợp chất **AGE1**, **AGE2**, **AGE3**, **AGE5** và **AGE6** được tìm thấy ở loài Biển hoa sông hằng (*A. gangetica*).

Kết quả nghiên cứu hoạt tính chống oxy hóa, hoạt tính ức chế enzyme  $\alpha$ -glucosidase và hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định của các cao chiết *n*-hexane (**AGH**), ethyl acetate (**AGE**) và nước (**AGW**) cho thấy cao chiết **AGE** có hoạt tính sinh học tốt nhất. Cao chiết **AGE** thể hiện hoạt tính chống ôxi hóa với giá trị IC<sub>50</sub> là 0,063 mg/ml và có hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định ức chế 4/6 chủng vi khuẩn thử nghiệm với MIC là 128 và 256  $\mu$ g/ml và ức chế vi nấm *C. albicans* với MIC là 256  $\mu$ g/ml.

### 5.2. KIẾN NGHỊ

Từ việc nghiên cứu về thành phần hóa học và khảo sát hoạt tính sinh học của phần trên mặt đất của loài Biển hoa sông hằng, chúng tôi kiến nghị:

- Đánh giá thêm một số hoạt tính sinh học của các cao chiết như hoạt tính chống ung thư, hạ mỡ máu...
- Đánh giá một số hoạt tính sinh học của các chất phân lập từ các cao chiết.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

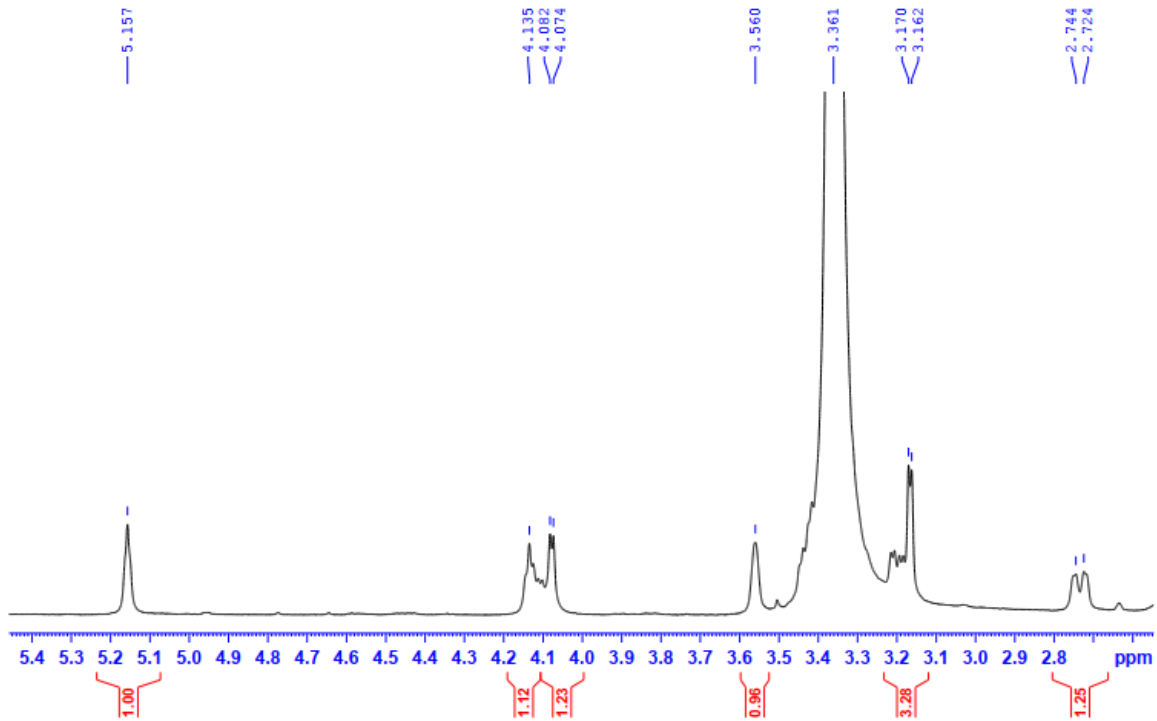
1. *Biển hoa sông Hằng*. 2021; Available from: <http://baotoncaythuocnam.com/cay-thuoc/Bien-hoa-song-hang-24022021-122.html>.
2. V.V. Chi, *Từ điển Cây thuốc Việt Nam*, 2012, Nhà xuất bản Y học.
3. T. Kanchanapoom, S. Ruchirawat, *Megastigmane glucoside from Asystasia gangetica (L.) T. Anderson*, Journal of Natural Medicines, 2007, 61, 430-433.
4. D.O. Moronkola, *Chemical compositions of the essential oils from aerial, seed and root parts of nigerian Asystasia gangetica (L)*, Current Chemical Research, 2011, 1, 14-18.
5. A. Hamid, O. Aiyelaagbe, A. Risikat, L. Usman, S. Adebayo, *Preliminary Phytochemistry, Antibacterial and Antifungal Properties of extracts of Asystasia gangetica Linn T. Anderson grown in Nigeria*, 2011, 2.
6. M.M. Senthamilselvi, D. Kesavan, N. Sulochana, *A new biflavone glycoside from flowers of Asystasia gangetica*, Chemistry of Natural Compounds, 2011, 47, 360-362.
7. P. Worawittayanon, J. Ruadreo, W. Disadee, P. Sahakitpichan, S. Sitthimonchai, N. Thasana, S. Ruchirawat, T. Kanchanapoom, *Iridoid and flavone glycosides from Asystasia gangetica subsp. micrantha and Asystasia salicifolia and their antioxidant activities*, Biochemical Systematics and Ecology, 2012, 40, 38–42.
8. O. Isna Athirah, A. Norizan, O. Isna Athirah, A. Norizan, A.-K. Amjad Ayad Qatran, *Iridoid Glycosides and Phenylpropanoids from Asystasia gangetica (L) T. Anderson Var Micrantha (Acanthaceae)*, Malaysian Journal of Analytical Sciences, 2020, 24, 530-537.
9. P. Mugabo, I.A. Raji, *Effects of aqueous leaf extract of Asystasia gangetica on the blood pressure and heart rate in male spontaneously hypertensive Wistar rats*, BMC Complement Altern Med, 2013, 13, 283.
10. P.A. Akah, A.C. Ezike, S.V. Nwafor, C.O. Okoli, N.M. Enwerem, *Evaluation of the anti-asthmatic property of Asystasia gangetica leaf extracts*, J Ethnopharmacol, 2003, 89, 25-36.
11. V.K. Mohd Mudassir Hussain\*, G Jeyabalan, *Analgesic and anti-inflammatory activity of ethanolic and aqueous whole plant extract of Asystasia gangetica*, International Journal of Pharmacy, 2016, 6, 174-179.
12. M. Barbaza, C.-Y. Hsieh, K. Castro-Cruz, C.J. Lee, C.-L. Hsieh, P.-W. Tsai, *The potential of Asystasia gangetica (Chinese violet) extracts as an anti-aging agent and as a whitening agent*, Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology, 2020, 21, 49-54.

13. K. Kumar, M. Umamaheswari, A. Sivashanmugam, V. Subhadradevi, S. Somanathan, T. Ravi, *Protective effect of Asystasia gangetica reduced oxidative damage in the small intestine of streptozotocin-induced diabetic rats*, *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*, 2009, 9, 307-314.
14. R.S.a.R.P. Kavitha Sama, *In vitro antidiabetic activity of anthocyanin extract of Asystasia gangetica (Chinese violet) flower* *Asian Journal of Plant Science and Research*, 2013, 3, 88-92.
15. R.S. Kavitha S, Ravi D., *Antidiabetic activity of Asystasia gangetica (L.) T. Anderson flower extract in streptozotocin induced diabetic rats*, *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 2016, 8, 79-84.
16. N.V.C. Võ Thị Thu Nga, Nguyễn Phương Dung, *Chiết xuất và phân lập một số flavonoid từ rau ngót Nhật (Asystasia gangetica)*, *Tạp chí Dược học*, 2019, 59, 73-76.
17. M. Kai, K. Vanselow, L. Sebastian, H. Ralf, A. Ruser, H. Ulf-Peter, *Determination of DPPH Radical Oxidation Caused by Methanolic Extracts of Some Microalgal Species by Linear Regression Analysis of Spectrophotometric Measurements*, *Sensors*, 2007, 7, 2080-2095.
18. V.M. Misin, N.N. Sazhina, *Content and activity of low-molecular antioxidants in juices of medicinal plants*, *Russian Journal of Physical Chemistry B*, 2010, 4, 797-800.
19. F. Hadacek, H. Greger, *Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice*, *Phytochemical Analysis*, 2000, 11, 137-147.
20. T. Morota, C.-X. Yang, H. Sasaki, W.-Z. Qin, K. Sugama, K.-L. Miao, T. Yoshino, L.-H. Xu, M. Maruno, B.-H. Yang, *Triterpenes from Tripterigium wilfordii*, *Phytochemistry*, 1995, 39, 1153-1157.
21. R. El-Shiekh, D. Al-Mahdy, M. Hifnawy, T. Tzanova, E. Evain-Bana, S. Philippot, D. Bagrel, E. Abdel-sattar, *Chemical and Biological Investigation of Ochrosia elliptica Labill. Cultivated in Egypt*, *Records of Natural Products*, 2017, 11, 552-557.
22. J.-J. Cheng, L.-J. Zhang, H.-L. Cheng, C.-T. Chiou, I.J. Lee, Y.-H. Kuo, *Cytotoxic Hexacyclic Triterpene Acids from Euscaphis japonica*, *Journal of Natural Products*, 2010, 73, 1655-1658.
23. D.K. Olivier, E.A. Shikanga, S. Combrinck, R.W.M. Krause, T. Regnier, T.P. Dlamini, *Phenylethanoid glycosides from Lippia javanica*, *South African Journal of Botany*, 2010, 76, 58-63.
24. J. Hagemeyer, B. Schneider, N.J. Oldham, K. Hahlbrock, *Accumulation of soluble and wall-bound indolic metabolites in Arabidopsis thaliana leaves infected with virulent or avirulent Pseudomonas syringae pathovar tomato strains*, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2001, 98, 753-758.

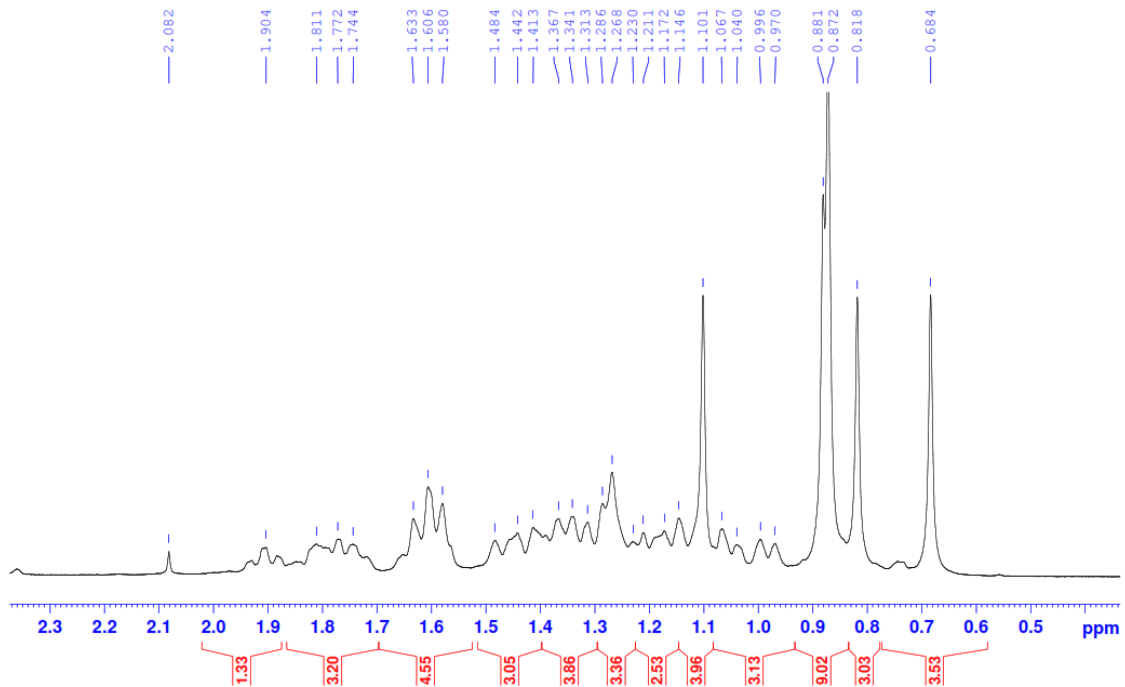
25. G.P. Moss, *Carbon-13 NMR spectra of carotenoids*, in *Carotenoids-4*, B.C.L. Weedon, Editor. 1976, Pergamon. p. 97-102.
26. S. Mitra, A. Rauf, A.M. Tareq, S. Jahan, T.B. Emran, T.G. Shahriar, K. Dhama, F.A. Alhumaydhi, A.S.M. Aljohani, M. Rebezov, M.S. Uddin, P. Jeandet, Z.A. Shah, M.A. Shariati, K.R.R. Rengasamy, *Potential health benefits of carotenoid lutein: An updated review*, *Food and Chemical Toxicology*, 2021, 154, 112328.
27. O. Nigro, A. Tuzi, T. Tartaro, A. Giaquinto, I. Vallini, G. Pinotti, *Biological effects of verbascoside and its anti-inflammatory activity on oral mucositis: a review of the literature*, *Anticancer Drugs*, 2020, 31, 1-5.
28. S. Mlala, A.O. Oyedeji, M. Gondwe, O.O. Oyedeji, *Ursolic Acid and Its Derivatives as Bioactive Agents*, *Molecules*, 2019, 24.
29. Y.K.N. Eric Wei Chiang Chan\*, Carine Shu Shien Lim, Vania Septa Anggraeni, Zhi Zhou Siew, Chen Wai Wong, Siu Kuin Wong, *Pomolic acid: A short review on its chemistry, plant sources, pharmacological properties, and patents*, *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2022, 0, 001-008. (DOI 10.7324/JAPS.2023.114932)
30. R. Pereda-Miranda, G. Delgado, A.R. de Vivar, *New Triterpenoids from *Salvia nicolsoniana**, *Journal of Natural Products*, 1986, 49, 225-230.
31. M. Deepak, S.S. Handa, *3 $\alpha$ ,24-dihydroxy-urs-12-en-28-oic acid from *Verbena officinalis** *Phytochemistry*, 1998, 49, 269-271.

# PHỤ LỤC PHỔ

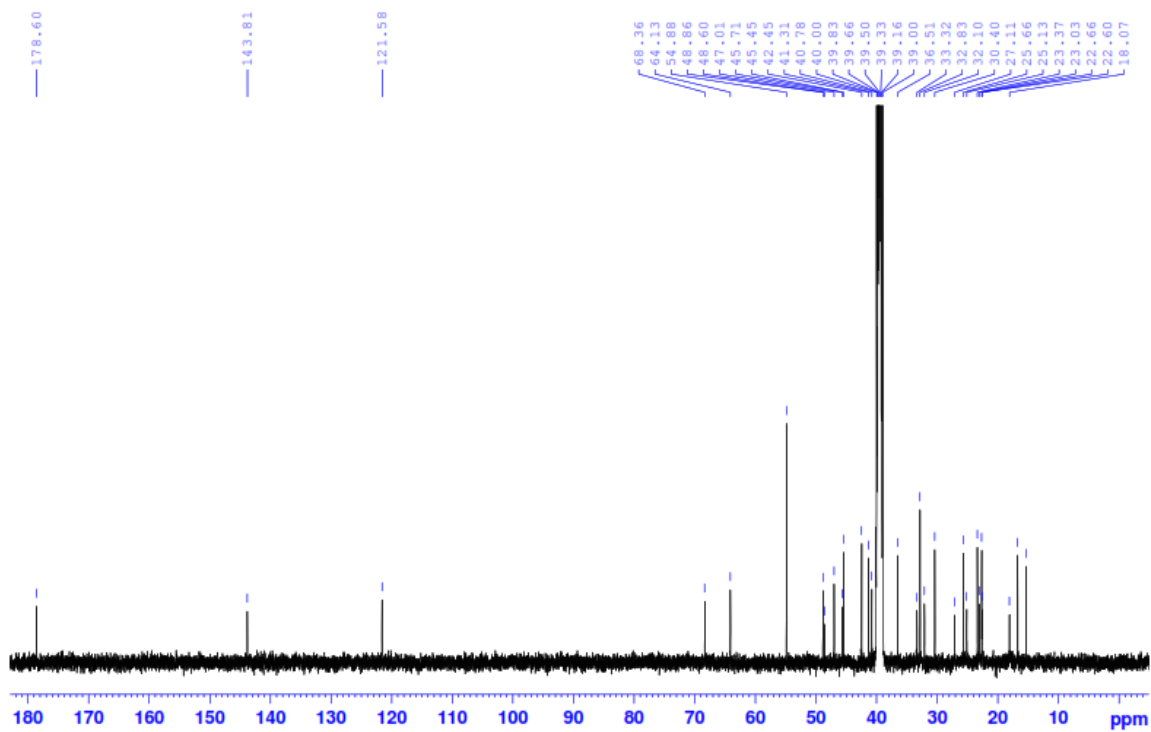
## 1. PHỤ LỤC PHỔ CỦA HỢP CHẤT AGE1



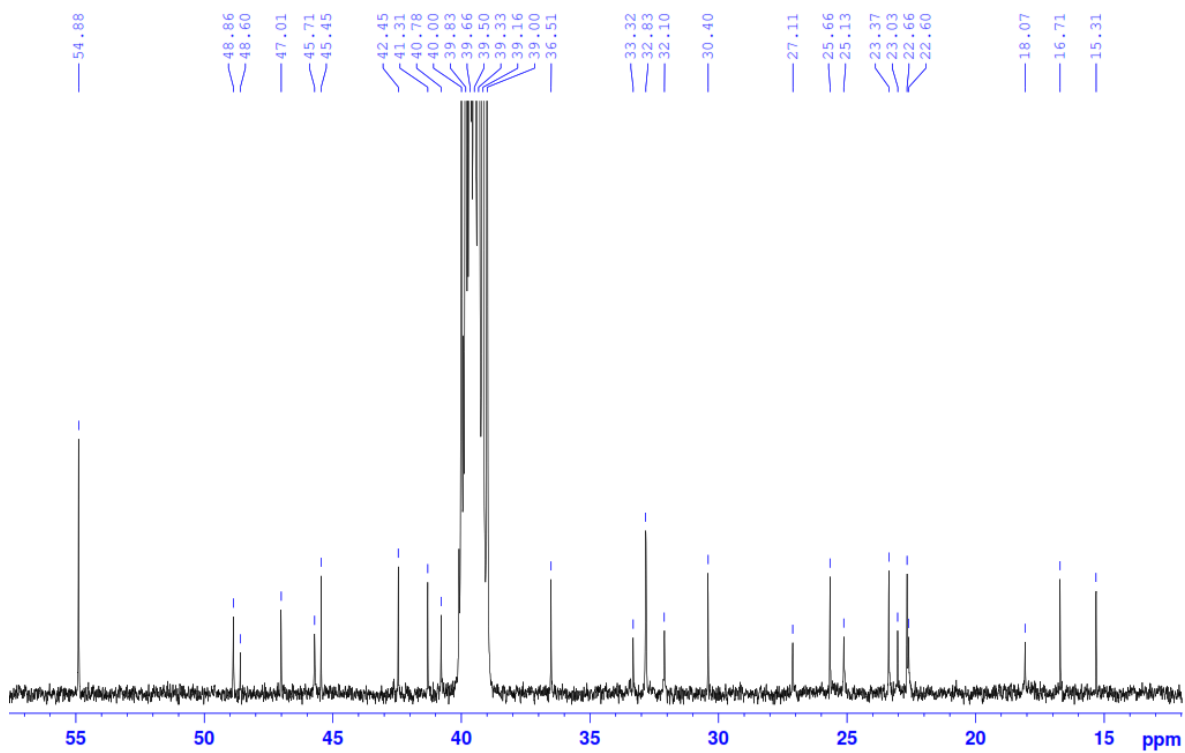
Phụ lục 1.1. Phổ  $^1\text{H-NMR}$  giãn của hợp chất AGE1



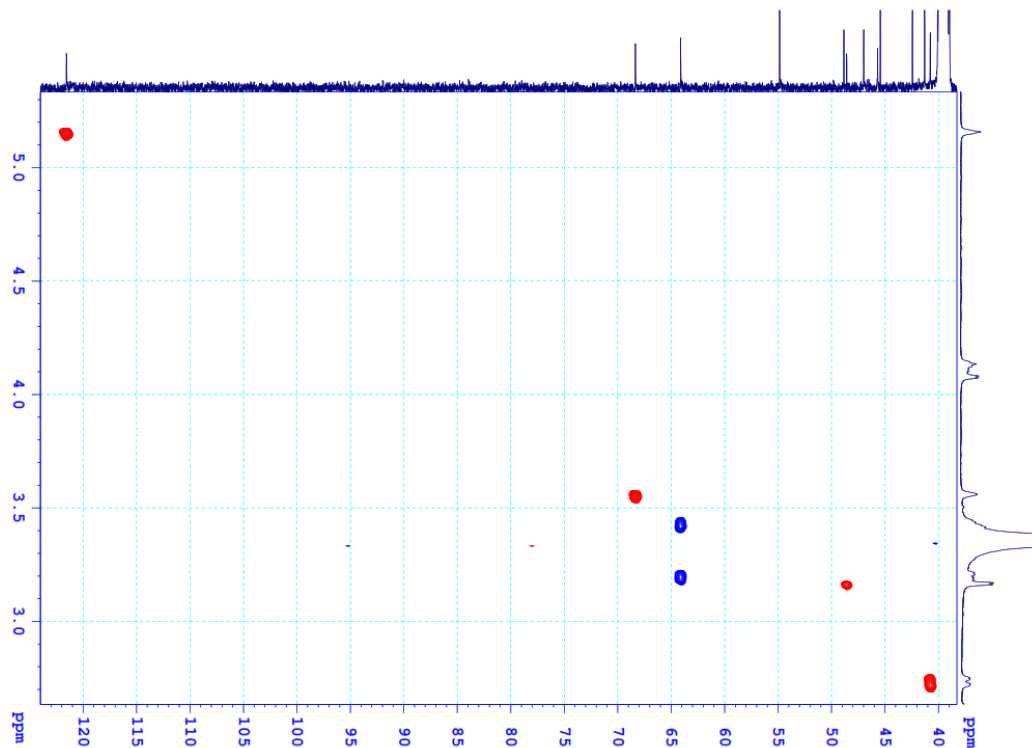
Phụ lục 1.2. Phổ  $^1\text{H-NMR}$  giãn của hợp chất AGE1



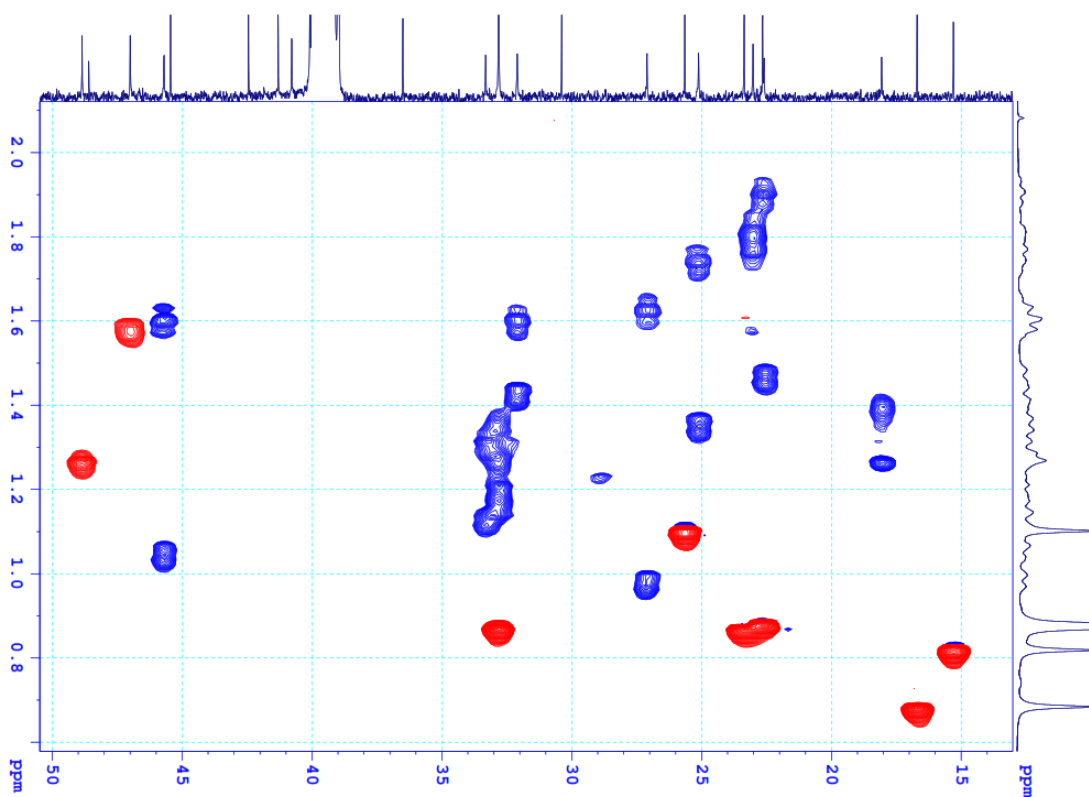
Phụ lục 1.3. Phổ  $^{13}\text{C-NMR}$  giãn của hợp chất AGE1



Phụ lục 1.4. Phổ  $^{13}\text{C-NMR}$  giãn của hợp chất AGE1

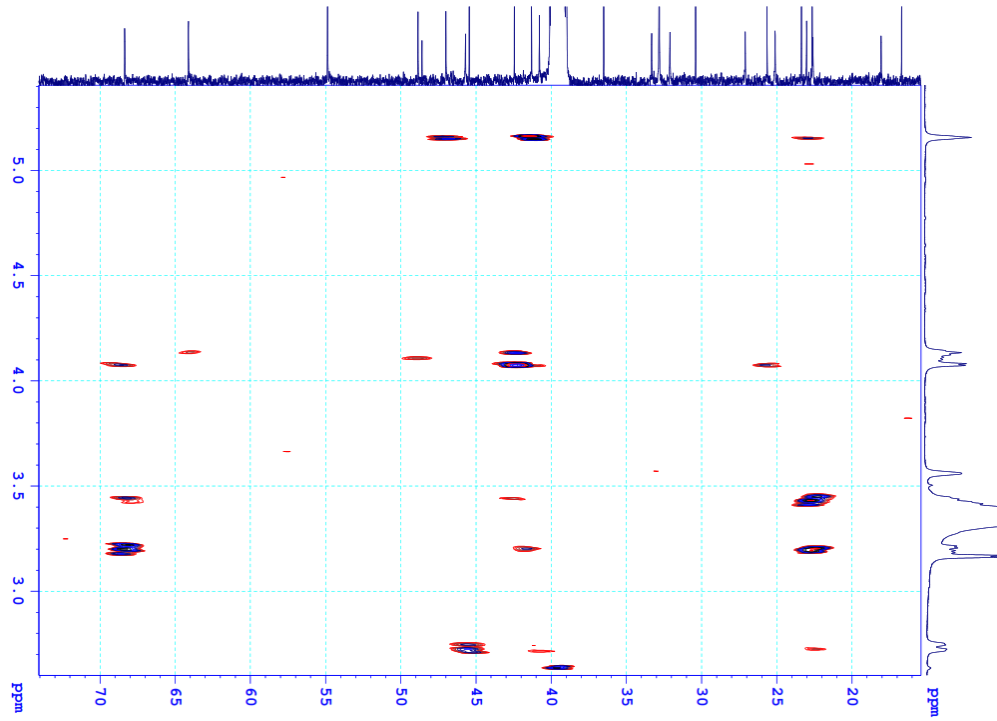


Phụ lục 1.5. Phổ HSQC giản của hợp chất AGE1

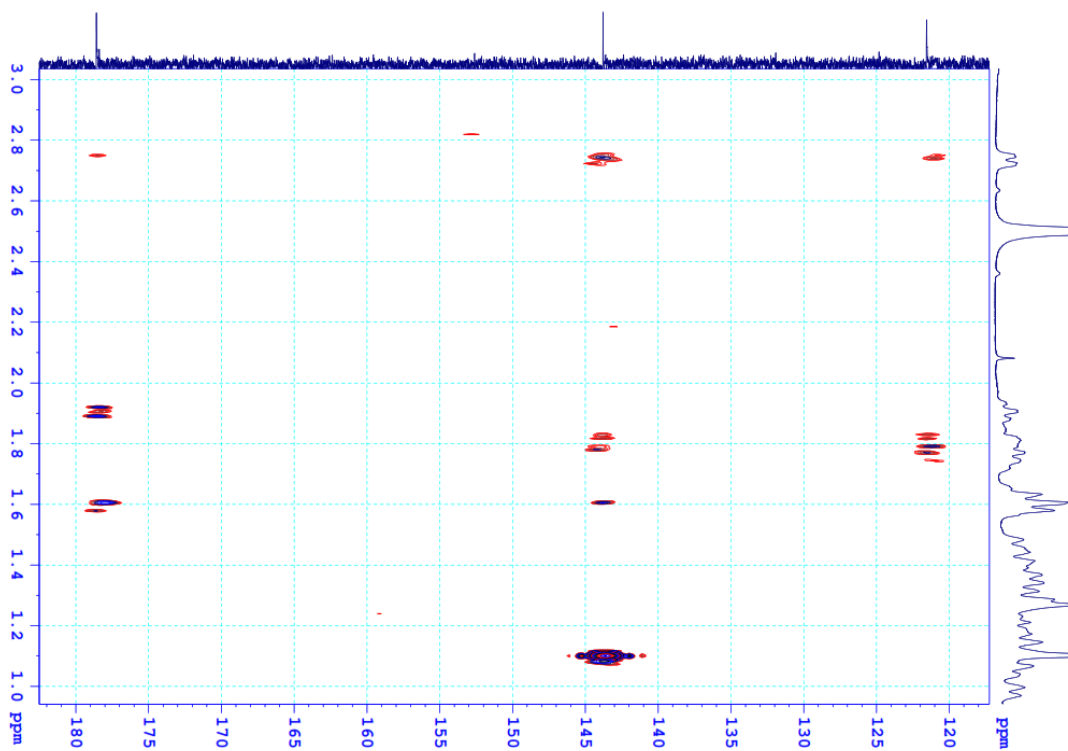


Phụ lục 1.6. Phổ HSQC giản của hợp chất AGE1

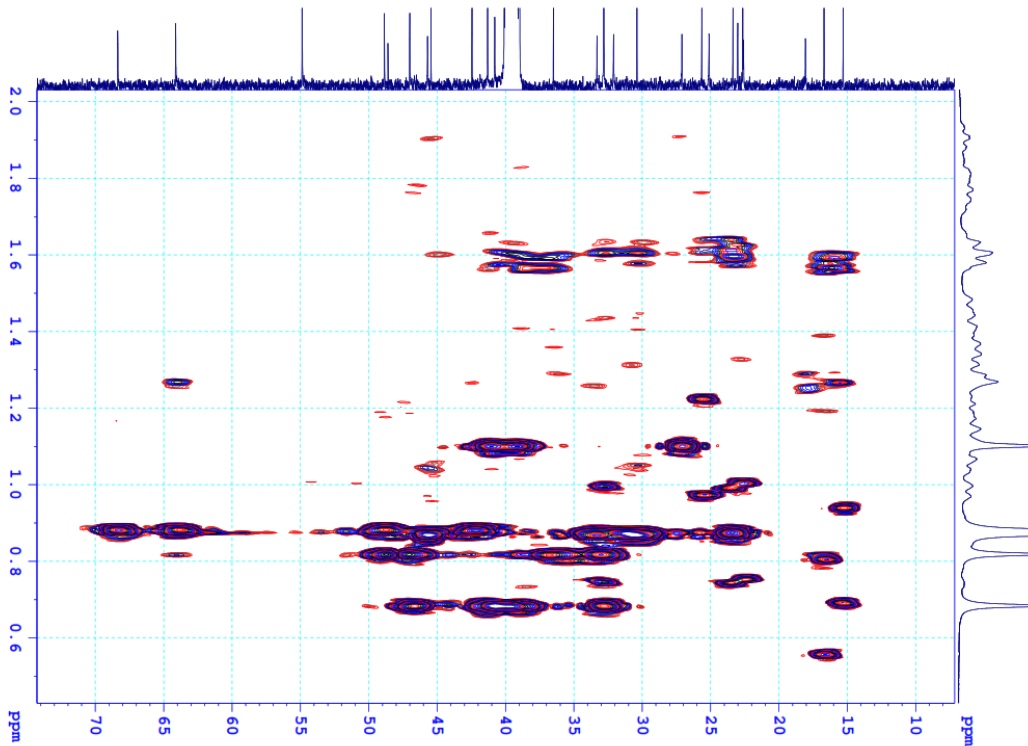




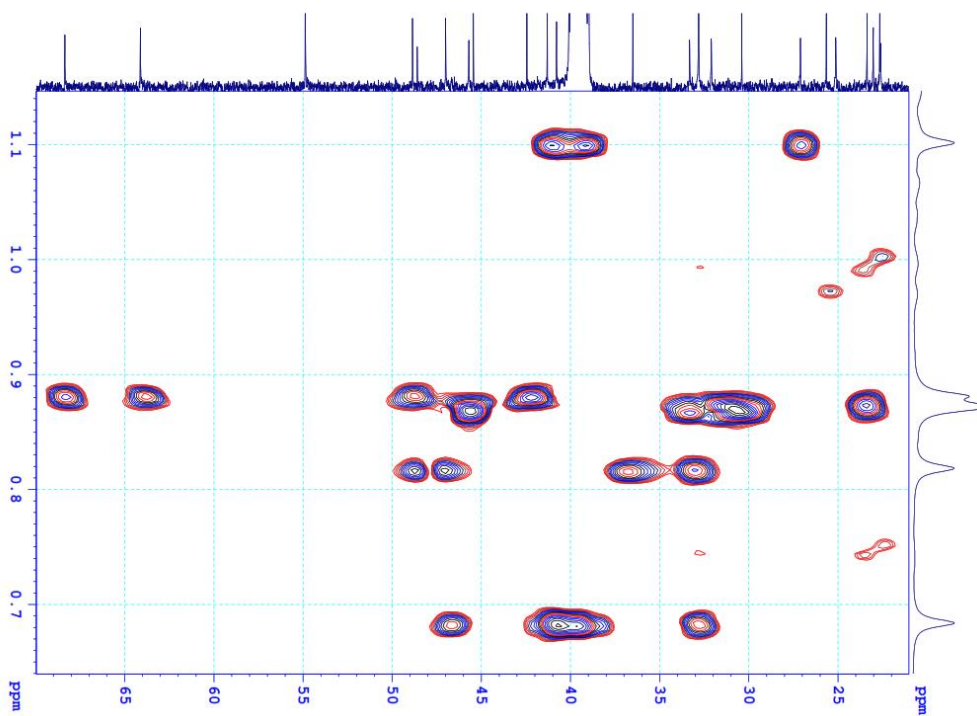
Phụ lục 1.7. Phổ HMBC giãn của hợp chất AGE1



Phụ lục 1.8. Phổ HMBC giãn của hợp chất AGE1

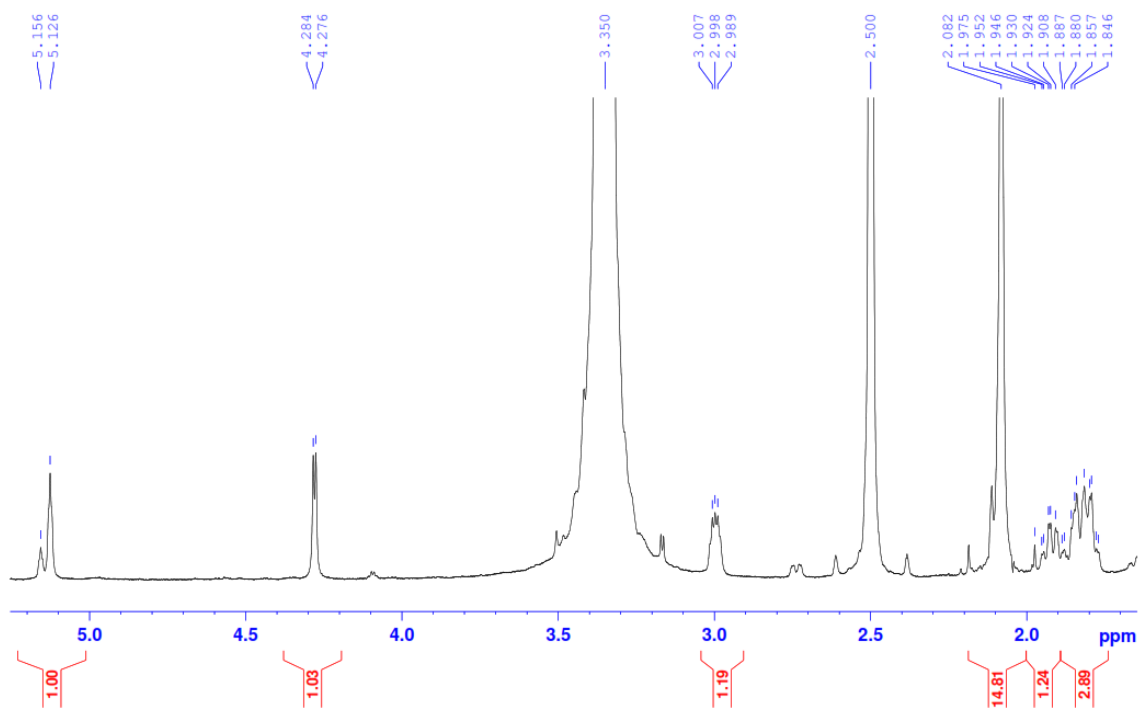


Phụ lục 1.9. Phổ HMBC giãn của hợp chất AGE1

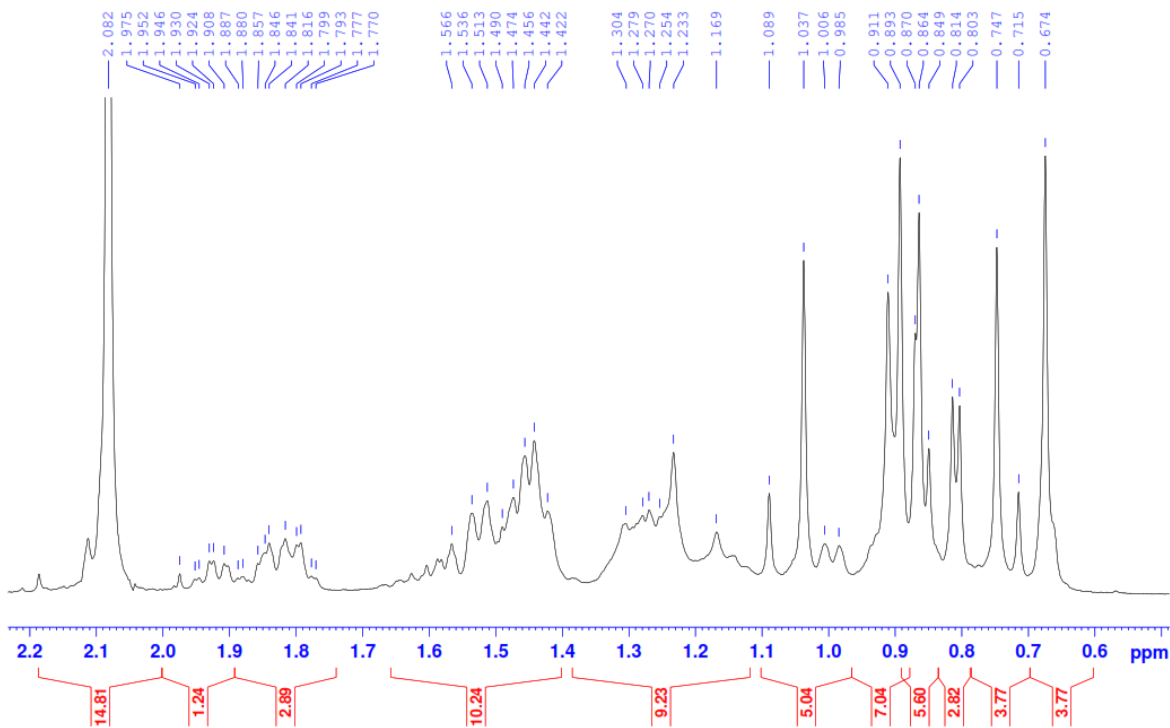


Phụ lục 1.10. Phổ HMBC giãn của hợp chất AGE1

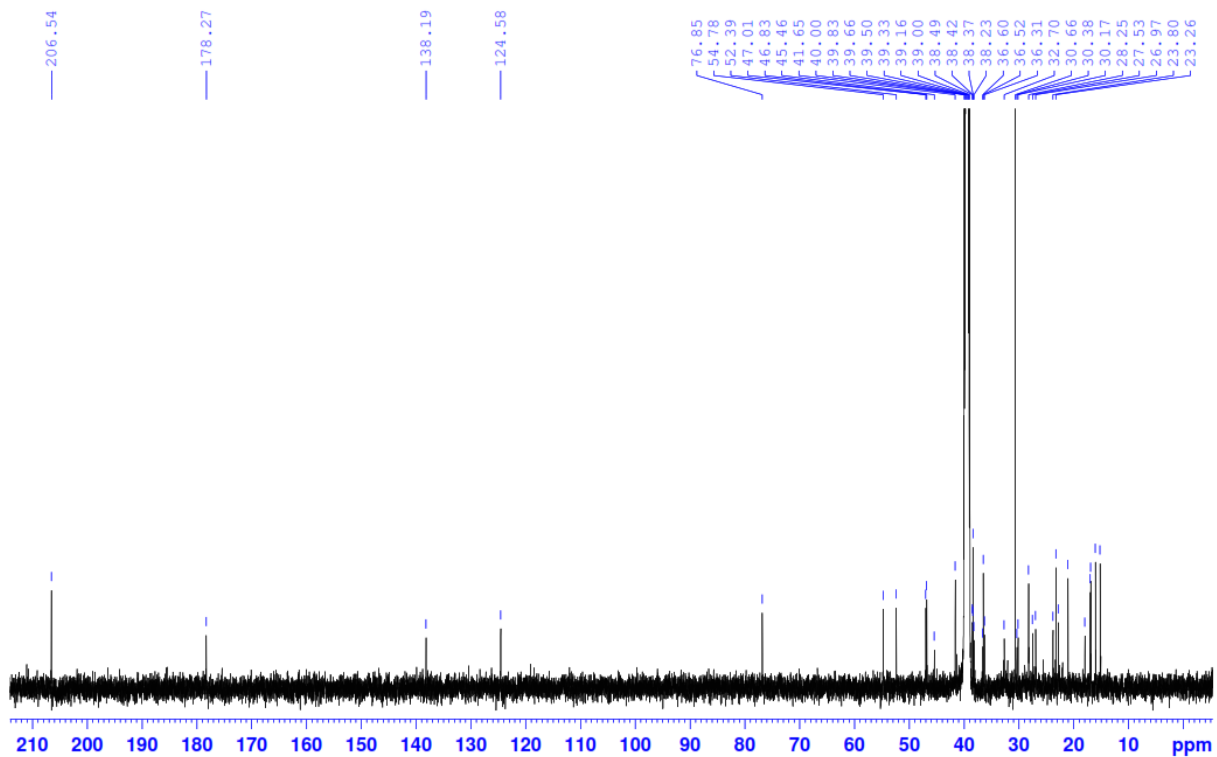
## 2. PHỤ LỤC PHỔ CỦA HỢP CHẤT AGE2



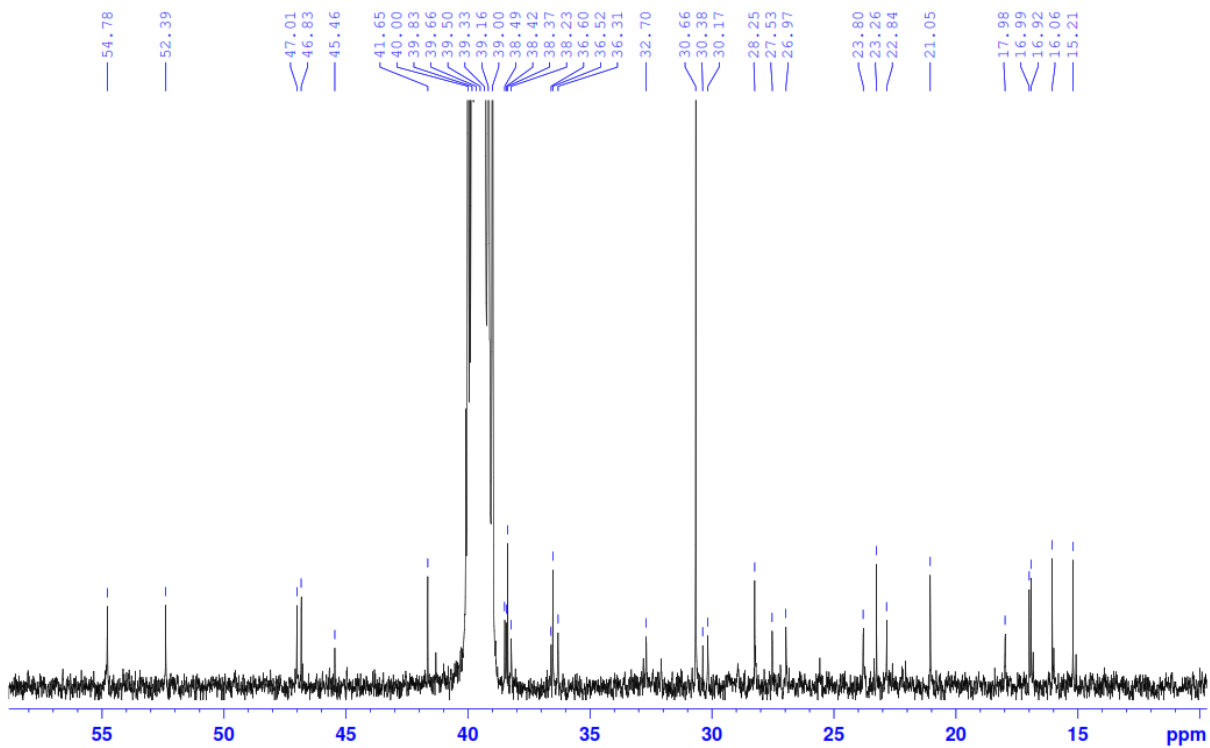
Phụ lục 2.1. Phổ  $^1\text{H-NMR}$  giãn của hợp chất AGE2



Phụ lục 2.2. Phổ  $^1\text{H-NMR}$  giãn của hợp chất AGE2

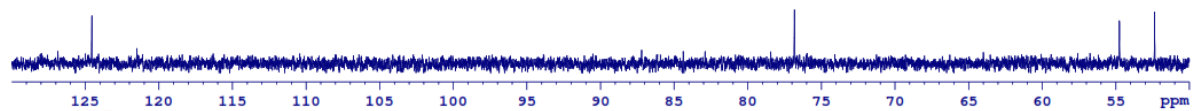


Phụ lục 2.3. Phổ  $^{13}\text{C}$ -NMR giãn của hợp chất AGE2



Phụ lục 2.4. Phổ  $^{13}\text{C}$ -NMR giãn của hợp chất AGE2

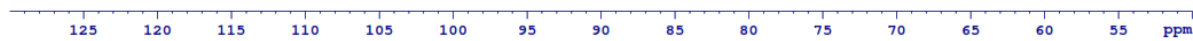
DEPT90



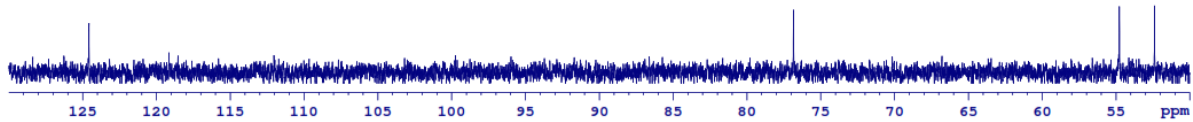
DEPT135



CH2

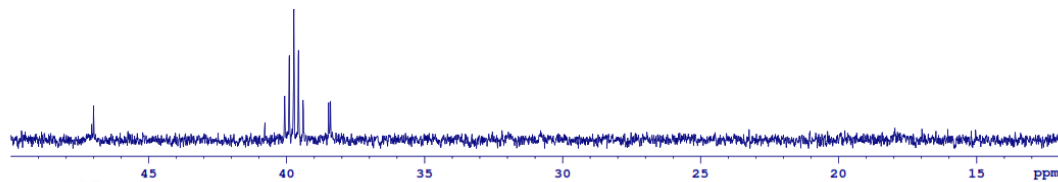


C13CPD

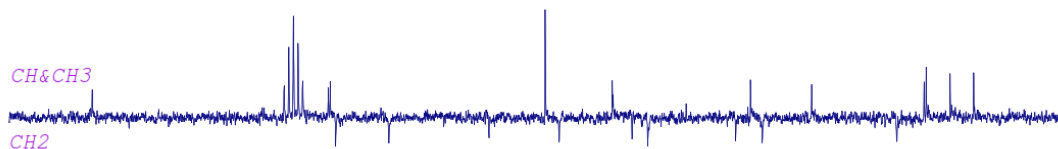


Phụ lục 2.5. Phổ DEPT giãn của hợp chất AGE2

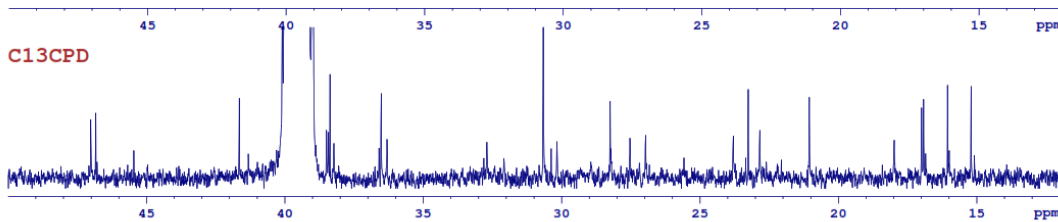
DEPT90



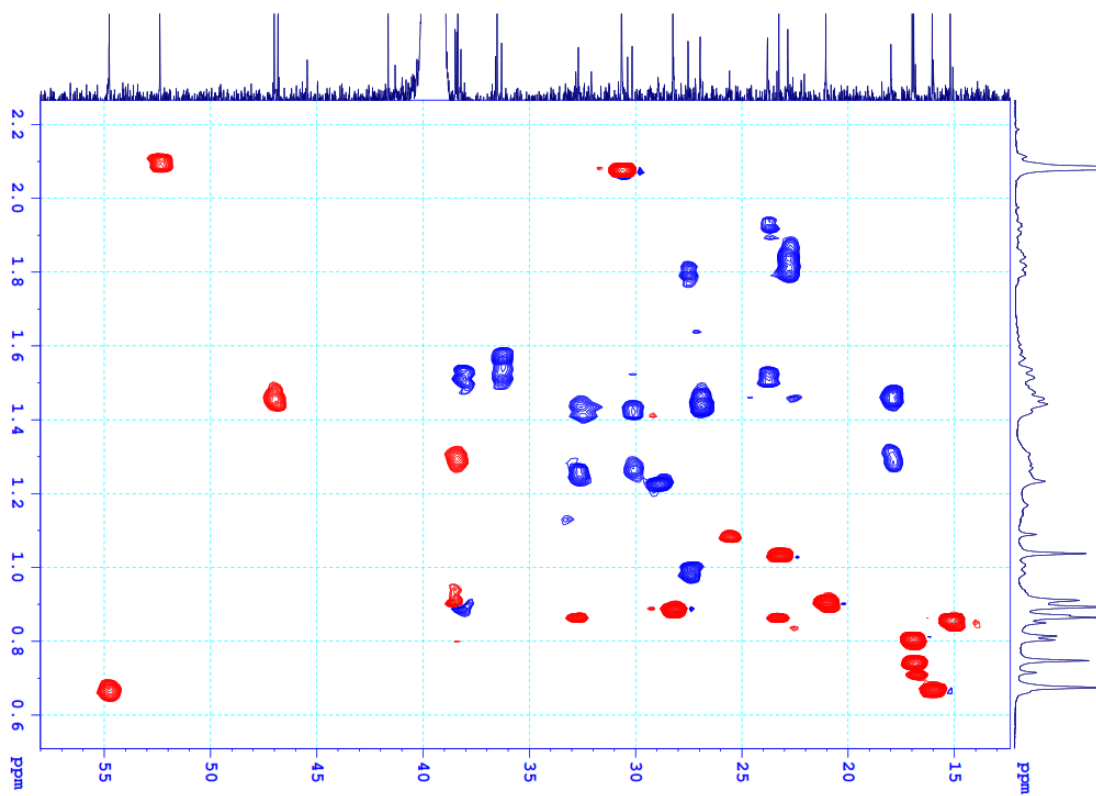
DEPT135



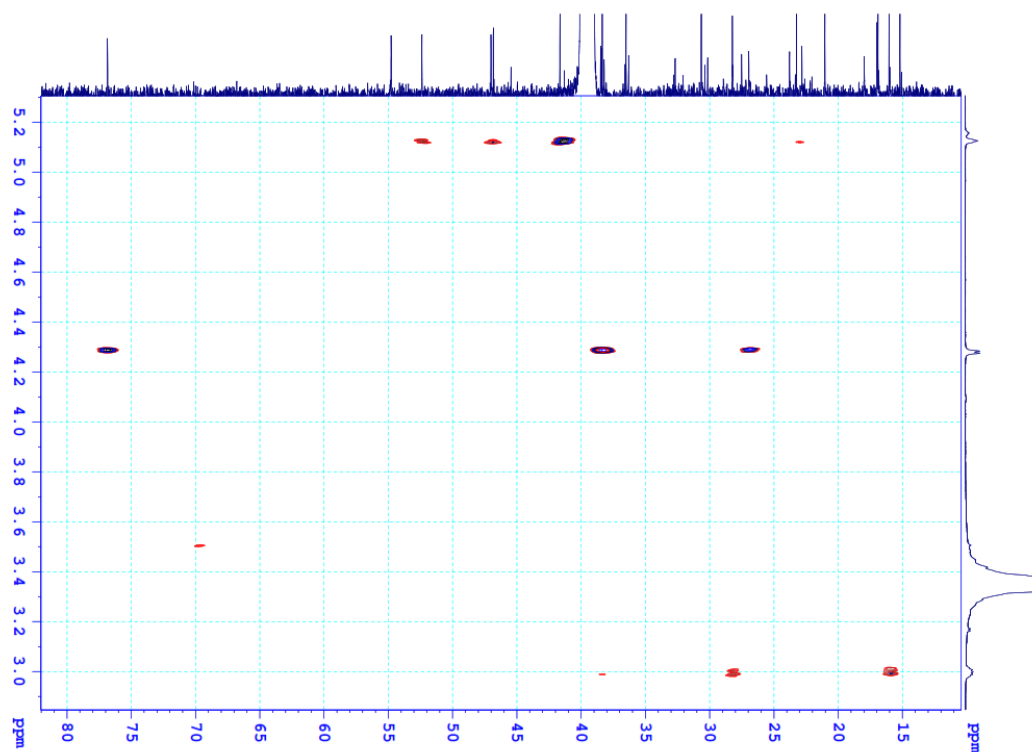
CH2



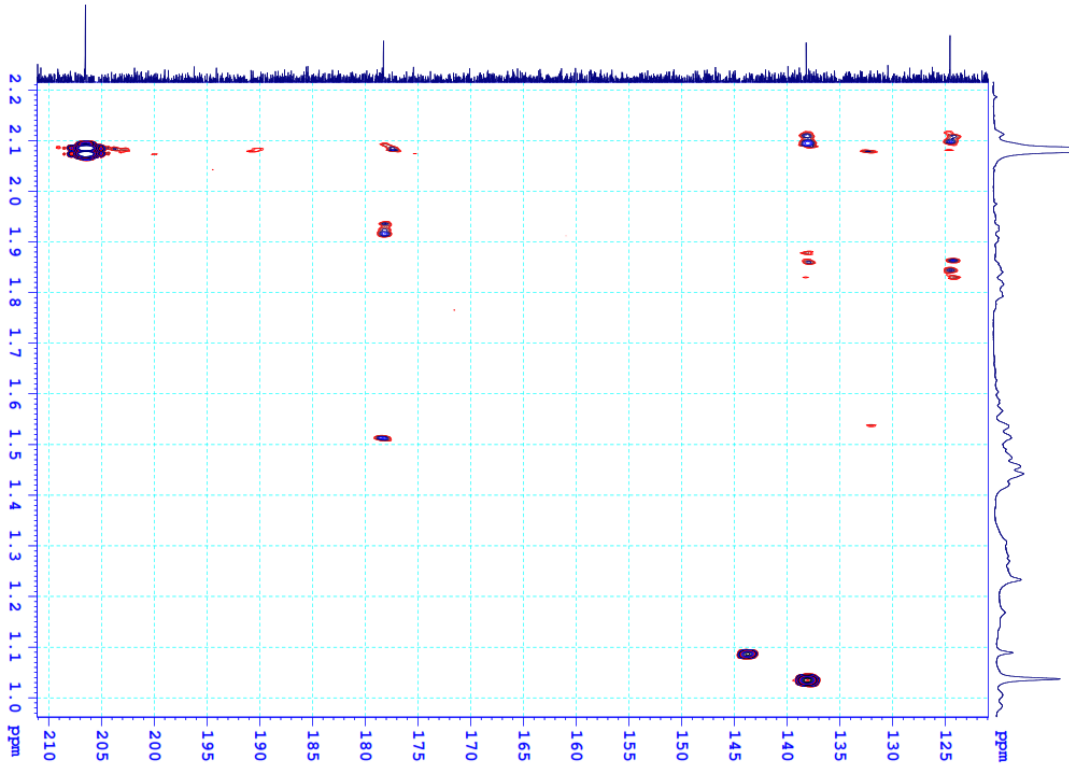
Phụ lục 2.6. Phổ DEPT giãn của hợp chất AGE2



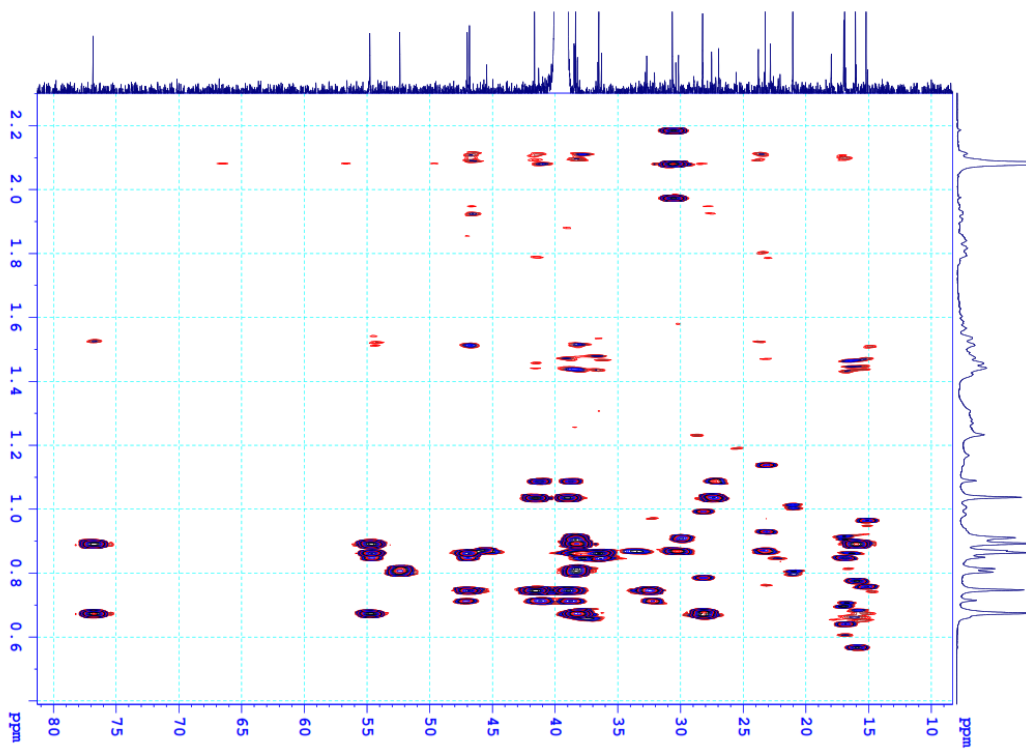
Phụ lục 2.7. Phổ HSQC giản của hợp chất AGE2



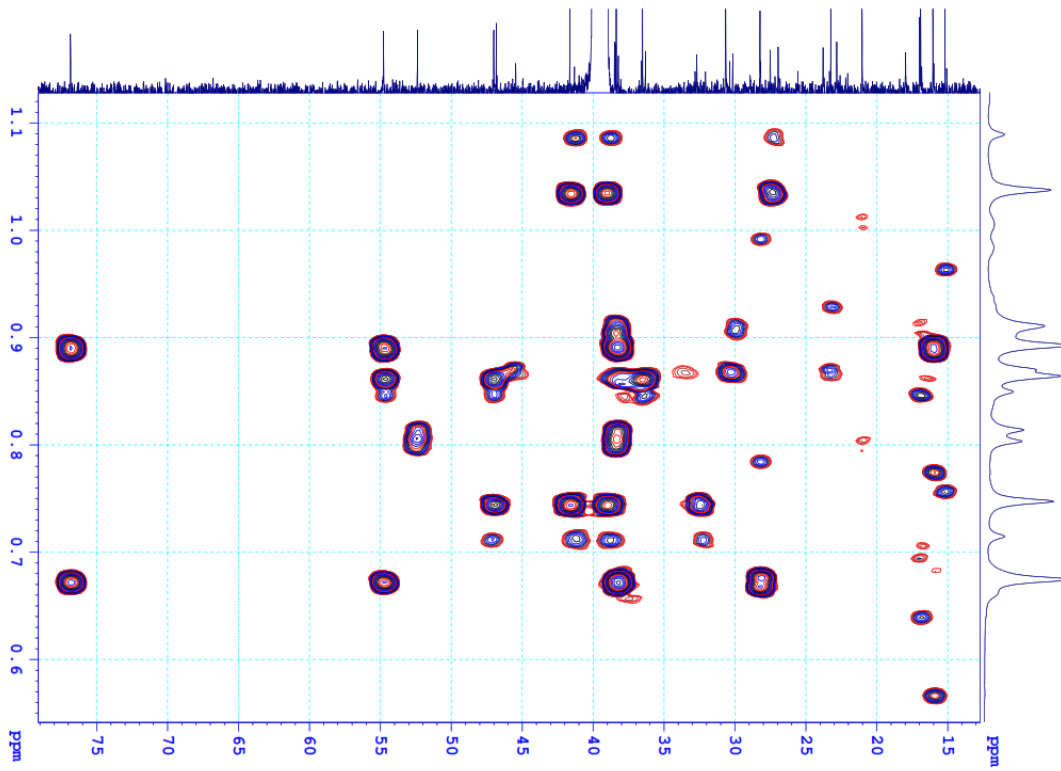
Phụ lục 2.8. Phổ HMBC giản của hợp chất AGE2



Phụ lục 2.9. Phổ HMBC giãn của hợp chất AGE2

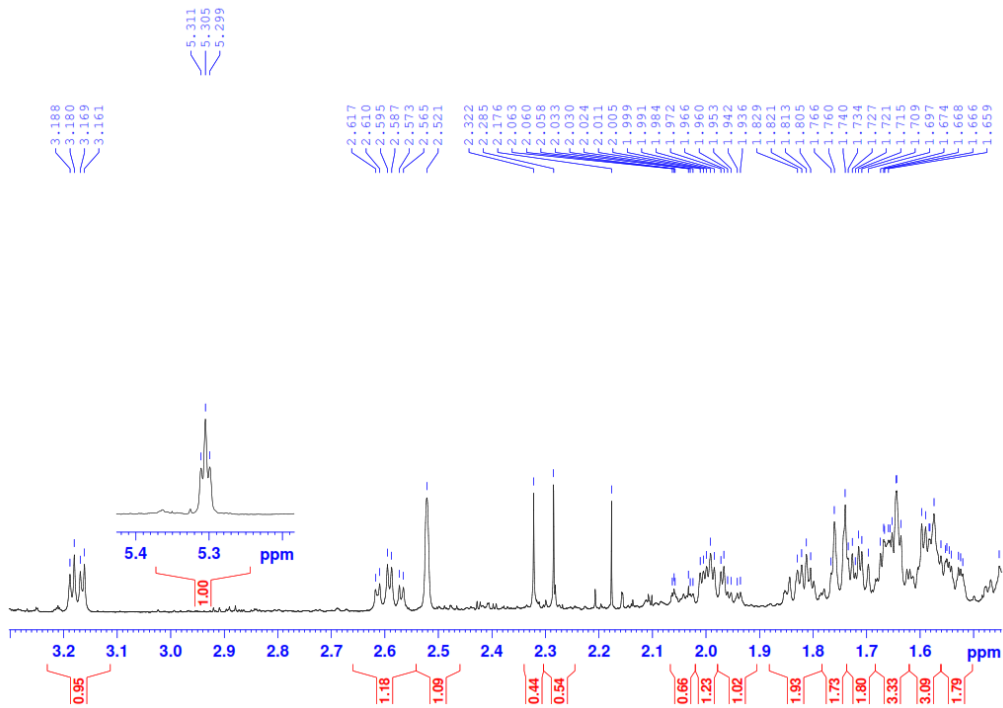


Phụ lục 2.10. Phổ HMBC giãn của hợp chất AGE2



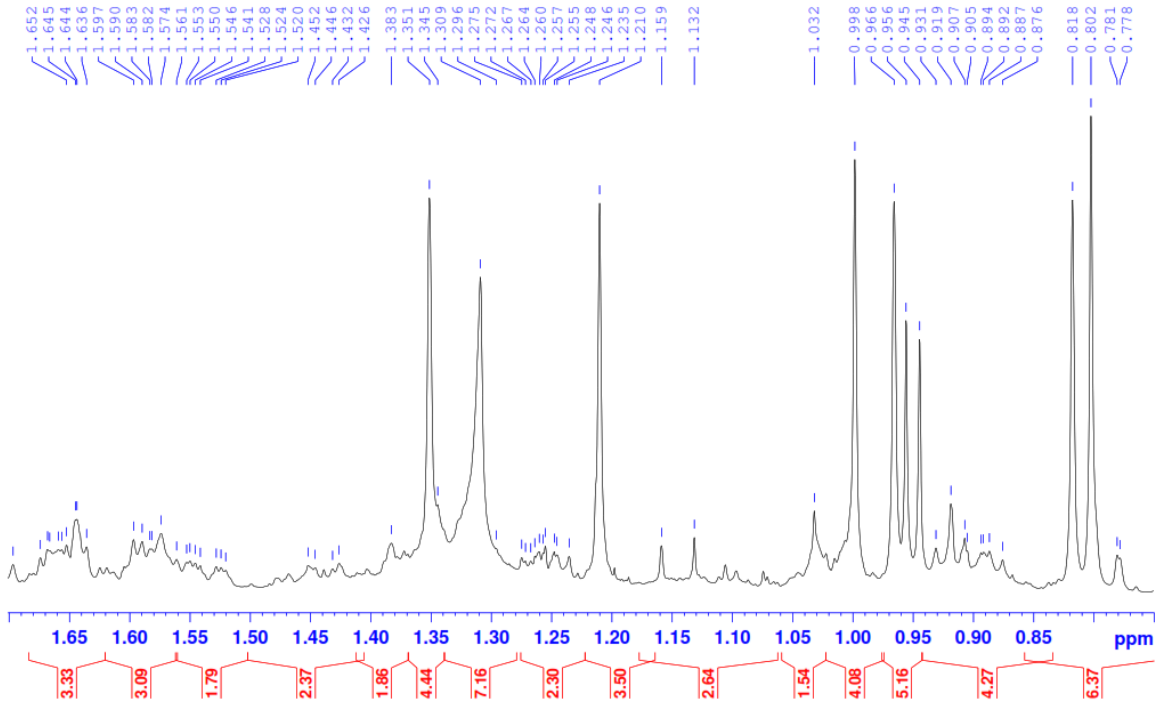
Phụ lục 2.11. Phổ HMBC giãn của hợp chất AGE2

### 3. PHỤ LỤC PHỔ CỦA HỢP CHẤT AGE3

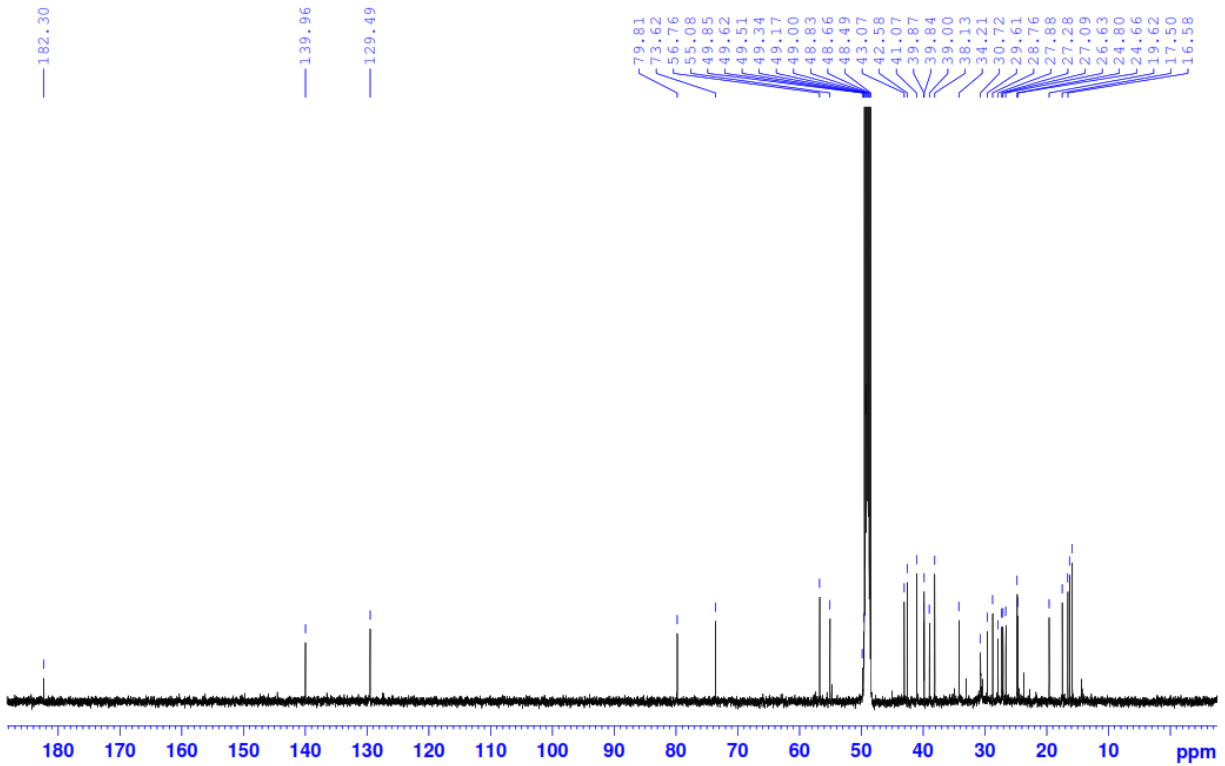


Phụ lục 3.1. Phổ  $^1\text{H}$ -NMR giãn của hợp chất AGE3

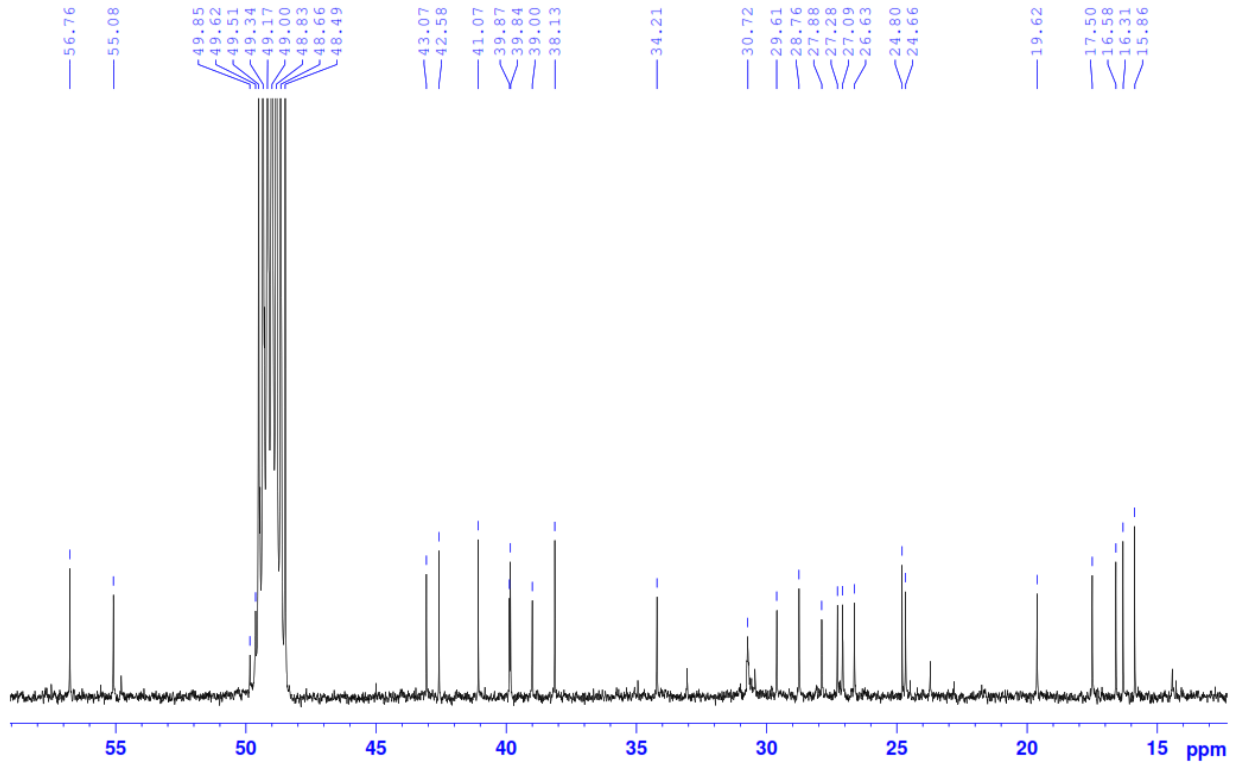




Phụ lục 3.2. Phổ  $^1\text{H-NMR}$  giãn của hợp chất AGE3

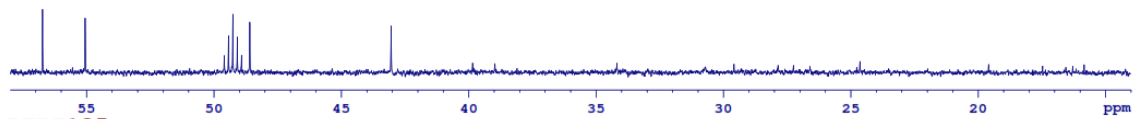


Phụ lục 3.3. Phổ  $^{13}\text{C-NMR}$  giãn của hợp chất AGE3

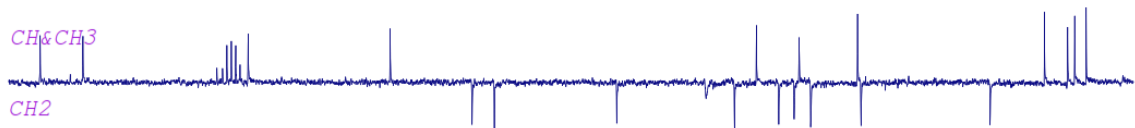


Phụ lục 3.4. Phổ  $^{13}\text{C}$ -NMR giãn của hợp chất AGE3

DEPT90



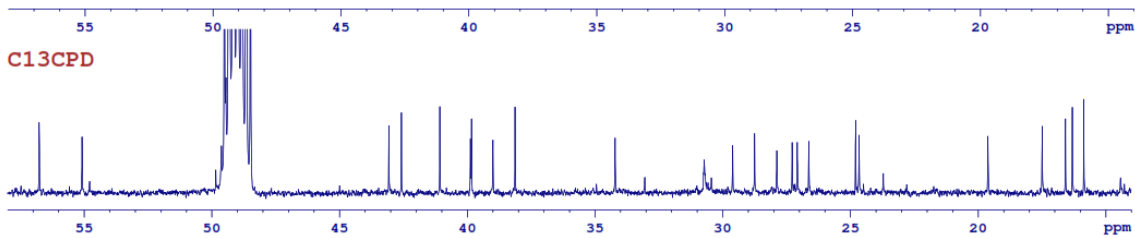
DEPT135



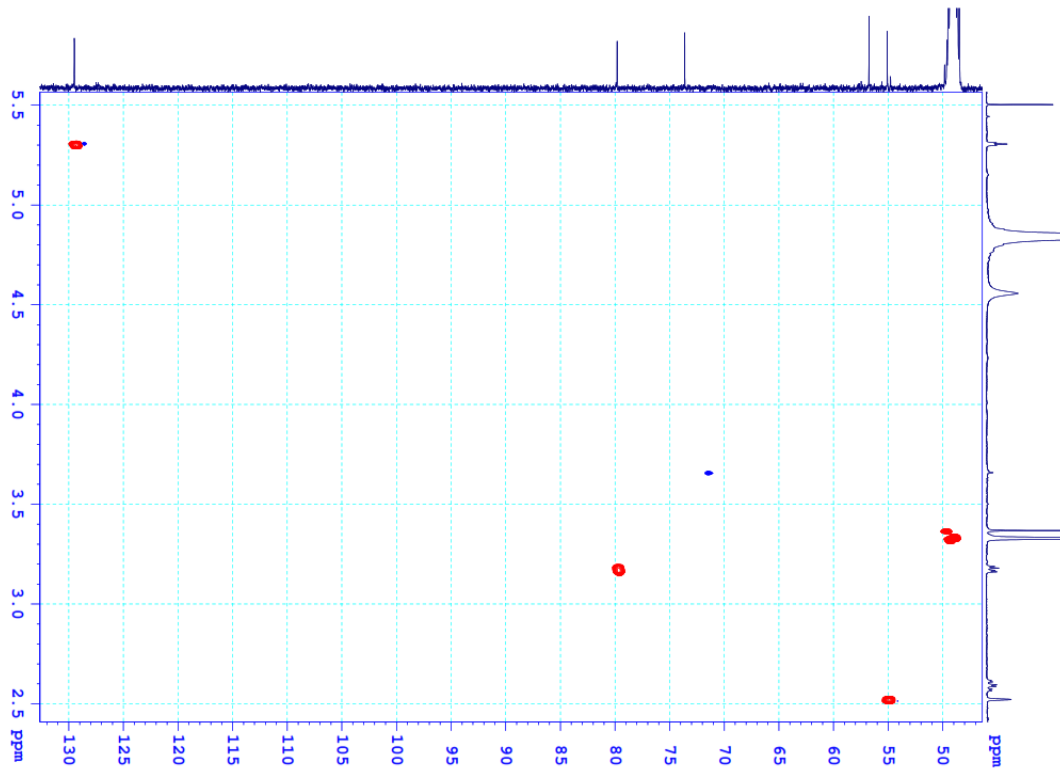
CH&CH3

CH2

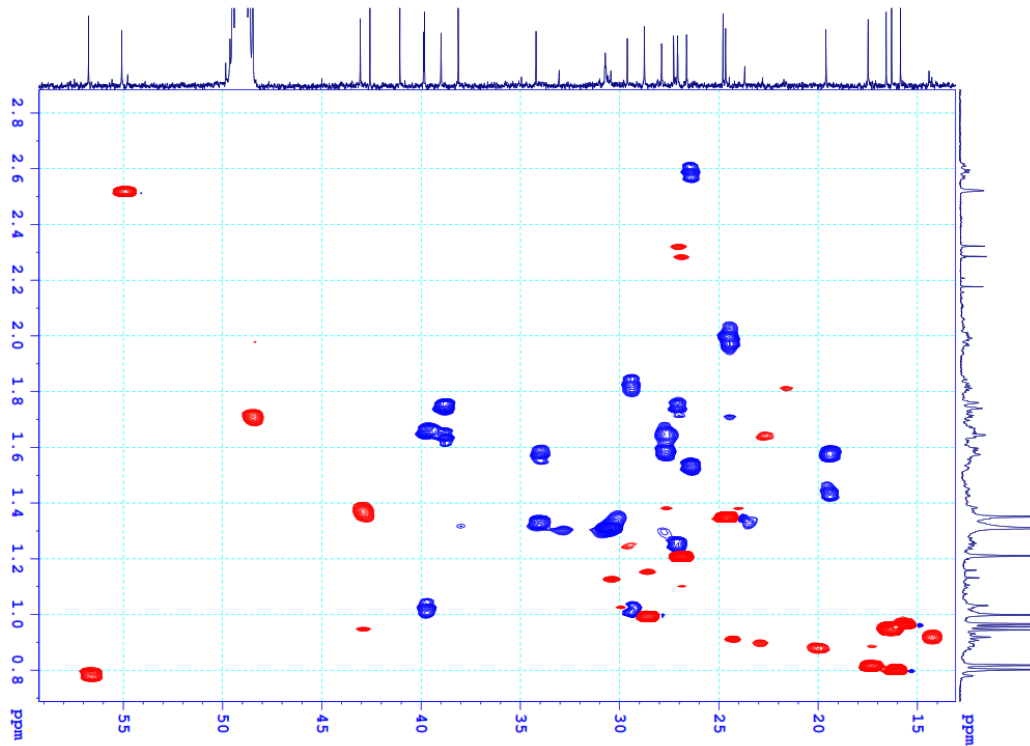
C13CPD



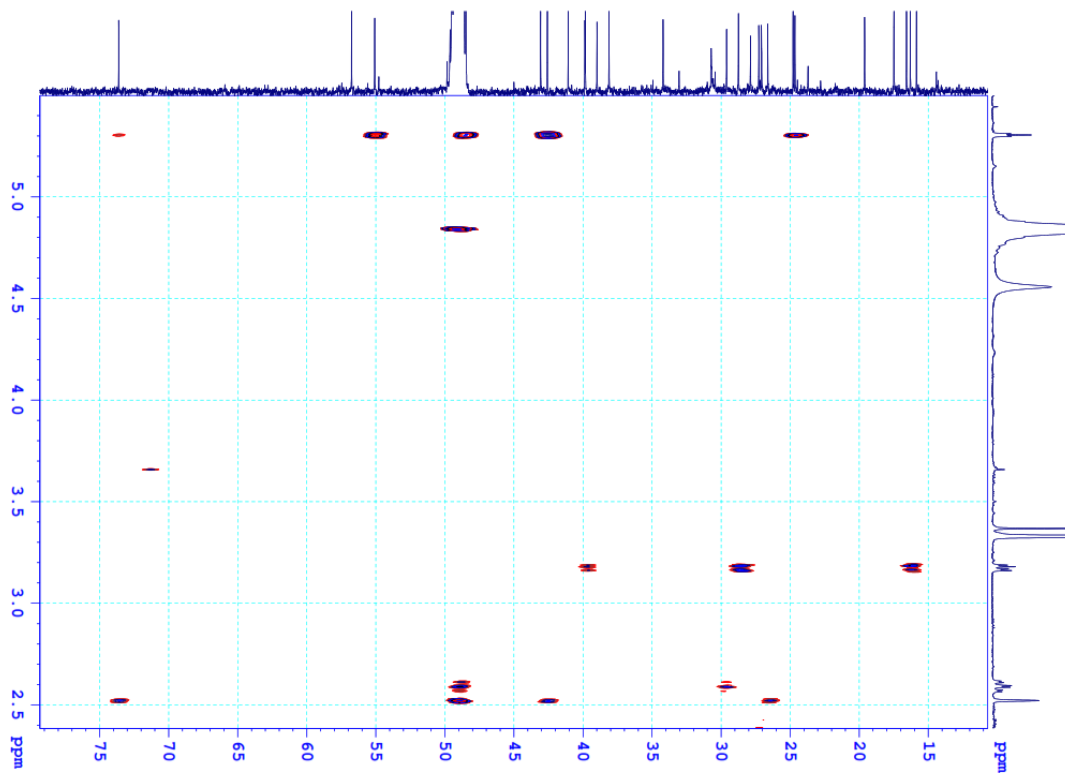
Phụ lục 3.5. Phổ DEPT giãn của hợp chất AGE3



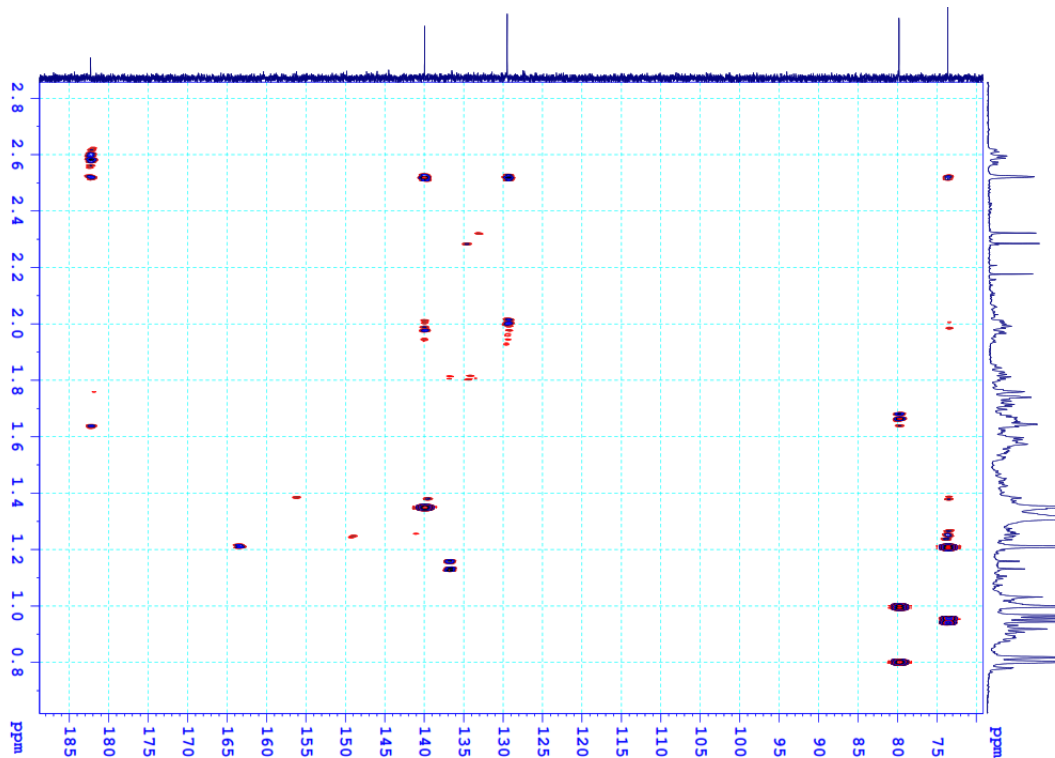
Phụ lục 3.6. Phổ HSQC gần của hợp chất AGE3



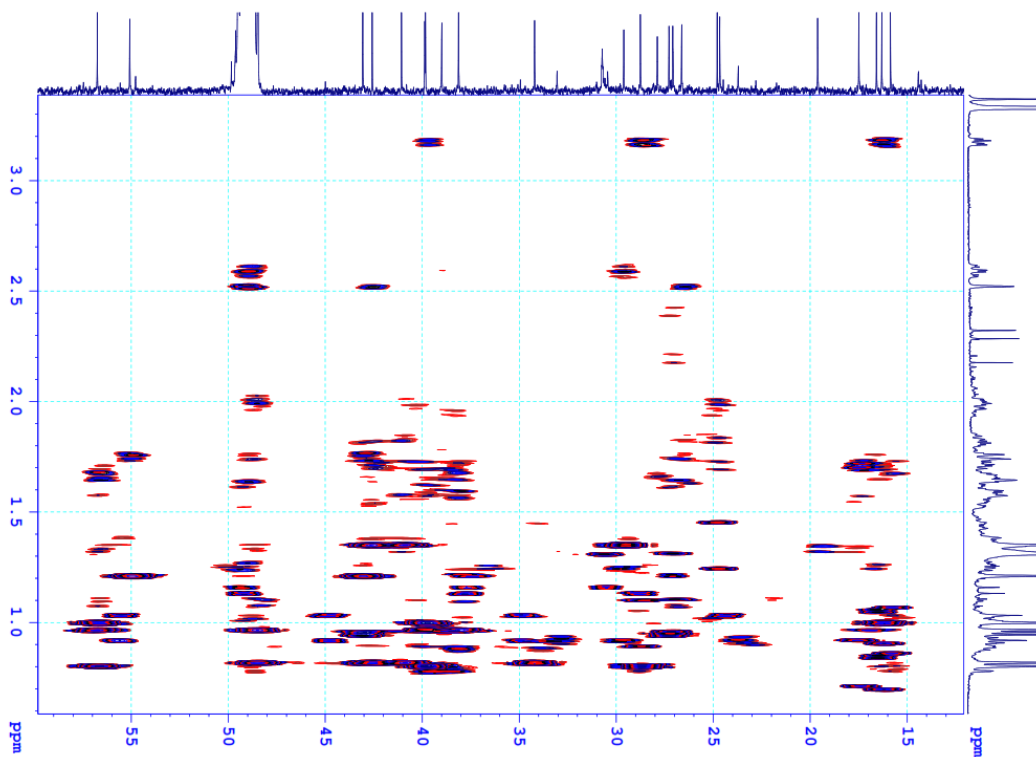
Phụ lục 3.7. Phổ HSQC gần của hợp chất AGE3



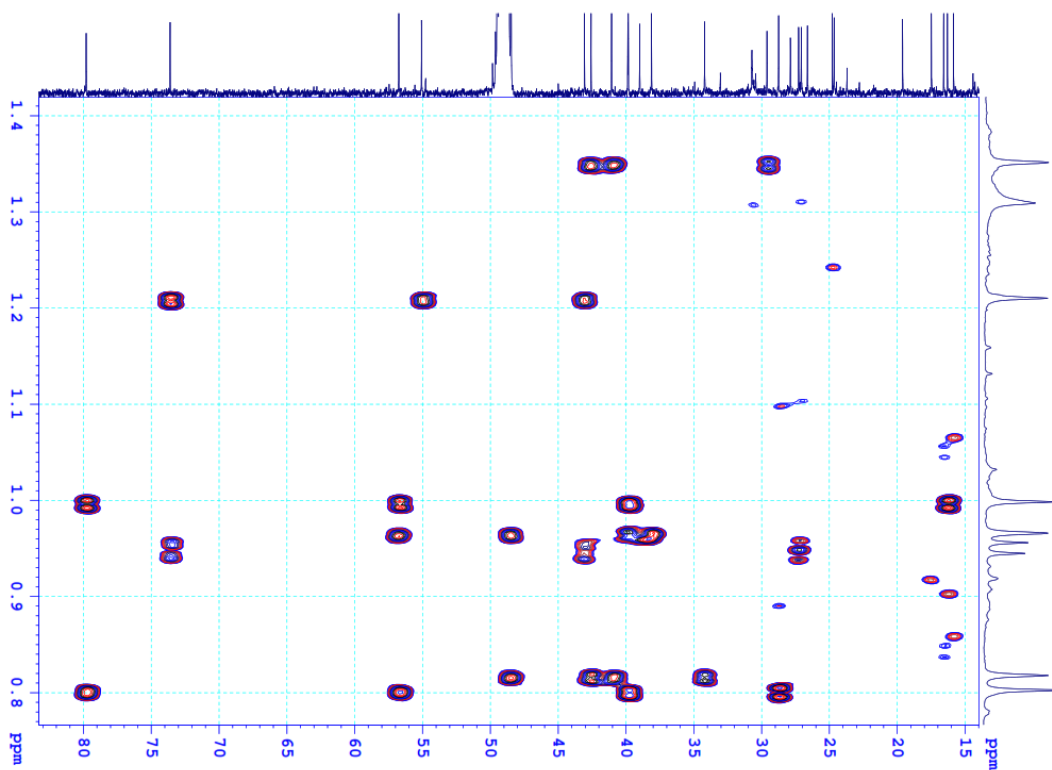
Phụ lục 3.8. Phổ HMBC gần của hợp chất AGE3



Phụ lục 3.9. Phổ HMBC gần của hợp chất AGE3

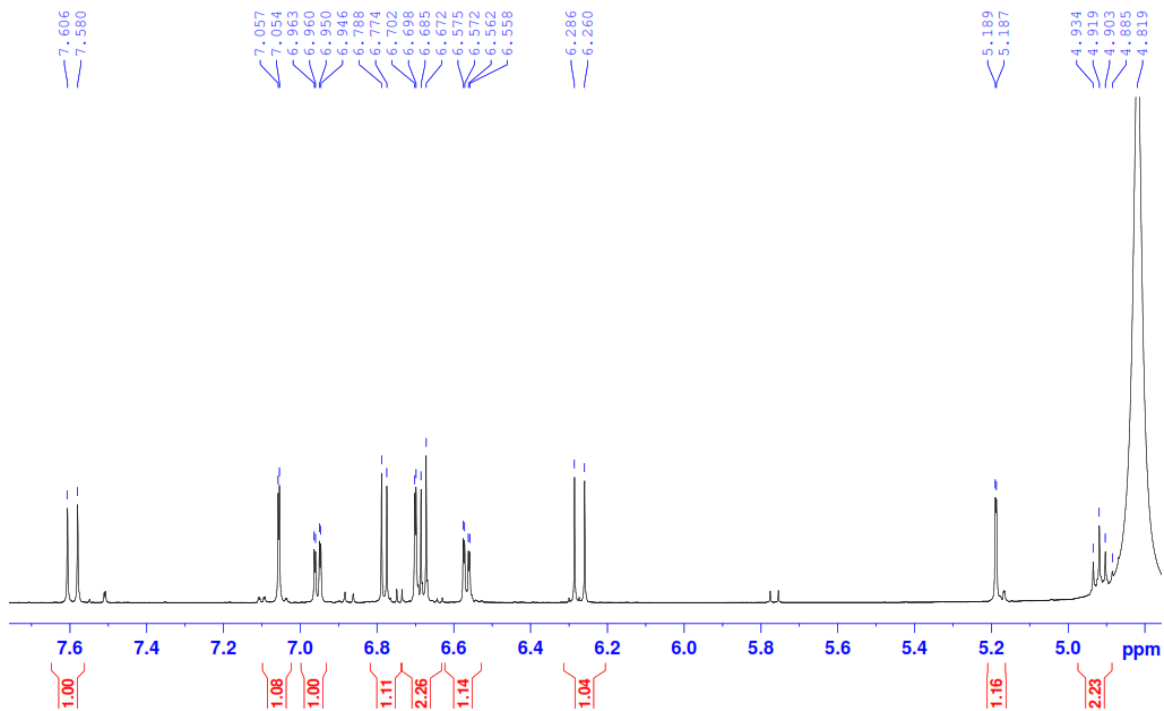


Phụ lục 3.10. Phổ HMBC giãn của hợp chất AGE3

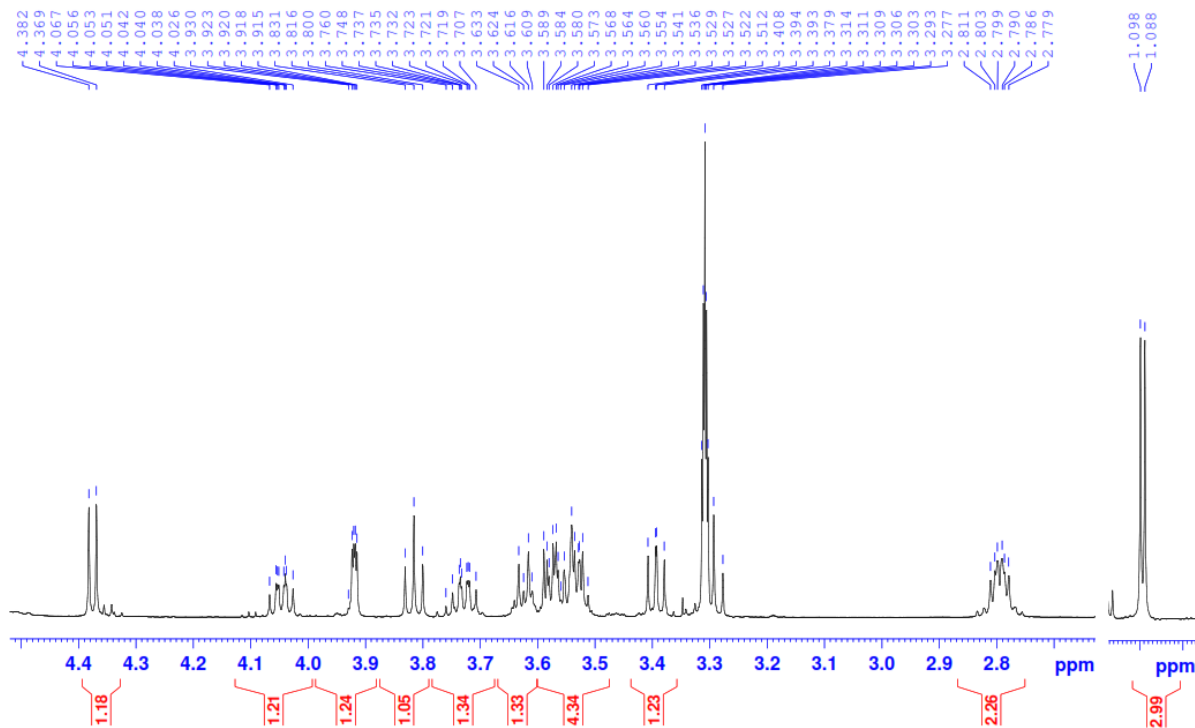


Phụ lục 3.11. Phổ HMBC giãn của hợp chất AGE3

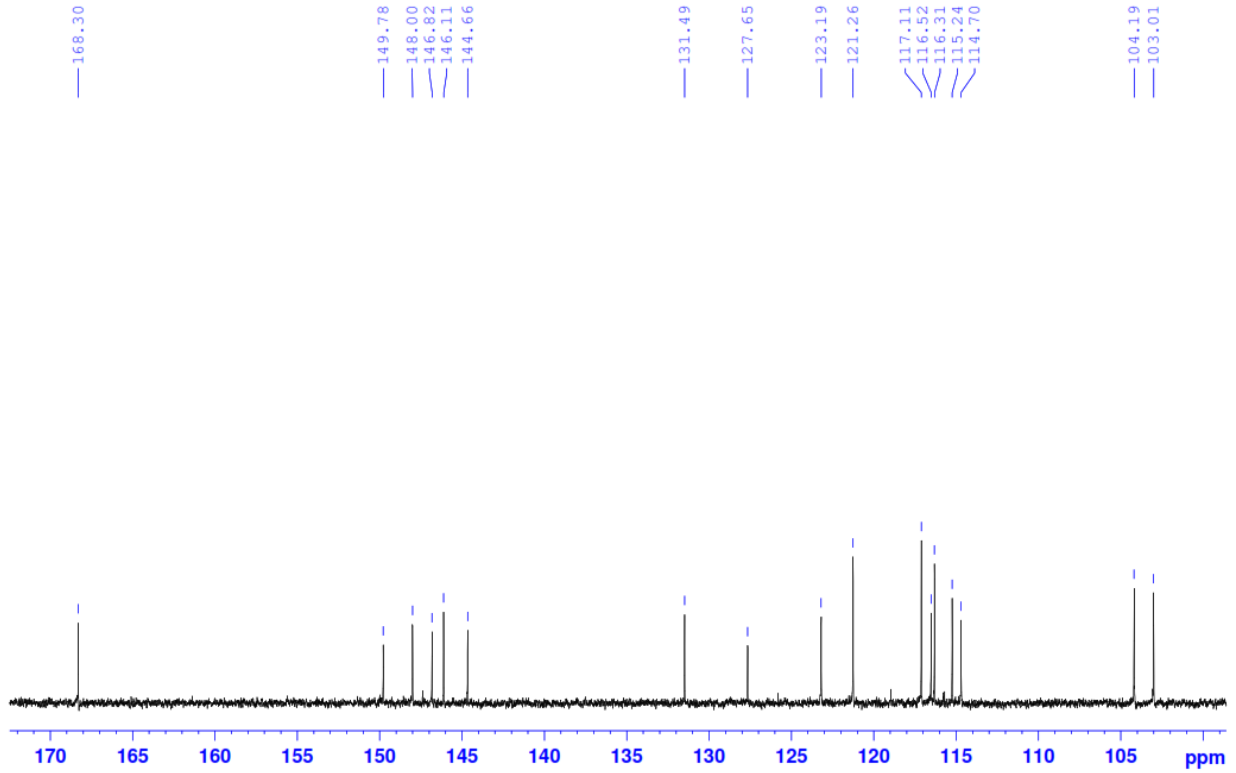
#### 4. PHỤ LỤC PHỔ CỦA HỢP CHẤT AGE4



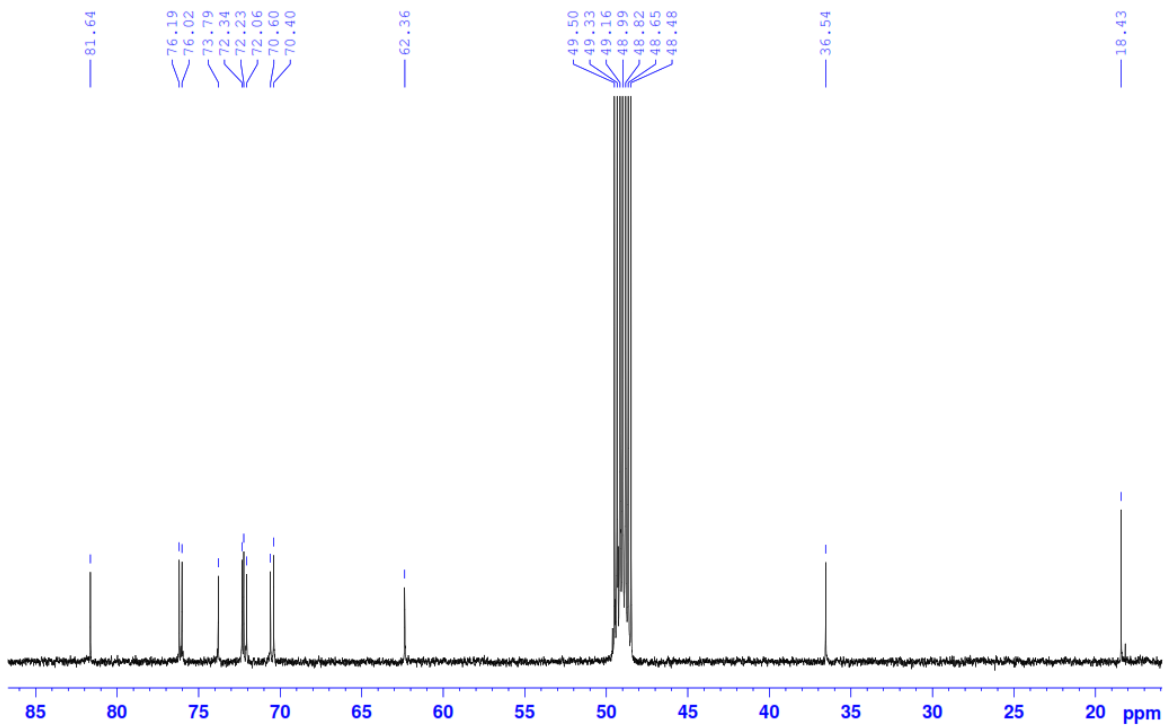
Phụ lục 4.1. Phổ  $^1\text{H-NMR}$  giãn của hợp chất AGE4



Phụ lục 4.2. Phổ  $^1\text{H-NMR}$  giãn của hợp chất AGE4

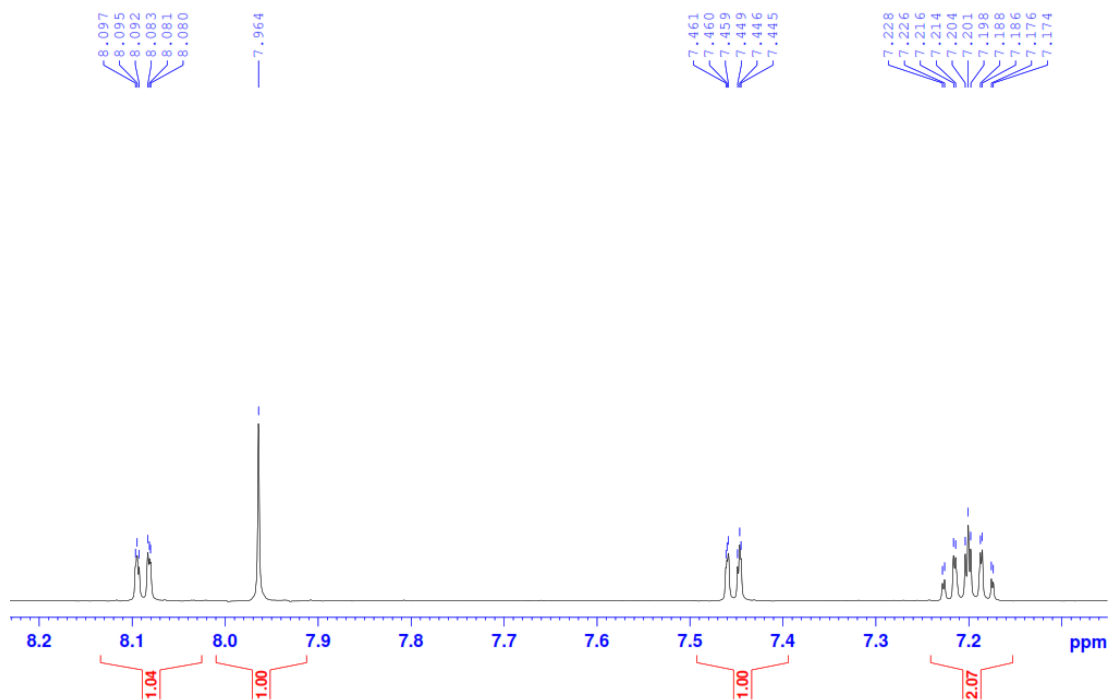


Phụ lục 4.3. Phổ  $^{13}\text{C}$ -NMR giãn của hợp chất AGE4

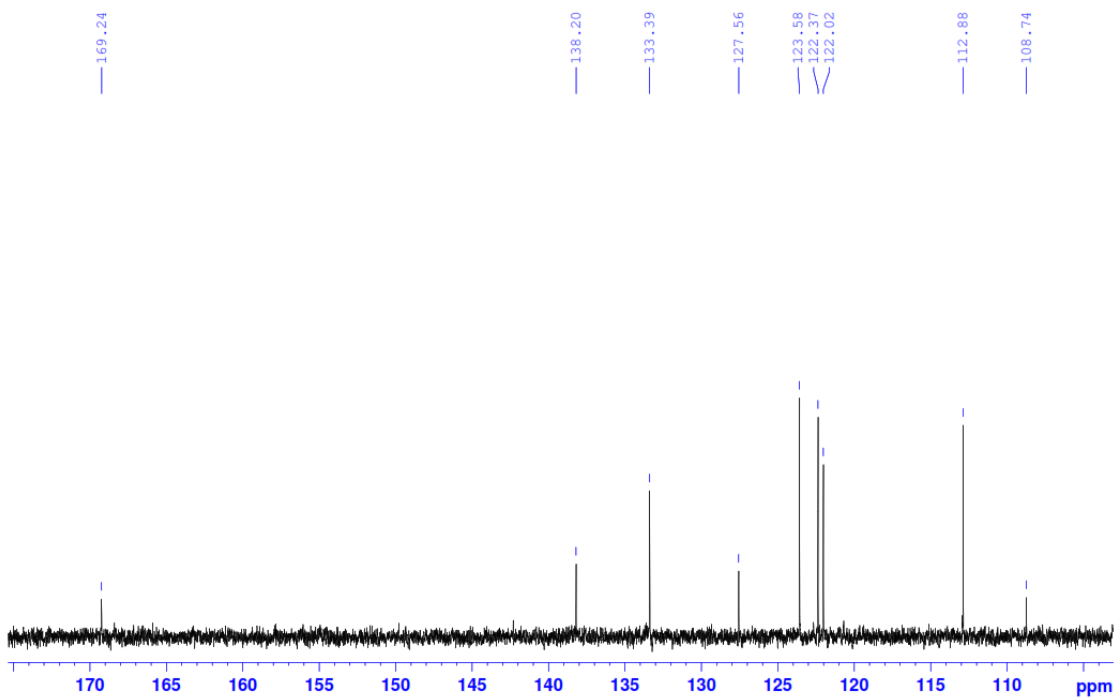


Phụ lục 4.4. Phổ  $^{13}\text{C}$ -NMR giãn của hợp chất AGE4

## 5. PHỤ LỤC PHỔ CỦA HỢP CHẤT AGE5



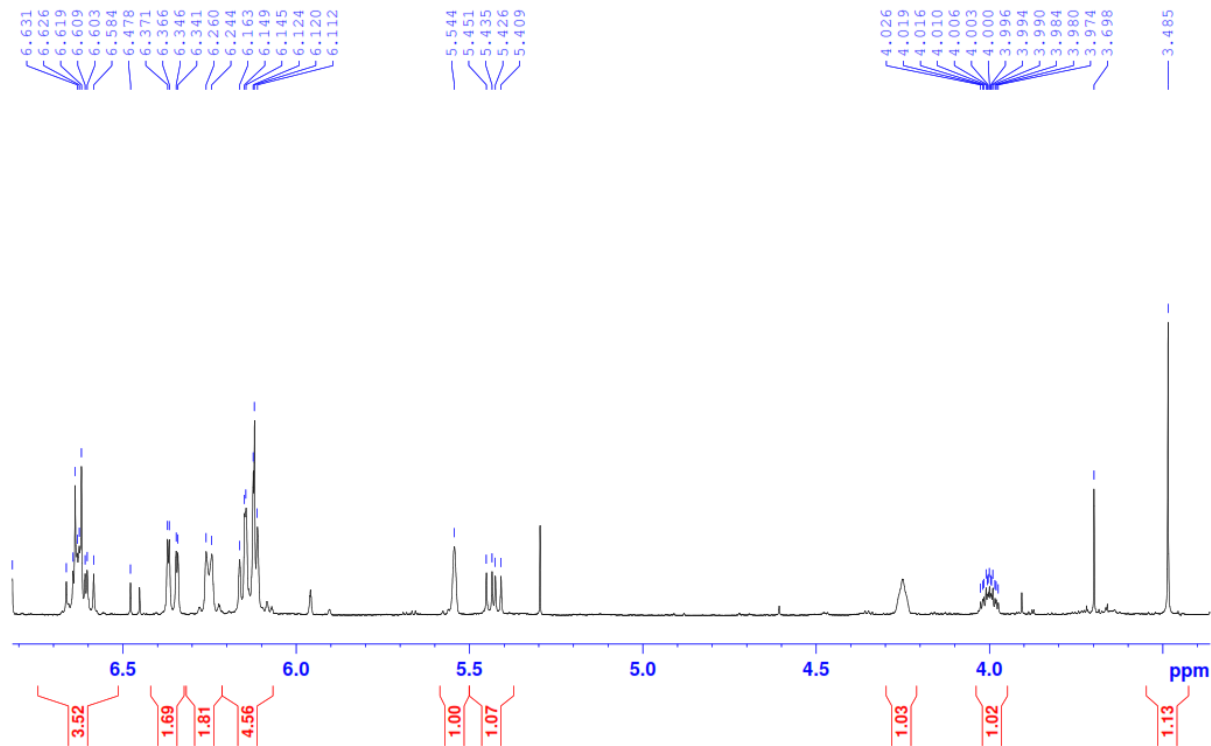
Phụ lục 5.1. Phổ  $^1\text{H-NMR}$  giản của hợp chất AGE5



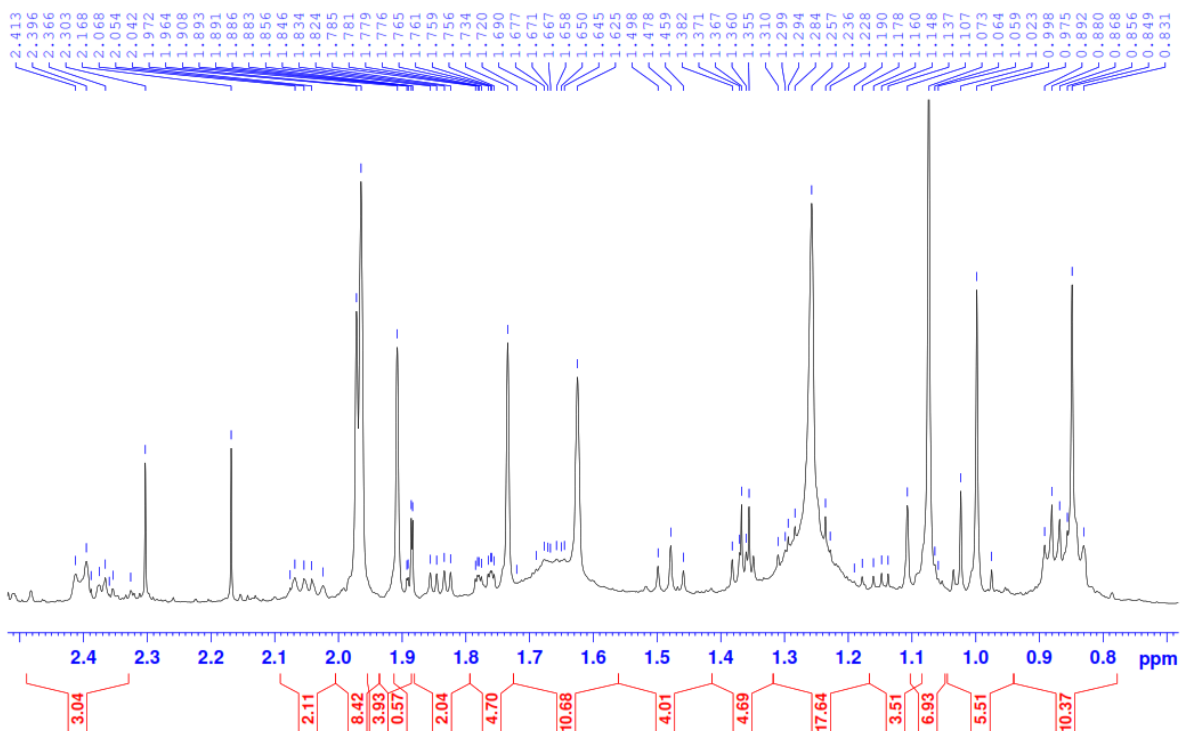
Phụ lục 5.2. Phổ  $^{13}\text{C-NMR}$  giản của hợp chất AGE5



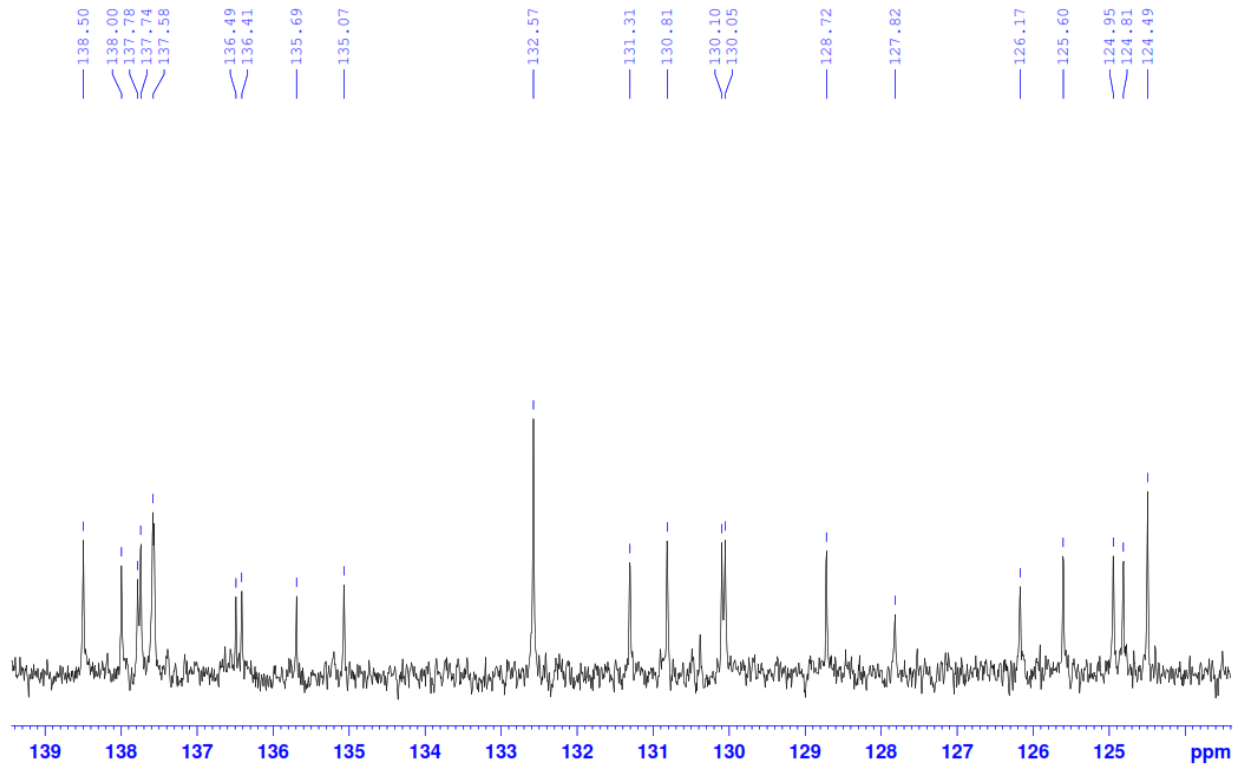
## 6. PHỤ LỤC PHỔ CỦA HỢP CHẤT AGE6



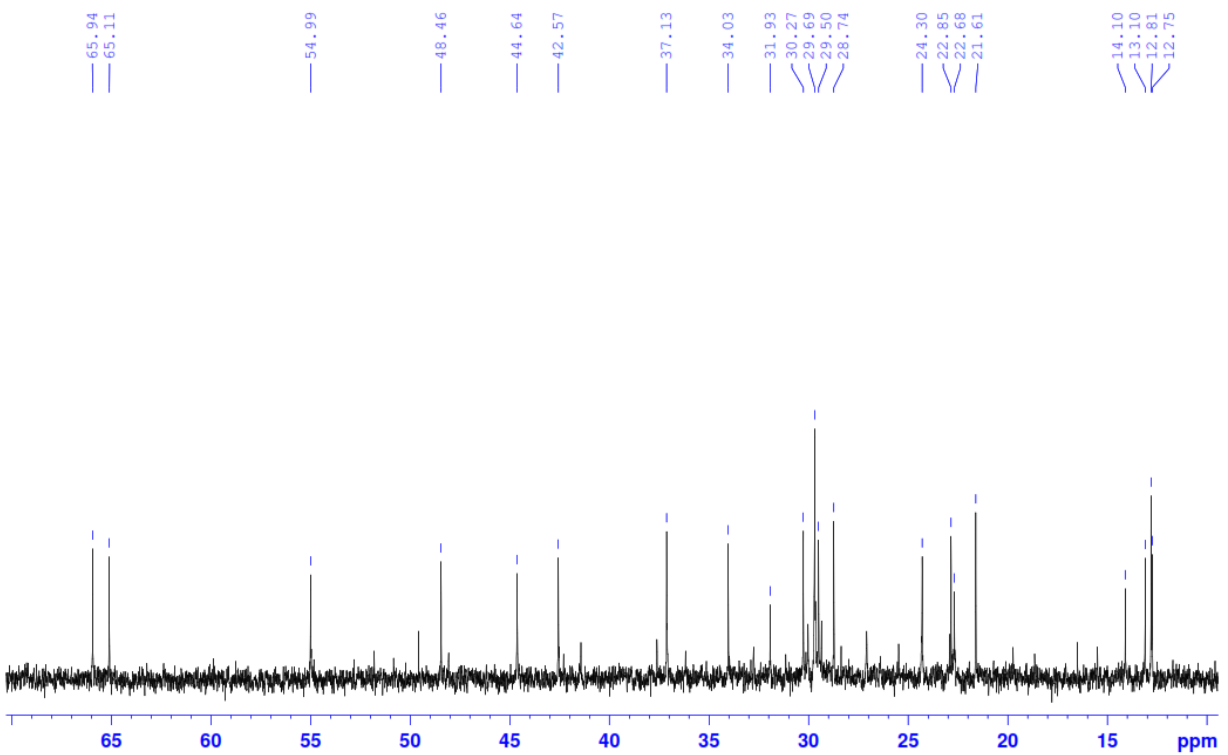
Phụ lục 6.1. Phổ  $^1\text{H-NMR}$  giãn của hợp chất AGE6



Phụ lục 6.2. Phổ  $^1\text{H-NMR}$  giãn của hợp chất AGE6

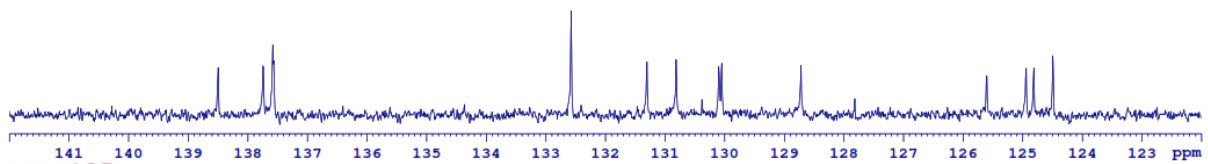


Phụ lục 6.3. Phổ  $^{13}\text{C}$ -NMR giãn của hợp chất AGE6

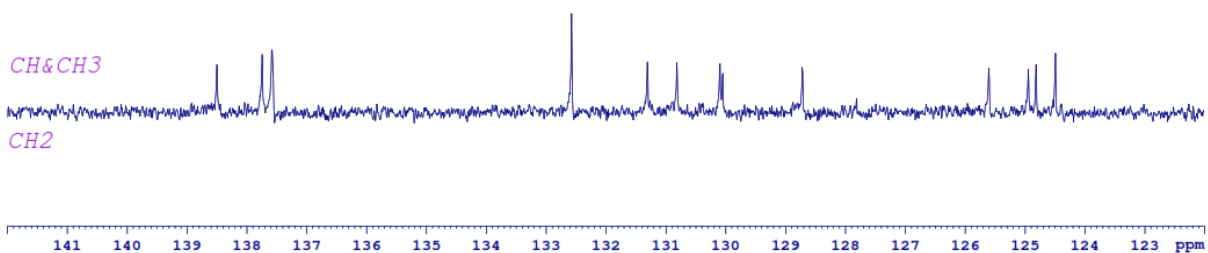


Phụ lục 6.4. Phổ  $^{13}\text{C}$ -NMR giãn của hợp chất AGE6

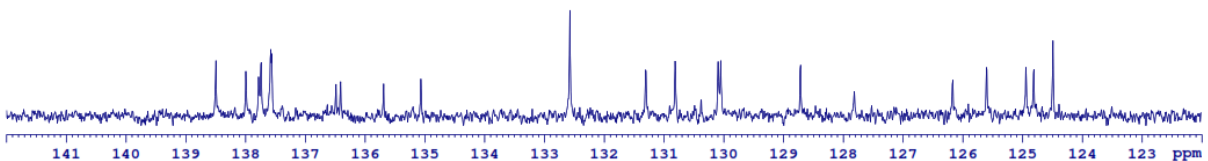
DEPT90



DEPT135

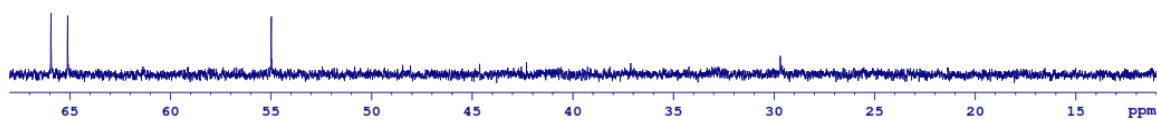


C13CPD

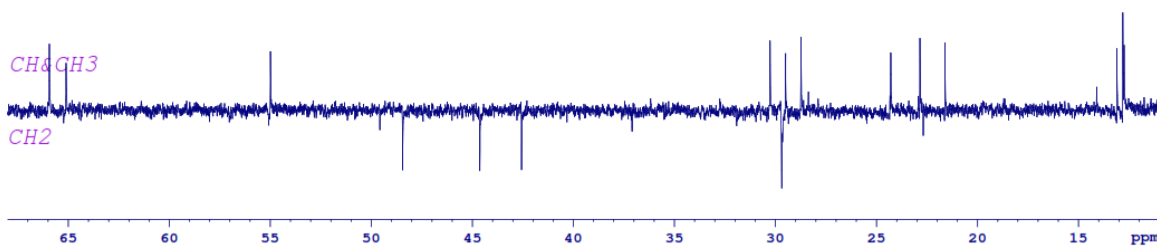


Phụ lục 6.5. Phổ DEPT giản của hợp chất AGE6

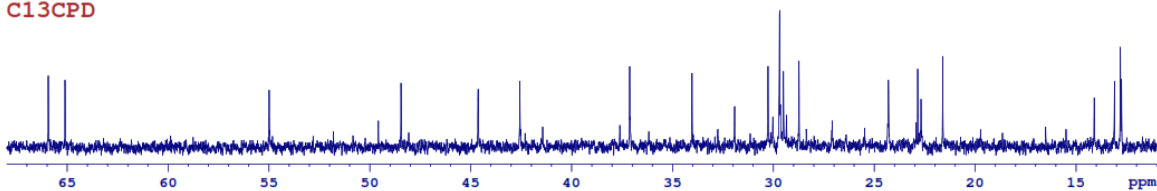
DEPT90



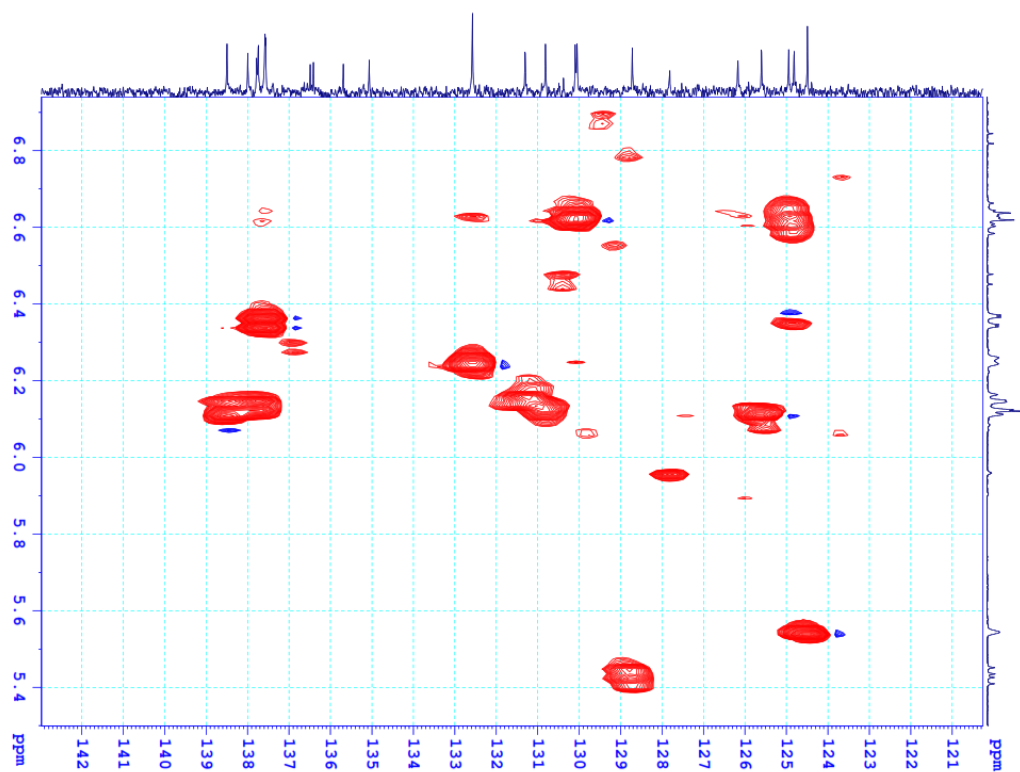
DEPT135



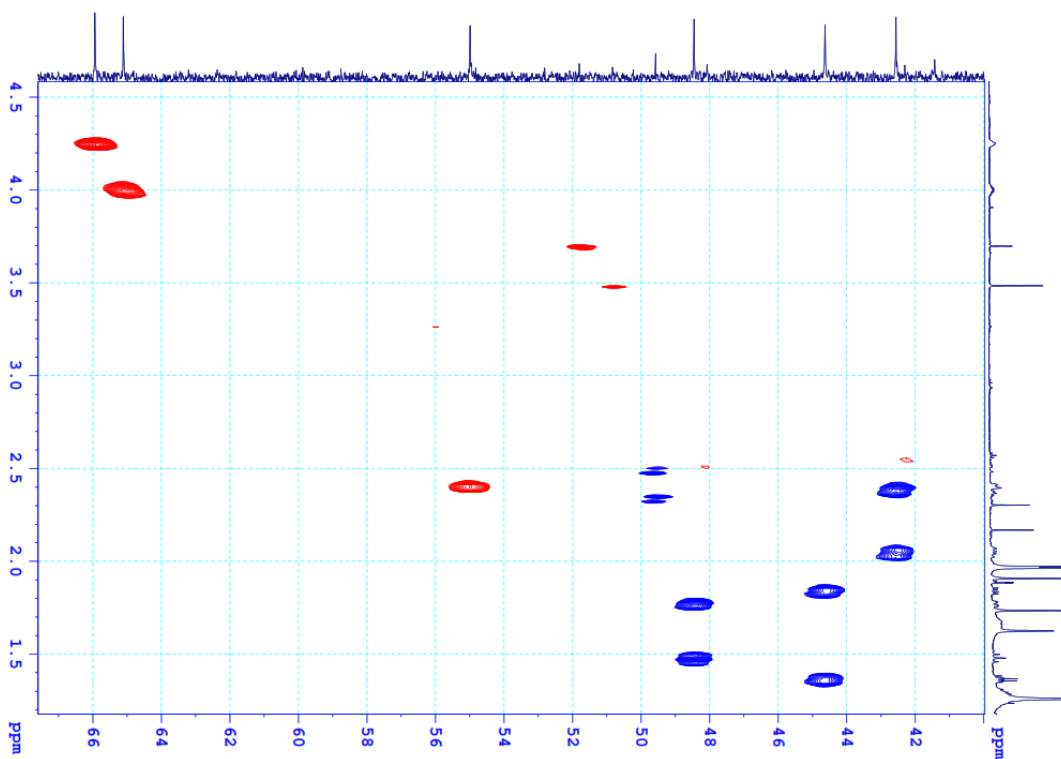
C13CPD



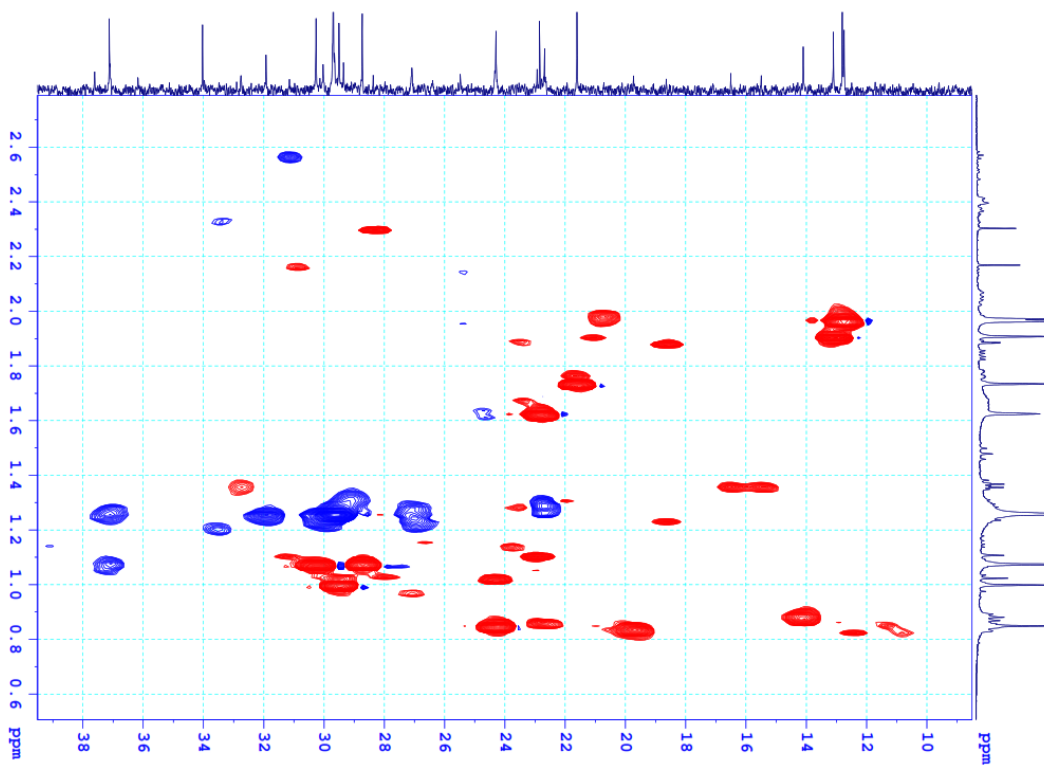
Phụ lục 6.6. Phổ DEPT giản của hợp chất AGE6



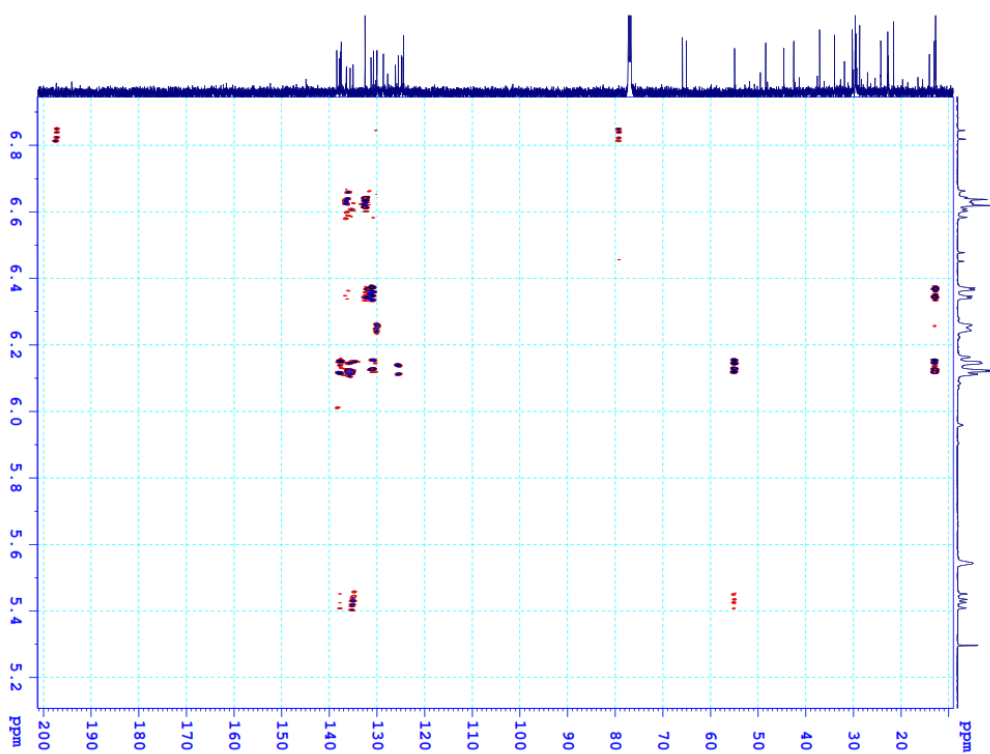
Phụ lục 6.7. Phổ HSQC giản của hợp chất AGE6



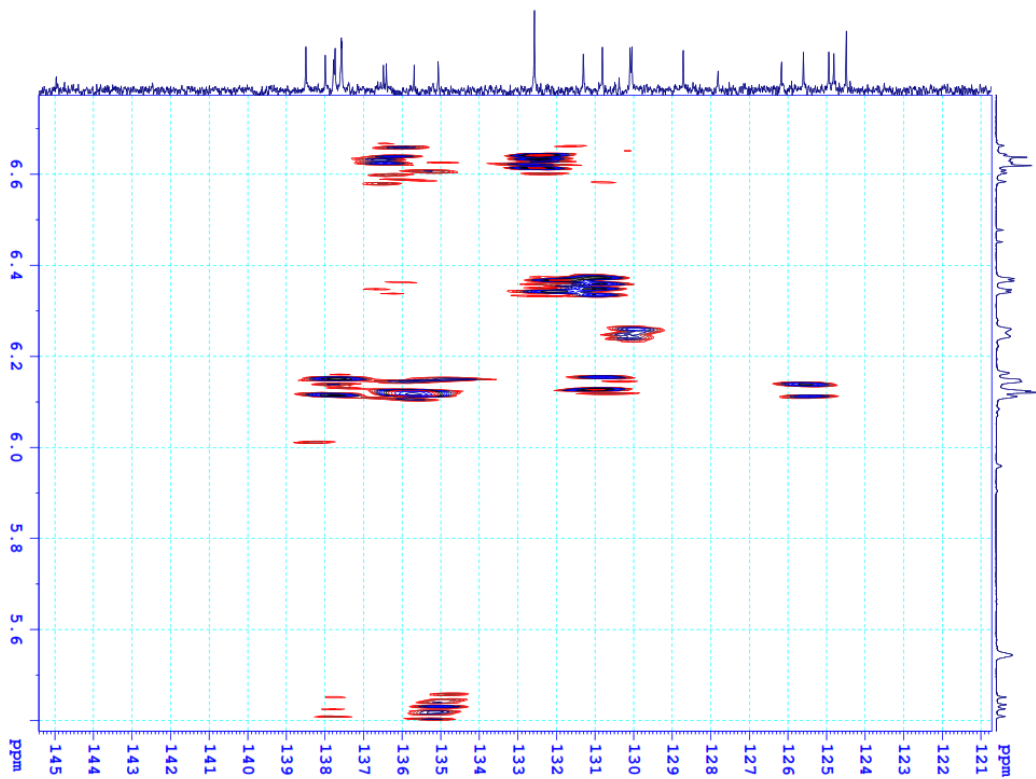
Phụ lục 6.8. Phổ HSQC giản của hợp chất AGE6



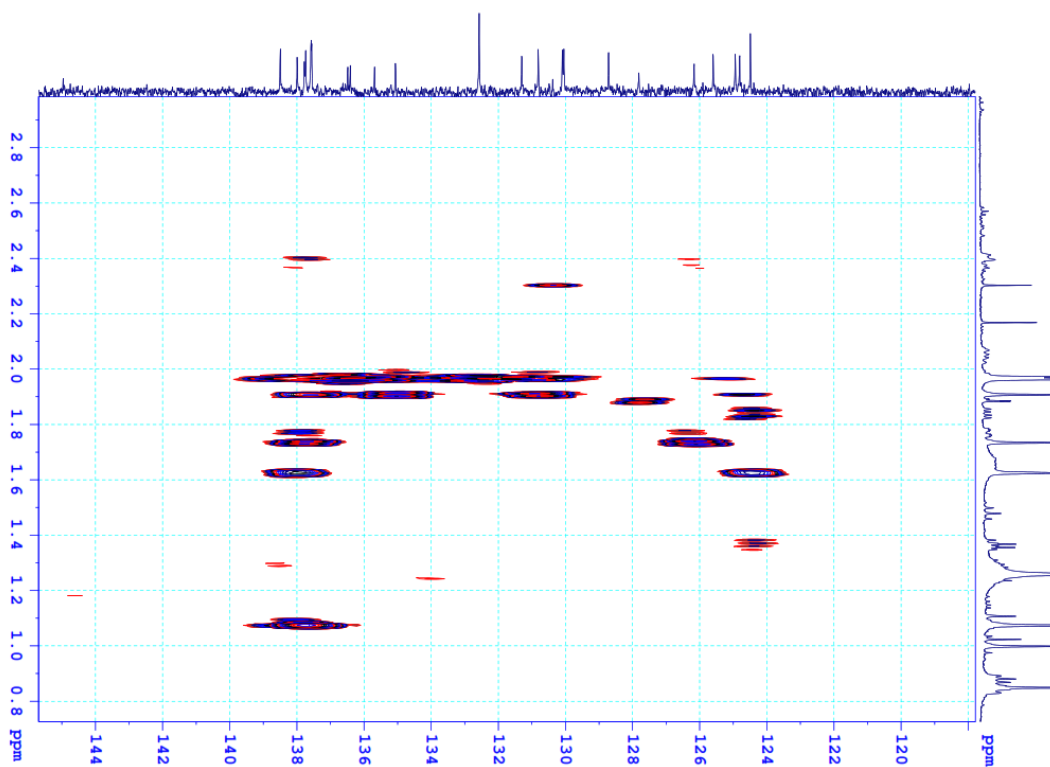
Phụ lục 6.9. Phổ HSQC giản của hợp chất AGE6



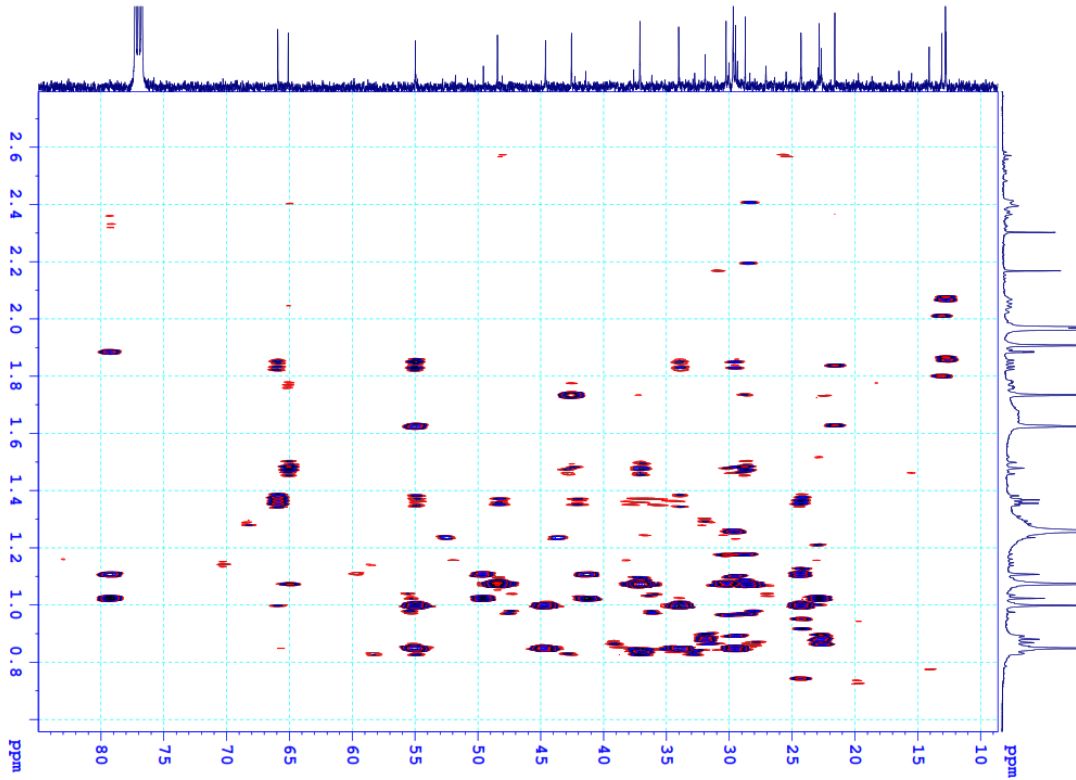
Phụ lục 6.10. Phổ HMBC giản của hợp chất AGE6



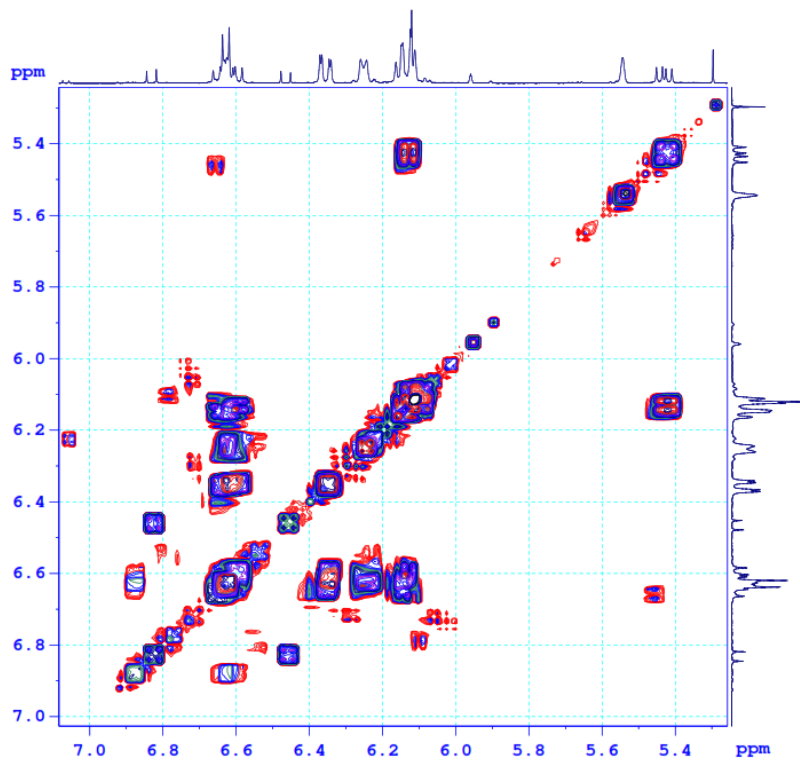
Phụ lục 6.11. Phổ HMBC giãn của hợp chất AGE6



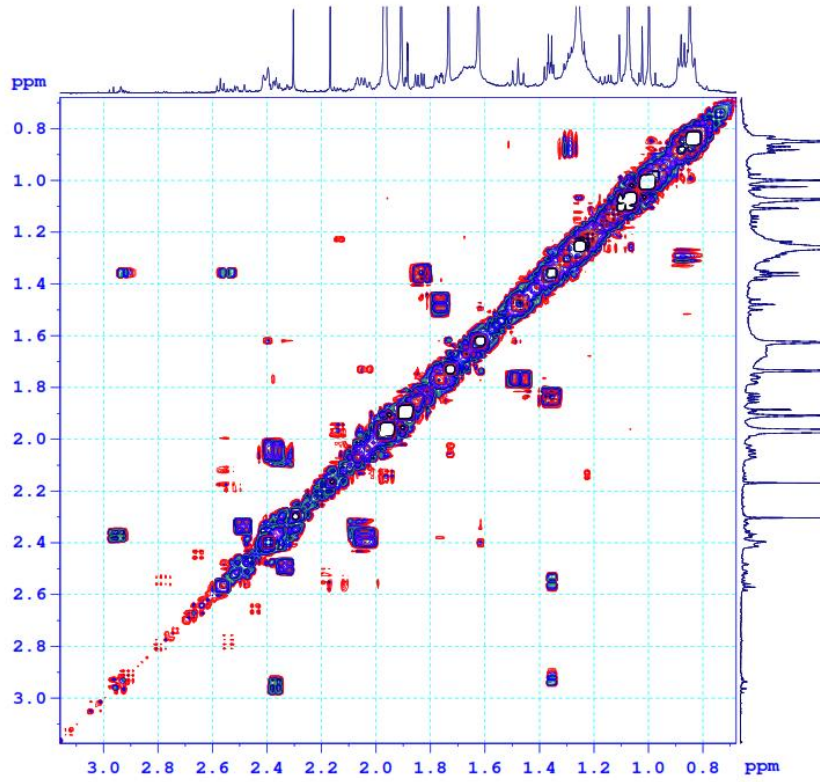
Phụ lục 6.12. Phổ HMBC giãn của hợp chất AGE6



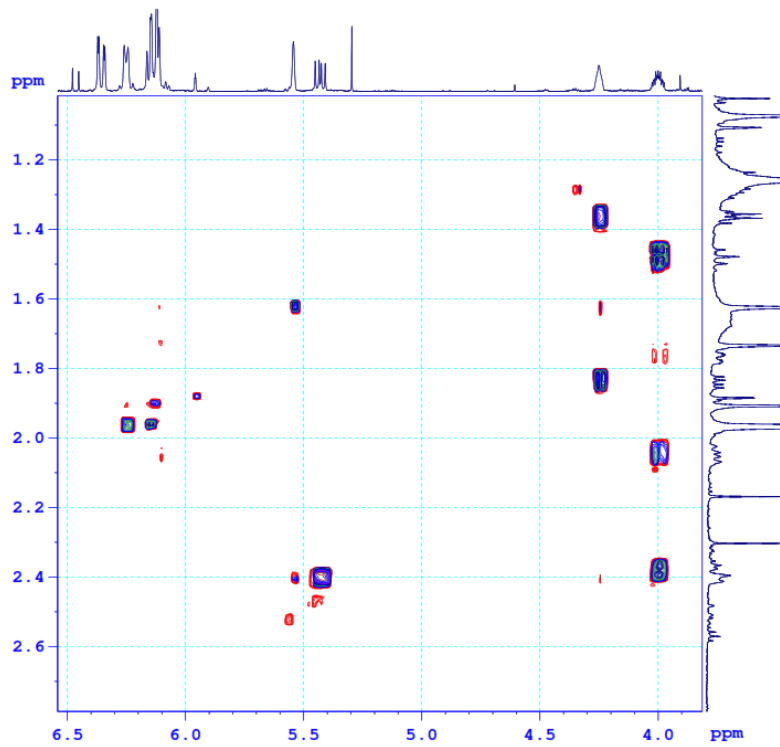
Phụ lục 6.13. Phổ HMBC giãn của hợp chất AGE6



Phụ lục 6.14. Phổ COSY giãn của hợp chất AGE6



Phụ lục 6.15. Phổ COSY giãn của hợp chất AGE6



Phụ lục 6.16. Phổ COSY giãn của hợp chất AGE6