

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



NGUYỄN THỊ LUYẾN

**NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN HÓA HỌC VÀ MỘT SỐ HOẠT
TÍNH SINH HỌC TỪ HAI LOÀI *WEDELIA CHINENSIS* VÀ *WEDELIA
TRILOBATA*, HỌ CÚC (ASTERACEAE)**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ HÓA HỌC

Hà Nội, 2023

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ

NGUYỄN THỊ LUYẾN

NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN HÓA HỌC VÀ MỘT SỐ HOẠT
TÍNH SINH HỌC TỪ HAI LOÀI *WEDELIA CHINENSIS* VÀ
WEDELIA TRILOBATA, HỌ CÚC (ASTERACEAE)

Chuyên ngành: Hóa hữu cơ
Mã số: 9 44 01 14

LUẬN ÁN TIẾN SĨ HÓA HỌC

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:

- PGS.TS. Nguyễn Hải Đăng
- PGS.TS. Nguyễn Tiến Đạt

Hà Nội, 2023

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan luận án này là công trình nghiên cứu của tôi dưới sự hướng dẫn khoa học của TS. Nguyễn Hải Đăng và PGS.TS. Nguyễn Tiến Đạt. Các số liệu, kết quả trong luận án là trung thực và chưa được công bố trong bất kỳ công trình nào khác.

Tác giả

Nguyễn Thị Luyện

LỜI CẢM ƠN

Luận án này được hoàn thành tại Viện Hóa sinh biển - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Trong quá trình nghiên cứu, tác giả đã nhận được nhiều sự chỉ dạy, giúp đỡ quý báu của các thầy cô, các nhà khoa học, các đồng nghiệp, bạn bè và gia đình.

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc, kính trọng nhất của mình tới PGS.TS. Nguyễn Tiến Đạt và TS. Nguyễn Hải Đăng - những người thầy đã tận tâm hướng dẫn, chỉ dạy cho tôi về mặt chuyên môn, cũng như động viên và tạo mọi điều kiện, giúp đỡ cho tôi trong suốt quá trình thực hiện luận án.

Tôi xin chân thành cảm ơn lãnh đạo và các đồng nghiệp Trung tâm Nghiên cứu nông dược - Trung tâm Nghiên cứu và chuyển giao Công nghệ đã cổ vũ, động viên và chia sẻ cho tôi những kinh nghiệm, những lời khuyên bổ ích và những góp ý quý báu trong việc thực hiện và hoàn thiện luận án.

Tôi xin trân trọng cảm ơn Ban lãnh đạo Học viện Khoa học và Công nghệ, ban lãnh đạo Viện Hóa sinh biển, đồng cảm ơn Ban lãnh đạo Trung tâm Nghiên cứu và Chuyển giao công nghệ đã giúp đỡ và tạo mọi điều kiện thuận lợi cho tôi trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu.

Tôi xin trân trọng cảm ơn Trung tâm ứng dụng các phương pháp phổ - Viện Hóa học đã giúp đỡ tôi thực hiện các phép đo phổ cộng hưởng từ hạt nhân.

Tôi xin trân trọng cảm ơn Viện Hóa sinh biển đã giúp đỡ tôi đã giúp đỡ tôi thực hiện các phép thử hoạt tính trong quá trình thực hiện luận án.

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

Xin trân trọng cảm ơn!

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	i
LỜI CẢM ƠN	ii
MỤC LỤC	iii
DANH MỤC VIẾT TẮT	vii
DANH MỤC BẢNG	ix
DANH MỤC HÌNH	x
MỞ ĐẦU	2
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN	4
1.1. Giới thiệu chung về chi <i>Wedelia</i>	4
1.1.1. Tổng quan về loài Sài đất ba thùy <i>Wedelia trilobata</i> (L.) Hitchc.....	5
1.1.2. Tổng quan về loài Sài đất <i>Wedelia chinensis</i> (Osbeck) Merr.	6
1.2. Tình hình nghiên cứu về chi <i>Wedelia</i>	9
1.2.1. Các nghiên cứu về thành phần hóa học.....	9
1.2.1.1. Thành phần sesquiterpene	9
1.2.1.2. Thành phần diterpene	13
1.2.1.3. Thành phần triterpene và triterpene saponin.....	19
1.2.1.4. Thành phần flavonoid.....	21
1.2.1.5. Các thành phần khác	23
1.2.2. Các nghiên cứu về hoạt tính sinh học về các loài thuộc chi <i>Wedelia</i> ..	25
1.2.2.1. Hoạt tính gây độc tế bào ung thư	25
1.2.2.2. Hoạt tính phòng và hỗ trợ bệnh tiểu đường	27
1.2.2.3. Hoạt tính chống oxy hóa	28
1.2.2.4. Kháng viêm, kháng khuẩn, kháng nấm.....	29
1.2.2.5. Tác động ức chế hệ thần kinh trung ương.....	31
1.2.2.6. Các hoạt tính sinh học khác	32
CHƯƠNG 2. PHƯƠNG PHÁP VÀ THỰC NGHIỆM	33
2.1. Đối tượng nghiên cứu	33
2.1.1. Sài đất ba thùy (<i>Wedelia trilobata</i> (L.) Hitchc).	33
2.1.2. Sài đất (<i>Wedelia chinensis</i> (Osbeck) Merr.).	33
2.2. Phương pháp nghiên cứu	34

2.2.1. Phương pháp phân lập chất	34
2.2.2. Phương pháp xác định cấu trúc các hợp chất	34
2.2.2.1. Phổ khối lượng (MS).....	34
2.2.2.2. Phổ khối lượng phân giải cao HR-ESI-MS.....	34
2.2.2.3. Phổ cộng hưởng từ hạt nhân NMR	35
2.2.2.4. Độ quay cực $[\alpha]_D$:.....	35
2.2.2.5. Phương pháp xác định đường:	35
2.2.2.6. Xác định cấu hình tuyệt đối theo phương pháp Mosher	36
2.2.3. Phương pháp đánh giá hoạt tính sinh học	36
2.2.3.1. Phương pháp đánh giá hoạt tính kháng viêm.....	36
2.2.3.2. Phương pháp đánh giá ức chế α -glucosidase	39
2.2.3.3. Phương pháp đánh giá hoạt tính ức chế α -amylase.....	40
2.2.3.4. Phương pháp đánh giá hoạt tính gây độc tế bào	40
2.3. Thực nghiệm	42
2.3.1. Phân lập các hợp chất từ Sài đất ba thùy (<i>W. trilobata</i>)	42
2.3.2. Phân lập các hợp chất từ mẫu Sài đất (<i>W. chinensis</i>)	45
2.4. Thông số vật lý và dữ liệu phổ của các hợp chất phân lập.....	48
2.4.1. Thông số vật lý và dữ liệu phổ của các hợp chất phân lập được từ Sài đất ba thùy (<i>W. trilobata</i>).....	48
2.4.1.1. Hợp chất WT1 : Wedtriloside A (chất mới)	48
2.4.1.2. Hợp chất WT2 : Wedtriloside B (chất mới)	48
2.4.1.3. Hợp chất WT3 : Paniculoside-IV	48
2.4.1.4. Hợp chất WT4 : Apigenin.....	48
2.4.1.5. Hợp chất WT5 : Apigenin 7- <i>O</i> - β -D-glucopyranoside.....	49
2.4.1.6. Hợp chất WT6 : 3- <i>O</i> -[β -D-glucopyranosyl(1-4)- β -D-glucuronopyranosyl].....	49
2.4.1.7. Hợp chất WT7 : 4', 4,6-trihydroxyaurone	49
2.4.1.8. Hợp chất WT8 : Caffeic acid.....	49
2.4.2. Thông số vật lý và dữ liệu phổ của các hợp chất phân lập được từ Sài đất (<i>W. chinensis</i>).....	49
2.4.2.1. Hợp chất WC1 : Wednenic (Hợp chất mới)	49
Hợp chất (S)-MTPA của WC1 (1a)	50

Hợp chất (R)-MTPA của WC1 (1b):	50
2.4.2.2. Hợp chất WC2 : Cleroindicin E.....	50
2.4.2.3. Hợp chất WC3 : Wednenol (Hợp chất mới).....	50
2.4.2.4. Hợp chất WC4 : Cornoside.....	51
2.4.2.5. Hợp chất WC5 : Rengyol.....	51
2.4.2.6. Hợp chất WC6 : Kaempferol-3- <i>O</i> - β -D-glucopyranoside	51
2.4.2.7. Hợp chất WC7 : Quercetin-3- <i>O</i> - β -D-glucopyranoside	51
2.4.2.8. Hợp chất WC8 : Luteolin.....	51
2.4.2.9. Hợp chất WC9 : Jaceosidin.....	51
2.4.2.10. Hợp chất WC10 : 1- <i>O</i> -benzyl- β -D-glucopyranosyl-2-sulfate	51
2.4.2.11. Hợp chất WC11 : 19-hydroxy-3-oxo-12-ursen-28-oic acid	52
2.4.2.12. Hợp chất WC12 : ilexgenin B (Pubescenolic acid)	52
2.5. Hoạt tính của các hợp chất phân lập loài <i>W. chinensis</i> và <i>W. trilobata</i>	52
2.5.1. Kết quả thử hoạt tính kháng viêm các hợp chất phân lập từ loài <i>W. chinensis</i> và <i>W. trilobata</i>	52
2.5.2. Kết quả thử hoạt tính ức chế α -amylase, α -glucosidase các hợp chất phân lập từ loài <i>W. trilobata</i> và <i>W. chinensis</i>	52
2.5.3. Hoạt tính ức chế gây độc tế bào của các hợp chất phân lập từ <i>W. chinensis</i> và <i>W. trilobata</i>	53
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....	54
3.1. Xác định cấu trúc các hợp chất phân lập	54
3.1.1. Xác định cấu trúc các hợp chất phân lập từ Sài đất ba thùy (<i>W. trilobata</i>)	54
3.1.1.1. Hợp chất WT1 : Wedtriloside A.....	54
3.1.1.2. Hợp chất WT2 : Wedtriloside B	63
3.1.1.4. Hợp chất WT4 : Apigenin.....	68
3.1.1.5. Hợp chất WT5 : Apigenin7- <i>O</i> - β -D-glucopyranoside	70
3.1.1.6. Hợp chất WT6 : 3- <i>O</i> -[β -D-glucopyranosyl(1-4)- β -D-glucoronopyranosyl] oleanolic acid 28- <i>O</i> - β -D-glucopyranosyl ester.....	71
3.1.1.7. Hợp chất WT7 : 4',4,6-trihydroxyaurone	74
3.1.1.8. Hợp chất WT8 : Caffeic acid.....	75
3.1.2. Xác định cấu trúc các hợp chất phân lập từ Sài đất (<i>W. chinensis</i>)	77

3.1.2.1. Hợp chất WC1 : Wednenic (Hợp chất mới)	77
3.1.2.2. Hợp chất WC2 : Cleroindicin E.....	84
3.1.2.3. Hợp chất WC3 : Wednenol (Hợp chất mới)	85
3.1.2.4. Hợp chất WC4 : Cornoside.....	87
3.1.2.5. Hợp chất WC5 : Rengyol.....	88
3.1.2.6. Hợp chất WC6 : Kaempferol-3- <i>O</i> - β -D-glucoside	89
3.1.2.7. Hợp chất WC7 : Quercetin-3- <i>O</i> - β -D-glucopyranoside	92
3.1.2.8. Hợp chất WC8 : Luteolin.....	94
3.1.2.9. Hợp chất WC9 : Jaceosidin.....	95
3.1.2.11. Hợp chất WC11 : 19-hydroxy-3-oxo-12-ursen-28-oic acid (pomonic acid).....	99
3.1.2.12. Hợp chất WC12 : ilexgenin B (Pubescenolic acid)	102
3.1.3. Tổng hợp các hợp chất đã phân lập từ Sài đất ba thùy và Sài đất	104
3.2. Đánh giá hoạt tính sinh học các hợp chất phân lập được từ <i>W. trilobata</i> và <i>W. chinensis</i>	107
3.2.1. Hoạt tính ức chế sản sinh NO của các hợp chất.....	107
3.2.2. Hoạt tính ức chế α -amylase, α -glucosidase	109
3.2.3. Hoạt tính gây độc tế bào	111
KẾT LUẬN	114
KIẾN NGHỊ	116
NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN	117
DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ	118
TÀI LIỆU THAM KHẢO	119

DANH MỤC VIẾT TẮT

Kí hiệu	Tiếng Anh	Diễn giải
^{13}C NMR	Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân carbon 13
^1H NMR	Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân proton
5-HIAA	5-hydroxyindole acid	5-hydroxyindole acid
5-HT	5-hydroxy tryptamine	5-hydroxy tryptamine
A-549	Human lung cancer cell	Dòng tế bào ung thư biểu mô phổi người
C.C	Chromatography column	Sắc ký cột
COSY	Correlation spectroscopy	Phổ COSY
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarisation Transfer	Phổ DEPT
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	Môi trường nuôi cấy tế bào DMEM
DMSO	Dimethylsulfoxide	$(\text{CH}_3)_2\text{SO}$
DPPH	1,1-diphenyl-1-picrylhydrazyl	1,1-diphenyl-1-picrylhydrazyl
FRAP	Ferric ion reducing antioxidant power	Chống oxi hóa bằng phương pháp khử sắt
Glc	Glucopyranosyl	Đường glucose
HeLa	Cervical cancer	Ung thư cổ tử cung
HepG-2	Human liver cell line	Dòng tế bào ung thư gan người
HMBC	Heteronuclear multiple bond correlation	Phổ tương tác dị hạt nhân qua nhiều liên kết
HPLC	High performance liquid chromatography	Sắc ký lỏng hiệu năng cao
HR-ESI-MS	High resolution electrospray Ionization mass spectrometry	Phổ khối lượng phân giải cao phun mù điện
HSQC	Heteronuclear Single-Quantum Coherence Spectroscopy	Phổ tương tác dị hạt nhân qua 1 liên kết

IC ₅₀	Inhibitory concentration at 50%	Nồng độ ức chế 50% đối tượng thử nghiệm
IR	Infrared Spectroscopy	Phổ hồng ngoại
LPS	Lipopolysaccharide	Lipopolysaccharide
MAO	Monoamine oxidase	Enzyme monoamine oxidase
MCF-7	Human breast cancer cell	Ung thư vú ở người
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NE	Norepinephrine	Norepinephrine
NO	Nitric oxide	nitric oxide
NOESY	Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy	Phổ NOESY
NOS2	Nitric Oxide Synthase 2	Nitric Oxide Synthase 2
PC3	Human prostate carcinoma cell	Ung thư tuyến tiền liệt
PGE2	Prostaglandin E2	Prostaglandin E2
TLC	Thin layer chromatography	Sắc ký lớp mỏng
TMS	Tetramethylsilane	(CH ₃) ₄ Si

DANH MỤC BẢNG

<i>Bảng 1.2.1.</i> Thành phần sesquiterpene từ <i>Wedelia</i>	10
<i>Bảng 1.2.2.</i> Thành phần diterpene từ <i>Wedelia</i>	15
<i>Bảng 1.2.3.</i> Thành phần triterpene và triterpene saponin từ <i>Wedelia</i>	20
<i>Bảng 1.2.4.</i> Thành phần flavonoid từ <i>Wedelia</i>	22
<i>Bảng 1.2.5.</i> Thành phần khác từ <i>Wedelia</i>	24
<i>Bảng 3.1.</i> Số liệu phổ NMR của WT1 và hợp chất tham khảo	61
<i>Bảng 3.2.</i> Số liệu phổ NMR của hợp chất WT2 và chất tham khảo.....	65
<i>Bảng 3.3.</i> Số liệu phổ NMR của WT3 và hợp chất tham khảo	67
<i>Bảng 3.4.</i> Số liệu phổ NMR của hợp chất WT4 và chất tham khảo.....	69
<i>Bảng 3.5.</i> Số liệu phổ NMR của hợp chất WT5 và chất tham khảo.....	70
<i>Bảng 3.7.</i> Số liệu phổ NMR hợp chất WT7 và hợp chất tham khảo	75
<i>Bảng 3.8.</i> Số liệu phổ NMR hợp chất WT8 và chất tham khảo	76
<i>Bảng 3.9.</i> Số liệu phổ NMR của WC1 và các hợp chất tham khảo.....	80
<i>Bảng 3.10.</i> Số liệu phổ NMR của WC2 và chất tham khảo	85
<i>Bảng 3.11.</i> Số liệu phổ NMR của WC3 và hợp chất tham khảo	86
<i>Bảng 3.12.</i> Số liệu phổ NMR của hợp chất WC4 và chất tham khảo	88
<i>Bảng 3.13.</i> Dữ liệu phổ NMR hợp chất WC5 và chất tham khảo	89
<i>Bảng 3.14.</i> Số liệu phổ NMR của hợp chất WC6 và chất tham khảo	91
<i>Bảng 3.15.</i> Số liệu phổ NMR của hợp chất WC7 và chất tham khảo	93
<i>Bảng 3.16.</i> Số liệu phổ NMR của hợp chất WC8 và chất tham khảo	95
<i>Bảng 3.17.</i> Số liệu phổ NMR của hợp chất WC9 và chất tham khảo	96
<i>Bảng 3.18.</i> Số liệu phổ NMR của hợp chất WC10 và hợp chất tham khảo ..	99
<i>Bảng 3.19.</i> Số liệu phổ NMR của hợp chất WC11 và chất tham khảo	101
<i>Bảng 3.20.</i> Số liệu phổ NMR của hợp chất WC12 và chất tham khảo	103
<i>Bảng 3.21.</i> Kết quả đánh giá hoạt tính ức chế sự sản sinh NO trong tế bào RAW264.7 của các hợp chất phân lập từ <i>W. chinensis</i> và <i>W. trilobata</i>	107
<i>Bảng 3.22.</i> Kết quả hoạt tính ức chế enzyme α -amylase và α -glucosidase của	110
các hợp chất phân lập từ <i>W. trilobata</i> và <i>W. chinensis</i>	110
<i>Bảng 3.23.</i> Kết quả thử hoạt tính gây độc tế bào của các hợp chất phân lập từ <i>W. chinensis</i> và <i>W. trilobata</i>	112

DANH MỤC HÌNH

<i>Hình 1.1.</i> Một số loài thuộc chi <i>Wedelia</i>	4
<i>Hình 1.2.</i> Một số bộ phận loài <i>Wedelia trilobata</i> (L.) Hitchc.[9].	6
<i>Hình 1.3.</i> Hình thái loài <i>Wedelia chinensis</i> (Osbeck) Merr.[9].	7
<i>Hình 1.4.</i> Cấu trúc hóa học các hợp chất sesquiterpene từ <i>Wedelia</i>	9
<i>Hình 1.5.</i> Cấu trúc hóa học của các hợp chất diterpene từ <i>Wedelia</i>	14
<i>Hình 1.6.</i> Cấu trúc hóa học các hợp chất triterpene và triterpene saponin từ <i>Wedelia</i>	20
<i>Hình 1.7.</i> Cấu trúc các hợp chất flavonoid từ <i>Wedelia</i>	22
<i>Hình 2.1.</i> Cây Sài đất ba thùy (<i>W. trilobata</i>)	33
<i>Hình 2.2.</i> Cây Sài đất (<i>W. chinensis</i>)	33
<i>Hình 2.3.</i> Sơ đồ phân lập các hợp chất từ loài Sài đất ba thùy (<i>W. trilobata</i>)	44
<i>Hình 2.4.</i> Sơ đồ phân lập các hợp chất từ loài Sài đất (<i>W. chinensis</i>)	47
<i>Hình 3.1.</i> Cấu trúc hóa học của hợp chất WT1 và các hợp chất tham khảo..	54
<i>Hình 3.2.</i> Phổ HR-ESI-MS của hợp chất WT1	55
<i>Hình 3.3.</i> Phổ IR của hợp chất WT1	55
<i>Hình 3.4.</i> Phổ ¹ H-NMR của hợp chất WT1	56
<i>Hình 3.5.</i> Phổ ¹³ C NMR của hợp chất WT1	57
<i>Hình 3.6.</i> Phổ HSQC của hợp chất WT1	58
<i>Hình 3.7.</i> Phổ HMBC của hợp chất WT1	58
<i>Hình 3.8.</i> Phổ COSY của hợp chất WT1	59
<i>Hình 3.9.</i> Các tương tác chính trên phổ HMBC (H→C), COSY (H—H) của WT1	59
<i>Hình 3.10.</i> Phổ NOESY của hợp chất WT1	60
<i>Hình 3.11.</i> Các tương tác NOESY (H←→H) chính của WT1	60
<i>Hình 3.12.</i> Cấu trúc hợp chất WT2	63
<i>Hình 3.13.</i> Các tương tác chính.....	64
HMBC (H→C), COSY (H—H) và NOESY (H←→H) của hợp chất WT2	64
<i>Hình 3.14.</i> Cấu trúc hóa học hợp chất WT3	66
<i>Hình 3.15.</i> Các tương tác chính HMBC (H→C), COSY (H—H)	68
của hợp chất WT3	68

<i>Hình 3.16.</i> Cấu trúc Hợp chất WT4	68
<i>Hình 3.17.</i> Cấu trúc hợp chất WT5	70
<i>Hình 3.18.</i> Cấu trúc hóa học của hợp chất WT6	71
<i>Hình 3.19.</i> Các tương tác chính trên phổ HMBC (H→C), COSY (H—H) của hợp chất WT6	72
<i>Hình 3.20.</i> Cấu trúc hóa học của hợp chất WT7	74
<i>Hình 3.21</i> Cấu trúc hợp chất WT8	75
<i>Hình 3.22.</i> Cấu trúc hóa học của hợp chất WC1 và các hợp chất so sánh	77
<i>Hình 3.23.</i> Phổ HR-ESI-MS của WC1	78
<i>Hình 3.24.</i> Phổ ¹ H-NMR của WC1	78
<i>Hình 3.25.</i> Phổ ¹³ C NMR của hợp chất WC1	79
<i>Hình 3.26.</i> Các tương tác chính trên phổ HMBC (H→C), COSY (H— H) của hợp chất WC1	80
<i>Hình 3.27.</i> Phổ HSQC của hợp chất WC1	81
<i>Hình 3.28.</i> Phổ HMBC của hợp chất WC1	81
<i>Hình 3.29.</i> Phổ COSY của hợp chất WC1	82
<i>Hình 3.30.</i> Phổ NOESY của hợp chất WC1	82
<i>Hình 3.31.</i> Tương tác chính trên phổ NOESY (←--→) của WC1	83
<i>Hình 3.32.</i> Giá trị $\Delta\delta_H^{(S-R)}$ của các este MTPA của hợp chất WC1	83
<i>Hình 3.33.</i> Cấu trúc hợp chất WC2	84
<i>Hình 3.34.</i> Cấu trúc hóa học của WC3	85
<i>Hình 3.35.</i> Các tương tác chính trên phổ HMBC (H→C), COSY (H — H), NOESY (←--→) của WC3	86
<i>Hình 3.36.</i> Cấu trúc hợp chất WC4	87
<i>Hình 3.37.</i> Cấu trúc hợp chất WC5	88
<i>Hình 3.38.</i> Cấu trúc hợp chất WC6	89
<i>Hình 3.39.</i> Cấu trúc hợp chất WC7	92
<i>Hình 3.40.</i> Cấu trúc hợp chất WC8	94
<i>Hình 3.41.</i> Cấu trúc hóa học hợp chất WC9	95
<i>Hình 3.42.</i> Cấu trúc hóa học của hợp chất WC10	97
<i>Hình 3.43.</i> Các tương tác chính trên phổ HMBC (H→C) của WC10	98
<i>Hình 3.44.</i> Cấu trúc hóa học của hợp chất WC11	99

<i>Hình 3.45.</i> Các tương tác chính trên phổ HMBC (H→C), COSY (H–H) của WC11	100
<i>Hình 3.46.</i> Cấu trúc hóa học và các tương tác chính trên phổ HMBC (H→C), COSY (H–H) của WC12	102
<i>Hình 3.47.</i> Các hợp chất WT1-WT8 phân lập từ <i>W. trilobata</i>	105
<i>Hình 3.48.</i> Các hợp chất WC1-WC9 phân lập từ <i>W. chinensis</i>	106

MỞ ĐẦU

Việc sử dụng cây cỏ làm thuốc luôn gắn liền với lịch sử tồn tại và phát triển của xã hội loài người, với nhiều ưu điểm như cấu trúc hóa học và hoạt tính sinh học đa dạng, dễ được hấp thụ và chuyển hóa trong cơ thể cũng như độc tính thấp. Đây là một lợi thế để chúng ta khai thác nguồn dược liệu phục vụ cho cuộc sống. Các nghiên cứu hoá học theo định hướng hoạt tính sinh học được cho là con đường ngắn nhất và hiệu quả nhất để tìm kiếm có chọn lọc các hoạt chất từ nguồn tài nguyên thiên nhiên. Việt Nam là một quốc gia được thiên nhiên ưu đãi và sở hữu hệ thực vật vô cùng phong phú với trên 12.000 loài thực vật bậc cao có mạch, trong đó ước tính có tới 5.000 loài được sử dụng trong y học cổ truyền. Các hợp chất có nguồn gốc thiên nhiên đã và đang nhận được rất nhiều sự quan tâm của các nhà khoa học trong và ngoài nước trong nghiên cứu và phát triển thành các dược phẩm chữa bệnh cho người.

Chi *Wedelia* đã và đang được các nhà khoa học trên thế giới quan tâm nghiên cứu, một số cây trong chi này được sử dụng như thảo dược truyền thống khắp thế giới, thể hiện nhiều hoạt tính quý báu như gây độc tế bào, bảo vệ gan, hạ sốt, giảm đau, diệt khuẩn, kháng sinh, chống oxy hóa, hạ đường huyết, và hen suyễn. Mở rộng nghiên cứu về thành phần hóa học của chi *Wedelia* đã xác định bao gồm Sesquiterpene, diterpene, triterpene, saponin triterpene, flavonoid, v/v. Trong nghiên cứu sàng lọc của chúng tôi cho thấy cao chiết methanol của cây Sài đất (*W. chinensis*) có hoạt tính diệt tế bào ung thư (trong đó có dòng tế bào ung thư phổi A-549, H1975), tác dụng ức chế sản sinh NO liên quan bệnh viêm. Kết quả sơ bộ này cho thấy cây Sài đất nói riêng và các loài khác thuộc chi *Wedelia* nói chung có thể chứa các thành phần hoạt chất sinh học quan trọng, tiềm tàng cho nghiên cứu phát triển thuốc. Đây là những tiền đề góp phần phát hiện các hoạt chất có hoạt tính sinh học tốt như: chống ung thư, kháng viêm và nghiên cứu cơ chế hoạt động của chúng. Việc nghiên cứu thành phần hoá học kết hợp với thử nghiệm hoạt tính sinh học dẫn đường sẽ cho phép thu được các hợp chất có hoạt tính sinh học với độ chọn lọc cao. Đây là phương pháp được các nhóm nghiên cứu tiên tiến trên thế giới áp dụng thành công.

Xuất phát từ những luận điểm trên, NCS đã lựa chọn đề tài “**Nghiên cứu thành phần hóa học và một số hoạt tính sinh học từ hai loài *Wedelia chinensis* và *Wedelia trilobata*, họ Cúc (Asteraceae)**”.

Mục tiêu của luận án:

- Nghiên cứu xác định thành phần hóa học từ hai loài *W. chinensis* và *W. trilobata* thuộc chi *Wedelia*.

- Đánh giá hoạt tính kháng viêm, hoạt tính ức chế α -amylase, α -glucosidase và hoạt tính gây độc tế bào ung thư của các hợp chất để làm cơ sở cho các nghiên cứu ứng dụng tiếp theo.

Nội dung của luận án bao gồm:

- Phân lập các hợp chất từ hai loài *W. chinensis* và *W. trilobata* bằng các phương pháp sắc ký.

- Xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất phân lập được bằng các phương pháp vật lý, hóa học.

- Đánh giá hoạt tính kháng viêm *in vitro*, hoạt tính ức chế α -amylase, α -glucosidase và hoạt tính gây độc tế bào ung thư *in vitro* của các hợp chất phân lập được.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN

1.1. Giới thiệu chung về chi *Wedelia*

Wedelia là chi thân cỏ sống lâu năm. Thân mọc thẳng đứng hoặc bò lan trên mặt đất, phân cành nhánh, phần lá mọc đối, hiếm khi so le, viền nguyên hoặc răng cưa. Cụm hoa của loài này thường ở tận cùng hoặc nách lá, có đường kính lớn hơn 1cm, đơn độc hay 2-4 cụm hợp lại, mỗi cụm hoa có cuống riêng. Cụm hoa đầu, dạng tỏa tròn, ở viền 1 hàng hoa cái; ở giữa là hoa lưỡng tính, hiếm gặp hoa đực riêng. Lá bắc: ở tổng bao 2-3 hàng, xếp lợp thành hình bán cầu hoặc hình chuông. Đế hoa: lồi, có vảy. Tràng hoa: ở viền dạng lưỡi nhỏ, ống tràng rất ngắn, phiến lưỡi phía đầu có 2-3 răng, màu vàng tươi; hoa ở giữa có tràng hình ống, đầu loe dạng chuông có 5 thùy màu vàng sẫm. Bao phấn: thường màu nâu, đỉnh nhọn, góc tù. Quả: đóng hình trứng, ít nhiều bị ép, quả đóng của hoa ở viền có 3 góc; còn của hoa ở giữa có 4 góc; đỉnh quả có vảy hoặc 1-2 lông cứng, không mào lông. Mở rộng các nghiên cứu về chi *Wedelia* cho thấy thành phần hóa học chính của chi này bao gồm các iridoid, flavonoid, dẫn xuất diterpenoid với nhiều hoạt tính thú vị như chống oxy hóa, kháng histamine, chống cấy ghép, hoạt động chống bệnh tim, chống ung thư,...[1].



Nguồn: internet

Hình 1.1. Một số loài thuộc chi *Wedelia*

Theo thống kê sơ bộ có khoảng 107 loài thuộc chi *Wedelia* trên thế giới đã được chấp nhận tên khoa học, trong đó ở Việt Nam có một số loài như Sài đất (*W. chinensis* (Osbeck) Merr), Cúc nháp (*W. urticaefolia* (Blume) DC. ex Wight), Chổi biển (*W. prostrate* Hemsl.), Sài đất ba thùy (*W. trilobata* (L.) Hitchc.), Sơn cúc hai hoa (*W. biflora* (L.) DC. Syn) [2].

1.1.1. Tổng quan về loài Sài đất ba thùy *Wedelia trilobata* (L.) Hitchc.

Sài đất ba thùy hay còn được gọi là Sài đất kiếng, Sài đất ba thùy và có tên khoa học: *Wedelia trilobata* (L.) Hitchc., tên đồng nghĩa là *Sphagneticola trilobata* (L.) Pruski.

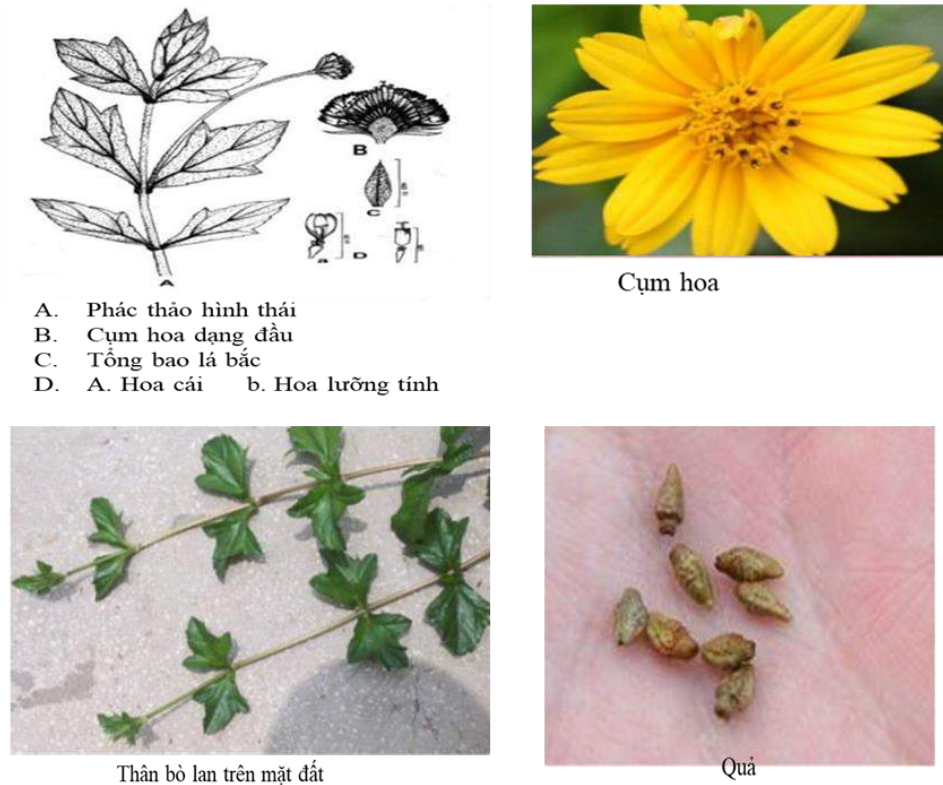
Mô tả thực vật: Sài đất ba thùy là cây thảo sống lâu năm, dài khoảng 10 - 30 cm, có thể mọc thẳng đứng cao đến 45 - 60 cm, bò lan đến 1,8 m. Cây thường mọc thành từng mảng, dày đặc che kín mặt đất. Thân bò, màu hơi đỏ hoặc xanh, tròn, rễ mọc tại các đốt, dài 10 - 30 cm. Phần mọc hướng lên có lông thô, cứng, rậm rạp, đôi khi nhẵn, không lông [3-5]. Lá: đơn, mọc đối, dày, dài khoảng 4 - 9 cm, rộng 2 - 5 cm, có răng cưa ở 2 bên thùy lá, có lông cứng và thô ở cả hai mặt lá. Hình thuôn bầu dục, nhọn đầu. Hệ gân lá cong hình cung và lông chim. Cụm hoa: hình đầu, mọc từ nách lá, mang hoa không đều ở vòng ngoài đơn, mọc ở nách lá, màu vàng tươi, nhiều cánh thành tầng, cuống hoa dài 3 - 10 cm, tổng bao có dạng chuông hoặc bán cầu, đầu hoa thường có khoảng 8 - 13 hoa tia, cánh dài 6 - 15mm, đĩa tràng hoa dài 4 - 5 mm. Ra hoa quanh năm. Quả: Quả bé có nốt sần [6].

Bộ phận dùng: Thường là hoa và lá. Ở Việt Nam chủ yếu được trồng và canh tác như một cây phủ đất và cây cảnh trong các thành phố, công viên và nhà ở.

Wedelia trilobata (L.) Hitchc. có nguồn gốc Nam Mỹ, Trung Mỹ, Mexico và được tìm thấy rộng rãi ở Bangladesh, Ấn Độ, Trung Quốc, Malaysia, Indonesia, Việt Nam, Campuchia, Miến Điện, phát triển mạnh mẽ trong các thung lũng, các vùng trồng trọt, rừng tự nhiên, rừng trồng, đồng cỏ, vùng ven biển và các khu vực thành thị. Lá hoặc các bộ phận trên không của cây này được sử dụng trong y học cổ truyền ở Caribe và Trung Mỹ để chữa đau lưng, thấp khớp, đau khớp, và để điều trị sốt và sốt rét ở Việt Nam.

Các nghiên cứu trước đây cho thấy thành phần chính của *W. trilobata* bao gồm: *ent*-kaurane diterpene, eudesmane sesquiterpene lactone, và triterpene với nhiều hoạt

tính như kháng khuẩn, chống khối u, bảo vệ gan, và hoạt động ức chế hệ thần kinh trung ương [7, 8].



Hình 1.2. Một số bộ phận loài *Wedelia trilobata* (L.) Hitchc.[9].

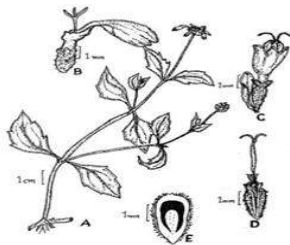
1.1.2. Tổng quan về loài Sài đất *Wedelia chinensis* (Osbeck) Merr.

Sài đất hay còn gọi là húng trám, cúc nháp, ngổ đất có tên khoa học là *Wedelia chinensis* (Osbeck) Merr, tên đồng nghĩa là *Shagmeticola calendulacea* (L.) Pruski thuộc họ Cúc – Asteraceae.

Mô tả thực vật: Sài đất là loài sống lâu năm, có hoa màu vàng tươi và mùi thơm nhẹ giống long não, được dùng để hạ sốt và giảm ho, long đờm. Sài đất là một loài cỏ sống dai, mọc bò trên mặt đất, chỗ thân mọc lan đến đâu có rễ mọc tới đấy dài khoảng 10 – 30 cm, có thể mọc thẳng đứng cao đến 45 - 60 cm, bò lan đến 1,8 m. Cây thường mọc thành từng mảng, dày đặc che kín mặt đất. Lá gần như không có cuống, mọc đối, hình bầu dục thuôn, góc và đầu nhọn. Hai mặt lá có lông thô, cứng, mép lá có răng cưa to và nông. Cụm hoa: Đế cụm hoa hơi lồi. Hoa: Đế cụm hoa hơi lồi mang hai loại hoa, màu vàng tươi, được bao bọc bởi vòng tổng bao lá bắc gồm 2 hàng xếp xen kẽ. Mỗi hoa có 1 lá bắc nhỏ đi kèm. Bầu dưới 5 lá đài. Hoa cái: tràng

hoa hình lưỡi nhỏ gồm 2 phần: Phần ống dài 1 - 1,5 mm và phần lưỡi nhỏ dài 8 - 9 mm, rộng 4 mm, đỉnh tù, có 2 - 3 răng, khía sâu 1 mm. Có từ 12 - 18 hoa cái trên đầu. Hoa lưỡng tính: tràng hoa hình ống loa dần lên phía trên, dài 5 mm, phần rộng nhất 1,2 mm. Phần trên cùng chia 5 thùy có đỉnh tù hoặc gần tròn. Phần dưới ống tràng nối với bầu thu nhỏ lại dài khoảng 1 mm. Quả: Quả bế, có răng dạng mào lông ở đỉnh [3-5, 10].

Bộ phận dùng của Sài đất: Phần trên mặt đất của cây được dùng để làm thuốc, thu hái quanh năm nhưng chủ yếu là vào mùa hè lúc cây đang ra hoa. Sau khi thu hái, đem về rửa sạch và có thể dùng tươi hay phơi, sấy khô. Cây thuốc được người dân bộ tộc sử dụng làm thuốc trong dân gian thuốc trị đái tháo đường, phong thấp, đầy bụng rối loạn và viêm. Một số thậm chí còn được sử dụng cho điều trị ngộ độc côn trùng. Một số nơi dùng thường sử dụng sài đất tắm trị rôm sảy, thuốc uống phòng chạy sỏi, chữa bang, sốt rét. Những năm 1961, một số bệnh viện sử dụng sài đất điều trị hiệu quả mọi trường hợp viêm tấy ngoài da, sưng khớp nhiễm trùng, mụn nhọt,... Sau đó vào năm 1966 sài đất được sử dụng tại bệnh viện trong điều trị viêm bang quang cho tác dụng hiệu quả [4]



Hình thái loài *Wedelia chinensis*

- A. Cảnh con B. Hoa con tủa tia
C. Hoa con mọc trên đĩa D. Nhụy Hoa
E. Bầu nhụy



Thân



Cụm hoa



Hoa lưỡng tính

Hoa đơn tính

Quả

Hình 1.3. Hình thái loài *Wedelia chinensis* (Osbeck) Merr.[9].

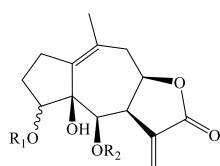
W. chinensis là một loại thảo dược truyền thống được sử dụng trong hệ thống thuốc của Ấn Độ. Theo truyền thống, quả, lá và thân được dùng trong việc sinh đẻ và điều trị vết cắn và đốt, sốt và nhiễm trùng. Lá được sử dụng trong điều trị rối loạn chức năng thận, cảm lạnh, vết thương và vô kinh. Lá cũng được sử dụng để nhuộm tóc và thúc đẩy sự phát triển của tóc, bên cạnh đó còn được dùng trong điều trị bệnh phù chân voi, đau răng, nhức đầu và ung thư. Ngoài ra, lá còn được sử dụng trong trị ho và bệnh cephalagia. Nước sắc của cây được dùng chữa rong kinh và các bệnh ngoài da. Cây cũng được sử dụng trong các chứng viêm, bệnh giun sán và rối loạn gan. Cây đã được dùng làm kháng viêm, tiêu thũng, chữa vết thương, yếu tinh và viêm gan virus. Loại cây này được khoa học báo cáo là có đặc tính chống oxy hóa, cho thấy tính hữu ích của nó trong việc giảm lo lắng và căng thẳng trong các tình trạng cảm xúc [11, 12].

Sài đất chứa rất nhiều thành phần hóa học tốt cho cơ thể. Dịch ép của cây chứa tinh dầu hòa tan 11,2%; hợp chất béo 29,7%; phytosterol 3,75%; chlorophyll 3,75%; caroten 1,14%; ngoài ra còn có đường, tanin, saponin, flavonoid, terpenoid, các hợp chất triterpenoid và phenolic. Các phân tích ở Ấn Độ về thảo mộc *W. chinensis* không thấy sự xuất hiện của các alkaloid, tuy nhiên các cuộc điều tra về thành phần hóa học của Trung Quốc về loài này cho thấy sự hiện diện của alkaloid trong thân, lá và hoa [13]. Các nghiên cứu mở rộng về hoạt tính sinh học thực hiện trên *W. chinensis* được cho là có tác dụng chống oxy hóa, chống viêm, giảm đau, kháng khuẩn, bảo vệ gan, chống trầm cảm, chống co giật, chữa lành vết thương, an thần và chống ung thư [10].

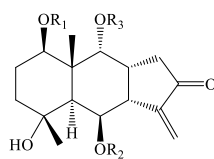
1.2. Tình hình nghiên cứu về chi *Wedelia*

1.2.1. Các nghiên cứu về thành phần hóa học

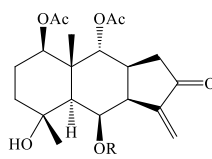
1.2.1.1. Thành phần sesquiterpene



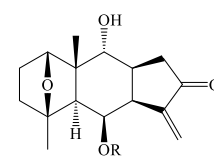
- 1 R₁ = H, R₂ = Mac
 2 R₁ = Ac, R₂ = Mac
 3 R₁ = Ac, R₂ = i-Bu
 4 R₁ = Ac, R₂ = Tig
 5 R₁ = Ac, R₂ = i-Val



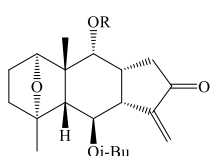
- 6 R₁ = H, R₂ = i-Bu, R₃ = Tig
 7 R₁ = H, R₂ = i-Bu, R₃ = Ang
 8 R₁ = Ac, R₂ = i-Bu, R₃ = Ac
 9 R₁ = Ac, R₂ = i-Bu, R₃ = H
 10 R₁ = Ac, R₂ = Mac, R₃ = H
 11 R₁ = Ac, R₂ = Mac, R₃ = Ac



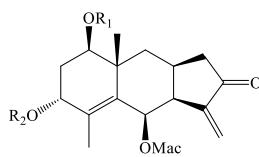
- 12 R = i-Bu
 13 R = Ang
 14 R = Mac



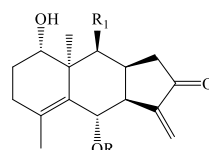
- 15 R = i-Bu
 16 R = Ang
 17 R = Mac



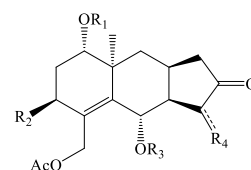
- 18 R = H
 19 R = Ac



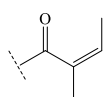
- 20 R₁ = H, R₂ = Ac
 21 R₁ = H, R₂ = COEt
 22 R₁ = H, R₂ = i-Bu
 23 R₁ = H, R₂ = Hang
 24 R₁ = H, R₂ = i-Val
 25 R₁ = H, R₂ = Tig
 26 R₁ = H, R₂ = Sen
 27 R₁ = Ac, R₂ = Tig



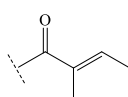
- 28 R = Tig, R₁ = H
 29 R = Ang, R₁ = H
 30 R = Mac, R₁ = H
 31 R = H, R₁ = OH



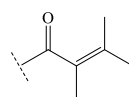
- 32 R₁ = R₂ = H, R₃ = Tig, R₄ = αOH
 33 R₁ = R₂ = H, R₃ = Ang, R₄ = αOH
 34 R₁ = H, R₂ = OAc, R₃ = Tig, R₄ = αOH
 35 R₁ = Ac, R₂ = OH, R₃ = Tig, R₄ = αOH
 36 R₁ = H, R₂ = OAc, R₃ = Tig, R₄ = O
 37 R₁ = R₂ = H, R₃ = Tig, R₄ = O



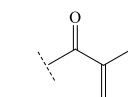
Ang: angeloyl



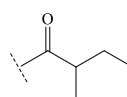
Tig: tigloyl



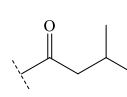
Sen: senecioyl



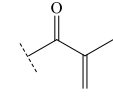
Mac: methacryloyl



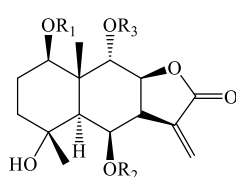
Hang: hydrangeloyl



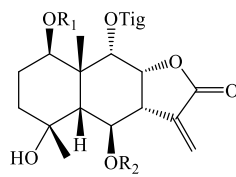
i-Val: isovaleryloxy



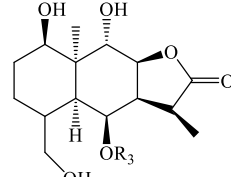
i-Bu: isobutyryloxy



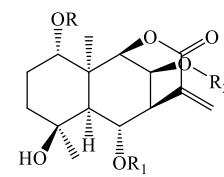
- 38 R₁ = Ac, R₂ = i-Bu, R₃ = i-Val
 39 R₁ = Ac, R₂ = i-Bu, R₃ = Tig
 40 R₁ = R₃ = Ac, R₂ = i-Bu
 41 R₁ = R₃ = Ac, R₂ = Ang



- 42 R₁ = Ac, R₂ = i-Bu, R₃ = Tig
 43 R₁ = R₃ = OH, R₂ = i-Bu
 44 R₁ = R₃ = Ac, R₂ = Mac



45



- 46 R = OH, R₁ = R₂ = i-Bu
 47 R = OH, R₁ = i-Bu, R₂ = Mac
 48 R = Ac, R₂ = Meacr, R₁ = i-Bu
 49 R = Ac, R₂ = R₁ = Mac
 50 R = Ac, R₂ = R₁ = i-Bu

Hình 1.4. Cấu trúc hóa học các hợp chất sesquiterpene từ *Wedelia*.

Năm 1980, 5 hợp chất mới pseudoguaianolie: Wedelifloride 6-*O*-methacrylate (1), 6-*O*-(methacryloyloxy) wedelifloride 4-*O*-acetate (2), 6-*O*-(isobutyryloxy) wedelifloride 4-*O*-acetate (3), 6-*O*-(tiglinoyloxy) wedelifloride 4-*O*-acetate (4), và 6-*O*-(isovaleryloxy) wedelifloride 4-*O*-acetate (5) được Bohlamann và cộng sự công bố

từ phần trên mặt đất của cây *W. grandiflora* Benth. [14]. Giai đoạn 1982-2005, 31 hợp chất mới eudesmanolide (**6–37**) tiếp tục được công bố từ các bộ phận khác nhau của các loài *W. prostrata*, *W. trilobata*, *W. hookeriana* Gardner, *W. grandiflora*, *W. pinetorum* (Standl. & Steyerl.), và *W. hispida* Kunth. Đáng chú ý, từ loài *W. prostrata* rất nhiều hợp chất sesquiterpene đã được phân lập với cấu trúc thú vị [15-21] (Hình 1.4). Năm 2013 Li và cộng sự đã phân lập được 10 hợp chất eudesmanolide từ loài *W. trilobata* trong đó có 5 hợp chất mới wedelolide C-F và wedetrilide A [22]. Tiếp tục mở rộng nghiên cứu về thành phần hóa học các loài thuộc chi *Wedelia*, 7 hợp chất eudesmanolidee mới (**40, 41, 46-50**) lần lượt được công bố từ *Wedelia prostrata* và *W. trilobata* [10, 13, 23-25]. Năm 2020, L. Sun và cộng sự tiếp tục phân lập từ hoa của loài *W. trilobata* 8 hợp chất eudesmanolide mới: $1\alpha,6\alpha,9\beta$ -trihydroxy-4,10 α -dimethy-15 $\alpha,7\alpha,8\alpha$ -eudesm-3-en-8,12-olide (**31**), 1α -acetoxy-4 α -hydroxy-6 α -isobutyryloxy-15 α -methyl-9 β -isovaleryloxyprostat (**38**), 1β -acetoxy-4 α -hydroxy-6 β -isobutyryloxy-15 α -methyl-9 β -tiglinoyloxyprostatolide (**39**), 1β -acetoxy-4 α -hydroxy-6 β -isobutyryloxy-9 α -tiglinoyloxyprostatolide (**42**), $1\alpha,9\beta$ -diacetoxy-4 β -hydroxy-6 α -methacryloxy-11 β -methylprostatolide (**45**), $1\alpha,4\alpha,9\beta$ -trihydroxy-6 β -isobutyryloxyprostatolide (**43**), $1\alpha,9\beta$ -diacetoxy-4 β -hydroxy-6 α -methacryloxy-11 β -methylprostatolide (**44**) [26].

Bảng 1.2.1. Thành phần sesquiterpene từ *Wedelia*

STT	Tên hợp chất	Loài	TLTK
1	Wedelifloride 6- <i>O</i> -methacrylate	<i>W. grandiflora</i>	[14]
2	6- <i>O</i> -(Methacryloyloxy)wedelifloride 4- <i>O</i> -acetate	<i>W. grandiflora</i>	[14]
3	6- <i>O</i> -(Isobutyryloxy)wedelifloride 4- <i>O</i> -acetate	<i>W. grandiflora</i>	[14]
4	6- <i>O</i> -(Tiglinoyloxy)wedelifloride 4- <i>O</i> -acetate	<i>W. grandiflora</i>	[14]
5	6- <i>O</i> -(Isovaleryloxy)wedelifloride 4- <i>O</i> -acetate	<i>W. grandiflora</i>	[14]
6	$1\beta,4\alpha$ -Dihydroxy-6 β -(isobutyryloxy)-9 α -(tigloyloxy)prostatolide	<i>W. prostrata</i> <i>W. trilobata</i>	[15-21]
7	9 α -(Angeloyloxy)-1 $\beta,4\alpha$ -dihydroxy-6 β -(isobutyryloxy)prostatolide	<i>W. prostrata</i>	[15-21]
8	$1\beta,9\alpha$ -Diacetoxy-4 α -hydroxy-6 β -(isobutyryloxy)prostatolide	<i>W. prostrata</i>	[15-21]

9	1 β -Acetoxy-4 α ,9 α -dihydroxy-6 β - (isobutyryloxy)prostatolide	<i>W. prostrata</i>	[15-21]
10	1 β -Acetoxy-4 α ,9 α -dihydroxy-6 β - (methacryloxy)prostatolide	<i>W. prostrata</i>	[15-21]
11	1 β ,9 α -Diacetoxy-4 α -dihydroxy-6 β - (methacryloxy)prostatolide	<i>W. prostrata</i>	[15-21]
12	Trilobolide 6- <i>O</i> -isobutyrate	<i>W. trilobata</i>	[15-21]
13	Trilobolide 6- <i>O</i> -angelate	<i>W. trilobata</i>	[15-21]
14	Trilobolide 6- <i>O</i> -methacrylate	<i>W. trilobata</i>	[15-21]
15	Oxidoisotrilobolide 6- <i>O</i> -isobutyrate	<i>W. trilobata</i>	[15-21]
16	Oxidoisotrilobolide 6- <i>O</i> -angelate	<i>W. trilobata</i>	[15-21]
17	Oxidoisotrilobolide 6- <i>O</i> -methacrylate	<i>W. trilobata</i>	[15-21]
18	9 α -Hydroxy-1 α ,4 α -epoxy-5 β H,7 β H,8 β H- prostatolide 6- <i>O</i> -isobutyrate	<i>W. prostrata</i>	[15-21]
19	9 α -Acetoxy-1 α ,4 α -epoxy-5 β H,7 β H,8 β H- prostatolide 6- <i>O</i> -isobutyrate	<i>W. prostrata</i>	[15-21]
20	3 α -Acetoxy-6 β -(methacryloyloxy)ivangustin	<i>W. hookeriana</i>	[15-21]
21	6 β -(Methacryloyloxy)-3 α - (propanoyloxy)ivangustin	<i>W. hookeriana</i>	[15-21]
22	3 α -(Isobutyryloxy)-6 β - (methacryloyloxy)ivangustin	<i>W. hookeriana</i>	[15-21]
23	3 α -(2-Methacryloyloxy)-6 β - (methacryloyloxy)ivangustin	<i>W. hookeriana</i>	[15-21]
24	3 α -(Isovaleryloxy)-6 β - (methacryloyloxy)ivangustin	<i>W. hookeriana</i>	[15-21]
25	6 β -(Methacryloyloxy)-3 α -(tigloyloxy)ivangustin	<i>W. hookeriana</i>	[15-21]
26	6 β -(Methacryloyloxy)-3 α - (senecioyloxy)ivangustin	<i>W. hookeriana</i>	[15-21]
27	6 β -(Methacryloyl)-3 α -(tigloyloxy)ivangustin acetate	<i>W. hookeriana</i>	[15-21]
28	1 α -Hydroxy-6 α -(tiglinoyloxy)steiractinolide	<i>W. grandiflora</i>	[15-21]
29	6 α -(Angeloyloxy)-1 α -hydroxysteiractinolide	<i>W. grandiflora</i>	[15-21]

30	6 α -(Methacryloyloxy)-1 α -hydroxysteiractinolide	<i>W. grandiflora</i>	[15-21]
31	1 α ,6 α ,9 β -trihydroxy-4,10 α -dimethyl5 α ,7 α ,8 α -eudesm-3-en-8,12-olide	<i>W. trilobata</i>	[26]
32	15-Acetoxy-1 α -hydroxy-10 α -methyl-6 α -(tigloyloxy)-7 α H,8 α H,11 β H eudesm-4-en-8,12-olide	<i>W. pinetorum</i>	[15-21]
33	15-Acetoxy-6 α -(angeloyloxy)-1 α -hydroxy-10 α -methyl-7 α H,8 α H,11 β H eudesm-4-en-8,12-olide	<i>W. pinetorum</i>	[15-21]
34	3 β ,15-Diacetoxy-1 α -hydroxy-10 α -methyl-6 α -(tigloyloxy)-7 α H,8 α H,11 β H eudesm-4-en-8,12-olide	<i>W. hispida</i>	[15-21]
35	1 α ,15-Diacetoxy-3 β -hydroxy-10 α -methyl-6 α -(tigloyloxy)-7 α H,8 α H,11 β -H eudesm-4-en-8,12-olide	<i>W. hispida</i>	[15-21]
36	3 β ,15-Diacetoxy-1 α -hydroxy-10 α -methyl-6 α -(tigloyloxy)-7 α H,8 α H eudesma-4,11-dien-8,12-olide	<i>W. hispida</i>	[15-21]
37	15-Acetoxy-1 α -Hydroxy-10 α -methyl-6 α -(tigloyloxy)-7 α H,8 α H-eudesma-4,11-dien-8,12-olide	<i>W. pinetorum</i>	[15-21]
38	1 α -acetoxy-4 α -Hydroxy-6 α -isobutyryloxy-15 α -methyl-9 β -isovaleryloxyprostat	<i>W. trilobata</i>	[26]
39	1 β -acetoxy-4 α - Hydroxy-6 β -isobutyryloxy-15 α -methyl-9 β -tiglinoyloxyprostatolide	<i>W. trilobata</i>	[26]
40	Prostrolides C	<i>W. prostrata</i>	[10, 13, 23, 24].
41	Prostrolides B	<i>W. prostrata</i>	[10, 13, 23, 24].
42	1 β -Acetoxy-4 α -hydroxy-6 β -isobutyryloxy- 9 α -tiglinoyloxyprostatolide	<i>W. trilobata</i>	[26]

43	1 α ,4 α ,9 β -Trihydroxy-6 β -isobutyryloxyprostatolide	<i>W. trilobata</i>	[26]
44	1 α ,9 β -Diacetoxy-4 β -hydroxy-6 α -methacryloxy-11 β -methylprostatolide	<i>W. trilobata</i>	[26]
45	1 α ,9 β -Diacetoxy-4 β -hydroxy-6 α -methacryloxy-11 β -methylprostatolide	<i>W. trilobata</i>	[26]
46	Wedelolide G	<i>W. trilobata</i>	[13]
47	Wedelolide H	<i>W. trilobata</i>	[13]
48	Prostrolides A	<i>W. prostrata</i>	[10, 13, 23, 24].
49	Wedelolide I	<i>W. prostrata</i>	[10, 13, 23, 24].
50	Wedelolide J	<i>W. prostrata</i>	[10, 13, 23, 24].

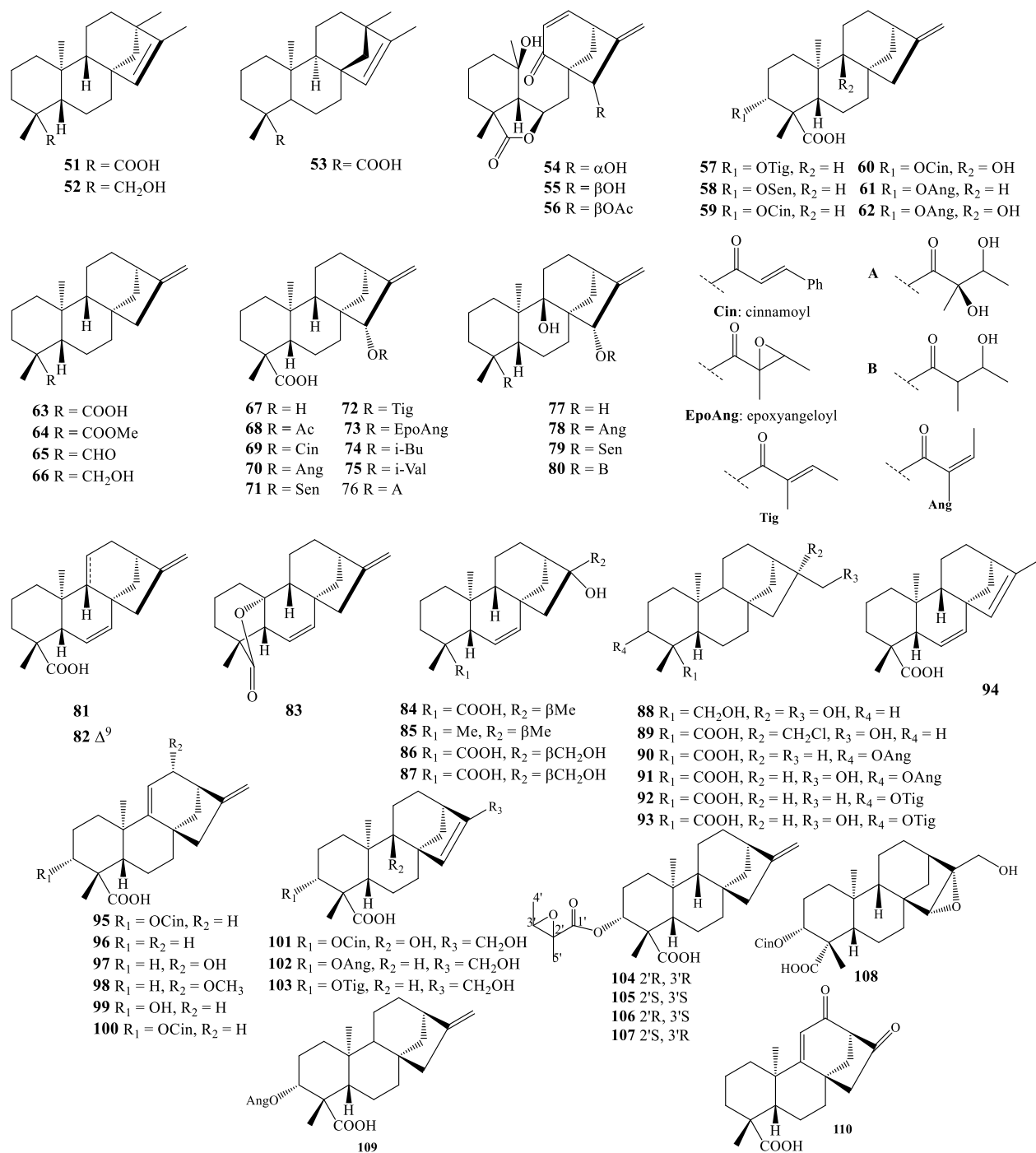
1.2.1.2. Thành phần diterpene

Qua các nghiên cứu đã công bố cho thấy, một trong những thành phần chính của chi *Wedelia* là các diterpene. Vào năm 1982, các dẫn xuất dạng *ent*-beyerene (**51**–**53**) cũng được báo cáo từ phần trên mặt đất của các loài *W. hookeriana* [18] và *W. calycina* Spreng. [21].

Tổng quan nghiên cứu về hóa học các loài thuộc chi *Wedelia* cho thấy thành phần hóa học chính là kaurene diterpene, trong đó các dẫn xuất *ent*-kaurane được tìm thấy ở hầu hết các loài thuộc chi *Wedelia* với rất nhiều hợp chất mới có cấu trúc thú vị được công bố [27, 28] (Hình 1.5).

Ở nước ta, năm 2006, tác giả Nguyễn Thanh Hoàng và cộng sự đã phân lập từ lá *W. trilobata* (L.) Hitchc. được hợp chất 3 α -(tigloyloxy) *ent*-kaur-16-en-19-oic acid (**57**) và từ bộ phận hoa loài *W. urticaefolia* (Blume) DC. ex Wight hợp chất *ent*-kaurene khác là *ent*-kaur-16-en-19-oic acid (**63**) [29]. Trong năm 2011, các nhà khoa học Trung Quốc đã phân lập và xác định được 2 hợp chất diterpene dạng khung *ent*-kaurene từ cây *W. prostrate* [30]. Đến năm 2015, Hui và cộng sự đã phân lập được 7 hợp chất *ent*-kaurane khác từ *W. trilobata*, trong đó có 2 hợp chất mới là 16 α ,17,19-

trihydroxy-18-nor-*ent*-kaurane-4 β -ol (**88**) và 17-chloro-16 β -hydroxy-*ent*-kaurane-19-oic acid (**89**) [31].



Hình 1.5. Cấu trúc hóa học của các hợp chất diterpene từ *Wedelia*.

Năm 2016, Li và cộng sự đã phân lập từ *W. trilobata* 26 hợp chất *ent*-kaurane diterpenoid, trong đó có 7 hợp chất mới (**90-93**, **95**, **101**) với hoạt tính thú vị [32]. Năm 2019, bốn hợp chất *ent*-kaurane mới là (2'*R*,3'*R*)-3 α -(2',3'-epoxyangeloyloxy)-kaur-16-en-19-oic acid (**104**), (2'*S*,3'*S*)-3 α -(2',3'-epoxyangeloyloxy)-kaur-16-en-19-oic acid (**105**), (2'*S*,3'*R*)-3 α -(2',3'-epoxyangeloyloxy)-kaur-16-en-19-oic acid (**106**)

và (2'*R*,3'*S*)-3 α -(2',3'-epoxyangeloyloxy)-kaur-16-en-19-oic acid (**107**) được Z. Wu và cộng sự phân lập từ *W. prostrata* [33]. Năm 2020, hợp chất 3 α -angeloyloxy-ent-kaur-16-en-19-oic acid (**109**) được J.Xu và cộng sự phát hiện từ loài *W. trilobata* [34], cùng thời gian này, nhóm tác giả R.K.Das và cộng sự đã công bố một hợp chất mới là wedelienone (**110**) từ loài *W. chinensis* [35].

Bảng 1.2.2. Thành phần diterpene từ *Wedelia*

51	<i>ent</i> -Beyer-15-en-19-oic acid	<i>W. hookeriana</i>	[18], [21]
52	<i>ent</i> -Beyer-15-en-19-ol	<i>W. hookeriana</i>	[18], [21]
53	Beyer-15-en-19-oic acid	<i>W. calycina</i>	[18], [21]
54	15 α -Hydroxywederegiolide	<i>W. regis</i>	[27, 28]
55	15 β -Hydroxywederegiolide	<i>W. regis</i>	[27, 28]
56	15 β -Acetoxywederegiolide	<i>W. regis</i>	[27, 28]
57	3 α -(Tigloyloxy)- <i>ent</i> -kaur-16-en-19-oic acid	<i>W. prostrata</i> <i>W. trilobata</i> <i>W. paludosa</i> <i>W. chinensis</i>	[18], [21], [27, 28], [36]
58	3 α -(Seneciolyoxy)- <i>ent</i> -kaur-16-en-19-oic acid	<i>W. trilobata</i>	[18], [21], [27, 28]
59	3 α -(Cinnamoyloxy)- <i>ent</i> -kaur-16-en-19-oic acid	<i>W. prostata</i> <i>W. trilobata</i> <i>W. chinensis</i> <i>W. paludosa</i>	[18], [21], [27, 28]
60	3 α -(Cinnamoyloxy)-9 β -hydroxy- <i>ent</i> -kaur-16-en-19-oic acid	<i>W. trilobata</i>	[18], [21]
61	3 α -(Angeloyloxy)- <i>ent</i> -kaur-16-en-19-oic acid	<i>W. trilobata</i> <i>W. paludosa</i> <i>W. chinensis</i>	[18], [21], [27, 28]
62	3 α -(Angeloyloxy)-9 β -hydroxy- <i>ent</i> -kaur-16-en-19-oic acid	<i>W. trilobata</i>	[27, 28]
63	<i>ent</i> -Kaur-16-en-19-oic acid	<i>W. hispida</i> <i>W. glauca</i>	[37-39], [29]

		<i>W. trilobata</i> <i>W. calycina</i> <i>W. chinensis</i> <i>W. paludosa</i> <i>W. hookeriana</i> <i>W. scaberrima</i> <i>W. grandiflora</i> <i>W. chinensis</i> <i>W. buphthalmiflora</i>	
64	<i>ent</i> -Kaurene-19-oic acid methyl ester	<i>W. trilobata</i>	[18], [21], [27, 28]
65	<i>ent</i> -Kaurene-19-al	<i>W. grandiflora</i>	[29]
66	<i>ent</i> -Kaurene-19-ol	<i>W. hookeriana</i> <i>W. grandiflora</i>	[29]
67	15 α -Hydroxy- <i>ent</i> -kaur-16-en-19-oic acid (Grandifloric acid)	<i>W. biflora</i> <i>W. calycina</i>	[37-39]
68	15 α -Acetoxy- <i>ent</i> -kaur-16-en-19-oic acid	<i>W. hookeriana</i>	[29]
69	15 α -(Cinnamoyloxy)- <i>ent</i> -kaur-16-en-19-oic acid	<i>W. glauca</i> <i>W. trilobata</i>	[37-39]
70	15 α -(Angeloyloxy)- <i>ent</i> -kaur-16-en-19-oic acid	<i>W. calycina</i> <i>W. hookeriana</i> <i>W. grandiflora</i> <i>W. scaberrima</i> <i>W. helianthoides</i> <i>W. buphthalmiflora</i>	[37-39], [29]
71	15 α -(Senecioyloxy)- <i>ent</i> -kaur-16-en-19-oic acid	<i>W. hookeriana</i> <i>W. grandiflora</i>	[29]
72	15 α -(Tigloyloxy)- <i>ent</i> -kaur-16-en-19-oic acid	<i>W. hookeriana</i> <i>W. scaberrima</i> <i>W. helianthoides</i> <i>W. buphthalmiflora</i>	[37-39]

73	15 α -(2,3-Epoxy-2-methylbutanoyloxy)- <i>ent</i> -kaur-16-en-19-oic acid	<i>W. calycina</i> <i>W. grandiflora</i>	[37-39]
74	15 α -(Isobutyryloxy)- <i>ent</i> -kaur-16-en-19-oic acid	<i>W. buphthalmiflora</i>	[16]
75	15 α -(Isovaleryloxy)- <i>ent</i> -kaur-16-en-19-oic acid	<i>W. buphthalmiflora</i>	[16]
76	15 α -(2,3-Dihydroxy-2-methylbutanoyloxy)- <i>ent</i> -kaur-16-en-19-oic acid	<i>W. calycina</i>	[37-39]
77	9 β ,15 α -Dihydroxy- <i>ent</i> -kaur-16-en-19-oic acid	<i>W. calycina</i>	[37-39]
78	15 α -(Angeloyloxy)-9 β -hydroxy- <i>ent</i> -kaur-16-en-19-oic acid	<i>W. trilobata</i> <i>W. hookeriana</i> <i>W. grandiflora</i> <i>W. helianthoides</i>	[37-39], [29]
79	9 β -Hydroxy-15 α -(senecioyloxy)- <i>ent</i> -kaur-16-en-19-oic acid	<i>W. hookeriana</i>	[29]
80	9 β -Hydroxy-15 α -(3-hydroxy-2-methylbutanyloxy)- <i>ent</i> -kaur-16-en-19-oic acid	<i>W. calycina</i>	[29]
81	<i>ent</i> -Kaura-6,16-dien-19-oic acid	<i>W. biflora</i>	[15,22]
82	<i>ent</i> -Kaura-9(11),16(17)-dien-19-oic acid	<i>W. hispida</i> <i>W. calycina</i> <i>W. chinensis</i> <i>W. paludosa</i> <i>W. hookeriana</i> <i>W. buphthalmiflora</i>	[37-39], [29], [40]
83	Tetrachyrin	<i>W. paludosa</i>	[15,22]
84	16 α -Hydroxy- <i>ent</i> -kaurane-19-oic acid	<i>W. paludosa</i>	[15,22]
85	<i>ent</i> -Kaurane-16 α -ol	<i>W. paludosa</i>	[15,22]
86	16 α ,17-Dihydroxy- <i>ent</i> -kaurane-19-oic acid	<i>W. calycina</i> <i>W. prostrata</i>	[15,22]
87	16 β ,17-Dihydroxy- <i>ent</i> -kaurane-19-oic acid	<i>W. paludosa</i>	[15,22]

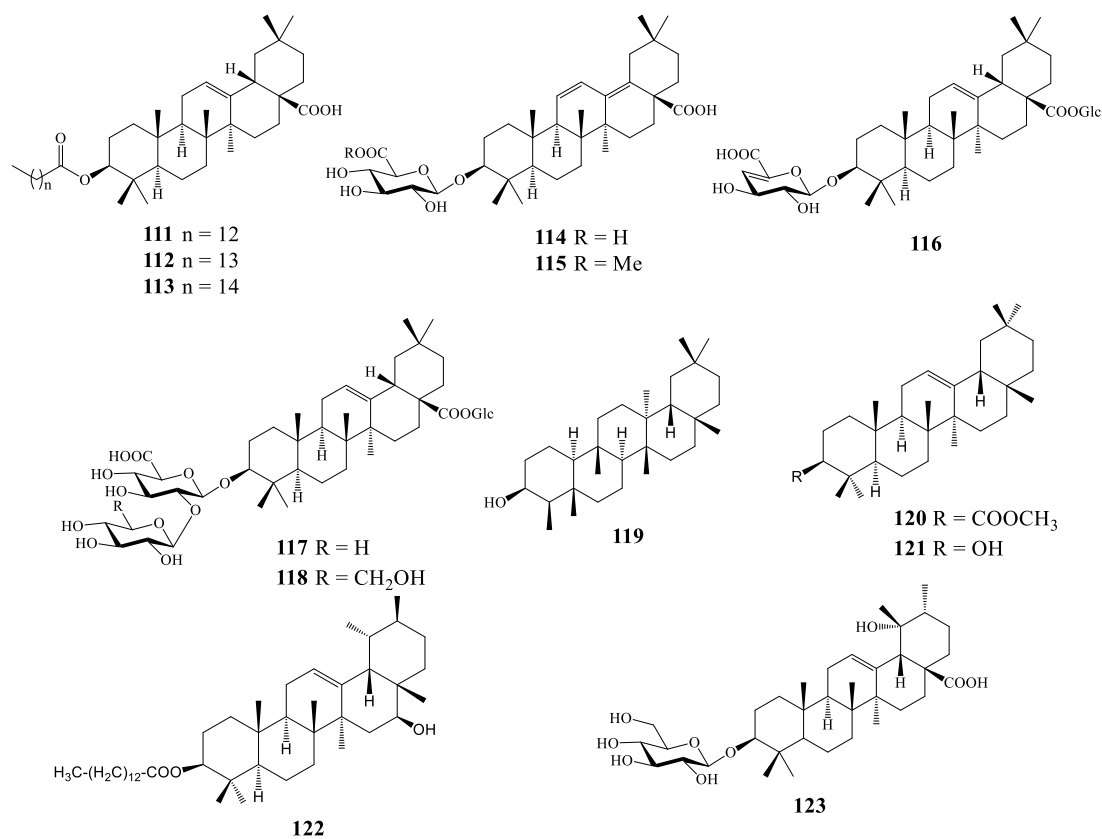
88	16 α ,17,19-Trihydroxy-18-nor- <i>ent</i> -kaurane-4 β -ol	<i>W. trilobata</i>	[31]
89	17-Chloro-16 β -hydroxy- <i>ent</i> -kaurane-19-oic acid	<i>W. trilobata</i>	[31]
90	3 α -angeloyloxy-16 α -hydroxy- <i>ent</i> -kaurane-19-oic acid	<i>W. trilobata</i>	[32]
91	3 α -Angeloyloxy-16 α ,17-dihydroxy- <i>ent</i> -kaurane-19-oic acid	<i>W. trilobata</i>	[32]
92	3 α -Tigloyloxy-16 α -hydroxy- <i>ent</i> -kaurane-19-oic acid	<i>W. trilobata</i>	[32]
93	3 α -Tigloyloxy-16 α , 17-dihydroxy- <i>ent</i> -kaurane-19-oic acid	<i>W. trilobata</i>	[32]
94	<i>ent</i> -Kaur-15-en-19-oic acid	<i>W. calycina</i>	[34]
95	3 α -Cinnamoyloxy- <i>ent</i> -kaura-9(11), 16-dien-19-oic acid	<i>W. trilobata</i>	[32]
96	(11),16-Dien-19-oic acid	<i>W. trilobata</i>	[34]
97	12 α -Hydroxy- <i>ent</i> -kaur-9(11), 16-dien-19-oic acid	<i>W. trilobata</i>	[34]
98	12 α -Methoxy- <i>ent</i> -kaur-9(11),16-dien-19-oic acid	<i>W. trilobata</i>	[34]
99	3 α -Hydroxy- <i>ent</i> -kaura-9(11), 16-dien-19-oic acid	<i>W. trilobata</i>	[34]
100	3 α -Cinnamoyloxykaur-9(11), 16-dien-19-oic acid	<i>W. prostrata</i>	[41]
101	3 α -Cinnamoyloxy-9 β ,17-dihydroxy- <i>ent</i> -kaur-15-en-19-oic acid	<i>W. trilobata</i>	[32]
102	3 α -Angeloyloxy-17-hydroxy- <i>ent</i> -kaur-15-en-19-oic acid	<i>W. chinensis</i>	[42]
103	3 α -(Tigloyloxy)-17-hydroxy- <i>ent</i> -kaur-15-en-19-oic acid	<i>W. chinensis</i>	[26]

104	(2'R,3'R)-3 α -(2',3'-epoxyangeloyloxy)- <i>ent</i> -kaur-16-en-19-oic acid	<i>W. prostrata</i>	[33]
105	(2'S,3'S)-3 α -(2',3'-epoxyangeloyloxy)- <i>ent</i> -kaur-16-en-19-oic acid	<i>W. prostrata</i>	[33]
106	(2'S,3'R)-3 α -(2',3'-epoxyangeloyloxy)- <i>ent</i> -kaur-16-en-19-oic acid	<i>W. prostrata</i>	[33]
107	(2'R,3'S)-3 α -(2',3'-epoxyangeloyloxy)- <i>ent</i> -kaur-16-en-19-oic acid	<i>W. prostrata</i>	[33]
108	3 α -Cinnamoyloxy-15 β ,16 β -epoxy-17-hydroxy- <i>ent</i> -kaurane-19-oic acid	<i>W. chinensis</i>	[43]
109	3 α -Angeloyloxy- <i>ent</i> -kaur-16-en-19-oic acid	<i>W. trilobata</i>	[34]
110	Wedelienone	<i>W. chinensis</i>	[35]

1.2.1.3. Thành phần triterpene và triterpene saponin

Đây cũng là thành phần được công bố phổ biến từ các nghiên cứu của chi *Wedelia*. Năm 1984, lupeol một hợp chất khá phổ biến từ các loài thực vật khác nhau cũng được phân lập từ loài *W. hispida* Kunth [21]. Từ bộ phận hoa của loài *W. paludosa*, De Carvalhor và cộng sự đã phân lập và xác định 3 hợp chất triterpen (**111**–**113**) [40]. Cũng từ dịch chiết EtOH loài *W. chinensis* vào năm 2005, Luo và cộng sự đã phân lập được 2 hợp chất saponin mới là oleana-11,13(18)-dienoic acid 3-*O*- β -glucuronopyranoside (**114**) và oleana-11,13(18)-dienoic acid 3-*O*- β -(6-*O*-methyl)glucuronopyranoside (**115**). Tiếp tục các nghiên cứu từ dịch chiết EtOAc lá của cây *W. scaberrima* Hook. một hợp chất saponin mới là wedelin (**116**) cũng được công bố [44]. Năm 1991, hai tác giả Govindachari và Premila đã công bố từ phần lá của loài *W. chinensis* hai bisdesmosidic oleanolic acid saponin mới là β -*O*-glucopyranosyl 3-*O*-[β -D-xylopyranosyl-(1-2)- β -D-glucuronopyranosyl]oleanolate (**117**) và β -D-glucopyranosyl 3-*O*-[β -D-glucopyranosyl-(1-2)- β -D-glucuronopyranosyl]oleanolate (**118**) (Hình 1.6) [45]. Ở Việt Nam, năm 2006, tác giả Nguyễn Thanh Hoàng và cộng sự đã phân lập từ lá của loài *W. trilobata* được 2 hợp chất friedelan-3- β -ol (**119**) và β -amyrin acetate (**120**). Trong năm 2009, nhóm tác giả này tiếp tục công bố các hợp chất triterpen khung olean là β -amyrin (**121**), 3- β -*O*-tetradecanoylurs-12-en-16- β -ol (**122**) từ hoa của loài *W. urticaefolia* [29]. Một hợp chất mới là 19- α -hydroxy-12(13)-

ene-28-oic acid-3-*O*- β -D-glucopyranoside (**123**) được Verma và cộng sự công bố năm 2015 từ loài *W. chinensis* [27, 46].



Hình 1.6. Cấu trúc hóa học

các hợp chất triterpene và triterpene saponin từ *Wedelia*.

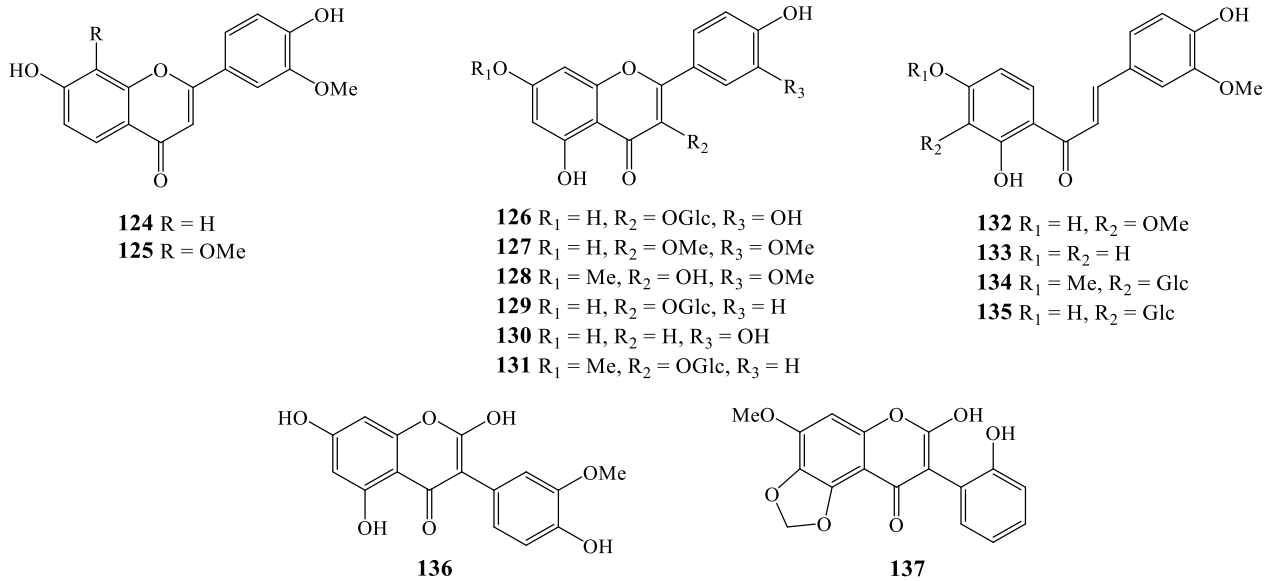
Bảng 1.2.3. Thành phần triterpene và triterpene saponin từ *Wedelia*.

111	3- <i>O</i> -Tetradecanoylolean-12-en-28-oic acid	<i>W. paludosa</i>	[40]
112	3- <i>O</i> -Pentadecanoylolean-12-en-28-oic acid	<i>W. paludosa</i>	[40]
113	3- <i>O</i> -Hexadecanoylolean-12-en-28-oic acid	<i>W. paludosa</i>	[40]
114	Oleana-11,13(18)-dienoic acid 3- <i>O</i> - β -glucuronopyranoside	<i>W. chinensis</i>	[47]
115	Oleana-11,13(18)-dienoic acid 3- <i>O</i> - β -(6- <i>O</i> -methyl)glucuronopyranoside	<i>W. chinensis</i>	[47]
116	Wedelin	<i>W. scaberrima</i>	[44]
117	β - <i>O</i> -Glucopyranosyl 3- <i>O</i> -[β -D-xylopyranosyl-(1-2)- β -D-glucuronopyranosyl]oleanolate	<i>W. chinensis</i>	[45]

118	β -D-Glucopyranosyl 3-O-[β -D-glucopyranosyl-(1-2)- β -D-glucuronopyranosyl]oleanolate	<i>W. chinensis</i>	[45]
119	Friedelan-3- β -ol	<i>W. biflora</i>	[29]
120	β -Amyrin acetate	<i>W. biflora</i>	[29]
121	β -amyrin	<i>W. urticaefolia</i>	[29]
122	3- β -O-Tetradecanoylurs-12-en-16- β -ol	<i>W. urticaefolia</i>	[29]
123	19-a-Hydroxyurs-12(13)-ene-28-oic acid-3-O- β -D-glucopyranosid	<i>W. calendulacea</i>	[46]

1.2.1.4. Thành phần flavonoid

Ngoài các hợp chất terpene thì flavonoid cũng là lớp chất được tìm thấy từ các loài thuộc chi *Wedelia*. Một flavanone mới 7,4'-dihydroxy-8,3'-dimethoxyflavanone (**121**) và hai dẫn xuất chalcone mới khác là 4,2',4'-trihydroxy-3,3'-dimethoxychalcone (**128**) và 4'-O- β -D-glucopyranosyl-4,2'-dihydroxy-3,3'-dimethoxychalcone (**130**) cùng với ba hợp chất đã biết **120**, **129**, và **131** đã được Caleanasan và cộng sự công bố từ phần trên mặt đất của loài *W. asperrima* (Decne.) Benth. [48]. Từ loài *W. chinensis* hai flavonoid glycoside đã biết là quercetin 3-O- β -D-glucopyranoside (**122**) và kaempferol 3-O-D-glucopyranoside (**125**) cũng được S. Apers và cộng sự công bố vào năm 2002 [49], tiếp đó hợp chất 7-methoxy-kaempferol-3-O- β -D-glucopyranoside (**127**) cũng được tìm thấy từ loài này [3]. Trong năm 2005, một hợp chất isoflavon (**133**) cũng được báo cáo từ loài *W. chinensis* [47]. Cùng thời gian này, D.H.Mitle cùng cộng sự cũng đã phân lập và xác định được hai hợp chất flavonoid là 3,3'-di-O-methylquercetin (**123**) và 7,3'-di-O-methylquercetin (**124**) cùng với một hợp chất đã biết khác là 2,7,4'-trihydroxy-5,3'-dimethoxyisoflavone (**132**) từ bộ phận lá của loài *W. biflora* [50]. Hợp chất luteolin (**126**) cũng được công bố từ loài *W. paludosa* [1, 47] (Hình 1.7).

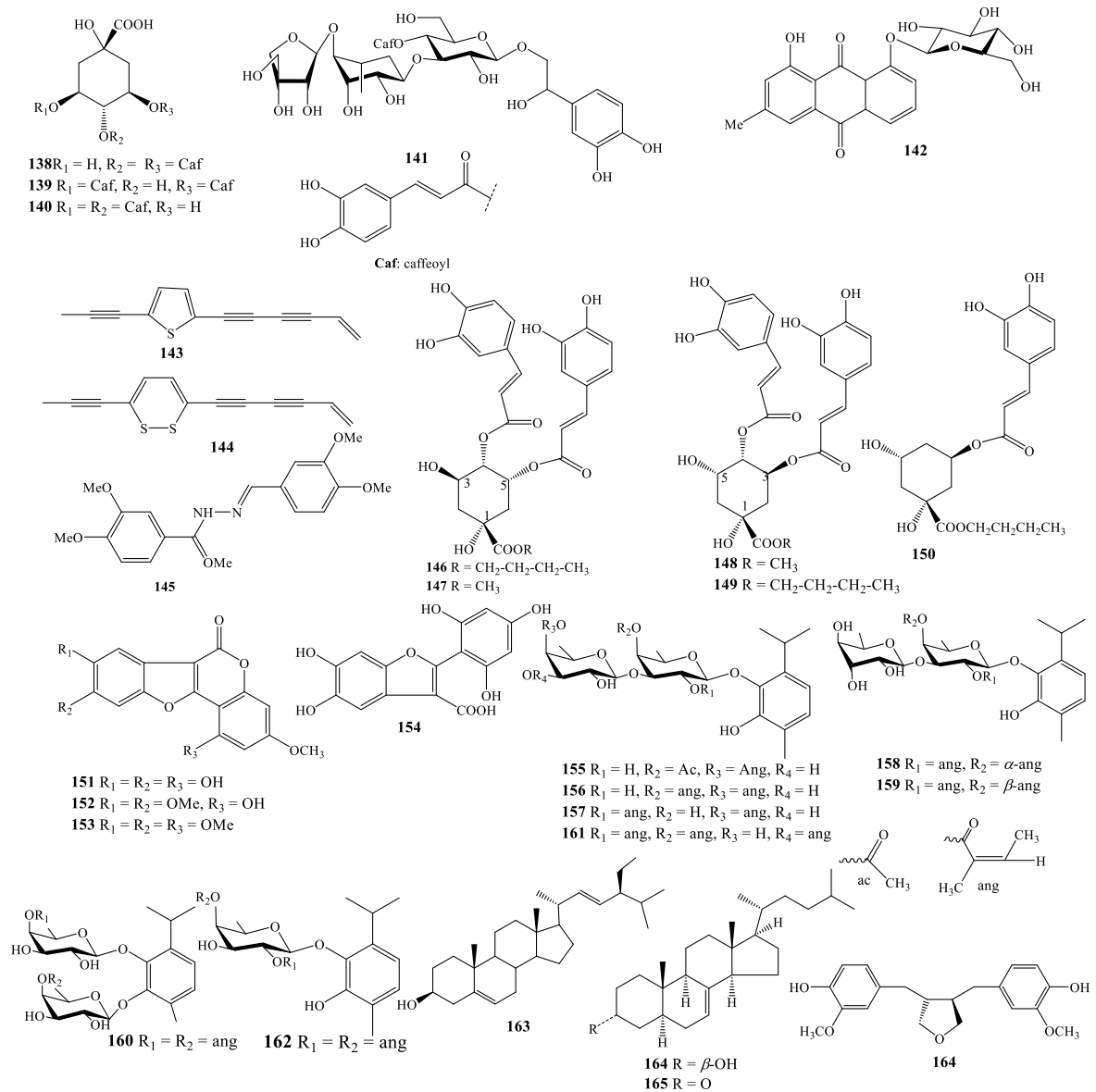


Hình 1.7. Cấu trúc các hợp chất flavonoid từ *Wedelia*.

Bảng 1.2.4. Thành phần flavonoid từ *Wedelia*

124	7,4'-Dihydroxy-3'-methoxyflavanone	<i>W. asperrima</i>	[48]
125	7,4'-Dihydroxy-8,3'-dimethoxyflavanone	<i>W. asperrima</i>	[48]
126	Quercetin 3- <i>O</i> -D-glucoside	<i>W. chinensis</i>	[48], [47]
127	3,3'-Di- <i>O</i> -methylquercetin	<i>W. biflora</i>	[50]
128	7,3'-Di- <i>O</i> -methylquercetin	<i>W. biflora</i>	[50]
129	Kaempferol 3- <i>O</i> -D-glucoside	<i>W. chinensis</i> <i>W. prostrata</i>	[48], [47]
130	Luteolin	<i>W. paludosa</i>	[47]
131	7-Methoxyl-kaempferol-3- <i>O</i> -β-D-glucopyranoside	<i>W. chinensis</i>	[3]
132	4,2',4'-Trihydroxy-3,3'-dimethoxychalcone	<i>W. asperrima</i>	[48]
133	4,2',4'-Trihydroxy-3-methoxychalcone	<i>W. asperrima</i>	[48]
134	4'- <i>O</i> -β-D-Glucopyranosyl-4,2'-dihydroxy-3,3'-dimethoxychalcone	<i>W. asperrima</i>	[48]
135	4'- <i>O</i> -β-D-Glucopyranosyl-4,2'-dihydroxy-3-methoxychalcone	<i>W. asperrima</i>	[48]
136	2,7,4'-Trihydroxy-5,3'-dimethoxyisoflavone	<i>W. biflora</i>	[50]
137	7-Methoxy-2'-hydroxy-5,6-(methylenedioxy)isoflavone	<i>W. chinensis</i>	[47]

1.2.1.5. Các thành phần khác

Hình 1.8. Cấu trúc các hợp chất khác từ *Wedelia*.

Lần đầu tiên hợp chất norwedelic acid (**154**) dạng coumarin được phân lập từ loài *W. chinensis* cùng với các thành phần khác (**151–153**, Hình 1.8) [51, 52]. Thêm vào đó, một vài dẫn xuất của caffeic acid (**138–141**) cũng lần lượt được báo cáo từ các loài *W. chinensis* và *W. trilobata* [49, 53]. Các hợp chất acid béo khác như stearic acid, linoleic acid, linolenic acid, và methyl linolenat từ phần trên không của loài *W. hispida* Kunth. cũng đã được xác định [21]. Từ dịch chiết EtOAc của *W. chinensis* lignoceric acid ($n\text{-C}_{24}\text{H}_{48}\text{O}_2$), melissic acid ($n\text{-C}_{30}\text{H}_{60}\text{O}_2$), và hợp chất mới ($9E,11Z,13E$)-8,15-dioxooxadeca-9,11,13-trienoic acid cũng được báo cáo trong năm 2005 [37]. Năm 2013, Thu và cộng sự đã phân lập được 10 hợp chất bao gồm 6 hợp chất mới wedebicoside A-F (**155-160**) và 4 hợp chất đã biết là **161 - 164** từ hoa của

loài *W. biflora* [54]. Gần đây, hợp chất chrysophenol 8-*O*- β -D-glucopyranoside (**142**) cũng được công bố từ *W. chinensis* [47]. Cũng từ loài này, năm 2018, Zhong và cộng sự tiếp tục công bố một hợp chất mới 4,5-di-*O*-caffeoylquinic acid butyl ester (**146**) cùng 4 hợp chất **147-150** lần đầu được phân lập từ loài này [43]. Bên cạnh đó, rất nhiều loài thuộc chi *Wedelia* được báo cáo các hợp chất sterol và các dẫn xuất của nó như stigmasteryl glucoside, sitosterol và sitosteryl glucoside [17, 18, 21, 30, 37, 40, 55].

Bảng 1.2.5. Thành phần khác từ *Wedelia*

138	4,5- <i>O</i> -Dicaffeoylquinic acid	<i>W. prostrata</i> <i>W. chinensis</i>	[49, 53]
139	3,5- <i>O</i> -Dicaffeoylquinic acid	<i>W. prostrata</i> <i>W. chinensis</i>	[49, 53]
140	3,4- <i>O</i> -Dicaffeoylquinic acid	<i>W. prostrata</i> <i>W. chinensis</i>	[49, 53]
141	Wedelosin	<i>W. chinensis</i>	[49, 53]
142	Chrysophenol 8- <i>O</i> - β -D-glucopyranoside	<i>W. chinensis</i>	[6, 17]
143	Thiophene acethylene	<i>W. trilobata</i> (L.) <i>Hitchc.</i> <i>W. grandiflora</i> <i>Benth.</i> <i>W. hookeriana</i> <i>Gardner.</i>	[18, 56]
144	Dithiophene acethylene	<i>W. hookeriana</i> <i>Gardner.</i>	[18]
145	Veratrylidenehydrazide	<i>W. biflora</i> (L.) DC.	[57]
146	4,5-di- <i>O</i> -Caffeoylquinic acid butyl ester	<i>W. chinensis</i>	[43]
147	4,5-di- <i>O</i> -Caffeoylquinic acid methyl ester	<i>W. chinensis</i>	[43]
148	3,4-di- <i>O</i> -Caffeoylquinic acid methyl ester	<i>W. chinensis</i>	[43]
149	3,4-di- <i>O</i> -Caffeoylquinic acid butyl ester	<i>W. chinensis</i>	[43]
150	3- <i>O</i> -Caffeoylquinic acid butyl ester	<i>W. chinensis</i>	[43]
151	Wedelolactone	<i>W. chinensis</i>	[51, 52]

152	Tri- <i>O</i> -methylwedelolactone	<i>W. chinensis</i>	[51, 52]
153	Norwedelolactone	<i>W. chinensis</i>	[51, 52]
154	Norwedelic acid	<i>W. chinensis</i>	[51, 52]
155	Wedebicoside A	<i>W. biflora</i>	[54]
156	Wedebicoside B	<i>W. biflora</i>	[54]
157	Wedebicoside C	<i>W. biflora</i>	[54]
158	Wedebicoside D	<i>W. biflora</i>	[54]
159	Wedebicoside E	<i>W. biflora</i>	[54]
160	Wedebicoside F	<i>W. biflora</i>	[54]
161	1- <i>O</i> -[2',4'-Diangeloyloxy-3'-(3''-angeloyloxy- β -D-fucopyranosyl)-6-hydroxythymol	<i>W. biflora</i>	[54]
162	1- <i>O</i> -(2',4'-diangeloyloxy- β -D-fucopyranosyl)-6-hydroxythymol	<i>W. biflora</i>	[54]
163	Stigmasterol	<i>W. biflora</i>	[54]
164	5 α -Stigm-7-en-3-ol	<i>W. biflora</i>	[54]
165	24-Ethylcoprostanone	<i>W. biflora</i>	[54]
166	Anhydrosecoisolariciresinol	<i>W. biflora</i>	[54]

Các nghiên cứu cho thấy thành phần hóa học từ *Wedelia* rất phong phú và đa dạng. Trong đó, các hợp chất được công bố nhiều nhất từ các loài thuộc chi *Wedelia* là các hợp chất thuộc khung sesquiterpen và các hợp chất diterpenoid dạng khung *ent*-beyerene và *ent*-kaurene với cấu trúc hóa học khá độc đáo.

1.2.2. Các nghiên cứu về hoạt tính sinh học về các loài thuộc chi *Wedelia*

Các loài thuộc chi *Wedelia* trên thế giới đã được phát hiện có nhiều hoạt tính sinh học đáng quan tâm như gây độc tế bào, kháng viêm, kháng khuẩn, kháng vi sinh vật kiểm định, giảm đau, chống tiểu đường và một số hoạt tính khác.

1.2.2.1. Hoạt tính gây độc tế bào ung thư

Trong một nghiên cứu của Gupta và cộng sự năm 2010 về khả năng chống ung thư biểu mô cổ tử cung (EAC) trên chuột bạch tạng Thụy Sĩ. Thí nghiệm cho chuột mang khối u uống trực tiếp dịch chiết methanol từ *W. chinensis* với liều 250 và 500 mg/kg trọng lượng cơ thể trong 9 ngày liên tiếp [58]. Kết quả cho thấy thể tích và số

lượng sống sót của tế bào khối u đều giảm, tuổi thọ của chuột tăng lên so với chuột đối chứng. Bên cạnh đó chuột được uống *W. chinensis* cho thấy số lượng hồng cầu và hàm lượng hemoglobin cũng tăng lên so với chuột đối chứng [58]. Năm 2007 nghiên cứu của Feng-Min Lin và cộng sự báo cáo rằng các hợp chất có trong *W. chinensis* có khả năng ngăn chặn hoạt động và sự phát triển của androgen - yếu tố tăng trưởng trong các tế bào ung thư tuyến tiền liệt. Nó cho thấy rằng tác dụng hiệp đồng của các hợp chất trong *W. chinensis*, chứng minh tiềm năng trong việc phòng ngừa và điều trị ung thư tuyến tiền liệt [1, 59, 60]. Năm 2011 nghiên cứu của Ginting và cộng sự đã xác nhận tiềm năng của *W. biflora* như một chất chống ung thư [61].

Hai hợp chất là wedelolactone (**151**) và norwedelolactone (**153**) cũng được Wagner và cộng sự báo cáo là thành phần hoạt động chính gây độc cho tế bào gan chuột bị gây độc với CCl₄ hoặc D-galactosamin, các tác giả cũng đã chứng minh tác dụng kích thích đáng kể tái sinh tế bào gan của chúng [62]. Năm 1986, tác giả Ling và cộng sự cũng chứng minh hợp chất *ent*-kaur-16-en-19 oic acid (**64**) cùng 3 hợp chất dạng khung kaurenoid khác và stigmasterol glucoside có tác dụng làm giảm độc tính tế bào gan chuột bị gây độc bởi CCl₄ hoặc D-galactosamin [37].

Một nghiên cứu khác của Manjamalai và cộng sự đã chứng minh rằng chiết xuất tinh dầu từ *W. chinensis* có tác dụng diệt tế bào ung thư phổi [13]. Nghiên cứu sau đó của Mardina và cộng sự vào năm 2020 sau khi tiến hành các thử nghiệm *in vivo* trên chuột, đã báo cáo rằng cáo rằng dịch chiết n-hexane từ *W. trilobata* có tiềm năng như một chất hóa học ngăn ngừa khối u ung thư vú [63]. Cùng thời điểm này, bốn hợp chất *ent*-kaurane mới là (2'*R*,3'*R*)-3 α -(2',3'-epoxyangeloyloxy)-kaur-16-en-19-oic acid (**104**), (2'*S*,3'*S*)-3 α -(2',3'-epoxyangeloyloxy)-kaur-16-en-19-oic acid (**105**), (2'*S*,3'*R*)-3 α -(2',3'-epoxyangeloyloxy)-kaur-16-en-19-oic acid (**106**) và (2'*R*,3'*S*)-3 α -(2',3'-epoxyangeloyloxy)-kaur-16-en-19-oic acid (**107**) được Z. Wu và cộng sự phân lập từ *W. prostrata* và nhóm tác giả đã thử nghiệm hoạt tính gây độc tế bào của các hợp chất này trên dòng tế bào HepG2. Kết quả cho thấy các hợp chất **104-107** cho các hoạt động gây độc tế bào tương đối mạnh, với các giá trị IC₅₀ lần lượt là 11,72 \pm 0,22, 14,23 \pm 0,18, 17,35 \pm 0,15 và 16,79 \pm 0,37 μ M [33]. Một nghiên cứu trong nước của nhóm tác giả Nguyễn Thị Minh Thuận vào năm 2020 cho biết chiết xuất chloroform từ *W. chinensis* có tác dụng gây độc tế bào và thúc đẩy quá trình tự chết của tế bào *in vitro* trên tế bào đơn nhân máu ngoại vi của người (PBMCs).

Theo tác giả, sau 48 giờ nuôi cấy, tỷ lệ tế bào đơn nhân bị apoptotic ở mẫu thử với cao chloroform từ *W. chinensis* tăng 19,1 % so với nhóm đối chứng và chưa xảy ra quá trình necrosis ở cả 2 mẫu. Chứng tỏ cao Sài đất gây độc cho tế bào đơn nhân theo cảm ứng tế bào chết theo chương trình (apoptosis). Điều này có thể được giải thích là do phân đoạn cao chloroform có chứa nhiều triterpenoid tự do. Các hợp chất triterpene, triterpenoid đã được chứng minh có tác dụng ức chế miễn dịch, có thể tăng độc tế bào hoặc apoptosis tế bào lympho [64]. Các nghiên cứu trước đó cũng đã báo cáo các loài *W. chinensis*, *W. prostrata* có khả năng gây độc tế bào [24, 65]. Từ hoa của loài *W. biflora*, Thu và cộng sự cho biết các hợp chất wedebicoside A-F (**155-160**) phân lập từ hoa của loài này gây độc mạnh trên cả 3 dòng tế bào ung thư như HeLa, MCF-7 và NCI-H460 ở nồng độ 100 µg/mL [54].

Cũng trong năm 2020, nhóm nghiên cứu của tác giả L. Sun và cộng sự cho biết các hợp eudesmanolide mới **31, 38-43** phân lập từ *W. trilobata* có tác dụng đáng kể trong việc ức chế sự phát triển của các dòng tế bào HeLa, SGC-7901 và HepG2. Nhóm tác giả cho rằng chính các nhóm este hóa của các nhóm hydroxyl ở vị trí C-1 và C-9 cho các hoạt động chống tăng sinh các dòng tế bào trên [26]. U nguyên bào thần kinh đệm (GBM) là loại u thần kinh đệm mạnh nhất và tính chất lan tỏa của nó khiến cho việc cắt bỏ nó khó khăn. Hơn nữa, ngay cả với việc điều trị xạ trị sau phẫu thuật và hóa trị cũng không đạt được kết quả như mong muốn. Do đó, việc tìm các phương pháp điều trị thay thế là cần thiết. Gần đây, một nghiên cứu của nhóm tác giả LJ. Chen (2021) cho thấy rằng chiết xuất ethanol từ *W. chinensis* đã ức chế đáng kể sự gia tăng của tế bào u nguyên bào thần kinh đệm (GMB) và gây ra quá trình tự chết trong các tế bào này [66]. Năm 2021, XQ.Zhou và các cộng sự của mình đã báo cáo rằng hợp chất trilobolide-6-*O*-isobutyrate phân lập từ *W. trilobata* có tác dụng gây độc tế bào rõ rệt trên các tế bào ung thư biểu mô tế bào gan [67].

1.2.2.2. Hoạt tính phòng và hỗ trợ bệnh tiểu đường

Gần đây, Novaes và cộng sự đã phát hiện dịch chiết và kaurenoic acid của loài *W. paludosa* có tác dụng giảm đường huyết, đặc biệt giảm lượng đường trong máu của chuột bị gây bệnh tiểu đường [68]. Dịch chiết nước của *W. trilobata* có tác dụng làm giảm đường huyết ở chuột bị tiểu đường do streptozotocin gây ra. Ở thí nghiệm này, những con chuột bạch đực được gây kích thích tăng đường huyết bằng streptozotocin với liều (45 mg/kg), sau đó được điều trị bằng cách cho uống với *W.*

trilobata liều (50 mg/kg). Thử nghiệm cho thấy, chuột đã giảm nồng độ glucose trong máu và cân nặng được cải thiện. Đồng thời, *W. trilobata* cũng làm giảm các sản phẩm thứ cấp của quá trình peroxi hóa lipid phản ứng với acid thiobarbituric quan sát thấy ở gan, thận, tinh hoàn cũng như triglyceride huyết thanh cao, giảm men gan (ALT và AST) ở chuột bị bệnh tiểu đường [69]. Năm 2020, nhóm nghiên cứu của Buddhakala và cộng sự khi nghiên cứu về độc tính và hoạt tính chống đái tháo đường của chiết xuất etanolic từ hoa của *W. trilobata* trên chuột cho biết chiết xuất ethanolic từ hoa của loài này không độc và chuột bị bệnh tiểu đường được cho uống chiết xuất ethanolic từ hoa *W. trilobata* ở liều 250 mg/kg trọng lượng cơ thể trong tám tuần làm giảm đáng kể lượng đường huyết lúc đói và cholesterol so với những con chuột đối chứng [70].

1.2.2.3. Hoạt tính chống oxy hóa

Nghiên cứu gần đây nhất vào năm 2021 của M.Islam và cộng sự đã báo cáo *W.chinensis* có hoạt tính chống oxy hóa mạnh trong một số thử nghiệm chống oxy hóa bao gồm DPPH và quét gốc hydroxyl, nhóm tác giả cho rằng apigenin được xem như một hợp chất chính góp phần ức chế hoạt động chống oxy hóa của *W. chinensis* [71]. Từ bộ phận lá của loài *W. chinensis*, Verma và cộng sự đã tiến hành khảo sát hàm lượng các dẫn xuất phenolic và tác dụng chống oxy hóa. Kết quả cho thấy, dịch chiết ethanol của loài này đã thể hiện tác dụng thu dọn gốc tự do DPPH[•], NO[•], O₂^{•-} và peroxit hóa lipid với giá trị IC₅₀ tương ứng là 9,16, 13,21, 25,27, và 17,33 µg/mL. Qua đó, các nhà khoa học cũng đã nhận thấy rằng, hoạt tính chống oxy hóa phụ thuộc nhiều vào thành phần phenolic hơn là nồng độ của các flavonoid [39]. Nghiên cứu của Manjamalai (2012) cho biết tinh dầu từ loài *W. chinensis* hoạt động chống oxy hóa đáng kể [13]. Mardina và cộng sự đã đánh giá hoạt tính chống oxy hóa của cao chiết ethyl acetate từ lá của loài *W. trilobata* thông qua khả năng quét gốc tự do DPPH[•]. Kết quả cho thấy hoạt tính chống oxy hóa trung bình của cao chiết với giá trị IC₅₀ = 127,43 µg/mL [65]. Cao chiết methanol từ hoa của loài *W. trilobata* đã được đánh giá hoạt tính chống oxy hóa thông qua phương pháp quét gốc tự do DPPH. Kết quả cho thấy cao chiết methanol thể hiện hoạt tính quét gốc tự do DPPH với IC₅₀ là 92,77 ± 0,49 % ở nồng độ thử 0,05 mg/mL. Nghiên cứu của Chethan và cộng sự cũng đánh giá khả năng chống oxy hóa của cao chiết methanol từ hoa loài *W. trilobata*, kết quả cho thấy cao chiết thể hiện hoạt tính chống oxy hóa tốt với giá trị IC₅₀ = 90 µg/mL

với phương pháp thử DPPH và giá trị $IC_{50} = 80 \mu\text{g/mL}$ đối với phương pháp quét gốc tự do ABTS [56]. Nghiên cứu đánh giá hoạt tính chống oxy hóa của cao chiết nước của các bộ phận khác nhau của cây *W. trilobata* được Govindappa và cộng sự tiến hành theo hai phương pháp quét gốc tự do DPPH và phương pháp khử ion sắt III (ferric ion reducing antioxidant power - FRAP). Kết quả đánh giá hoạt tính chống oxy hóa theo phương pháp thu dọn gốc tự do DPPH chỉ ra cao chiết từ lá tươi thể hiện hoạt tính chống oxy hóa tốt hơn từ thân và hoa tươi với % ức chế lần lượt là 86,17%, 82,64% và 55,41% ở nồng độ thử 0,1 mg/mL. Các cao chiết từ lá, hoa và thân khô thể hiện hoạt tính quét gốc tự do yếu hơn so với các bộ phận tươi. Ở nồng độ 0,1 mg/mL, cao chiết từ lá (83,12%) thể hiện hoạt tính chống oxy hóa mạnh hơn thân (79,33%) và hoa (54,26%). Theo phương pháp khử sắt, khả năng khử Fe (III) thành Fe(II) của cao chiết nước từ các bộ phận tươi loài *W. trilobata* nằm trong khoảng từ 810,14 đến 1623,21 $\mu\text{g Fe (II)/mg}$, từ các bộ phận khô trong khoảng 773,32 đến 1423,64 $\mu\text{g Fe (II)/mg}$. Khả năng khử ion sắt (III) của cao chiết nước phần thân, hoa và lá yếu hơn so với chất đối chứng ascorbic acid (1648,52 $\mu\text{g/mg}$), nhưng tốt hơn BHT (Butylated hydroxytoluene) (64,84 $\mu\text{g/mg}$) [72]. Một nghiên cứu khác cũng đánh giá hoạt tính chống oxy hóa của các bộ phận lá, thân và hoa của loài *W. trilobata* thông qua khả năng quét gốc tự do DPPH. Nghiên cứu cho thấy phần thân và hoa thể hiện hoạt tính chống oxy hóa mạnh với % ức chế là 92,4% và 99,1% ở nồng độ thử 800 $\mu\text{g/mL}$, phần lá thể hiện hoạt tính trung bình (54,4%) ở nồng độ 400 $\mu\text{g/mL}$ [73].

1.2.2.4. Kháng viêm, kháng khuẩn, kháng nấm.

Từ các dịch chiết *n*-hexane, dichloromethane và butanol của hoa loài *W. paludosa* thể hiện hoạt tính kháng lại các chủng nấm gây bệnh ngoài da như: *Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton rubrum*, và *Trichophyton mentagrophyte* với nồng độ từ 250-1000 $\mu\text{g/mL}$ [74]. Trong đó 2 hợp chất kaurenoic acid và luteolin cũng cho thấy có hoạt tính kháng nấm [75]. Năm 2004, Mottakin và cộng sự đã sàng lọc hoạt tính kháng 19 chủng vi khuẩn và thử nghiệm độc tính Brine Shrimp của các cao chiết cùng với 3 hợp chất diterpene phân lập được từ loài *W. chinensis*. Kết quả thử nghiệm độc tính Brine Shrimp cho thấy các cao chiết có hoạt tính tốt với LC_{50} là 4,59 $\mu\text{g/mL}$ (ete dầu hòa), 7,99 $\mu\text{g/mL}$ (chloroform), và 14,88 $\mu\text{g/mL}$ (methanol) từ các dịch chiết tương ứng. Riêng với hợp chất (63) được phân lập từ cao chiết CHCl_3 cho thấy có hoạt tính kháng khuẩn với hầu hết các chủng vi khuẩn thử nghiệm, với

liều 200 $\mu\text{g}/\text{đĩa}$ thì đường kính vòng vô khuẩn là 10-21 mm. Các hợp chất khác như 3 α -(angeloyloxy)-*ent*-kaur-16-en-19-oic acid (**61**) có khả năng kháng khuẩn tốt với giá trị LC_{50} lên tới 0,68 $\mu\text{g}/\text{mL}$ [76]. Ngoài ra, các hợp chất *ent*-kaur-6,16-dien-19-oic acid (**81**) và *ent*-kaur-15-en-19-oic acid (**94**) cũng thể hiện hoạt tính kháng khuẩn khá tốt [50, 55, 77]. Nghiên cứu vào năm 2013 của Li và cộng sự cho biết ở nồng độ 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, các hợp chất wedelolide A và wedelode C-F phân lập từ loài *W. trilobata* thể hiện hoạt động kháng virus mạnh trong cây thuốc lá với tỷ lệ ức chế khác nhau, từ 46,7% đến 76,5%, cao hơn so với đối chứng dương ningnanmycin (13,5%) [22]. Đến năm 2015, Hui và cộng sự đã phân lập được 7 hợp chất *ent*-kaurane khác từ *W. trilobata*, trong đó có 2 hợp chất là 16 α ,17,19-trihydroxy-18-nor-*ent*-kaurane-4 β -ol (**88**) và 17-chloro-16 β -hydroxy-*ent*-kaurane-19-oic acid (**89**), những hợp chất này thể hiện hoạt tính kháng khuẩn ở mức trung bình với các giá trị MIC từ 3,13 tới 12,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ trên chủng vi khuẩn Gram (-) (*Shigella dysenteriae*) và Gram (+) (*Staphylococcus aureus*) [31]. Một nghiên cứu khác của Mitle và cộng sự cho biết hai hợp chất flavonoid **128** và **136** phân lập từ thân của loài *W. biflora* thể hiện khả năng kháng khuẩn mạnh [50, 55]. Từ phần vỏ thân của cây *W. biflora*, các nhà khoa học Thái Lan đã công bố khả năng kháng khuẩn của các hợp chất 5 α -stigm-7-en-3-ol (**164**) và 24-ethylcoprostanone (**165**) [55]. Các nghiên cứu khác trong năm 2012 cho biết các hợp chất diterpenoid từ *W. trilobata* có khả năng kháng *Pseudomonas solanacearum* Smith (một loại vi rút gây héo rũ ở cà chua) thông qua con đường tín hiệu JA ở cây thuốc lá [78]. Ngoài ra từ cao chiết của *W. trilobata* còn cho thấy tác dụng chống ký sinh trùng, kháng khuẩn, kháng nấm, kháng viêm [25, 79, 80]. Tiếp đó, hợp chất wedelolactone (**151**) cũng đã được Yuan và cộng sự tiến hành khảo sát hoạt tính kháng viêm thông qua tác động của chúng lên sự phát sinh các yếu tố gây viêm với sự kích thích của yếu tố phiên mã NF- κ B. Kết quả cho thấy, hợp chất này thể hiện tiềm năng kháng viêm mạnh thông qua quá trình ức chế sự sản sinh của NO, PGE₂ và yếu tố hoại tử khối u TNF- α [81]. Năm 2018, tiếp tục nghiên cứu thành phần hóa học và đánh giá hoạt tính kháng viêm trên đại thực bào RAW264.7 của các hợp chất phân lập từ *W. chinensis*. Tác giả Zhong và cộng sự cho biết 3 α -cinnamoyloxy-15 β ,16 β -epoxy-17-hydroxy-*ent*-kaurane-19-oic acid (**108**), 4,5-di-*O*-caffeoylquinic acid butyl ester (**146**), 4,5-di-*O*-caffeoylquinic acid methyl ester (**147**), 3,4-di-*O*-caffeoylquinic acid methyl ester (**148**), 3,4-di-*O*-caffeoylquinic acid butyl ester (**149**),

3-*O*-caffeoylquinic acid butyl ester (**150**), isoquercetin-3-*O*- β -D-glucopyranoside (**122**) có khả năng ức chế mạnh sự sản sinh NO trên đại thực bào với giá trị IC₅₀ tương ứng là $12,42 \pm 0,32$, $10,87 \pm 0,25$, $12,56 \pm 0,53$, $11,34 \pm 0,32$ và $6,45 \pm 0,26$ μ M [43]. Nghiên cứu của L.Sun và cộng sự đã báo cáo khả năng chống viêm đáng kể của hợp chất (**103**) bằng cách ức chế sản xuất NO trong các tế bào BV-2 microglia do LPS gây ra với giá trị IC₅₀ là $11,77 \pm 0,83$ μ M [26]. Nghiên cứu mới đây vào năm 2021 của của J. Xu và cộng sự cho rằng hợp chất (**57**) phân lập từ *W. trilobata* có tiềm năng được phát triển như một chất điều trị mới cho các bệnh liên quan đến viêm [36].

1.2.2.5. Tác động ức chế hệ thần kinh trung ương

W. chinensis đã được báo cáo là một loại thuốc dân gian để điều trị các bệnh khác nhau bao gồm cả bệnh thoái hóa thần kinh, các bệnh liên quan tới thần kinh trung ương hệ thống. Chiết xuất từ thân của loài này cho hoạt động ức chế thần kinh trung ương mạnh, hầu hết tương tự như tác nhân tâm thần [35]. Chiết xuất ethanol của toàn bộ cây của *W. chinensis* đã được thử nghiệm cho các hành vi tâm sinh lý. Kết quả cho thấy các động vật sử dụng cao chiết này làm giảm hành vi vận động và giảm kích thích của các thần kinh trung ương gây trầm cảm [10, 82]. Dịch chiết chloroform, ethyl acetate và chiết xuất methanol từ lá của *W. trilobata* (30 mg/kg) kết hợp với sử dụng pentobarbitone được tiến hành thử nghiệm dựa trên đánh giá thời gian ngủ và hoạt động di chuyển ở chuột [83]. Chiết xuất ete dầu hòa làm tăng nồng độ natri-pentobarbitone ở chuột so với các chiết xuất khác. Các động vật được dùng chiết xuất ethanolic từ *W. chinensis* cho thấy giảm hoạt động vận động cao hơn đáng kể so với các thuốc diazepam điển hình và các loại chiết xuất khác [65]. Một nghiên cứu khác về dịch chiết cồn của lá *W. chinensis* được đánh giá về những thay đổi do căng thẳng gây ra trong não chất dẫn truyền thần kinh và mức enzyme monoamine oxidase trong chuột bạch tạng. Các chất chiết xuất được tìm thấy có khả năng bình thường hóa hoạt động chống lại căng thẳng cố định gây ra thay đổi trong norepinephrine (NE), dopamine (DA), 5-hydroxy tryptamine (5-HT), acid axetic 5-hydroxy indole (5-HIAA) và enzyme monoamine oxidase (MAO) [84]. Năm 2019, M.A.F. Islam và cộng sự tiếp tục nghiên cứu hoạt tính từ cao chiết ethanolic của *W. trilobata* về tác dụng chống tiêu chảy và hệ thần kinh trung ương. Kết quả cho thấy cao chiết từ *W. trilobata* có tác dụng chống tiêu chảy và trầm cảm thần kinh trung ương giảm đáng kể [85].

1.2.2.6. Các hoạt tính sinh học khác

Năm 2009, Mishra G và cộng sự đã nghiên cứu hoạt tính bảo vệ tế bào gan từ chiết xuất cồn và nước của *W. chinensis*. Quan sát thấy rằng các chiết xuất cồn ở liều 500 mg/kg cho thấy có tác dụng mạnh hơn so với chiết xuất nước [86]. Khoảng thời gian sau đó Jalal A và cộng sự (2012) đã báo cáo rằng các hợp chất như flavonoid, terpenoid và tannin trong *W. chinensis* có thể chịu trách nhiệm về bảo vệ gan [87]. Hoạt tính làm lành vết thương được khảo sát trên hợp chất **63** phân lập từ lá *W. trilobata*. Hợp chất này có tác dụng chữa lành vết thương là do khả năng kháng khuẩn, kích thích tăng trưởng nguyên bào sợi và bảo vệ các tế bào thương tích gây ra bởi peroxide. Các *ent*-kaura-9(11),16-dien-19-oic acid (2,5-0,08 g/ml) đã làm tăng sự sống sót của tế bào nguyên bào sợi chuột L929 từ 97-117% và bảo vệ tế bào nguyên bào sợi L929 chống lại sự mất cân bằng oxy hóa gây ra bởi hydrogen peroxide (94-80%) [80]. Nghiên cứu so sánh về hoạt tính giảm đau từ chiết xuất ethanol của: *W. trilobata*, *W. biflora* và *Eclipta alba* được đánh giá bằng phương pháp dùng acid acetic gây đau ở chuột. Người ta phát hiện ra rằng các chiết xuất ức chế phản ứng đau gây ra bởi acid acetic phụ thuộc liều. Liều 500 mg/kg của chiết xuất ethanol của: *W. trilobata*, *W. biflora*, *Eclipta alba* và aspirin có thể ngăn chặn hiện tượng nghiến răng và có hiệu quả giảm đau tương đương với các thuốc chuẩn như aspirin và morphine khi nghiên cứu trên mô hình động vật [80]. H. Wagner và cộng sự đã nghiên cứu rằng wedelolactone (**151**) phân lập từ *W. chinensis* có 5 cơ chế ức chế lipoxygenase và caspase. Nghiên cứu khẳng định rằng *W. chinensis* có tác dụng giảm đau mạnh, kháng viêm khi tiến hành thử nghiệm trên các mô hình động vật cho kết quả tương đương với các thuốc chuẩn như morphine, aspirin và indomethacine [88]. Cho tới năm 2021, các nghiên cứu của R. Vinyagam và cộng sự tiếp tục khẳng định lại đa tác dụng của hợp chất (**151**) với khả năng kháng khuẩn, giảm đau, chống oxy hóa, độc tế bào, chống đái tháo đường, chống viêm, bảo vệ thần kinh, bảo vệ tim mạch và bảo vệ gan [89].

CHƯƠNG 2. PHƯƠNG PHÁP VÀ THỰC NGHIỆM

2.1. Đối tượng nghiên cứu

2.1.1. Sài đất ba thùy (*Wedelia trilobata* (L.) Hitchc).

Mẫu Sài đất ba thùy (*W. trilobata*) được thu hái tại Thái Bình vào tháng 9 năm 2017. Tên khoa học của mẫu được xác định bởi TS. Đỗ Văn Hải, Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Mẫu tiêu bản 2016.55-W2 được lưu trữ tại Trung tâm Nghiên cứu nông dược, Trung tâm Nghiên cứu và Chuyển giao công nghệ.



Hình 2.1. Cây Sài đất ba thùy (*W. trilobata*)

2.1.2. Sài đất (*Wedelia chinensis* (Osbeck) Merr.).

Mẫu Sài đất (*W. chinensis*) được thu hái tại Hà Nội vào tháng 9 năm 2017. Tên khoa học của mẫu được xác định bởi TS. Đỗ Văn Hải, Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Mẫu tiêu bản 2016.55-W1 được lưu trữ tại Trung tâm Nghiên cứu nông dược, Trung tâm Nghiên cứu và Chuyển giao công nghệ.



Hình 2.2. Cây Sài đất (*W.chinensis*)

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp phân lập chất

- Sắc ký lớp mỏng (TLC)

Sắc ký lớp mỏng được thực hiện trên bản mỏng tráng sẵn DC-Alufolien 60 F₂₅₄ (Merck 1,05715), RP-C18 F_{254S} (Merck). Phát hiện chất bằng đèn tử ngoại ở hai bước sóng 254 nm và 365 nm hoặc dùng thuốc thử là dung dịch H₂SO₄ 10% được phun đều lên bản mỏng, sấy khô rồi hơi nóng từ từ đến khi hiện màu.

- Sắc ký lớp mỏng điều chế

Sắc ký lớp mỏng điều chế thực hiện trên bản mỏng tráng sẵn silica gel 60 F₂₅₄ (Merck 1,05875), phát hiện vết chất bằng đèn tử ngoại hai bước sóng 254 nm và 365 nm, hoặc cắt rìa bản mỏng để phun thuốc thử là dung dịch H₂SO₄ 10%, hơi nóng để phát hiện vết chất; ghép lại bản mỏng như cũ để xác định vùng chất, sau đó cạo lớp silica gel có chất, giải hấp phụ và tinh chế lại bằng cách kết tinh trong dung môi thích hợp.

- Sắc ký cột (C.C)

Sắc ký cột được tiến hành với chất hấp phụ là silica gel pha thường và pha đảo. Silica gel pha thường có cỡ hạt là 0,040-0,063 mm (230-400 mesh). Silica gel pha đảo RP-18 (150 μm, Fuji Silysia Chemical Ltd.). Nhựa Diaion HP-20 (Mitsubishi Chem. Ind. Co., Ltd.).

2.2.2. Phương pháp xác định cấu trúc các hợp chất

Phương pháp chung để xác định cấu trúc hoá học của các hợp chất là sự kết hợp xác định giữa các thông số vật lý với các phương pháp phổ hiện đại bao gồm:

2.2.2.1. Phổ khối lượng (MS)

Phổ khối lượng đo trên hệ Agilent 1260 HPLC-MS với nguồn ion hóa (Electrospray ionization source-ESI hoặc Atmospheric pressure chemical ionization-APCI) của Viện Hóa sinh biển, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

2.2.2.2. Phổ khối lượng phân giải cao HR-ESI-MS

Phổ phân giải cao HR-ESI-MS được đo trên máy Agilent 6530 Accurate Mass QTOF LC/MS của Viện Hóa sinh biển, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

2.2.2.3. Phổ cộng hưởng từ hạt nhân NMR

Phổ NMR đo trên máy: Bruker AM500 FT-NMR của Viện Hoá học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Chất nội chuẩn là TMS (Tetramethyl Silan).

Các kỹ thuật phổ cộng hưởng từ hạt nhân được sử dụng bao gồm:

- Phổ cộng hưởng từ hạt nhân một chiều: $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C NMR}$ và DEPT.
- Phổ cộng hưởng từ hạt nhân hai chiều: HSQC, HMBC, COSY và NOESY.
- Dung môi được sử dụng bao gồm các dung môi: $\text{DMSO-}d_6$, CD_3OD , CDCl_3 . Việc lựa chọn dung môi đo phụ thuộc vào bản chất của từng mẫu, trên nguyên tắc là dung môi phải hòa tan hoàn toàn mẫu đo và không che khuất các tín hiệu phân tích.

2.2.2.4. Độ quay cực $[\alpha]_D$:

Độ quay cực được đo trên máy JASCO P-2000 Polarimeter của Viện Hóa sinh biển, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

2.2.2.5. Phương pháp xác định đường:

Việc xác định cấu hình đường và vị trí gắn của đường là phần vô cùng quan trọng trong quá trình xây dựng cấu trúc hóa học của các hợp chất phân lập được. Trình tự xác định đường được thực hiện như sau:

- Nhận dạng đường đơn thông qua giá trị độ chuyển dịch hóa học cacbon và proton, cấu hình α/β của nhóm OH-hemiacetal được xác định thông qua hằng số tương tác của proton anome (J_{1-2}) cũng như xác định lập thể các vị trí trong từng phân tử đường bằng dạng tín hiệu và hằng số tương tác J của các proton trong từng phân tử đường.

- So sánh độ chuyển dịch hóa học δ_C của các đường thu được với các tài liệu tham khảo về chi và loài.

- Kiểm tra lại cấu trúc hóa học của từng phân tử đường đơn bằng phổ HSQC kết hợp với phổ $^1\text{H-}^1\text{H COSY}$ để nối mạch cacbon cũng như gán chính xác các giá trị độ dịch chuyển hóa học của từng vị trí. Xác định vị trí gắn của đường đơn hay chuỗi đường thông qua phổ tương tác 2 chiều HMBC.

Tuy nhiên, với việc sử dụng phổ NMR, chúng ta chưa khẳng định được cấu hình D/L của từng phân tử đường.

+ Xác định đường D và L: Trước hết thủy phân để tạo đường đơn, sau đó tinh chế bằng các phương pháp sắc ký kết hợp để thu được các đường đơn. Tiến hành kiểm tra trên sắc ký TLC với các đường chuẩn; so sánh độ quay cực riêng với các dữ liệu đã công bố. Từ đó xác định được cấu hình D/L của đường.

+ Các bước tiến hành cụ thể như sau: Mỗi hợp chất (**WT1** và **WT2**, 3 mg) được hòa tan trong 5 mL hỗn hợp dung dịch KOH/EtOH 10 % và đun nóng đến 70°C trong 3 giờ. Sau đó hỗn hợp dung dịch được axit hóa bằng HOAc. Hỗn hợp thu được sau phản ứng được loại bỏ dung môi và tiến hành chiết phân lớp với EtOAc và nước (10 mL x 3 lần). Dịch chiết EtOAc thu được được cô quay và tinh chế lại thu được chất bột màu trắng. Dịch nước thu được gồm các sản phẩm đường đơn. Tiến hành so sánh bằng silica gel TLC (R_f 0,3 với hệ dung môi triển khai CH₃Cl/MeOH/H₂O 1,5:1:0,15 (v/v/v)) và so sánh độ quay cực riêng với đường chuẩn đã công bố [90, 91] cho thấy đường thu được là D-glucose với $[\alpha]_D^{20} +10,5$ (c, 0,15, H₂O).

2.2.2.6. Xác định cấu hình tuyệt đối theo phương pháp Mosher [92]:

Việc xác định cấu hình tuyệt đối của các hợp chất hữu cơ là một yêu cầu quan trọng về cấu trúc trong hợp chất thiên nhiên. Các đối tượng nghiên cứu theo Mosher có thể là ancol bậc 2, amin bậc 1, Các ester Mosher được điều chế bằng phản ứng của ancol bậc 2 với các tác nhân Mosher (*R*)- và (*S*)- α -methoxy- α -(trifluoromethyl) phenylacetic acid (*R*)-MTPA và (*S*)-MTPA) hoặc với các acylchloride của MTPA. Các bước tiến hành cụ thể như sau:

- Điều chế ester (*S*)-MTPA của **WC1**: hợp chất **WC1** (3 mg) được hòa tan trong CH₂Cl₂ (2,5 mL) cùng dimethylaminopyridine (35 mg), trimethylamine và (*R*)-MTPA chloride (30 μ L), hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ phòng. Sau 3 giờ dừng phản ứng, thêm vào 1mL MeOH. Hỗn hợp dung dịch thu được được cô quay và tinh chế lại trên cột sắc ký silica gel với hệ dung môi rửa giải CH₂Cl₂-MeOH (100:1) thu được este (*S*)-MTPA của **WC1** (**1a**, 1,2 mg). Số liệu phổ xem mục 2.4.2.1

- Điều chế ester (*R*) - MTPA của **WC1**: Ester (*R*) - MTPA của **WC1** (**1b**, 1,5 mg) được điều chế bằng (*S*) - MTPA clorua với các bước tương tự như trên. Số liệu phổ xem mục 2.4.2.1

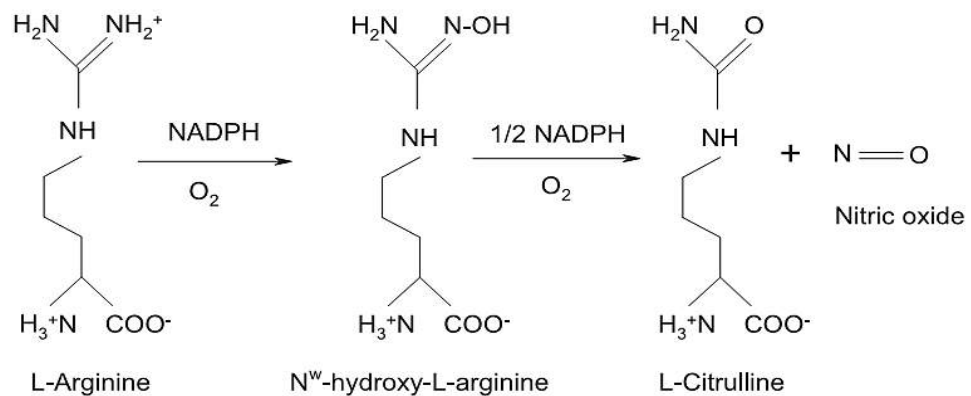
2.2.3. Phương pháp đánh giá hoạt tính sinh học

2.2.3.1. Phương pháp đánh giá hoạt tính kháng viêm

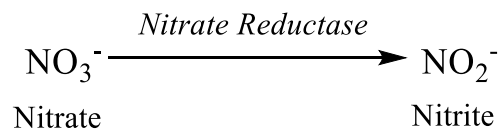
Nguyên tắc:

Hoạt tính kháng viêm được đánh giá qua tác dụng ức chế sản sinh gốc tự do nitric oxide ($\cdot\text{NO}$). Gốc tự do $\cdot\text{NO}$ được sản sinh ở nhiều loại tế bào khác nhau. Dạng $\cdot\text{NO}$ xuất tiết có mặt ở các tế bào như đại thực bào, nguyên bào sợi hay tế bào gan thường được sản sinh với lượng lớn khi xuất hiện đáp ứng viêm [93].

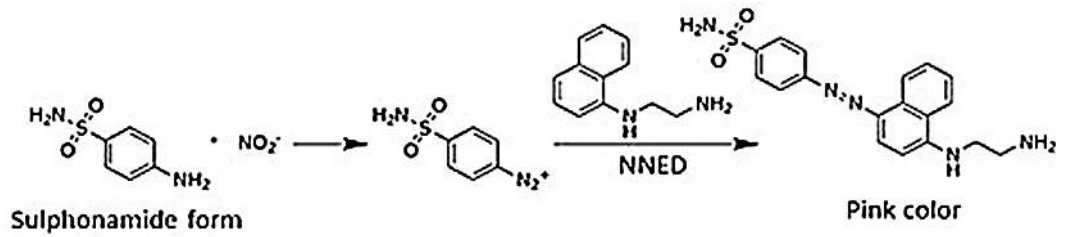
Các gốc tự do nitric oxide ($\cdot\text{NO}$) được sản xuất từ quá trình chuyển hóa L-Arginine thành L-citrulline, xúc tác bởi iNOS. Trong phản ứng, NADPH được sử dụng cung cấp electron và NOH-arginine được tạo ra như là một trung gian. NOS₂ (Nitric Oxide Synthase 2) sử dụng oxy và electron từ NADPH để oxy hóa các chất nền L-Arginine và trung gian OH-L-Arginine, mà sau đó được oxy hóa thành NO và L-Citrulline.



Các gốc tự do $\cdot\text{NO}$ có thời gian bán hủy rất ngắn ($t_{1/2} = 4$ giây), phản ứng với các phân tử khác nhau thường hình thành hoặc nitrate (NO_3^-) hoặc nitrite (NO_2^-). Một phương pháp được sử dụng để xác định gián tiếp $\cdot\text{NO}$ là đo màu các thành phần sản phẩm của nó và nitrite. Phản ứng này đòi hỏi nitrate (NO_3^-) đầu tiên được khử thành nitrite (NO_2^-).



Nitrite được phát hiện và phân tích thông qua phản ứng tạo phức màu hồng đỏ khi mẫu thử có chứa NO_2^- với thuốc thử Griess. Phương pháp này được thực hiện trên dòng tế bào đại thực bào RAW264.7.



Khi thêm acid sulphanilic, nitrite tạo thành muối diazonium, sau đó các thuốc nhuộm azo được thêm vào để tạo thành màu hồng.

Cách tiến hành:

Nuôi tế bào: Tế bào RAW264.7 nuôi cấy ở 37°C trong môi trường DMEM có bổ sung huyết thanh nhau thai bò 10% (FBS), 100 U/mL penicillin và 100 µg/mL streptomycin trong tủ nuôi cấy 5% CO₂ trong 24 giờ.

Sau đó chúng được nuôi cấy trong giếng phiên 96 với thể tích là 200 µL, mật độ 2 x 10⁴ tế bào/giếng. Ủ 30 phút ở 37°C, 5% CO₂.

Tế bào được kích thích với 2 µL LPS (0,1 mg/mL) với sự có mặt của các hợp chất thử ở nhiều nồng độ khác nhau, được pha sẵn trong DMSO. Ủ 30 phút ở 37°C, 5% CO₂.

Hút 100 µL dịch nổi của tế bào phản ứng với 100 µL thuốc thử Griess. NaNO₂ ở các nồng độ khác nhau được sử dụng để xây dựng đường chuẩn. Độ hấp thụ được đo ở 570 nm. Cardamonin được sử dụng làm mẫu đối chứng dương [94].

Giếng không được ủ mẫu mà chỉ sử dụng dung dịch pha mẫu, không cho LPS được coi là đối chứng âm. Phần tế bào còn lại sau khi đã sử dụng để đánh giá hoạt tính gây độc tế bào bằng phương pháp MTT [95].

Phần tế bào còn lại sau khi đã sử dụng để đánh giá hoạt tính ức chế sản sinh NO được bổ sung 20 µL dung dịch MTT (0,5 mg/mL pha trong PBS), ủ trong 4 giờ ở 37°C và 5% CO₂. Sau đó hút bỏ hết môi trường trên bề mặt, kết tủa formazan được hòa tan trong isopropanol. Độ hấp thụ được đo ở 570 nm.

Khả năng sống sót của tế bào CS% (% Cell Survival) được tính theo công thức:

$$CS\% = \left[\frac{OD(\text{mẫu thử}) - OD(\text{đối chứng trắng})}{OD(\text{DMSO}) - OD(\text{Đối chứng trắng})} \times 100 \right]$$

Hàm lượng nitrite của mẫu thí nghiệm được xác định nhờ vào đường chuẩn NaNO₂ và được so sánh % với mẫu đối chứng âm (LPS). Khả năng ức chế sản sinh NO được xác định theo công thức:

$$\% \text{ Ức chế} = \frac{([\text{Xtb}](\text{mẫu thử}) - [\text{Xtb}]_{\text{LPS}})}{[\text{Xtb}]_{\text{Control}} - [\text{Xtb}]_{\text{LPS}}} \times 100\%$$

[Xtb] : nồng độ NO trung bình, được tính toán dựa vào đường chuẩn NaNO₂

Phương pháp xử lý số liệu:

Các thí nghiệm đánh giá sàng lọc hoạt tính ức chế sản sinh NO của các chất sạch phân lập được được thực hiện lặp ít nhất 3 lần và lấy giá trị trung bình. Phân tích số liệu, xây dựng đồ thị và tính toán giá trị IC₅₀ được xác định theo phương pháp hồi quy không tuyến tính trên phần mềm Graphpad Prism 6.0.

2.2.3.2. Phương pháp đánh giá ức chế α -glucosidase

Hoạt tính ức chế α -glucosidase được thực hiện dựa trên phản ứng thủy phân 4-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside (pNPG) thành đường glucose và *p*-nitrophenol, hợp chất có màu vàng, dưới xúc tác của enzyme α -glucosidase. Khi mẫu thử có hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase, sự tạo thành hợp chất *p*-nitrophenol sẽ giảm, do vậy mật độ quang (OD) của *p*-nitrophenol so với mẫu đối chứng, không bị ức chế sẽ giảm theo. Mật độ quang (OD) của *p*-nitrophenol sinh ra sau phản ứng được đo ở bước sóng 405nm và được dùng để đánh giá hoạt động ức chế enzyme của mẫu thử.

Công thức:

$$\% \text{ Ức chế} = \frac{(\text{OD}_{c+} - \text{OD}_{c-}) - (\text{OD}_s - \text{OD}_b)}{\text{OD}_{c+} - \text{OD}_{c-}} \times 100$$

- OD_{c+}: Mật độ quang trung bình của mẫu chứng dương (không có mẫu thử, có α -glucosidase)

- OD_{c-}: Mật độ quang trung bình của mẫu chứng âm (không có mẫu thử và α -glucosidase)

- OD_s: Mật độ quang trung bình của mẫu thử

- OD_b: Mật độ quang trung bình của mẫu trắng (có mẫu thử, không có α -glucosidase).

- Nồng độ ức chế 50%, IC₅₀ được xây dựng trên 5 nồng độ thử nghiệm. Giá trị IC₅₀ được xác định theo phương pháp hồi quy tuyến tính trên phần mềm Graphpad Prism 6.0.

- Phép thử được thực hiện cụ thể như sau:

Trong mỗi giếng nghiên cứu chứa: 50 μL mẫu thử và 100 μL dung dịch enzyme α -glucosidase được ủ 25°C trong 5 phút, tiếp tục bổ sung 50 μL 4-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside (p NPG), đo trên máy ELISA ở bước sóng 405 nm [96]. Chất đối chứng dương acarbose được dùng để kiểm soát độ ổn định và đánh giá hoạt tính ức chế tương đương. Các phép thử được lặp lại 3 lần [96].

2.2.3.3. Phương pháp đánh giá hoạt tính ức chế α -amylase

Nguyên tắc: Hoạt tính ức chế enzyme α -amylase được thực hiện dựa vào phản ứng thủy phân tinh bột khoai tây trong nước với sự có mặt của enzyme α -amylase. Dung dịch tinh bột hòa tan dưới xúc tác của enzyme α -amylase tạo ra một phản ứng có màu xanh đặc trưng do phức hợp giữa tinh bột và iodine, đo độ giảm màu ở bước sóng 650 nm để đánh giá hoạt tính ức chế enzyme của mẫu nghiên cứu.

Cách tiến hành: Đun sôi 100 mg tinh bột khoai tây trong 5 mL đệm phosphate ($\text{P}_\text{H} = 7$) trong 5 phút, sau đó làm nguội về nhiệt độ phòng. Tiếp đó mẫu thử (20 μL) và tinh bột (50 μL) được trộn lẫn với 30 μL đệm phosphate 0,1 M ($\text{P}_\text{H} = 7$). Sau 5 phút thêm vào 2 mL dung dịch α -amylase 5 mg/mL. Hỗn hợp phản ứng sau đó được ủ ở 37°C trong vòng 15 phút. Phản ứng kết thúc bằng việc thêm 50 μL HCl 1 M và 50 μL dung dịch iốt. Đo độ hấp thụ quang của dung dịch sau phản ứng ở bước sóng 650 nm và tính % ức chế [97].

Công thức:

$$\% \text{ Ức chế} = \frac{(\text{OD}_{\text{c}+} - \text{OD}_{\text{c}-}) - (\text{OD}_{\text{s}} - \text{OD}_{\text{b}})}{\text{OD}_{\text{c}+} - \text{OD}_{\text{c}-}} \times 100$$

- $\text{OD}_{\text{c}+}$: Mật độ quang trung bình của mẫu chứng dương (không có mẫu thử, có α -amylase)

- $\text{OD}_{\text{c}-}$: Mật độ quang trung bình của mẫu chứng âm (không có mẫu thử và α -amylase)

- OD_{s} : Mật độ quang trung bình của mẫu thử

- OD_{b} : Mật độ quang trung bình của mẫu trắng (có mẫu thử, không có α -amylase).

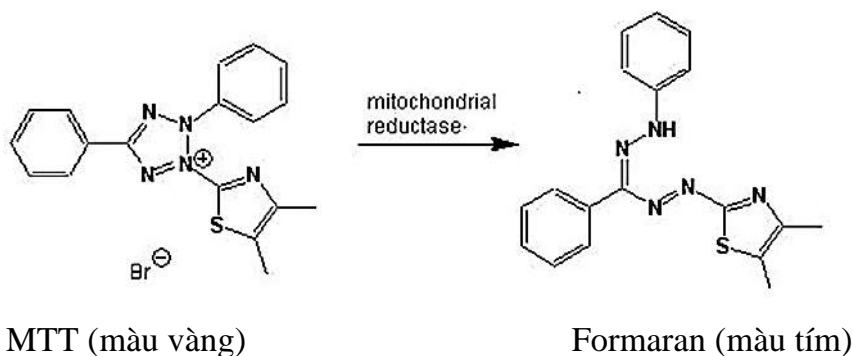
2.2.3.4. Phương pháp đánh giá hoạt tính gây độc tế bào

- Dòng tế bào thử nghiệm: Hoạt tính gây độc tế bào được thử nghiệm trên 4 dòng tế bào ung thư ở người bao gồm: ung thư phổi (A-549), ung thư gan (Hep3B),

ung thư vú (MCF-7), ung thư tuyến tiền liệt (PC3). Các dòng tế bào ung thư được cung cấp bởi GS. Jeong-Hyung Lee, trường ĐHQG Kangwon, Hàn Quốc. Tế bào ung thư được nuôi cấy *in vitro* theo phương pháp Mosmann [98].

- Phương pháp thử độc tế bào: Sử dụng phương pháp MTT

Đây là một phương pháp so màu, đo độ suy giảm màu của MTT để đánh giá khả năng sống sót của tế bào. Ở tế bào sống, MTT tham gia phản ứng oxi hóa khử với ty thể của tế bào và tạo thành các formazan dạng tinh thể. Do vậy, tỉ lệ tế bào sống sót được suy ra từ lượng formazan tạo thành từ MTT. Lượng formazan tạo thành được hoà tan bởi dung môi hữu cơ (DMSO, isopropanol) và đo độ hấp thụ ở bước sóng 570 nm. Khả năng gây độc tế bào được suy ra từ việc đánh giá khả năng sống sót của tế bào [95].



- Phép thử được tiến hành cụ thể như sau:

+ Chất thử (20 μ L) được đưa vào các giếng của khay 96 giếng để có nồng độ độ 100 μ M; 30 μ M, 10 μ M.

+ Tế bào được nuôi cấy 48 giờ trong môi trường RPMI 1640 hoặc DMEM ở 37°C, 5% CO₂ với 10% FBS, penicillin (100 unit/mL) và streptomycin sulphate (100 μ g/mL). Sau khi điều chỉnh để có mật độ phù hợp (trong khoảng 2-5 x10⁵ tế bào/giếng). Hút 180 μ L tế bào vào các giếng của khay 96 giếng đã có chất thử. Trên cùng một đĩa thử, bố trí một số giếng để làm đối chứng không có mẫu thử, chỉ có dung môi pha mẫu DMSO 10%.

+ Sau 48h, cho phản ứng với 0,5 mg/mL MTT ở điều kiện 37°C và 5% CO₂ trong 4 giờ. Sau đó hút bỏ hết môi trường trên bề mặt, kết tủa formazan được hòa tan trong isopropanol.

+ Độ hấp thụ được đo ở 570 nm.

+ Camptothecin được sử dụng làm đối chứng dương.

Khả năng sống sót của tế bào CS% (% Cell Survival) được tính theo công thức:

$$\% \text{ sống sót} = \left[\frac{\text{OD (mẫu thử)} - \text{OD (đối chứng trắng)}}{\text{OD (DMSO)} - \text{OD (đối chứng trắng)}} \times 100 \right]$$

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

OD: giá trị mật độ quang

DMSO10% được sử dụng như đối chứng âm.

Giá trị IC₅₀ được xác định theo phương pháp hồi quy không tuyến tính trên phần mềm Graphpad Prism 6.0.

Các phép thử hoạt tính sinh học được thực hiện tại Viện hóa sinh biển – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

2.3. Thực nghiệm

2.3.1. Phân lập các hợp chất từ Sài đất ba thùy (*W. trilobata*)

Phần thân và lá của Sài đất ba thùy (*W. trilobata*) sau khi thu hoạch được rửa sạch, phơi khô và nghiền nhỏ thu được 2,4 kg. Sau đó tiến hành chiết mẫu trong dung môi methanol (5L x 3 lần) bằng thiết bị chiết siêu âm (50°C, mỗi lần 3 giờ) để thu cao chiết methanol (300 g). Từ cao chiết methanol thu được, tiến hành chiết phân đoạn trong dung môi *n*-hexane và nước theo tỷ lệ 1:1 (v/v), dịch chiết *n*-hexane thu được cô quay dưới áp suất giảm chân không thu được cao *n*-hexane (101,8 g) và lớp nước. Từ lớp nước, tiếp tục tiến hành chiết phân lớp với dung môi ethyl acetate, sau đó cô quay dưới áp suất giảm chân không thu được cao chiết ethyl acetate (15,1 g) và dịch nước. Dịch nước được cho chạy qua cột Diaion (HP-20) để loại bỏ muối và đường tự do rồi rửa giải bằng methanol/nước theo tỉ lệ 0/1 – 1/0 (v/v) thu được 3 phân đoạn kí hiệu WTW1-WTW3.

Từ cao ethyl acetate được hòa tan với một lượng tối thiểu dung môi sau đó tẩm với silica gel, cất quay cho đến khi bột tơi khô. Tiến hành phân tách cột này với hệ dung môi gradient dichloromethane/methanol với độ phân cực tăng dần (D/M 50:1 – 0:1, v/v)) thu được 6 phân đoạn kí hiệu WT2.1-WT2.6. Từ phân đoạn WT2.1 tiến hành phân tách bằng cột pha thường với hệ dung môi rửa giải dichloromethane/acetone 6/1 (v/v) thu được phân đoạn WT3.2. Tinh chế lại WT3.2 trên cột silica gel pha thường sử dụng hệ dung môi rửa giải dichloromethane/ethyl acetate theo tỉ lệ 3/1 (v/v) thu được chất sạch **WT4** (10 mg). Từ WT2.3 chạy cột pha

thường với hệ rửa giải dichloromethane/methanol/nước 5/1/0,1 (v/v/v), thu được phân đoạn WT4.3. Tiếp tục phân tách WT4.3 trên cột sắc ký pha thường rửa giải bằng hệ dung môi dichloromethane/ethyl acetate/methanol 4/2/1 (v/v/v) thu được phân đoạn WT 5.6. Tinh chế lại WT5.6 trên cột Sephadex LH 20 sử dụng hệ dung môi rửa giải methanol/nước 1/1 (v/v) thu được chất sạch **WT1** (40 mg) và **WT5** (14 mg). Từ phân đoạn WT2.5 tiến hành phân tách trên cột Sephadex LH 20 sử dụng hệ dung môi rửa giải methanol/nước 1/1 (v/v) thu được phân đoạn WT9.1. Tinh chế lại WT 9.1 trên cột sắc ký pha đảo sử dụng hệ dung môi rửa giải methanol/nước 1/1 (v/v), thu được chất sạch **WT6** (15 mg).

Tiến hành sắc ký cột với phân đoạn WTW3 sử dụng dung môi rửa giải gradient dichloromethane/methanol 100/1 – 0/100 (v/v) thu được 6 phân đoạn kí hiệu WT1.1 – WT1.6. Từ phân đoạn WT1.5 được phân tách trên cột sắc ký silica gel pha thường với hệ dung môi ethyl acetate/methanol/nước 5/1/0,1 (v/v/v) thu được phân đoạn WT14.3. Tiếp tục phân tách WT14.3 trên cột Sephadex LH 20 với hệ dung môi rửa giải methanol/nước 1/3 (v/v) thu được 2 phân đoạn WT16.5 và WT16.6. Tinh chế lại WT16.5 trên cột sắc ký pha thường với hệ dung môi ethyl acetate/methanol/nước 4/1/0,1 (v/v/v) thu được **WT2** (16,9 mg). Hợp chất **WT8** (13 mg) thu được khi tinh chế lại WT16.6 trên cột pha đảo rửa giải bằng hệ dung môi methanol/nước 1/2 (v/v). Phân đoạn WT1.4 được chạy qua cột sắc ký silica gel pha thường thu được WT1.7 khi rửa giải bằng hệ dung môi ethyl acetate/methanol/nước 5/1/0,1 (v/v/v). Phân tách lại WT1.7 qua cột pha đảo sử dụng dung môi rửa giải methanol/nước 1/1 (v/v) thu được hai phân đoạn WT1.12 và WT1.11. Phân đoạn WT1.11 tiếp tục được phân tách qua cột silica gel pha thường, rửa giải bằng hệ dung môi dichloromethane/methanol/nước 7/1/0,1 (v/v/v) thu được WT17.4. Từ phân đoạn WT17.4 chạy qua cột sắc ký pha đảo với hệ rửa giải methanol/nước 1/1,5 thu được chất sạch **WT7** (5 mg). Từ phân đoạn WT1.12 chạy cột sắc ký pha thường hệ ethyl acetate/methanol/nước 8/1/0,1 (v/v/v) được phân đoạn WT 14.7. Phân đoạn WT14.7 được tinh chế lại trên cột sắc ký pha thường, sử dụng hệ dung môi rửa giải dichloromethane/methanol/nước 7/1/0,1 (v/v/v) thu được chất sạch **WT3** (22 mg).

2.3.2. Phân lập các hợp chất từ mẫu Sài đất (*W. chinensis*)

Phân thân, lá của Sài đất (*W. chinensis*) sau khi thu hoạch được rửa sạch, phơi khô và nghiền nhỏ thu được 1,4 kg. Sau đó tiến hành chiết mẫu trong dung môi methanol (3 lần x 4L) bằng thiết bị chiết siêu âm (50°C, mỗi lần 3 giờ) để thu cao chiết methanol (160 g). Từ cao chiết methanol thu được, tiến hành chiết phân đoạn trong dung môi *n*-hexane và nước theo tỷ lệ 1:1 (v/v), dịch chiết *n*-hexane thu được cô quay dưới áp suất giảm thu được cặn *n*-hexane và lớp nước. Từ lớp nước, tiếp tục tiến hành chiết phân lớp với dung môi ethyl acetate, sau đó cô quay dưới áp suất giảm chân không thu được cặn chiết ethyl acetate (16,26 g) và dịch nước. Dịch nước được cho chạy qua cột Diaion (HP-20) để loại bỏ tạp chất rồi rửa giải bằng methanol/nước theo tỉ lệ 0/1 – 1/0 (v/v) thu được 3 phân đoạn kí hiệu WCW1-WCW3.

Tiến hành sắc ký cột với phân đoạn WCW2 sử dụng dung môi rửa giải gradient dichloromethane/methanol (100/1 – 1/100, (v/v)) thu được 6 phân đoạn kí hiệu WC2.1 – WC2.6. Từ phân đoạn WC2.3 được phân tách qua cột Sephadex LH 20 rửa giải bằng hệ dung môi methanol/nước 1/1 (v/v) thu được phân đoạn WC3.1. Tiếp tục phân tách WC3.1 trên cột sắc ký silica gel pha thường với hệ dung môi dichloromethane/methanol 9/1 (v/v) thu được hai phân đoạn WC8.4 và WC8.7. Tinh chế lại WC8.4 trên cột sắc ký silica gel pha thường với hệ dung môi dichloromethane/acetone 1,2/1 (v/v) thu được hợp chất **WC2** (222 mg). Hai hợp chất **WC3** (12,5 mg) và **WC5** (48,9 mg) thu được khi tinh chế lại WC8.7 qua cột sắc ký pha đảo sử dụng hệ dung môi rửa giải methanol/nước 1/1 (v/v). Phân đoạn WC2.4 được phân tách trên cột sắc ký silica gel pha thường với hệ dung môi dichloromethane/methanol 5/1 (v/v) thu được hai phân đoạn WC4.3 và WC4.4. Từ phân đoạn WC4.3 khi cho chạy qua cột sắc ký pha đảo sử dụng hệ dung môi rửa giải methanol/nước 1/1 (v/v) thu được phân đoạn WC4.5. Tinh chế lại WC4.5 qua cột sắc ký silica gel pha thường với hệ dung môi dichloromethane/methanol/nước 4/1/0,1 (v/v/v) thu được hợp chất sạch **WC1** (20 mg). Phân đoạn WC4.4 được chạy lại trên cột sắc ký silica gel pha thường với hệ dung môi hexane/dichloromethane/methanol 1/1/1 (v/v/v) thu được hợp chất **WC6** (22 mg) và phân đoạn WC4.7. Phân đoạn này tiếp tục được phân tách lại qua cột sắc ký silica gel pha thường với hệ dung môi ethyl acetate/methanol 6/1 (v/v) thu được hợp chất **WC7** (15 mg). Phân tách phân đoạn WC2.5 trên cột sephadex LH 20 với hệ dung môi rửa giải methanol/nước 1/2 (v/v)

thu được phân đoạn WC5.1. Phân đoạn này tiếp tục được chạy qua cột sắc ký silica gel pha thường với hệ dung môi rửa giải dichloromethane/methanol 3/1 (v/v) thu được hai phân đoạn WC5.4 và WC5.6. Hợp chất **WC4** (98 mg) thu được khi tinh chế lại WC5.4 trên cột sắc ký silica gel pha thường với hệ dung môi ethyl acetate/methanol 6/1 (v/v). Phân tách WC5.6 trên cột sắc ký pha đảo sử dụng hệ dung môi rửa giải methanol/nước 1/5 (v/v) thu được hợp chất sạch **WC10** (24,4 mg).

Từ cặn ethyl acetate được hòa tan với một lượng tối thiểu dung môi sau đó tẩm với silica gel, cất quay cho đến khi bột tơi khô. Tiến hành phân tách cột này với hệ dung môi gradient hexane/acetone với độ phân cực tăng dần 100:0 – 0:100 (v/v) thu được 6 phân đoạn kí hiệu WC12.1-WC12.6. Từ phân đoạn WC12.3 tiến hành phân tách bằng cột pha thường hệ với hệ dung môi rửa giải dichloromethane/ethyl acetate 6/1 (v/v) thu được hợp chất **WC8** (9,7 mg) và phân đoạn WC13.6. Tinh chế lại WC13.6 trên cột pha đảo sử dụng hệ dung môi rửa giải acetone/nước 2/1 (v/v) thu được hai hợp chất sạch **WC11** (11,2 mg) và **WC12** (15,4 mg). Từ WC12.6 chạy cột sắc ký silica gel pha thường với hệ rửa giải hexane/acetone 1/1 (v/v), thu được phân đoạn WC15.3. Tiếp tục phân tách WC15.3 trên cột sắc ký pha đảo sử dụng hệ dung môi rửa giải acetone/nước 1/1 (v/v), thu được chất sạch **WC9** (35,3 mg).

2.4. Thông số vật lý và dữ liệu phổ của các hợp chất phân lập

2.4.1. Thông số vật lý và dữ liệu phổ của các hợp chất phân lập được từ Sài đất ba thùy (*W. trilobata*)

2.4.1.1. Hợp chất **WT1**: Wedtriloside A (chất mới)

Chất bột màu trắng;

Độ quay cực $[\alpha]_D^{24}$: - 61,6 (c 0,15, MeOH);

Phổ IR ν_{\max} (KBr): 3423, 2941, 2865, 1727, 1630, 1461, 1381, 1319, 1250, 1224, 1080, và 992 cm^{-1} ;

Phổ HR-ESI-MS m/z 541,2659 $[\text{M}+\text{HCOO}]^-$ (Tính toán lý thuyết cho công thức phân tử $\text{C}_{27}\text{H}_{41}\text{O}_{11}$, $M = 541,2654$); m/z 531,2367 $[\text{M}+\text{Cl}]^-$ (Tính toán lý thuyết cho công thức phân tử $\text{C}_{26}\text{H}_{40}\text{O}_9\text{Cl}$, $M = 531,2366$);

Số liệu phổ ^1H NMR (CD_3OD , 500 MHz) và ^{13}C NMR (CD_3OD , 125 MHz) xem bảng 3.1.

2.4.1.2. Hợp chất **WT2**: Wedtriloside B (chất mới)

Chất bột màu trắng;

Độ quay cực $[\alpha]_D^{24}$: - 37 (c 0,10, MeOH);

Phổ IR ν_{\max} (KBr): 3379, 2926, 2862, 1721, 1632, 1458, 1378, 1248, 1227, 1065, 1030, 986, 884, and 767 cm^{-1} .

Phổ HR-ESI-MS m/z 575,2190 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (Tính toán lý thuyết cho công thức phân tử $\text{C}_{26}\text{H}_{39}\text{O}_{12}\text{S}$, $M = 575,2192$).

Số liệu phổ ^1H NMR (CD_3OD , 500 MHz) và ^{13}C NMR (CD_3OD , 125 MHz) xem bảng 3.2.

2.4.1.3. Hợp chất **WT3**: Paniculoside-IV

Chất bột màu trắng;

Độ quay cực $[\alpha]_D^{24}$: - 77,2 (c 0,2, MeOH);

Phổ ESI-MS m/z 499 $[\text{M}+\text{H}]^+$;

Số liệu phổ ^1H NMR (CD_3OD , 500 MHz) và ^{13}C NMR (CD_3OD , 125 MHz) xem bảng 3.3.

2.4.1.4. Hợp chất **WT4**: Apigenin

Chất bột màu vàng;

Điểm nóng chảy mp: 347-348 $^\circ\text{C}$;

Phổ ESI-MS m/z 271 $[\text{M}+\text{H}]^+$

Số liệu phổ ^1H NMR (CD_3OD , 500 MHz) và ^{13}C NMR (CD_3OD , 125 MHz) xem bảng 3.4.

2.4.1.5. Hợp chất WT5: Apigenin 7-O- β -D-glucopyranoside

Chất bột màu vàng;

Phổ ESI-MS m/z 433 $[\text{M}+\text{H}]^+$;

Số liệu phổ ^1H NMR ($\text{DMSO-}d_6$, 500 MHz) và ^{13}C NMR ($\text{DMSO-}d_6$, 125 MHz) xem bảng 3.5.

2.4.1.6. Hợp chất WT6: 3-O-[β -D-glucopyranosyl(1-4)- β -D-glucuronopyranosyl] oleanolic acid 28-O- β -D-glucopyranosyl ester

Chất bột màu trắng;

Phổ ESI-MS m/z 979 $[\text{M}+\text{Na}]^+$;

Số liệu phổ ^1H NMR ($\text{DMSO-}d_6$, 500 MHz) và ^{13}C NMR ($\text{DMSO-}d_6$, 125 MHz) xem bảng 3.6.

2.4.1.7. Hợp chất WT7: 4', 4,6-trihydroxyaurone

Chất bột màu trắng;

Phổ ESI-MS m/z 271 $[\text{M}+\text{H}]^+$;

Số liệu phổ ^1H NMR (CD_3OD , 500 MHz) và ^{13}C NMR (CD_3OD , 125 MHz) xem bảng 3.7.

2.4.1.8. Hợp chất WT8: Caffeic acid

Chất bột màu trắng;

Phổ ESI-MS m/z 181 $[\text{M}+\text{H}]^+$;

Số liệu phổ ^1H NMR (CD_3OD , 500 MHz) và ^{13}C NMR (CD_3OD , 125 MHz) xem bảng 3.8

2.4.2. Thông số vật lý và dữ liệu phổ của các hợp chất phân lập được từ Sài đất (*W. chinensis*)

2.4.2.1. Hợp chất WC1: Wednenic (Hợp chất mới)

Chất bột màu trắng;

Độ quay cực $[\alpha]_D^{24}$: - 26,5 (c 0,25, MeOH);

Phổ IR ν_{max} (KBr) 3395, 2968, 2930, 1648, 1580, 1511, 1372, 1226, 1163, 1075, và 1040 cm^{-1} ;

Phổ HR-ESI-MS m/z 345,0987 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (Tính toán lý thuyết cho công thức $\text{C}_{13}\text{H}_{23}\text{NaO}_7\text{S}$, $M = 345,0984$); m/z 367,0801 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (Tính toán lý thuyết cho

công thức $C_{13}H_{22}O_7Na_2S$, $M = 367,0803$); m/z 225,1482 [$M - HSO_4Na + H$]⁺ (Tính toán lý thuyết cho công thức $C_{13}H_{22}O_3$, $M = 225,1490$);

Số liệu phổ 1H NMR (CD_3OD , 500 MHz) và ^{13}C NMR (CD_3OD , 125 MHz) xem bảng 3.9.

Hợp chất (S)-MTPA của WCI (1a)

1H NMR (CD_3OD , 500 MHz): δ_H 7,613 – 7,421 (10H, overlap, proton thom), 3,630 (3H, s, OCH_3), 1,501 (1H, dd, $J = 3,5, 12,5$ Hz, H_{a-2}), 1,859 (1H, t, $J = 12,5$ Hz, H_{b-2}), 4,693 (1H, dt, $J = 3,5, 12,5$ Hz, H-3), 5,767 (1H, d, $J = 3,5$ Hz, H-4), 6,418 (1H, dd, $J = 1,0, 16,5$ Hz, H-7), 5,901 (1H, dd, $J = 6,0, 16,5$ Hz, H-8), 5,983 (1H, dd, $J = 6,0, 12,5$ Hz, H-9), 1,431 (3H, d, $J = 6,0$ Hz, H-10), 1,202 (3H, s, H-11), 1,050 (3H, s, H-12), 1,315 (3H, s, H-13).

Hợp chất (R)-MTPA của WCI (1b):

1H NMR (CD_3OD , 500 MHz): δ_H 7,613-7,401 (10H, overlap, proton thom), 3,58 (3H, s, OCH_3), 1,516 (1H, dd, $J = 3,5, 12,5$ Hz, H_{a-2}), 1,878 (1H, t, $J = 12,5$ Hz, H_{b-2}), 4,676 (1H, dt, $J = 3,5, 12,5$ Hz, H-3), 5,767 (1H, d, $J = 3,5$ Hz, H-4), 6,395 (1H, dd, $J = 1,0, 16,5$ Hz, H-7), 5,846 (1H, dd, $J = 6,0, 16,5$ Hz, H-8), 5,982 (1H, dd, $J = 6,0, 12,5$ Hz, H-9), 1,463 (3H, d, $J = 6,0$ Hz, H-10), 1,174 (3H, s, H-11), 1,014 (3H, s, H-12), 1,328 (3H, s, H-13).

2.4.2.2. Hợp chất WC2: Cleroindicin E

Chất dầu không màu;

ESI-MS m/z 159 [$M+H$]⁺, 141 [$M - H_2O + H$]⁺, và 123 [$M - 2H_2O + H$]⁺;

$[\alpha]_D^{23}$: + 1.15 (c 0,011, MeOH);

Số liệu phổ 1H NMR (CD_3OD , 500 MHz) và ^{13}C NMR (CD_3OD , 125 MHz) xem bảng 3.10.

2.4.2.3. Hợp chất WC3: Wednenol (Hợp chất mới)

Chất dầu không màu;

$[\alpha]_D^{24}$: - 47.2 (c 0,22, MeOH);

Phổ IR ν_{max} (KBr): 3341, 2950, 1455, 1270, 1168, và 920 cm^{-1} ;

Phổ HR-ESI-MS m/z 185,1170 [$M + H$]⁺ (Tính toán lý thuyết cho công thức phân tử $C_{10}H_{17}O_3$, $M = 185,1177$);

Số liệu phổ 1H NMR (CD_3OD , 500 MHz) và ^{13}C NMR (CD_3OD , 125 MHz) xem bảng 3.11.

2.4.2.4. Hợp chất **WC4**: *Cornoside*

Chất bột màu nâu;

Độ quay cực $[\alpha]_D^{24}$: - 19,5 (c 0,11, MeOH);

Phổ khối lượng ESI-MS m/z 317 $[M+H]^+$

Số liệu phổ 1H NMR (CD_3OD , 500 MHz) và ^{13}C NMR (CD_3OD , 125 MHz)

xem bảng 3.12.

2.4.2.5. Hợp chất **WC5**: *Rengyol*

Chất rắn, màu trắng;

Số liệu phổ 1H NMR (CD_3OD , 500 MHz) và ^{13}C NMR (CD_3OD , 125 MHz)

xem bảng 3.13.

2.4.2.6. Hợp chất **WC6**: *Kaempferol-3-O- β -D-glucopyranoside*

Chất bột, màu vàng;

Phổ ESI-MS m/z 449 $[M+H]^+$;

Số liệu phổ 1H NMR (CD_3OD , 500 MHz) và ^{13}C NMR (CD_3OD , 125 MHz)

xem bảng 3.14.

2.4.2.7. Hợp chất **WC7**: *Quercetin-3-O- β -D-glucopyranoside*

Chất bột, màu vàng;

Phổ ESI-MS m/z 464 $[M+H]^+$;

Số liệu phổ 1H NMR (CD_3OD , 500 MHz) và ^{13}C NMR (CD_3OD , 125 MHz)

xem bảng 3.15.

2.4.2.8. Hợp chất **WC8**: *Luteolin*

Chất bột màu vàng;

ESI-MS m/z 287 $[M+H]^+$;

Số liệu phổ 1H NMR (500 MHz, $DMSO-d_6$) và ^{13}C NMR (125 MHz, $DMSO-$

d_6) xem bảng 3.16.

2.4.2.9. Hợp chất **WC9**: *Jaceosidin*

Chất bột màu vàng;

Phổ ESI-MS m/z 331 $[M+H]^+$;

Số liệu phổ 1H NMR ($DMSO-d_6$, 500 MHz) và ^{13}C NMR ($DMSO-d_6$, 125

MHz) xem bảng 3.17.

2.4.2.10. Hợp chất **WC10**: *1-O-benzyl- β -D-glucopyranosyl-2-sulfat*

Chất bột, màu trắng;

Phổ ESI-MS m/z 349 $[M-H]^-$

Độ quay cực $[\alpha]_D^{24}$: -36,0 (c 0,03, MeOH)

Số liệu phổ 1H NMR (CD_3OD , 500 MHz) và ^{13}C NMR (CD_3OD , 125 MHz) xem bảng 3.18.

2.4.2.11. Hợp chất **WC11**: 19-hydroxy-3-oxo-12-ursen-28-oic acid

Chất bột, màu trắng;

Độ quay cực $[\alpha]_D^{24}$: -50,0 (c 0,02, MeOH);

Phổ ESI-MS m/z 469 $[M-H]^-$, m/z 939 $[2M-H]^-$.

Số liệu phổ 1H NMR (CD_3OD , 500 MHz) và ^{13}C NMR (CD_3OD , 125 MHz) xem bảng 3.19.

2.4.2.12. Hợp chất **WC12**: ilexgenin B (*Pubescenolic acid*)

Chất bột, màu trắng;

Độ quay cực $[\alpha]_D^{24}$: +22,6 (c 0,01, CH_3Cl)

Phổ ESI-MS m/z 471 $[M-H]^-$

Số liệu phổ 1H NMR (CD_3OD , 500 MHz) và ^{13}C NMR (CD_3OD , 125 MHz) xem bảng 3.20.

2.5. Hoạt tính của các hợp chất phân lập loài *W. chinensis* và *W. trilobata*

2.5.1. Kết quả thử hoạt tính kháng viêm các hợp chất phân lập từ loài *W. chinensis* và *W. trilobata*

Các hợp chất phân lập **WC1-WC12** và **WT1-WT8** đã được thử nghiệm cho khả năng ức chế sản sinh NO trong các tế bào RAW264.7 được kích thích bằng LPS ở nồng độ 10, 30, và 100 μM được thực hiện như mục 2.2.3.1. Các hợp chất được đánh giá sơ bộ có khả năng ức chế > 50 % sự sản sinh ra NO trong tế bào RAW264.7 tiếp tục thử nghiệm ở các nồng độ khác nhau để xác định giá trị IC_{50} . Kết quả thử nghiệm được thể hiện ở bảng 3.21.

2.5.2. Kết quả thử hoạt tính ức chế α -amylase, α -glucosidase các hợp chất phân lập từ loài *W. trilobata* và *W. chinensis*

Các hợp chất **WT1-WT8**, **WC1-WC12** phân lập từ *W. trilobata* và *W. chinensis* được đánh giá hoạt tính ức chế α -amylase và α -glucosidase theo phương pháp mô tả ở 2.2.3.3 và 2.2.3.2. Kết quả được thể hiện trong bảng 3.22.

2.5.3. Hoạt tính ức chế gây độc tế bào của các hợp chất phân lập từ *W. chinensis* và *W. trilobata*

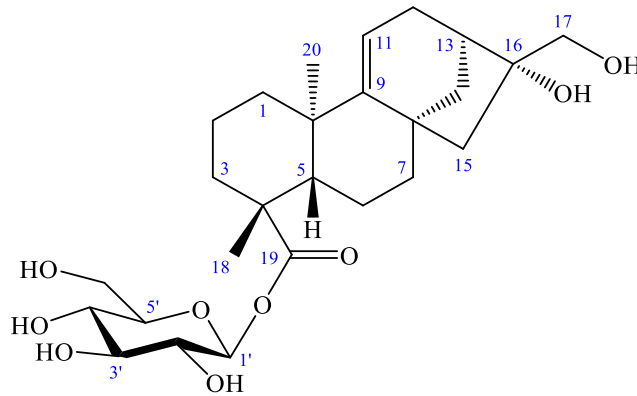
Các phép thử hoạt tính gây độc tế bào được thực hiện theo phương pháp được mô tả trong mục 2.2.3.4. Các hợp chất **WC1- WC12** phân lập từ *W. chinensis* và **WT1-WT8** phân lập từ *W. trilobata* được thử hoạt tính gây độc tế bào *in vitro* trên 4 dòng tế bào ung thư ở người: ung thư phổi (A-549), ung thư gan (Hep3B), ung thư vú (MCF-7), ung thư tuyến tiền liệt (PC3). Kết quả thử hoạt tính thể hiện ở bảng 3.23.

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

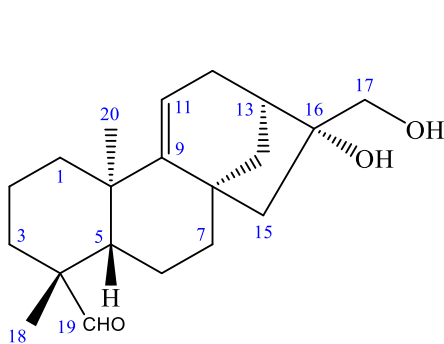
3.1. Xác định cấu trúc các hợp chất phân lập

3.1.1. Xác định cấu trúc các hợp chất phân lập từ Sài đất ba thùy (*W. trilobata*)

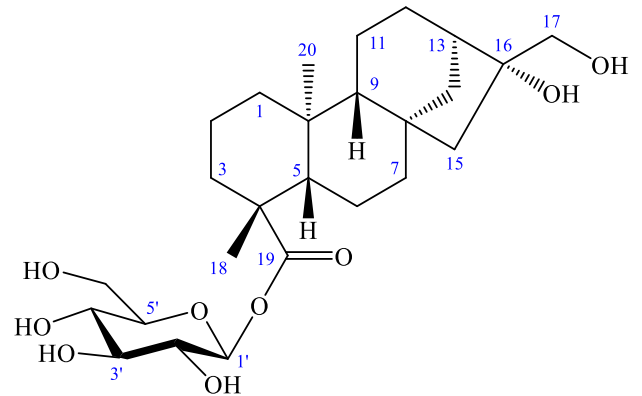
3.1.1.1. Hợp chất **WT1**: Wedtriloside A.



WT1



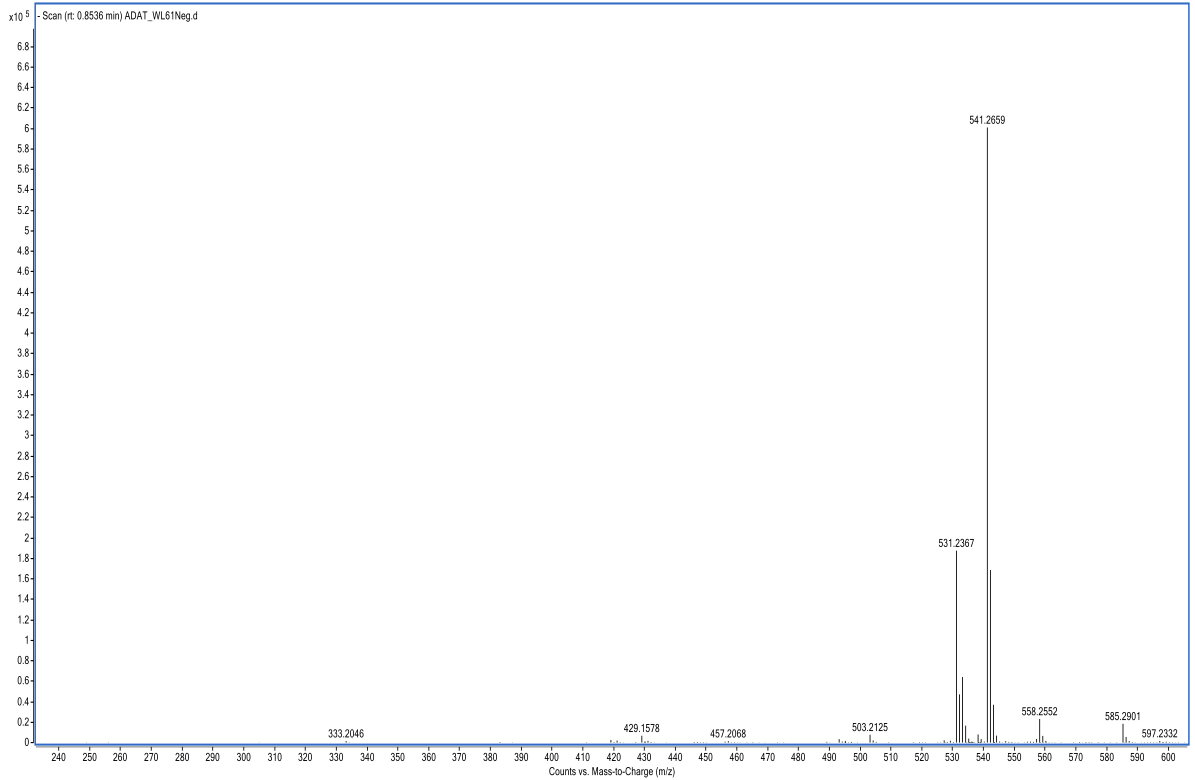
16 α ,17-dihydroxy-ent-9(11)-kaurene-19-al



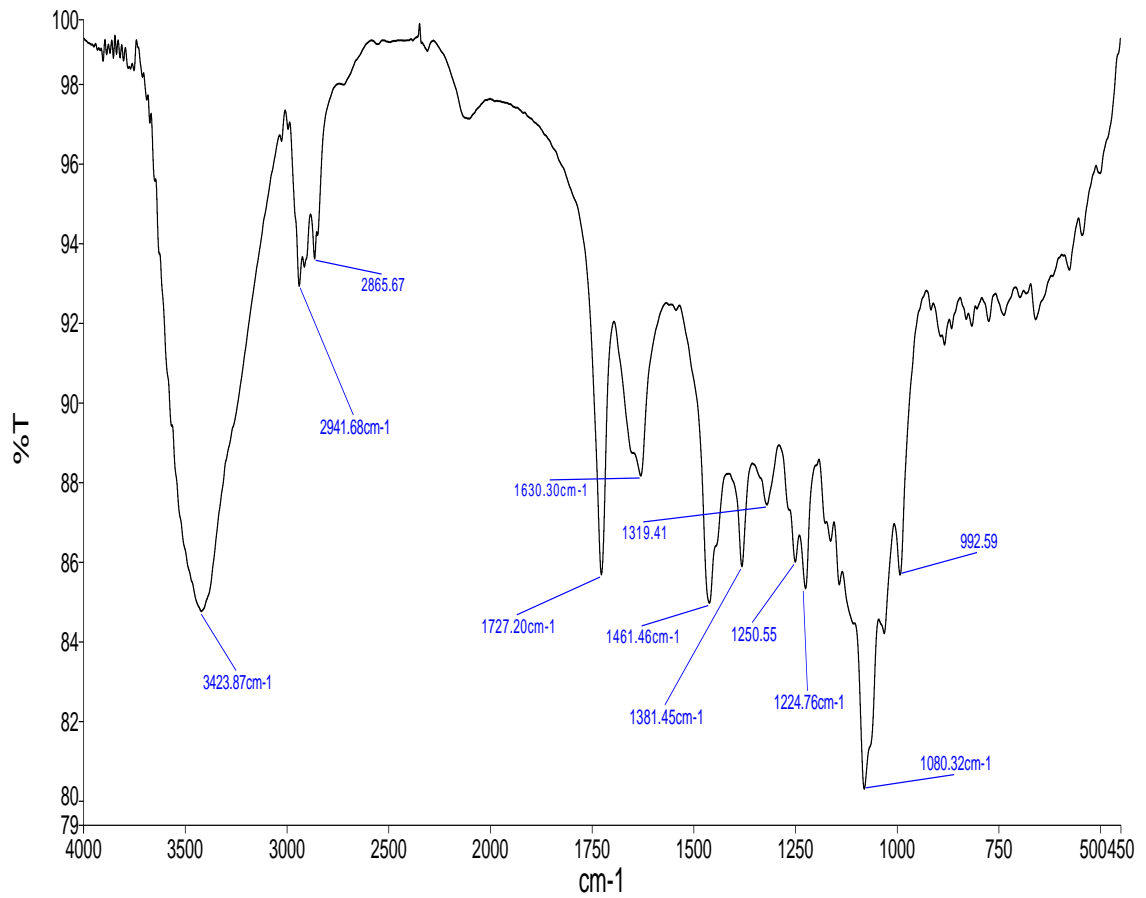
Paniculoside-IV

Hình 3.1. Cấu trúc hóa học của hợp chất **WT1** và các hợp chất tham khảo

Hợp chất **WT1** thu được dưới dạng chất bột màu trắng, độ quay cực là $[\alpha]_D^{24} - 61,6$ (c 0,15, MeOH). Trên phổ khối phân giải cao HR-ESI-MS của hợp chất **WT1** xuất hiện pic ion giả phân tử tại m/z 541,2659 $[M + HCOO]^-$ (tính toán lý thuyết cho công thức phân tử là $C_{27}H_{41}O_{11}$, $M = 541,2649$) cho phép xác định công thức phân tử của **WT1** là $C_{26}H_{40}O_9$.

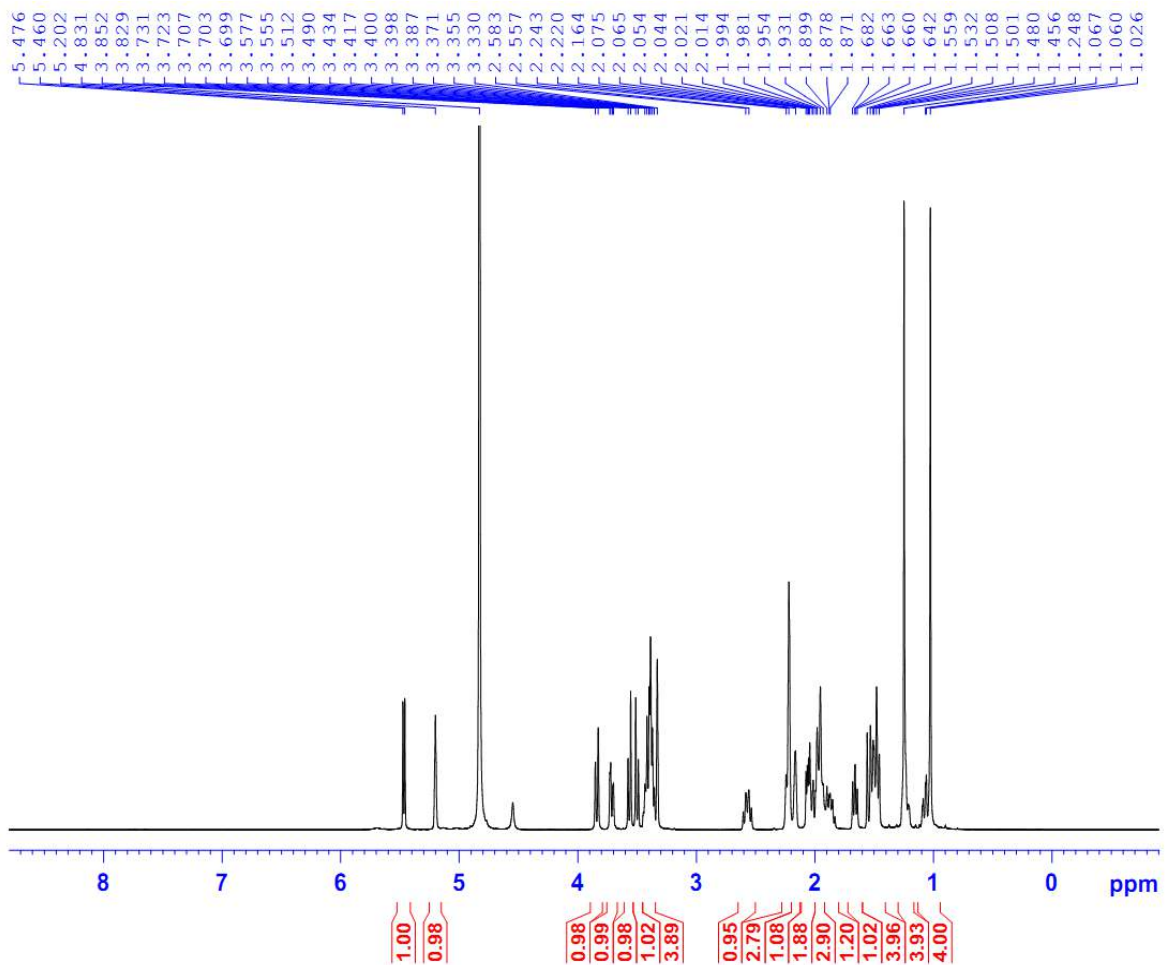


Hình 3.2. Phổ HR-ESI-MS của hợp chất **WT1**

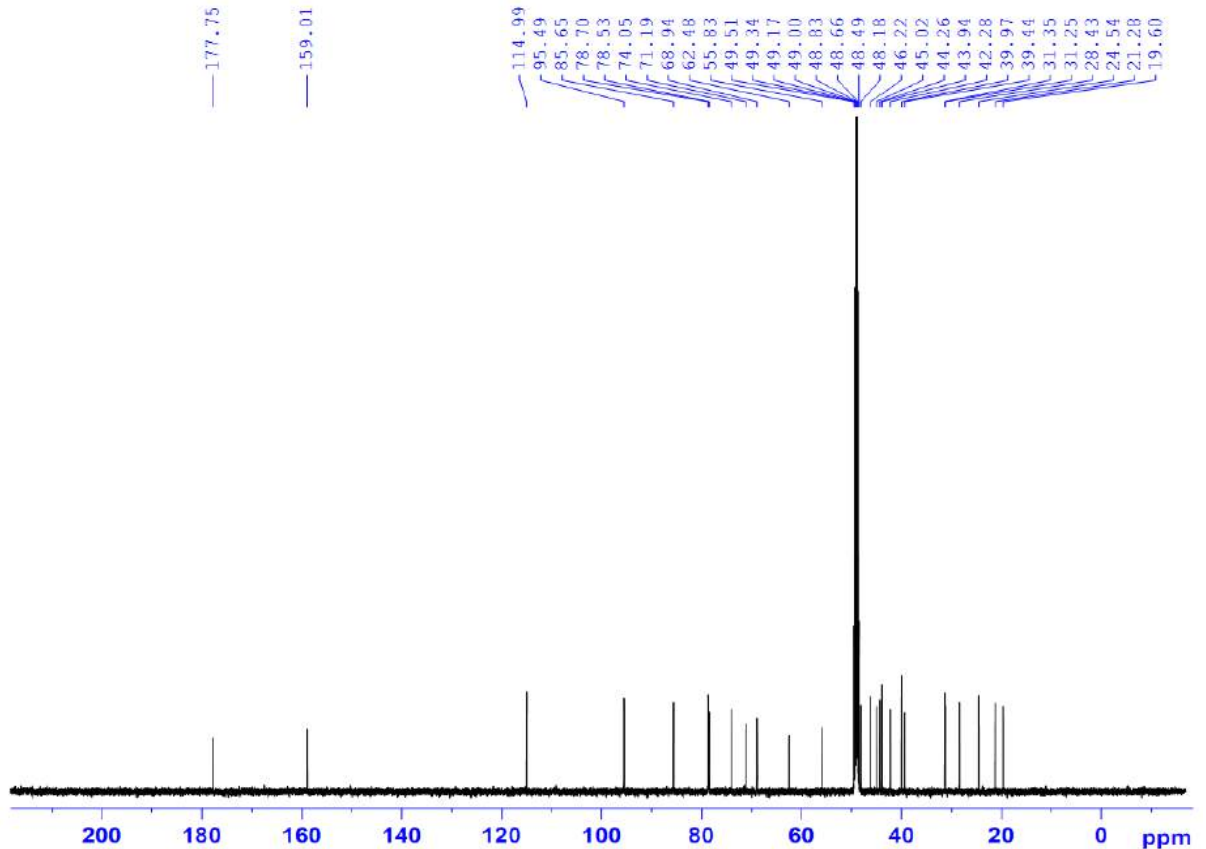


Hình 3.3. Phổ IR của hợp chất **WT1**

Trên phổ hồng ngoại của **WT1** cho thấy một liên kết đôi (1630 cm^{-1}), một nhóm carbonyl (1727 cm^{-1}), và nhóm hydroxyl (3423 cm^{-1}). Trên phổ $^1\text{H NMR}$ của **WT1** xuất hiện tín hiệu của hai nhóm methyl tại $\delta_{\text{H}} 1,24$ (3H, s, H-18) và $1,02$ (3H, s, H-20), cùng tín hiệu của một proton olefinic tại $\delta_{\text{H}} 5,20$ (1H, t, $J = 3,0\text{ Hz}$, H-11). Bên cạnh đó tín hiệu của proton oxymethylene được xác định tại $\delta_{\text{H}} 3,51$ (1H, d, $J = 11,5\text{ Hz}$, H_a-17), $3,55$ (1H, d, $J = 11,0\text{ Hz}$, H_b-17). Ngoài ra, phổ proton của **WT1** còn cho thấy sự xuất hiện tín hiệu của một proton anome tại $\delta_{\text{H}} 5,47$ (1H, d, $J = 8,0\text{ Hz}$, H-1') cùng 6 tín hiệu khác của một phân tử đường tại $\delta_{\text{H}} 3,36$ (1H, dd, $J = 8,0, 9,0\text{ Hz}$, H-2'), $\delta_{\text{H}} 3,43$ (1H, dd, $J = 9,0, 9,0\text{ Hz}$, H-3'), $\delta_{\text{H}} 3,38$ (1H, t, $J = 9,0\text{ Hz}$, H-4'), $\delta_{\text{H}} 3,40$ (1H, m, H-5'), $3,83$ (1H, dd, $J = 2,0, 11,5\text{ Hz}$, H_a-6') và $3,71$ (1H, dd, $J = 4,5, 11,5\text{ Hz}$, H_b-6'). Từ các dữ liệu trên cùng với giá trị của các hằng số tương tác J ($J_{1',2'} = 8,0\text{ Hz}$, $J_{2',3'} = 9,0\text{ Hz}$, và $J_{3',4'} = 9,0\text{ Hz}$) cho phép dự đoán sự có mặt của một phân tử đường β -glucopyranose.

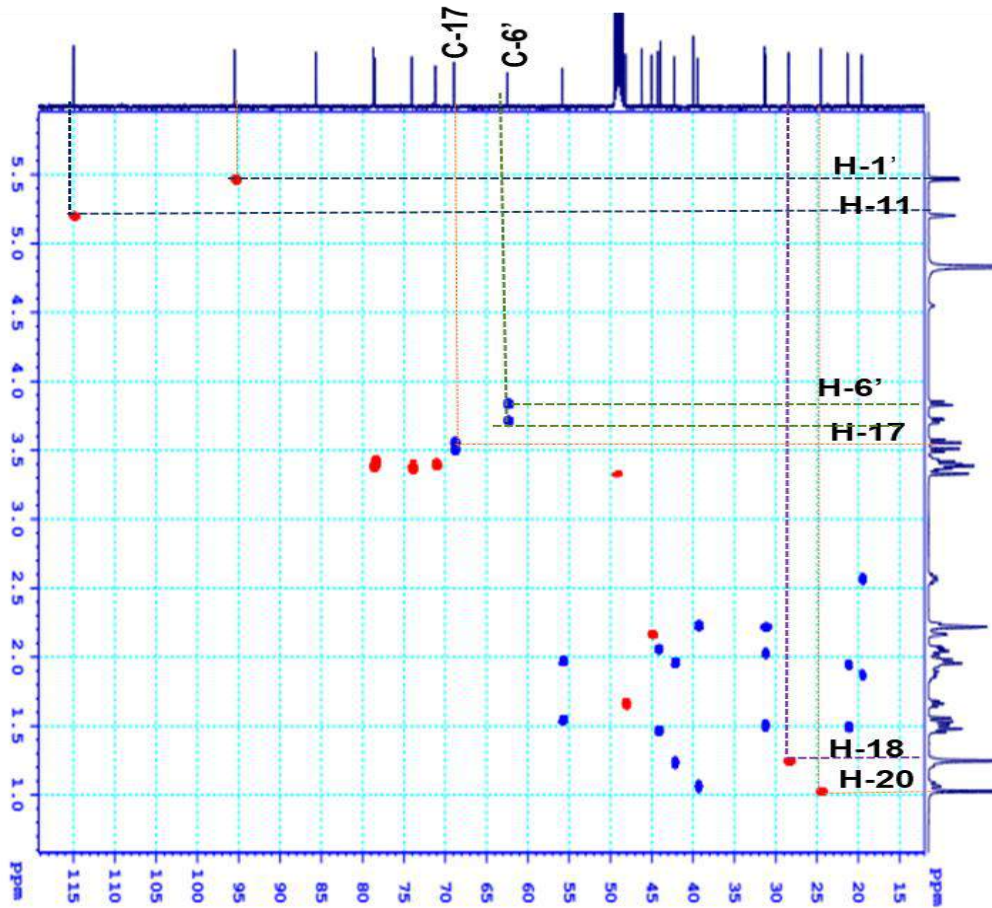


Hình 3.4. Phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất **WT1**

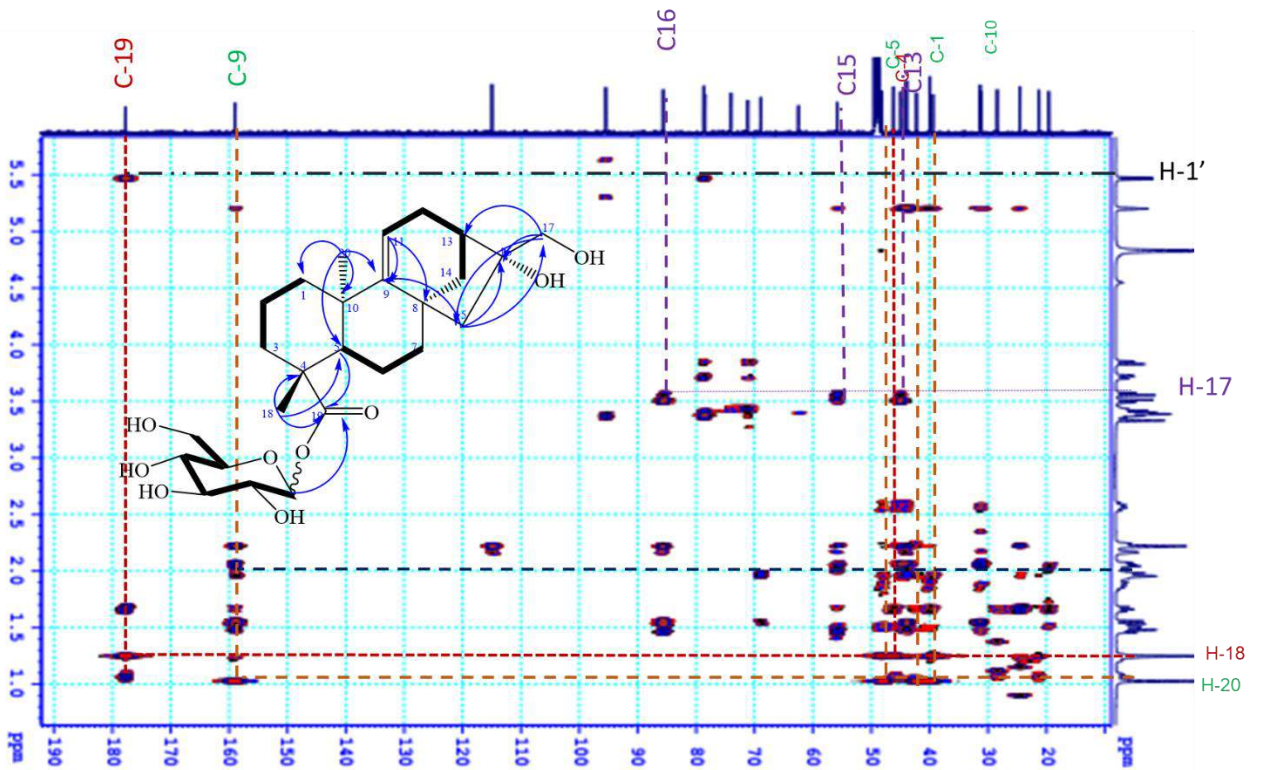


Hình 3.5. Phổ ^{13}C NMR của hợp chất **WT1**

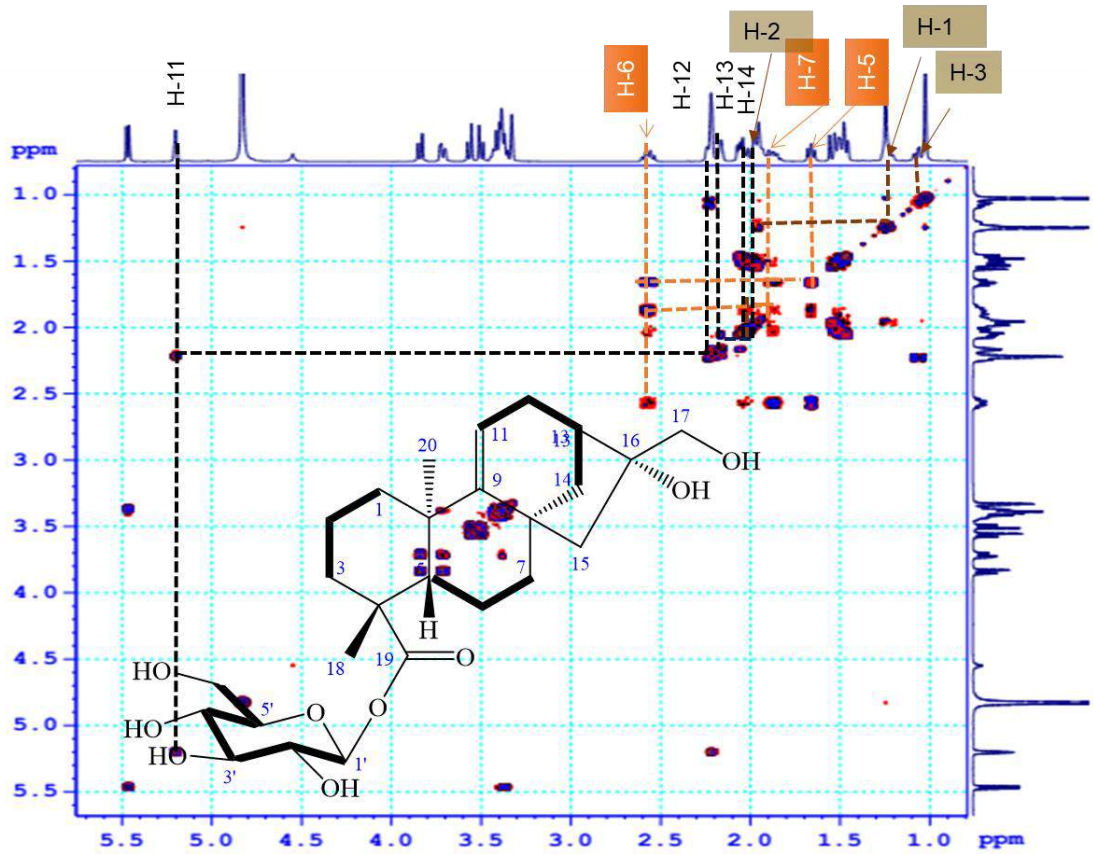
Phân tích phổ ^{13}C NMR của **WT1** cho thấy sự xuất hiện tín hiệu của 26 nguyên tử carbon, trong đó có 2 tín hiệu của nhóm methyl, 9 tín hiệu nhóm methylene với 2 nhóm methylene đính trực tiếp với oxi tại δ_{C} 68,9 (C-17) và 62,4 (C-6'), 9 nhóm methine cộng hưởng trong vùng từ 45,0 đến 114,9 ppm, và 6 tín hiệu carbon không liên kết hydro. Trên phổ ^{13}C NMR cho thấy sự xuất hiện của một nhóm methine cộng hưởng tại δ_{C} 114,9 và một carbon không liên kết hydro tại δ_{C} 159,0 ppm, gợi ý sự xuất hiện một nối đôi C=C. Từ các dữ kiện phổ thu được và các phân tích trên gợi ý hợp chất **WT1** là một diterpenoid có khung *ent*-kaurane. Điều này hoàn toàn phù hợp với đặc điểm sinh tổng hợp của các hợp chất diterpenoid phát hiện từ chi *Wedelia* trước đó [99].



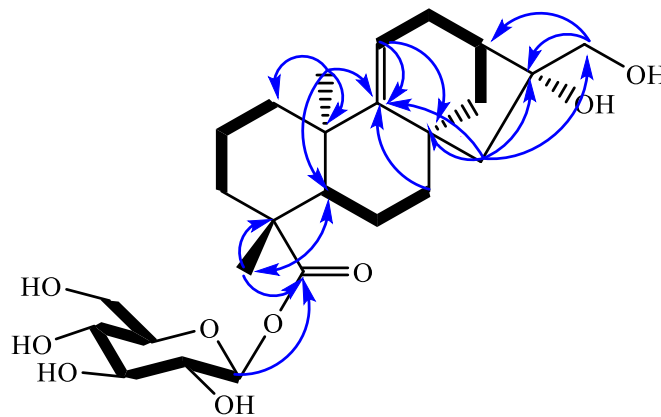
Hình 3.6. Phổ HSQC của hợp chất WT1



Hình 3.7. Phổ HMBC của hợp chất WT1

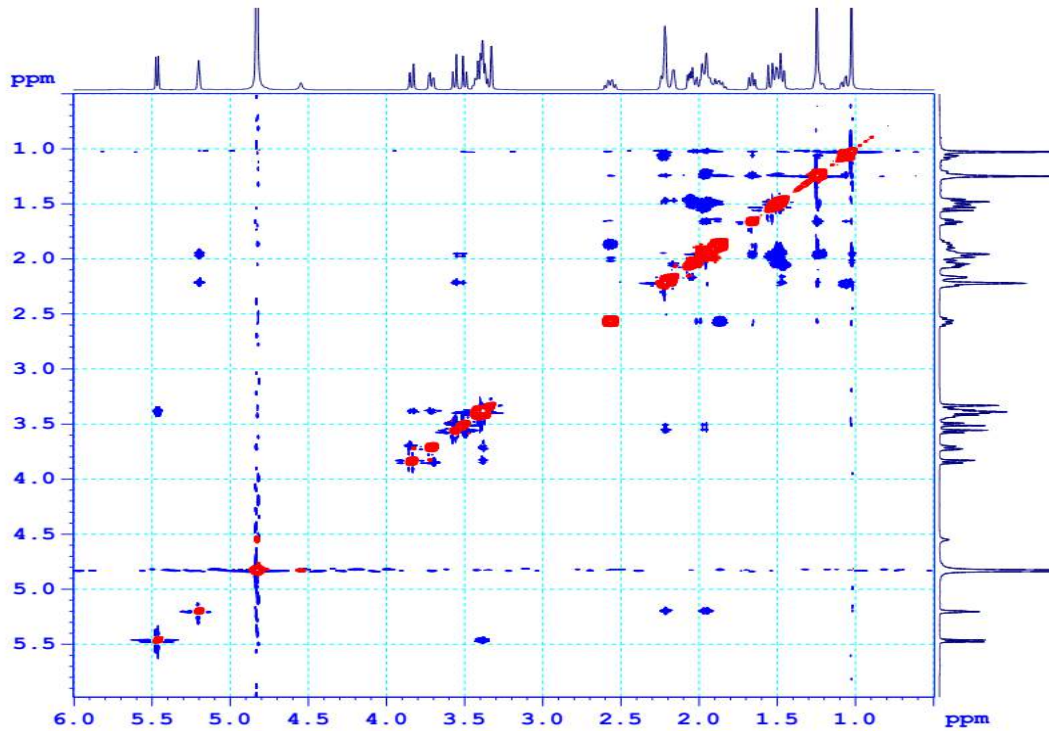


Hình 3.8. Phổ COSY của hợp chất **WT1**



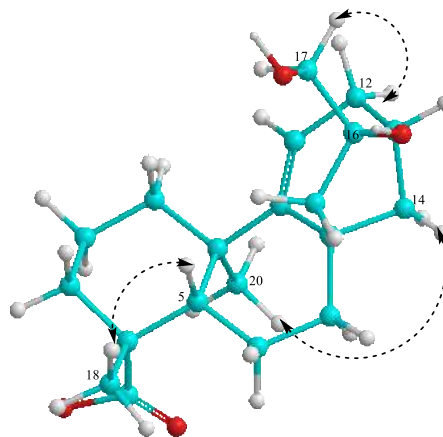
Hình 3.9. Các tương tác chính trên phổ HMBC (H→C), COSY (H—H) của **WT1**

Các liên kết trực tiếp giữa các proton và carbon của **WT1** được xác định dựa trên việc phân tích phổ HSQC. Vị trí của phân tử đường được xác định dựa trên phổ HMBC giữa tương tác H-1' của phân tử đường (δ_{H} 5,47, $J = 8,0$ Hz) với C-19 (δ_{C} 177,7) của phần *ent*-kaurane aglycon, điều này cho phép ta xác định vị trí của phân tử đường được đính trực tiếp tại vị trí C-19 (Hình 3.9).



Hình 3.10. Phổ NOESY của hợp chất **WT1**

Bên cạnh đó trên phổ HMBC cho thấy tương tác giữa H-20 (δ_{H} 1,02) và C-1 (δ_{C} 42,2), C-5 (δ_{C} 48,1), C-9 (δ_{C} 159,0), C-10 (δ_{C} 39,9); giữa H-18 (δ_{H} 1,28) với C-4, C-5, và C-19 cho phép ta xác định vị trí của hai nhóm methyl được đính trực tiếp tại C-10 và C-4 của phần *ent*-kaurane aglycon (Hình 3.9). Tương tác giữa H-17 (δ_{H} 3,51) và C-16 (δ_{C} 85,6), C-15 (δ_{C} 55,8), C-13 (δ_{C} 45,0) cho phép xác định vị trí của nhóm CH₂-17 được gắn tại C-16. Một số các tương tác của proton cạnh nhau được quan sát trên phổ COSY như: H-11 (δ_{H} 5,20)/H-12 (δ_{H} 2,22, δ_{H} 1,48)/H-13 (δ_{H} 2,16); H-5 (δ_{H} 1,66)/H-6 (δ_{H} 2,56, δ_{H} 1,98)/H-7 (δ_{H} 2,03, δ_{H} 1,51); H-1 (δ_{H} 1,20, 1,95)/H-2 (δ_{H} 1,93, 1,50)/H-3 (δ_{H} 2,23, 1,07) (Hình 3.9).



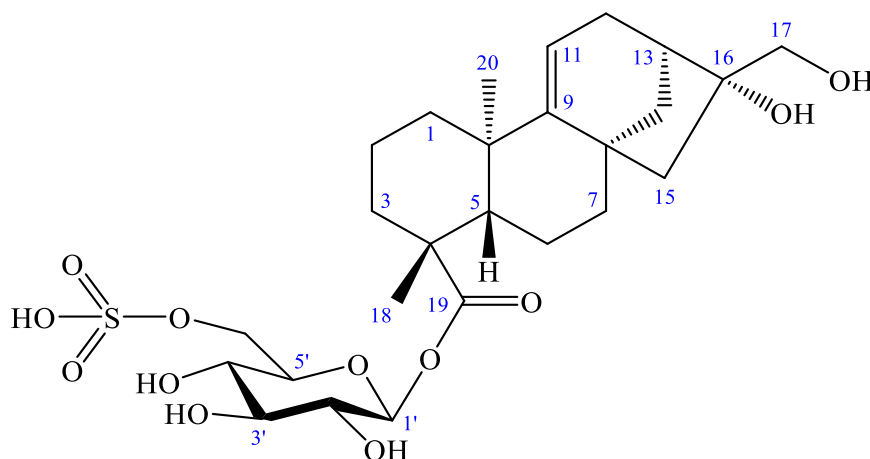
Hình 3.11. Các tương tác NOESY (H \leftrightarrow H) chính của **WT1**

Bảng 3.1. Số liệu phổ NMR của WT1 và hợp chất tham khảo

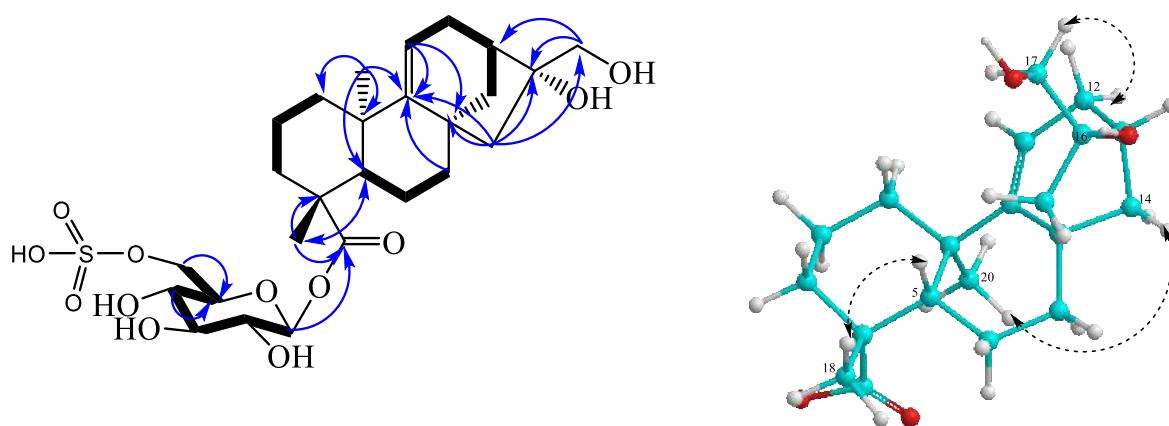
C	# δ_C^d	$\delta_C^{a,c}$	$\delta_H^{b,c}$ mult. (J in Hz)
1	39,9	42,2	1,20 m/1,95 m
2	19,2	21,2	1,93 m/1,50 m
3	35,1	39,4	2,23 m/1,07 m
4	48,3	46,2	-
5	45,9	48,1	1,66 dd (8,5, 11,0)
6	17,5	19,6	2,56 m/1,98 m
7	29,6	31,3	2,03 m/1,51 m
8	42,6	43,9	-
9	156,6	159,0	-
10	38,3	39,9	-
11	113,8	114,9	5,20 t (3,0)
12	30,1	31,2	2,22 m/1,48 m
13	44,2	45,0	2,16 m
14	42,9	44,2	2,06 m/1,45 m
15	55,0	55,8	1,96 m/1,54 m
16	84,6	85,6	-
17	68,4	68,9	3,51 d (11,0) 3,55 d (11,0)
18	24,2	28,4	1,24 s
19	206,6	177,7	-
20	23,7	24,5	1,02 s
1'		95,4	5,47 d (8,0)
2'		74,0	3,36 dd (8,0, 9,0)
3'		78,5	3,43 dd (9,0, 9,0)
4'		71,1	3,38 t (9,0)
5'		78,7	3,40 m
6'		62,4	3,83 dd (2,0, 11,5) 3,71 dd (4,5, 11,5)

^a125MHz, ^b500 MHz, ^cCD₃OD, ^d75 MHz, # δ_C : Số liệu của 16 α ,17-dihydroxy-*ent*-9(11)-kaurene-19-al đo trong CDCl₃ [100].

Cấu hình α của nhóm methylene ở vị trí C-14 được xác định bằng tương tác trên phổ NOESY của H_a-14 (δ_H 1,45) và H₃-20 (δ_H 1,02). Bên cạnh đó phổ NOESY xuất hiện tín hiệu tương tác giữa H₃-18 (δ_H 1,28) và H-5 (δ_H 1,66), tuy nhiên không có tương tác giữa δ_H 1,28 (H₃-18)/ δ_H 1,66 (H-5) với H₃-20 (δ_H 1,02), từ đó kết luận cấu hình β cho H₃-18 và H-5. Phân tích các tương tác trên phổ NOESY của **WT1** cho thấy tương tác giữa H _{β} -12 và H_a-17 gợi ý cho ta cấu hình α của nhóm hydroxyl tại vị trí C-16. Bên cạnh đó khi so sánh độ dịch chuyển hóa học tại C-16 (δ_C 85,6) và C-17 (δ_C 68,9) của **WT1** với các giá trị phổ ¹³C NMR tại 84,6 (C-16) và 68,4 (C-17) của 16 α ,17-dihydroxy-*ent*-9(11)-kaurene-19-al [100] cho thấy sự phù hợp ở hai vị trí trên, trong khi hợp chất 16 β ,17-hydroxy-*ent*-kauran-19-oic acid- β -D-glucopyranosyl ester có độ dịch chuyển hóa học tương ứng tại hai vị trí trên là δ_C 79,8 (C-16) và 70,3 (C-17) [99, 100]. Từ những thông tin trên cho thấy cấu trúc hợp chất **WT1** tương tự như 16 α ,17-dihydroxy-*ent*-9(11)-kaurene-19-al, ngoại trừ sự xuất hiện của nhóm carbonyl trong **WT1** thay vì nhóm aldehyde trong 16 α ,17-dihydroxy-*ent*-9(11)-kaurene-19-al và sự xuất hiện của một gốc đường glucose tại vị trí C-19. Tiến hành thủy phân hợp chất **WT1** trong môi trường kiềm để thu được đường đơn. Nhóm đường trong **WT1** được xác định là D-glucose với góc quay cực $[\alpha]^{24}_D = +10,5$ (c 0,15, H₂O) phù hợp với giá trị độ quay cực riêng của đường D-glucose đã công bố trước đó [90, 99]. Kết hợp so sánh dữ liệu phổ của **WT1** với hợp chất 16 α ,17-dihydroxy-*ent*-kauran-19-oic acid- β -D-glucopyranosyl ester (Paniculoside-IV) [99] cho thấy sự tương đồng ở hầu hết các vị trí ngoại trừ sự xuất hiện thêm một nối đôi tại vị trí C-9/C-11 trong hợp chất **WT1**. Từ tất cả những phân tích dữ liệu phổ trên cho phép xác định được hợp chất **WT1** là 16 α ,17-dihydroxy-*ent*-9(11)-kaurene-19-oic acid- β -D-glucopyranosyl ester, đây là hợp chất mới và được đặt tên riêng là wedtriloside A.

3.1.1.2. Hợp chất **WT2**: Wedtriloside BHình 3.12. Cấu trúc hợp chất **WT2**

Hợp chất **WT2** thu được dưới dạng chất bột màu trắng, độ quay cực riêng là $[\alpha]_D^{24}$: - 37 (c 0,10, MeOH). Trên phổ khối lượng phân giải cao HR-ESI-MS xuất hiện pic ion giả phân tử tại m/z 575,2190 $[M-H]^-$ (Tính toán lý thuyết cho công thức phân tử $C_{26}H_{39}O_{12}S$, $M = 575,2192$) cho phép xác định được công thức phân tử của **WT2** là $C_{26}H_{40}O_{12}S$. Trên phổ hồng ngoại của **WT2** cho thấy sự xuất hiện một tín hiệu liên kết đôi trong vùng (1630 cm^{-1}), một nhóm cacboxyl (1727 cm^{-1}), và nhóm hydroxyl (3423 cm^{-1}). Bên cạnh đó sự xuất hiện của các dải tín hiệu tại 1227 , 1248 cm^{-1} (S=O) và 767 , 819 , và 884 cm^{-1} (C-O-S) gợi ý sự xuất hiện của một nhóm sulfate [101-103]. Giống với hợp chất **WT1**, trên phổ proton của **WT2** cũng xuất hiện tín hiệu hai nhóm methyl tại δ_H 1,23 (3H, s, H-18) và 1,02 (3H, s, H-20), cùng với tín hiệu của một proton olefin tại δ_H 5,19 (1H, t, $J = 3,0\text{ Hz}$, H-11). Tín hiệu của proton oxymethylene được xác định tại δ_H 3,50 (1H, d, $J = 11,0\text{ Hz}$, H_a-17), 3,55 (1H, d, $J = 11,0\text{ Hz}$, H_b-17). Ngoài ra còn có sự xuất hiện của một tín hiệu của proton anome tại δ_H 5,47 (1H, d, $J = 8,0\text{ Hz}$, H-1') và sáu tín hiệu khác của phân tử đường bao gồm δ_H 3,37 (1H, dd, $J = 8,0, 9,0\text{ Hz}$, H-2'), δ_H 3,43 (1H, br d, $J = 9,0\text{ Hz}$, H-3'), δ_H 3,49 (1H, t, $J = 9,0\text{ Hz}$, H-4'), δ_H 3,53 (1H, m, H-5'), 4,25 (1H, dd, $J = 2,0, 11,5\text{ Hz}$, H_a-6') và 4,21 (1H, dd, $J = 4,5, 11,5\text{ Hz}$, H_b-6'). Từ các dữ liệu trên cùng với giá trị của các hằng số tương tác J ($J_{1',2'} = 8,0\text{ Hz}$, $J_{2',3'} = 9,0\text{ Hz}$, và $J_{3',4'} = 9,0\text{ Hz}$) cho phép dự đoán sự có mặt của một phân tử đường β -glucopyranose.



Hình 3.13. Các tương tác chính

HMBC (H→C), COSY (H—H) và NOESY (H↔H) của hợp chất **WT2**

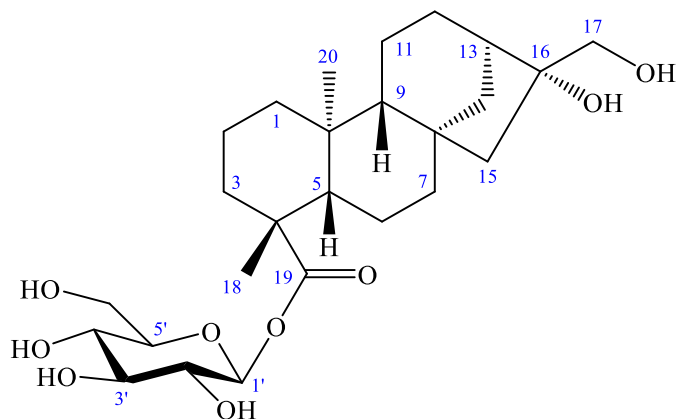
Trên phổ ^{13}C NMR của **WT2** cũng cho thấy sự xuất hiện tín hiệu của 26 nguyên tử carbon, trong đó có 2 tín hiệu của nhóm methyl, 9 tín hiệu nhóm methylene với 2 nhóm methylene đính trực tiếp với oxi tại δ_{C} 68,9 (C-17) và 67,6 (C-6'), 9 nhóm methine cộng hưởng trong vùng từ 45,0 đến 114,9 ppm, và 6 tín hiệu carbon không liên kết hydro. So sánh với các dữ liệu phổ của **WT1** và **WT2** cho thấy sự gần giống nhau ở hầu hết các vị trí. Điểm khác nhau duy nhất của hai hợp chất này là tại vị trí C-6' của phân tử đường. Trên phổ ^{13}C NMR cho thấy tại vị trí C-6' của **WT2** chuyển dịch mạnh về phía trường thấp tại δ_{C} 67,6 ppm trong khi ở hợp chất **WT1** là δ_{C} 62,4 và nhóm hydroxyl được thay thế bởi một nhóm thế khác. Tiến hành thủy phân **WT2** trong môi trường kiềm thu được đường đơn. Gốc đường thu được được xác định là D-glucoside (xem mục 2.2.2.5) bởi sự phù hợp với dữ liệu đã công bố trước đó [90]. Bên cạnh đó khi thêm $\text{Ba}(\text{OH})_2$ vào dung dịch nước thu được sau khi thủy phân thấy xuất hiện kết tủa trắng, không tan trong HCl 2M. Kết hợp với các tín hiệu thu được từ phổ hồng ngoại, phổ khối lượng phân giải cao, có thể khẳng định sự có mặt của anion SO_4^{2-} trong **WT2**. Từ những phân tích trên kết hợp so sánh tài liệu tham khảo có thể khẳng định nhóm thế tại C-6' của **WT2** là hydrogen sulfate ($-\text{HSO}_4$). Các tương tác HMBC, COSY và NOESY của **WT2** hoàn toàn tương tự như **WT1** (Hình 3.13). Từ những phân tích trên xác định được hợp chất **WT2** là 16 α ,17-dihydroxy-ent-9(11)-kaurene-19-oic acid- β -D-glucopyranosyl-6'-sulfate ester. Đây là một hợp chất mới được đặt tên riêng là wedtriloside B.

Bảng 3.2. Số liệu phổ NMR của hợp chất **WT2** và chất tham khảo

C	#$\delta_C^{a,c}$	$\delta_C^{a,c}$	$\delta_H^{b,c}$ mult. (J in Hz)
1	42,2	42,2	1,21 m/1,97 m
2	21,2	21,2	1,92 m/1,47 m
3	39,4	39,3	2,23 m/1,06 m
4	46,2	46,1	-
5	48,1	48,2	1,65 dd (8,5, 11,0)
6	19,6	19,5	2,56 m/1,85 m
7	31,3	31,3	2,01 m/1,50 m
8	43,9	43,9	-
9	159,0	159,0	-
10	39,9	39,9	-
11	114,9	114,9	5,19 t (3,0)
12	31,2	31,2	2,21 m/1,49 m
13	45,0	45,0	2,15 br d (3,5)
14	44,2	44,2	2,05 m/1,46 m
15	55,8	55,8	1,97 m/1,54 d (13,0)
16	85,6	85,6	-
17	68,9	68,9	3,50 d (11,0) 3,55 d (11,0)
18	28,4	28,4	1,23 s
19	177,7	177,4	-
20	24,5	24,5	1,02 s
1'	95,4	95,2	5,47 d (8,0)
2'	74,0	73,9	3,37 dd (8,0, 9,0)
3'	78,5	78,0	3,43 br d (9,0)
4'	71,1	70,7	3,49 t (9,0)
5'	78,7	76,7	3,53 m
6'	62,4	67,6	4,25 dd (2,0, 11,5) 4,21 dd (4,5, 11,5)

^a125MHz, ^b500 MHz, ^cCD₃OD, # δ_C : Số liệu của hợp chất **WT1** đo trong CD₃OD.

3.1.1.3. Hợp chất **WT3**: Paniculose-IV



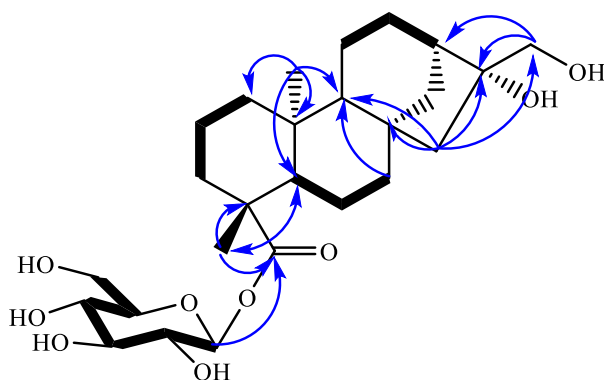
Hình 3.14. Cấu trúc hóa học hợp chất **WT3**

Hợp chất **WT3** thu được dưới dạng bột trắng, vô định hình, với độ quay cực $[\alpha]_D^{24} -77,2$ (c 0,2, MeOH). Trên phổ ESI-MS xuất hiện pic ion giả phân tử tại m/z 499 $[M+H]^+$, 481 $[M+H-H_2O]^+$ và 516 $[M + NH_4]^+$ chứng tỏ **WT3** có khối lượng phân tử $M = 498$, kết hợp với phổ cộng hưởng từ hạt nhân cho phép xác định công thức phân tử của nó là $C_{26}H_{42}O_9$. Trên phổ 1H -NMR cho thấy sự xuất hiện tín hiệu của hai nhóm methyl tại δ_H 1,23 (3H, s, H-18) và 0,96 (3H, s, H-20), cùng tín hiệu của hai proton oxymethylene tại δ_H 3,73 (1H, d, $J = 11,5$ Hz, H_a -17), 3,63 (1H, d, $J = 11,0$ Hz, H_b -17). Ngoài ra còn có tín hiệu của một proton anome tại δ_H 5,43 (1H, d, $J = 8,0$ Hz, H-1') và năm tín hiệu khác của phân tử đường bao gồm δ_H 3,42 (1H, dd, $J = 8,0, 9,0$ Hz, H-2'), δ_H 3,46 (1H, dd, $J = 9,0, 9,0$ Hz, H-3'), δ_H 3,40 (1H, t, $J = 9,0$ Hz, H-4'), δ_H 3,44 (1H, m, H-5'), 3,86 (1H, dd, $J = 2,0, 12,0$ Hz, H_a -6') và 3,71 (1H, dd, $J = 4,5, 12,0$ Hz, H_b -6'). Các dữ liệu này cùng với giá trị của các hằng số tương tác J ($J_{1',2'} = 8,0$ Hz, $J_{2',3'} = 9,0$ Hz, và $J_{3',4'} = 9,0$ Hz) cho phép dự đoán sự có mặt của một phân tử đường β -glucopyranose. Phổ ^{13}C NMR của **WT3** cho thấy tín hiệu của 26 nguyên tử carbon, trong đó có 2 tín hiệu của nhóm methyl, 11 tín hiệu nhóm methylene trong đó 2 nhóm methylene đính trực tiếp với oxi tại δ_C 66,7 (C-17) và 62,2 (C-6'), 8 tín hiệu methine, và 5 tín hiệu carbon không liên kết hydro. Liên kết trực tiếp giữa các proton và carbon được xác định thông qua phổ HSQC. Phân tích các tương tác trên phổ 1H - 1H COSY của **WT3** cho phép ghép nối các mảnh cấu trúc H-1 (δ_H 1,84, 0,83)/H-2 (δ_H 1,42, 1,90)/H-3 (δ_H 2,18, 1,06); H-5 (δ_H 1,11)/H-6 (δ_H 1,83, 1,96)/H-7 (δ_H 1,44, 1,65) và H-11 (δ_H 1,60, 1,54)/H-12 (δ_H 1,62, 1,48)/H-13 (δ_H 2,02). Tương tự như hợp chất **WT1** và **WT2** phân tử đường trong **WT3** được xác định là D-glucoside.

Bảng 3.3. Số liệu phổ NMR của WT3 và hợp chất tham khảo

C	$\# \delta_C^{a,c}$	$\delta_C^{a,c}$	$\delta_H^{b,c}$ mult. (J in Hz)
1	41,8	41,6	0,83 m/1,84 m
2	20,1	19,9	1,90 m/1,42 m
3	39,1	38,8	1,06 m 2,18 d (13,5)
4	45,1	45,0	-
5	58,5	58,3	1,11 m
6	23,2	23,0	1,83 m/1,96 m
7	43,4	43,0	1,44 m/1,65 m
8	45,8	46,0	-
9	57,3	57,09	1,02 d (5,5)
10	40,9	40,7	-
11	19,6	19,4	1,60 m/1,54 m
12	27,2	27,0	1,62 m/1,48 m
13	46,2	45,6	2,02 m
14	38,1	37,9	1,96 m/1,84 m
15	53,7	53,5	1,40 m/1,56 m
16	83,0	83,0	-
17	66,9	66,7	3,73 d (11,5) 3,63 d (11,5)
18	29,0	29,0	1,23 s
19	178,2	178,9	-
20	16,4	16,2	0,96 s
1'	95,6	95,4	5,43 d (8,0)
2'	74,1	73,7	3,42 dd (8,0, 9,0)
3'	78,7	78,2	3,46 dd (9,0, 9,0)
4'	71,1	70,8	3,40 t (9,0)
5'	78,7	78,4	3,44 m
6'	62,4	62,2	3,86 dd (2,0, 12,0) 3,71 dd (4,5, 12,0)

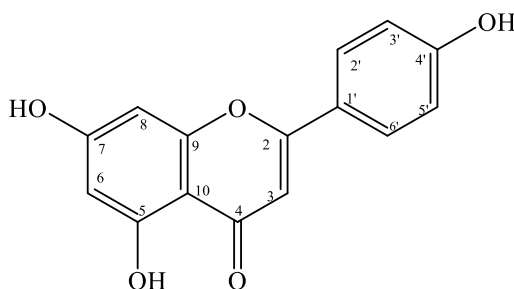
^a125MHz, ^b500 MHz, ^cCD₃OD, [#] δ_C của paniculose-IV đo trong CD₃OD [99].



Hình 3.15. Các tương tác chính HMBC (H→C), COSY (H—H)
của hợp chất **WT3**

Vị trí của D-glucoside được xác định dựa trên các tương tác trên phổ HMBC. Trên phổ HMBC của **WT3** cho thấy tương tác H-1' của phân tử đường (δ_H 5,43, $J = 8,0$ Hz) với C-19 (δ_C 178,90) của phần *ent*-kaurane aglycon, ngoài ra các tương tác khác được quan sát trên phổ HMBC bao gồm tương tác giữa H-20 (δ_H 0,96) và C-1 (δ_C 41,6), C-5 (δ_H 58,3), C-9 (δ_H 57,0) và C-10 (δ_H 40,7), giữa H-18 và C-4 (δ_H 45,0), C-5 (δ_H 58,3) và C-19 (δ_H 178,9); giữa H-17 (δ_H 3,73, 3,630 và C-13 (δ_C 45,6)/C-15 (δ_C 53,5)/C-16 (δ_C 83,0) cho phép ta gán ghép vị trí các nhóm methyl và các nhóm thế của hợp chất **WT1** như hình 3.15. Các dữ liệu phổ của hợp chất **WT3** cho phép dự đoán cấu trúc của một *ent*-kaurane diterpenoid [99] và tương tự hợp chất **WT1** ngoại trừ việc mất đi một liên kết đôi tại C-9/C-11. Từ tất cả những phân tích trên kết hợp so sánh với tài liệu tham khảo đã công bố thì cấu trúc của hợp chất **WT3** được xác định là 16 α ,17-dihydroxy-*ent*-kauran-19-oic acid- β -D-glucopyranosyl ester hay Paniculoside-IV, một hợp chất được đã được công bố trước đây từ loài *Acanthopanax koreanum* [99]

3.1.1.4. Hợp chất **WT4**: Apigenin



Hình 3.16. Cấu trúc Hợp chất **WT4**

Hợp chất **WT4** thu được dưới dạng chất bột màu vàng. Phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất xuất hiện tín hiệu proton của một vòng thơm hệ tương tác spin-spin A_2B_2

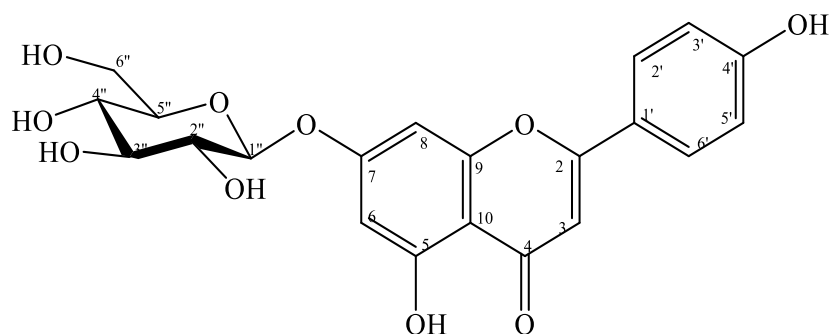
tại δ_H 7,90 (2H, d, $J = 8,5$ Hz, H-2' và H-6'), 6,95 (2H, d, $J = 8,5$ Hz, H-3' và H-5'). Bên cạnh đó là hai tín hiệu proton olefin thơm ở vị trí *meta* so với nhau tại δ_H 6,72 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-6), 7,11 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-8) và một tín hiệu dạng singlet được xác định tại δ_H 6,70 (1H, s, H-3).

Phổ ^{13}C NMR của hợp chất **WT4** xuất hiện tín hiệu của 15 nguyên tử carbon đặc trưng cho một hợp chất flavone. Trong đó hai vị trí đặc trưng tại δ_C 98,7 (CH, C-6) và 93,9 (CH, C-8) của vòng A khung flavone khi hai vị trí C-5 và C-7 bị thế và một tín hiệu nhóm ketone tại δ_C 181,7 (C-4). Với những phân tích này gợi ý **WT4** là một flavone. Một hệ spin kiểu A_2B_2 với các tín hiệu thu được trên phổ carbon có cường độ mạnh gấp đôi. Các tín hiệu này được xác định tại δ_C 128,4 (C-2', C-6'), 115,9 (C-3', C-5') và 161,1 (C-4'). Thêm nữa các dữ liệu thu được từ phổ NMR của hợp chất **WT4** không xuất hiện bất kì tín hiệu của một nhóm thế nào khác, chứng tỏ các vị trí nhóm thế trong **WT4** đều là các nhóm OH. Điều này được khẳng định lại khi phổ ESI-MS của **WT4** khi thu được các tín hiệu giả phân tử tại m/z 271[M+H]⁺, 541 [2M+H]⁺ và 253 [M-H₂O]⁺ tương ứng với KLPT M = 270, CTPT C₁₅H₁₀O₅. Kết hợp so sánh với tài liệu tham khảo [104] đã công bố xác định được hợp chất **WT4** là apigenin.

Bảng 3.4. Số liệu phổ NMR của hợp chất **WT4** và chất tham khảo

C	# $\delta_C^{a,c}$	$\delta_C^{a,c}$	$\delta_H^{b,c}$ mult ($J = \text{Hz}$)
2	163,7	163,7	-
3	102,8	102,8	6,76 s
4	181,6	181,7	-
5	161,4	161,4	-
6	98,8	98,7	6,18 d (2,0)
7	164,0	164,0	-
8	93,5	93,9	6,47 d (2,0)
9	157,2	157,2	-
10	103,6	103,6	-
1'	121,1	121,1	-
2'	128,4	128,4	7,91 d (8,5)
3'	115,9	115,9	6,91 d (8,5)
4'	161,1	161,1	-
5'	115,9	115,9	6,91 d (8,5)
6'	128,3	128,4	7,91 d (8,5)

^a125MHz, ^b500 MHz, ^cDMSO-*d*₆, [#]chất apigenin đo trong DMSO-*d*₆ [104].

3.1.1.5. Hợp chất **WT5**: Apigenin 7-O- β -D-glucopyranosideHình 3.17. Cấu trúc hợp chất **WT5**Bảng 3.5. Số liệu phổ NMR của hợp chất **WT5** và chất tham khảo

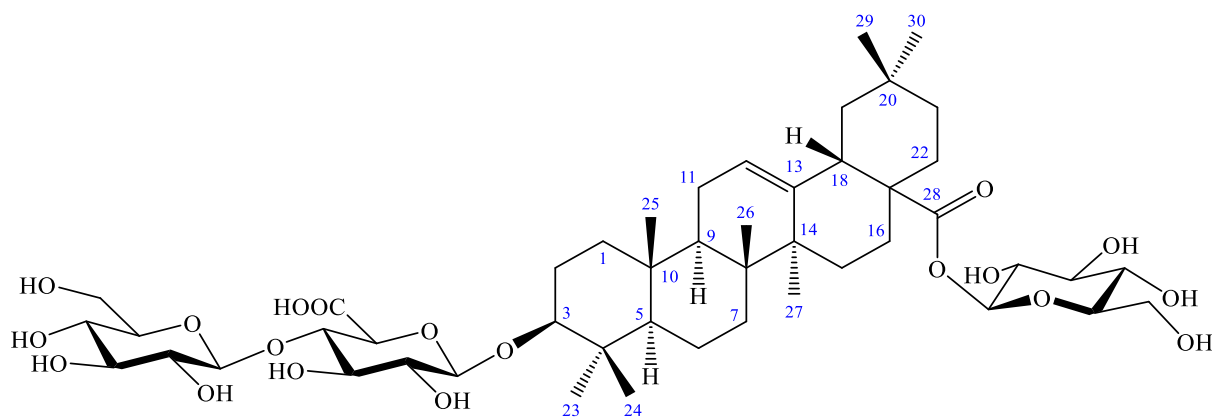
C	*δ_C	$\delta_C^{a,c}$	$\delta_H^{b,c}$ mult. (J in Hz)
2	164,0	164,3	-
3	102,8	102,8	6,84 s
4	181,0	181,9	-
5	161,0	161,1	-
6	99,7	99,4	6,44 d (1,5)
7	162,6	162,9	-
8	94,6	94,8	6,82 d (1,5)
9	156,6	156,9	-
10	105,1	105,2	-
1'	120,7	120,0	-
2', 6'	128,3	128,5	7,93 d (8,5)
3', 5'	115,7	116,1	6,90 d (8,5)
4'	160,8	161,0	-
1''	99,3	99,4	5,06 d (7,5)
2''	73,0	73,0	
3''	77,0	77,1	
4''	69,4	69,5	
5''	76,3	76,4	
6''	60,5	60,5	

^a125MHz, ^b500 MHz, ^cDMSO-*d*₆ * δ_C của hợp chất apigenin 7-O- β -D-glucopyranoside đo trong DMSO-*d*₆ [105].

Hợp chất **WT5** thu được dưới dạng chất bột màu vàng. Các tín hiệu đặc trưng cho vòng thơm thu được trên phổ ^1H NMR của hợp chất **WT5** hoàn toàn tương tự với các tín hiệu proton thơm thu được từ **WT4**, ngoại trừ sự xuất hiện thêm một tín hiệu của phân tử đường trên phổ proton của hợp chất **WT5**, điều này được khẳng định lại khi trên phổ khối phun mù điện tử xuất hiện các pic ion giả phân tử tại m/z 433 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 877 $[2\text{M}+\text{Na}]^+$ và 415 $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$ cho phép dự đoán khối lượng phân tử của **WT5** là $M = 432$ tương ứng với CTPT $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{10}$. Kết hợp với các dữ liệu phổ NMR gợi ý **WT5** cũng là một dẫn xuất của flavone với proton anome tại δ_{H} 5,06 (1H, d, $J = 7,5$ Hz, H-1'') có hằng số tương tác khá cao ($J = 7,5$ Hz) nên có thể khẳng định là phân tử đường β -D-glucopyranoside.

Trên phổ carbon thu được tín hiệu của 21 nguyên tử carbon, trong đó 15 nguyên tử carbon hoàn toàn phù hợp với một flavone. Phân tử đường được xác định tại độ chuyển dịch hóa học δ_{C} 99,90 (C-1''), 73,08 (C-2''), 77,14 (C-3''), 69,55 (C-4''), 76,41 (C-5''), và 60,59 (C-6''). So sánh các dữ liệu phổ của hợp chất **WT5** thu được với dữ liệu phổ đã công bố của hợp chất apigenin 7-O- β -D-glucopyranoside [105] thấy sự phù hợp ở tất cả các vị trí. Như vậy có thể kết luận được **WT5** là apigenin 7-O- β -D-glucopyranoside.

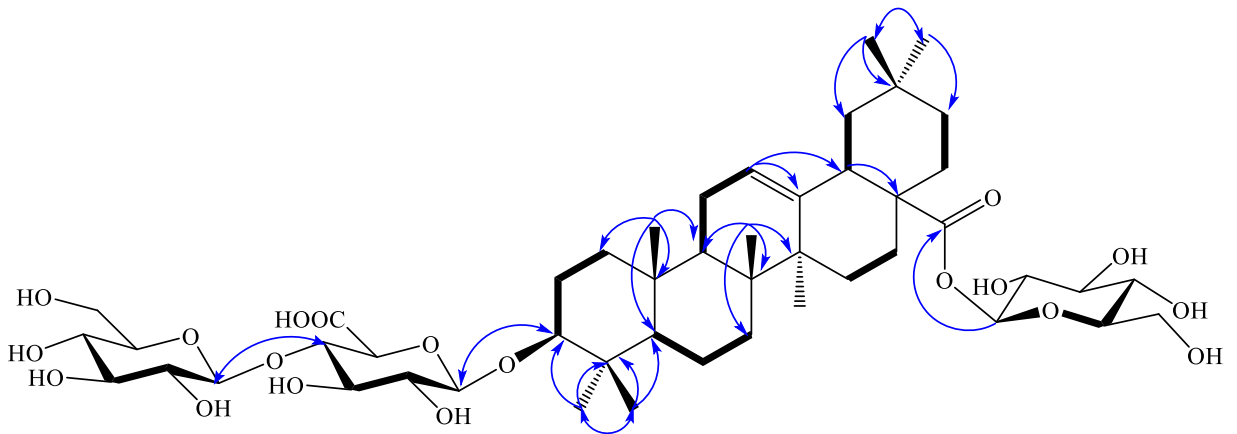
3.1.1.6. Hợp chất **WT6**: 3-O-[β -D-glucopyranosyl(1-4)- β -D-glucoronopyranosyl] oleanolic acid 28-O- β -D-glucopyranosyl ester



Hình 3.18. Cấu trúc hóa học của hợp chất **WT6**

Hợp chất **WT6** thu được dưới dạng chất bột màu trắng. Trên phổ khối lượng phun mù điện tử xuất hiện tín hiệu m/z 979,4 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ gợi ý công thức phân tử của hợp chất **WT6** là $\text{C}_{48}\text{H}_{76}\text{O}_{19}$. Phổ ^1H NMR và ^{13}C NMR cho thấy hợp chất **WT6** có chứa alycon là oleanolic acid với sự xuất hiện tín hiệu của 7 nhóm methyl tại δ_{C} 27,6 (C-23)/ δ_{H} 0,96 (3H, s, H-23), δ_{C} 16,6 (C-24)/ δ_{H} 0,68 (3H, s, H-24); δ_{C} 15,1 (C-

25)/ δ_{H} 0,85 (3H, s, H-25), δ_{C} 16,4 (C-26)/ δ_{H} 0,75 (3H, s, H-26); δ_{C} 25,4 (C-27)/ δ_{H} 1,07 (3H, s, H-27); δ_{C} 32,7 (C-29)/ δ_{H} 0,86 (3H, s, H-29) và δ_{C} 23,3 (C-30)/ δ_{H} 0,85 (3H, s, H-30), một liên kết đôi dạng (-CH=C<) tại [δ_{C} 143,4 (C-13) và 121,6 (C-12)/ δ_{H} 5,16 (1H, br s, H-12)], bên cạnh đó liên kết đôi bị thế ba vị trí trên được khẳng định dựa trên các tương tác trên phổ HMBC giữa H-12 (δ_{H} 5,16) và C-13 (δ_{C} 143,4)/C-18 (δ_{C} 40,7), giữa H-27 (δ_{H} 1,07) và C-13 (δ_{C} 143,4)/C-14 (δ_{C} 41,2)/C-7 (δ_{C} 32,2) và sáu carbon không liên kết hydro [δ_{C} 38,6 (C-4), 40,0 (C-8), 36,2 (C-10), 41,2 (C-14), 45,9 (C-17), và 30,2 (C-20)]. Hai nhóm carboxyl được xác định tại [δ_{C} 175,2 (C-28) và 172,9 (C-6')]. Tín hiệu của một nhóm methine tại trường thấp δ_{C} 87,8 (C-3)/ δ_{H} 3,01 (1H, dd, $J = 4,5, 10,5$ Hz, H-3) gợi ý đây là một nhóm methine được oxi hóa. Bên cạnh đó phổ ^1H NMR cho thấy xuất hiện các tín hiệu đặc trưng của 3 phân tử đường, các giá trị ^1H và ^{13}C NMR của anome lần lượt là [δ_{H} 4,11 d (8,0)/ δ_{C} 105,2], [δ_{H} 4,23 d (8,0)/ δ_{C} 104,4] và [δ_{H} 5,23 d (8,0)/ δ_{C} 94,0]. Vị trí các phân tử đường được xác định dựa trên phổ HMBC. Tương tác giữa H-1' (δ_{H} 4,11)/ δ_{C} 105,2 và C-3 (δ_{C} 87,8) cho phép xác định vị trí của phân tử đường thứ nhất đính tại vị trí C-3 của alycon. Tín hiệu tại C-4' dịch chuyển mạnh về phía trường thấp và tương tác giữa H-1'' (δ_{H} 4,23)/ δ_{C} 104,4 và C-4' (δ_{C} 82,9) trên phổ HMBC cho phép xác định vị trí phân tử đường thứ 2 được gắn tại C-4' của phân tử đường thứ nhất.



Hình 3.19. Các tương tác chính trên phổ HMBC (H→C), COSY (H—H) của WT6

Bảng 3.6. Số liệu phổ NMR của hợp chất **WT6** và hợp chất tham khảo

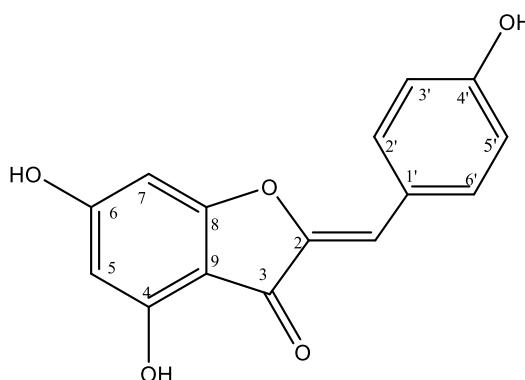
C	# δ_C	$\delta_C^{a,c}$	$\delta_H^{b,c}$ mult. (J in Hz)	C	# δ_C	$\delta_C^{a,c}$	$\delta_H^{b,c}$ mult. (J in Hz)
1	38,1	38,2	0,87 m/1,46 m	27	25,4	25,4	1,07 s
2	25,4	25,4	1,92 m/1,48 m	28	175,2	175,2	-
3	87,9	87,8	3,01 d (4,5, 10,5)	29	32,7	32,7	0,86 s
4	38,7	38,6	-	30	23,3	23,3	0,85 s
5	55,0	55,0	0,71 m	3-O-Glc			
6	17,7	17,7	1,45 m/1,26 m	1'	105,0	105,2	4,11 d (8,0)
7	32,2	32,2	1,37 m/1,20 m	2'	73,5	73,7	3,00 m
8	40,0	40,0	-	3'	75,4	75,4	3,34 m
9	47,0	47,0	1,47 m	4'	82,9	82,9	4,18 m
10	36,2	36,2	-	5'	75,3	75,4	3,21 m
11	22,9	22,9	1,79 m	6'	172,0	172,9	-
12	121,6	121,6	5,16 br s	4'-O-Glc			
13	143,4	143,4	-	1''	103,8	104,4	4,23 d (8,0)
14	41,2	41,2	-	2''	73,4	73,6	3,15 m
15	27,1	27,1	1,71 m/0,94 m	3''	76,3	76,6	3,21 m
16	22,5	22,5	1,94 m/1,58 m	4''	70,0	69,5	3,12 m
17	45,9	45,9	-	5''	77,0	76,9	3,10 m
18	40,7	40,7	1,49 m	6''	61,1	60,9	3,62 dd (12,5, 2,0) 3,48 dd (12,5, 4,5)
19	45,5	45,5	1,63 m/1,08 m	28-O-Glc			
20	30,2	30,2	-	1'''	94,1	94,0	5,23 d (8,0)
21	33,2	33,2	1,32 m/1,14 m	2'''	72,3	72,3	3,09 m
22	31,6	31,5	1,54 m/1,49 m	3'''	76,6	76,7	3,09 m
23	27,6	27,6	0,96 s	4'''	69,5	69,5	3,12 m
24	16,6	16,6	0,68 s	5'''	77,6	77,7	3,13 m
25	15,1	15,1	0,85 s	6'''	60,7	60,6	3,60 dd (12,5, 2,5) 3,44 dd (12,5, 5,5)
26	16,6	16,4	0,75 s				

^a125, MHz, ^b500 MHz, ^cDMSO-*d*₆, # δ_C của 3-O-[β -D-glucopyranosyl(1-4)- β -D-glucoronopyranosyl] oleanolic acid 28-O- β -D-glucopyranosyl ester đo trong DMSO-*d*₆ [106]

Bên cạnh đó trên phổ HMBC còn cho thấy tương tác giữa H-1''' (δ_H 5,23/ δ_C 94,0) và C-28 (δ_C 175,2) của aglycon, như vậy tại vị trí C-28 của aglycon được thế vào phân tử đường thứ ba. Các hằng số tương tác *J* lớn cho tất cả các proton anome, gợi ý cấu hình β cho các phân tử đường. Cấu hình tương đối tại H-3 được xác định

dựa trên sự phân tích phổ ROESY. Trên phổ ROESY cho thấy tương tác giữa H-3 (δ_H 3,01) với H-5 (δ_H 0,71), H-23 (δ_H 0,96) nhưng không có mối tương quan với H-24. Từ đó có thể nhận định cấu hình α cho vị trí H-3. Kết hợp so sánh với tài liệu tham khảo đã công bố xác định được hợp chất **WT6** là 3-*O*-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucuronopyranosyl] oleanolic acid 28-*O*- β -D-glucopyranosyl ester một hợp chất được công bố lần đầu từ chi *Wedelia*, tuy nhiên trước đó hợp chất này đã được công bố từ *Swartzia simplex* [107] và *Polyscias fruticosa* [106].

3.1.1.7. Hợp chất **WT7**: 4',4,6-trihydroxyaurone



Hình 3.20. Cấu trúc hóa học của hợp chất **WT7**

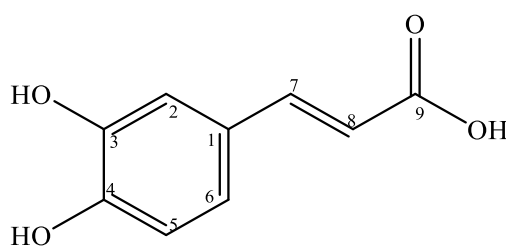
Hợp chất **WT7** thu được dưới dạng chất bột màu vàng. Phổ khối lượng ESI-MS cho các pic ion giả phân tử tại m/z 271 $[M+H]^+$, 293 $[M+Na]^+$, kết hợp với dữ liệu phổ NMR của **WT7** cho phép ta dự đoán CTPT của **WT7** là $C_{15}H_{10}O_5$, $M = 270$. Trên phổ 1H MNR của **WT7** xuất hiện tín hiệu của 7 proton thơm và olefin. Trong đó các tín hiệu tại δ_H 7,90 (2H, d, $J = 9,0$ Hz) và 6,95 (2H, d, $J = 8,5$ Hz) có cường độ mạnh gấp đôi, gợi ý một vòng thơm thế dạng A_2B_2 . Bên cạnh đó hai tín hiệu đặc trưng thế meta với nhau tại δ_H 7,11 (1 H, d, $J = 2,0$ Hz) và 6,72 (1H, d, $J = 2,0$ Hz). Ngoài ra một tín hiệu proton olefin bị cô lập hoàn toàn được xác định tại δ_H 6,70 ppm. Trên phổ ^{13}C NMR và DEPT thu nhận tín hiệu của 15 nguyên tử carbon trong khoảng từ 100,2-184,2 ppm. Tất cả các phân tích trên cho phép gợi ý hợp chất **WT7** là một flavone, và các nhóm thế trong **WT7** đều là OH khi phổ NMR không thu nhận sự xuất hiện của bất kì nhóm thế nào khác. Các phân tích dữ liệu trên gợi ý ta tới hợp chất 4',4,6-trihydroxyaurone. So sánh dữ liệu phổ với tài liệu đã công bố về 4',4,6-trihydroxyaurone [108] thấy sự phù hợp hầu hết các vị trí. Như vậy có thể khẳng định **WT7** chính là 4',4,6-trihydroxyaurone.

Bảng 3.7. Số liệu phổ NMR hợp chất **WT7** và hợp chất tham khảo

C	* δ_C^d	$\delta_C^{a,c}$	$\delta_H^{b,c}$ mult. (J in Hz)
2	150,0	158,3	-
3	179,0	184,3	-
4	167,5	167,0	-
5	97,6	104,2	7,11d (2,0)
6	167,5	167,0	-
7	100,4	100,2	6,72 d (2,0)
8	158,7	160,1	-
9	102,8	104,7	-
10	109,0	108,2	6,70 s
1'	123,3	123,0	-
2'	132,7	129,6	7,90 d, (9,0)
3'	115,9	117,0	6,95 d (8,5)
4'	158,1	158,3	-
5'	115,9	117,0	6,95 d (8,5)
6'	132,7	129,6	7,90 d, (9,0)

^a 125MHz, ^b 500 MHz, ^cCD₃OD, ^dDMSO-*d*₆, * δ_C của 4',4,6-trihydroxyaurone đo trong DMSO [108]

3.1.1.8. Hợp chất **WT8**: Caffeic acid



Hình 3.21 Cấu trúc hợp chất **WT8**

Hợp chất **WT8** thu được dưới dạng chất bột màu trắng nhạt. Phổ ¹H NMR xuất hiện 3 tín hiệu proton olefin đặc trưng của hệ vòng thơm ABX tại δ_H 7,01 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-2), 6,71 (1H, d, $J = 8,0$ Hz, H-5), 6,75 (1H, dd, $J = 2,0, 8,0$ Hz, H-6), hai proton của một liên kết đôi tại δ_H 7,40 (1H, d, $J = 16,0$ Hz, H-7), 6,15 (1H, d, $J = 16,0$ Hz, H-8). Với hằng số tương tác trên hai proton là rất lớn ($J = 16,0$ Hz) nên liên kết đôi ở mạch nhánh có cấu hình *trans*. Phổ ¹³C NMR xuất hiện 9 tín hiệu

nhóm nguyên tử carbon. Trong đó có 8 nguyên tử carbon trong vòng thơm và liên kết đôi dao động trong vùng trường δ_C (ppm): 114,0 - 148,34 ppm và nhóm cacboxylic tại δ_C 165,9 (C-9). Kết hợp so sánh với tài liệu tham khảo đã công bố [109] xác định được hợp chất **WT8** là caffeic acid.

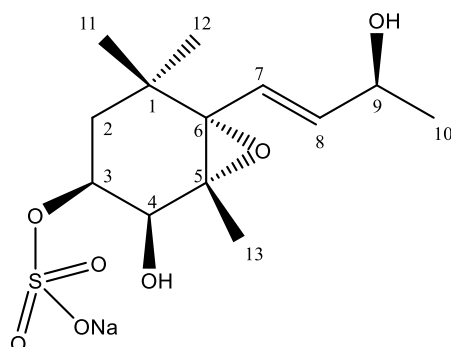
*Bảng 3.8. Số liệu phổ NMR hợp chất **WT8** và chất tham khảo*

C	*δ_C^d	$\delta_C^{a,c}$	$\delta_H^{b,c}$ mult. (J in Hz)
1	125,6	125,4	-
2	115,5	115,7	7,01 d (2,0)
3	145,5	145,5	-
4	148,0	148,3	-
5	115,1	114,8	6,71 d (8,0)
6	121,0	121,3	6,75 dd (2,0, 8,0)
7	144,4	145,1	7,40 d (16,0)
8	115,6	115,7	6,15 d (16,0)
9	167,7	165,9	-

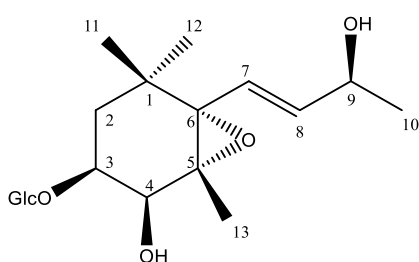
^a 125MHz, ^b 500 MHz, ^cDMSO-*d*₆, ^d60 MHz, * δ_C của caffeic acid đo trong DMSO-*d*₆ [109]

3.1.2. Xác định cấu trúc các hợp chất phân lập từ Sài đất *W. chinensis*

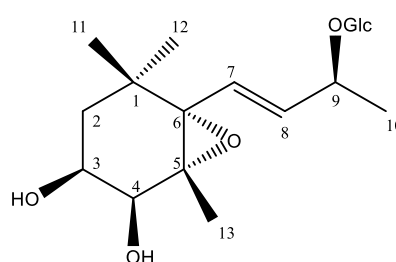
3.1.2.1. Hợp chất **WC1**: Wednenic (Hợp chất mới)



Cấu trúc hợp chất **WC1**



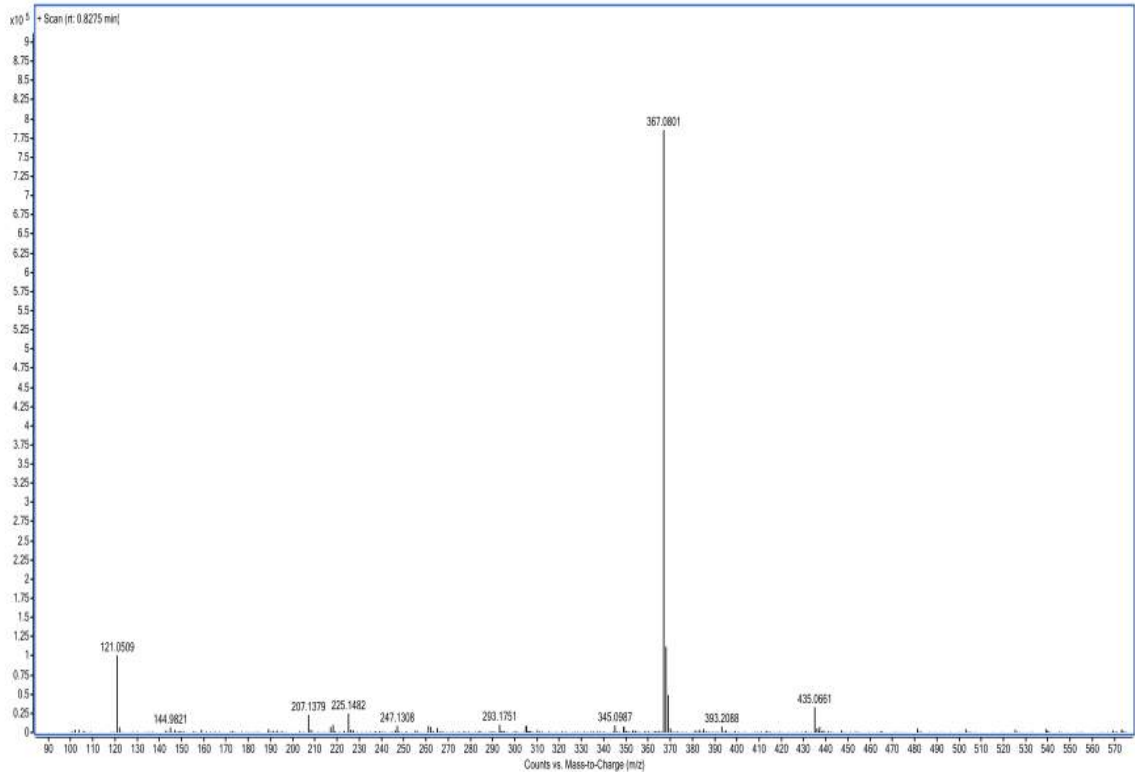
1: (3*S*,5*R*,6*S*,9*S*,7*E*)-megastigman-7-ene-5,6-epoxy-3,9-diol 3-*O*- β -D-glucopyranoside



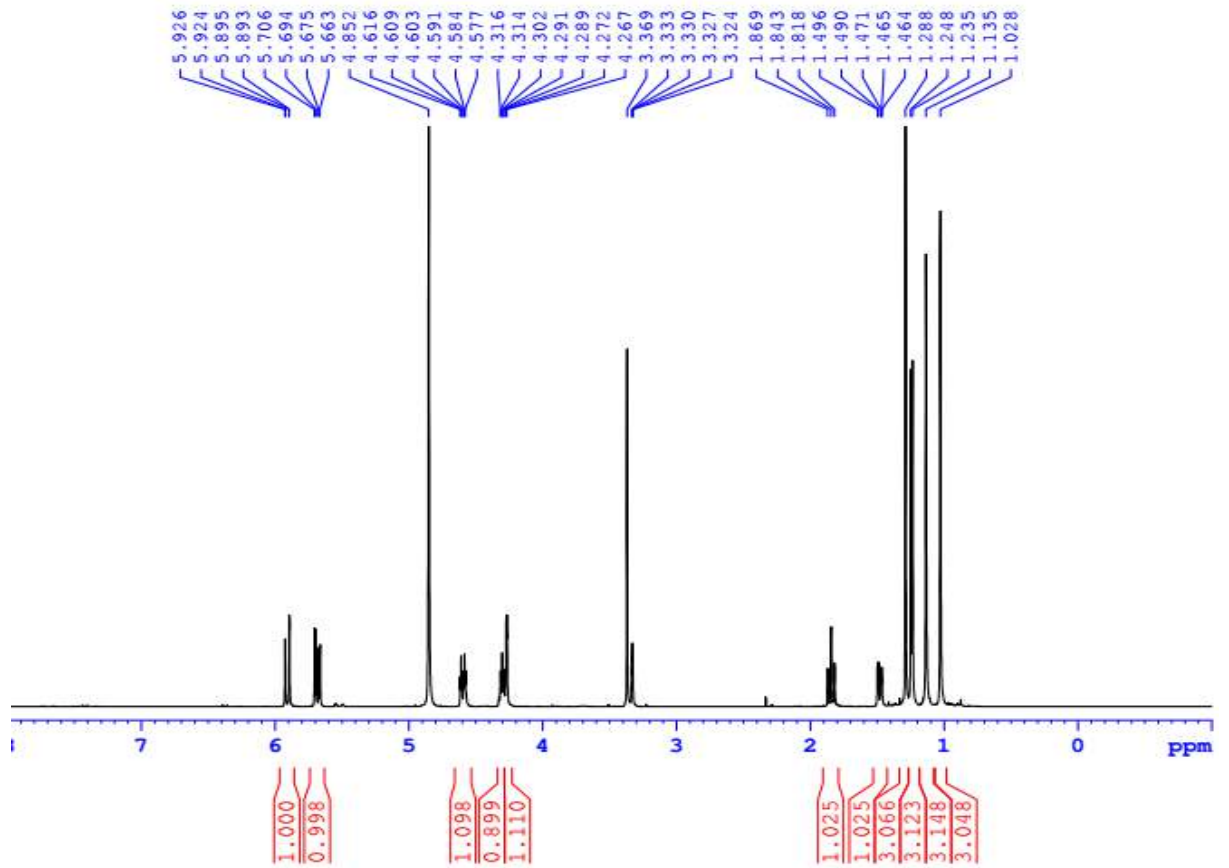
2: (3*S*,4*S*,5*R*,6*S*,9*S*,7*E*)-megastigman-7-ene-5,6-epoxy-3,4,9-triol 9-*O*- β -D-glucopyranoside

Hình 3.22. Cấu trúc hóa học của hợp chất **WC1** và các hợp chất so sánh

Hợp chất **WC1** thu được dưới dạng chất bột màu trắng với độ quay cực $[\alpha]_{\text{D}}^{24}$: -26,5 (c 0,25, MeOH). Phổ phân giải cao HR-ESI-MS của **WC1** xuất hiện các pic ion giả phân tử tại m/z 345,0987 $[\text{M}+\text{H}]^+$, tại m/z 367,0801 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ và phân mảnh tại m/z 225,1482 $[\text{M}-\text{SO}_4\text{Na}]^+$ gợi ý sự xuất hiện của một nhóm sulfate trong cấu trúc của **WC1** với công thức phân tử của **WC1** là $\text{C}_{13}\text{H}_{21}\text{O}_7\text{SNa}$. Trên phổ ^1H NMR của **WC1** xuất hiện tín hiệu của 4 nhóm methyl tại δ_{H} 1,24 (3H, d, $J = 6,0$ Hz, H-10), δ_{H} 1,03 (3H, s, H-12), δ_{H} 1,13 (3H, s, H-11) và δ_{H} 1,28 (3H, s, H-13). Bên cạnh đó tín hiệu của một cặp proton methylene được xác định tại δ_{H} 1,47 (1H, dd, $J = 3,5, 12,5$ Hz, $\text{H}_{\text{a}}-2$) và δ_{H} 1,84 (1H, t, $J = 12,5$ Hz, $\text{H}_{\text{b}}-2$).

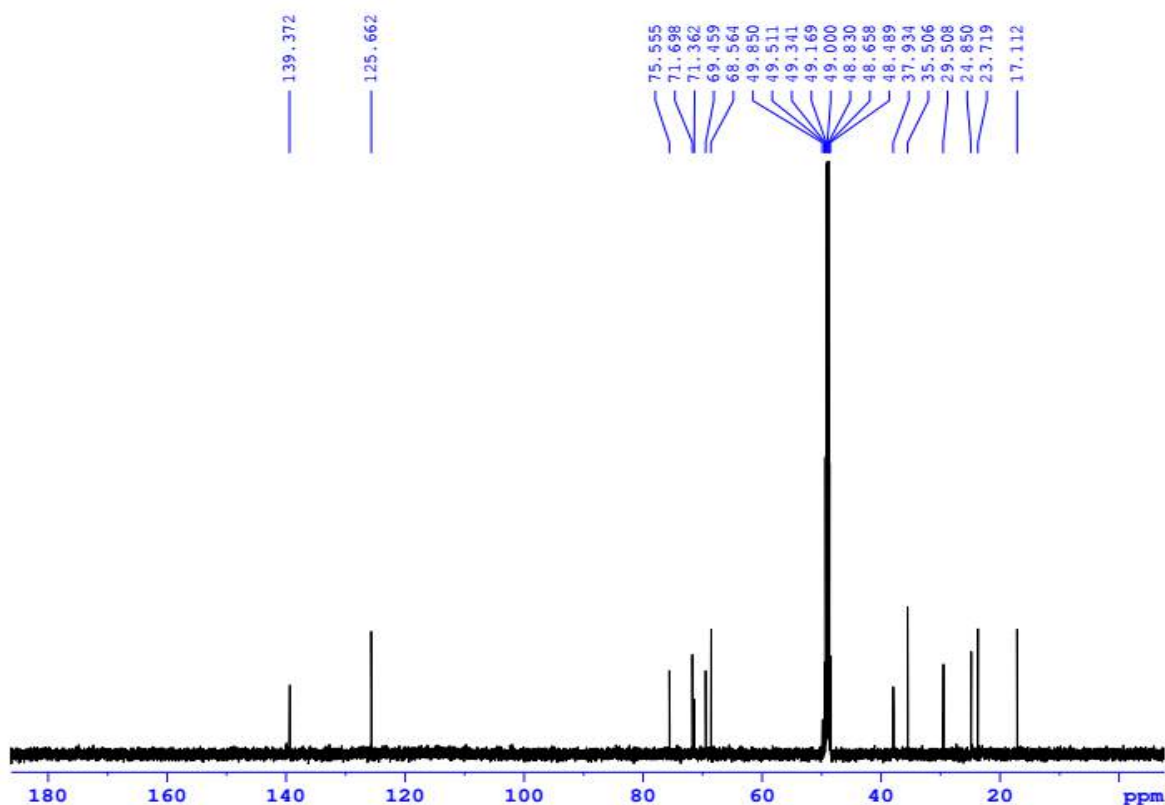


Hình 3.23. Phổ HR-ESI-MS của WC1



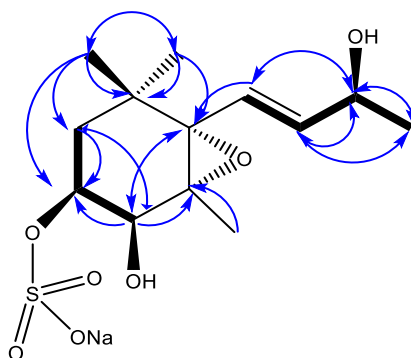
Hình 3.24. Phổ ¹H-NMR của WC1

Ngoài ra trên phổ proton của **WC1** còn cho thấy sự hiện diện của 3 nhóm oxi methine tại δ_H 4,40 (1H, ddd, $J = 3,0, 3,5, 12,5$ Hz, H-3), δ_H 4,27 (1H, dd, $J = 1,0, 3,0$ Hz, H-4) và δ_H 4,31 (1H, dd, $J = 6,0, 12,5$ Hz, H-9). Tín hiệu của 2 proton olefin được xác định tại δ_H 5,92 (1H, dd, $J = 1,0, 16,5$ Hz, H-7) và δ_H 5,69 (1H, dd, $J = 6,0, 16,5$ Hz, H-8). Hằng số ghép cặp lớn ($J = 16,5$ Hz) giữa H-7 và H-8 chứng minh cấu hình *E* của nối đôi giữa C-7 và C-8.



Hình 3.25. Phổ ^{13}C NMR của hợp chất **WC1**

Trên phổ ^{13}C NMR và DEPT của **WC1** xuất hiện tín hiệu của 13 nguyên tử carbon bao gồm tín hiệu của 4 nhóm methyl được xác định tại δ_C 23,7 (C-10), 24,8 (C-11), 29,5 (C-12) và 17,1 (C-13), một nhóm methylene tại δ_C 37,9 (C-2), hai nhóm oxi methine tại δ_C 71,6 (C-4), 68,5 (C-9) và một nhóm oxi methine liên kết với một gốc sunfate được xác định tại δ_C 75,5 (C-3), tín hiệu của 3 nguyên tử carbon không mang hidro được xác định tại δ_C 35,5 (C-1), 69,4 (C-5), 71,3 (C-6), cùng một cặp nguyên tử carbon *trans*-olefin tại δ_C 125,6 (C-7), và 139,3 (C-8). Từ các dữ liệu phổ trên gợi ý hợp chất **WC1** là một megastigmane.



Hình 3.26. Các tương tác chính trên phổ HMBC (H→C), COSY (H—H) của hợp chất WC1

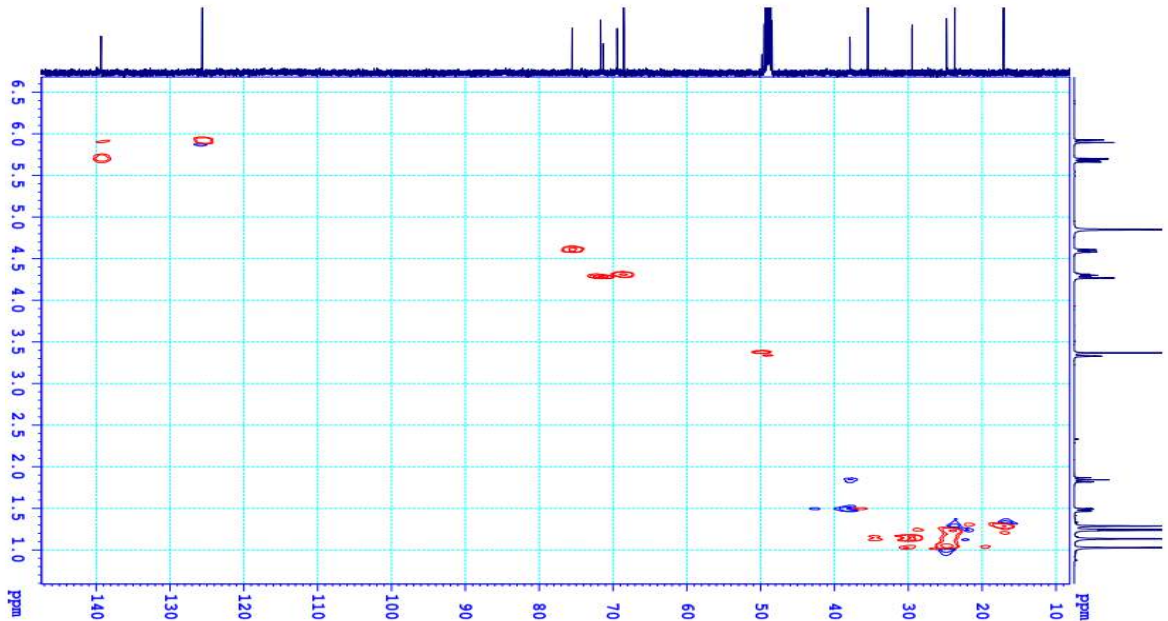
Bảng 3.9. Số liệu phổ NMR của WC1 và các hợp chất tham khảo

C	¹ δ _C ^{d,c}	² δ _C ^{d,c}	δ _C ^{a,c}	δ _H ^{b,c} mult. (J = Hz)
1	35,9	35,5	35,5	-
2	45,5	40,5	37,9	1,47 dd (3,5, 12,5) 1,84 t (12,5)
3	73,0	66,7	75,5	4,60 ddd (3,0, 3,5, 12,5)
4	38,5	73,3	71,6	4,27 d (3,0)
5	67,8	69,7	69,4	-
6	71,3	71,6	71,3	-
7	125,7	129,6	125,6	5,92 dd (1,0, 16,5)
8	139,0	136,2	139,3	5,69 dd (6,0, 12,5)
9	68,7	74,4	68,5	4,31 dd (6,0, 12,5)
10	23,9	22,4	23,7	1,24 d (6,0)
11	29,8	29,8	29,5	1,13 s
12	25,2	24,9	24,8	1,03 s
13	20,3	17,8	17,1	1,28 s

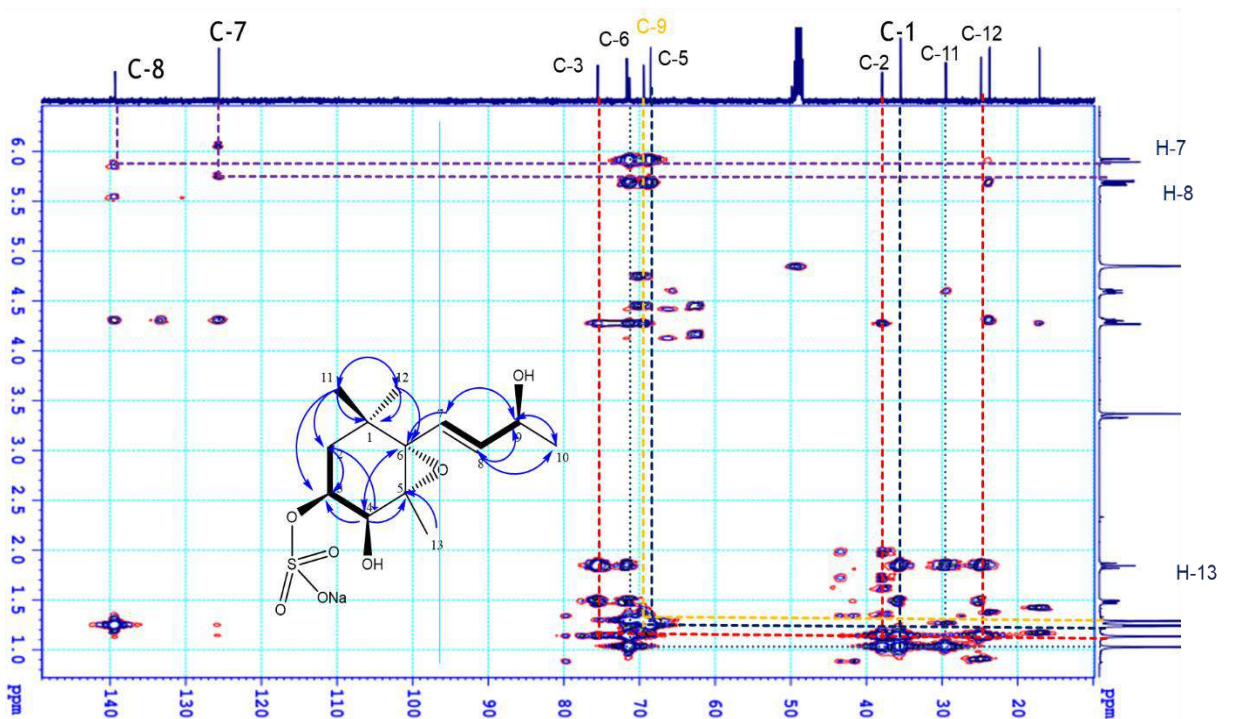
^a125MHz, ^b500 MHz, ^d100 MHz, ^cCD₃OD, ¹δ_C của (3*S*,5*R*,6*S*,7*E*,9*S*) megastigman-7-ene-5,6-epoxy-3,9-diol 3-*O*-β-D-glucopyranoside đo trong CD₃OD [110], ²δ_C của (3*S*,4*S*,5*R*,6*S*,9*S*,7*E*)-megastigman-7-ene-5,6-epoxy-3,4,9-triol 9-*O*-β-D-glucopyranoside đo trong CD₃OD [96].

Liên kết giữa C-2/C-3/C-4 và C-7/C-8/C-9 được xác định dựa trên phổ HSQC và COSY với các tương tác giữa các proton liền kề nhau như: H-2 (δ_H 1,47, 1,84)/H-3 (δ_H 4,64)/H-4 (δ_H 4,27) và H-7 (δ_H 5,92)/H-8 (δ_H 5,69)/H-9 (δ_H 4,31)/H-10 (δ_H

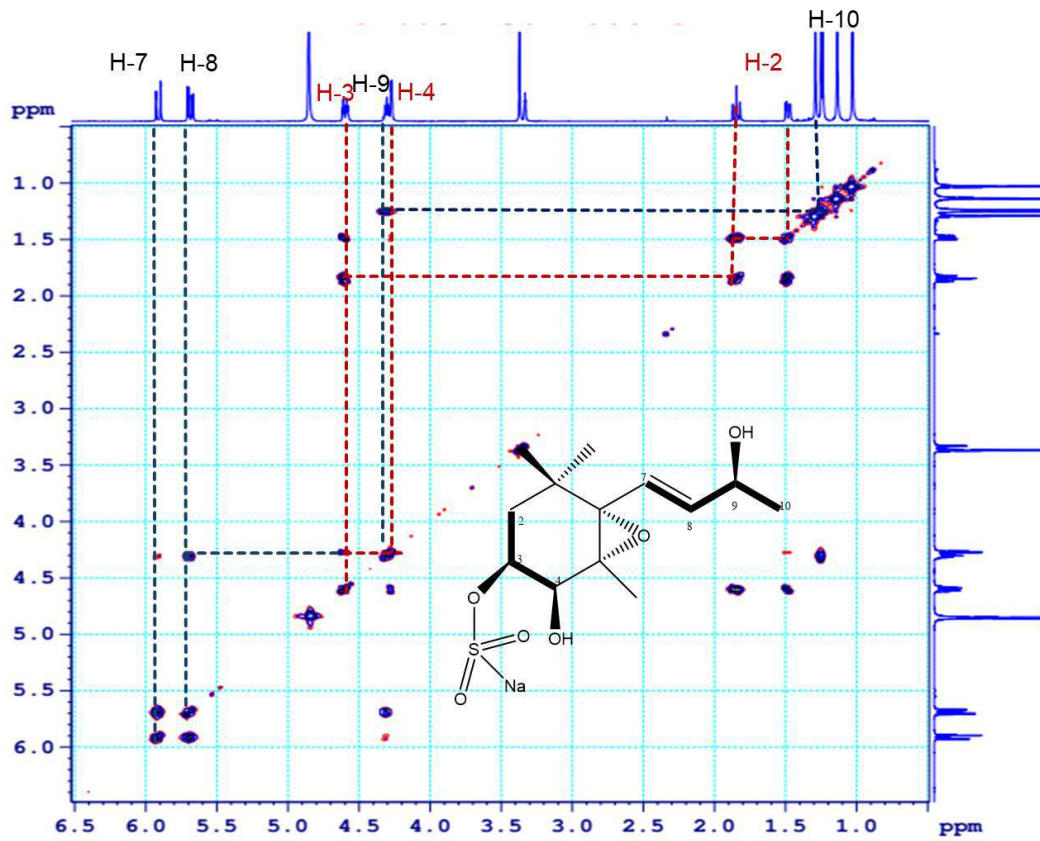
1,24) (Hình 3.26). Tương tác giữa H-4, H-7, H-8, H-12 và H-13 với C-6 cho phép xác định vị trí liên kết của C-7 và các nhóm methyl. Các tín hiệu phổ của hợp chất **WC1** tương đồng với dữ liệu của hợp chất (3*S*,4*S*,5*R*,6*S*,9*S*,7*E*)-megastigman-7-ene-5,6-epoxy-3,4,9-triol 9-*O*- β -D-glucopyranoside nhưng có đôi chút khác biệt ở vị trí C-3 và C-4 do có thêm liên kết với nhóm natri sulfonate và hydroxy được xác định thông qua các tương tác trên phổ HMBC.



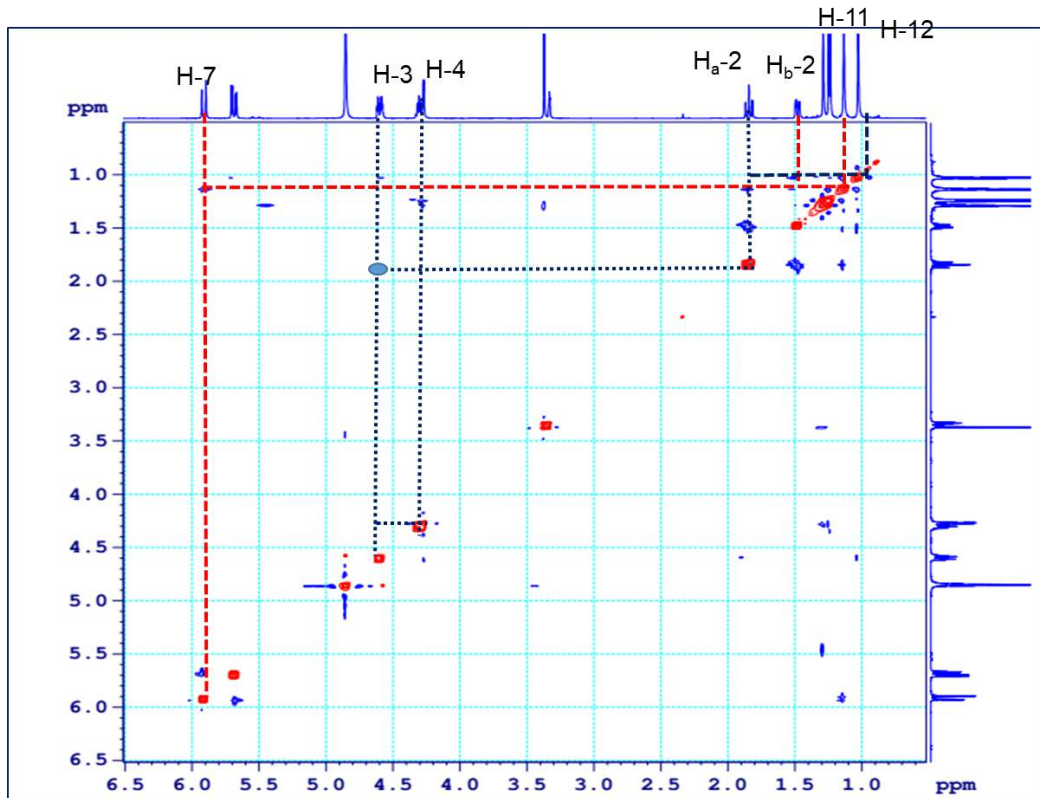
Hình 3.27. Phổ HSQC của hợp chất **WC1**



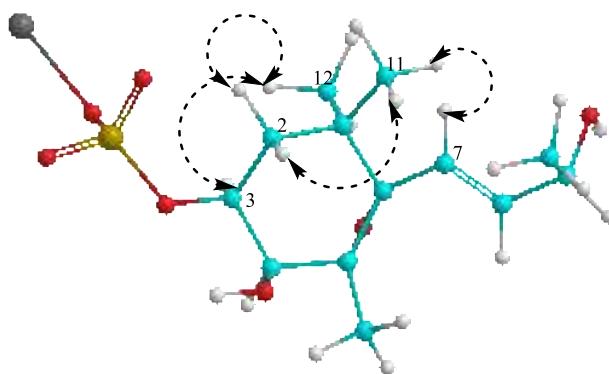
Hình 3.28. Phổ HMBC của hợp chất **WC1**



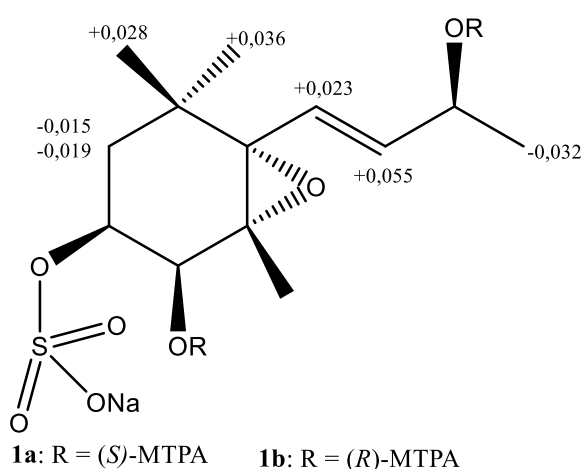
Hình 3.29. Phổ COSY của hợp chất WC1



Hình 3.30. Phổ NOESY của hợp chất WC1



Hình 3.31. Tương tác chính trên phổ NOESY ($\leftarrow\text{---}\rightarrow$) của WC1

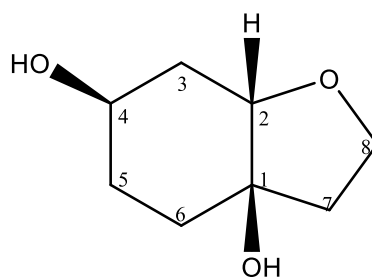


Hình 3.32. Giá trị $\Delta\delta_{\text{H}}^{(S-R)}$ của các este MTPA của hợp chất WC1

Cấu hình α của H-3 được xác định thông qua tương tác giữa H-3 với H_a-2, H-12 và tương tác của H-7, H_b-2 với H-11 và H-8 trên phổ NOESY. Ngoài ra, hằng số ghép cặp $J = 12,5$ Hz của H-3 với H_a-2 cũng cho phép xác định vị trí axial của proton H-3. Bên cạnh đó, tương tác trên phổ NOESY giữa H-4 và H-3 cũng chứng minh cho liên kết dạng equatorial của H-4 cũng như cấu dạng α ở các vị trí này. Hằng số ghép cặp của H-3 [δ_{H} 4,60 (1H, ddd, $J = 3,0, 3,5, 12,5$ Hz)] và H-4 [δ_{H} 4,27 (1H, dd, $J = 1,0, 3,0$ Hz)] trùng khớp với các thông số tương ứng của hợp chất (3*S*,4*S*,5*R*,6*S*,9*S*,7*E*)-megastigman-7-ene-5,6-epoxy-3,4,9-triol 9-*O*- β -D-glucopyranoside đo trong cùng dung môi [δ_{H} 3,79 (1H, ddd, $J = 3,0, 3,0, 12,0$ Hz, H-3) và 3,88 (1 H, dd, $J = 1,0, 3,0$ Hz, H-4)]. Những điều này cho phép kết luận hai hợp chất có cấu hình tương tự nhau tại C-3 và C-4 [111]. Độ chuyển dịch hóa học của C-5 (δ_{C} 69,4) và C-6 (δ_{C} 71,3) cũng tương tự số liệu phổ ^{13}C NMR (đo trong CD_3OD) của (3*S*,4*S*,5*R*,6*S*,9*S*,7*E*)-megastigman-7-ene-5,6-epoxy-3,4,9-triol 9-*O*- β -D-glucopyranoside [δ_{C} 69,7 (C-5) và 71,6 (C-6)] [111] và khác biệt so với số liệu

phổ của một hợp chất có cấu hình 5*S*,6*R* là (3*S*,4*S*,5*S*,6*R*,7*E*,9*S*)-5,6-epoxy-3,4,9-trihydroxy-7-megastigmen-3-*O*- β -D-glucopyranoside (komaroveside C) [δ_C 68.2 (C-5) và 70.4 (C-6)] [112]. Do đó, có thể xác định cấu hình 5*R*, 6*S* của hợp chất **WC1**. Để xác định cấu hình tuyệt đối tại C-9 ta tiến hành điều chế hai dẫn xuất (*S*)- và (*R*)-MTPA ester của **WC1** (xem mục 2.2.2.6), thông qua giá trị $\Delta\delta$ của hai dẫn xuất (*S*)- và (*R*)-MTPA ester (Hình 3.32). Theo quy tắc của Mosher cấu hình tại C-9 của **WC1** được xác định là cấu hình *S* [92, 110, 113, 114]. Từ các phân tích dữ liệu phổ nói trên, cấu trúc của hợp chất **WC1** được xác định là (3*S*,4*S*,5*R*,6*S*,9*S*,7*E*)-megastigman-5,6-epoxy-7-ene-4,9-diol-3-natri sulfonate, một hợp chất mới đặt tên là wedenic.

3.1.2.2. Hợp chất **WC2**: Cleroindicin E



Hình 3.33. Cấu trúc hợp chất **WC2**

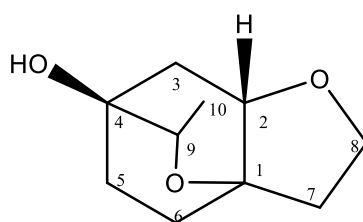
Hợp chất **WC2** thu được dưới dạng chất dầu không màu. Phổ khối lượng phun mù điện tử ESI-MS xuất hiện pic ion giả phân tử tại m/z 159 $[M+H]^+$ gợi ý hợp chất **WC2** có KLPT $M = 158$, kết hợp với dữ liệu phổ NMR của **WC2** cho phép xác định công thức phân tử của **WC2** là $C_8H_{14}O_3$. Phổ 1H NMR của **WC2** xuất hiện tín hiệu của hai nhóm oxymethine tại δ_H 3,95 (1H, m, H-4) và 3,93 (1H, m, H-2). Bên cạnh đó phổ proton cho thấy sự xuất hiện của bốn nhóm methylene và một nhóm oxymethylene được xác định tại δ_H 3,85 (2H, m, H-8). Phổ ^{13}C NMR và DEPT của **WC2** cho thấy sự xuất hiện tín hiệu của 8 nguyên tử carbon bao gồm 2 nhóm methine tại δ_C 82,3 (C-2), và 66,7 (C-4), một nhóm oxymethylene tại 66,0 (C-8), 4 nhóm methylene tại δ_C 35,8 (C-3), 31,0 (C-5), 32,7 (C-6), 39,4 (C-7) và một carbon không mang hydro tại δ_C 75,2 (C-1). So sánh số liệu phổ của **WC2** với tài liệu đã công bố trước đó về hợp chất cleroindicin E [110, 115-117] cho thấy phù hợp ở tất cả các vị trí. Như vậy có thể khẳng định **WC2** là cleroindicin E.

Bảng 3.10. Số liệu phổ NMR của **WC2** và chất tham khảo

C	# δ_C^d	$\delta_C^{a,c}$	$\delta_H^{b,c}$ mult. (J in Hz)
1	75,3	75,2	-
2	82,3	82,1	3,93 m
3	36,8	35,8	1,97 m
4	66,4	66,7	3,95 m
5	31,8	31,0	1,96 m
6	33,2	32,7	1,73 m, 1,97 m
7	39,8	39,4	
8	65,4	66,0	3,85 m

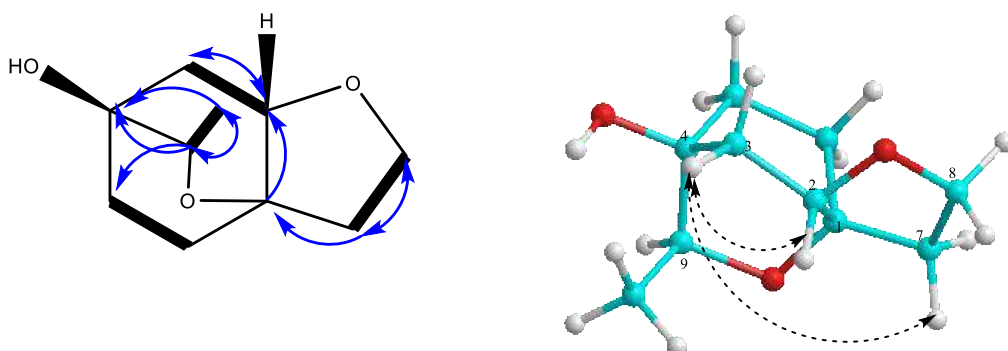
^a125MHz, ^b500 MHz, ^cCD₃OD, ^d100 MHz, # δ_C của cleroidicin E đo trong pyridine-*d*₅ [117].

3.1.2.3. Hợp chất **WC3**: Wednenol (Hợp chất mới)

Hình 3.34. Cấu trúc hóa học của **WC3**

Hợp chất **WC3** thu được dưới dạng chất dầu không màu. Trên phổ khối lượng phân giải cao HR-ESI-MS của **WC3** xuất hiện pic ion giả phân tử tại m/z 185,1170 $[M + H]^+$, kết hợp với sự xuất hiện tín hiệu của 10 nguyên tử carbon trên phổ ¹³C NMR, gợi ý công thức phân tử của **WC3** là C₁₀H₁₆O₃. Trên phổ ¹H NMR, các tín hiệu được quan sát cho thấy tín hiệu của một nhóm methyl tại δ_H 1,15 (d, $J = 6,5$ Hz, H-10), hai nhóm oxymethine tại δ_H 4,00 (dd, $J = 6,0, 9,5$ Hz, H-2) và 3,51 (q, $J = 6,5$ Hz, H-9), nhóm methylene oxy hóa tại δ_H 3,95 (ddd, $J = 3,0, 8,0, 9,5$ Hz, H_a-8) và 4,05 (dd, $J = 8,0, 8,5$ Hz, H_b-8)], và bốn nhóm methylene (Bảng 3.11). Trên phổ ¹³C NMR của **WC3** xuất hiện tín hiệu 10 nguyên tử carbon, bao gồm một nhóm methyl tại δ_C 17,0 (C-10), hai nhóm methine tại δ_C 83,3 (C-2) và 4,3 (C-9)], methylene oxy hóa [δ_C 66,4 (C-8)], và bốn methylene tại [δ_C 37,5 (C-3), 29,2 (C-5), 30,5 (C-6), và 36,0 (C-7)], gợi ý **WC3** là một cyclohexylethanoid [116]. Phân

tích dữ liệu ^1H và ^{13}C NMR của **WC3** (Bảng 3.11) gợi ý rằng hợp chất này có cấu trúc tương tự với **WC2**, ngoại trừ sự xuất hiện cầu liên kết oxi giữa C-1 và C-9 trong **WC3**. [110, 116, 117].



Hình 3.35. Các tương tác chính trên phổ
HMBC ($\text{H} \rightarrow \text{C}$), COSY ($\text{H} - \text{H}$), NOESY ($\leftarrow \text{---} \rightarrow$) của **WC3**

Bảng 3.11. Số liệu phổ NMR của **WC3** và hợp chất tham khảo

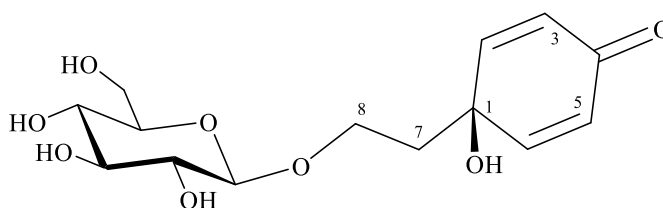
C	# δ_{C}	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,c}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{b,c}}$ mult. (J in Hz)
1	75,3	79,4	-
2	82,3	83,3	4,00 dd (6,0, 9,5)
3	36,8	37,5	1,39 dd (6,0, 13,5) 1,80 m
4	66,4	75,4	-
5	31,8	29,2	1,53 ddd (4,5, 9,5, 13,5) 1,66 m
6	33,2	30,5	1,93 ddd (4,0, 11,5, 13,5) 2,09 ddd (4,0, 7,5, 13,5)
7	39,8	36,0	1,76 ddd (4,0, 8,0, 12,5) 2,22 ddd (8,0, 9,5, 12,5)
8	65,4	66,4	3,95 ddd (3,0, 8,0, 9,0) 4,05 dd (8,0, 8,5)
9		74,3	3,51 q (6,5)
10		17,0	1,15 d (6,5)

^a 125MHz, ^b500 MHz, ^cCD₃OD, # δ_{C} của cleroidicin E đo trong pyridine-*d*₅ [117].

Phổ COSY của **WC3** cho thấy tương quan giữa H-5 và H-6, giữa H-7 và H-8, giữa H-2 và H-3, và giữa H-9 và H-10 (Hình 3.35). Quan sát trên phổ HMBC cho

thấy các tương tác giữa H-10 và C-4/C-9, giữa H-9 và C-3/C-4/C-5 cho phép xác định vị trí của các nhóm methyl và oxymethine. Khác với hợp chất cleroidicin E tại vị trí C-1 có sự chuyển dịch về trường thấp từ 75,8 xuống 79,4, điều này có thể được giải thích bởi sự hiện diện của liên kết ete C-1 và C-9 trong **WC3**. Những dữ kiện trên gợi ý cấu trúc **WC3** là 1,2,4-trioxygenated-cyclohexylethanoid. Tiếp tục phân tích chi tiết các phổ NOESY cho thấy tương tác giữa H-2 [δ_H 4,00 (1H, dd, $J = 6,0, 9,5$ Hz)] với H_a-3 và H_a-7, và hằng số tương tác ($J = 6,0$ Hz) giữa H-2 (δ_H 4,00) và H_a-3 (δ_H 1.39) gợi ý một liên kết equatorial. Bên cạnh đó trên phổ NOESY cho thấy liên kết equatorial giữa H_a-3 và H-9 với hằng số tương tác $J = 6,5$ Hz. Từ các phân tích dữ liệu phổ thu được, kết hợp so sánh với các công bố trước đó của các hợp chất tương tự có thể được xác định **WC3** là một chất mới và được đặt tên là wednenol.

3.1.2.4. Hợp chất **WC4**: Cornoside



Hình 3.36. Cấu trúc hợp chất **WC4**

Hợp chất **WC4** thu được dưới dạng dầu màu nâu. Trên phổ ^1H NMR của **WC4** xuất hiện tín hiệu cộng hưởng của một nhóm methylene tại δ_H 2,07 (2H, t, $J = 6,5$ Hz, H-7), hai tín hiệu một nhóm oxymethylene tại [δ_H 3,87 (1H, dt, $J = 6,5$ Hz, H_a-8) và 4,01 (1H, dt, $J = 6,5$ Hz, H_b-8)]. Ngoài ra trên phổ ^1H -NMR của **WC4** còn cho thấy sự xuất hiện tín hiệu của proton anome của phân tử đường tại δ_H 4,24 (1H, d, $J = 8,0$ Hz, H-1'), với hằng số tương tác lớn ($J_{1,2} = 8,0$ Hz) gợi ý phân tử đường có cấu hình β . Bên cạnh đó, phổ proton còn xuất hiện 6 tín hiệu phân tử đường trong vùng trường 3,69 - 3,16 (6H, H₂'/H-3'/H-4'/H-5'/H-6') và hai tín hiệu của hai proton olefin tại δ_H 6,14 (2H, dd, $J = 8,0, 1,5$ Hz, H-2, H-6) và 7,04 (2H, dd, $J = 8,0, 1,5$ Hz, H-3, H-5). Phổ ^{13}C NMR xuất hiện một tín hiệu đặc trưng của nhóm keton tại δ_C 188,0 (C-4), 2 tín hiệu chập của hai liên kết đối xứng nhau tại δ_C 154,4 (C-2/C-6) và 127,9 (C-3/C-5), hai tín hiệu của nhóm methylene tại 65,7 (C-8) và 41,0 (C-7). Ngoài ra trên phổ ^{13}C NMR còn xuất hiện 6 tín hiệu đặc trưng của phân tử đường

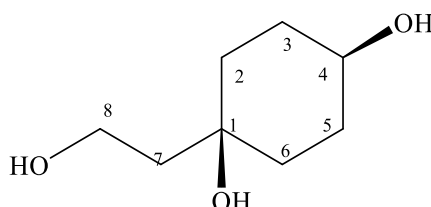
glucose tại δ_C 104,3 (C-1'), 75,0 (C-2'), 78,5(C-3'), 71,6 (C-4'), 77,9 (C-5'), 62,7(C-6'). Qua những phân tích trên kết hợp so sánh tài liệu tham khảo đã công bố [116] có thể kết luận **WC4** là cornoside.

Bảng 3.12. Số liệu phổ NMR của hợp chất **WC4** và chất tham khảo

C	* δ_C^d	$\delta_C^{a,c}$	$\delta_H^{b,c}$ mult. (J in Hz)
1	69,1	69,3	-
2	153,7	154,4	7,04 dd (8,0, 1,5)
3	127,1	127,9	6,14 dd (8,0, 1,5)
4	185,8	188,0	-
5	127,1	127,9	6,14 dd (8,0, 1,5)
6	153,7	154,4	7,04 dd (8,0, 1,5)
7	41,0	41,0	2,07 t (6,5)
8	65,2	65,7	3,87 t (6,5) 4,01 t (6,5)
1'	104,7	104,3	4,24 d (8,0)
2'	75,1	75,0	3,17 dd (8,0, 9,0)
3'	78,5	78,5	3,63 m
4'	71,6	71,6	3,64 m
5'	78,4	77,9	
6'	62,7	62,7	3,87 dd (2,0, 10,5) 3,68 m

^a 125MHz, ^b500 MHz, ^cCD₃OD, ^dpyridine-*d*₅, * δ_C của cornoside đo trong pyridine-*d*₅ [116].

3.1.2.5. Hợp chất **WC5**: Rengyol



Hình 3.37. Cấu trúc hợp chất **WC5**

Hợp chất **WC5** thu được dưới dạng chất bột màu trắng. Phổ ¹H NMR của **WC5** xuất hiện tín hiệu của các nhóm methylene trong khoảng δ_H 1,37-1,75 (10H, m, H-2, H-3, H-5, H-6, H-7), một nhóm oxymethylene tại δ_H 3,75 (2H, t, $J = 7,5$ Hz,

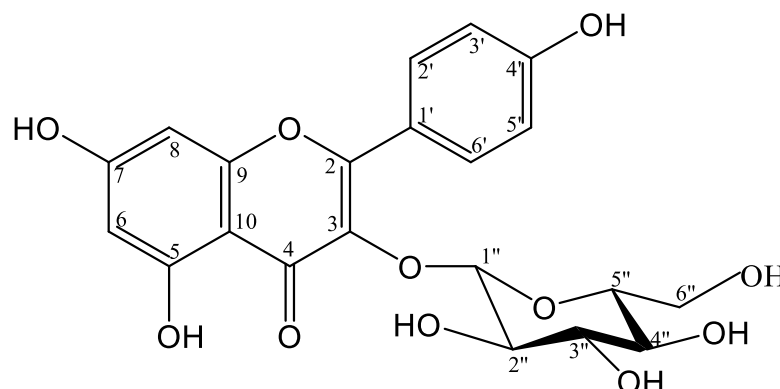
H-8) và một tín hiệu của nhóm oxymethine tại δ_H 3,54 (1H, br q, $J = 5,0$, H-4). Phổ ^{13}C NMR xuất hiện tín hiệu của một nhóm oxymethylene tại δ_C 59,1 (C-8), một oxymethin tại δ_C 70,7 (C-1) và một nhóm carbon không liên kết với hydro tại δ_C 70,7 (C-4). Bên cạnh đó tín hiệu của các nhóm methylene cũng được ghi nhận tại δ_C 36,0 (C-2/C-6), 31,2 (C-3/C-5) và 45,5 (C-7). Hai cặp giá trị trùng nhau gợi ý trong công thức phân tử của **WC5** có chứa vòng cyclohexane đã bị thế 2 vị trí 1,4 (para). Qua những phân tích trên phổ NMR của hợp chất **WC5**, kết hợp với các tài liệu đã công bố trước đó về hợp chất rengyol [116], cho thấy sự phù hợp ở tất cả các vị trí, cho phép ta xác định được **WC5** là rengyol.

Bảng 3.13. Dữ liệu phổ NMR hợp chất **WC5** và chất tham khảo

C	# δ_C^d	$\delta_C^{a,c}$	$\delta_H^{b,c}$ mult. (J in Hz)
1	70,1	70,7	-
2	36,2	36,0	1,63 m
3	31,8	31,2	1,74 m
4	69,8	70,7	3,54 br q (5,0)
5	31,8	31,2	1,74 m
6	36,2	36,0	1,63 m
7	45,2	45,5	1,45 t (6,5)
8	58,9	59,1	3,75 t (7,5)

^a125MHz, ^b500 MHz, ^cCD₃OD, ^dDMSO-*d*₆, [#] δ_C của rengyol đo trong DMSO-*d*₆ [116].

3.1.2.6. Hợp chất **WC6**: Kaempferol-3-O- β -D-glucoside



Hình 3.38. Cấu trúc hợp chất **WC6**

Hợp chất **WC6** thu được dưới dạng chất bột, màu vàng, phổ khối lượng ESI-MS xuất hiện pic ion phân tử tại m/z 449 $[\text{M}+\text{H}]^+$, kết hợp với phổ NMR của **WC6** cho phép xác định công thức phân tử của **WC6** là $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{11}$, KLPT $M = 448$. Các

phổ NMR của nó đặc trưng cho một hợp chất có khung flavonoid. Trên phổ ^1H NMR, tại vùng trường trung bình đặc trưng cho tín hiệu của các olefin vòng thơm xuất hiện tín hiệu của 6 proton, trong đó có một hệ vòng thơm kiểu A_2B_2 được xác định bởi hai tín hiệu có cường độ pic mạnh gấp đôi tại δ_{H} 6,88 (2H, dd, $J = 2,0, 7,0$ Hz, H-3', H-5'), 8,04 (2H, dd, $J = 2,0, 8,0$ Hz, H-2', H-6') và hai proton thế dạng meta với nhau tại δ_{H} 6,20 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-8), 6,40 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-6). Bên cạnh đó phổ ^1H NMR cũng xác định sự có mặt của một phân tử đường với tín hiệu proton anome tại δ_{H} 5,42 (1H, d, $J = 7,5$ Hz, H-1'').

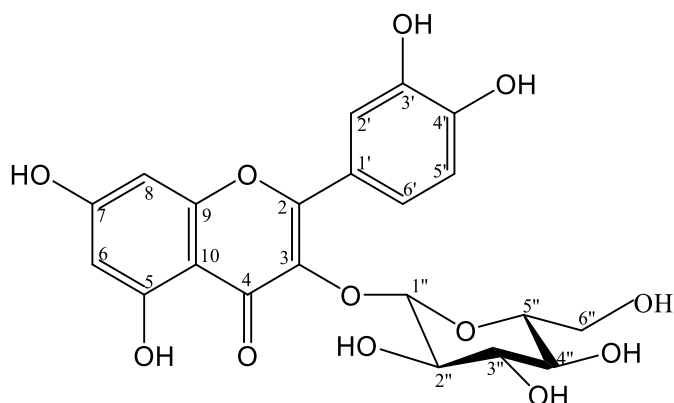
Các tín hiệu trên phổ ^{13}C NMR gồm 21 nguyên tử carbon, trong đó có 6 nhóm CH thuộc vòng thơm, 9 carbon không liên kết hydro và 6 nguyên tử carbon đặc trưng cho một phân tử đường, gợi ý rằng hợp chất **WC6** có khung flavonoid và vòng B có dạng kaempferol với các tín hiệu tại δ_{C} 121,1 (C-1'), 131,1 (C-2', C-6'), 115,4 (C-3', C-5'), 160,1 (C-4'). Bên cạnh đó phổ ^{13}C NMR của hợp chất **WC6** xuất hiện hai tín hiệu tại δ_{C} 93,7 và 98,7 rất đặc trưng cho hai vị trí C-8, C-6 của vòng A khi hai vị trí C-5 và C-7 đều bị thế. Ngoài ra sự xuất hiện của một phân tử đường glucose cũng được xác định với các tín hiệu rất đặc trưng tại δ_{C} 101,1 (C-1'')/ δ_{H} 5,42 (1H, d, $J = 7,5$ Hz), 74,4 (C-2'')/3,17 (1H, d, $J = 4,0$ Hz), 77,62 (C-3'')/3,21 (1H, d, $J = 3,5$ Hz), 70,1 (C-4'')/3,08 (1H, s), 76,1 (C-5'')/3,25 (1H, m), 60,9 (C-6''). Hằng số tương tác lớn ($J_{1,2} = 7,5$ Hz) gợi ý phân tử đường có cấu dạng β . Từ các dữ kiện trên kết hợp so sánh với tài liệu tham khảo [118] đã công bố về kaempferol-3-*O*- β -D-glucopyranoside cho thấy có sự phù hợp ở tất cả các vị trí (Bảng 3.14). Như vậy có thể khẳng định **WC6** là kaempferol-3-*O*- β -D-glucoside hay còn có tên gọi khác là astragalín.

Bảng 3.14. Số liệu phổ NMR của hợp chất **WC6** và chất tham khảo

C	# δ_C^d	$\delta_C^{a,c}$	$\delta_H^{b,c}$ mult. (<i>J</i> in Hz)
2	156,7	156,6	-
3	133,5	133,4	-
4	177,6	177,7	-
5	160,8	161,4	-
6	99,3	98,9	6,20 d (2,0)
7	162,2	164,3	-
8	94,5	93,9	6,42d (2,0)
9	156,0	156,6	-
10	105,5	104,2	-
1'	120,7	121,1	-
2', 6'	130,9	131,1	8,04 dd (2,0, 7,0)
3', 5'	115,1	115,4	6,88 dd (2,0, 7,0)
4'	160,2	160,1	-
1''	100,8	101,1	5,42 d (7,5)
2''	74,2	74,4	3,17 d (4,0)
3''	77,5	77,6	3,21 d (3,5)
4''	69,9	70,1	3,08 s
5''	76,4	76,1	3,25 m
6''	60,8	60,9	3,56 dd (5,0, 12,0) 3,21 m

^a125 MHz, ^b500 MHz, ^cDMSO-*d*₆, ^d100 MHz, # δ_C của kaempferol-3-*O*- β -D-glucoside đo trong DMSO-*d*₆ [118]

3.1.2.7. Hợp chất WC7: Quercetin-3-O- β -D-glucopyranoside



Hình 3.39. Cấu trúc hợp chất WC7

Hợp chất WC7 thu được dưới dạng chất bột màu vàng, phổ khối lượng ESI-MS xuất hiện pic ion giả phân tử tại m/z 464 $[M+H]^+$ gợi ý hợp chất có KLPT $M = 463$, CTPT $C_{21}H_{19}O_{12}$. Các phổ NMR của WC7 đặc trưng cho một hợp chất có khung flavonoid. Trên phổ 1H -NMR, tại vùng trường trung bình đặc trưng cho tín hiệu của các olefin vòng thơm xuất hiện tín hiệu của 5 proton, trong đó có một hệ vòng thơm kiểu ABX được xác định tại δ_H 7,73 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-2'), 6,89 (1H, d, $J = 8,5$ Hz, H-5'), 7,60 (1H, dd, $J = 2,0, 8,5$ Hz, H-6'), hai proton ở vị trí meta với nhau tại δ_H 6,21 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-6), 6,39 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-8). Bên cạnh đó phổ proton cũng xác định sự có mặt của một phân tử đường với tín hiệu proton anome tại δ_H 5,24 (1H, d, $J = 7,5$ Hz, H-1'') cùng các tín hiệu khác đặc trưng cho phân tử đường tại 3,74- 3,25 (6H, m, H-2'', H-3'', H-4'', H-5'', H-6'').

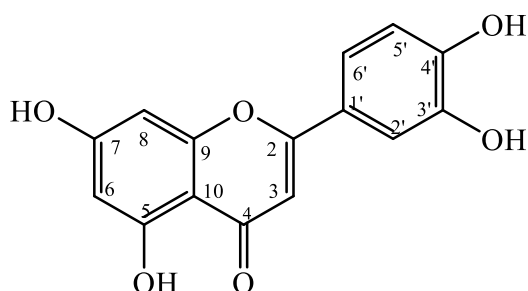
Các tín hiệu trên phổ ^{13}C NMR đã gợi ý rằng hợp chất WC7 có khung flavonoid và vòng B bị thế 3 vị trí C-1', C-3', C-4'. Điều này được khẳng định bởi các tín hiệu của vòng B tại δ_C 123,2 (C-1'), 116,0 (C-2'), 145,8 (C-3'), 149,8 (C-4'), 117,6 (C-5'), 123,0 (C-6'), hai tín hiệu tại δ_C 94,7 và 99,9 rất đặc trưng cho hai vị trí C-8, C-6 của vòng A khi hai vị trí C-5 và C-7 đều bị thế. Ngoài ra sự xuất hiện của một phân tử đường glucose cũng được xác định với các tín hiệu rất đặc trưng tại δ_C 104,4 (C-1'')/ δ_H 5,24 (1H, d, $J = 7,5$ Hz, H-1''), 75,7 (C-2''), 78,3 (C-3''), 71,2 (C-4''), 78,1 (C-5''), 62,5 (C-6''). Hằng số tương tác lớn ($J_{1,2} = 7,5$ Hz) gợi ý phân tử đường có dạng β -glucoside. Trên phổ 1H -NMR và ^{13}C NMR không xuất hiện thêm bất kỳ tín hiệu nào khác, chứng tỏ các nhóm thế còn lại trong WC7 là nhóm OH. Từ các dữ kiện trên có thể dự đoán hợp chất WC7 là một flavonoid có cấu trúc vòng B bị

thể 1,3,4 và trong phân tử có một đơn vị đường β -D-glucoside. So sánh số liệu phổ của **WC7** với chất quercetin-3-O- β -D-glucoside [119] thấy có sự phù hợp ở tất cả các vị trí (Bảng 3.15) Từ đó có thể kết luận hợp chất **WC7** là quercetin-3-O- β -D-glucopyranoside hay còn có tên khác là isoquercitrin

Bảng 3.15. Số liệu phổ NMR của hợp chất **WC7** và chất tham khảo

C	* $\delta_C^{c,d}$	$\delta_C^{a,c}$	$\delta_H^{b,c}$ mult. (J in Hz)
2	158,0	158,4	-
3	135,1	135,6	-
4	178,9	179,4	-
5	163,2	162,9	-
6	99,3	99,9	6,21 d (2,0)
7	165,7	165,9	-
8	95,4	94,7	6,39 d (2,0)
9	158,6	159,0	-
10	105,2	105,6	-
1'	123,0	123,2	-
2'	116,2	116,0	7,73 d (2,0)
3'	145,9	145,8	-
4'	149,5	149,8	-
5'	117,4	117,6	6,89 d (8,5)
6'	122,7	123,0	7,60 dd (2,0, 8.5)
1''	101,4	104,4	5,24 d (7,5)
2''	74,3	75,7	3,32 m
3''	76,8	78,3	3,25 m
4''	70,0	71,2	3,50 m
5''	77,5	78,1	3,74 m
6''	61,3	62,5	3,74 dd (2,0, 11,5) 3,60 dd (5,0, 12,0)

^a125MHz, ^b500MHz, ^cCD₃OD, ^d75 MHz, * δ_C của isoquercitrin [119].

3.1.2.8. Hợp chất **WC8**: LuteolinHình 3.40. Cấu trúc hợp chất **WC8**

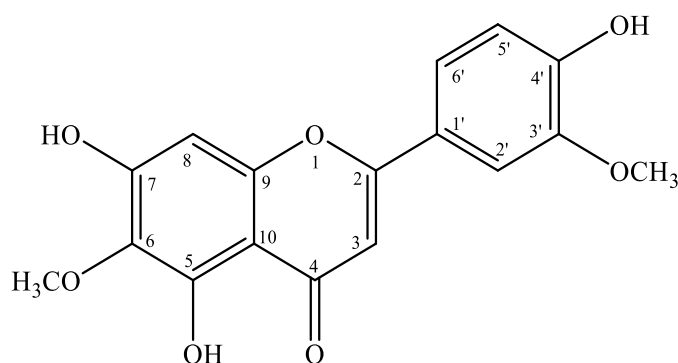
Hợp chất **WC8** thu được dưới dạng bột màu vàng, phổ khối lượng ESI-MS xuất hiện pic ion giả phân tử tại m/z 287 $[M+H]^+$ kết hợp với phổ $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C NMR}$ có thể dự đoán công thức phân tử của **WC8** là $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_6$, KLPT $M = 286$. Phổ $^1\text{H-NMR}$ xuất hiện tín hiệu của 6 proton đặc trưng cho vòng thơm, trong đó có hai proton ở vị trí *meta* với nhau tại δ_{H} 6,38 (1H, br s, H-6), 6,19 (1H, br s, H-8), một proton bị cô lập hoàn toàn tại δ_{H} 5,93 (1H, s, H-3) và một hệ vòng thơm thể kiểu ABX với các tín hiệu tại δ_{H} 7,24 (1H, br s, H-2'), 6,65 (1H, d, $J = 8,5$ Hz, H-5'), 7,26 (1H, d, $J = 8,5$ Hz, H-6'). Phổ $^{13}\text{C NMR}$ xuất hiện tín hiệu của 15 nguyên tử carbon, kết hợp với phổ $^1\text{H-NMR}$ có thể nhận định đây là một hợp chất có khung flavone. Hai tín hiệu tại δ_{C} 99,3 và 94,1 được xác định là ở hai vị trí C-6, C-8 của vòng A khung flavone khi vị trí C-5 và C-7 bị thế, vòng B với hệ tương tác ABX được đặc trưng bởi các tín hiệu δ_{C} 120,4 (C-1'), 112,8 (C-2'), 146,2 (C-3'), 151,2 (C-4'), 116,0 (C-5'), 118,8 (C-6'), nhóm methine còn lại tại δ_{C} 102,1 được xác định là ở vị trí C-3. Ngoài ra phổ $^1\text{H NMR}$ và $^{13}\text{C NMR}$ cũng không xuất hiện bất kỳ tín hiệu của nhóm thế nào khác chứng tỏ tất cả các nhóm thế trong phân tử đều là nhóm OH, điều này được khẳng định thêm dựa vào phổ khối lượng ESI-MS. So sánh các dữ liệu phổ của hợp chất **WC8** với các dữ liệu phổ của hợp chất luteolin [118] thấy có sự phù hợp hoàn toàn. Như vậy có thể kết luận hợp chất **WC8** chính là luteolin.

Bảng 3.16. Số liệu phổ NMR của hợp chất **WC8** và chất tham khảo

C	* $\delta_C^{d,c}$	$\delta_C^{a,c}$	$\delta_H^{b,c}$ mult. (J in Hz)
2	164,5	166,4	
3	103,3	102,1	5,93 br s
4	182,2	181,2	
5	162,1	161,3	
6	99,2	99,4	
7	164,7	163,7	
8	94,2	94,1	6,19 br s
9	157,9	157,4	
10	104,2	102,7	
1'	122,1	120,4	
2'	113,8	112,8	7,24 br s
3'	146,2	146,2	
4'	150,2	151,2	
5'	116,4	116,0	6,65 d (8,5)
6'	118,8	118,8	7,26 d (8,5)

^a125MHz, ^b500MHz, ^c DMSO-*d*₆, ^d100 MHz, * δ_C của luteolin đo trong DMSO-*d*₆ [118].

3.1.2.9. Hợp chất **WC9**: Jaceosidin



Hình 3.41. Cấu trúc hóa học hợp chất **WC9**

Hợp chất **WC9** thu được dưới dạng chất bột màu vàng, phổ khối lượng ESI-MS xuất hiện pic ion giả phân tử tại m/z 331 $[M+H]^+$, kết hợp với phổ 1H NMR và ^{13}C NMR có thể dự đoán công thức phân tử của **WC9** là $C_{17}H_{14}O_7$, KLPT M = 330. Phổ proton xuất hiện tín hiệu của 5 proton đặc trưng cho vòng thơm và proton olefin

trong độ dịch chuyển 6,5-7,5 ppm, trong đó hai proton bị cô lập hoàn toàn tại δ_H 6,60 ppm (1H, s, H-8), tại 6,86 ppm (1H, s, H-3) và một hệ vòng thơm kiểu ABX với các tín hiệu tại δ_H 6,92 (1H, d, $J = 9,0$ Hz, H-5'), 7,53 (1 H, m, H-6'), 7,53 (1 H, m, H-2'). Bên cạnh đó phổ proton còn cho thấy sự xuất hiện tín hiệu của hai nhóm methoxy tại δ_H 3,75 (3H, s, OCH₃) và 3,88 (3H, s, OCH₃).

Bảng 3.17. Số liệu phổ NMR của hợp chất **WC9** và chất tham khảo

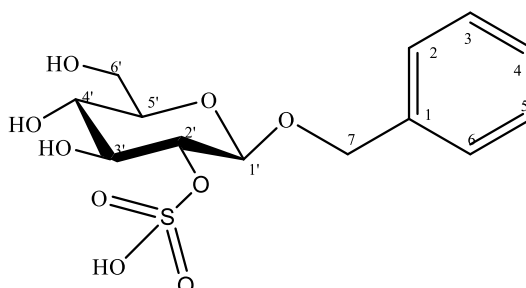
C	* $\delta_C^{a,b}$	$\delta_C^{a,c}$	$\delta_H^{b,c}$ mult. (J in Hz)
2	163,5	164,0	
3	102,6	103,0	6,86 s
4	181,9	182,4	
5	152,6	153,0	
6	131,5	131,6	
7	158,1	157,5	
8	94,4	94,6	6,60 s
9	152,5	152,7	
10	103,7	104,4	
1'	121,5	121,8	
2'	110,2	110,4	6,92 d (9,0)
3'	148,0	148,3	
4'	150,7	151,0	
5'	115,7	116,0	7,53 m
6'	120,4	120,6	7,53 m
6-OCH ₃	59,8	60,2	3,75 s
3'-OCH ₃	55,9	56,2	3,88 s

^a125MHz, ^b500MHz, ^cCD₃OD, * δ_C của jaceosidin đo trong DMSO-*d*₆ [120].

Phổ ¹³C NMR xuất hiện tín hiệu của 17 nguyên tử carbon, trong đó có hai carbon là của nhóm oxy methyl. Điều này hoàn toàn phù hợp với các nhận định đưa ra khi phổ ¹H NMR thu được tín hiệu của hai nhóm methoxy. Như vậy, kết hợp giữa các tín hiệu thu được trên phổ ¹H NMR, phổ ¹³C NMR và phổ DEPT có thể nhận định 15 nguyên tử carbon còn lại thuộc khung flavone. Tín hiệu đặc trưng tại δ_C 94,4

được xác định là ở vị trí C-8 của vòng A khung flavone khi vị trí C-5, và C-7 bị thế. Bên cạnh đó tín hiệu tại δ_C 131,6 ppm được xác định là C-6 gợi ý tại vị trí này có một nhóm thế đính vào trực tiếp khi nó dịch chuyển về phía trường thấp. Trên vòng B với hệ tương tác ABX được đặc trưng bởi các tín hiệu 121,8 (C-1'), 110,4 (C-2'), 148,3 (C-3'), 151,0 (C-4'), 116,0 (C-5'), 120,6 (C-6'). Tín hiệu của hai nguyên tử carbon còn lại tại δ_C 164,0 ppm và một nhóm methine tại δ_C 103,0 ppm hoàn toàn phù hợp với vị trí C-2 và C-3. Ngoài hai nhóm methoxy được xác định tại độ chuyển dịch 60,2 và 56,2 ppm không còn xuất hiện bất kì tín hiệu của nhóm thế nào khác. Như vậy có thể khẳng định các nhóm thế trong **WC9** bao gồm các nhóm thế methoxy (-OCH₃) và hydroxy (-OH). Điều này được khẳng định lại một lần nữa trên phổ khối lượng ESI-MS. Kết hợp so sánh dữ liệu phổ của hợp chất **WC9** với dữ liệu đã công bố của hợp chất Jaceosidin [120] thấy sự phù hợp ở tất cả các vị trí, từ đó có thể kết luận hợp chất **WC9** chính là jaceosidin.

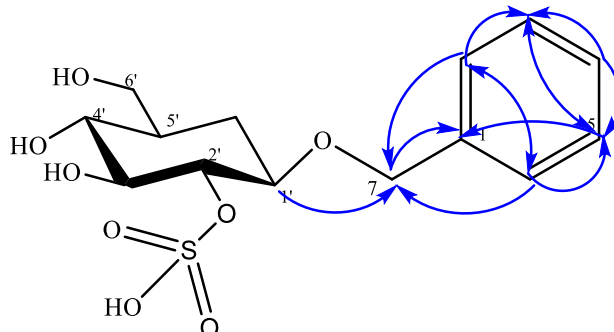
3.1.2.10. Hợp chất **WC10**: 1-O-benzyl- β -D-glucopyranosyl-2'-sulfate.



Hình 3.42. Cấu trúc hóa học của hợp chất **WC10**

Hợp chất **WC10** thu được dưới dạng tinh thể hình kim, màu trắng. Công thức phân tử của **WC10** được xác định là C₁₃H₁₈O₉S (M = 350) dựa trên phân tích phổ khối với sự xuất hiện của pic ion giả phân tử tại m/z 349 [M - H]⁻. Trên phổ ¹H-NMR xuất hiện 5 tín hiệu proton olefin của vòng thơm tại δ_H 7,25 (1H, d, J = 7,5 Hz, H-3, H-5) và 7,47 (2H, br t, J = 7,5 Hz, H-2, H-6). Hai tín hiệu của nhóm oxymethylene xuất hiện tại δ_H 4,74 (1H, d, J = 12,0 Hz, H_b-7) và 4,93 (1H, d, J = 12,0 Hz, H_a-7). Thêm vào đó là 7 tín hiệu đặc trưng của một phân tử đường tại [δ_H 4,53 (1H, d, J = 7,5 Hz, H-1'), 4,17 (1H, dd, J = 7,5, 8,0 Hz, H-2'), 3,44 (1H, dd, J = 9,0, 9,0 Hz, H-3'), 3,66 (1H, t, J = 9,0 Hz, H-4'), 3,31 (1H, m, H-5'), và 3,71 (1H, d, J = 5,0, 12,0 Hz, H_b-6/3,39 (1H, d, J = 1,5 Hz, H_a-6)]. Hằng số tương tác ($J_{1,2}$ = 7,5 Hz, H-1') khá cao của proton anomer, gợi ý phân tử đường có cấu dạng β . Phân tích phổ ¹³C NMR của **WC10** cho thấy sự xuất hiện tín hiệu của 6 carbon vòng thơm

tại δ_C 138,9 (C-1), 128,8 (C2/C-6), 129,1 (C-3/C-5) và 128,4 (C-4), một tín hiệu cộng hưởng của nhóm oxymethylene được xác định tại δ_C 71,5 (C-7). Bên cạnh đó, 6 tín hiệu cộng hưởng đặc trưng của phân tử đường glucose cũng được quan sát tại δ_C 101,0 (C-1'), 81,4(C-2'), 77,4(C-3'), 71,5(C-4'), 77,6(C-5'), 62,6(C-6').



Hình 3.43. Các tương tác chính trên phổ HMBC (H \rightarrow C) của **WC10**

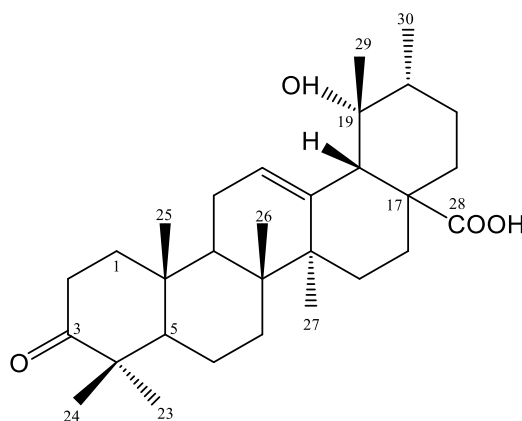
Phân tích phổ HMBC của **WC10** cho thấy các tương tác giữa H2/H6 (δ_H 7,47) cùng tương tác với C-3/C-5 (δ_C 129,1), C-7 (δ_C 71,5), giữa H3/H-5 cùng tương tác với C2/C-6 (δ_C 128,8) và C-1 (δ_C 138,9). Bên cạnh đó tương tác giữa H-1' (δ_H 4,53) đến C-7 (δ_C 71,5) và giữa H-7 (δ_H 4,93/4,74) với C-1 (δ_C 138,9) và C-1' (δ_C 101,0) cho phép xác định vị trí của nhóm methylene và của phân tử đường (Hình 3.43). Từ các dữ liệu phổ thu được của **WC10** cho thấy dữ liệu phổ tương tự các phổ tương ứng của benzyl- β -D-glucopyranoside [121]. Sự khác nhau giữa số liệu phổ của **WC10** với các số liệu phổ tương ứng của benzyl- β -D-glucopyranoside cho thấy các tín hiệu của đơn vị đường tại C-2' (δ_C 81,4 ppm) của phân tử đường glucose trong **WC10** có giá trị lớn hơn bất thường so với giá trị C-2' (δ_C 75,1 ppm) phân tử đường thông thường trong glucose, kết hợp với các công bố trước đó liên quan và các phổ NMR, phổ khối của **WC10** đến sự thay đổi độ chuyển dịch hóa học về trường thấp gợi ý có nhóm HSO₃ thế vào H của nhóm OH tại vị trí C-2' của phân tử đường này. Với những phân tích trên, kết hợp so sánh với tài liệu tham khảo đã công bố [122] có thể khẳng định hợp chất **WC10** là 1-O-benzyl- β -D-glucopyranosyl-2-sulfate.

Bảng 3.18. Số liệu phổ NMR của hợp chất **WC10** và hợp chất tham khảo

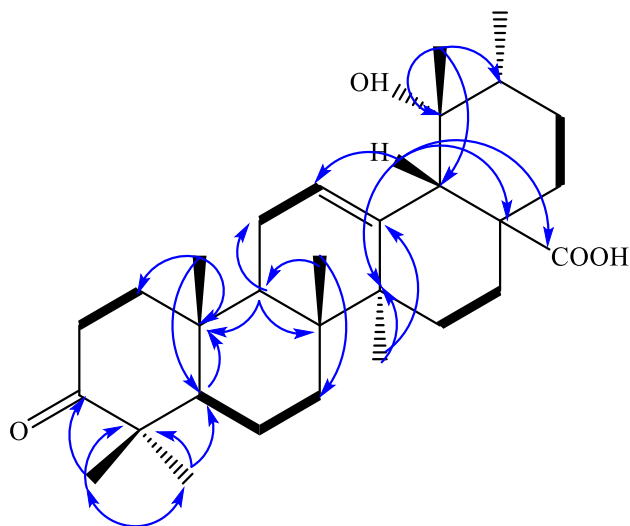
C	# δ_C	$\delta_C^{a,c}$	$\delta_H^{b,c}$ mult. (J in Hz)
1	139,1	138,9	-
2,6	128,5	128,8	7,47 br t (7,5)
3,5	128,8	129,1	7,33 t (7,5)
4	128,1	128,4	7,25 t (7,5)
7	71,2	71,5	4,93 d (12,0)/4,74 d (12,0)
1'	100,7	101,0	4,53 d (7,5)
2'	81,3	81,4	4,17 dd (7,5, 9,0)
3'	77,4	77,4	3,44 dd (9,0, 9,0)
4'	71,3	71,5	3,66 t (9,0)
5'	77,6	77,6	3,31 m
6'	62,4	62,6	3,91 dd (2,5, 12,0) 3,71 dd (5,0, 9,0)

^a125MHz, ^b500MHz, ^cCD₃OD, # δ_C của 1-*O*-benzyl- β -D-glucopyranosyl-2-sulfate đo trong CD₃OD [122].

3.1.2.11. Hợp chất **WC11**: 19-hydroxy-3-oxo-12-ursen-28-oic acid (pomonic acid)

Hình 3.44. Cấu trúc hóa học của hợp chất **WC11**

Hợp chất **WC11** thu được dưới dạng chất bột, màu trắng. Trên phổ khối lượng phun mù điện tử xuất hiện pic ion giả phân tử tại m/z 469 $[M-H]^-$, kết hợp với các dữ liệu phổ NMR của **WC11** cho phép xác định công thức phân tử của **WC11** là C₃₀H₄₆O₄, KLPT M = 470.



Hình 3.45. Các tương tác chính

trên phổ HMBC (H→C), COSY (H—H) của **WC11**

Phổ ^{13}C NMR xuất hiện tín hiệu của một triterpenoid 5 vòng 30 carbon gồm 7 nhóm methyl, 9 nhóm methylene, 5 nhóm methine và nguyên tử carbon không liên kết với hydro [trong đó có một nhóm cacboxylic δ_{C} 182,5 (C-28) và một nhóm keton tại δ_{C} 220,5 (C-3), một carbon oxymethine tại δ_{C} 73,5 (C-19), một liên kết đôi tại δ_{C} 129,2 (C-12)/ δ_{C} 140,0 (C-13). Phổ ^1H -NMR đặc trưng cho một hợp chất triterpenoid, trong đó xuất hiện tín hiệu cộng hưởng của 7 nhóm methyl tại [δ_{H} 1,11 (3H, s, H-23), 1,07 (3H, s, H-24), 1,10 (3H, s, H-25), 0,88 (3H, d, $J = 6,5$ Hz, H-30)] và một proton olefin tại δ_{H} 5,32 (1H, d, $J = 3,5$ Hz, H-12).

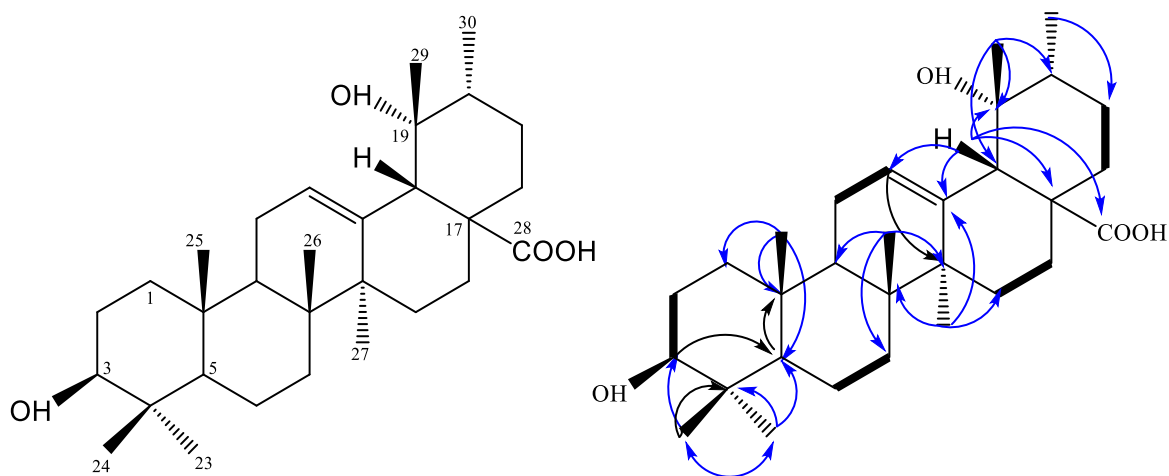
Để làm rõ hơn về cấu trúc của hợp chất **WC11**, các tương tác trên phổ hai chiều HSQC và HMBC đã được phân tích. Trên phổ HMBC có những tương tác chính quan sát được giữa H-23/H-24 cùng tương tác với C-3/C-4/C-5, giữa H-25 tương tác với C-1/C-5/C-10, giữa H-9 tương tác với C-8/C-10/C-11, giữa H-26 với C-7/C-9, giữa H-18 tương tác với C-12/C-13/C-14/C-16/C-17/C-18/C-28 và giữa H-29 tương tác với C-18/C-19/C-20 cho phép xác định một nhóm keton, một nhóm hydro và một nhóm cacboxylic tại C-3, C-19 và C-28 (Hình 3.45). Qua phân tích các dữ liệu phổ 1D, 2D NMR và so sánh với tài liệu đã công bố [123] có thể khẳng định **WC11** là 19-hydroxy-3-oxo-ursen-28-oic acid hay còn gọi là pomonic acid.

Bảng 3.19. Số liệu phổ NMR của hợp chất **WC11** và chất tham khảo

C	*$\delta_C^{d,e}$	$\delta_C^{a,c}$	$\delta_H^{b,c}$ mult. (J in Hz)
1	39,0	38,9	1,64 m 1,76 m
2	32,2	27,2	1,74 m 1,27 t
3	217,5	220,5	-
4	47,4	48,5	-
5	55,2	56,6	1,41 m
6	19,6	20,8	1,54 m
7	34,1	33,7	1,63 m 1,41 m
8	39,9	41,0	-
9	46,4	47,7	1,82 m
10	36,75	37,8	-
11	23,7	24,7	2,07 dd (3,5, 8,0)
12	129,2	129,2	5,32 t (3,5)
13	138,0	140,0	-
14	41,0	42,7	-
15	28,1	29,6	1,84 m 1,04 m
16	25,3	26,6	2,60 m 1,56 m
17	47,7	49,2	-
18	52,8	55,1	2,53 s
19	73,0	73,5	-
20	41,2	43,0	1,36 m
21	35,9	35,1	2,62 m 2,40 m
22	37,4	40,2	1,94 m 1,48 m
23	27,4	27,0	1,11 s
24	21,5	21,9	1,07 s
25	14,9	15,4	1,10 s
26	16,7	17,3	0,88 s
27	24,5	24,6	1,37 s
28	183,7	182,5	-
29	26,3	27,1	1,21 s
30	16,1	16,5	0,95 d (6,5)

^a125MHz, ^b500MHz, ^cCD₃OD, ^dCDCl₃, ^e100,6 MHz, * δ_C của pomonic acid đo trong CDCl₃ [123].

3.1.2.12. Hợp chất **WC12**: *ilexgenin B (Pubescenolic acid)*



Hình 3.46. Cấu trúc hóa học và các tương tác chính trên phổ HMBC (H→C), COSY (H—H) của **WC12**

Hợp chất **WC12** thu được dưới dạng chất bột màu trắng. Phổ $^1\text{H-NMR}$ xuất hiện các tín hiệu đặc trưng của hợp chất triterpenoid. Phân tích các dữ liệu phổ NMR của hợp chất **WC12** cho thấy tương tự hợp chất **WC11**, ngoại trừ sự khác nhau liên quan đến một nhóm hydroxyl tại vị trí C-3 (δ_c 76,9) trong **WC12** thay cho một nhóm keton (δ_c 220,5) trong **WC11** cùng với sự chuyển dịch về phía trường cao của các carbon bên cạnh của hợp chất **WC12** (Bảng 3.20). Trên phổ HMBC có các tương tác chính giữa H-23/H-24 cùng tương tác đến C-3/C-4/C-5, giữa H-25 đến C-1/C-5, C-10, giữa H-9 tương tác với C-8/C-9/C-11, giữa H-26 tương tác với C-7/C-9/C-14, giữa H-18 với C-12/C-13/C-14/C-16/C-17/C-18/C-28, giữa H-29 tương tác với C-18/C-19/C-20 cho phép xác định cấu trúc của hợp chất **WC12** như hình vẽ (Hình 3.46). Qua phân tích dữ liệu phổ 1D, 2D NMR của **WC12**, kết hợp so sánh tài liệu tham khảo đã công bố trước đó [124] cho thấy sự trùng khớp ở tất cả các vị trí, như vậy có thể khẳng định hợp chất **WC12** là pubescenolic acid .

Bảng 3.20. Số liệu phổ NMR của hợp chất **WC12** và chất tham khảo

C	* $\delta_C^{d,e}$	$\delta_C^{a,c}$	$\delta_H^{b,c}$ mult. (J in Hz)
1	38,9	39,0	1,64 m 1,40 m
2	28,0	26,2	2,00 m 1,55 m
3	78,2	76,9	3,36 d (5,0)
4	39,3	38,3	
5	55,8	55,1	1,35 m
6	18,9	19,4	1,46 m 1,42 m
7	33,6	34,1	1,64 m 1,34 m
8	40,3	41,2	
9	47,7	48,4	1,88 m
10	37,4	38,1	
11	24,0	24,6	2,03 m 1,98 m
12	128,1	129,5	5,31 br t
13	139,9	139,9	
14	42,1	42,7	
15	29,2	29,5	1,82 m 1,03 m
16	26,6	26,6	2,60 m
17	48,2	49,5	
18	47,4	48,2	2,52 s
19	73,4	73,6	
20	43,1	43,0	1,38 m
21	27,0	27,2	1,72 m 1,26 m
22	32,4	34,1	1,76 m 1,66 m
23	28,8	29,0	0,95 s
24	15,6	22,9	0,86 s
25	16,2	15,7	0,97 s
26	17,3	17,5	0,81 s
27	24,4	24,8	1,38 s
28	180,6	182,5	
29	26,8	27,0	1,21 s
30	16,4	16,5	0,94 d (6,5)

^a125MHz, ^b500MHz, ^cCD₃OD, ^dpyridine-*d*₅, ^e100MHz, * δ_C của Pubescenolic acid đo trong pyridine-*d*₅ [124].

3.1.3. Tổng hợp các hợp chất phân lập từ Sài đất ba thùy và Sài đất

Bằng các phương pháp sắc kết hợp từ hai loài Sài đất ba thùy và Sài đất đã phân lập và xác định cấu trúc của 20 hợp chất bao gồm: 3 hợp chất diterpene (wedtriloside A, wedtriloside B, Paniculoside-IV), 7 hợp chất flavonoid (apigenin, apigenin-7-O- β -D-glucopyranoside, 4',4,6-trihydroxyaurone, kaempferol-3-O-D-glucoside, quercetin-3-O- β -D-glucoside, luteolin, jaceosidin), 3 hợp chất triterpene saponin và triterpenoid (3-O-[β -D-glucopyranosyl(1-4)- β -D-glucuronopyranosyl] oleanolic acid 28-O- β -D-glucopyranosyl ester, pomonic acid, ilexgenin B) và 7 hợp chất khác (wednenic, wednenol, caffeic acid, Cleroindicin E, cornoside, rengyol, 1-O-benzyl- β -D-glucopyranosyl-2-sulfate).

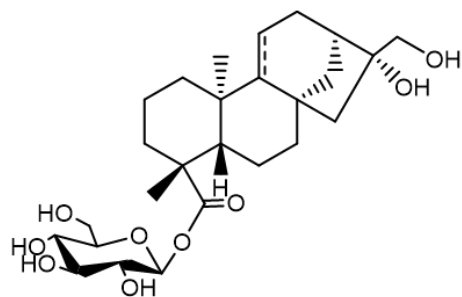
Đặc biệt, 4 hợp chất: wedtriloside A, wedtriloside B, wednenic và wednenol là những hợp chất mới, cùng 4 hợp chất hợp chất: 3-O-[β -D-glucopyranosyl(1-4)- β -D-glucuronopyranosyl] oleanolic acid 28-O- β -D-glucopyranosyl ester, cornoside, rengyol, 1-O-benzyl- β -D-glucopyranosyl-2-sulfate là những hợp chất lần đầu tiên được phân lập từ chi *Wedelia*.

Thành phần hóa học chính từ hai loài *W. trilobata* và *W. chinensis* được nghiên cứu chủ yếu là các hợp chất diterpene, triterpeneoid và flavonoid hoàn toàn phù hợp với các công bố trước đó về thành phần chính của chi *Wedelia*.

Các hợp chất diterpene phân lập được từ *W. trilobata* cho thấy thành phần hóa học chính là các hợp chất khung *ent*-kaurane phù hợp với thành phần hóa học chính của các hợp chất diterpene đã công bố trước đó chi về *Wedelia*.

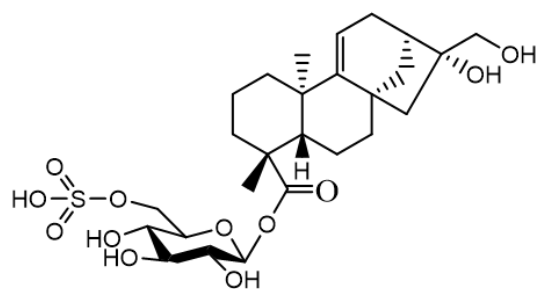
Các hợp chất Triterpenoid phân lập từ hai loài nghiên cứu cho thấy thành phần hóa học chính là các hợp chất thuộc khung *oleane* và *ursane*, phù hợp với thành phần hóa học chính của các hợp chất triterpenoid trong chi *Wedelia* đã công bố.

Cấu trúc hóa học của các hợp chất trên được xác định dựa vào các dữ liệu phổ IR, HR-ESI-MS, MS, 1D, 2D NMR, đồng thời so sánh với các tài liệu đã công bố trước đây đối với các hợp chất đã biết.

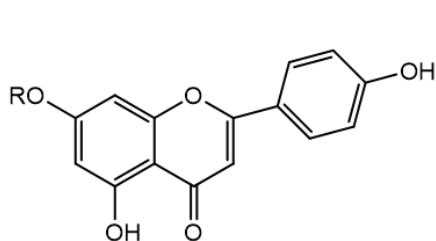


WT1: $\Delta^{9,11}$, Wedtriloside A (mới)

WT3: Paniculose-IV

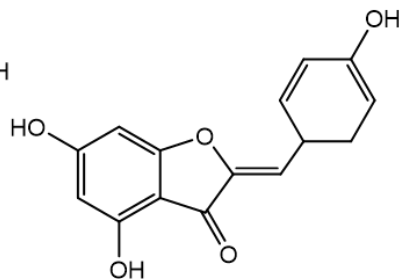


WT2: Wedtriloside B (mới)

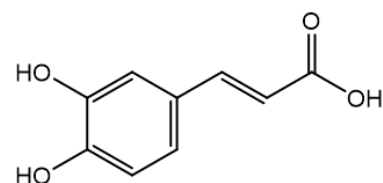


WT4: R = H: apigenin

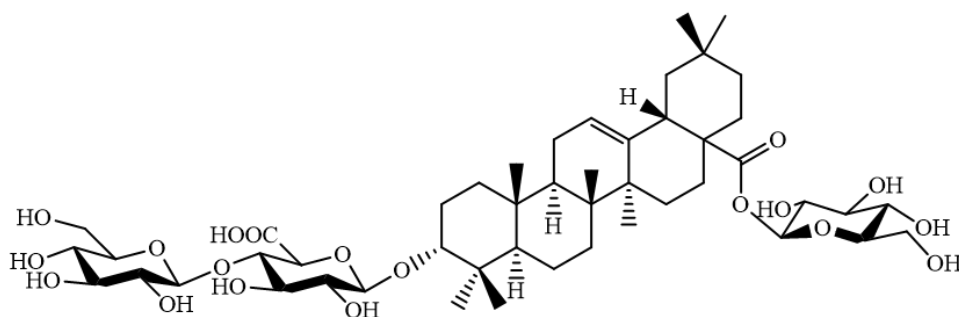
WT5: R = Glc: apigenin 7-O- β -D-glucopyranoside



WT7: 4',4,6-trihydroxyaurone

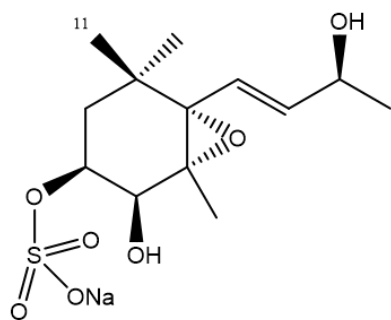
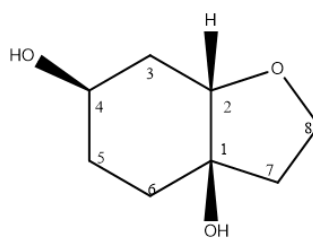
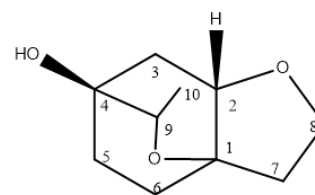
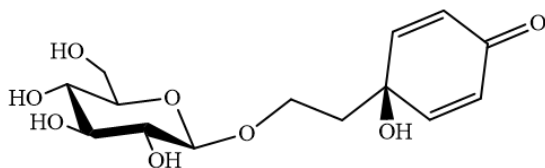
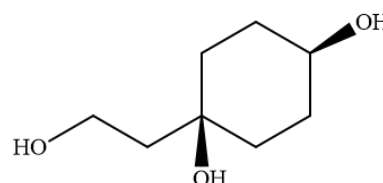
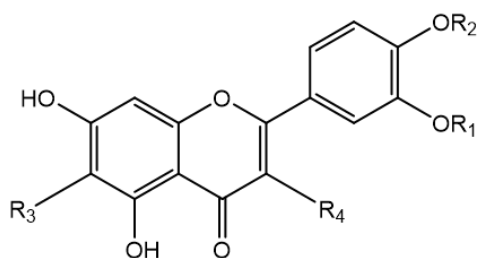
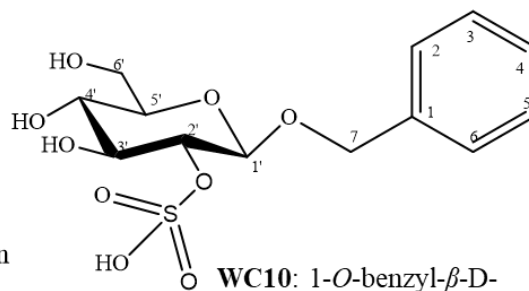
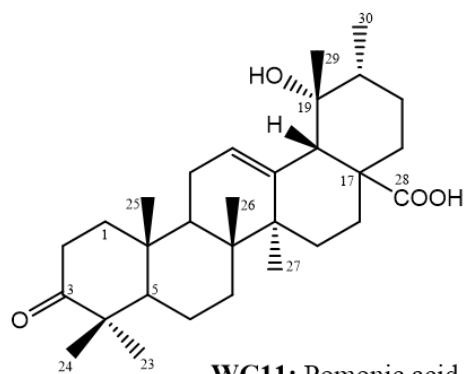
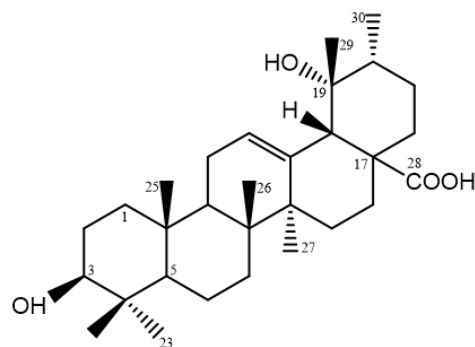


WT8: caffeic acid



WT6: 3-O-[[β -D-glucopyranosyl(1-4)- β -D-glucuronopyranosyl] oleanolic acid 28-O- β -D-glucopyranosyl ester

Hình 3.47. Các hợp chất **WT1-WT8** phân lập từ *W. trilobata*

**WC1:** Wedenic (mới)**WC2:** Cleroindicin E**WC3:** Wedenol (mới)**WC4:** Cornoside**WC5:** Rengyol**WC6:** $R_1 = H, R_2 = H, R_3 = H, R_4 = O\text{-Glc}$: Astragalin**WC7:** $R_1 = H, R_2 = H, R_3 = H, R_4 = O\text{-Glc}$: Isoquercitrin**WC8:** $R_1 = H, R_2 = H, R_3 = H, R_4 = H$: Luteolin**WC9:** $R_1 = CH_3, R_2 = H, R_3 = OCH_3, R_4 = H$: Jaceosidin**WC10:** 1-O-benzyl- β -D-glucopyranosyl-2-sulfate**WC11:** Pomonic acid**WC12:** Pubescenolic acid*Hình 3.48.* Các hợp chất **WC1-WC9** phân lập từ *W. chinensis*

3.2. Đánh giá hoạt tính sinh học các hợp chất phân lập được từ *W. trilobata* và *W. chinensis*

3.2.1. Hoạt tính ức chế sản sinh NO của các hợp chất

Trước khi thử khả năng ức chế sản sinh NO trên tế bào RAW264.7, các hợp chất này được đánh giá ảnh hưởng tới sự phát triển của tế bào RAW264.7 ở các nồng độ thử nghiệm 30 và 100 μM . Kết quả cho thấy các hợp chất **WC1-WC12** phân lập từ *W.chinensis* không gây ảnh hưởng đến sự phát triển bình thường của tế bào RAW264.7 (phần trăm tế bào sống sót khoảng 100% so với mẫu chuẩn không chứa chất thử nghiệm) và các hợp chất phân lập từ *W. trilobata* cho kết quả là hợp chất **WT3** và **WT8** gây độc tế bào nhẹ (phần trăm tế bào sống sót > 70 % ở nồng độ thử nghiệm 100 μM), các hợp chất còn lại không gây độc tế bào (phần trăm tế bào sống sót từ 90 - 109 % so với mẫu chuẩn không chứa chất thử nghiệm) ở các nồng độ thử nghiệm. Do đó, lượng NO sản sinh trong môi trường nuôi cấy được coi như không ảnh hưởng bởi sự phát triển quá mức hay sự chết đi của tế bào trong điều kiện thí nghiệm có mặt của các hợp chất và cao chiết kể trên. Sau khi đánh giá sơ bộ, các hợp chất có khả năng ức chế > 50 % sự sản sinh ra NO trong tế bào RAW264.7 tiếp tục thử nghiệm ở các nồng độ khác nhau để xác định giá trị IC_{50} .

Bảng 3.21. Kết quả đánh giá hoạt tính ức chế sự sản sinh NO trong tế bào RAW264.7 của các hợp chất phân lập từ *W. chinensis* và *W. trilobata*

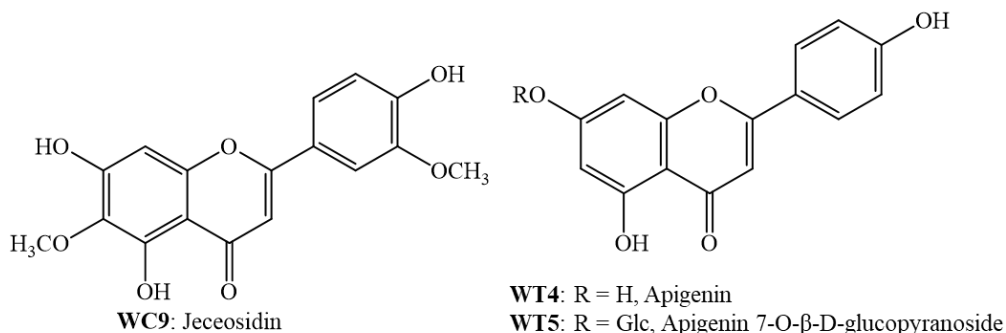
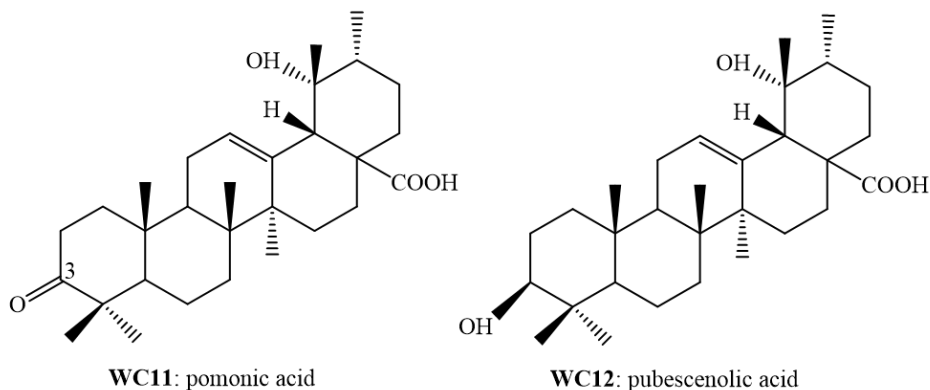
Mẫu	Giá trị IC_{50} (μM)
WC9	10,72 \pm 1,06
WC11	10,91 \pm 0,67
WC12	26,92 \pm 1,12
WT4	21,9 \pm 0,90
WT6	78,5 \pm 0,97
Cardamonin *	2,12 \pm 0,05

* Cardamonin được sử dụng làm chất đối chứng

Sau khi đánh giá sơ bộ tác dụng ức chế sự sản sinh NO trong tế bào RAW264.7 của các hợp chất **WC1-WC12** và **WT1-WT8** ở nồng độ thử nghiệm 100 μM , kết quả cho thấy các hợp chất **WC9-WC12**, **WT4**, **WT6** có khả năng ức chế > 50% sự sản sinh NO trong tế bào RAW264.7. Vì vậy, các hợp chất này được

tiếp tục thử nghiệm ở các nồng độ khác nhau để xác định giá trị IC_{50} . Kết quả cho thấy hợp chất **WC9**, **WC11** thể hiện tác dụng ức chế sản sinh NO trong tế bào RAW264.7 khá mạnh với giá trị IC_{50} tương ứng là $10,72 \pm 1,06$ và $10,91 \pm 0,67 \mu M$ (bảng 3.21). Bên cạnh đó hợp chất **WC12** và **WT4** cho kết quả ức chế sản sinh NO trong đại thực bào RAW264.7 đáng chú ý với các giá trị IC_{50} tương ứng là $26,92 \pm 1,12$ và $21,9 \pm 0,90 \mu M$. Hợp chất **WT6** thể hiện tác dụng ức chế sản sinh NO trong tế bào RAW264.7 yếu với giá trị $IC_{50} = 78,5 \pm 0,97 \mu M$ trong khi đó các hợp chất còn lại không thể hiện hoạt tính ức chế sản sinh NO trong tế bào RAW264.7.

Từ kết quả thu được cho thấy hợp chất **WC11** và **WC12** có cấu trúc hóa học tương tự nhau, nhưng hợp chất **WC11** thể hiện hoạt tính ức chế sản sinh NO tương đối tốt ($IC_{50} = 10,91 \mu M$), tốt hơn so với hợp chất **WC12** ($IC_{50} = 26,92 \mu M$). Điều này gợi ý hợp chất **WC12** với nhóm thế hydroxy tại vị trí C-3 làm giảm hoạt tính.



Bên cạnh đó khi so sánh hoạt tính ức chế sản sinh NO của hai hợp chất **WT4**, **WT5** và **WC9** cho thấy hợp chất **WC9** thể hiện hoạt tính tốt hơn hai hợp chất còn lại trong khi chúng có cùng khung flavonoid. Hai hợp chất **WT4** và **WT5** có cấu trúc hóa học tương tự nhau nhưng hợp chất **WT4** cho thấy có khả năng ức chế sản sinh NO trong khi hợp chất **WT5** với sự xuất hiện của một phân tử đường tại C-7 thay vì nhóm hydroxy lại không thể hiện hoạt tính. Điều này gợi ý sự xuất hiện của

các phân tử đường làm giảm hoặc mất đi khả năng ức chế sản sinh NO của các hợp chất flavonoid.

3.2.2. Hoạt tính ức chế α -amylase, α -glucosidase

Một số các nghiên cứu trước đây đã báo cáo chiết xuất từ *W. trilobata* có tác dụng hạ đường huyết [79, 80]. Các hợp chất **WT1-WT8** và **WC1-WC12** phân lập từ *W. trilobata* và *W. chinensis* được tiến hành thử nghiệm *in vitro* khả năng ức chế enzyme α -glucosidase và α -amylase theo phương pháp mô tả tại mục 2.2.3.2 và 2.2.3.3. Kết quả được hiển thị trong bảng 3.22 cho thấy hầu hết các hợp chất đều có khả năng ức chế α -amylase và α -glucosidase, trong đó ấn tượng nhất là khả năng ức chế α -amylase và α -glucosidase của hợp chất **WT6** với giá trị giá trị IC_{50} tương ứng là 52,08 và 190,4 μ M mạnh hơn so với đối chứng dương acarbose ($IC_{50} = 67,8$ và 450,56 μ M) (Bảng 3.22). Kết quả này cũng phù hợp với một nghiên cứu trước đó về đánh giá ức chế α -amylase của hợp chất saponin phân lập từ Đinh lăng [112] và một nghiên cứu của các nhà nghiên cứu khoa học người Trung Quốc đối với hợp chất **WT6** [113].

Hai hợp chất mới **WT1** và **WT2** phân lập từ *W. trilobata* cho thấy khả năng ức chế đáng kể đối với enzyme α -amylase với giá trị IC_{50} tương ứng là 112,20 và 87,10 μ M, tuy nhiên hai hợp chất này lại không có khả năng ức chế α -glucosidase. Khả năng ức chế enzyme α -amylase của hợp chất **WT8** ở mức độ trung bình với giá trị IC_{50} là 181,97 μ M, nhưng lại có khả năng ức chế tốt enzyme α -glucosidase với giá trị $IC_{50} = 173,8$ μ M mạnh hơn đối chứng dương acarbose ($IC_{50} = 450,56$ μ M). Kết quả trên cho thấy hợp chất **WT4** có khả năng ức chế α -glucosidase mạnh với IC_{50} tương ứng là 27,54 μ M, mạnh hơn chất đối chứng acarbose ($IC_{50} = 450,56$ μ M). Kết quả này cũng phù hợp với một nghiên cứu trước đó về khả năng ức chế α -glucosidase của hợp chất **WT4** [114].

Đánh giá khả năng ức chế α -amylase và α -glucosidase của các chất phân lập từ *W. chinensis* cho thấy hầu hết các hợp chất đều có khả năng ức chế α -glucosidase, α -amylase. Cụ thể là chất **WC9** ức chế mạnh cả hai loại enzyme α -amylase, α -glucosidase với giá trị IC_{50} tương ứng $112,8 \pm 15,1$ và $785,9 \pm 12,7$ μ M (Bảng 3.22). Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu trước đây về khả năng ức chế enzym α -glucosidase, α -amylase của các hợp chất flavonoid [125, 126]. Các hợp chất **WC1**, **WC11**, **WC12** cho khả năng ức chế enzyme α -glucosidase, α -amylase ở mức trung

bình trong khi đó các hợp chất còn lại cho kết quả không ức chế hoặc ức chế yếu đối với cả hai enzyme α -glucosidase, α -amylase.

Bảng 3.22. Kết quả hoạt tính ức chế enzyme α -amylase và α -glucosidase của các hợp chất phân lập từ *W. trilobata* và *W. chinensis*

Hợp chất	IC ₅₀ (μ M)	
	α -amylase	α -glucosidase
WT1	112,20 \pm 2,87	-
WT2	87,10 \pm 1,89	-
WT4	-	27,54 \pm 1,12
WT6	52,08 \pm 0,56	190,40 \pm 2,01
WT8	181,97 \pm 2,62	173,78 \pm 2,37
WC1	436,8 \pm 28,6	915,6 \pm 36,5
WC9	112,8 \pm 15,1	785,9 \pm 12,7
WC11	420,7 \pm 25,2	-
WC12	395,6 \pm 18,3	821,4 \pm 55,2
Acabose*	67,80 \pm 0,32	450,56 \pm 2,31

(-): Không ức chế (IC₅₀ > 1000), (*): chất đối chứng.

Từ các kết quả trên có thể sơ bộ nhận thấy các hợp chất diterpenoid và các hợp chất flavonoid phân lập từ *W. trilobata* thể hiện hoạt tính ức chế α -glucosidase, α -amylase tốt hơn các hợp chất phân lập từ *W. chinensis*. Theo đó hợp chất **WT6** [(3-*O*-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucuronopyranosyl] oleanolic acid 28-*O*- β -D-glucopyranosyl ester) phân lập từ *W. trilobata* cho thấy có khả năng ức chế tốt cả hai loại enzyme α -glucosidase, α -amylase, thậm chí ức chế mạnh hơn so với đối chứng dương acarbose. Kết quả này cũng hoàn toàn phù hợp với một nghiên cứu trước đây về khả năng ức chế α -glucosidase, α -amylase của hợp chất 3-*O*-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucuronopyranosyl] oleanolic acid 28-*O*- β -D-glucopyranosyl ester phân lập từ lá cây đinh lăng. Nghiên cứu trước đó cho thấy tác dụng hiệp đồng của hợp chất này với acarbose trong việc ức chế enzyme α -amylase. Cụ thể khi phối trộn hai hoạt chất lại ở cùng nồng độ 1 μ g/ml thì tác dụng ức chế α -amylase tăng lên rất nhiều lần. Điều này cho thấy hoạt chất 3-*O*-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucuronopyranosyl] oleanolic acid 28-*O*- β -D-

glucopyranosyl ester có tác dụng hiệp đồng với thuốc chữa tiểu đường acarbose ở nồng độ phối trộn thấp. Ở nồng độ cao hơn 10 $\mu\text{g/ml}$, sự ức chế α -amylase là tác dụng cộng hợp của hai hoạt chất trong khi ở nồng độ phối trộn cao 100 $\mu\text{g/ml}$ hoàn toàn không có sự ức chế kết hợp giữa hai hoạt chất. Kết quả này gợi ý cho khả năng sử dụng hợp chất 3-*O*-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucuronopyranosyl] oleanolic acid 28-*O*- β -D-glucopyranosyl ester (**WT6**) có nguồn gốc thiên nhiên kết hợp với thuốc acarbose trong việc hỗ trợ điều trị tiểu đường. Sau đó hợp chất này được tiếp tục nghiên cứu tác dụng chống dung nạp sucrose, nồng độ glucose trong huyết thanh chuột tại các thời điểm 0 phút, 30 phút, 60 phút và 120 phút sau khi cho uống sucrose đã được xác định. Kết quả xác định nồng độ glucose trong huyết thanh cho thấy sau khi chuột được uống hoạt chất 3-*O*-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucuronopyranosyl] oleanolic acid 28-*O*- β -D-glucopyranosyl ester ở liều 100 mg/kg thì được uống sucrose liều 4g/kg thì nồng độ glucose trong máu ở các thời điểm 30 phút, 1 giờ đã giảm hơn so với lô đối chứng không sử dụng hoạt chất [127, 128]. Từ những kết quả nghiên cứu trên cho thấy hoạt chất 3-*O*-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucuronopyranosyl] oleanolic acid 28-*O*- β -D-glucopyranosyl ester (**WT6**) có thể được sử dụng như một ứng cử viên trong việc ngăn ngừa và điều trị bệnh tiểu đường và các biến chứng của bệnh tiểu đường.

3.2.3. Hoạt tính gây độc tế bào

Kết quả đánh giá hoạt tính gây độc tế bào *in vitro* của các hợp chất phân lập từ *W. trilobata* và *W. chinensis* trên 4 dòng tế bào ung thư ở người gồm: ung thư phổi (A549), ung thư gan (Hep3B), ung thư vú (MCF-7), ung thư tuyến tiền liệt (PC3) (Bảng 3.23) cho thấy:

Hợp chất **WT3** và **WT4** phân lập từ *W. trilobata* đều thể hiện khả năng gây độc tế bào ở mức trung bình đối với dòng ung thư phổi và ung thư gan với giá trị IC_{50} tương ứng là $36,31 \pm 1,15$; $49,3 \pm 1,03$ μM và $31,77 \pm 1,34$; $34,6 \pm 0,74$ μM . Cả hai hợp chất này thể hiện gây độc yếu đối với các dòng tế bào ung thư vú và ung thư tuyến tiền liệt trong khi các hợp chất còn lại phân lập từ *W. trilobata* không gây độc với các dòng tế bào ung thư thử nghiệm.

Hợp chất **WC11**, **WC9** phân lập từ *W. chinensis* thể hiện hoạt tính gây độc tế bào ở mức độ trung bình với dòng ung thư tuyến tiền liệt với giá trị IC_{50} tương ứng là $25,12 \pm 1,07$ μM và $30,20 \pm 1,23$ μM so với chất đối chứng dương

camptothecin ($IC_{50} = 4,65 \mu M$), bên cạnh đó **WC9** thể hiện hoạt tính gây độc yếu với 3 dòng tế bào ung thư thử nghiệm còn lại với giá trị IC_{50} trong khoảng 45,71-78,89 μM , trong khi **WC11** lại thể hiện khả năng gây độc trung bình với dòng tế bào A-549 với giá trị IC_{50} là $36,31 \pm 1,15 \mu M$, tuy nhiên hợp chất này chỉ thể hiện gây độc yếu đến không gây độc với 2 dòng tế bào ung thư thử nghiệm Hep3B và MCF-7. Hợp chất **WC12** thể hiện khả năng gây độc ở mức độ trung bình yếu trên các dòng tế bào ung thư thử nghiệm với giá trị IC_{50} trong khoảng 31,77-53,70 μM , trong khi các hợp chất còn lại không thể hiện hoạt tính gây độc ở các nồng độ nghiên cứu trên cả 4 dòng tế bào ung thư thử nghiệm.

Bảng 3.23. Kết quả thử hoạt tính gây độc tế bào của các hợp chất phân lập từ *W. chinensis* và *W. trilobata*

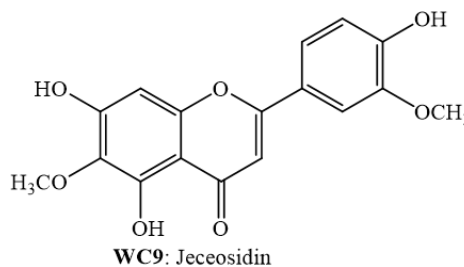
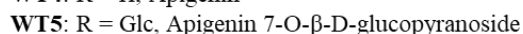
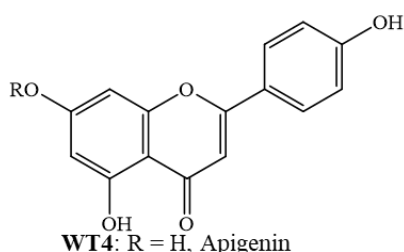
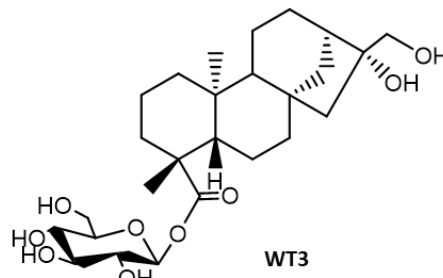
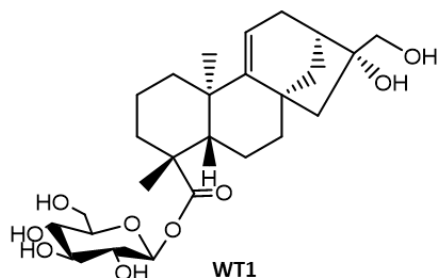
Mẫu	IC_{50} (μM)			
	A549	Hep3B	MCF-7	PC3
WC9	$78,89 \pm 2,11$	$79,43 \pm 1,19$	$45,71 \pm 1,32$	$30,20 \pm 1,23$
WC11	$36,31 \pm 1,15$	$69,18 \pm 1,45$	$67,61 \pm 2,08$	$25,12 \pm 1,07$
WC12	$31,77 \pm 1,34$	$53,70 \pm 1,23$	$37,15 \pm 1,18$	$53,70 \pm 2,36$
WT3	$36,31 \pm 1,15$	$49,3 \pm 1,03$	$87,61 \pm 1,08$	$55,6 \pm 1,17$
WT4	$31,77 \pm 1,34$	$34,6 \pm 0,74$	$79,8 \pm 1,18$	$61,0 \pm 1,94$
Camptothecin *	$4,65 \pm 0,14$	$0,34 \pm 0,014$	$0,80 \pm 0,02$	$0,97 \pm 0,008$

(*): chất đối chứng dương

Hai hợp chất **WT1** và **WT3** có cấu trúc hóa học tương tự nhau chỉ khác biệt duy nhất tại vị trí nối đôi C-9/C11, tuy nhiên hợp chất **WT1** không thể hiện hoạt tính gây độc tế bào đối với các dòng tế bào ung thư thử nghiệm trong khi hợp chất **WT3** có khả năng gây độc trên cả 4 loại tế bào ung thư bao gồm: ung thư phổi, ung thư gan, ung thư vú và ung thư tuyến tiền liệt (Bảng 3.23).

Kết quả thấy các hợp chất **WT4**, **WT5** và **WC9** có cấu trúc hóa học cùng thuộc khung flavone nhưng chỉ có hợp chất **WT4** và **WC9** thể hiện hoạt tính gây độc tế bào trên các dòng tế bào thử nghiệm ở các mức độ khác nhau, trong khi hợp chất **WT5** là dẫn xuất glucoside của **WT4** lại không thể hiện hoạt tính gây độc tế

bào trên các dòng tế bào thử nghiệm, điều này có thể được giải thích do sự xuất hiện của các gốc đường làm giảm hoặc mất hoạt tính gây độc tế bào ung thư của các hợp chất flavonoid. Điều này hoàn toàn phù hợp với một nghiên cứu mới đây của A. Gangopadhyay và cộng sự cho rằng glycoside của các hợp chất flavone gây độc yếu hơn trên cùng các dòng tế bào ung thư thử nghiệm [129-131].



Mỗi sự thay thế của các nhóm thế trong cấu trúc sẽ quyết định hoạt tính sinh học riêng của chúng. Qua các nghiên cứu cho thấy giữa cấu trúc hóa học và hoạt tính sinh học của các hợp chất có mối tương quan với nhau, tuy nhiên không có một quy tắc chung nào về mối quan hệ giữa cấu trúc hóa học và hoạt tính sinh học của chúng. Qua rất nhiều nghiên cứu, các nhà khoa học đã phát hiện ra một số đặc điểm chính của các hợp chất flavone và flavonoid ảnh hưởng tới khả năng gây độc tế bào là do sự hiện diện của nối đôi tại vị trí C2/C3 của vòng C và các nhóm hydroxy trong vòng A và B của chúng đã kiểm soát hoạt động chống ung thư của các hợp chất, điều này lý giải vì sao các hợp chất **WT4**, **WC9** có khả năng gây độc tế bào ung thư ở các mức độ khác nhau trong khi các hợp chất khác lại không thể hiện khả năng gây độc trên các tế bào thử nghiệm [131, 132].

KẾT LUẬN

Bằng phương pháp sắc ký kết hợp và các phương pháp phổ hiện đại, có sự so sánh với số liệu phổ các hợp chất tương tự trong tài liệu tham khảo, từ hai loài *Wedelia trilobata* và *Wedelia chinensis* NCS đã phân lập và xác định được cấu trúc của 20 hợp chất và đánh giá một số hoạt tính sinh học của các hợp chất này. Cụ thể:

1. Từ loài *W. trilobata* đã phân lập và xác định cấu trúc 8 hợp chất (**WT1-WT8**) trong đó có 2 hợp chất mới và 6 hợp chất đã biết. Hai hợp chất mới được đặt tên là: wedtriloside A (**WT1**) và wedtriloside B (**WT2**) và 6 hợp chất đã biết gồm: Paniculose-IV (**WT3**), apigenin (**WT4**), apigenin-7-*O*- β -D-glucopyranoside (**WT5**), 3-*O*-[β -D-glucopyranosyl(1-4)- β -D-glucuronopyranosyl] oleanolic acid 28-*O*- β -D-glucopyranosyl ester (**WT6**), 4',4,6-trihydroxyaurone (**WT7**), caffeic acid (**WT8**)

2. Từ loài *W. chinensis* đã phân lập và xác định cấu trúc 12 hợp chất trong đó có 2 hợp chất mới và 10 hợp chất đã biết. Hai hợp chất mới được đặt tên là: wednenic (**WC1**) và wednenol (**WC3**) và 10 hợp chất đã biết gồm: Cleroindicin E (**WC2**), cornoside (**WC4**), rengyol (**WC5**), kaempferol-3-*O*-D-glucoside (**WC6**), quercetin-3-*O*- β -D-glucoside (**WC7**), luteolin (**WC8**), jaceosidin (**WC9**), 1-*O*-benzyl- β -D-glucopyranosyl-2-sulfat (**WC10**), pomonic acid (**WC11**), ilexgenin B (**WC12**).

3. Đã nghiên cứu hoạt tính ức chế sản sinh NO trong đại thực bào RAW264.7 của các hợp chất phân lập từ hai loài *W. trilobata* và *W. chinensis*. Kết quả cho thấy: **WC9** và **WC11** thể hiện tác dụng ức chế sản sinh NO trong tế bào RAW264.7 tương đối tốt với giá trị IC_{50} tương ứng là $10,72 \pm 1,06$ và $10,91 \pm 0,67$ μ M so với đối chứng dương cardamonin ($IC_{50} = 2,12 \pm 0,05$ μ M). Các hợp chất còn lại thể hiện tác dụng ức chế sản sinh NO trong tế bào RAW264.7 ở mức trung bình hoặc không thể hiện khả năng ức chế.

4. Đã nghiên cứu hoạt tính ức chế α -amylase và α -glucosidase của các hợp chất phân lập được từ hai loài *W. chinensis* và *W. trilobata*. Kết quả cho thấy: Hầu hết các hợp chất phân lập từ *W. trilobata* đều cho thấy khả năng ức chế enzyme α -amylase và α -glucosidase. Đặc biệt hợp chất **WT4**, **WT6** có khả năng ức chế α -glucosidase với giá trị IC_{50} tương ứng là $27,54 \pm 1,12$ μ M và $190,40 \pm 2,01$ μ M, mạnh hơn so với đối chứng dương acarbose ($IC_{50} = 67,8$ μ M và $450,56$ μ M). Bên

cạnh đó hợp chất **WT6** còn ức chế mạnh enzyme α -amylase với IC_{50} là 52,08 μ M. Tuy nhiên các hợp chất phân lập từ *W. chinensis* chỉ thể hiện khả năng ức chế enzyme α -amylase và α -glucosidase ở mức trung bình đến không ức chế.

5. Đã tiến hành đánh giá hoạt tính gây độc tế bào ung thư của các hợp chất phân lập từ *W. chinensis* (**WC1-WC12**) và *W. trilobata* (**WT1-WT8**) trên 4 dòng tế bào ung thư ở người: ung thư phổi (A549), ung thư gan (Hep3B), ung thư vú (MCF-7), ung thư tuyến tiền liệt (PC3). Kết quả cho thấy: Các hợp chất phân lập từ *W. chinensis* gồm **WC9**, **WC11**, **WC12** thể hiện khả năng gây độc trên 4 dòng tế bào thử nghiệm ở mức độ trung bình với giá trị IC_{50} trong khoảng 25,12-53,7 μ M. Hai hợp chất **WT3** và **WT4** phân lập từ *W. trilobata* chỉ thể hiện hoạt tính gây độc trên hai dòng tế bào Hep3B và PC3 ở mức trung bình với các giá trị IC_{50} tương ứng là 49,3; 55,6 và 34,6; 61,0 μ M, các hợp chất còn lại không thể hiện hoạt tính.

KIẾN NGHỊ

Kết quả nghiên cứu của luận án cho thấy hợp chất **WT4** phân lập từ *W. trilobata* có khả năng ức chế α -glucosidase mạnh có thể tiếp tục tiến hành đánh giá hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase *in vivo* để định hướng về khả năng ứng dụng của hợp chất này.

Một số hợp chất phân lập từ *W. trilobata* thể hiện khả năng ức chế tốt cả hai loại enzyme α -amylase và α -glucosidase, có thể nghiên cứu sâu hơn về hoạt tính hạ đường huyết của loài này.

Hợp chất **WC9** phân lập từ *W. chinensis* cho hoạt tính ức chế sản sinh NO tương đối tốt với giá trị $IC_{50} = 10,72 \pm 1,06 \mu\text{M}$ so với đối chứng dương cardamonin ($IC_{50} = 2,12 \pm 0,05 \mu\text{M}$), cần có nghiên cứu sâu hơn về cơ chế ức chế sản sinh NO đối với hợp chất này.

NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN

1. Về thành phần hóa học

Từ 2 loài *Wedelia trilobata* (L.) Hitchc. và *Wedelia chinensis* (Osbeck) Merr. T đã phân lập và xác định cấu trúc hóa học của 20 hợp chất. trong đó có 4 hợp chất mới và 4 hợp chất lần đầu được phân lập từ chi *Wedelia*.

- Bốn hợp chất mới là: wedtriloside A, wedtriloside B, wednenic và wednenol

- Bốn hợp chất lần đầu phân lập từ chi *Wedelia* gồm: Hợp chất 3-*O*-[β -D-glucopyranosyl(1-4)- β -D-glucoronopyranosyl] oleanolic acid 28-*O*- β -D-glucopyranosyl ester, cornoside, rengyol, 1-*O*-benzyl- β -D-glucopyranosyl-2-sulfate

Về tác dụng sinh học

Lần đầu tiên tại Việt Nam tiến hành thử nghiệm *in vitro* khả năng ức chế enzyme α -amylase và α -glucosidase của 2 loài *Wedelia trilobata* (L.) Hitch và *Wedelia chinensis* (Osbeck) Merr. Kết quả cho thấy hợp chất apigenin, 3-*O*-[β -D-glucopyranosyl(1-4)- β -D-glucoronopyranosyl] oleanolic acid 28-*O*- β -D-glucopyranosyl ester có khả năng ức chế α -glucosidase mạnh hơn so với đối chứng dương acarbose và hợp chất 3-*O*-[β -D-glucopyranosyl(1-4)- β -D-glucoronopyranosyl] oleanolic acid 28-*O*- β -D-glucopyranosyl ester còn ức chế enzyme α -amylase mạnh hơn đối chứng dương acarbose.

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ

1. **Nguyen Thi Luyen**, Pham Thanh Binh, Pham Thi Tham, Ta Manh Hung, Nguyen Hai Dang, Nguyen Tien Dat, Nguyen Phuong Thao. Wedtrilosides A and B, two new diterpenoid glycosides from the leaves of *Wedelia trilobata* (L.) Hitchc. with α -amylase and α -glucosidase inhibitory activities. *Bioorganic Chemistry*, **2019** (85), 319 -324; IF: 5.3

2. Nguyen Phuong Thao, Pham Thanh Binh, **Nguyen Thi Luyen**, Ta Manh Hung, Nguyen Hai Dang, Nguyen Tien Dat. α -Amylase and α -Glucosidase Inhibitory Activities of Chemical Constituents from *Wedelia chinensis* (Osbeck.) Merr. Leaves. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, **2018**, ID: 2794904; IF: 2.594

3. Nguyen Phuong Thao, Pham Thanh Binh, **Nguyen Thi Luyen**, Nguyen Duy Cong, Nguyen Hai Dang, Nguyen Tien Dat. Anti-inflammatory and cytotoxic activities of constituents from *Wedelia trilobata* (L.) Hitchc. *Vietnam J. Chem*, **2019**, 57 (1), 121-127.

4. **Nguyễn Thị Luyên**, Phạm Thanh Bình, Nguyễn Duy Công, Bùi Thị Thúy Luyện, Nguyễn Hải Đăng, Nguyễn Tiến Đạt, Nguyễn Phương Thảo. Nghiên cứu thành phần hóa học cây Sài đất (*Wedelia chinensis* (Osbeck.) Merr.). *Tạp chí dược học*, **2018**, 510, 25-29.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. A. Meena, M. Rao, R. Meena, P. Panda, *Pharmacological and phytochemical evidences for the plants of Wedelia Genus—A Review*, Asian Journal of Pharmaceutical Research, 2011, 1, 7-12.
2. “V.The Plant List,” <http://www.theplantlist.org/>.
3. C. Arunachalam, R. Arunadevi, S. Murugammal, N. Monika, R. Susila, S.S. Kumar, *Comparative botanical and phytochemical studies of ambiguous medicinal plant species of Wedelia and Eclipta (Fam. Asteraceae) used in ASU systems of medicine with special reference to in-silico screening of hepatoprotective potential of marker wedelolactone with acetaminophen targets*, Pharmacognosy Research, 2020, 12, 285.
4. Đỗ Tất Lợi, *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, NXB Y học, 2004.
5. Võ Văn Chi, *Từ điển cây thuốc Việt Nam*, 1997.
6. T. Johns, K. Graham, G.H.N. Towers, *Molluscicidal activity of affinin and other isobutylamides from the asteraceae*, Phytochemistry, 1982, 21, 2737-2738.
7. Y. Hui, X.-Q. Zhou, G.-Y. Chen, C.-R. Han, X.-P. Song, C.-Y. Dai, W.-H. Chen, *Chemical Constituents of the Flowers of Wedelia trilobata*, Chemistry of Natural Compounds, 2019, 55, 160-163.
8. Y. Hui, J. Cao, J. Lin, J.N. Yang, Y.J. Liu, C.R. Han, X.P. Song, C.Y. Dai, X.P. Zhang, W.H. Chen, *Eudesmanolides and Other Constituents from the Flowers of Wedelia trilobata*, Chemistry & Biodiversity, 2018, 15, 1700411.
9. H.G. Ân, *Khảo sát và so sánh đặc điểm vi học, hoạt tính kháng khuẩn kháng nấm giữa Sài đất ba thùy (Wedelia trilobata (L). Hitchc.) và Sài đất (Wedelia chinensis (Osbeck.) Merr.)*, 2018.
10. S. Koul, A. Pandurangan, R. Khosa, *Wedelia chinensis (Asteraceae)—an overview*, Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 2012, 2, S1169-S1175.
11. K. Umasankar, V. Suresh, R. Kumar, A. Suresh, N. Kumar, G. Arunachalam, *CNS activity of ethanol extract of Wedelia chinensis in experimental animals*, International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology, 2010, 3, 881-886.
12. I. Darah, S. Lim, K. Nithianantham, *Effects of methanol extract of Wedelia chinensis osbeck (asteraceae) leaves against pathogenic bacteria with emphasise on Bacillus cereus*, Indian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2013, 75, 533.
13. A. Manjamalai, V. Grace, *Antioxidant activity of essential oils from Wedelia chinensis (Osbeck) in vitro and in vivo lung cancer bearing C57BL/6 mice*, Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, 2012, 13, 3065-3071.
14. F. Bohlmann, E. Rosenberg, H. Robinson, R.M. King, *Pseudoguaianolides from Wedelia grandiflora*, Phytochemistry, 1980, 19, 2047-2048.
15. S.F. Farag, N.A. El-Emary, M. Niwa, *Eudesmanolides from Wedelia prostrata*, Chem Pharm Bull, 1996, 44, 661-664.
16. C.Y. Ragasa, W.G. Padolina, B.F. Bowden, S. Li, D.M. Tapiolas, J.C. Coll, *New eudesmanolide sesquiterpenes from a Philippines collection of Wedelia prostata*, Journal of Natural products, 1993, 56, 386-393.

17. F. Bohlmann, J. Ziesche, R.M. King, H. Robinson, *Eudesmanolides and diterpenes from Wedelia trilobata and an ent-kaurenic acid derivative from Aspilia parvifolia*, *Phytochemistry*, 1982, 20, 751-756.
18. F. Bohlmann, C. Zdero, R.M. King, H. Robinson, *Eudesmanolides and kaurene derivatives from Wedelia hookeriana*, *Phytochemistry*, 1982, 21, 2329-2333.
19. F. Bohlmann, W. Ang, R.M. King, H. Robinson, *A further steiractinolide from Wedelia grandiflora*, *Phytochemistry*, 1984, 23, 2069-2070.
20. W. Herz, V.E. Sosa, *10 α -methyl-eudesman-8 α H,12-olides and other constituents from Wedelia pinetorum*, *Phytochemistry*, 1986, 25, 1481-1483.
21. W. Herz, P. Kulanthaivel, *Ent-kauranes and 10 α -methyl-eudesman-8 α H,12-olides from Wedelia calycina and Wedelia hispida*, *Phytochemistry*, 1984, 23, 2271-2275.
22. Y. Li, X. Hao, S. Li, H. He, X. Yan, Y. Chen, J. Dong, Z. Zhang, S. Li, *Eudesmanolides from Wedelia trilobata (L.) Hitchc. as potential inducers of plant systemic acquired resistance*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, 61, 3884-3890.
23. A. Mottakin, R. Chowdhury, M. Haider, K. Rahman, C. Hasan, M. Rashid, *Cytotoxicity and antibacterial activity of extractives from Wedelia calendulacea*, *Fitoterapia*, 2004, 75, 355-359.
24. X.H. Ma, Z.B. Wang, L. Zhang, W. Li, C.M. Deng, T.H. Zhong, G.Y. Li, W.M. Zheng, Y.H. Zhang, *Diterpenoids from Wedelia prostrata and their derivatives and cytotoxic activities*, *Chemistry & Biodiversity*, 2017, 14, e1600423.
25. S. Brito, O. Crescente, A. Fernández, A. Coronado, N. Rodriguez, *Efficacy of a kaurenic acid extracted from the Venezuelan plant Wedelia trilobata (Asteracea) against Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Biomedica*, 2006, 26, 180-187.
26. L. Sun, Z. Wang, Y. Wang, J. Xu, X. He, *Anti-proliferative and anti-neuroinflammatory eudesmanolides from Wedelia (Sphagneticola trilobata (L.) Pruski)*, *Fitoterapia*, 2020, 142, 104452.
27. N. Verma, R.L. Khosa, *Chemistry and biology of genus Wedelia Jacq.: A review*, *Indian Journal of Natural Products and Resources*, 2015, 6, 71-90.
28. X. Li, M. Dong, Y. Liu, Q.-W. Shi, H. Kiyota, *Structures and biological properties of the chemical constituents from the genus Wedelia*, *Chemistry & Biodiversity*, 2007, 4, 823-836.
29. N.T. Hoang, V.T.L. Chi, N.K.P. Phung, *Some di- and triterpenes of Wedelia urticaefolia (Bl.) (Asteraceae)*, *Tap Chi Hoa Hoc*, 2009, 47, 127-132.
30. Z.X. Gang, Y.W. Qiang, L.Y. Ting, L.X. Jing, L.X. Yan, Z.Y. Hong, *Studies on the diterpenoids of W. prostrata*, *Journal of Chinese Medicinal Materials*, 2011, 34, 383-386.
31. H. Ren, Q.L. Xu, Y. Luo, M. Zhang, Z.Y. Zhou, L.M. Dong, J.W. Tan, *Two new ent-kaurane diterpenoids from Wedelia trilobata (L.) Hitchc*, *Phytochem Lett*, 2015, 11, 260-263.
32. S.-F. Li, J.-Y. Ding, Y.-T. Li, X.-J. Hao, S.-L. Li, *Antimicrobial diterpenoids of Wedelia trilobata (L.) Hitchc*, *Molecules*, 2016, 21, 457.

33. Z. Wu, Y. Zhang, W. Li, N. Chen, Q. Niu, Y. Li, Q. Li, D. Yang, Y. Li, G. Wang, *New ent-kaurane diterpenes with chiral epoxyangelate moieties from Wedelia prostrata*, Chinese Chemical Letters, 2019, 30, 451-453.
34. J. Xu, L. Zhou, L. Sun, Z. Wang, Y. Wang, Y. Wang, X.J.J.o.N.P. He, *3 α -Angeloyloxy-ent-kaur-16-en-19-oic Acid Isolated from Wedelia trilobata L. Alleviates Xylene-Induced Mouse Ear Edema and Inhibits NF- κ B and MAPK Pathway in LPS-Stimulated Macrophages*, Journal of Natural Products, 2020, 83, 3726-3735.
35. K.R. Das, A. Iwasaki, K. Suenaga, H.J.T.L. Kato-Noguchi, *A kaurene-type novel phytotoxic substance in Wedelia chinensis*, Tetrahedron Letters, 2020, 61, 151600.
36. J. Xu, Z. Wang, L. Sun, Y. Wang, Y. Wang, X. He, *(3 α)-3-(tiglinoyloxy)-ent-kaur-16-en-19-oic acid, isolated from Wedelia trilobata L., exerts an anti-inflammatory effect via the modulation of NF- κ B, MAPK and mTOR pathway and autophagy in LPS-stimulated macrophages*, Toxicology in Vitro, 2021, 73, 105139.
37. Y.L. Ling, Y.K. Ying, K. Chohachi, O. Yoshiteru, K. Yoshinobu, H. Hiroshi, *Antihepatotoxic principles of Wedelia chinensis Herbs*, Planta Medica, 1986, 52, 499-500.
38. S. Emmanuel, T. Amalraj, S. Ignacimuthu, *Hepatoprotective effect of coumestans isolated from the leaves of Wedelia calendulacea Less. in paracetamol induced liver damage*, Indian Journal of Experimental Biology, 2001, 39, 1305-1307.
39. A.K. Sharma, K.K. Anand, P. Pushpangadan, B.K. Chandan, C.L. Chopra, Y.S. Prabhakar, N.P. Damodaran, *Hepatoprotective effects of Wedelia calendulacea*, Journal of Ethnopharmacology, 1989, 25, 93-102.
40. G.J.a.d. Carvalho, M.G.d. Carvalho, D.T. Ferreira, T.d.J.F.e.R. Braz-Filho, *Diterpenos, triterpenos e esteróides das flores de Wedelia paludosa*, Química Nova, 2001, 24, 24-26.
41. Z. Wu, Y. Zhang, L. Yang, N. Chen, L. Jiang, S. Jiang, G. Li, Y. Li, G. Wang, *Three new ent-kaurane diterpenes from the herbs of Wedelia prostrata*, Journal of Natural Medicines, 2017, 71, 305-309.
42. C. Cai, Y. Zhang, D. Yang, X. Hao, S. Li, *Two new kaurane-type diterpenoids from Wedelia chinensis (Osbeck.) Merr*, Natural Product Research, 2017, 31, 2531-2536.
43. Y.L. Zhong, Y.B. Zhang, L. Ding, Q.W. Niu, J. Qin, L.J. He, Y.L. Li, G.C. Wang, *Two New Compounds from Wedelia chinensis and Their Anti-inflammatory Activities*, Medicina Chemistry and Drug Discovery, 2018, 3, 3459-3462.
44. R. Batista, E. Chiari, A.B.d. Oliveira, *Trypanosomicidan kaurane diterpenes from Wedelia paludosa*, Planta Medica, 1999, 65, 283-284.
45. T.R. Govindachari, M.S. Premila, *Triterpenoid saponins from Wedelia calendulaceae Less.*, Indian journal of chemistry. Sect. B: Organic chemistry, Including Medical Chemistry, 1991, 30B, 466.
46. C. Choo, N. Sulong, F. Man, T. Wong, *Vitexin and isovitexin from the leaves of Ficus deltoidea with in-vivo α -glucosidase inhibition*, Journal of Ethnopharmacology, 2012, 142, 776-781.

47. X.R. Luo, *Master Thesis*, The Academy of Military Medical Sciences, Beijing, China, 2005.
48. C.A. Calanasan, J.K. MacLeod, *A diterpenoid sulphate and flavonoids from Wedelia asperima*, *Phytochemistry*, 1998, 47, 1093-1099.
49. S. Apers, Y. Huang, S.V. Miert, R. Dommissie, D.V. Berghe, L. Pieters, A. Vlietinck, *Characterisation of new oligoglycosidic compounds in two Chinese medicinal herbs*, *Phytochemical Analysis*, 2002, 13, 202–206.
50. D.H. Miles, V. Chittawong, P.A. Hedin, U. Kokpol, *Potential agrochemicals from leaves of Wedelia biflora*, *Phytochemistry*, 1993, 32, 1427-1429.
51. T.R. Govindachari, M.S. Premila, *The benzofuran norwedelic acid from Wedelia calendulaceae*, *Phytochemistry*, 1985, 24, 3068-3069.
52. N.S. Nguyen, N.T. Do, K.P.P. Nguyen, C.H. Ngyen, *Tap Chi Hoa Hoc*, 1998, 36, 87.
53. S.F. Farag, H.A. Hassanean, A.M. Makboul, N.A. El-Emary, M. Niwa, *Entkaurane diterpenes and further constituents from Wedelia trilobata*, *Bull. Pharm. Sci., Assiut. Univ. Sci.*, 1998, 21, 81-84.
54. N.T.H. Thu, L.T. Ha, V.T. Nga, P.N.K. Tuyen, T.T. Quang, F.R. Danielle, M.P. Lawrence, N.K.P. Phung, *Six new phenolic glycosides and a new ceramide from the flowers of Wedelia biflora and Their cytotoxicity against some cancer cell lines*, *Natural Product Communications*, 2013, 8, 367-372.
55. D.H. Miles, V. Chittawong, A.M. Payne, P.A. Hedin, U. Kokpol, *Cotton boll weevil antifeedant activity and antifungal activity (Rhizoctonia solani and Pythium ultimum) of extracts of the stems of Wedelia biflora*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1990, 38, 1591–1594.
56. J. Chethan, K.S. Kumara, S. Niranjana, H. Prakash, *Evaluation of antioxidant and antibacterial activities of methanolic flower extract of Wedelia trilobata (L.) Hitch*, *African Journal of Biotechnology*, 2012, 11, 9829-9834.
57. T.R. Govindachari, M.S. Premila, *Phytochemistry*, 1985, 24, 3068-3069.
58. M. Gupta, U. K anti Mazumder, P. Haldar, C. Kandar, L. Manikandan, G. Senthil, *Anticancer activity of Indigofera aspalathoides and Wedelia calendulaceae in Swiss albino mice*, *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 2010, 141-145.
59. F.-M. Lin, L.-R. Chen, E.-H. Lin, F.-C. Ke, H.-Y. Chen, M.-J. Tsai, P.-W. Hsiao, *Compounds from Wedelia chinensis synergistically suppress androgen activity and growth in prostate cancer cells*, *Carcinogenesis*, 2007, 28, 2521-2529.
60. C.-H. Tsai, F.-M. Lin, Y.-C. Yang, M.-T. Lee, T.-L. Cha, G.-J. Wu, S.-C. Hsieh, P.-W. Hsiao, *Herbal extract of Wedelia chinensis attenuates androgen receptor activity and orthotopic growth of prostate cancer in nude mice*, *Clinical Cancer Research*, 2009, 15, 5435-5444.
61. Z. Thomy, B. Ginting. *Isolation and cytotoxic test of plant secondary metabolites from Sernai (Wedelia biflora L.)*. in *Prosiding seminar nasional biologi â€ œMeningkatkan peran biologi dalam mewujudkan national achievement with global reach*. USU-Press. 2011.
62. H. Wagner, B. Geyer, Y. Kiso, H. Hikino, G.S. Rao, *Coumestans as the main active principles of the liver drugs Eclipta alba and Wedelia calendulacea*, *Planta Medica*, 1986, 52, 370-374.

63. V. Mardina, S. Ilyas, T. Harmawan, H. Halimatussakdiah, M. Tanjung, *Antioxidant and cytotoxic activities of the ethyl acetate extract of Sphagneticola trilobata (L.) JF Pruski on MCF-7 breast cancer cell*, Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research, 2020, 11, 123.
64. L.T.T.N. Nguyễn Thị Minh Thuận, *Đánh giá tác động gây độc và chết theo chương trình của cao phân đoạn chiết từ Wedlilia chinensis (Osbeck) Merr., trên tế bào đơn nhân máu ngoại vi người*, Nghiên cứu Dược & Thông tin thuốc, 2020, 11, 18-23.
65. S. Khanum, M.S. Sarwar, M.S. Islam, *In vivo neurological, analgesic and in vitro antioxidant and cytotoxic activities of ethanolic extract of leaf and stem bark of Wedelia chinensis*, Bangladesh Pharmaceutical Journal, 2019, 22, 18-26.
66. L.-J. Chen, T.-C. Hsu, P.-J. Yeh, J.L. Yow, C.-L. Chang, C.-H. Lin, B.-S. Tzang, *Differential Effects of Wedelia chinensis on Human Glioblastoma Multiforme Cells*, Integrative Cancer Therapies, 2021, 20, 15347354211000119.
67. X.Q. Zhou, X.M. Mao, R. Fan, S.Y. Li, J. Shang, T. Zhang, R.H. Li, H.Q. Li, Y. Hui, W.H.J.P.R. Chen, *Trilobolide-6-O-isobutyrate suppresses hepatocellular carcinoma tumorigenesis through inhibition of IL-6/STAT3 signaling pathway*, Phytotherapy Research, 2021, 35, 5741-5753.
68. A.P. Novaes, C. Rossi, C. Poffo, E.P. Júnior, O. AE, V. Schlemper, N. R, V. Cechinel-Filho, C. Bürger, *Preliminary evaluation of the hypoglycemic effect of some Brazilian medicinal plants*, Therapie, 2001, 56, 427-430.
69. I. Kade, N. Barbosa, E. Ibukun, A. Igbakin, C. Nogueira, J. Rocha, *Aqueous extracts of Sphagneticola trilobata attenuates streptozotocin-induced hyperglycaemia in rat models by modulating oxidative stress parameters*, Biology and Medicine, 2010, 2, 1-13.
70. N. Buddhakala, C. Talubmook, *Toxicity and antidiabetic activity of ethanolic extract of Sphagneticola trilobata (L.) Pruski flower in rats*, Journal of Ethnopharmacology, 2020, 262, 113128.
71. M. Islam, S. Zaman, K. Biswas, M. Al-Amin, M. Hasan, A. Alam, T. Tanaka, G.J.B.c.m. Sadik, *therapies, Evaluation of cholinesterase inhibitory and antioxidant activity of Wedelia chinensis and isolation of apigenin as an active compound*, BMC Complementary Medicine and Therapies, 2021, 21, 1-12.
72. M. Govindappa, S.N. Sravya, M. Poojashri, T. Sadananda, C. Chandrappa, G. Santoyo, P. Sharanappa, N.A. Kumar, *Antimicrobial, antioxidant and in vitro anti-inflammatory activity and phytochemical screening of water extract of Wedelia trilobata (L.) Hitchc*, Journal of Medicinal Plant Research, 2011, 5, 5718-5729.
73. D. Jayakumar, S.J. Mary, R.J. Santhi, *Antioxidant and antimicrobial activities of Wedelia trilobata and Morinda pubescens*, Asian Journal of Chemistry, 2011, 23, 305.
74. M.R.K. Sartori, J.B. Pretto, A.B. Cruz, L.F.V. Bresciani, R.A. Yunes, M. Sortino, S.A. Zacchino, V.C. Filho, *Antifungal activity of fractions and two pure compounds of flowers from Wedelia paludosa (Acmela brasiliensis) (Asteraceae)*, Pharmazie, 2003, 58, 567-569.

75. J.M. Rosa, P.S. Brocardo, D. Balz, A.L.S. Rodrigues, A.P. Waltrick, A. Bagio, E.C. Goulart, F.C. Meotti, A.L. Dafre, A.R.S. Santos, *Protective effect of crude extract from Wedelia paludosa (Asteraceae) on the hepatotoxicity induced by paracetamol in mice*, Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2006, 58, 137–142.
76. A.K.M. Mottakin, R. Chowdhury, M.S. Haidera, K.M. Rahman, C.M. Hasan, M.A. Rashid, *Cytotoxicity and antibacterial activity of extractives from Wedelia calendulacea*, Fitoterapia, 2004, 75, 355–359.
77. A. Taddei, A. Rosas-Romero, *Antimicrobial activity of Wedelia trilobata crude extracts*, Phytomedicine, 1999, 6, 133-134.
78. L. Zhao, Z. Hu, S. Li, X. Zhou, J. Li, X. Su, L. Zhang, Z. Zhang, J. Dong, *Diterpenoid compounds from Wedelia trilobata induce resistance to Tomato spotted wilt virus via the JA signal pathway in tobacco plants*, Scientific Reports, 2019, 9, 1-12.
79. S.S. Mizokami, N.S. Arakawa, S.R. Ambrosio, A.C. Zarpelon, R. Casagrande, T.M. Cunha, S.H. Ferreira, F.Q. Cunha, W.A. Verri Jr, *Kaurenoic acid from Sphagneticola trilobata inhibits inflammatory pain: effect on cytokine production and activation of the NO–cyclic GMP–protein kinase G–ATP-sensitive potassium channel signaling pathway*, Journal of Natural products, 2012, 75, 896-904.
80. N. Balekar, N.G. Katkam, T. Nakpheng, K. Jehtae, T. Srichana, *Evaluation of the wound healing potential of Wedelia trilobata (L.) leaves*, Journal of Ethnopharmacology, 2012, 141, 817-824.
81. F. Yuan, J. Chen, P.P. Sun, S. Guan, J. Xu, *Wedelolactone inhibits LPS-induced pro-inflammation via NF-kappaB pathway in RAW 264.7 cells*, Journal of Biomedical Science, 2013, 31, 20-28.
82. T. Prakash, D. Kotresha, R.R. Nedendla, *Neuroprotective activity of Wedelia calendulacea on cerebral ischemia/reperfusion induced oxidative stress in rats*, Indian Journal of Pharmacology, 2011, 43, 676.
83. F.G. Coe, G.J. Anderson, *Screening of medicinal plants used by the Garifuna of Eastern Nicaragua for bioactive compounds*, Journal of Ethnopharmacology, 1996, 53, 29-50.
84. R. Senthilkumar, S. Ahmedjohn, G. Archunan, N. Manoharan, *Antioxidant activity of Wedelia chinensis in alloxan induced diabetic rats*, Pharmacologyonline, 2008, 2, 640-651.
85. M.A.F. Islam, A. Barua, M.H. Binoy, M.J. Alam, M. Ershad, M. Choudhuri, R. Masuma, *Pre-clinical investigation of anti-diarrheal and CNS depressant effect of Wedelia trilobata in Swiss albino mice*, Oriental Pharmacy and Experimental Medicine, 2019, 19, 435-444.
86. G. Mishra, R. Sinha, N. Verma, R. Khosa, V.K. Garg, P. Singh, *Hepatoprotective activity of alcoholic and aqueous extracts of Wedelia chinensis*, Pharmacologyonline, 2009, 1, 345-356.
87. A.A. Jalal, S. Selvakumar, R. Nallathambi, G. Jeevaprakash, S. Dheivanai, S. Senthivelan, *Hepatoprotective activity of Wedelia chinensis against carbon tetrachloride induced liver damage in rats*, Int J Phytopharmacol, 2012, 3, 121-125.

88. H. Wagner, B. Fessler, *In-vitro-5-lipoxygenasehemmung durch Eclipta alba Extrakte und das Coumestan-Derivat Wedelolacton*, *Planta Medica*, 1986, 52, 374-377.
89. R. Vinyagam, P. Kumar, K.E. Lee, B. Xu, M.N. Matin, S.G.J.P. Kang, *Biological and Functional Properties of Wedelolactone in Human Chronic Diseases*, *Phyton-International Journal of Experimental Botany*, 2021, 90, 1.
90. N.P. Thao, B.T.T. Luyen, J.S. Lee, J.H. Kim, N.T. Dat, Y.H. Kim, *Inhibition potential of cycloartane-type glycosides from the roots of Cimicifuga dahurica against soluble epoxide hydrolase*, *Journal of Natural products*, 2017, 80, 1867-1875.
91. S. Milkovska-Stamenova, R. Schmidt, A. Frolov, C. Birkemeyer, *GC-MS method for the quantitation of carbohydrate intermediates in glycation systems*, *Journal of Agricultural, Food Chemistry*, 2015, 63, 5911-5919.
92. I. Ohtani, T. Kusumi, Y. Kashman, H. Kakisawa, *High-field FT NMR application of Mosher's method. The absolute configurations of marine terpenoids*, *Journal of the American Chemical Society*, 1991, 113, 4092-4096.
93. C. Nathan, *Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells*, *The FASEB journal*, 1992, 6, 3051-3064.
94. S. Hatziieremia, A. Gray, V. Ferro, A. Paul, R. Plevin, *The effects of cardamonin on lipopolysaccharide-induced inflammatory protein production and MAP kinase and NF κ B signalling pathways in monocytes/macrophages*, *British Journal of Pharmacology*, 2006, 149, 188-198.
95. V.M. Dirsch, H. Stuppner, A.M. Vollmar, *The Griess assay: suitable for a bio-guided fractionation of anti-inflammatory plant extracts?*, *Planta Medica*, 1998, 64, 423-426.
96. M.C.N. Hong Hanh Thi Tran, Hoang Tram Le, Thi Luyen Nguyen, Thanh Binh Pham, Van Minh Chau, Hoai Nam Nguyen, Tien Dat Nguyen *Inhibition of α -glucosidase and α -amylase from Cyperus rotundus*, *Pharmaceutical Biology*, 2014, 51, 74-77.
97. H.H.T. Tran, M.C. Nguyen, H.T. Le, T.L. Nguyen, T.B. Pham, V.M. Chau, H.N. Nguyen, T.D. Nguyen, *Inhibitors of α -glucosidase and α -amylase from Cyperus rotundus*, *Pharmaceutical Biology*, 2014, 52, 74-77.
98. T. Mosmann, *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays*, *J Immunol Methods*, 1983, 65, 55-63.
99. X.F. Cai, G. Shen, N.T. Dat, O.H. Kang, Y.M. Lee, J.J. Lee, Y.H. Kim, *Inhibitory effect of kaurane type diterpenoids from Acanthopanax koreanum on TNF- α secretion from trypsin-stimulated HMC-1 cells*, *Archives of Pharmacal Research*, 2003, 26, 731-734.
100. L. Han, X. Huang, I. Sattler, H.-M. Dahse, H. Fu, W. Lin, S. Grabley, *New diterpenoids from the marine mangrove Brugiera gymnorrhiza*, *Journal of Natural products*, 2004, 67, 1620-1623.
101. N. Lupescu, S.M. Arad, S. Geresh, M.A. Bernstein, R. Glaser, *Structure of some sulfated sugars isolated after acid hydrolysis of the extracellular polysaccharide of Porphyridium sp., a unicellular red alga*, *Carbohydrate Research*, 1991, 210, 349-352.

102. M. Xu, Y.-J. Zhang, X.-C. Li, M.R. Jacob, C.-R. Yang, *Steroidal saponins from fresh stems of Dracaena angustifolia*, *Journal of Natural products*, 2010, 73, 1524-1528.
103. J. Shitamoto, S. Sugimoto, K. Matsunami, H. Otsuka, T. Shinzato, Y. Takeda, *Tricalysionoside A, a megastigmane gentiobioside, sulfatricalysines A–F, and tricalysiosides X–Z, ent-kaurane glucosides, from the leaves of Tricalysia dubia*, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 2011, 59, 72-77.
104. P. Van Loo, A. De Bruyn, M. Buděšínský, *Reinvestigation of the structural assignment of signals in the ¹H and ¹³C NMR spectra of the flavone apigenin*, *Magnetic Resonance in Chemistry*, 1986, 24, 879-882.
105. C. Redaelli, L. Formentini, E. Santaniello, *Apigenin 7-glucoside and its 2''- and 6''-acetates from ligulate flowers of Matricaria chamomilla*, *Phytochemistry*, 1980, 19, 985-986.
106. T.T.H. Hanh, N.H. Dang, N.T. Dat, *α-Amylase and α-glucosidase inhibitory saponins from Polyscias fruticosa leaves*, *Journal of Chemistry*, 2016, 2082946.
107. C. Borel, M.P. Gupta, K. Hostettmann, *Molluscicidal saponins from Swartzia simplex*, *Phytochemistry*, 1987, 26, 2685-2689.
108. S. Okombi, D. Rival, S. Bonnet, A.-M. Mariotte, E. Perrier, A. Boumendjel, *Discovery of benzylidenebenzofuran-3 (2 H)-one (aurones) as inhibitors of tyrosinase derived from human melanocytes*, *Journal of Medicinal Chemistry*, 2006, 49, 329-333.
109. T. Nakazawa, K. Ohsawa, *Metabolism of rosmarinic acid in rats*, *Journal of Natural Products*, 1998, 61, 993-996.
110. T. Kanchanapoom, H. Otsuka, S. Ruchirawat, *Megastigmane glucosides from Equisetum debile and E. diffusum*, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 2007, 55, 1277-1280.
111. Q. Yu, K. Matsunami, H. Otsuka, Y. Takeda, *Staphylionosides A–K: Megastigmane Glucosides from the Leaves of Staphylea bumalda DC*, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 2005, 53, 800-807.
112. I.K. Lee, K.H. Kim, S.Y. Lee, S.U. Choi, K.R. Lee, *Three new megastigmane glucopyranosides from the Cardamine komarovii*, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 2011, 59, 773-777.
113. M.A. Shushni, R. Singh, R. Mentel, U. Lindequist, *Balticolid: a new 12-membered macrolide with antiviral activity from an ascomycetous fungus of marine origin*, *Marine Drugs*, 2011, 9, 844-851.
114. J.M. Seco, E. Quinoá, R. Riguera, *The assignment of absolute configuration by NMR*, *Chemical Reviews*, 2004, 104, 17-118.
115. M. Honzumi, T. Kamikubo, K. Ogasawara, *A stereocontrolled route to cyclohexylethanoid natural products*, *Synlett*, 1998, 1998, 1001-1003.
116. T. Hase, Y. Kawamoto, K. Ohtani, R. Kasai, K. Yamasaki, C. Picheansoonthon, *Cyclohexylethanoids and related glucosides from Millingtonia hortensis*, *Phytochemistry*, 1995, 39, 235-241.
117. J. Tian, Q.-S. Zhao, H.-J. Zhang, Z.-W. Lin, H.-D. Sun, *New clerodindicins from Clerodendrum indicum*, *Journal of Natural products*, 1997, 60, 766-769.
118. P.K. AGRAWAL, *Carbon-13 NMR of flavonoids*, *Studies in Organic Chemistry*, 1989, 39, XVI-564.

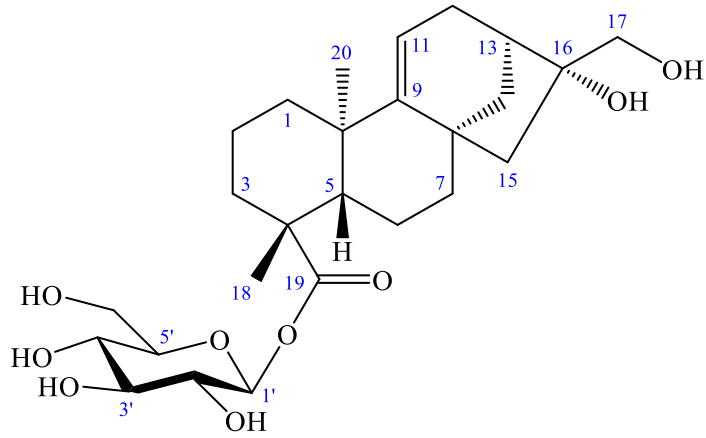
119. L.Ö.D. Zühal Güvenalp, *Flavonol glycosides from Asperula arvensis L*, Turkish Journal of Chemistry, 2005, 29, 163-169.
120. M. Khan, B. Yu, A. Rasul, A. Al Shawi, F. Yi, H. Yang, T. Ma, *Jaceosidin induces apoptosis in U87 glioblastoma cells through G2/M phase arrest*, Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, (2012), 2012.
121. G.F.P. David S. Seiglera, Adolf Nahrstedt, Rosemary Leen. , *Cyanogenic allosides and glucosides from Passiflora edulis ard Carica papaya*, Phytochemistry, 2002, 60, 873-882.
122. A.N.A.E.-S. M. S. Kamel, E. Karvinen, A. Koskinen *Sulfated glycosides. Structural proof for salvadoside through comparison with that reginoselectively synthesized from D-glucose*, Bulletin of Phamaceutical Sciences (Assiut University), 1995, 18, 87-93.
123. X.P.C. Dong Liang Cheng, *Pomolic acid derivaiives from the root of Sargosorba officinalis*, Phytochemistry, 1992, 31, 1317-1324.
124. M.K. Chieko Hata, Kazuko Yoshikawa, Shigenobu Arihara, *Triterpenoid Saponins of Aquifoliaceous Plants. V. Ilexosides XV-XIX from the Barks of Ilex crenata Thunb*, Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 1992, 40, 1990-1992.
125. D.F. Pereira, L.H. Cazarolli, C. Lavado, V. Mengatto, M.S.R.B. Figueiredo, A. Guedes, M.G. Pizzolatti, F.R.M.B. Silva, *Effects of flavonoids on α -glucosidase activity: potential targets for glucose homeostasis*, Nutrition, 2011, 27, 1161-1167.
126. P.V.A. Babu, D. Liu, E.R. Gilbert, *Recent advances in understanding the anti-diabetic actions of dietary flavonoids*, The Journal of Nutritional Biochemistry, 2013, 24, 1777-1789.
127. T.T.H. Hanh, N.H. Dang, N.T. Dat, *α -Amylase and α -glucosidase inhibitory saponins from Polyscias fruticosa leaves*, Journal of Chemistry, 2016, 2016.
128. N.T. Luyen, N.H. Dang, P.T.X. Binh, N.T. Hai, N.T. Dat, *Hypoglycemic property of triterpenoid saponin PFS isolated from Polyscias fruticosa leaves*, Anais da Academia Brasileira de Ciências, 2018, 90, 2881-2886.
129. A. Gangopadhyay, S. Chakraborty, S.K. Jash, D. Gorai, *Cytotoxicity of natural flavones and flavonols against different cancer cells*, Journal of the Iranian Chemical Society, 2022, 1-27.
130. R.J. Williams, J.P. Spencer, C. Rice-Evans, *Medicine, Flavonoids: antioxidants or signalling molecules?*, Free Radical Biology, 2004, 36, 838-849.
131. O. Benavente-Garcia, Castillo, *Update on uses and properties of citrus flavonoids: new findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity*, Journal of Agricultural Food Chemistry, 2008, 56, 6185-6205.
132. M. Tunon, Garcia-Mediavilla, MV Sanchez-Campos, S Gonzalez-Gallego, *Potential of flavonoids as anti-inflammatory agents: modulation of pro-inflammatory gene expression and signal transduction pathways*, Current Drug Metabolism, 2009, 10, 256-271.

PHỤ LỤC

MỤC LỤC PHỤ LỤC

1. Phụ lục phổ hợp chất WT1	3
2. Phụ lục phổ hợp chất WT2	14
3. Phụ lục phổ hợp chất WT3	19
4. Phụ lục phổ hợp chất WT4	23
5. Phụ lục phổ hợp chất WT5	26
6. Phụ lục phổ hợp chất WT6	30
7. Phụ lục phổ hợp chất WT7	34
8. Phụ lục phổ hợp chất WT8	37
9. Phụ lục phổ hợp chất WC1	40
11. Phụ lục phổ hợp chất WC3	52
12. Phụ lục phổ hợp chất WC4	57
13. Phụ lục phổ hợp chất WC5	60
14. Phụ lục phổ của hợp chất WC6	63
16. Phụ lục phổ hợp chất WC8	69
17. Phụ lục phổ hợp chất WC9	72
18. Phụ lục phổ hợp chất WC10	75
19. Phụ lục phổ hợp chất WC11	79
20. Phụ lục phổ hợp chất WC12	84
21. Phụ lục giám định mẫu	89

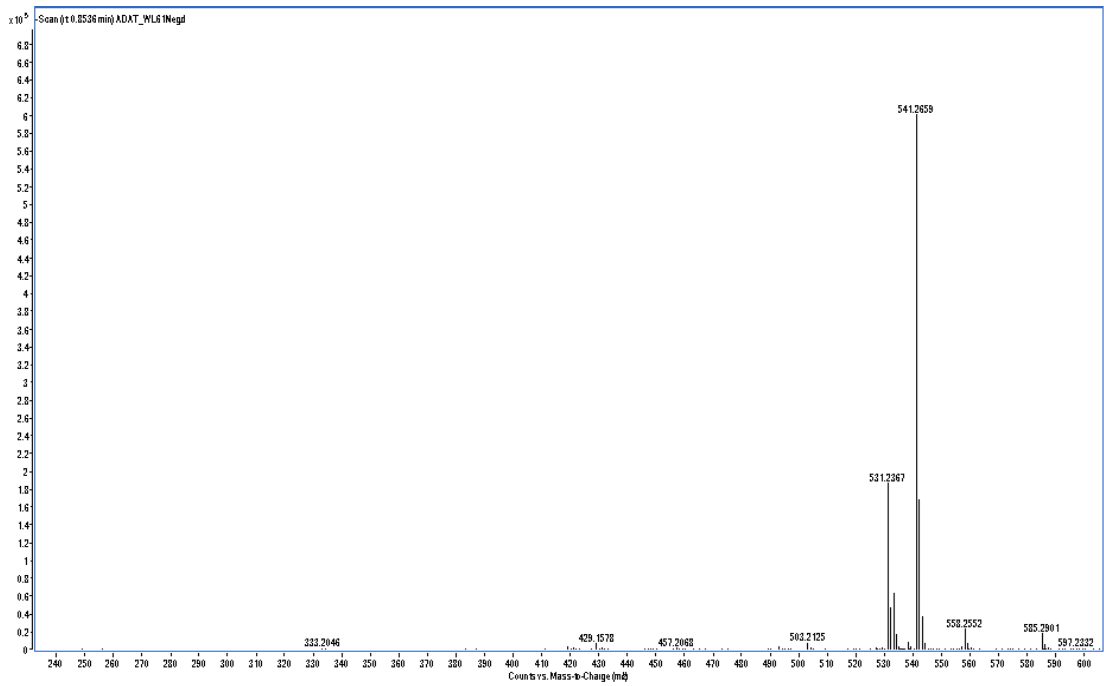
1. Phụ lục phổ hợp chất WT1



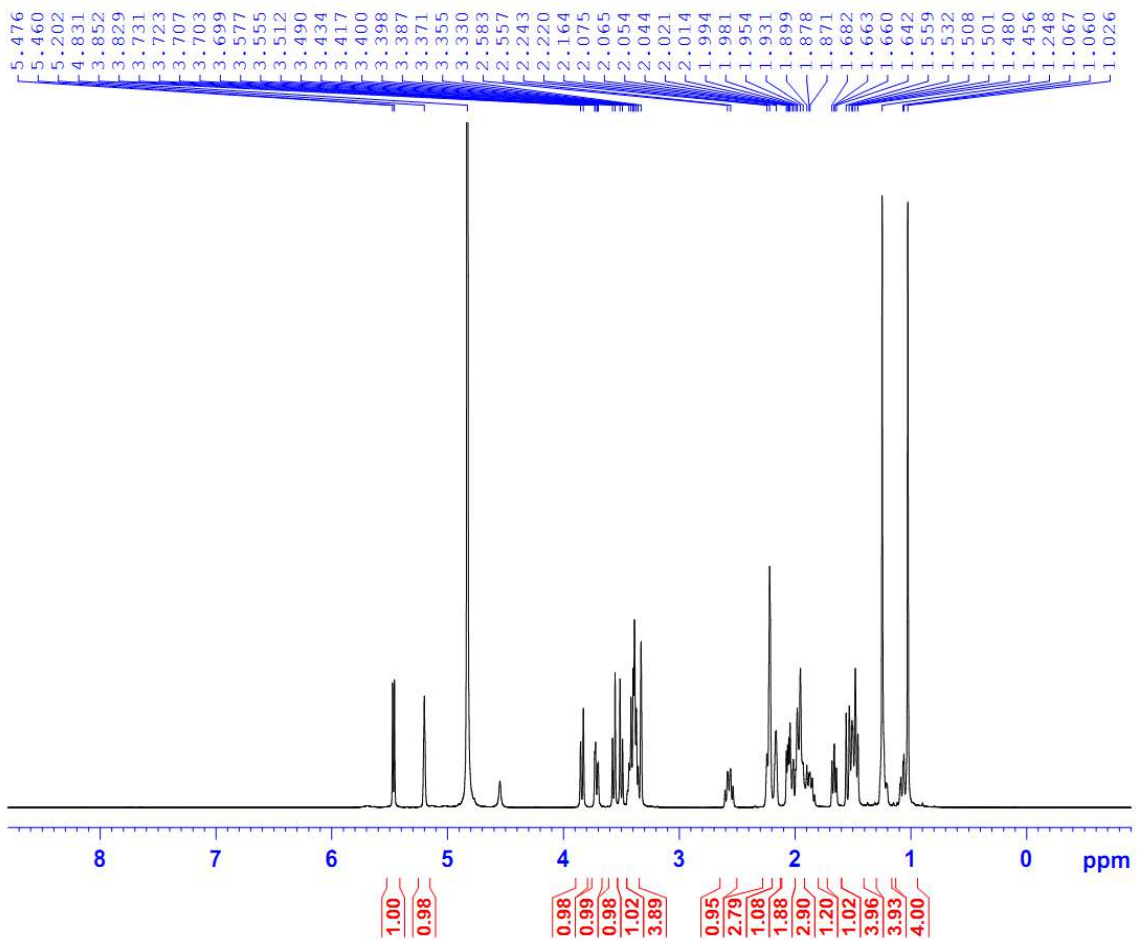
Wedtriloside A

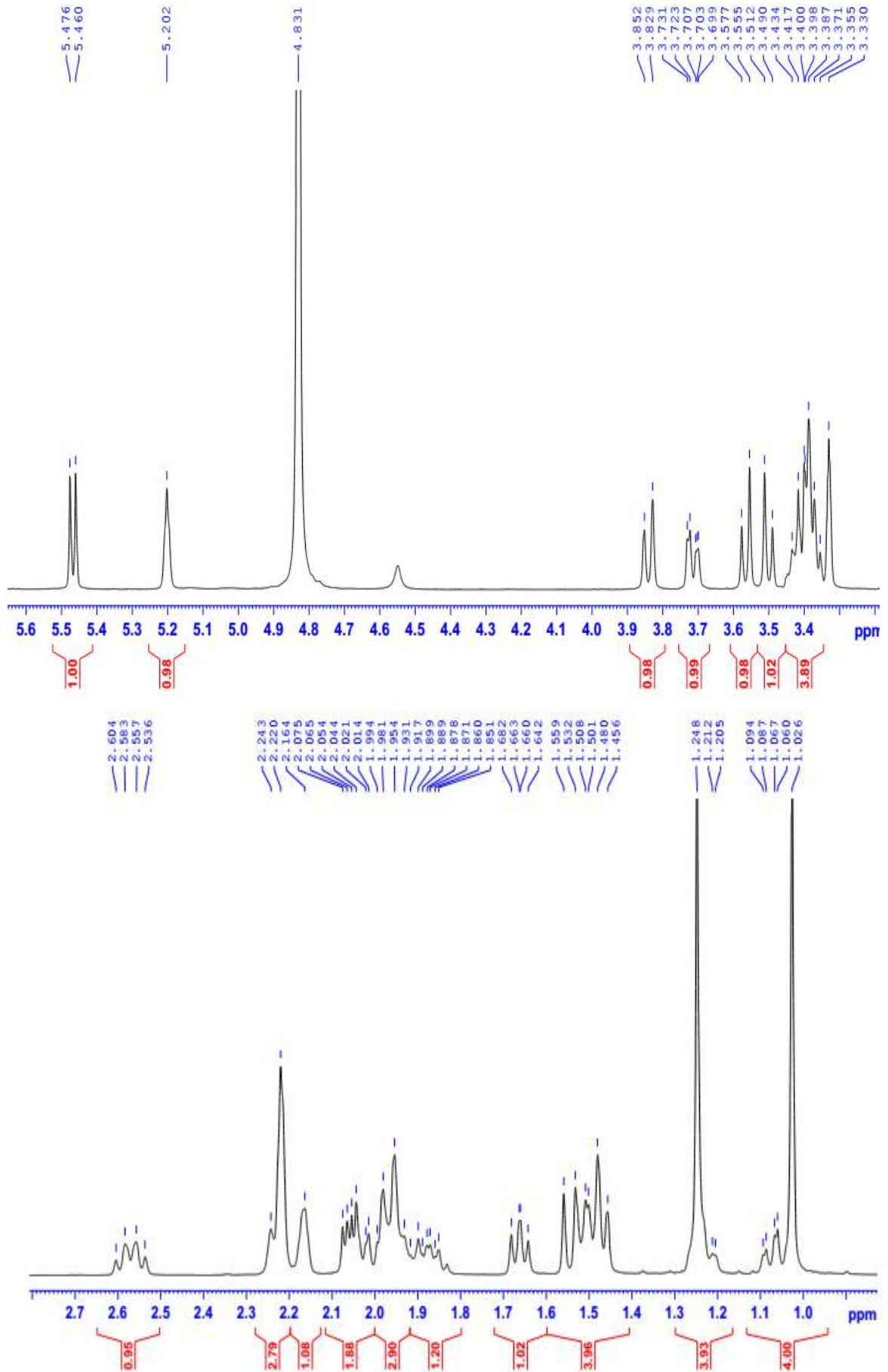
- Công thức phân tử: $C_{26}H_{40}O_9$
- Phổ HR-ESI-MS
- Phổ 1H NMR
- Phổ ^{13}C NMR
- Phổ HSQC
- Phổ HMBC
- Phổ NOESY

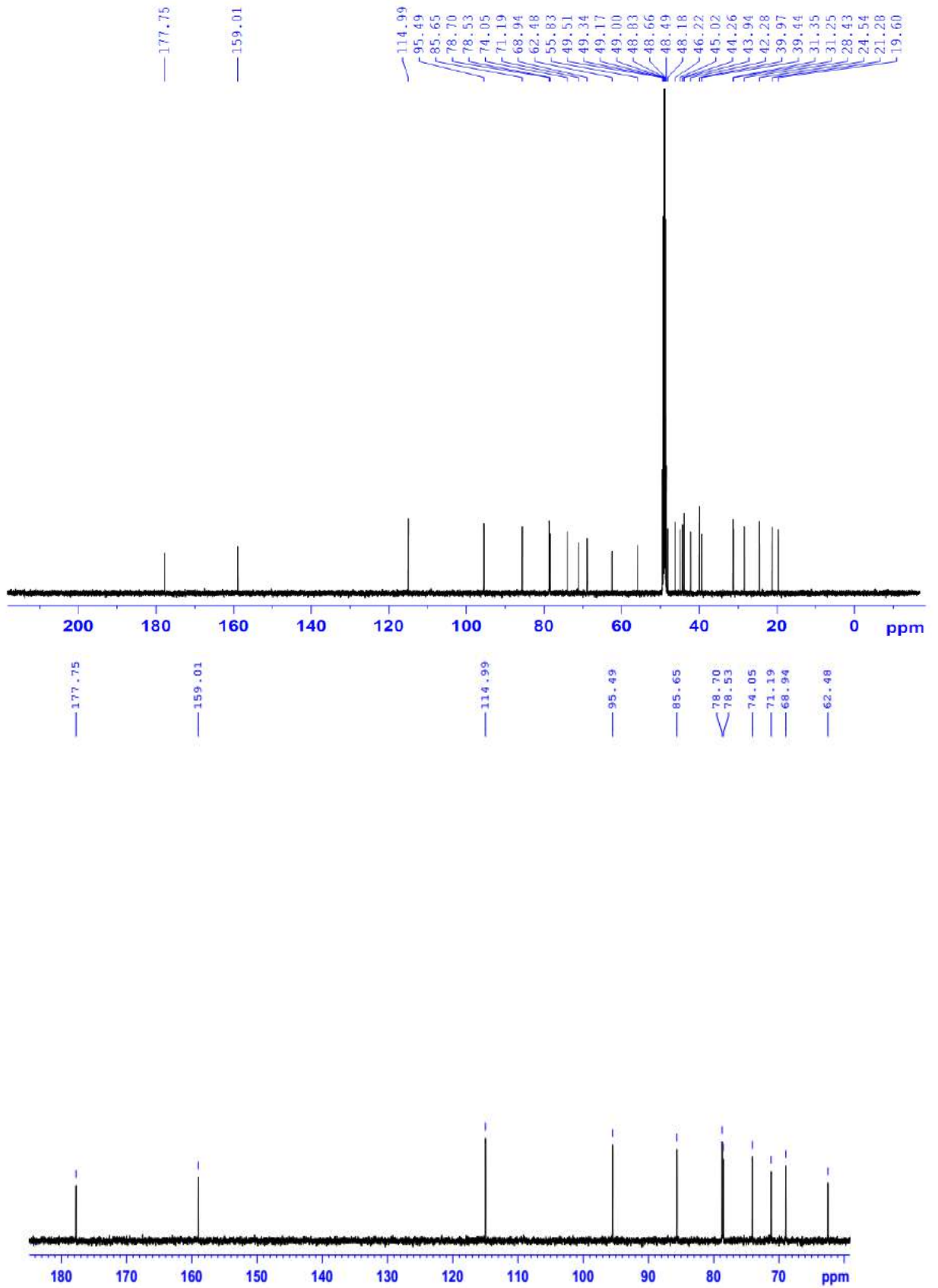
1.1. Phổ HR-ESI-MS của hợp chất WT1

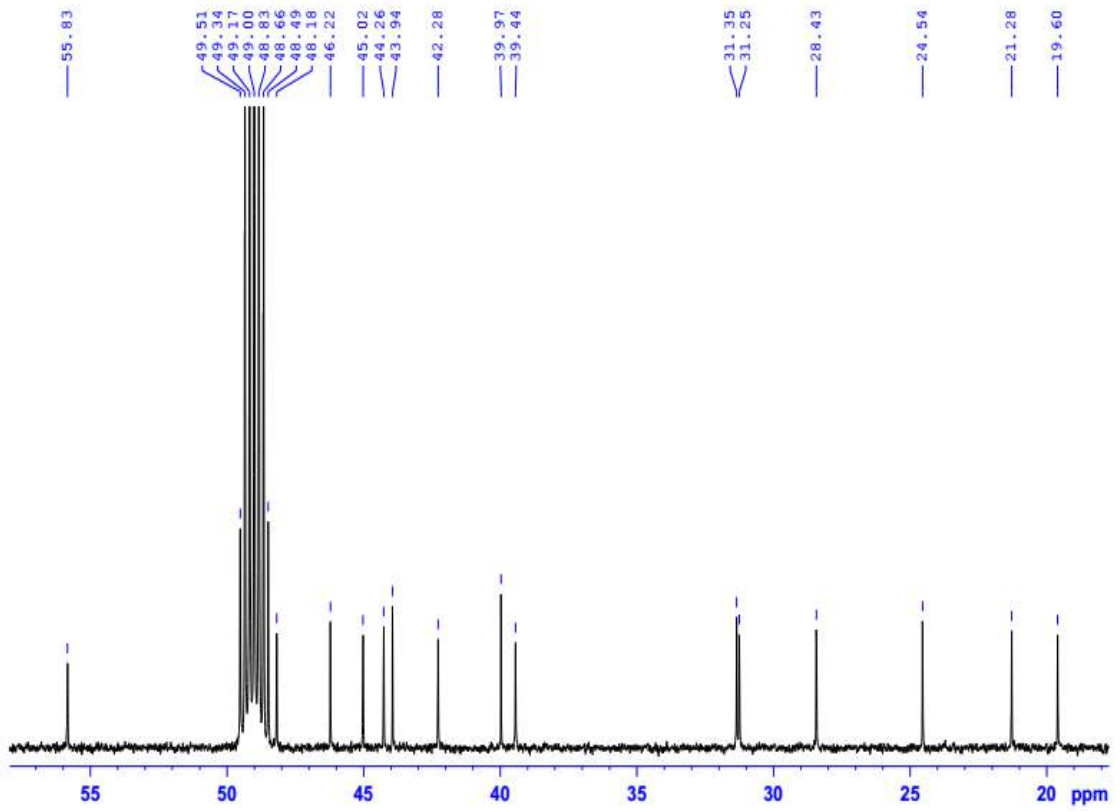


1.2. Phổ ¹H-NMR của hợp chất WT1

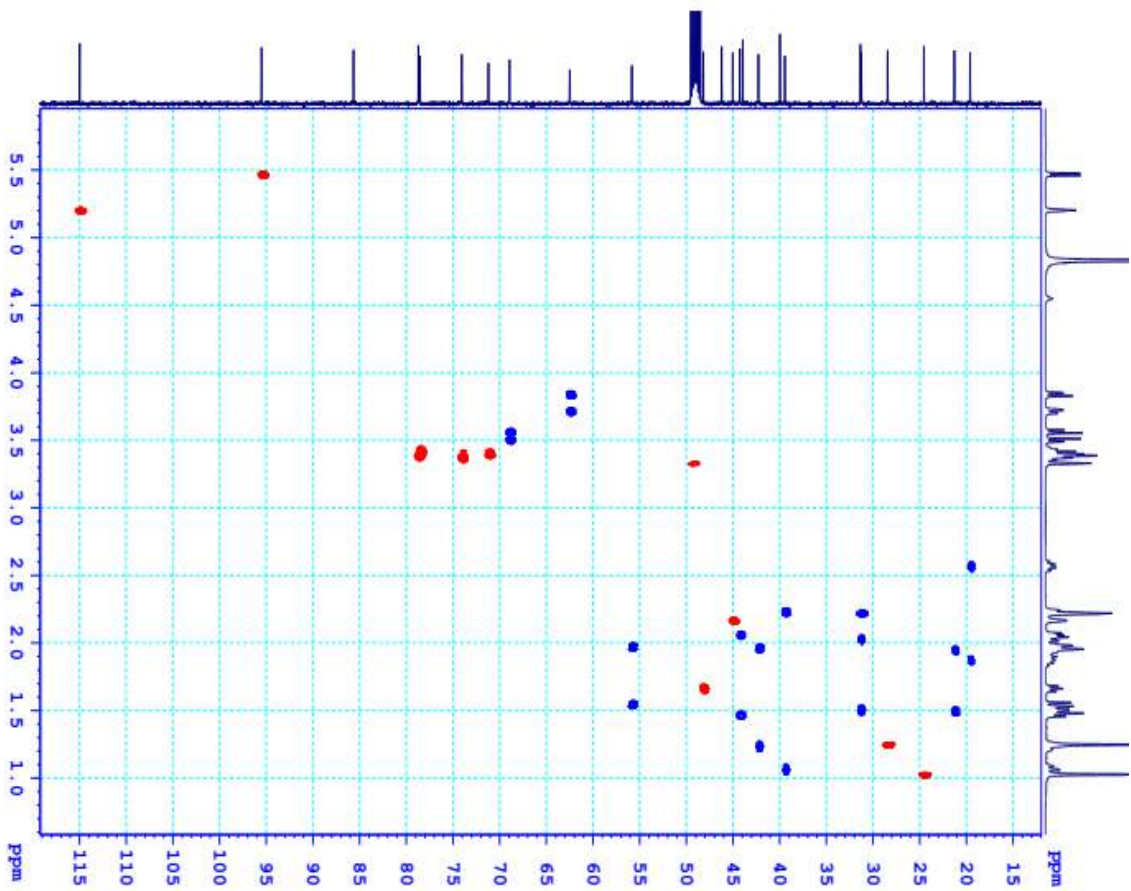


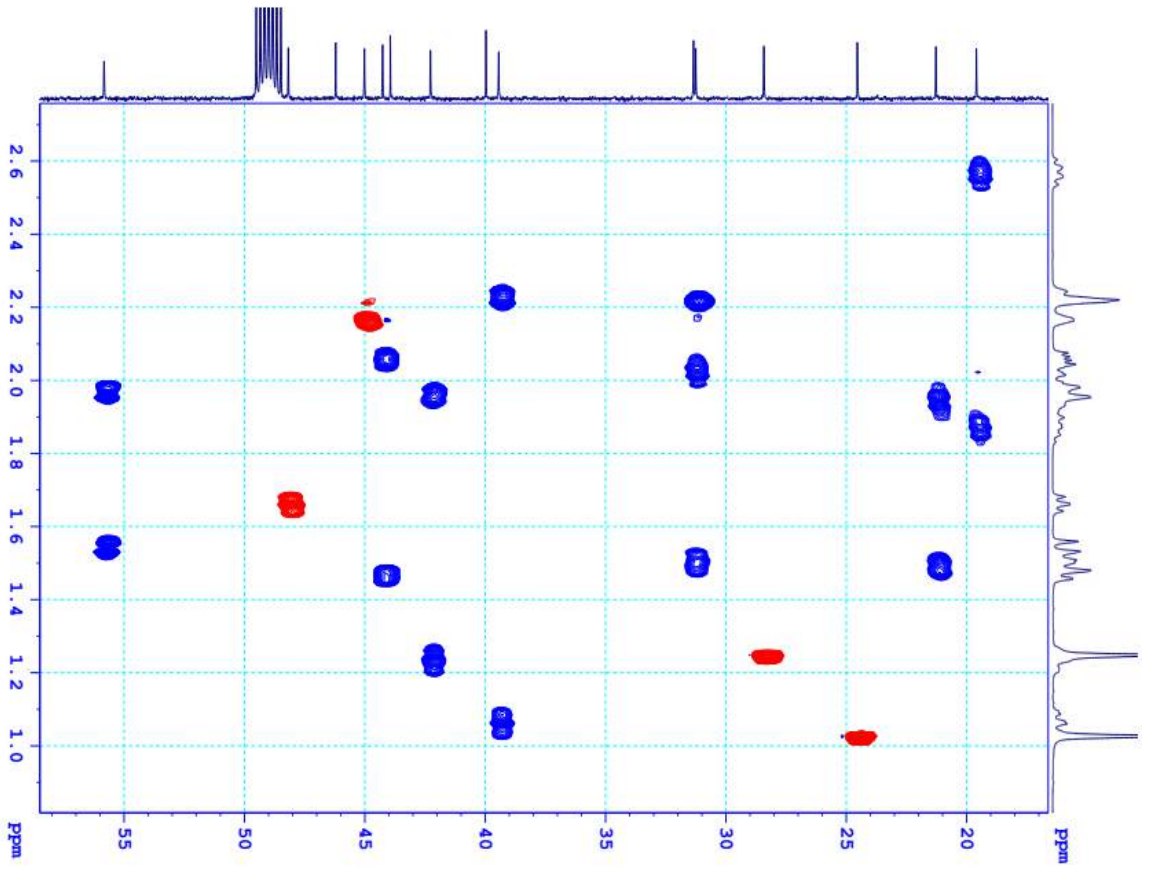
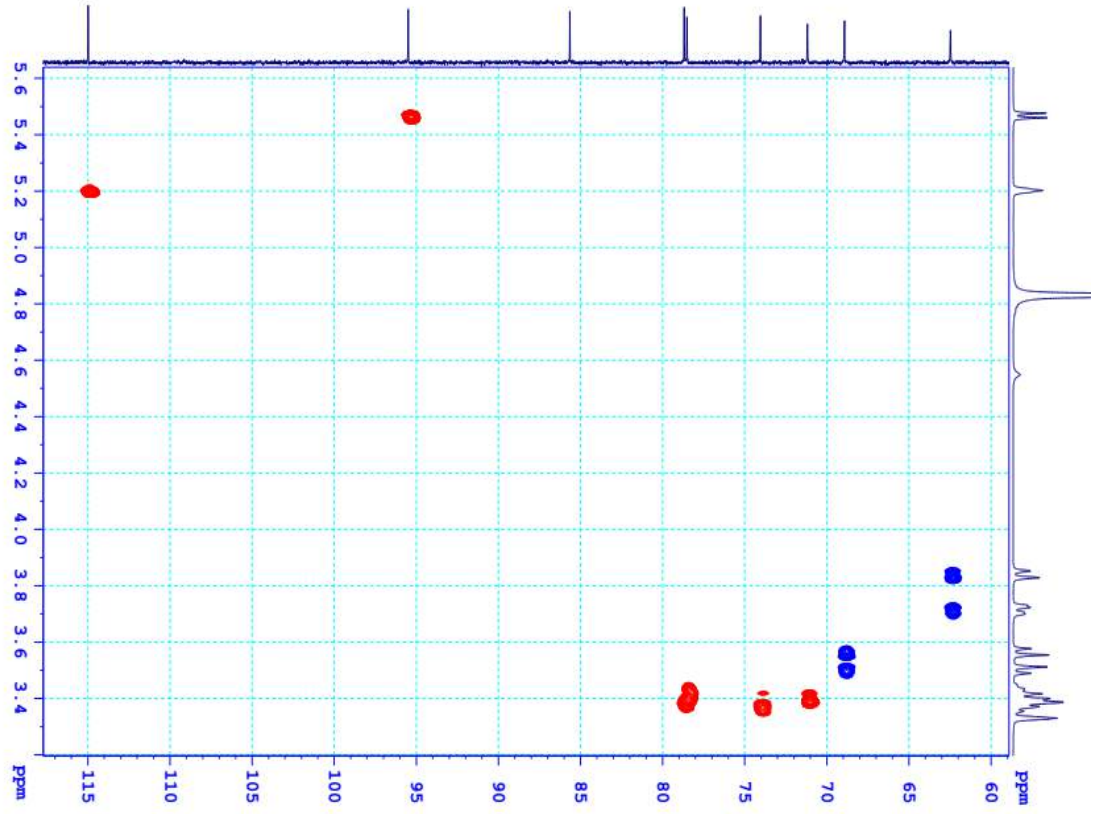


1.3. Phổ ^{13}C NMR của hợp chất **WT1**

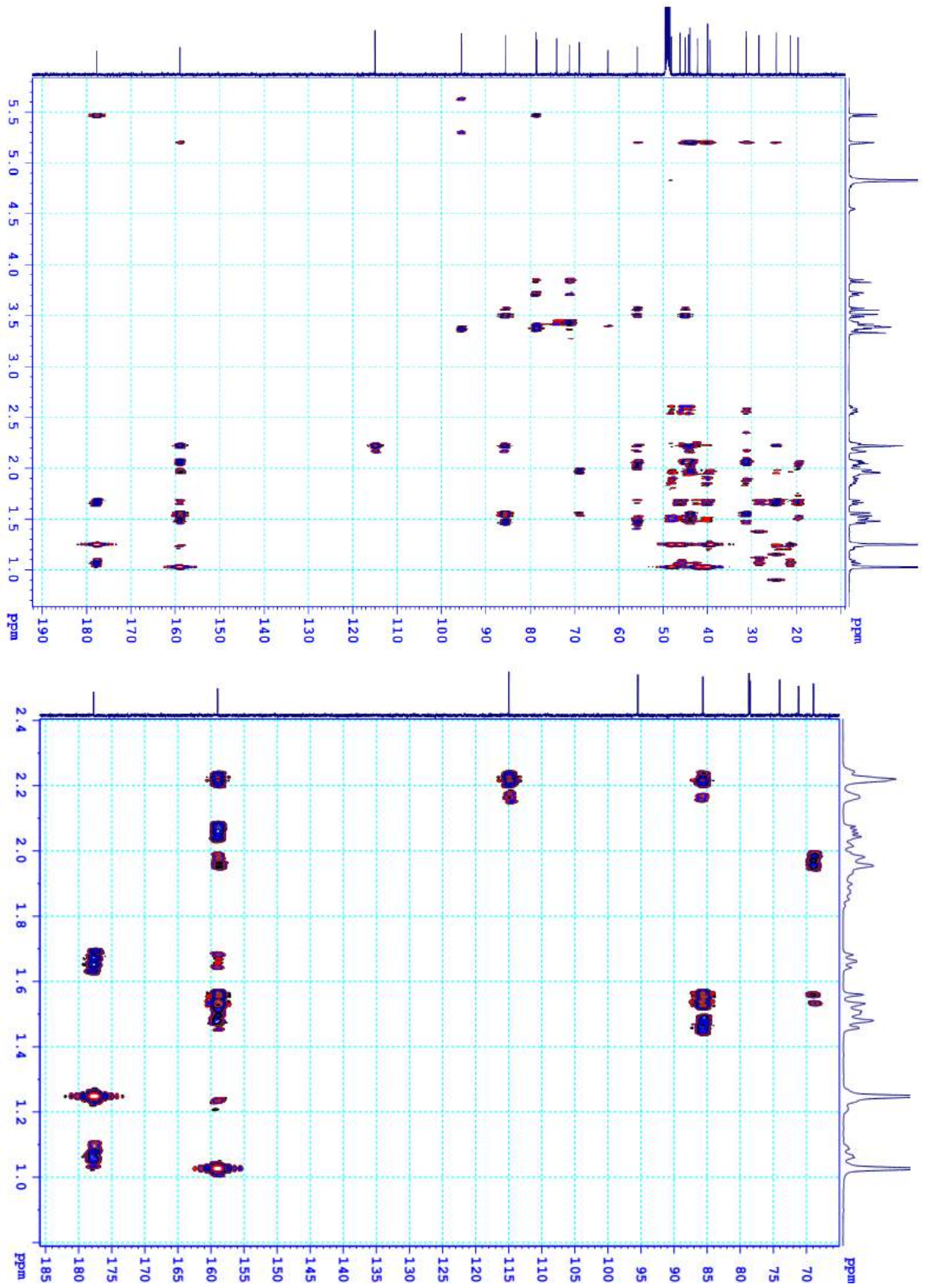


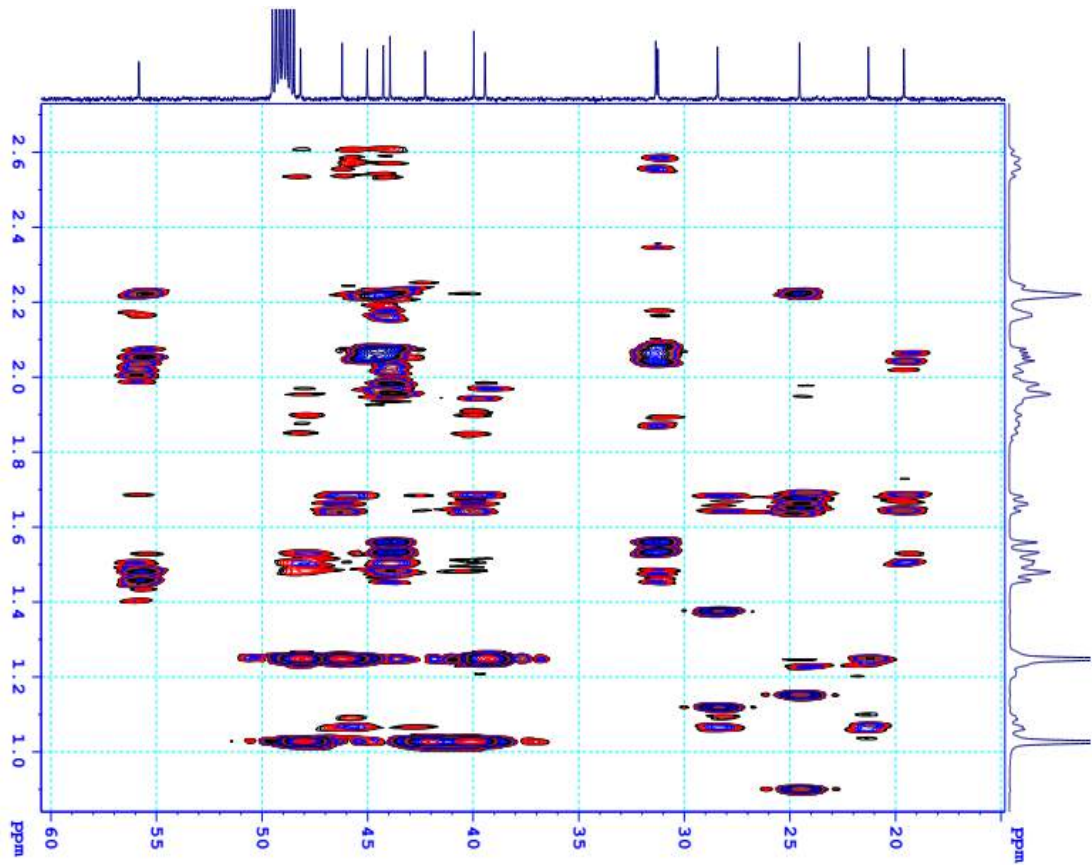
1.4. Phổ HSQC của hợp chất WT1



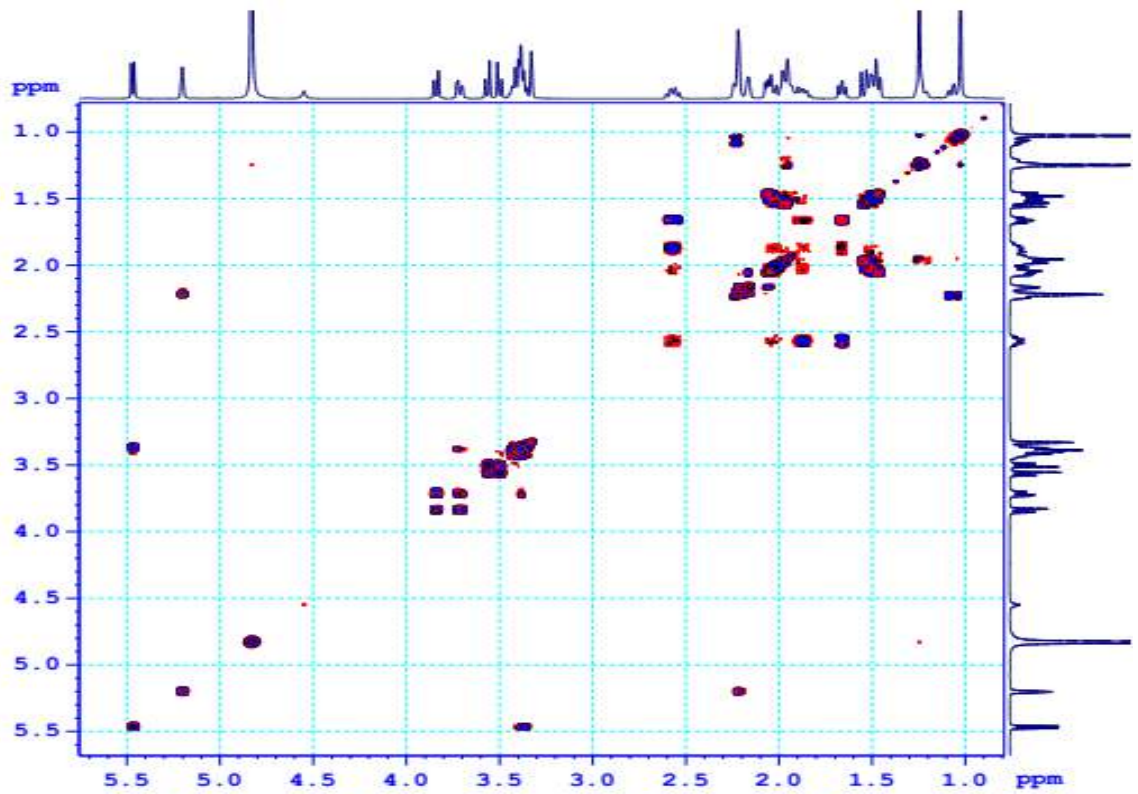


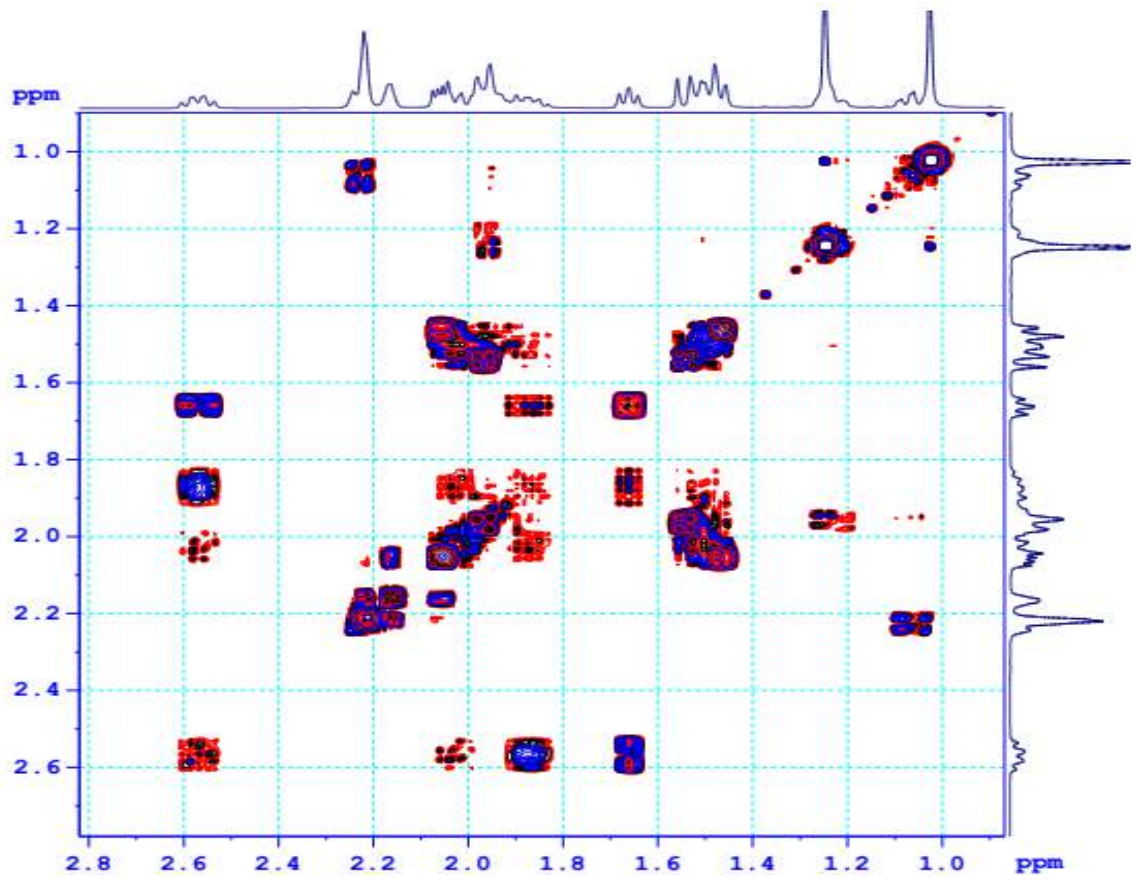
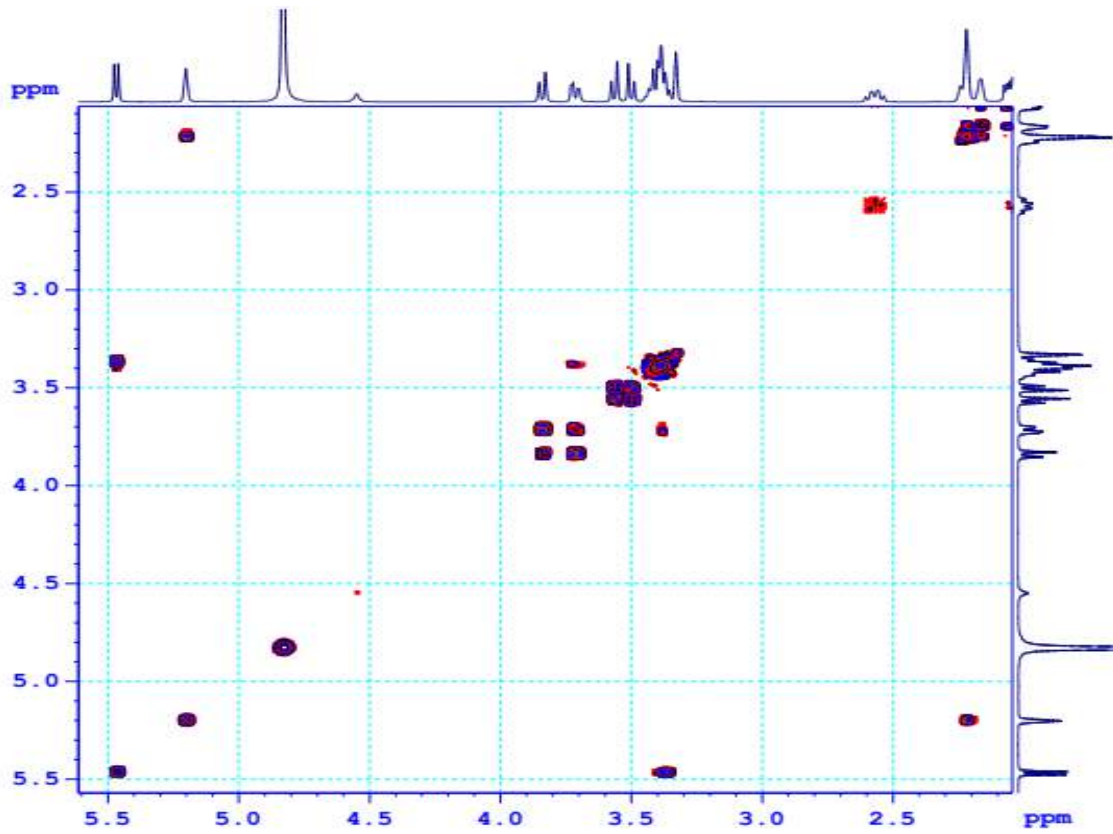
1.5. Phổ HMBC của hợp chất WT1



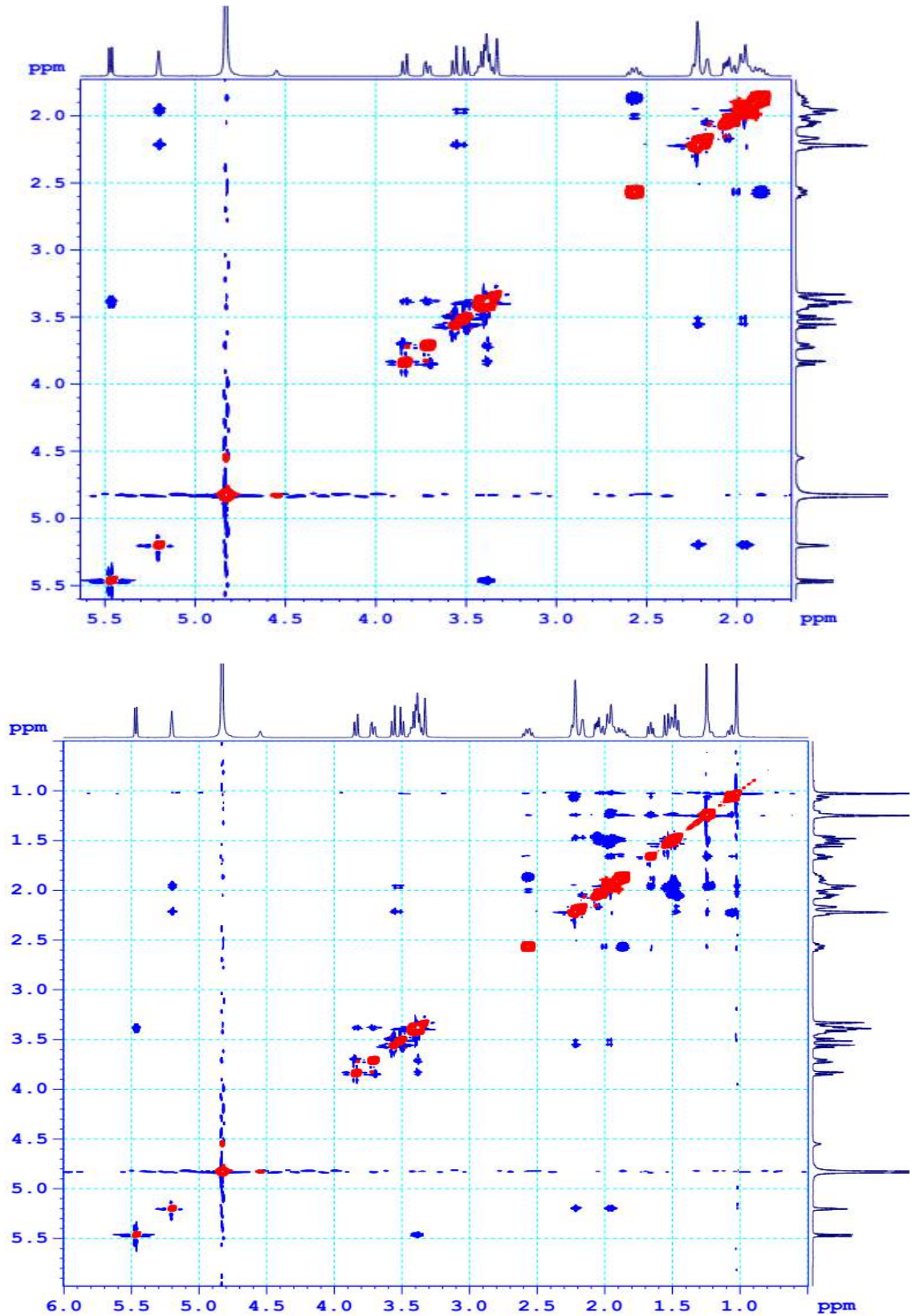


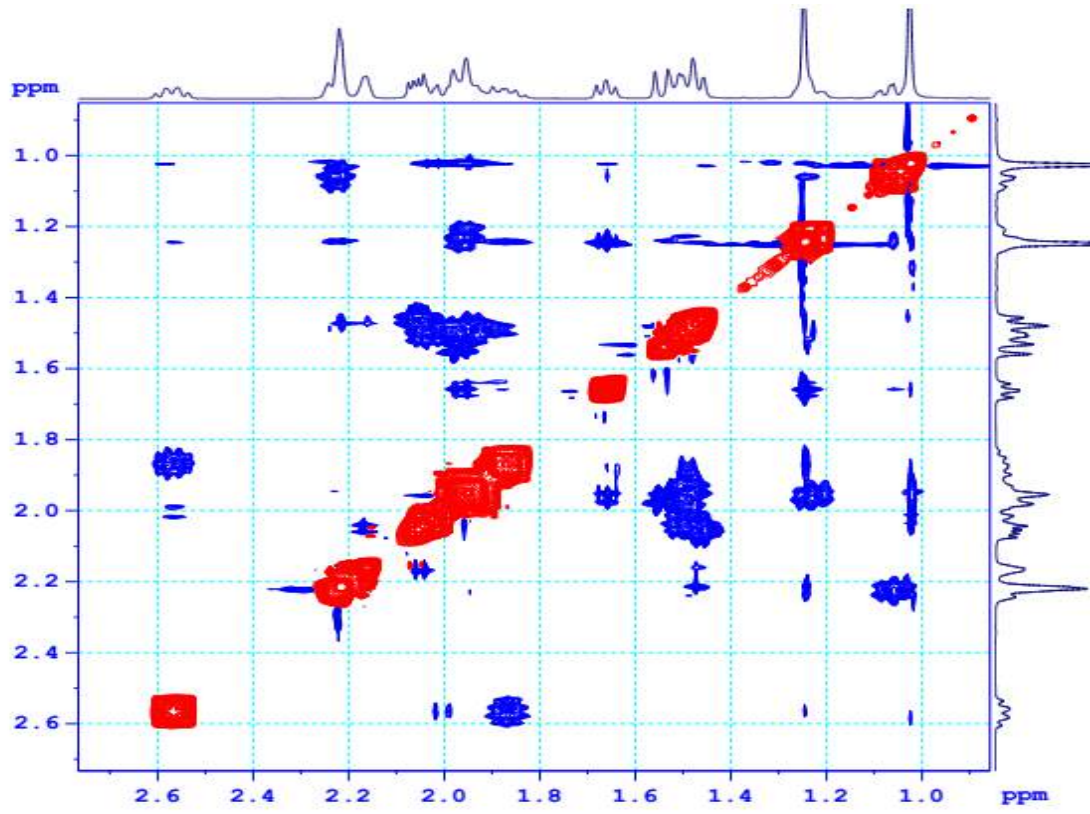
1.6. Phổ COSY của hợp chất WT1



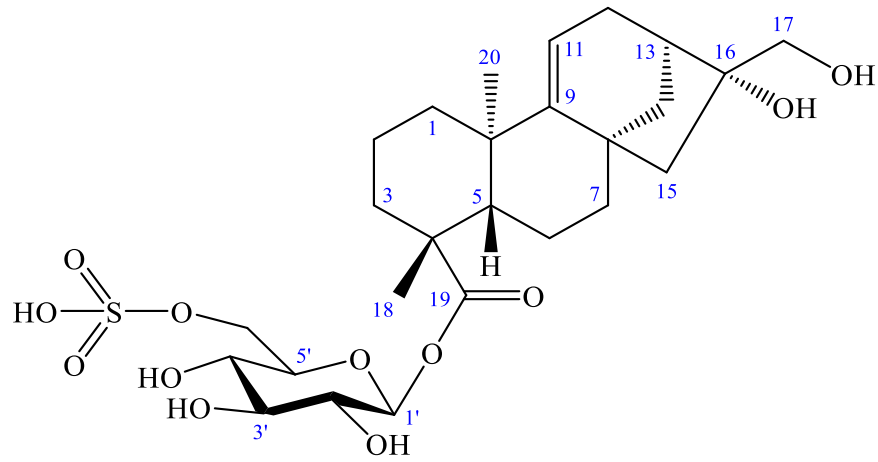


1.7. Phổ NOESY của hợp chất WT1





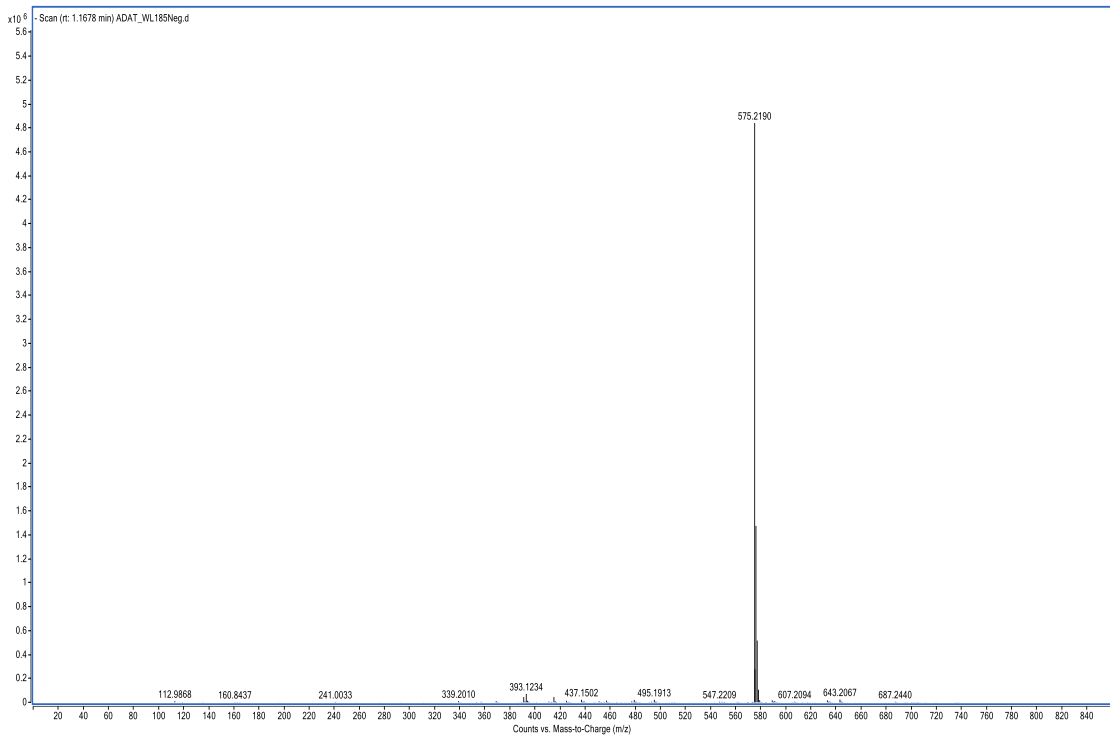
2. Phụ lục phổ hợp chất WT2



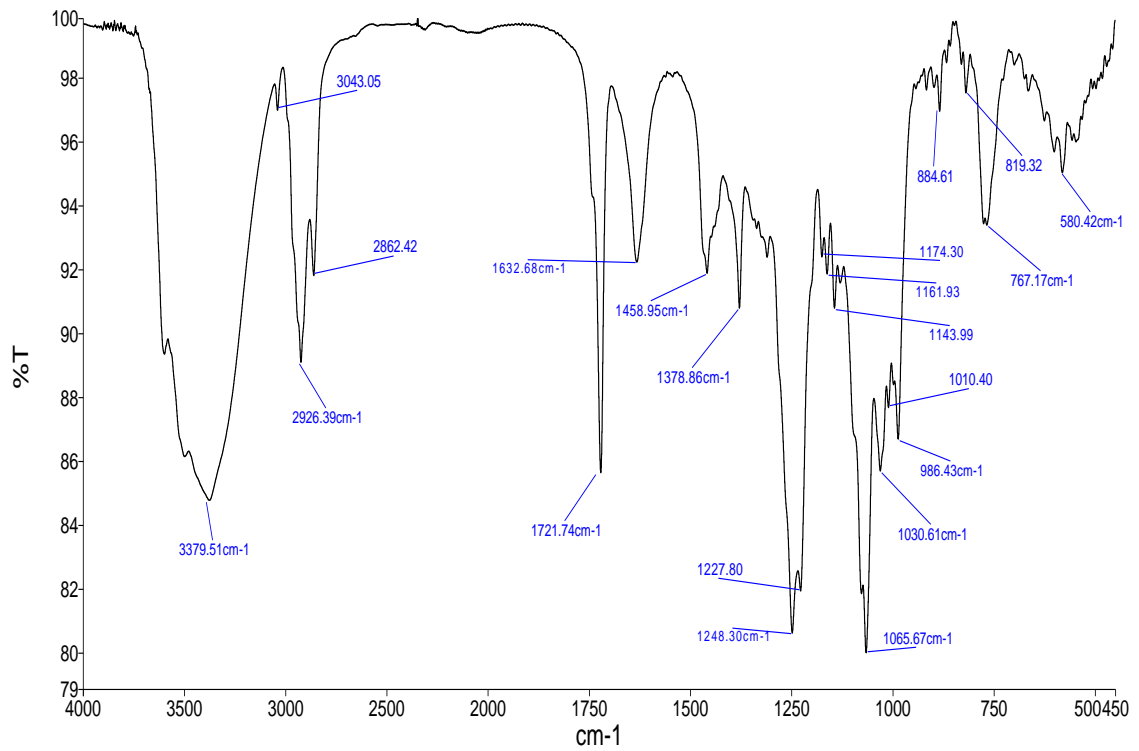
Wedtriloside B

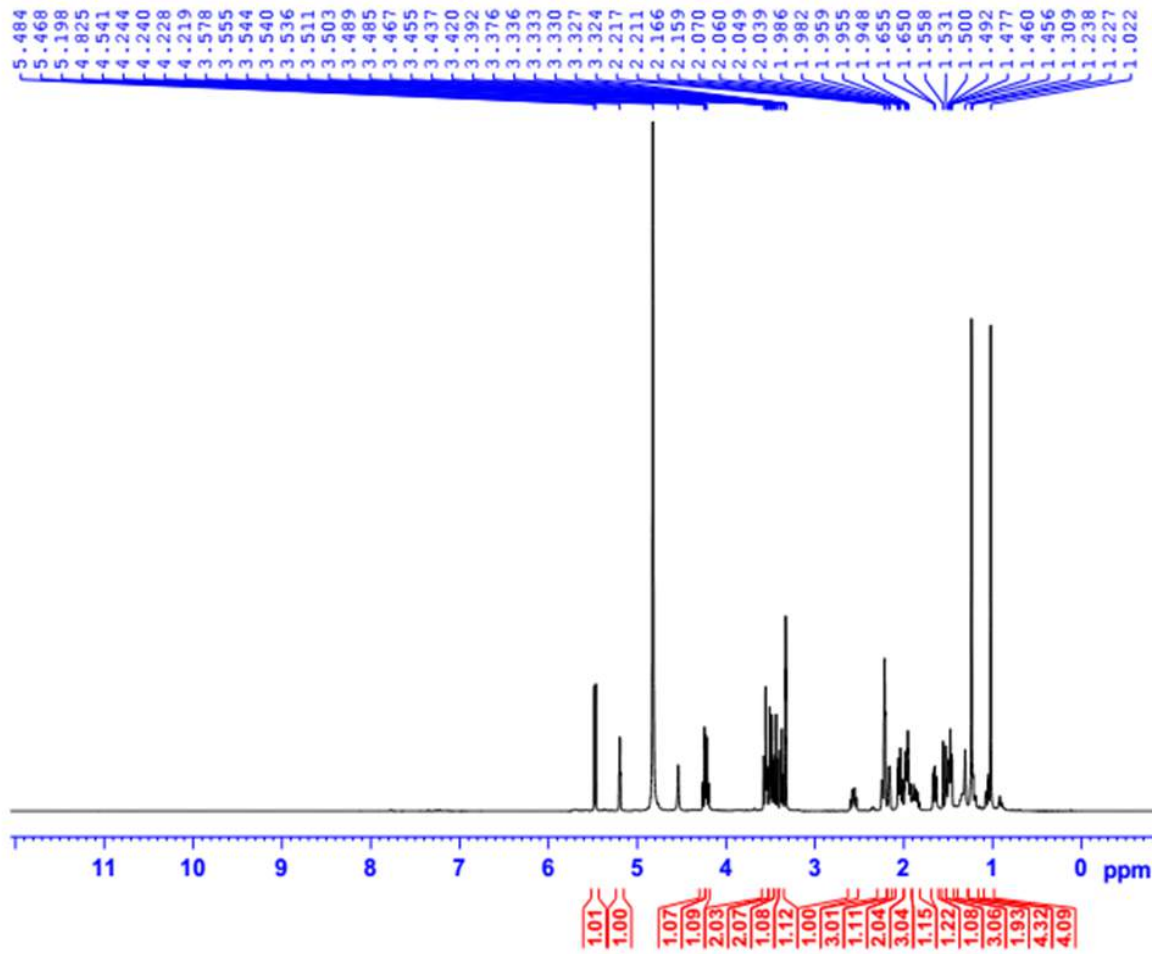
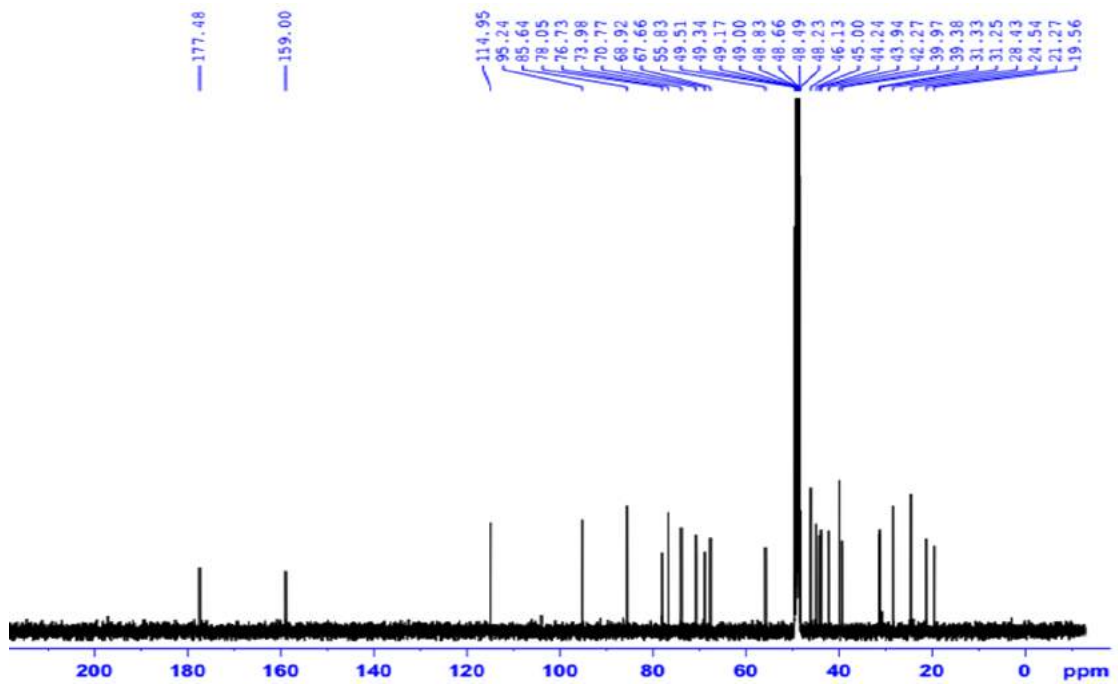
- CTPT: $C_{26}H_{40}O_{12}S$
- KLPT M = 576
- Phổ HR-ESI-MS
- Phổ hồng ngoại
- Phổ 1H NMR
- Phổ ^{13}C NMR
- Phổ HSQC
- Phổ HMBC
- Phổ COSY
- Phổ NOESY

2.1. Phổ HR_ESI-MS của hợp chất WT2

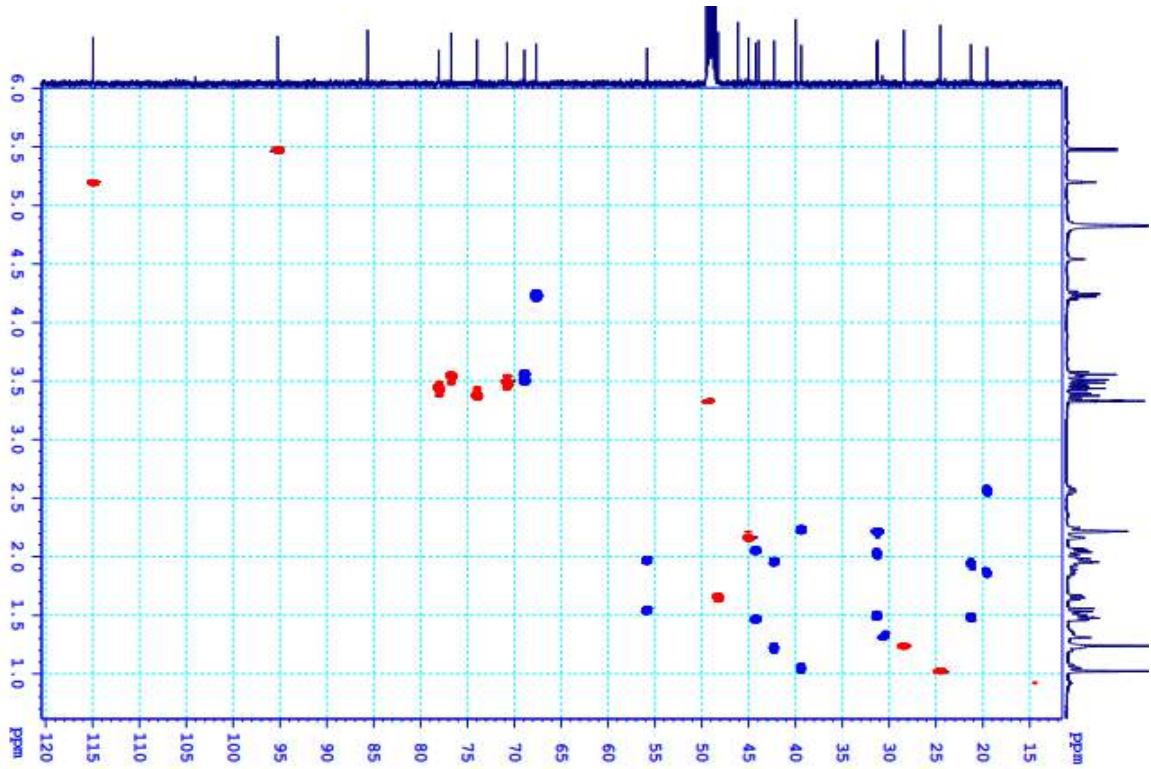


2.2. Phổ hồng ngoại của hợp chất WT2

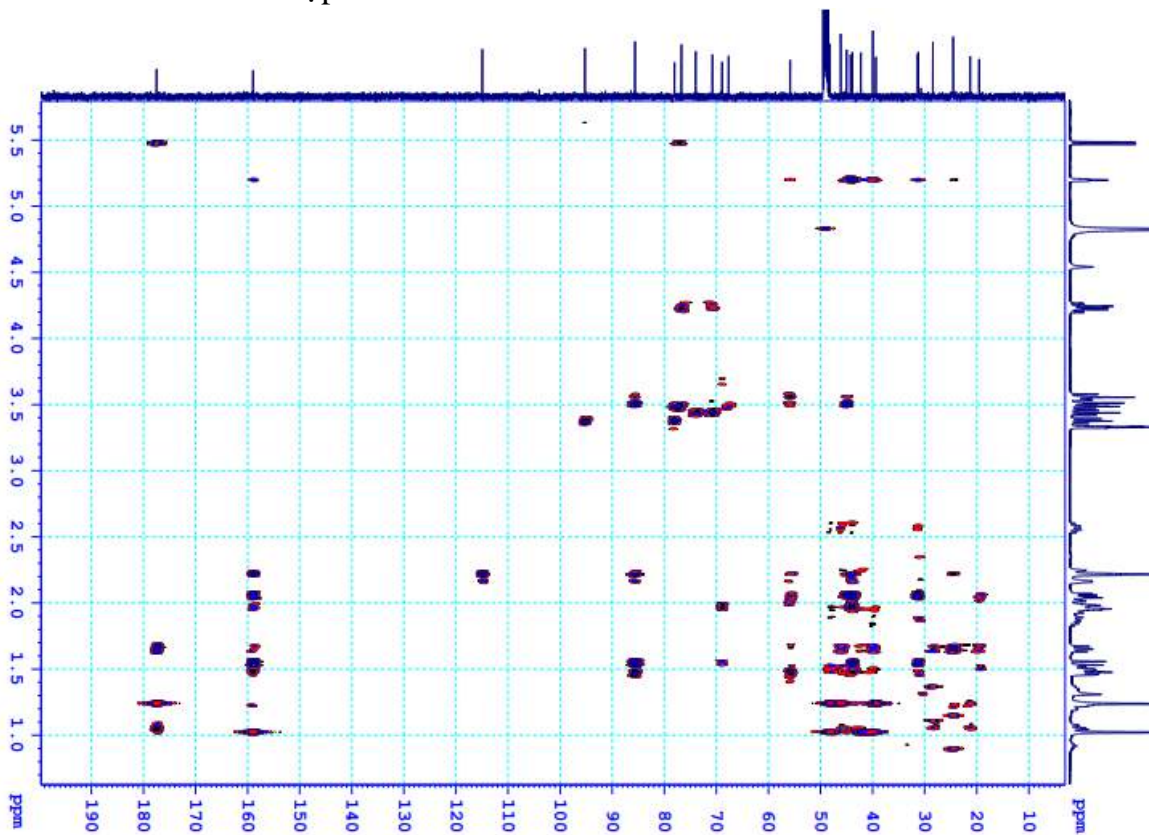


2.3. Phổ ^1H NMR của hợp chất **WT2**2.4. Phổ ^{13}C NMR của hợp chất **WT2**

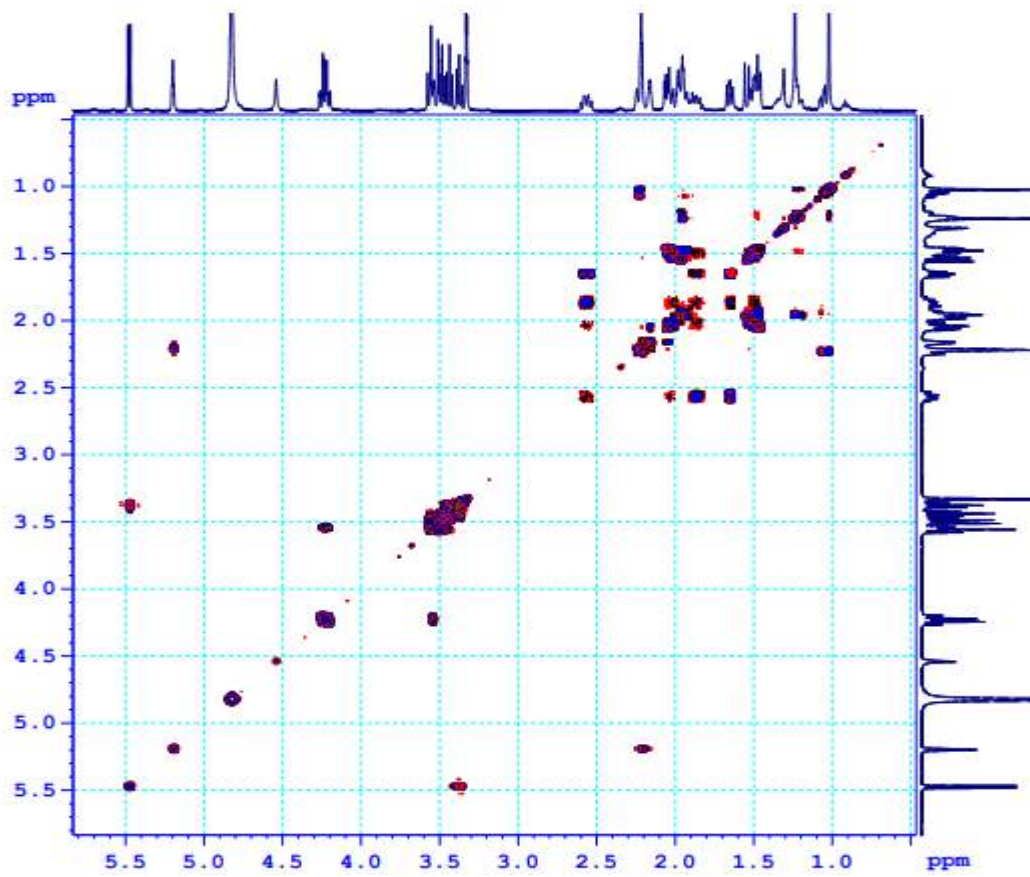
2.5. Phổ HSQC của hợp chất WT2



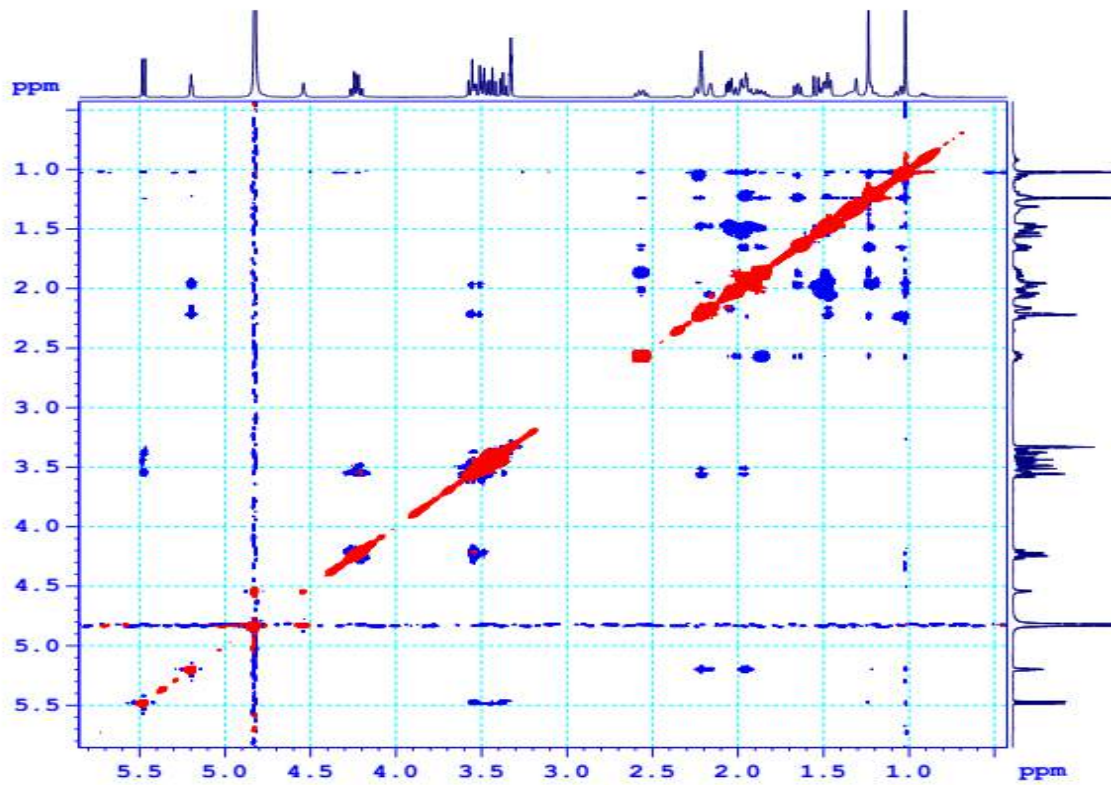
2.6. Phổ HMBC của hợp chất WT2



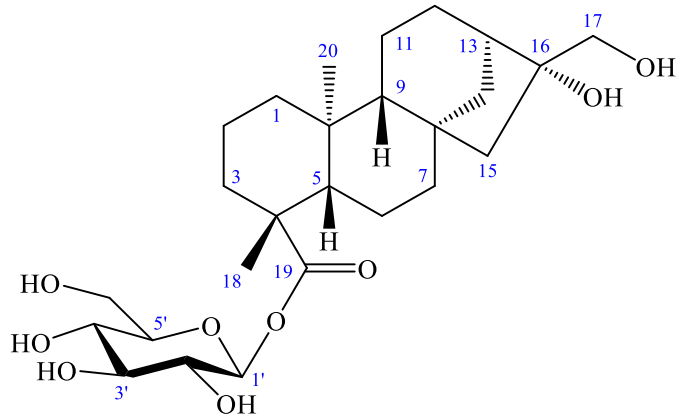
2.7. Phổ COSY của hợp chất WT2



2.8. Phổ NOESY của hợp chất WT2



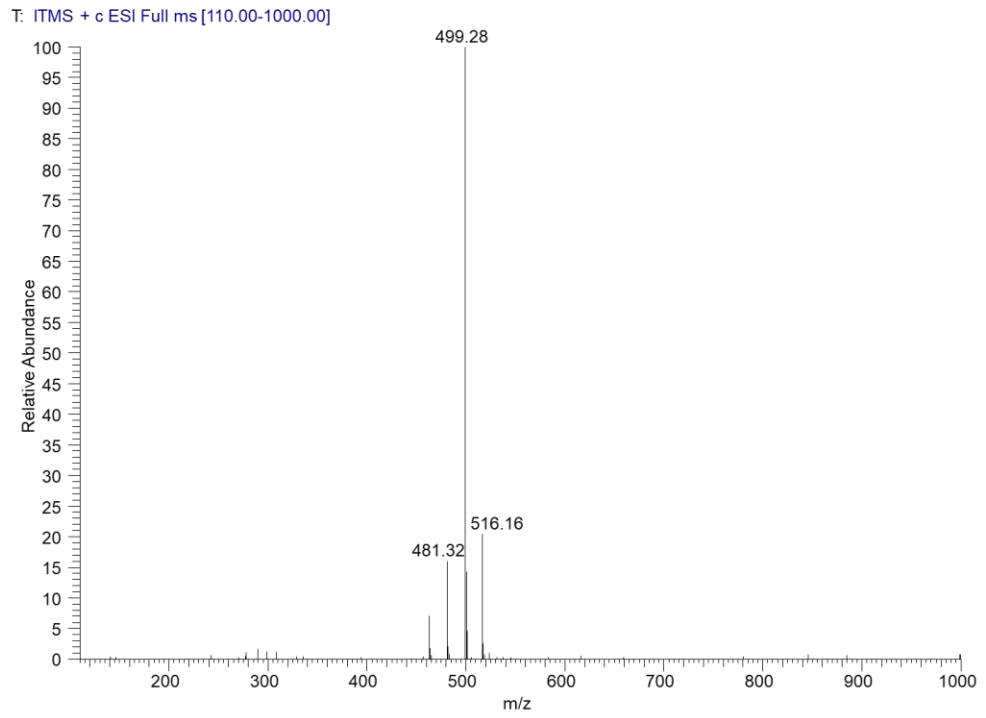
3. Phụ lục phổ hợp chất WT3



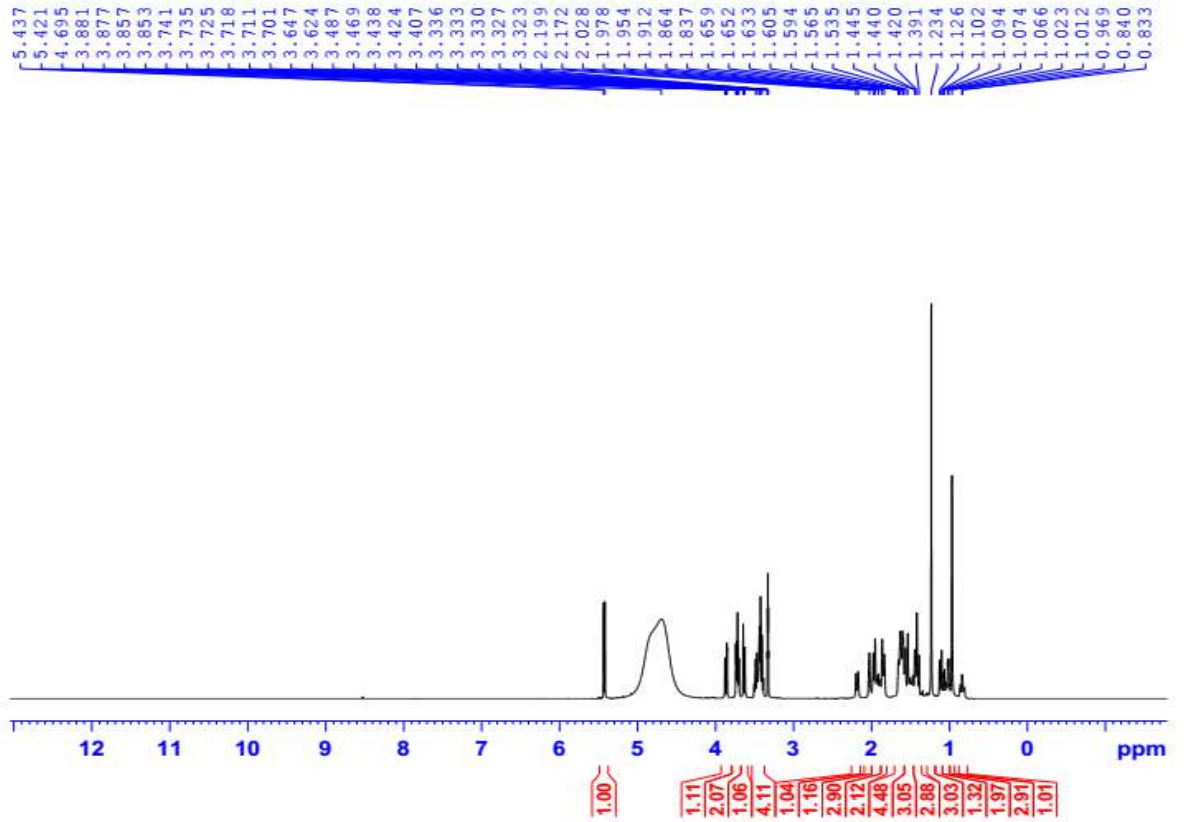
Paniculoside-IV

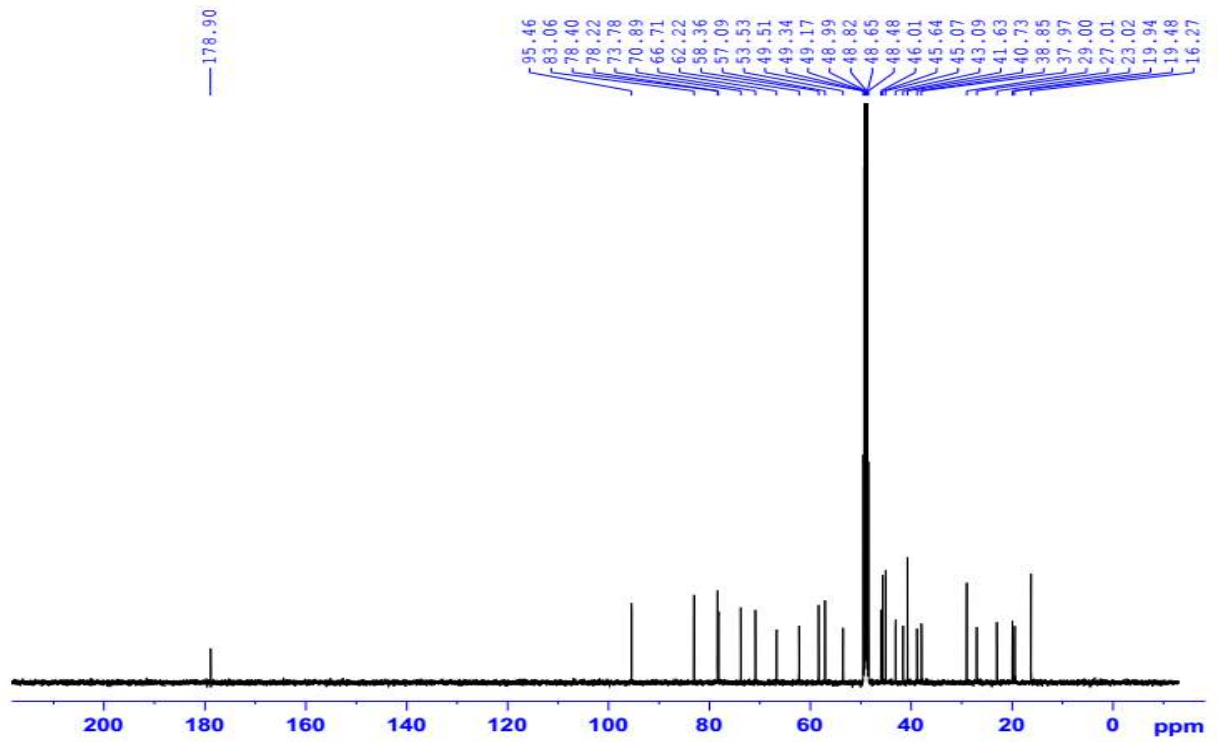
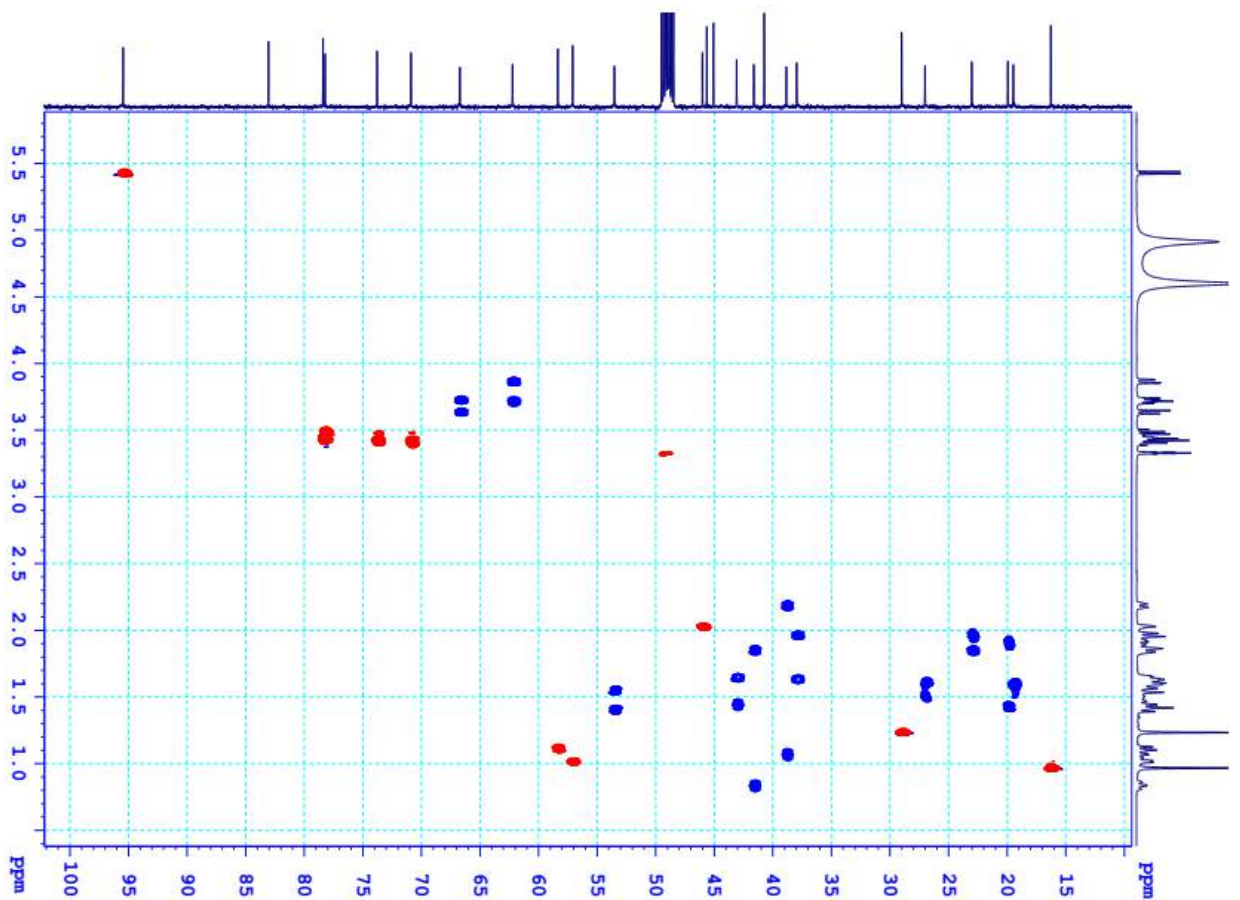
- CTPT: $C_{26}H_{42}O_9$
- KLPT M = 498
- Phổ ESI-MS
- Phổ 1H NMR
- Phổ ^{13}C NMR
- Phổ HSQC
- Phổ HMBC
- Phổ COSY

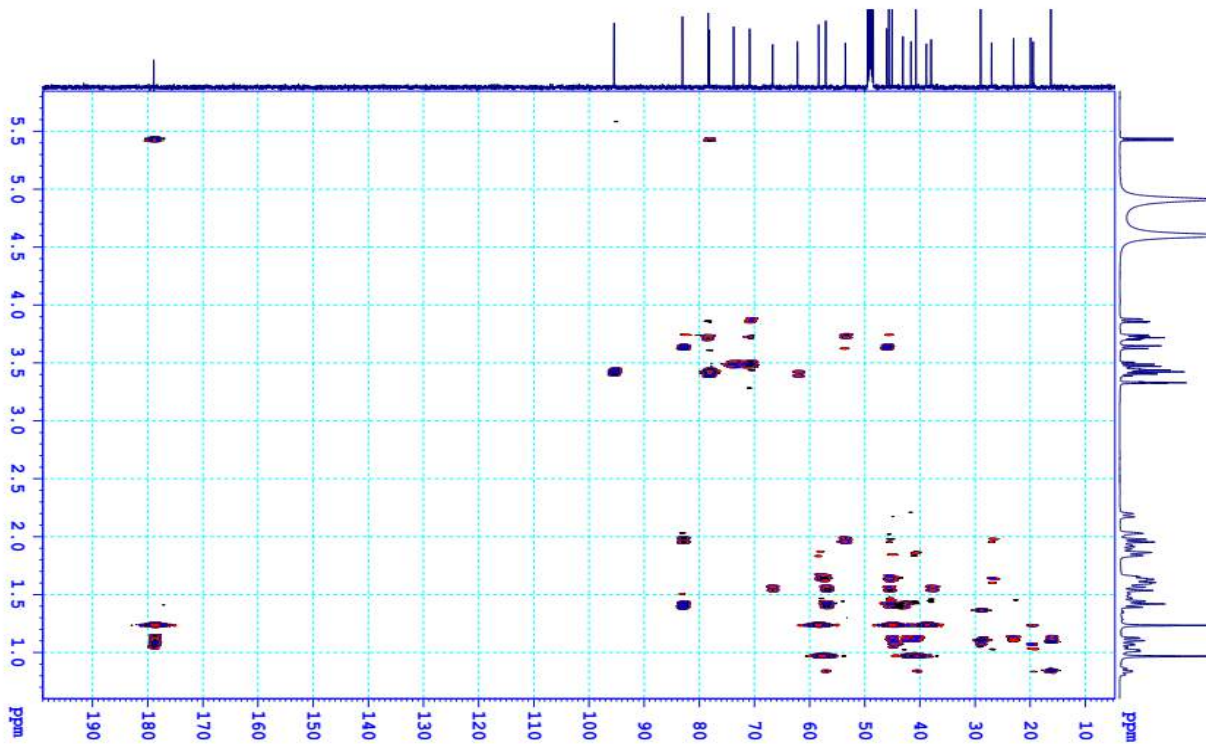
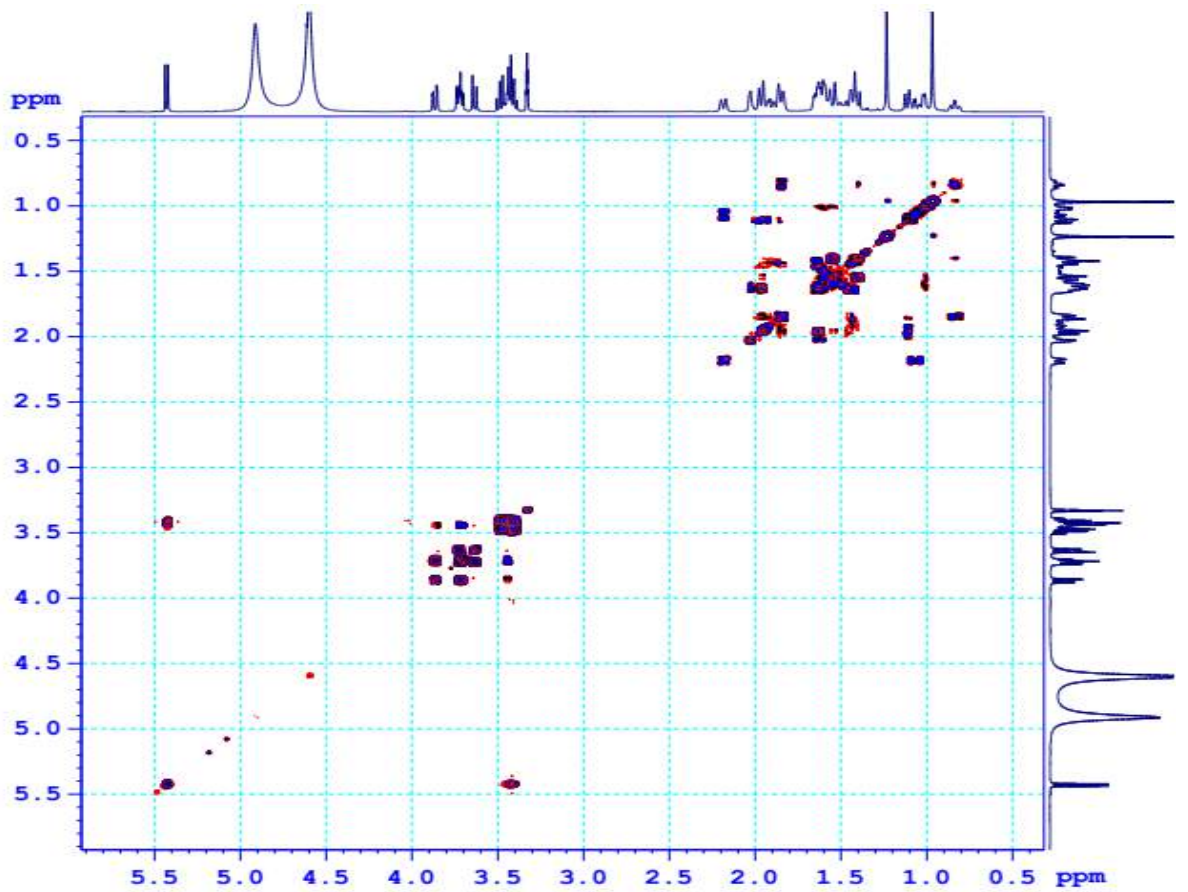
3.1. Phổ ESI-MS của hợp chất WT3



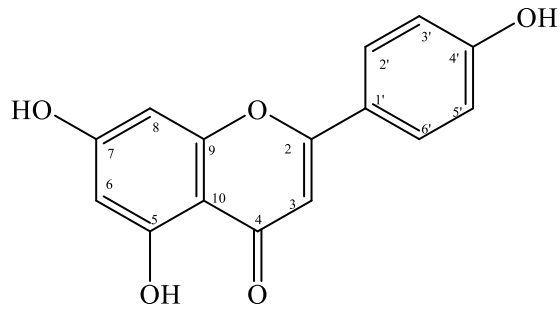
3.2. Phổ ^1H NMR của hợp chất WT3



3.3. Phổ ^{13}C NMR của hợp chất **WT3**3.4. Phổ HSQC của hợp chất **WT3**

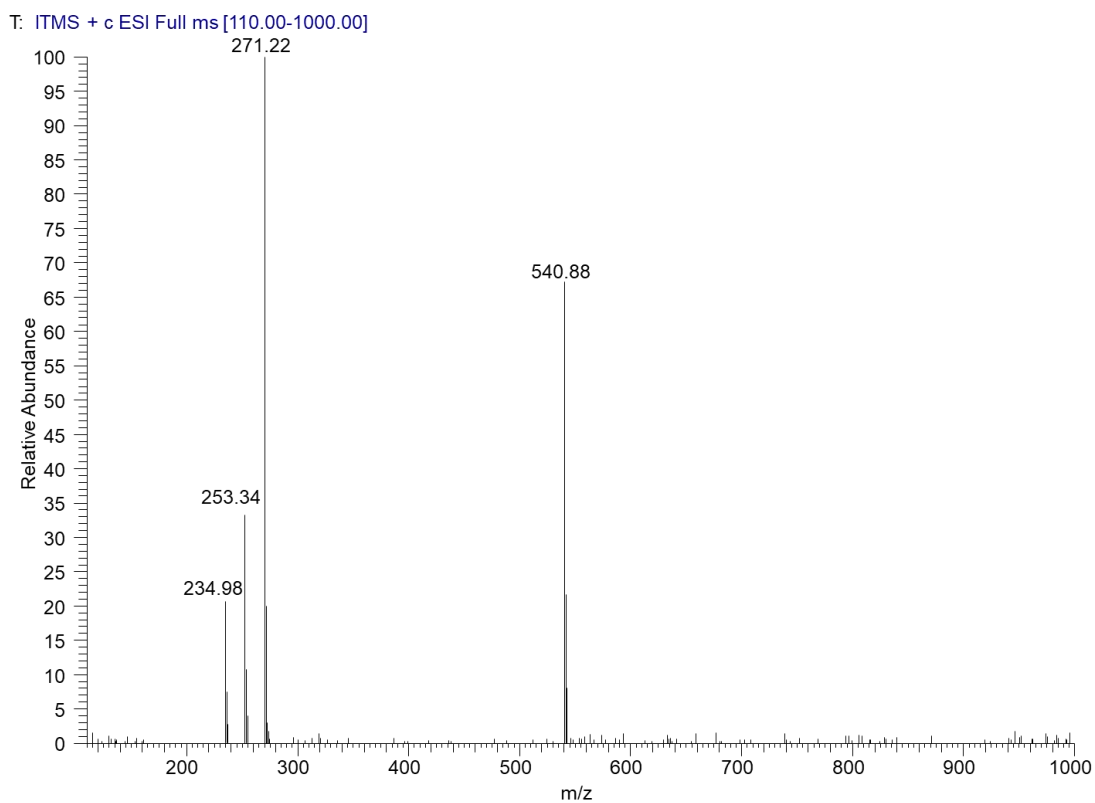
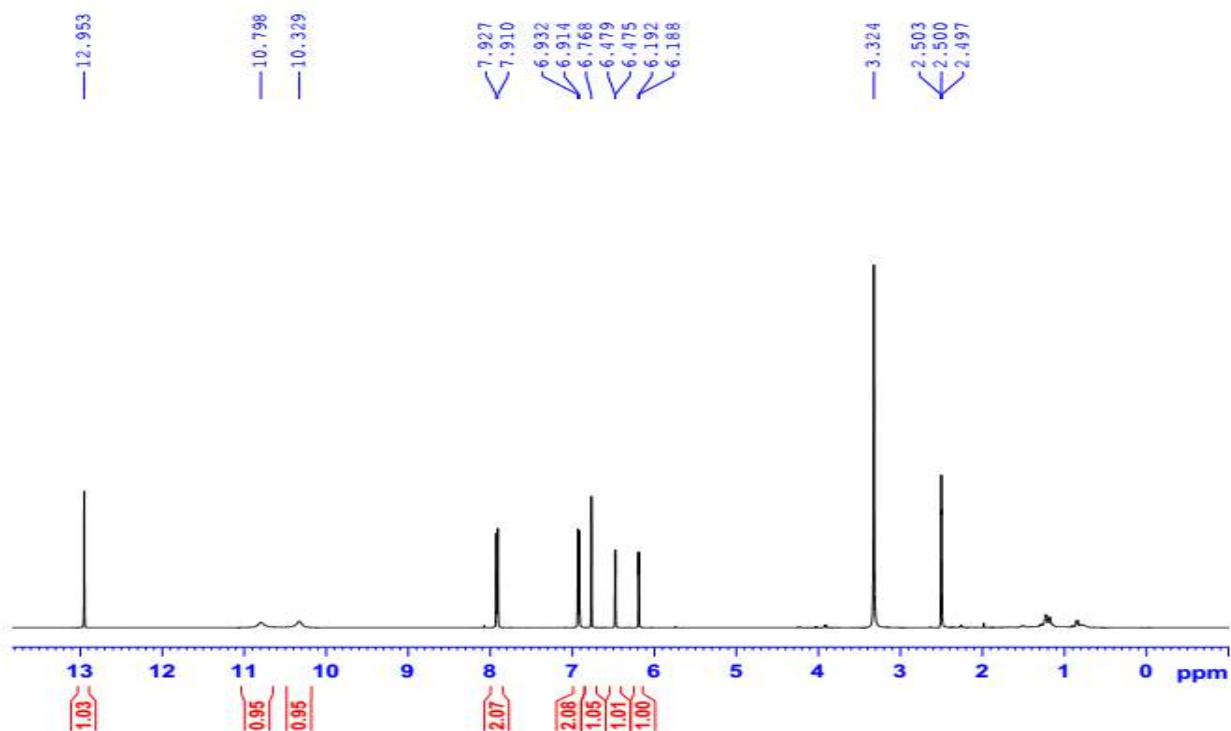
3.5. Phổ HMBC của hợp chất **WT3**3.6. Phổ COSY của hợp chất **WT3**

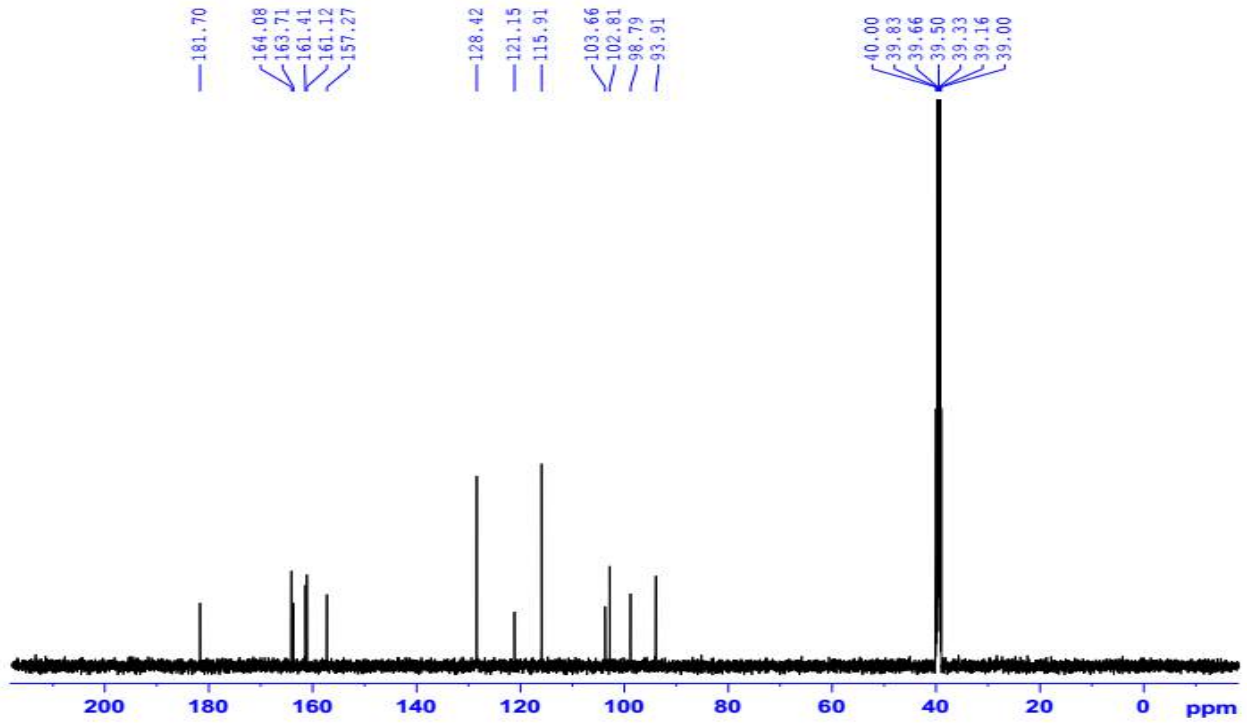
4. Phụ lục phổ hợp chất WT4



Apigenin

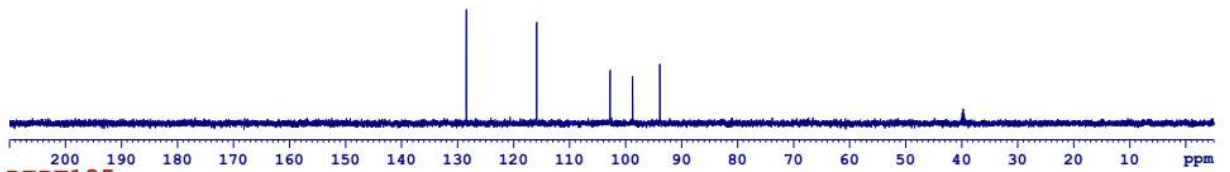
- CTPT $C_{15}H_{10}O_5$
- KLPT $M = 270$
- Phổ ESI-MS
- Phổ 1H NMR
- Phổ ^{13}C NMR
- Phổ DEPT

2.1. Phổ ESI-MS của hợp chất **WT4**2.2. Phổ ^1H NMR của hợp chất **WT4**

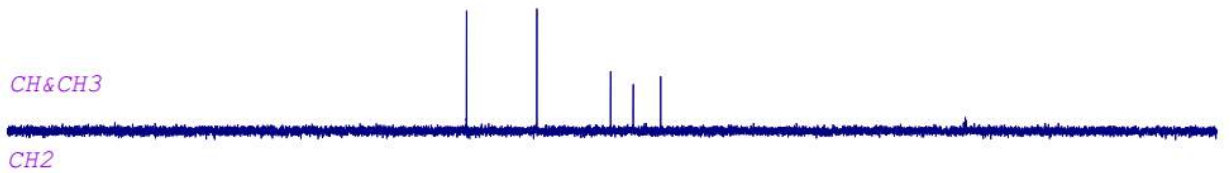
2.3. Phổ ^{13}C NMR của hợp chất WT4

2.4. Phổ DEPT của hợp chất WT4

DEPT90

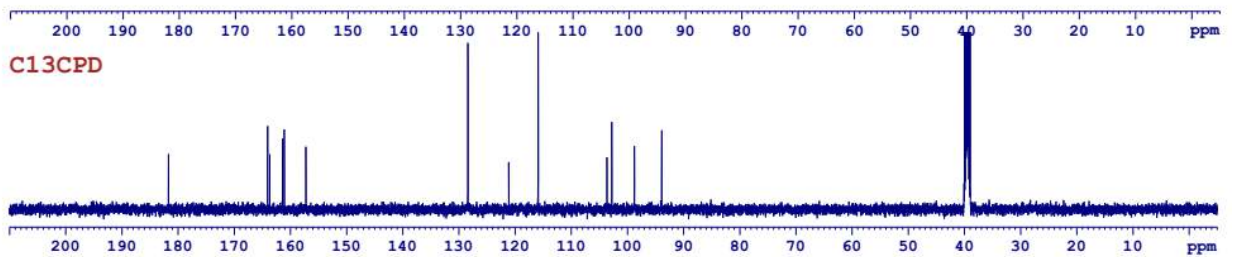


DEPT135

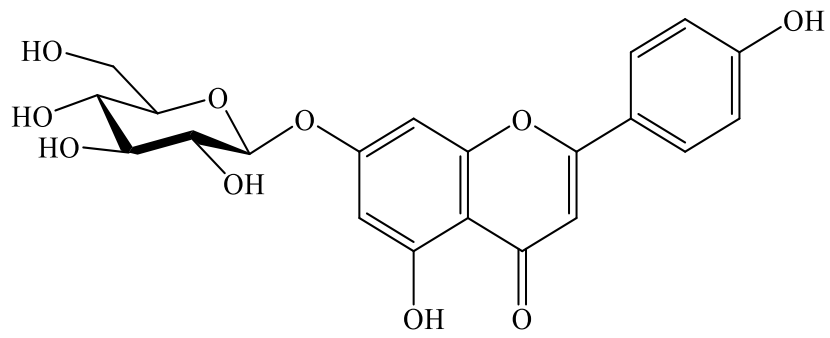


CH&CH3

CH2



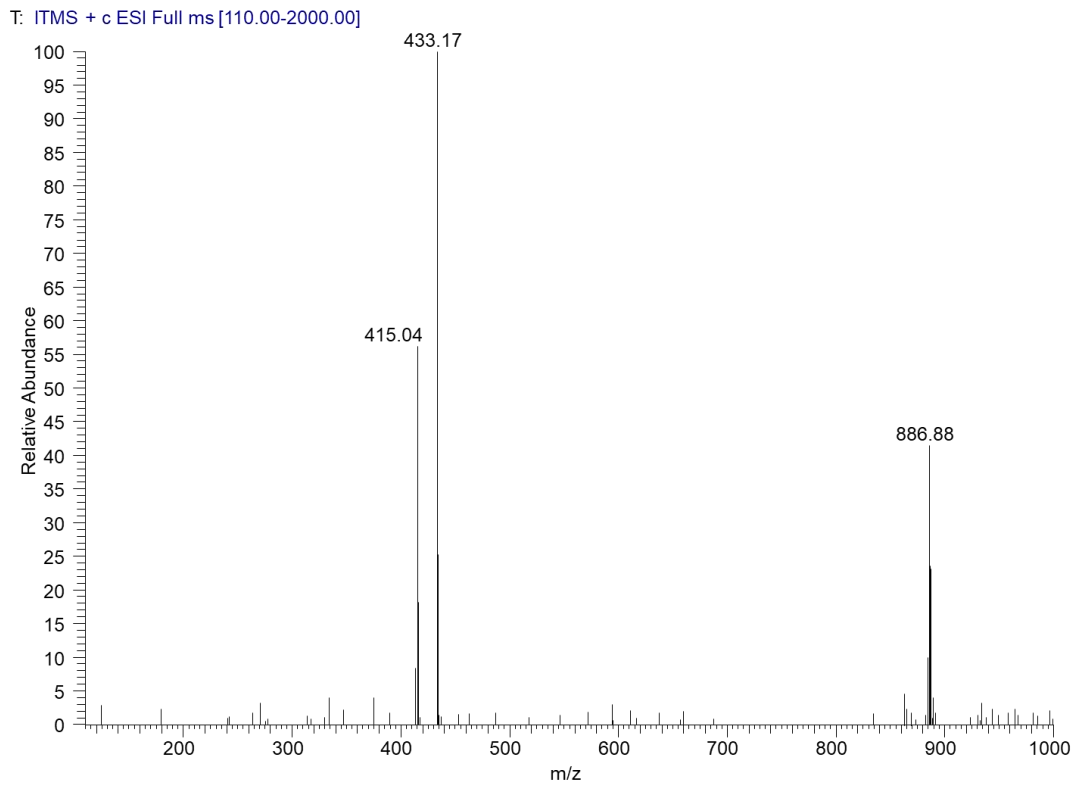
5. Phụ lục phổ hợp chất WT5



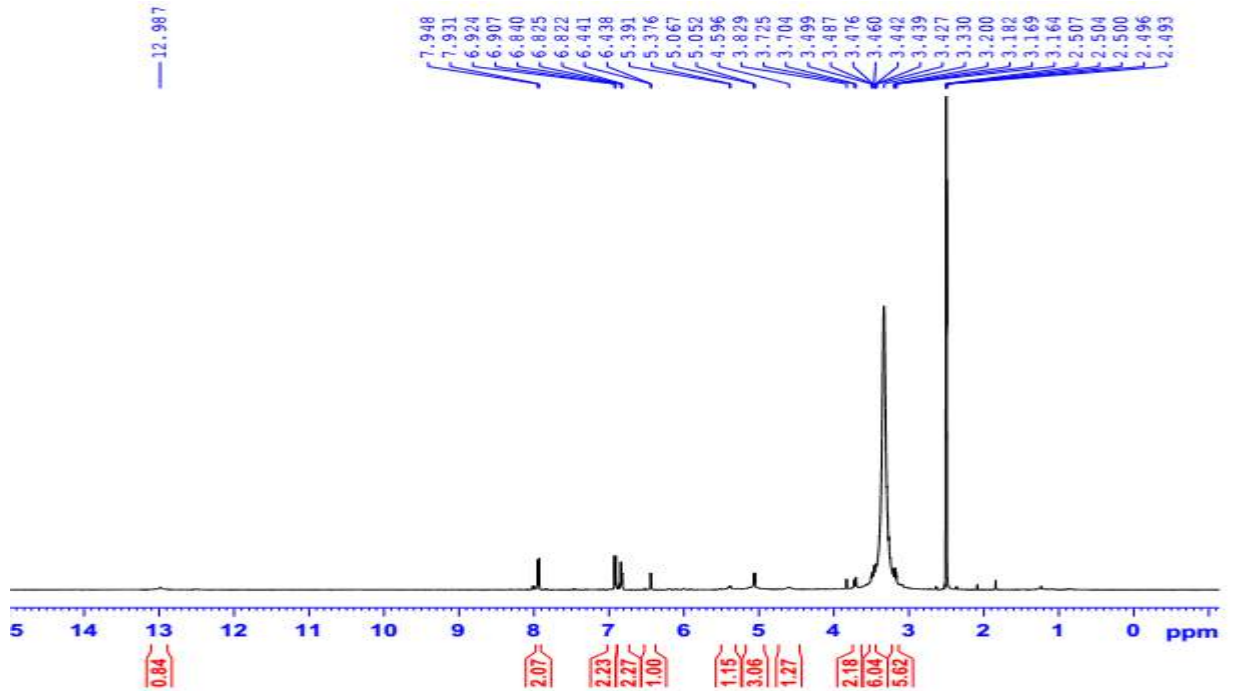
Apigenin7-O-β-D-glucopyranoside

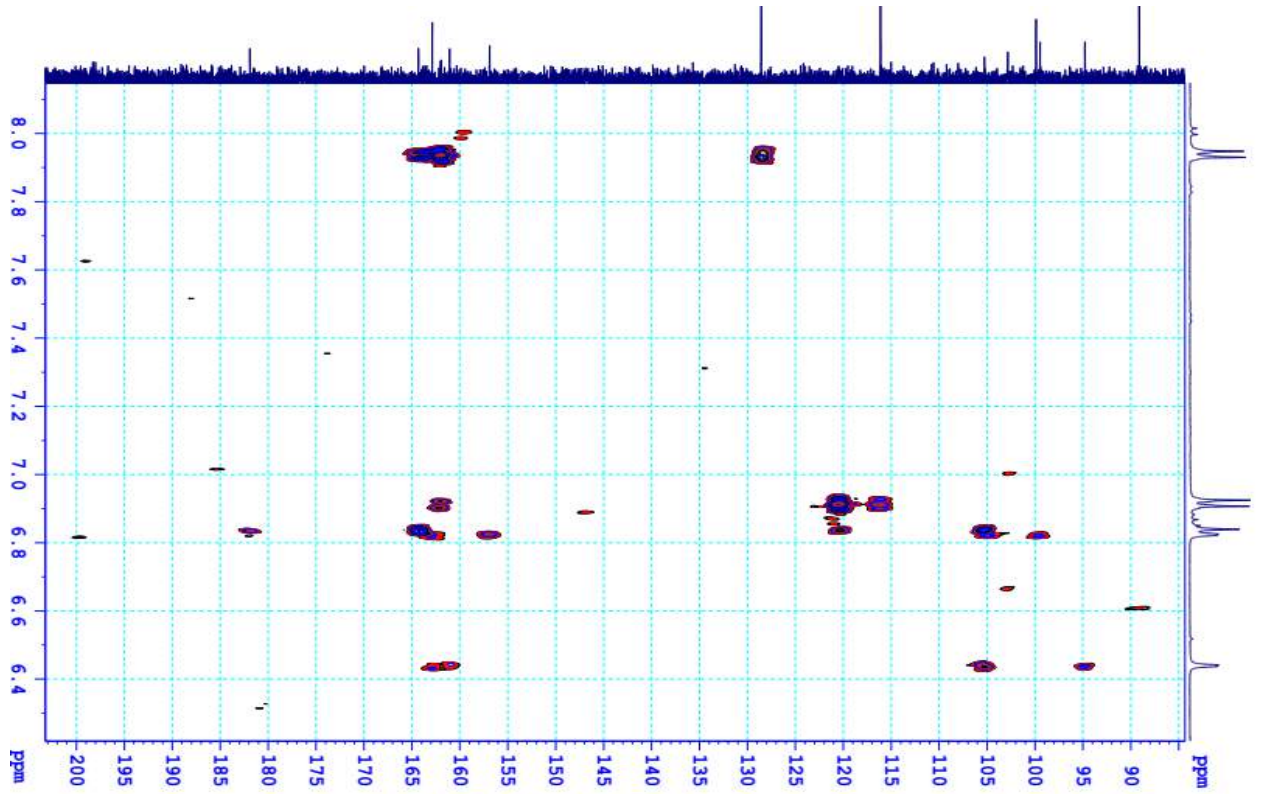
- CTPT $C_{21}H_{20}O_{10}$
- KLPT $M = 432$
- Phổ ESI_MS
- Phổ 1H NMR
- Phổ ^{13}C NMR
- Phổ HSQC
- Phổ HMBC

5.1. Phổ ESI_MS của hợp chất **WT5**

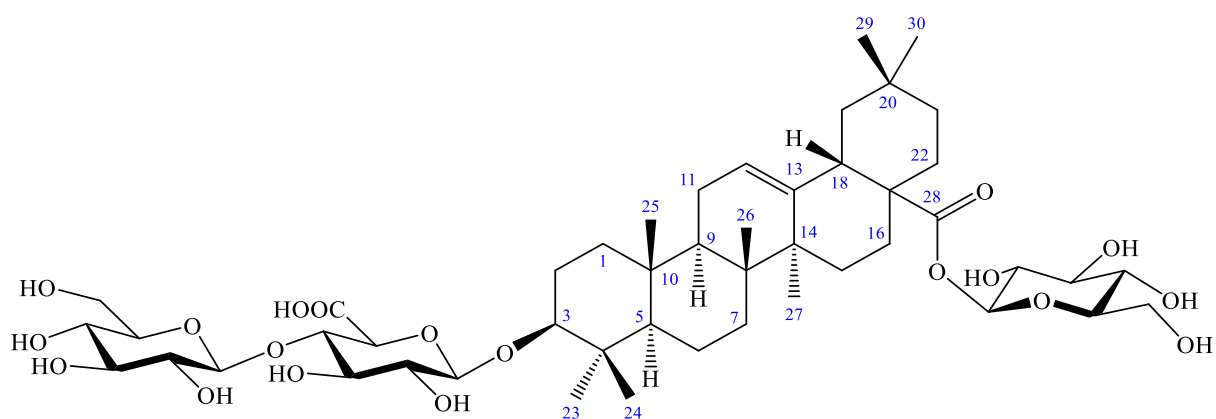


5.2. Phổ ^1H NMR của hợp chất **WT5**



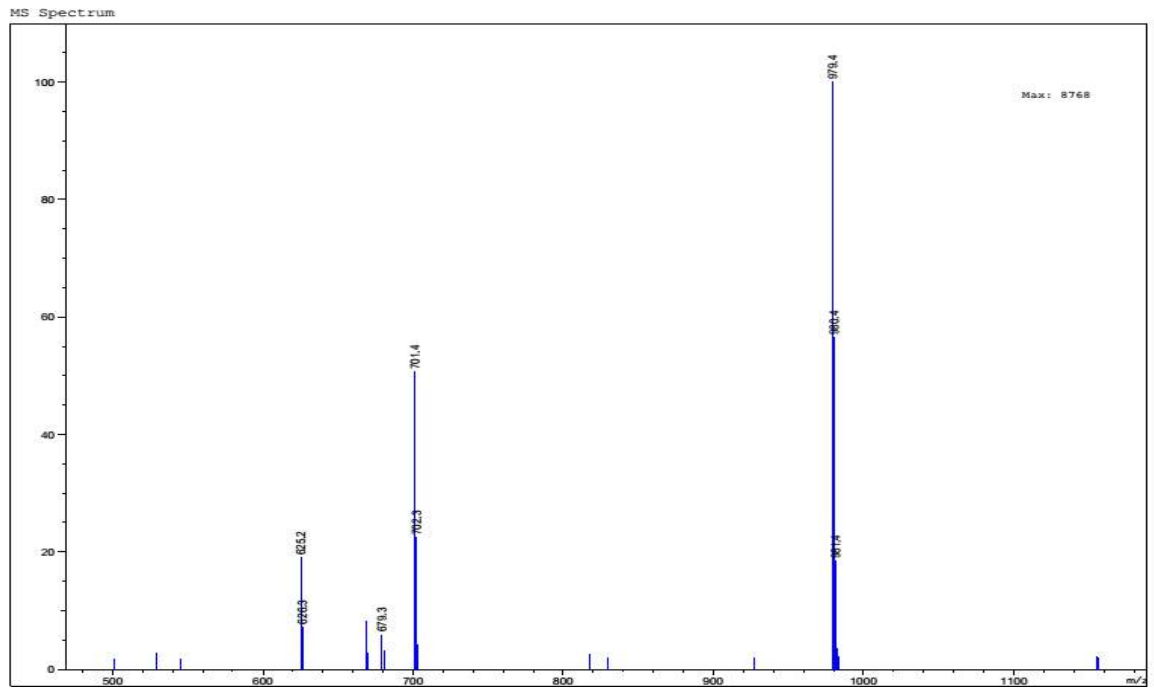
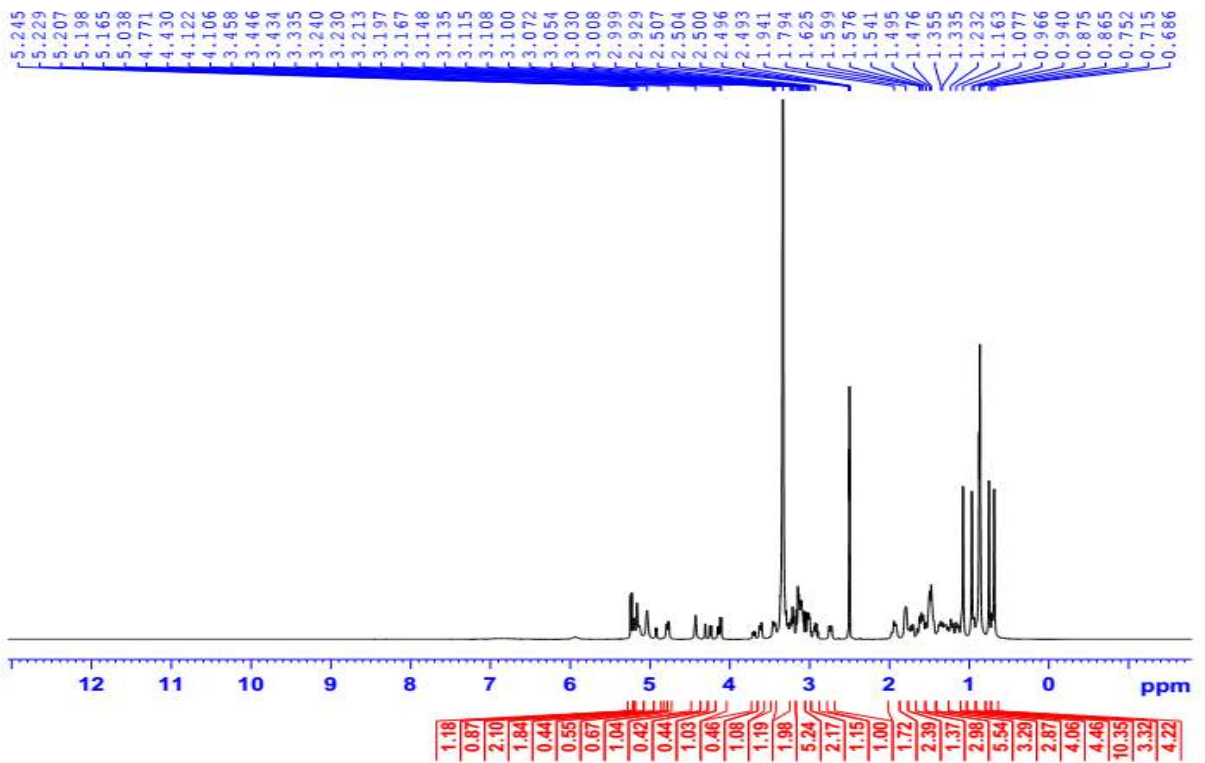
5.5. Phổ HMBC của hợp chất **WT5**

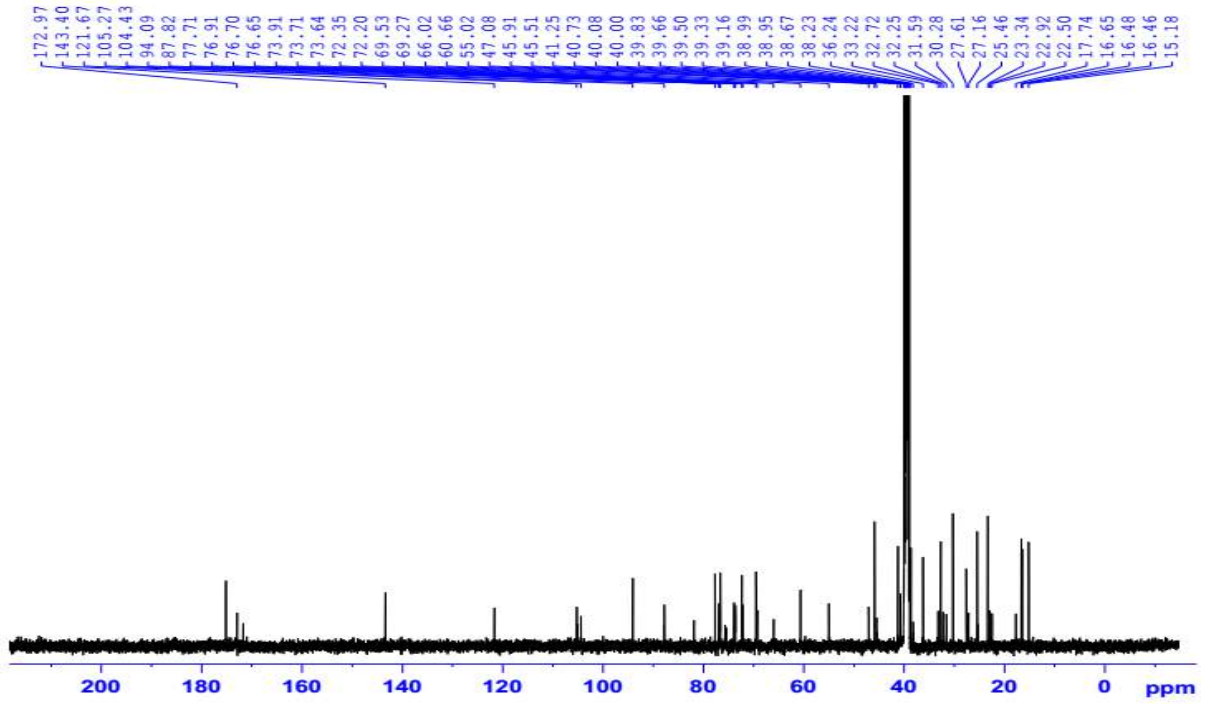
6. Phụ lục phổ hợp chất WT6



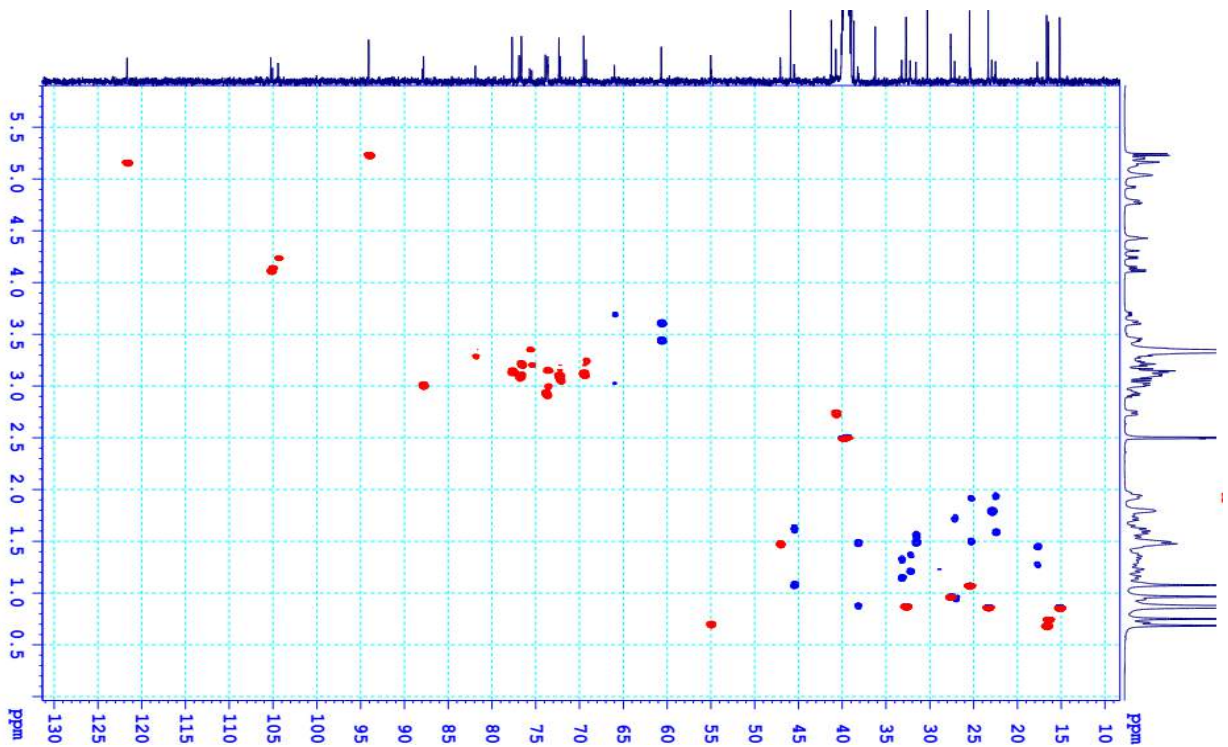
3-O-[[β-D-glucopyranosyl(1-4)-β-D-glucuronopyranosyl] oleanolic acid 28-O-β-D-glucopyranosyl ester

- CTPT: $C_{48}H_{76}O_{19}$
- KLPT M = 956
- Phổ ESI-MS
- Phổ 1H NMR
- Phổ ^{13}C NMR
- Phổ HSQC
- Phổ HMBC
- Phổ COSY

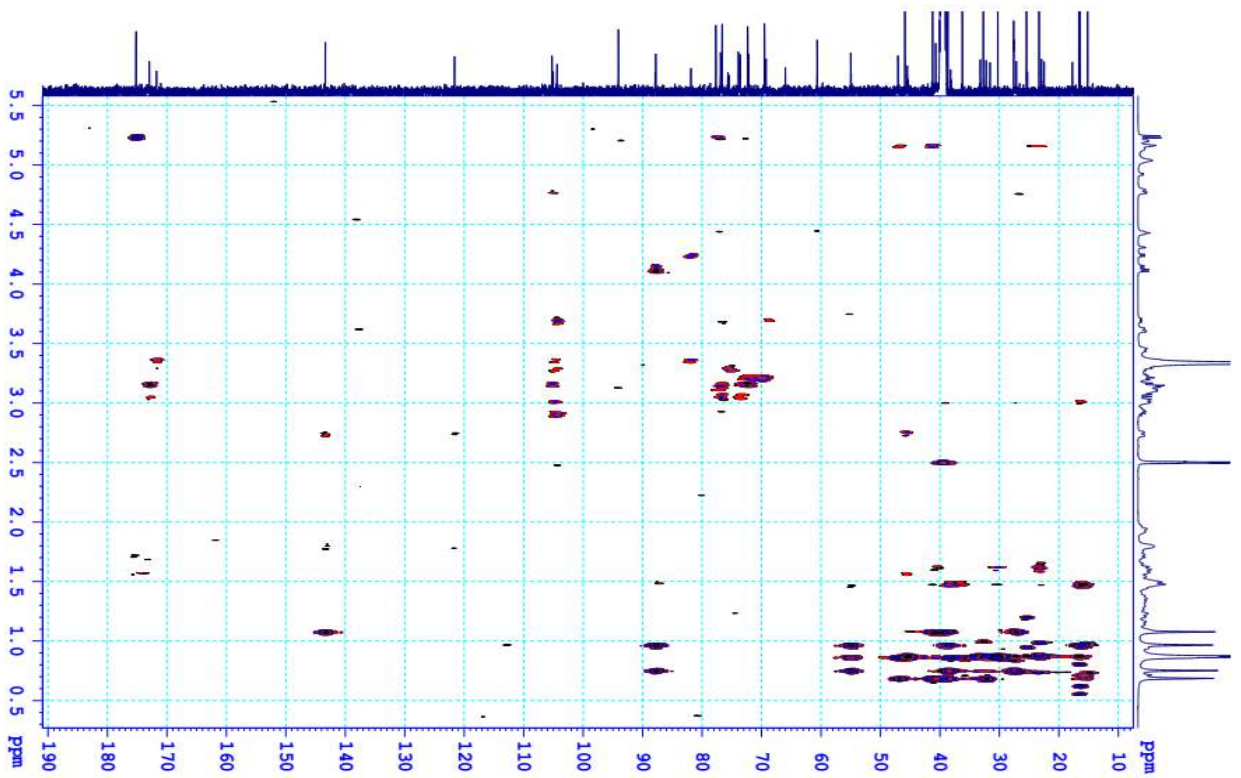
6.1. Phổ ESI-MS của hợp chất **WT6**6.2. Phổ ^1H NMR của hợp chất **WT6**

6.3. Phổ ^{13}C NMR của hợp chất WT6

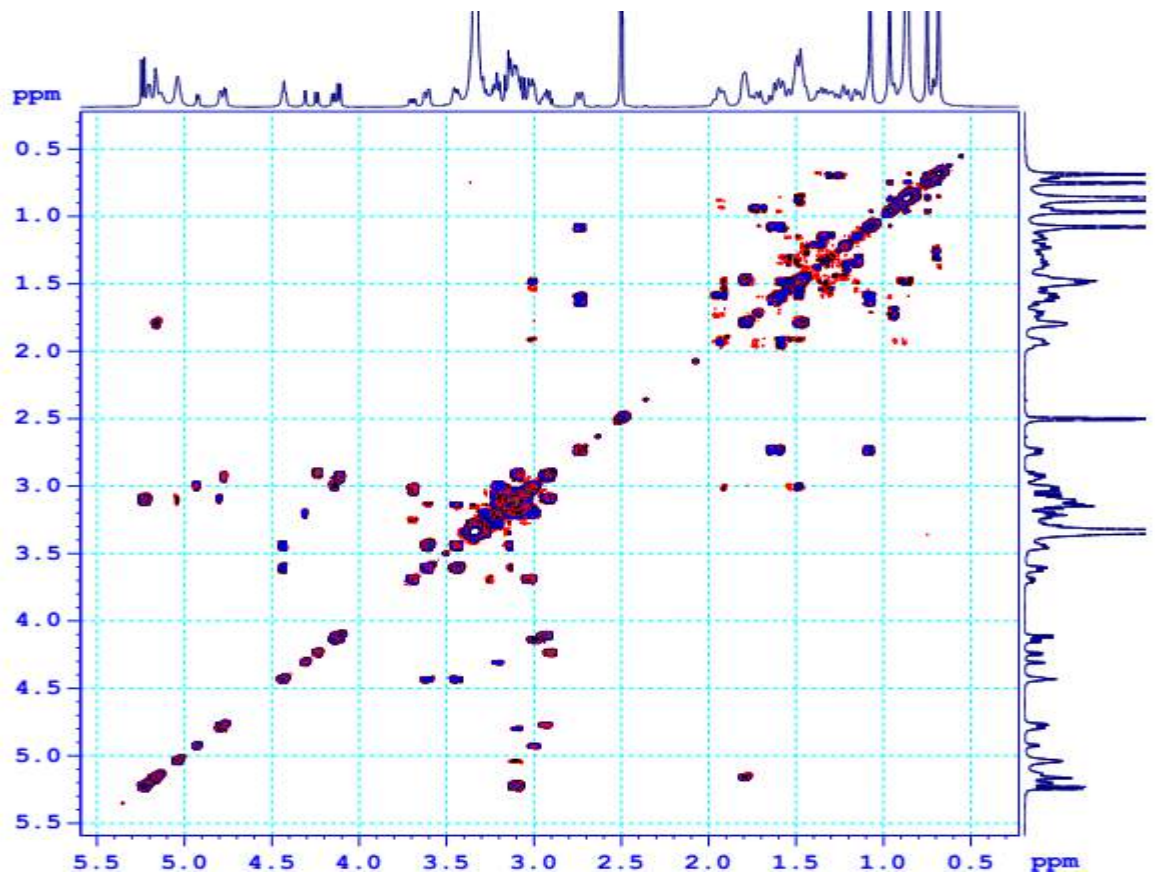
6.4. Phổ HSQC của hợp chất WT6



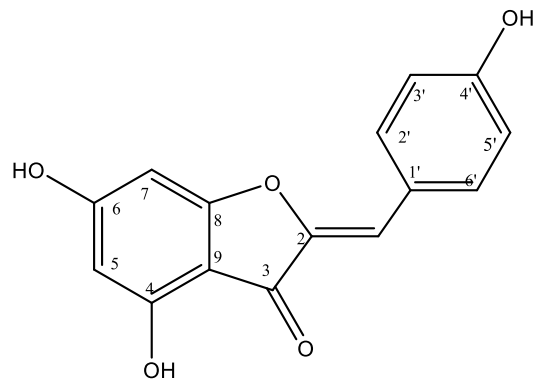
6.5. Phổ HMBC của hợp chất WT6



6.6. Phổ COSY của hợp chất WT6



7. Phụ lục phổ hợp chất WT7

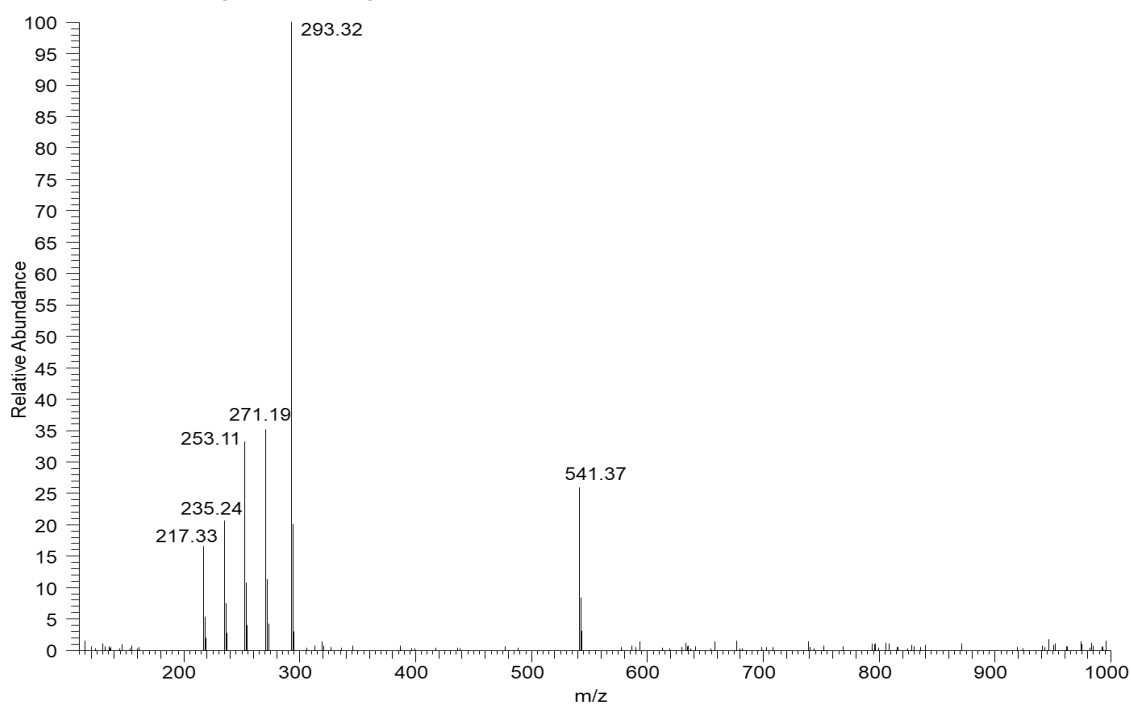
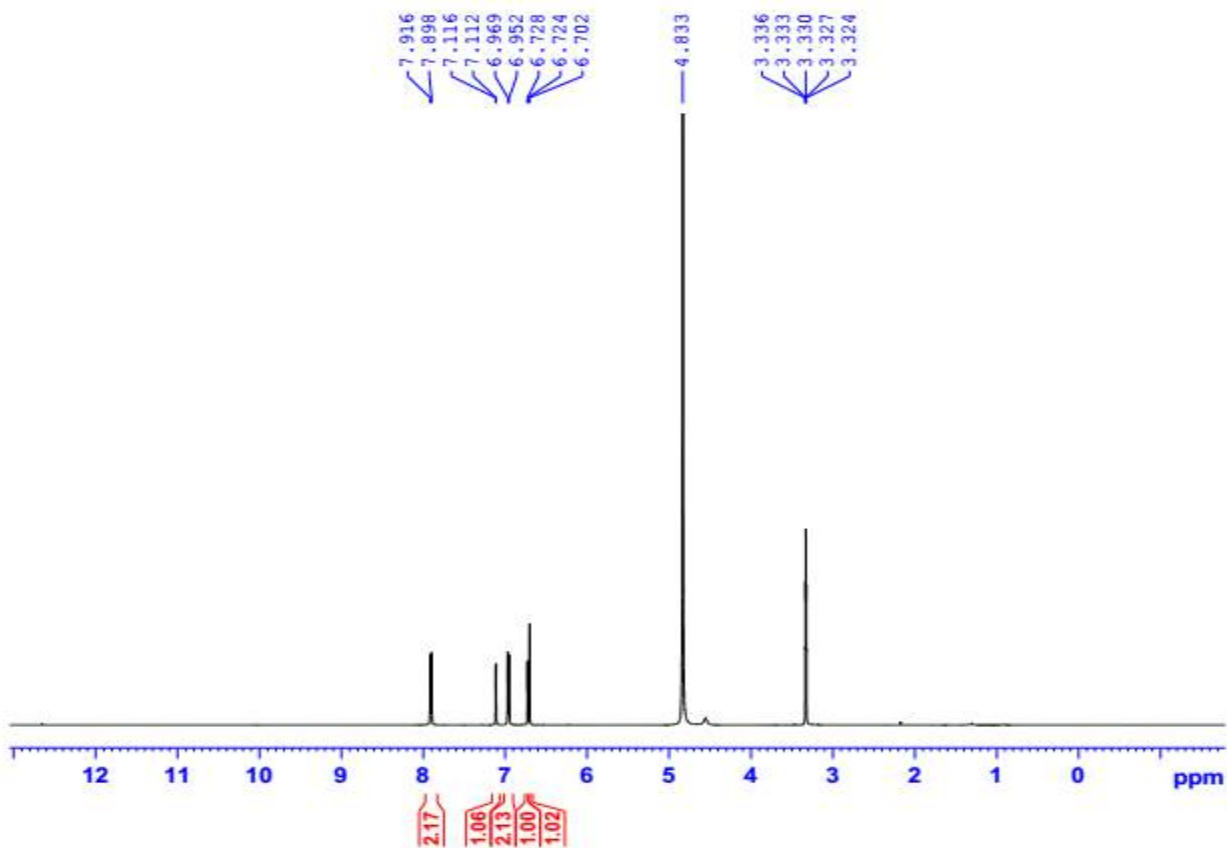


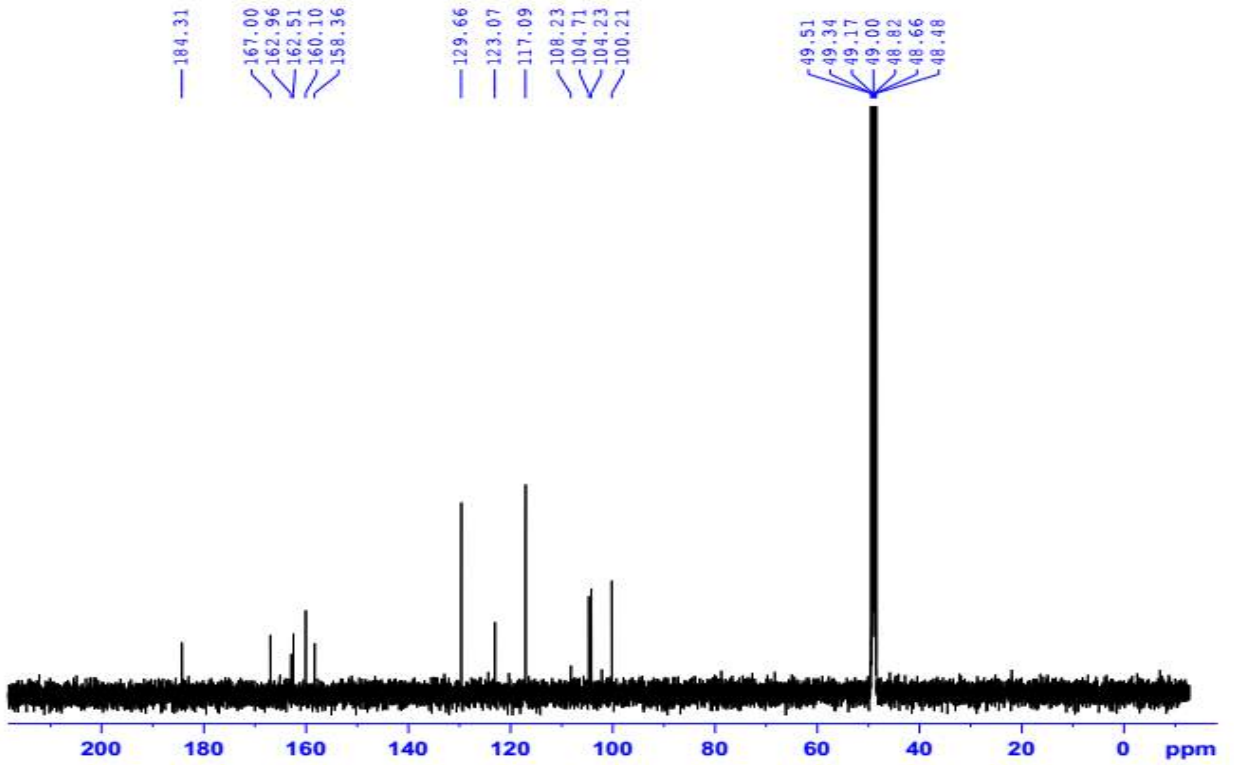
4',4',6'-trihydroxyaurone

- CTPT: $C_{15}H_{10}O_5$,
- KLPT $M = 270$
- Phổ ESI-MS
- Phổ 1H NMR
- Phổ ^{13}C NMR
- Phổ DEPT

7.1. Phổ ESI-MS của hợp chất **WT7**

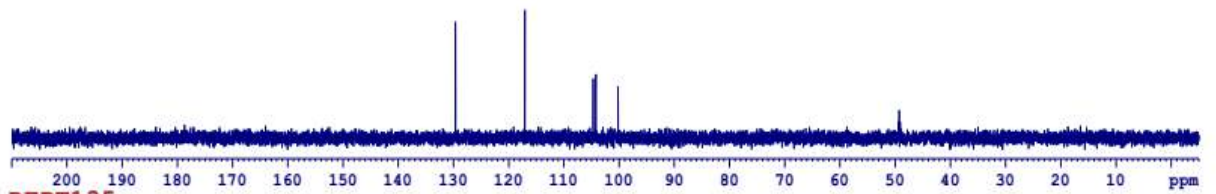
T: ITMS + c ESI Full ms [110.00-1000.00]

7.2. Phổ ^1H NMR của hợp chất **WT7**

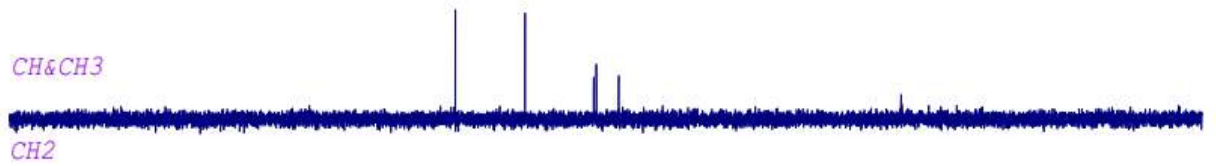
7.3. Phổ ^{13}C NMR của hợp chất WT7

7.4. Phổ DEPT của hợp chất WT7

DEPT90

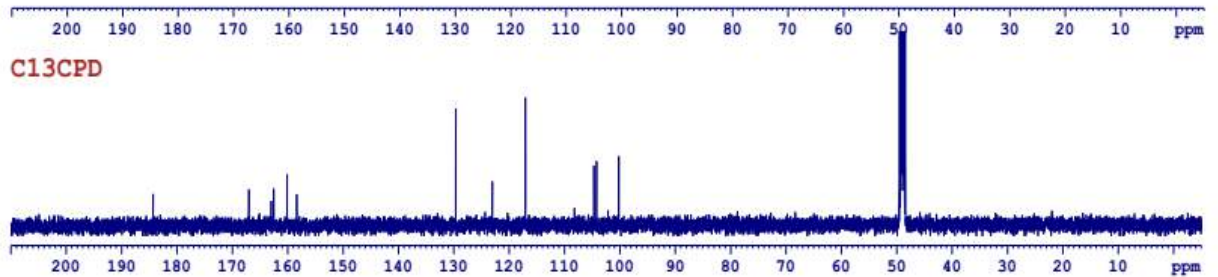


DEPT135

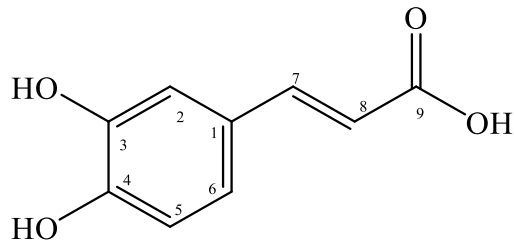


CH&CH3

CH2

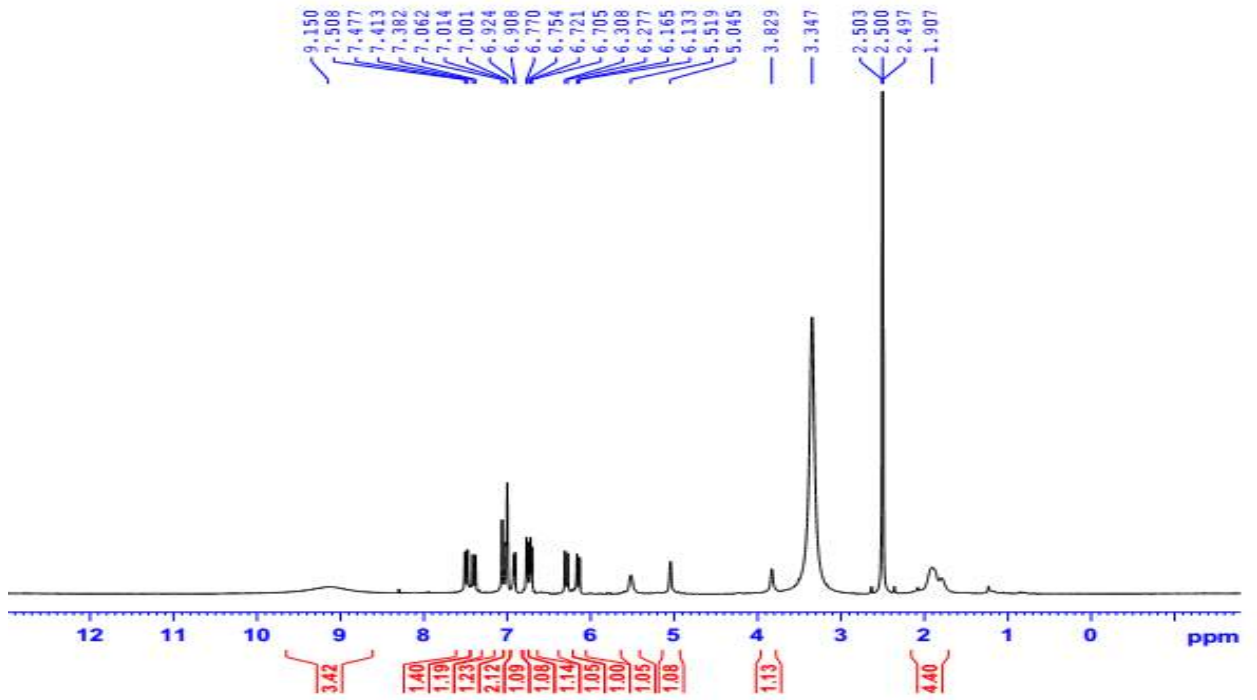
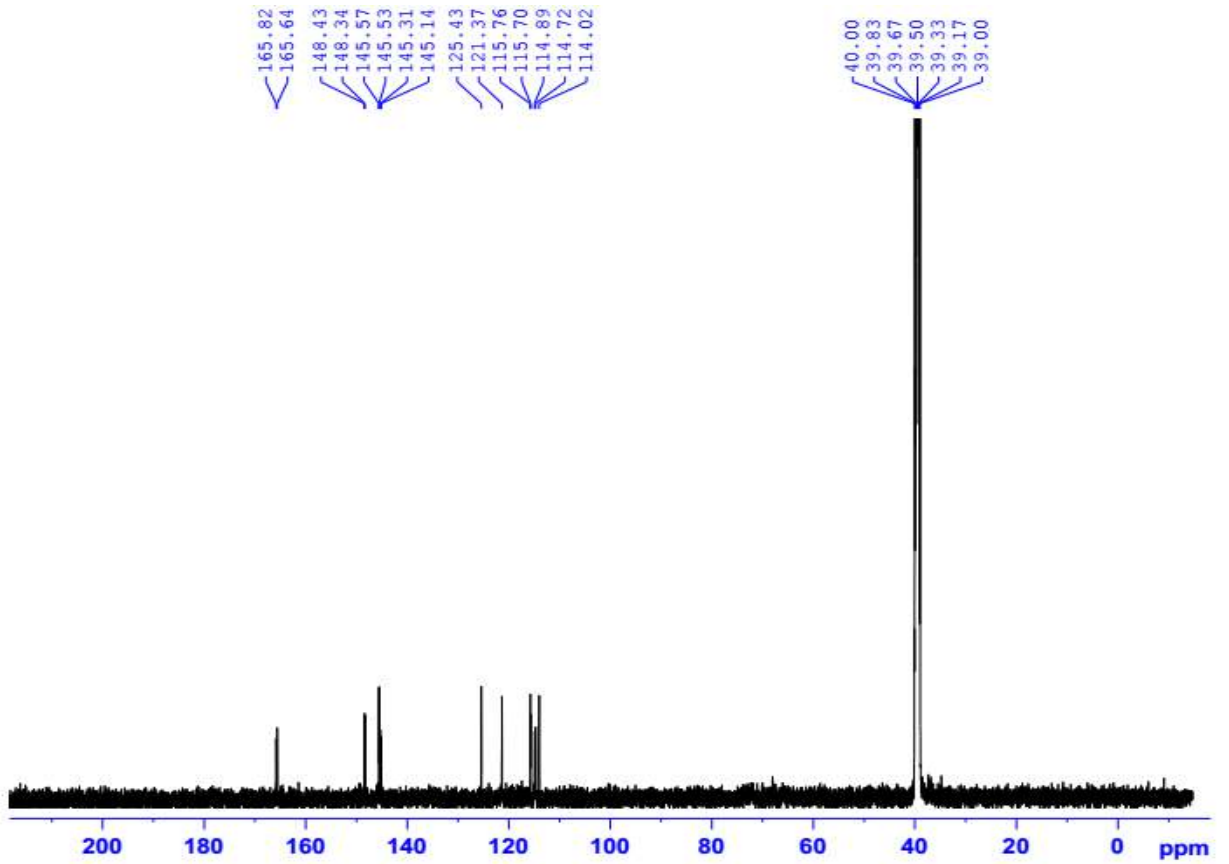


8. Phụ lục phổ hợp chất WT8



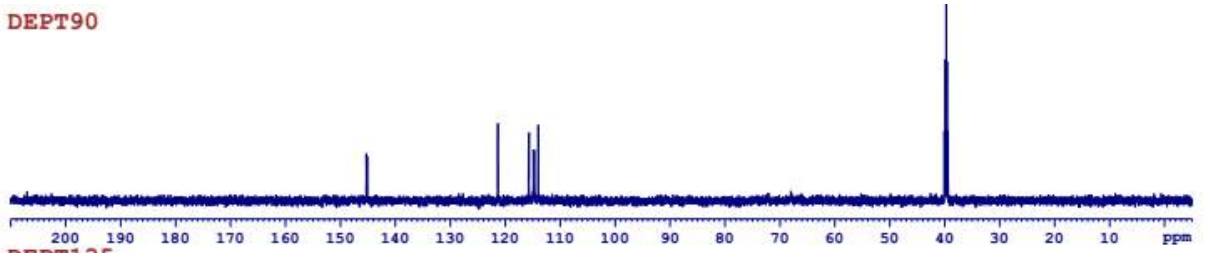
Caffeic acid

- CTPT $C_9H_8O_4$
- KLPT $M = 180$
- Phổ 1H NMR
- Phổ ^{13}C NMR
- Phổ DEPT

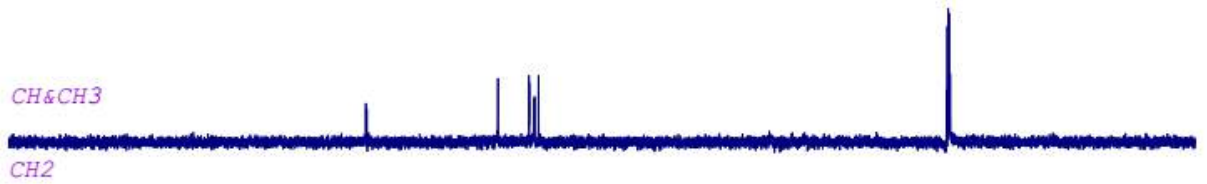
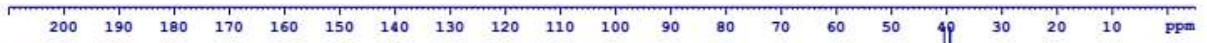
8.1. Phổ ^1H NMR của hợp chất **WT8**8.2. Phổ ^{13}C NMR của hợp chất **WT8**

8.3. Phổ DEPT của hợp chất **WT8**

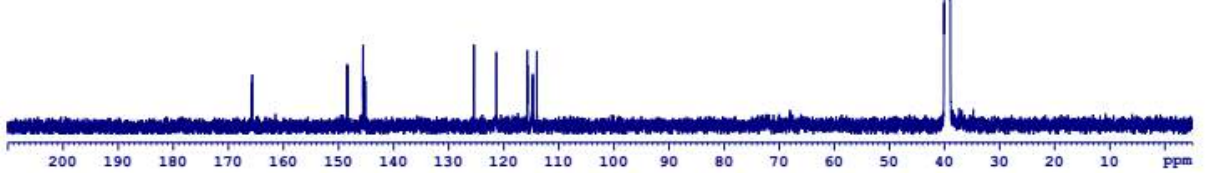
DEPT90



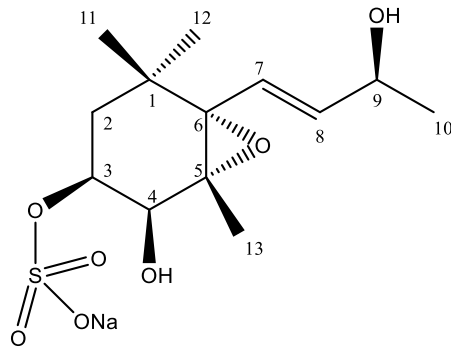
DEPT135

*CH&CH3**CH2*

C13CPD

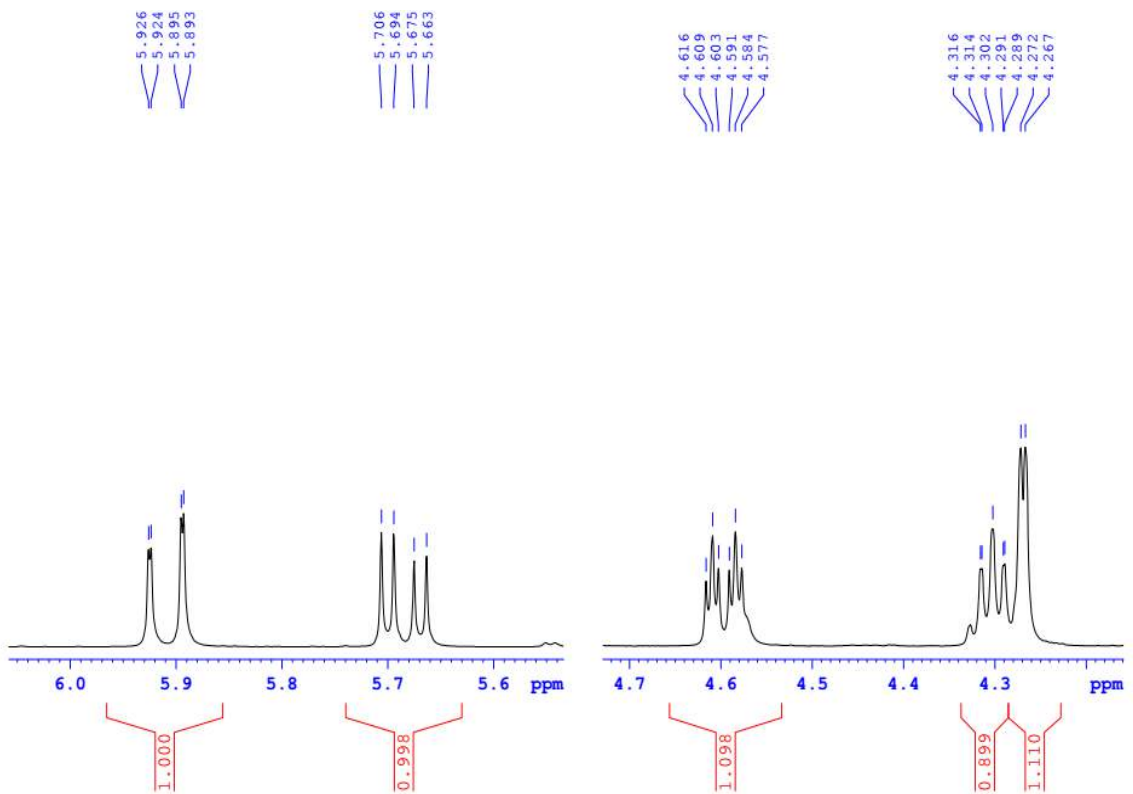
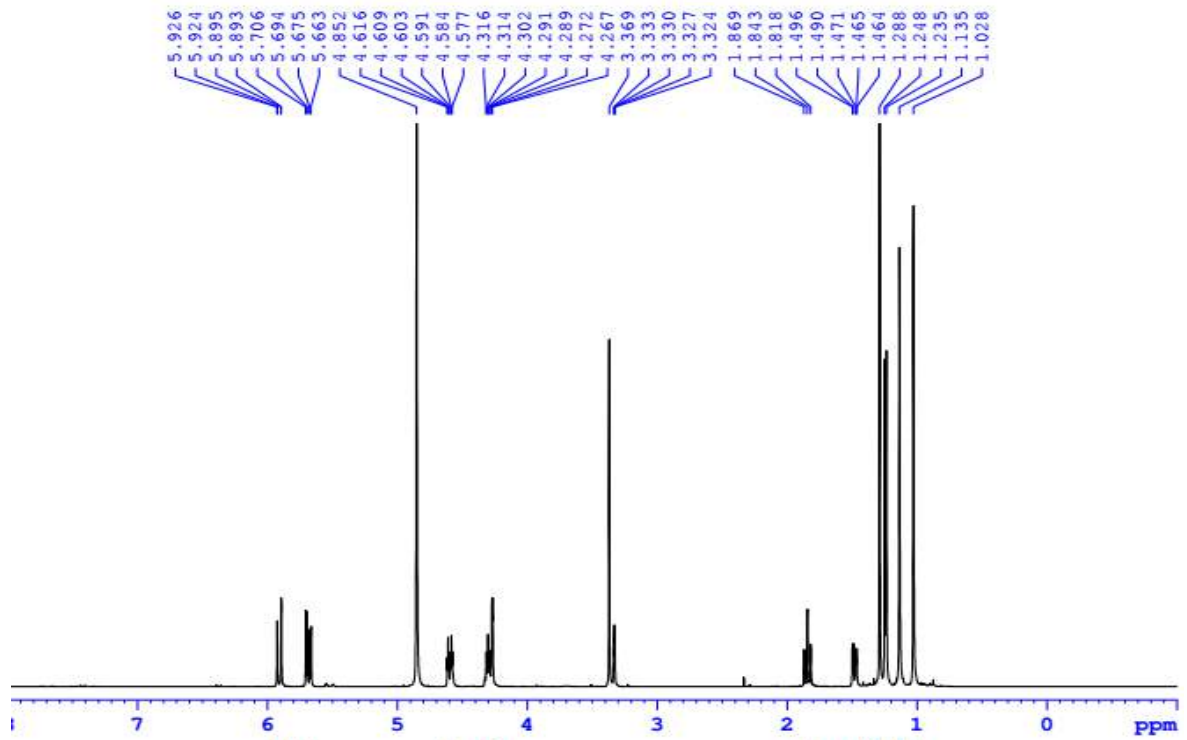


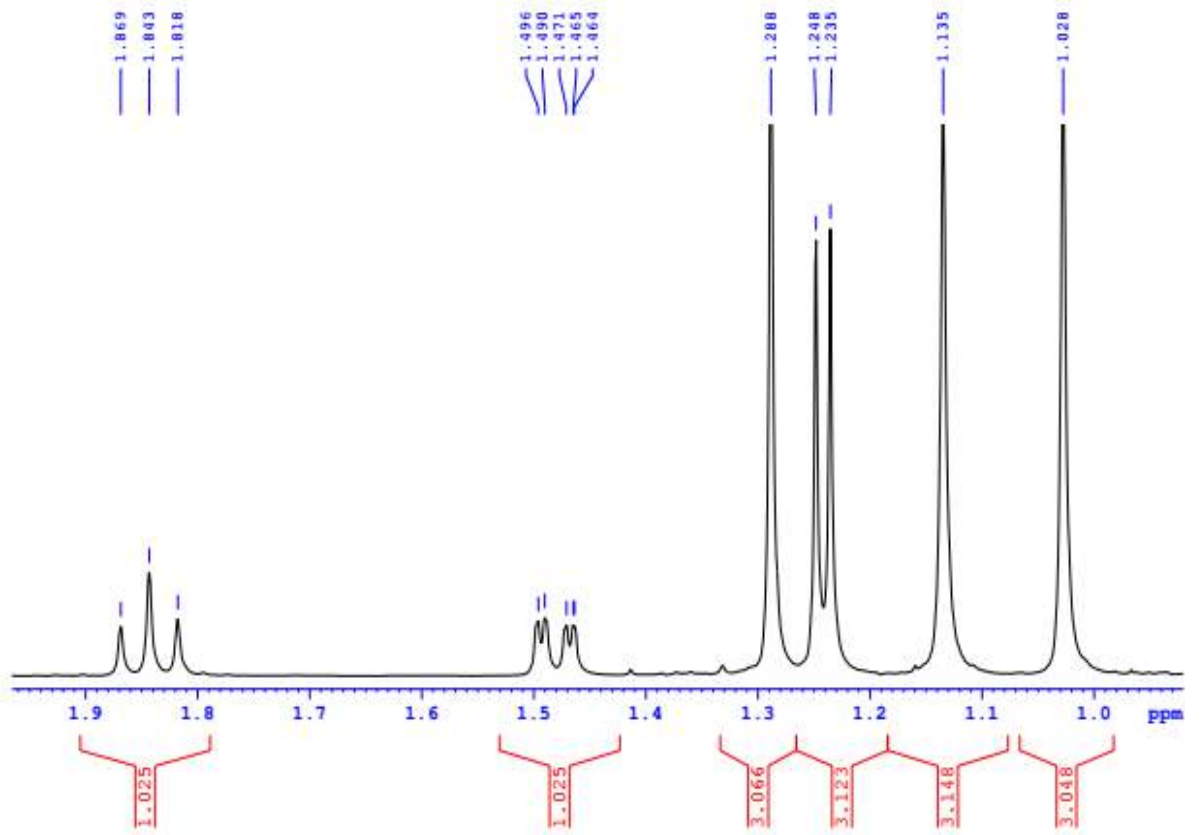
9. Phụ lục phổ hợp chất WC1



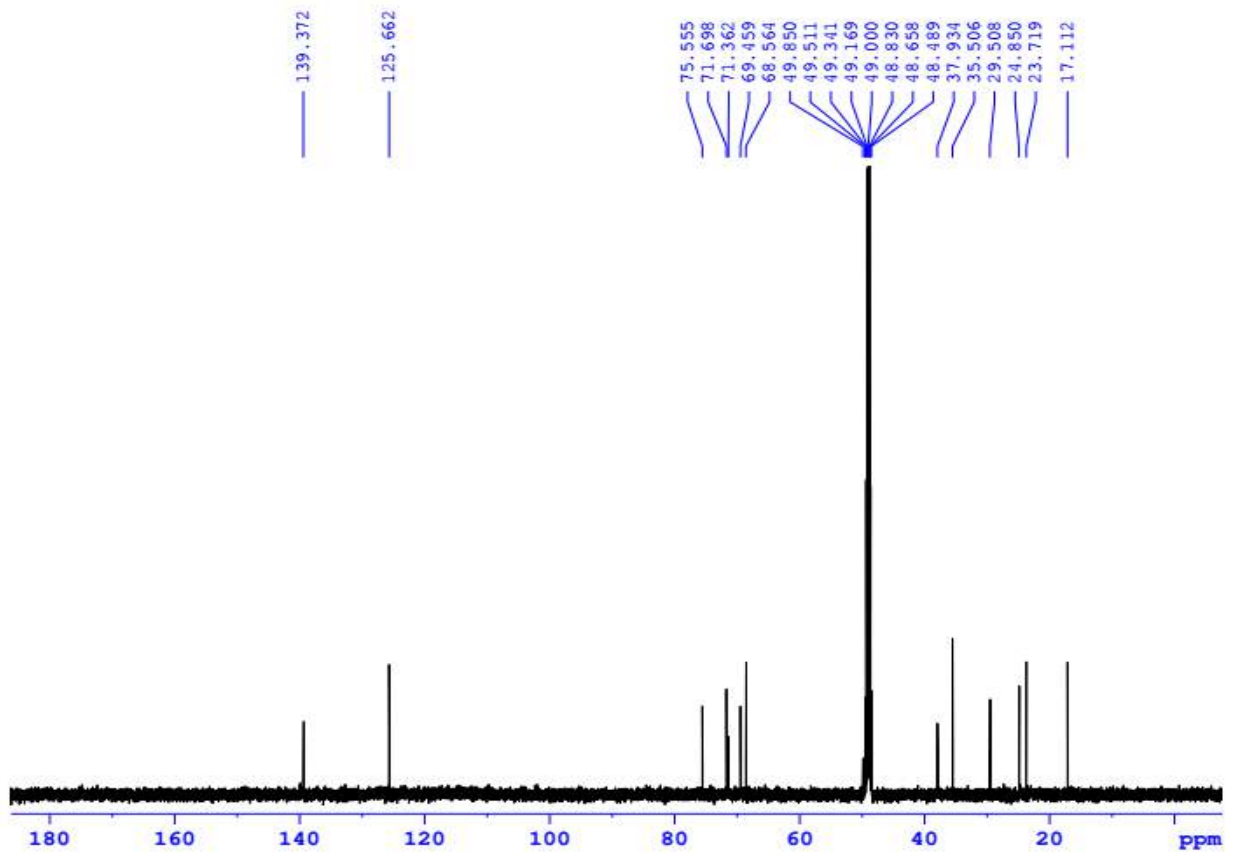
Wednic

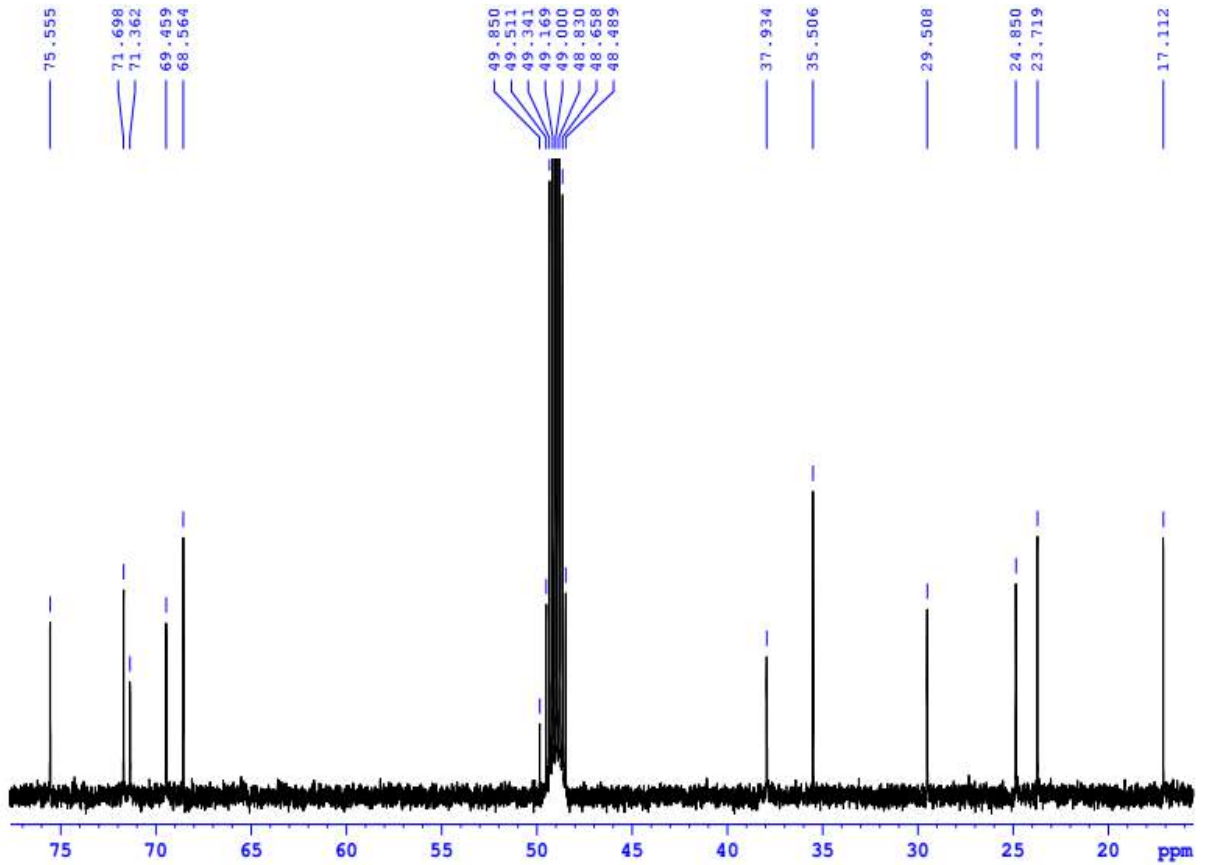
- CTPT: $C_{13}H_{21}O_7NaS$
- KLPT: $M = 550$
- Phổ HR-ESI-MS
- Phổ 1H NMR
- Phổ ^{13}C NMR
- Phổ HSQC
- Phổ HMBC
- Phổ COSY
- Phổ NOESY

9.1. Phổ ^1H NMR của hợp chất WC1



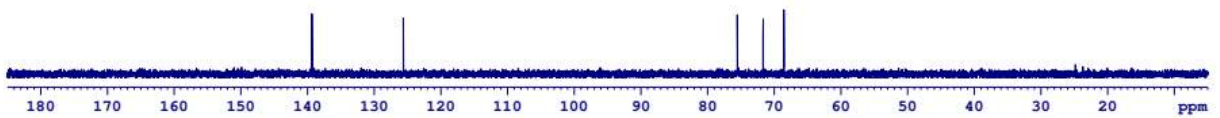
9.2. Phổ ^{13}C NMR hợp chất WC1



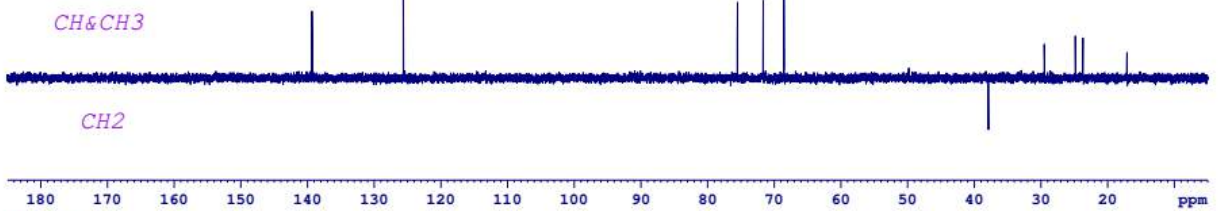


9.3. Phổ DEPT của hợp chất WC1

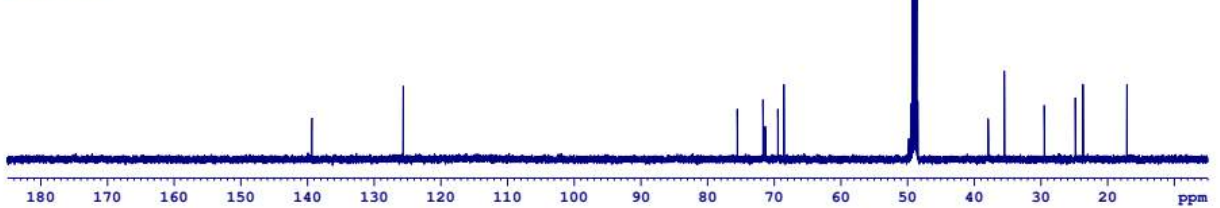
DEPT90



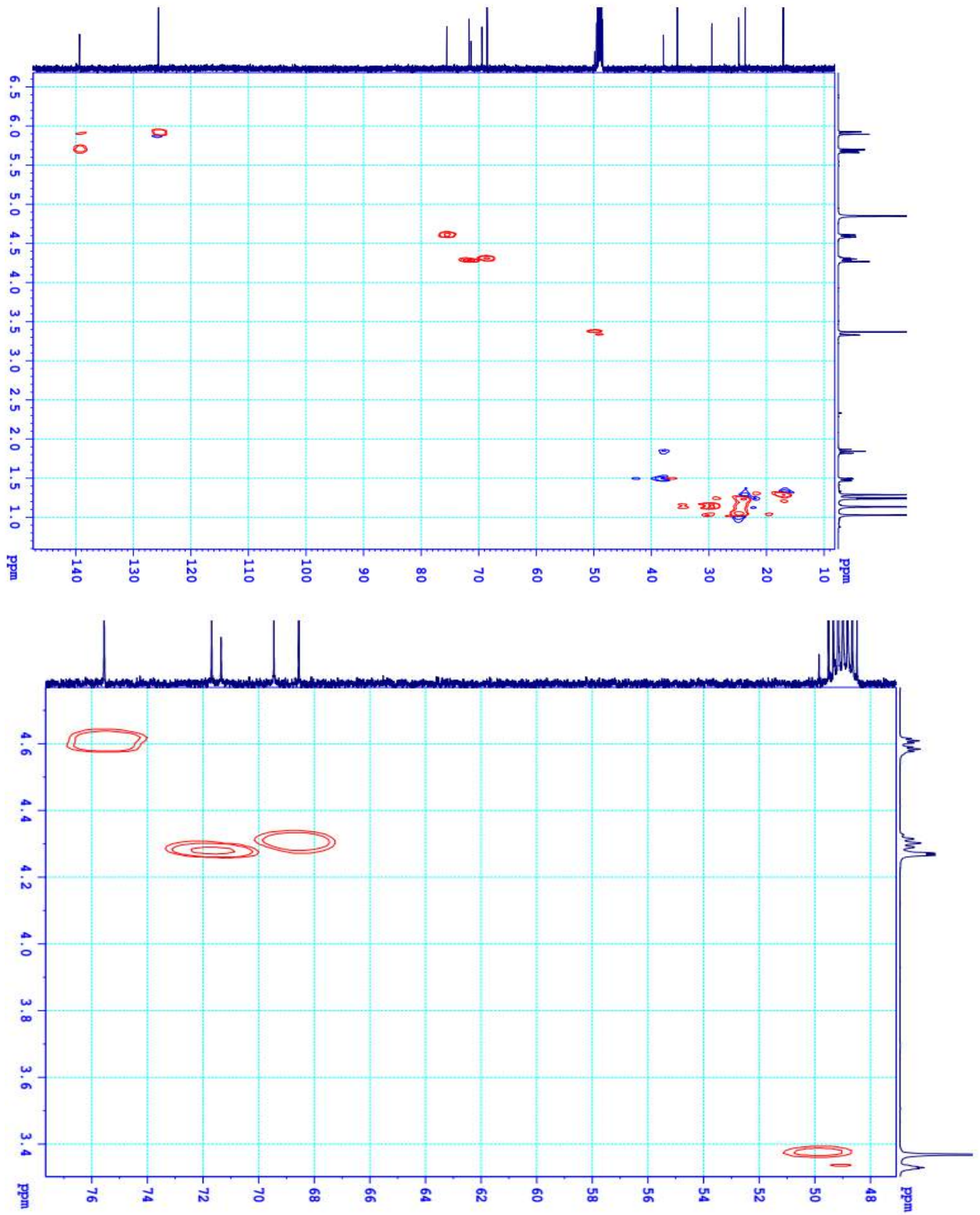
DEPT135

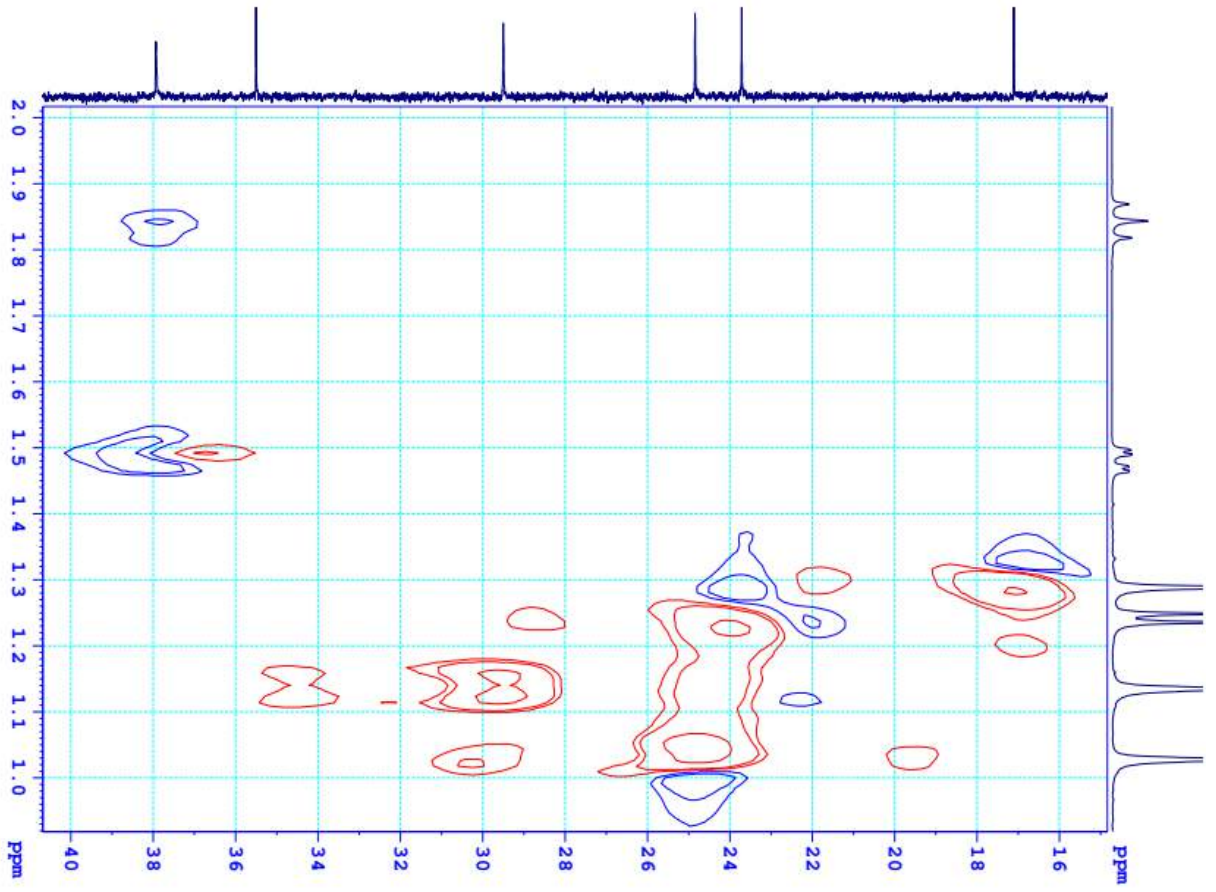


C13CPD

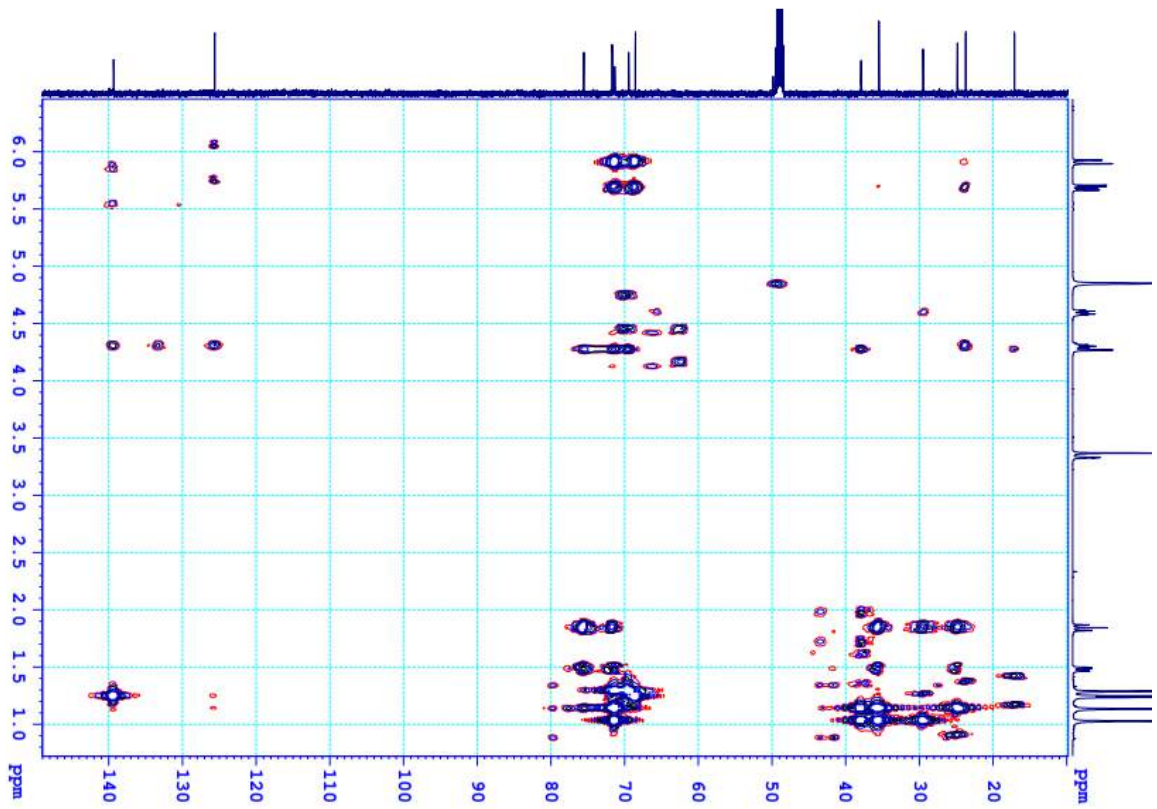


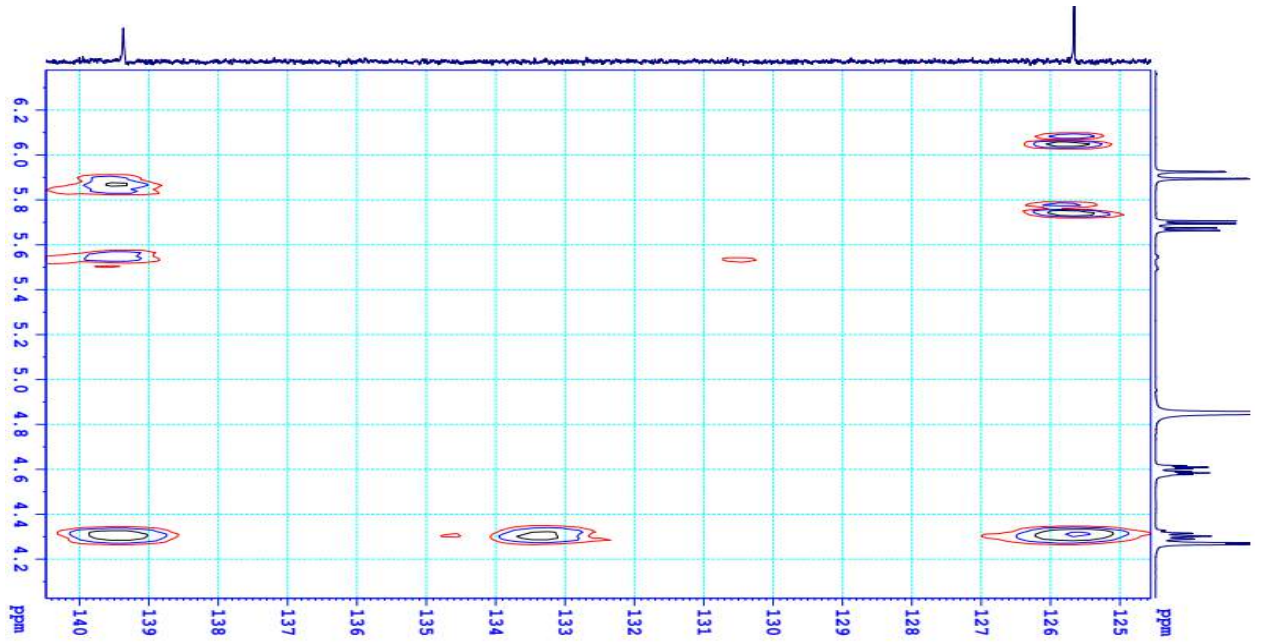
9.4. Phổ HSQC của hợp chất WC1



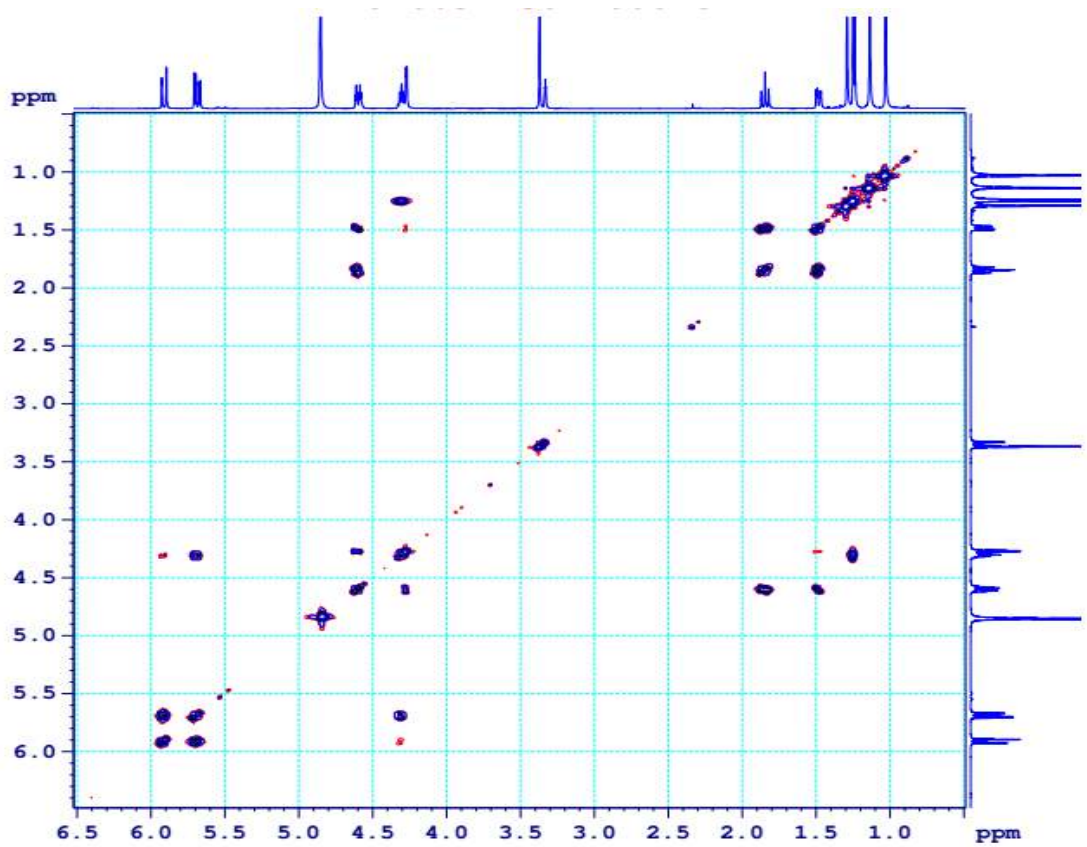


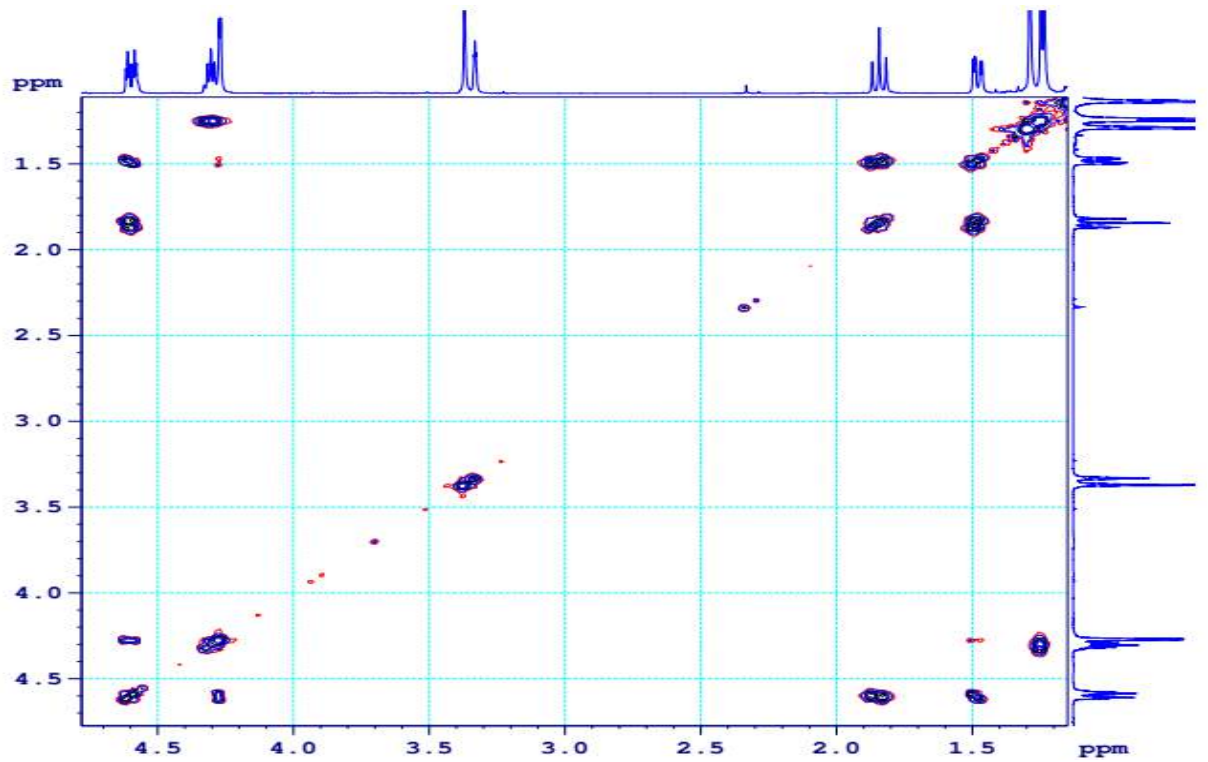
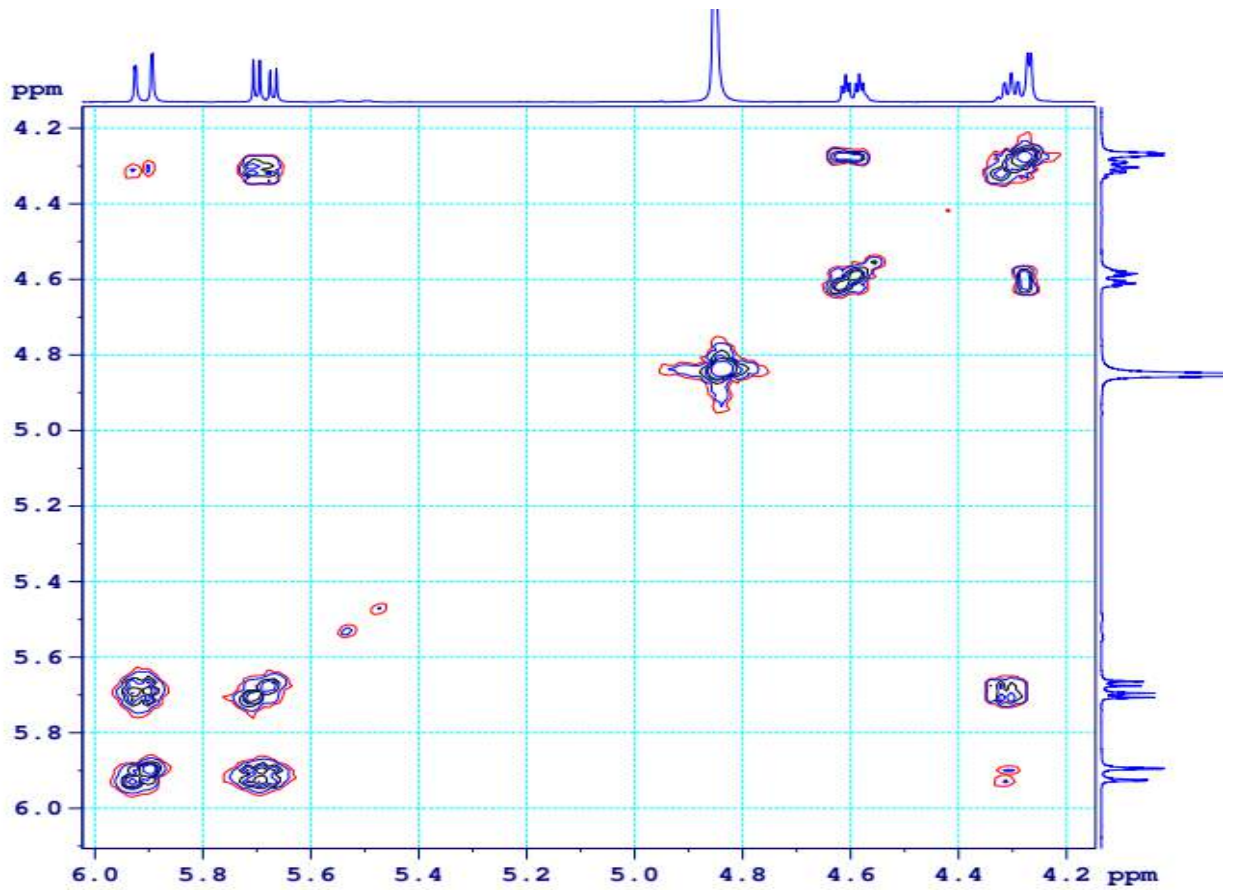
9.5. Phổ HMBC của hợp chất WC1



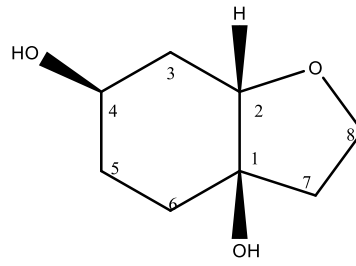


9.6. Phổ COSY của hợp chất WC1



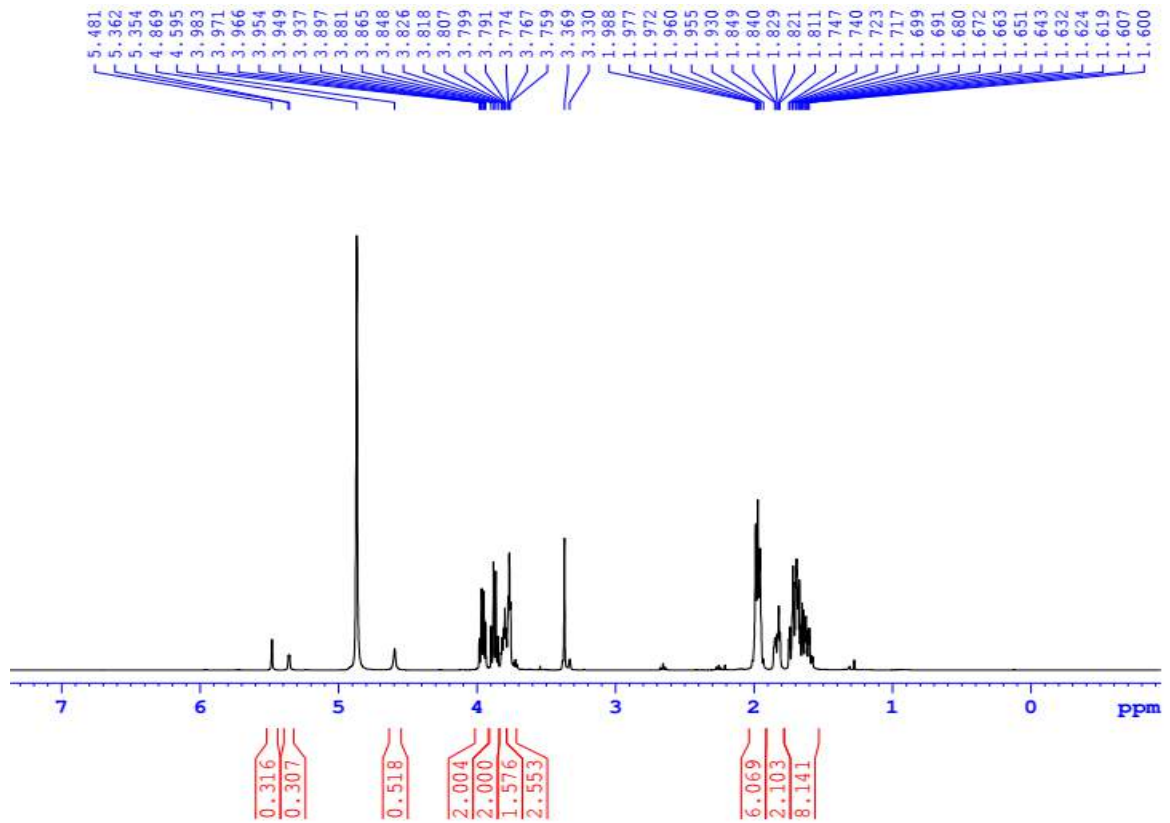
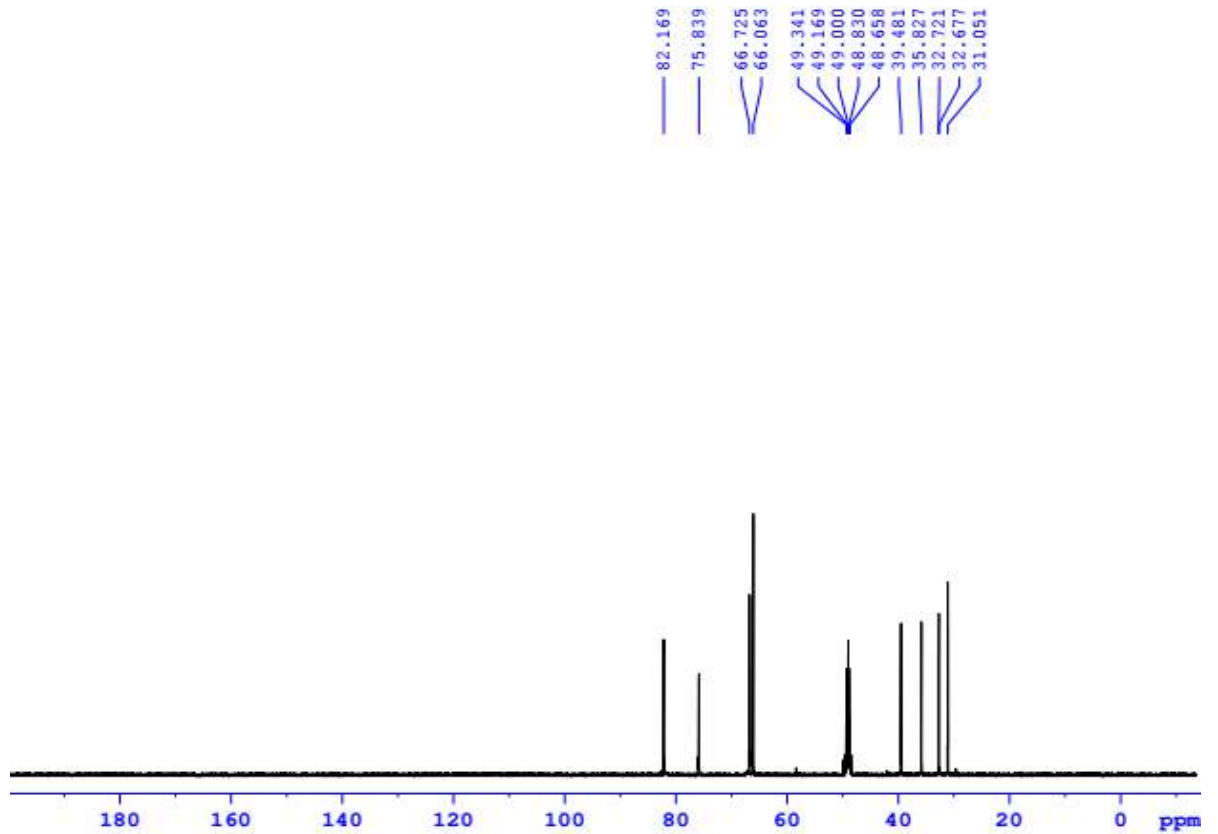


10. Phụ lục phổ của hợp chất WC2



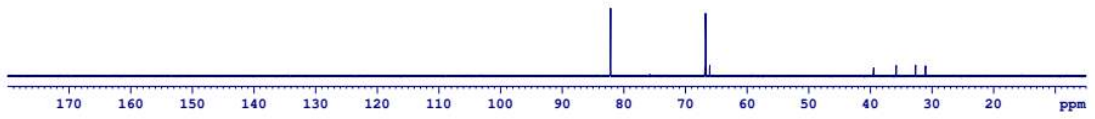
Cleroindicin E

- CTPT $C_8H_{14}O_3$
- KLPT $M = 158$
- Phổ 1H NMR
- Phổ ^{13}C NMR
- Phổ DEPT
- Phổ ESI-MS

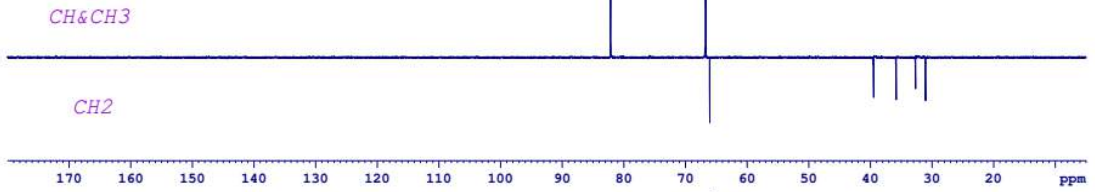
10.1. Phổ ^1H NMR của hợp chất WC210.2. Phổ ^{13}C NMR của hợp chất WC2

10.3. phổ DEPT của hợp chất WC2

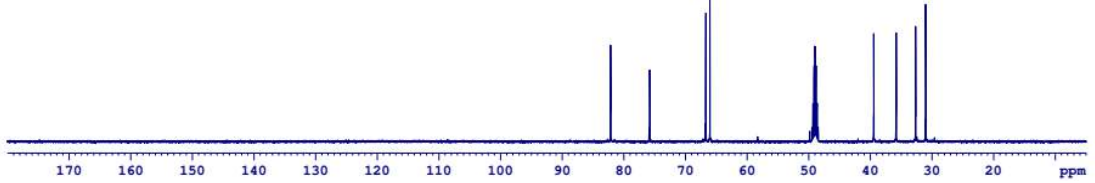
DEPT90



DEPT135

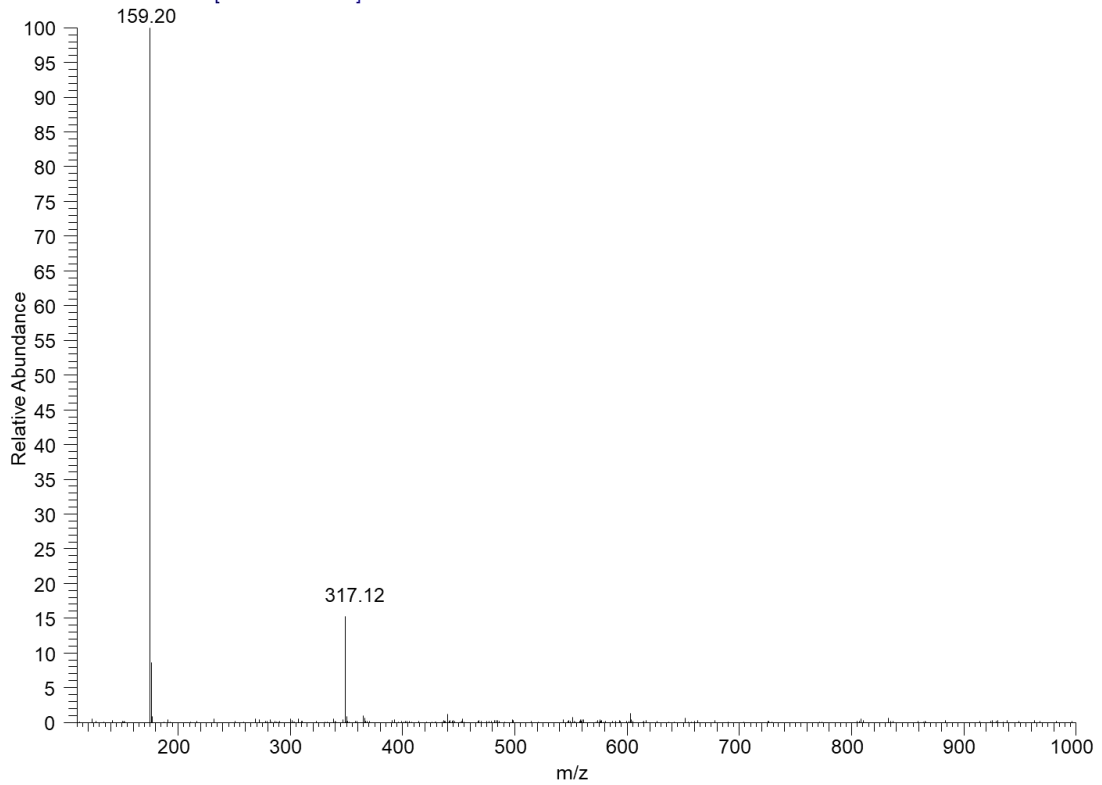


C13CPD

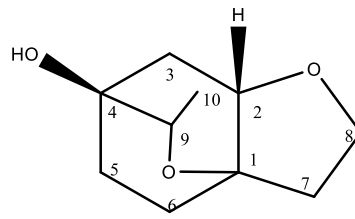


10.4. phổ ESI-MS của WC2

T: ITMS + c ESI Full ms [110.00-1000.00]

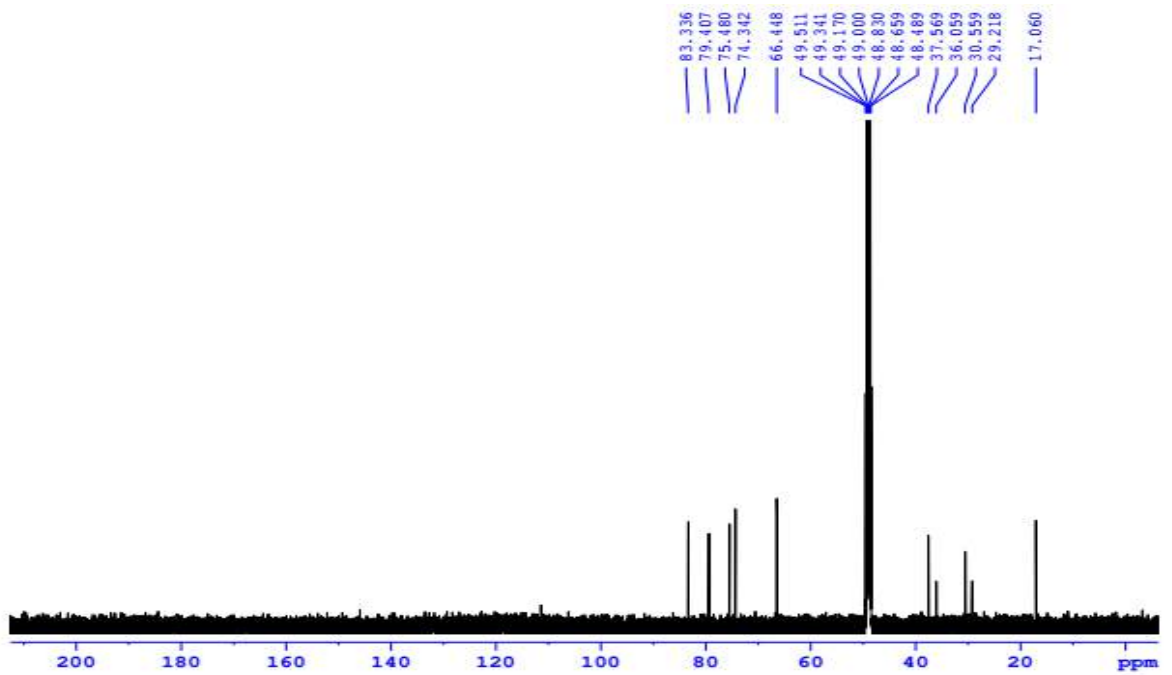


11. Phụ lục phổ hợp chất WC3

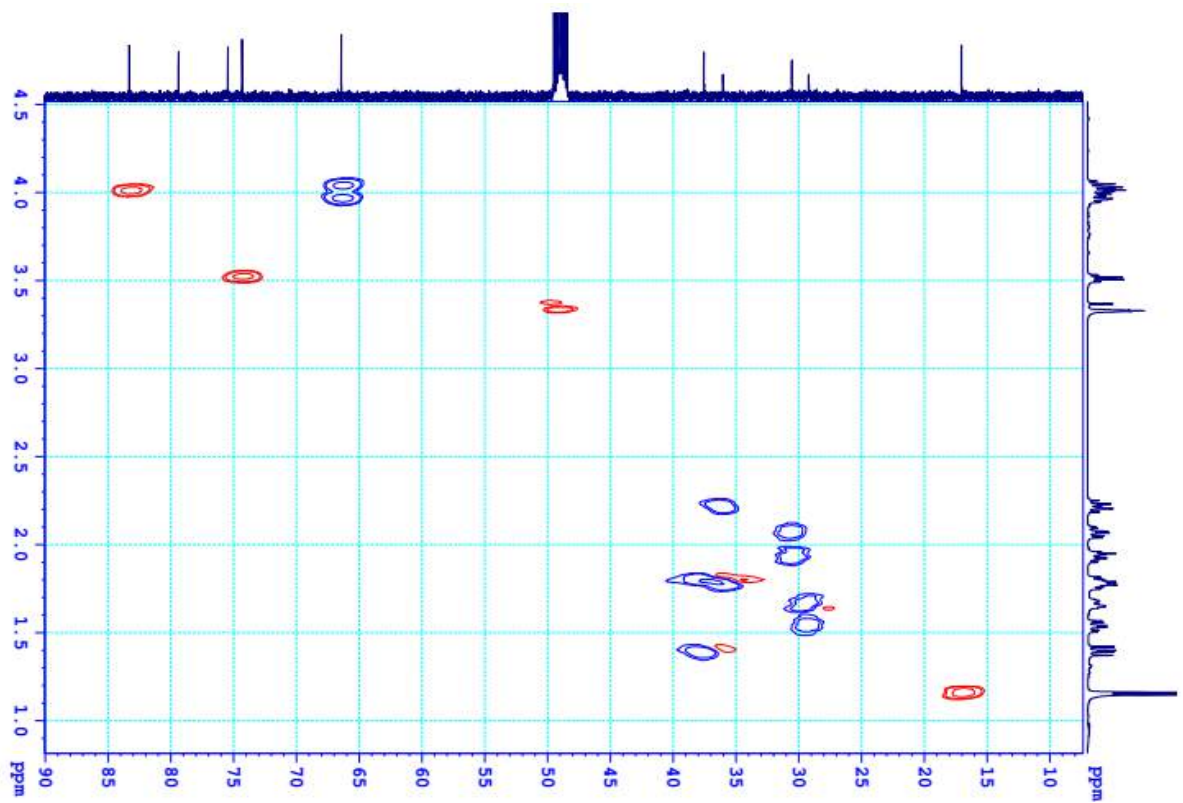


Wednenol

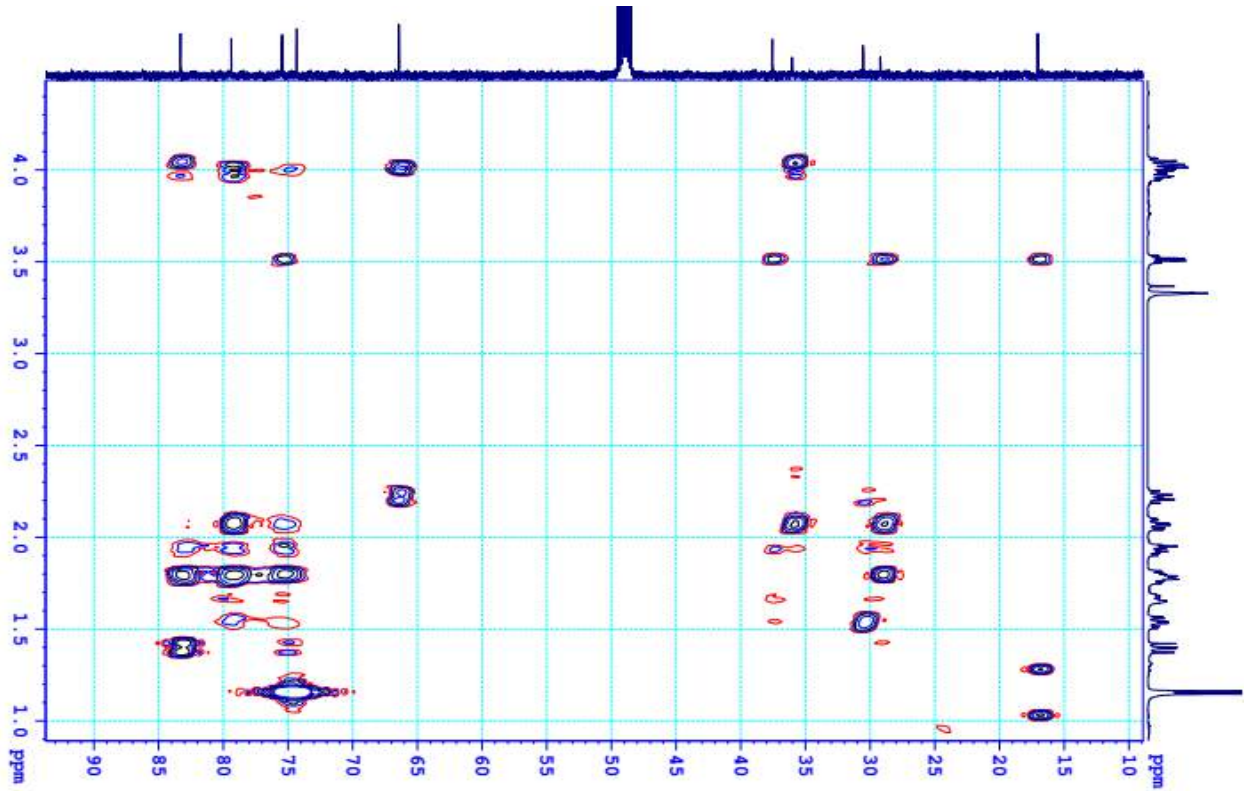
- CTPT: $C_{10}H_{16}O_3$
- KLPT M = 184
- Phổ HR-MSI-MS
- Phổ 1H MNR
- Phổ ^{13}C NMR
- Phổ HSQC
- Phổ HMBC
- Phổ COSY
- Phổ NOESY

11.3. Phổ ^{13}C NMR của hợp chất WC3

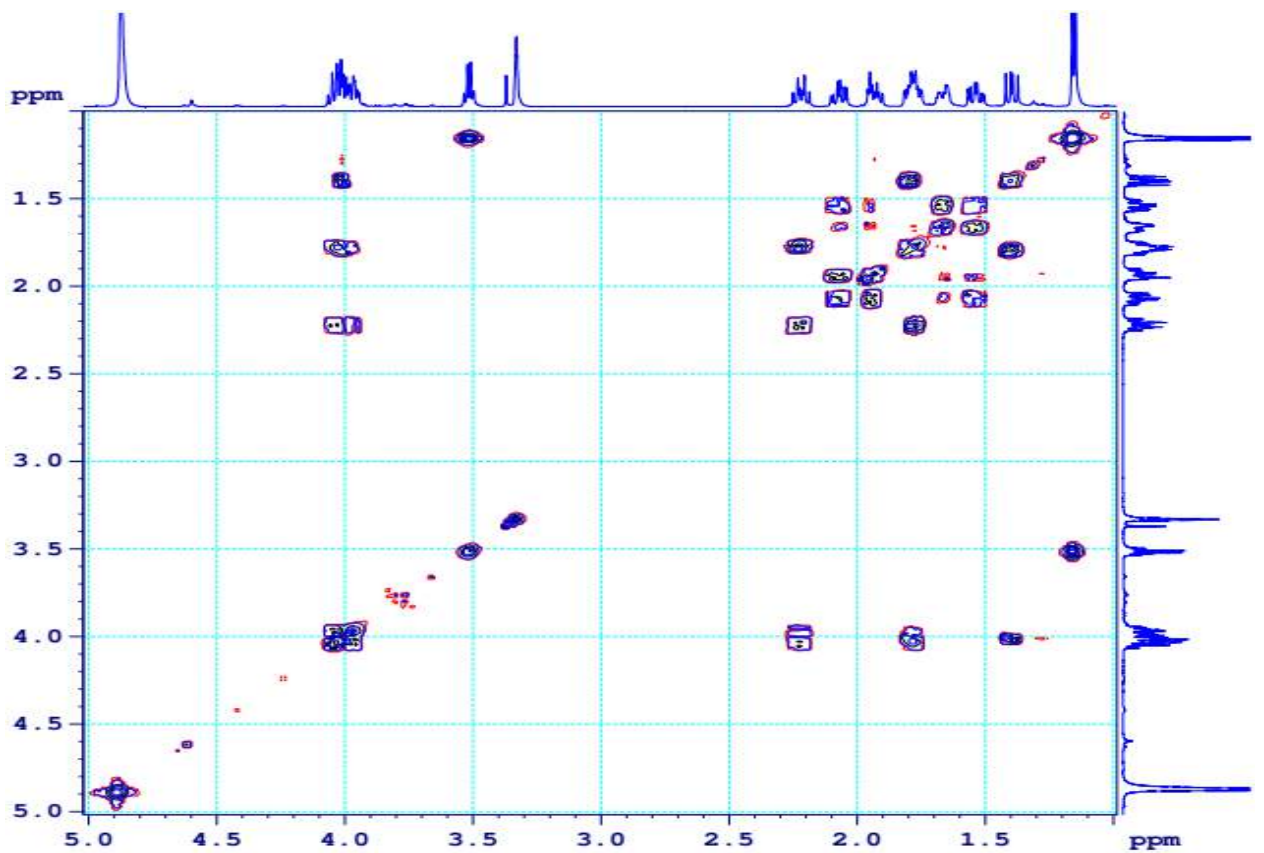
11.4. Phổ HSQC của hợp chất WC3



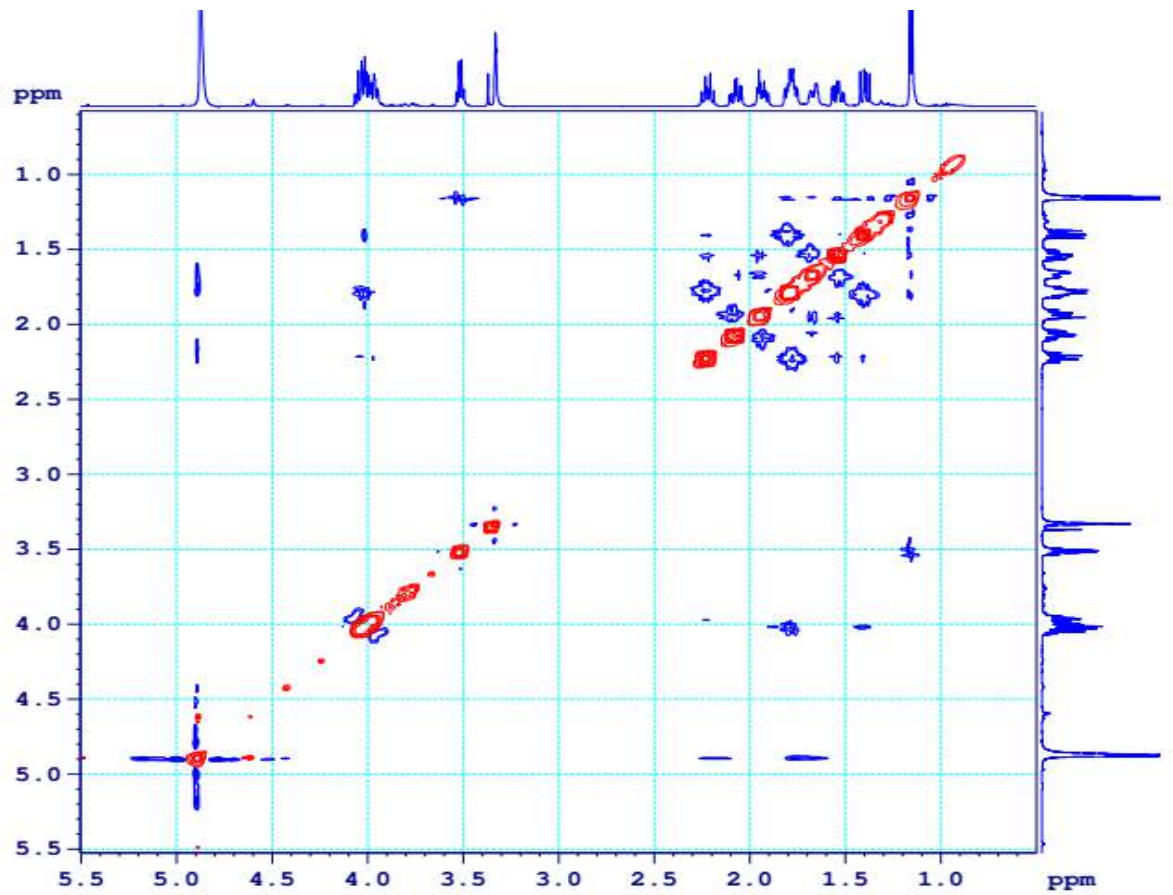
11.5. Phổ HMBC của hợp chất WC3

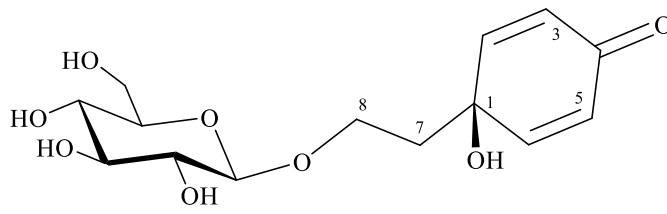


11.6. Phổ COSY của hợp chất WC3



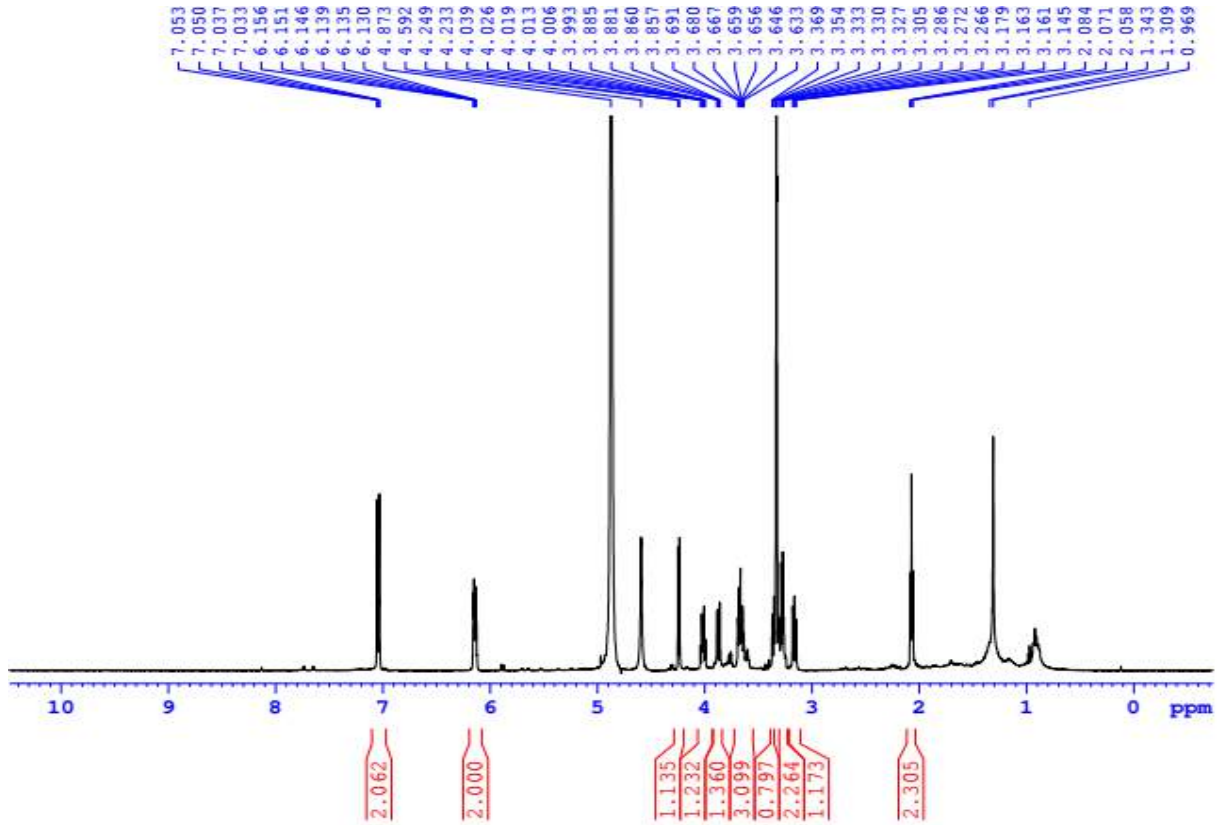
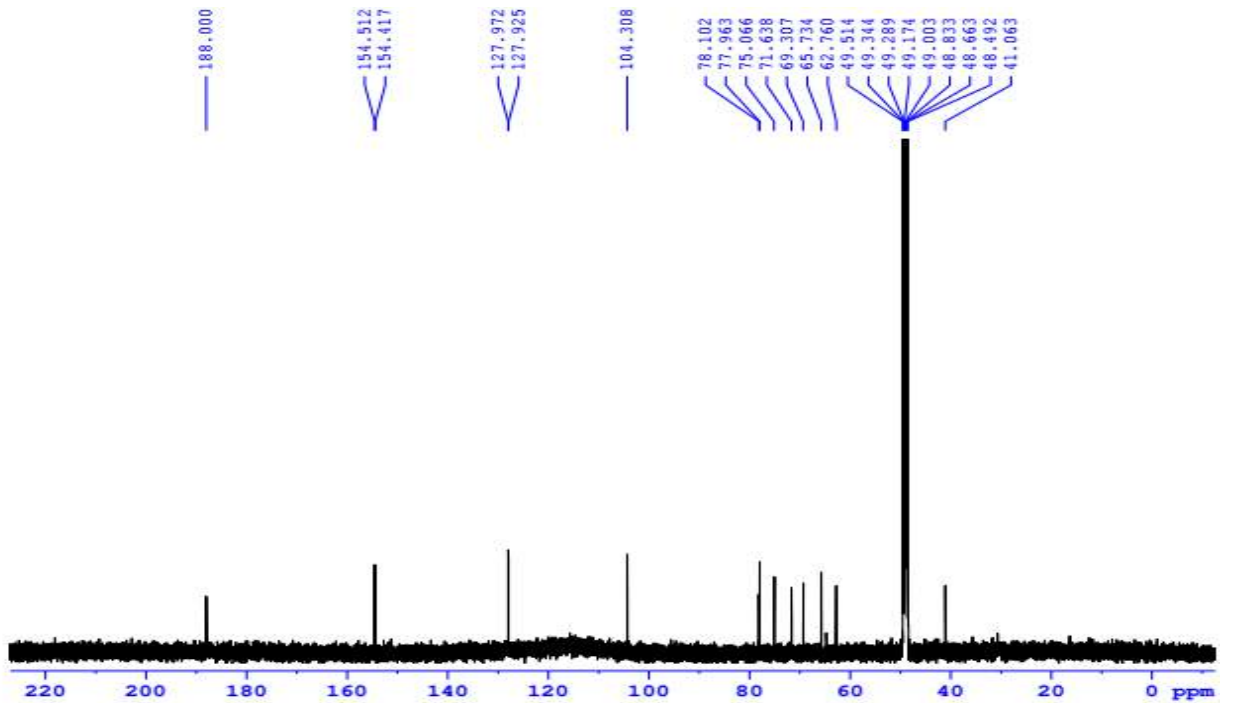
11.7. Phổ NOESY của hợp chất WC3



12. Phụ lục phổ hợp chất WC4.

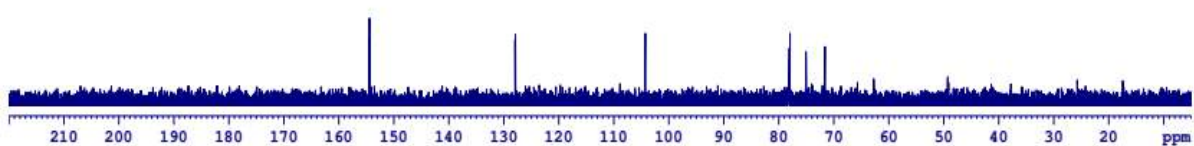
Cornoside

- CTPT $C_{14}H_{20}O_8$
- KLPT $M = 316$
- Phổ 1H NMR
- Phổ ^{13}C NMR
- Phổ DEPT
- Phổ ESI-MS

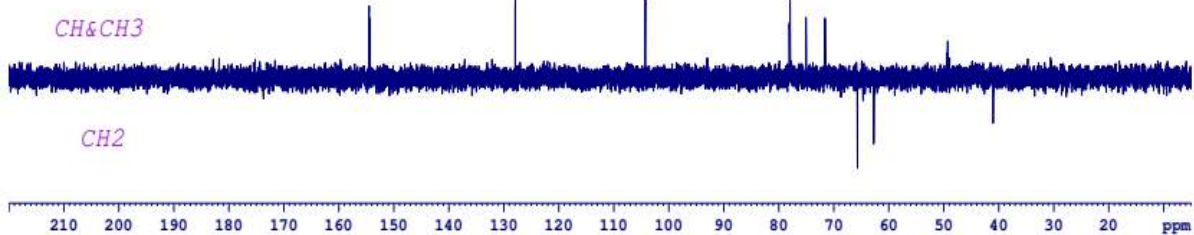
12.1. Phổ ^1H NMR của hợp chất WC412.2. Phổ ^{13}C NMR của hợp chất WC4

12.3. Phổ DEPT của hợp chất WC4

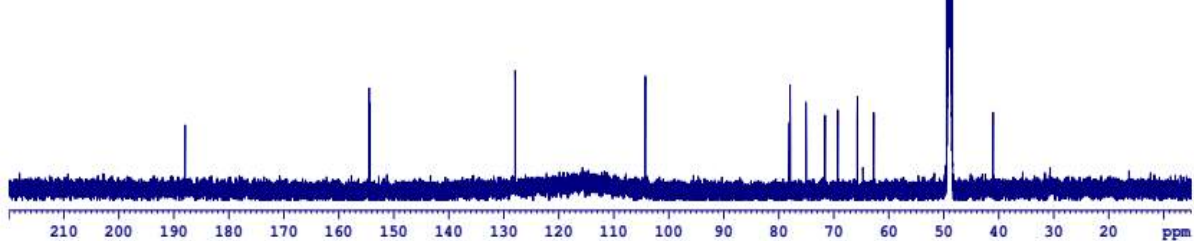
DEPT90



DEPT135

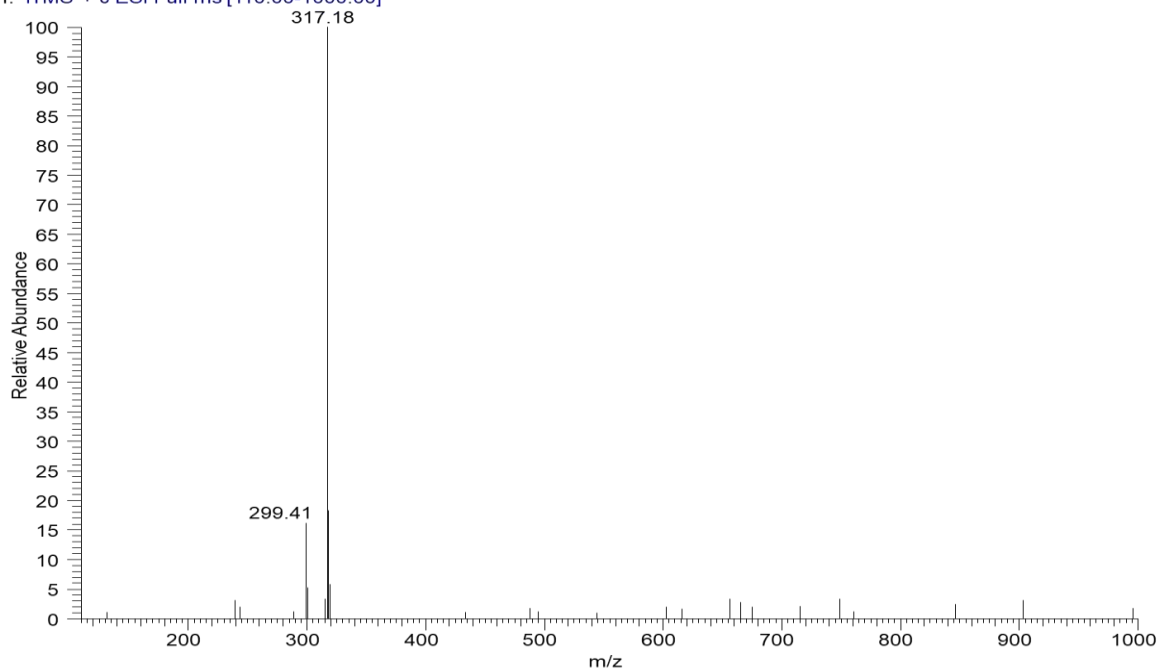


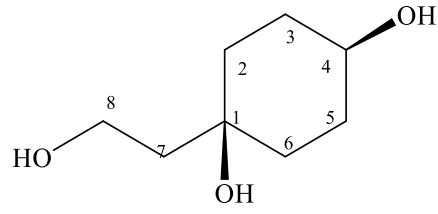
C13CPD



12.4. Phổ ESI-MS của WC4

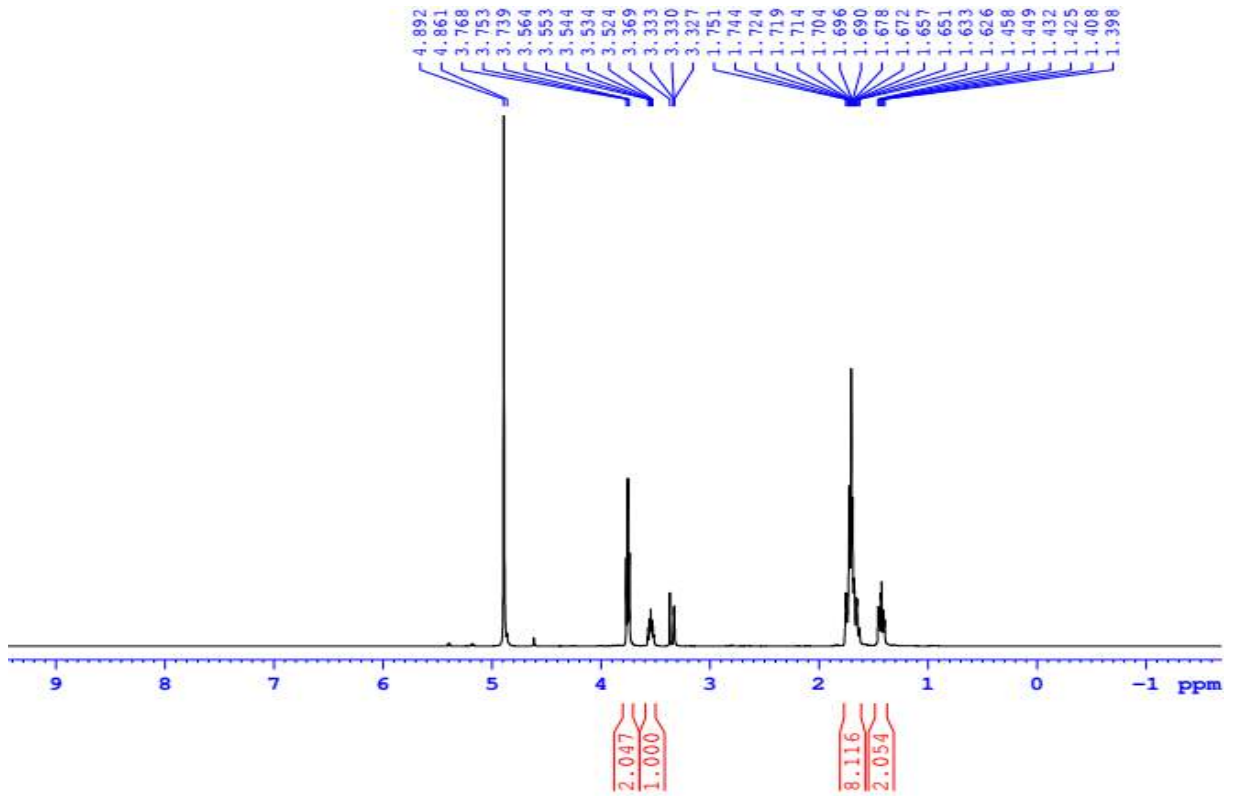
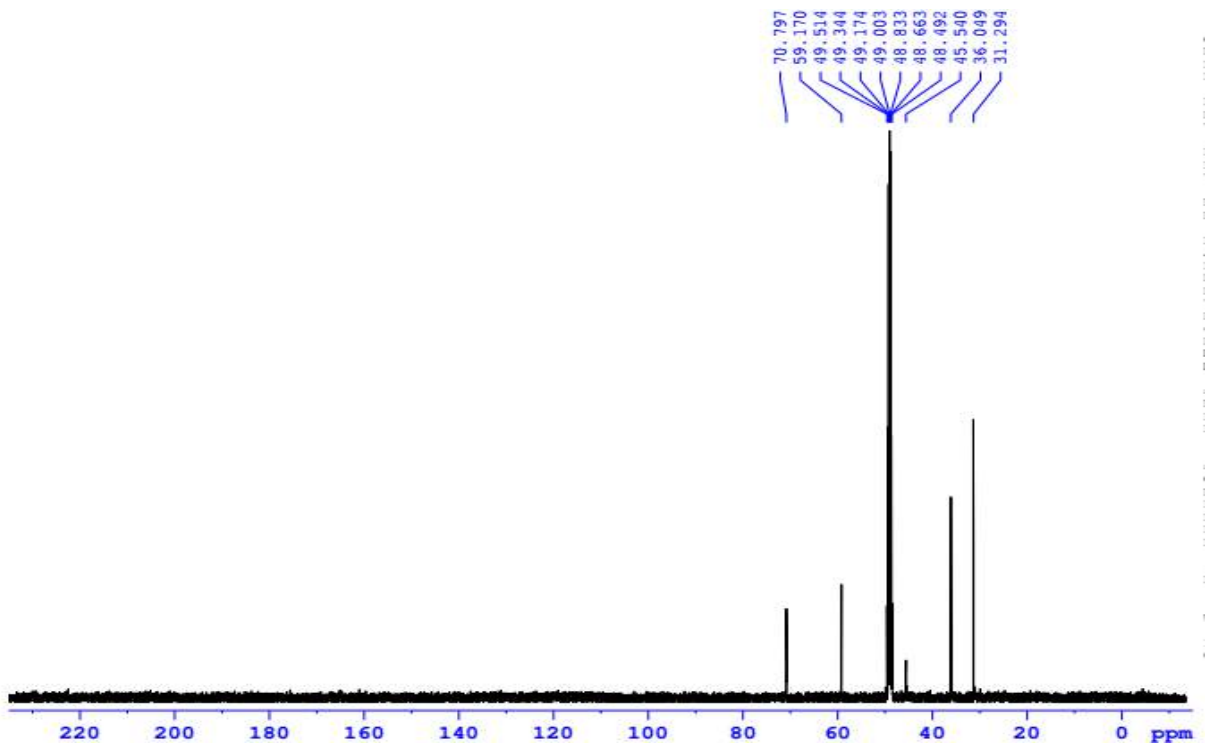
T: ITMS + c ESI Full ms [110.00-1000.00]



13. Phụ lục phổ hợp chất WC5

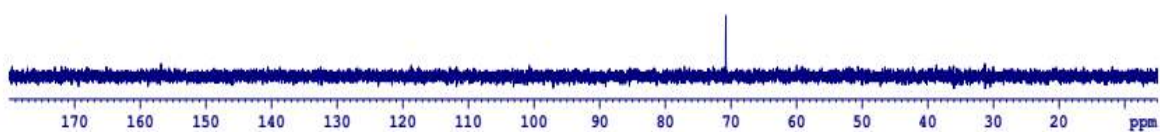
Rengyol

- CTPT $C_8H_{16}O_3$
- KLPT $M = 160$
- Phổ 1H NMR
- Phổ ^{13}C NMR
- Phổ DEPT

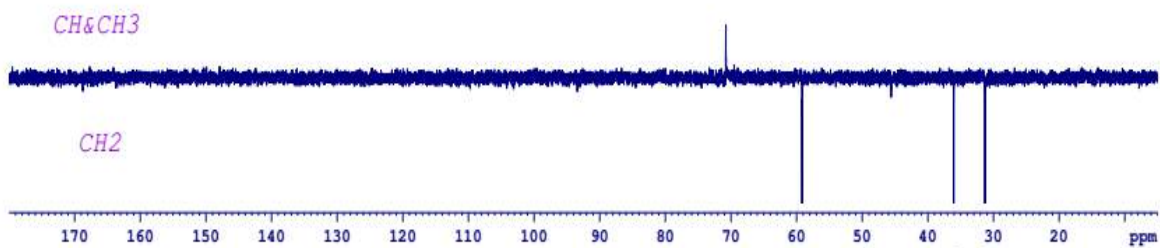
13.1. Phổ ^1H NMR của hợp chất **WC5**13.2. Phổ ^{13}C NMR của hợp chất **WC5**

13.3. Phổ DEPT của hợp chất WC5

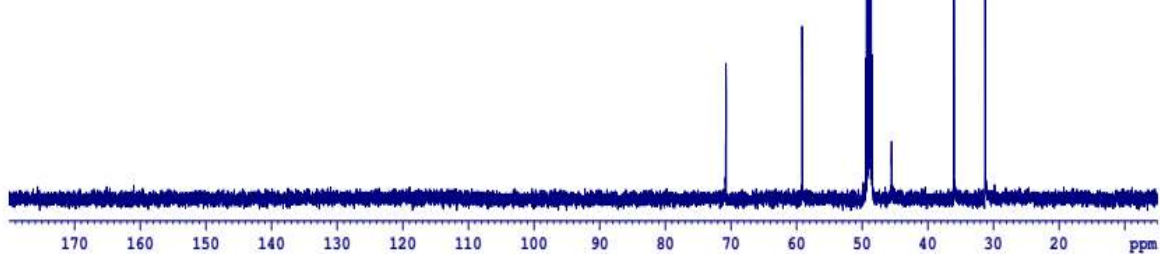
DEPT90



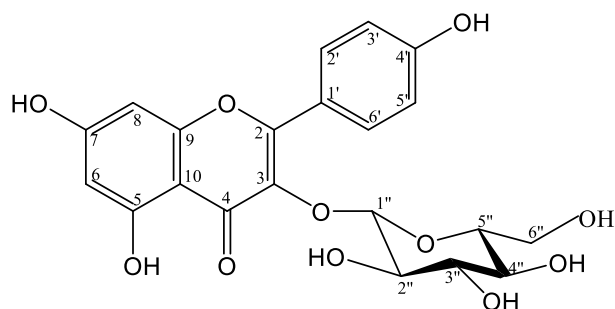
DEPT135



C13CPD

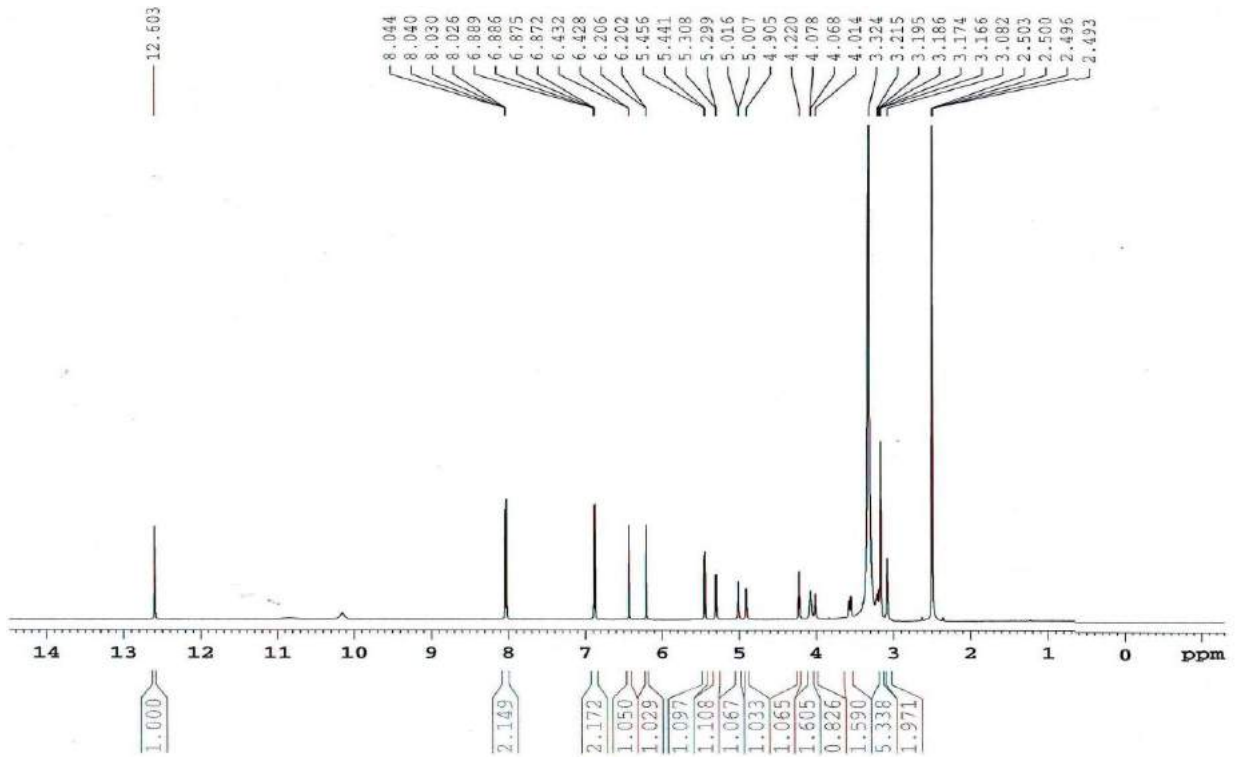
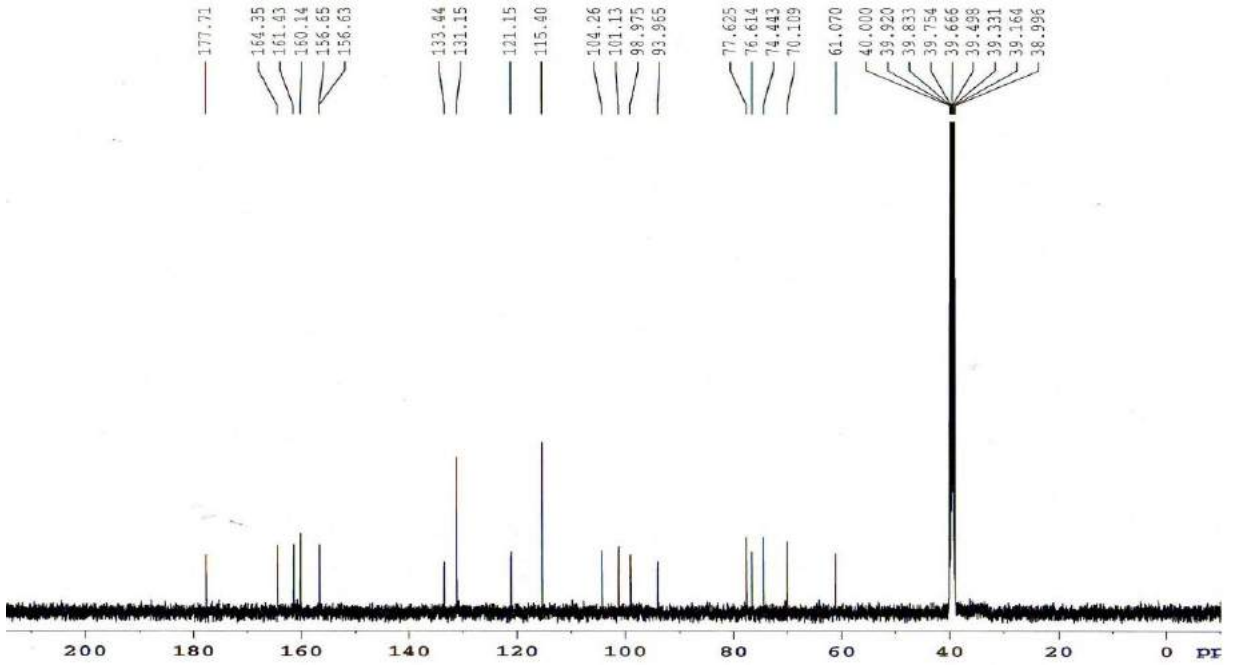


14. Phụ lục phổ của hợp chất WC6

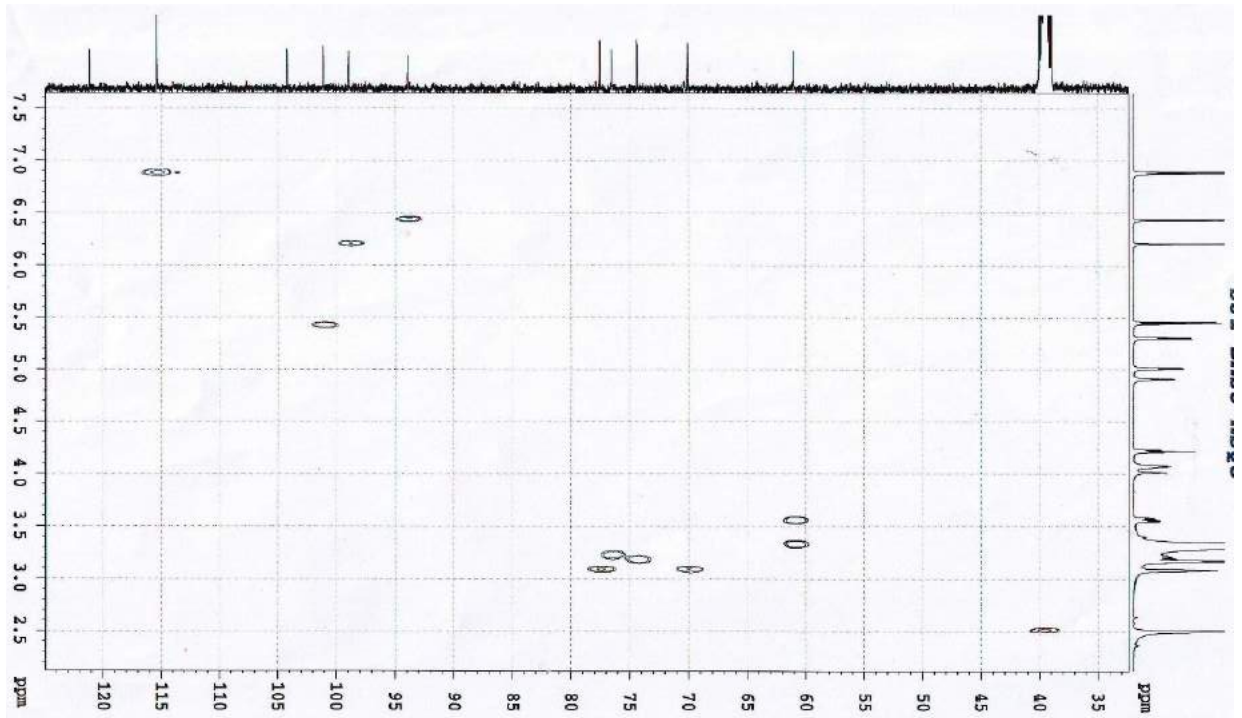


Kaempferol-3-*O*-D-glucoside

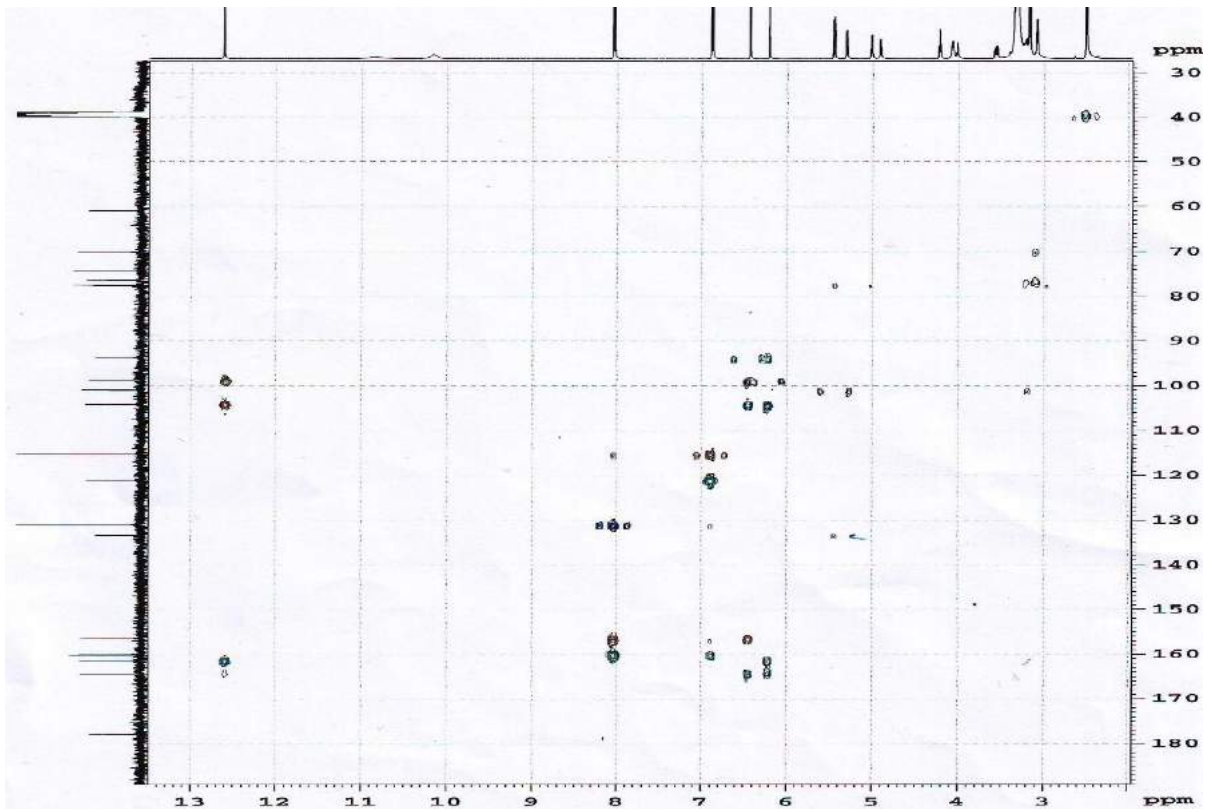
- CTPT $C_{21}H_{20}O_{11}$
- KLPT $M=448$
- Phổ 1H NMR
- Phổ ^{13}C NMR
- Phổ HSQC
- Phổ HMBC

14.1. Phổ ^1H NMR của hợp chất **WC6**14.2. Phổ ^{13}C NMR của hợp chất **WC6**

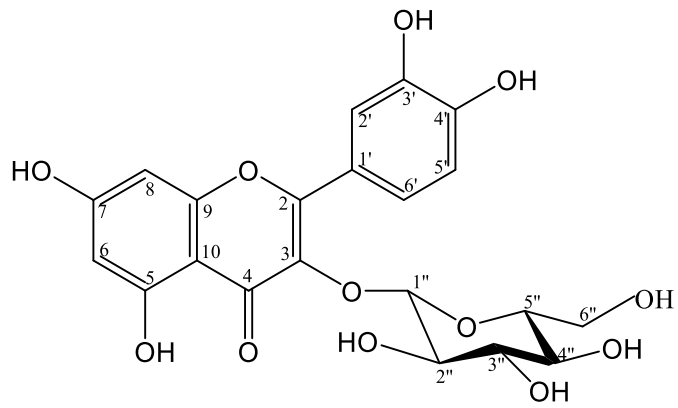
14.3. Phổ HSQC của hợp chất WC6



14.4. Phổ HMBC của hợp chất WC6

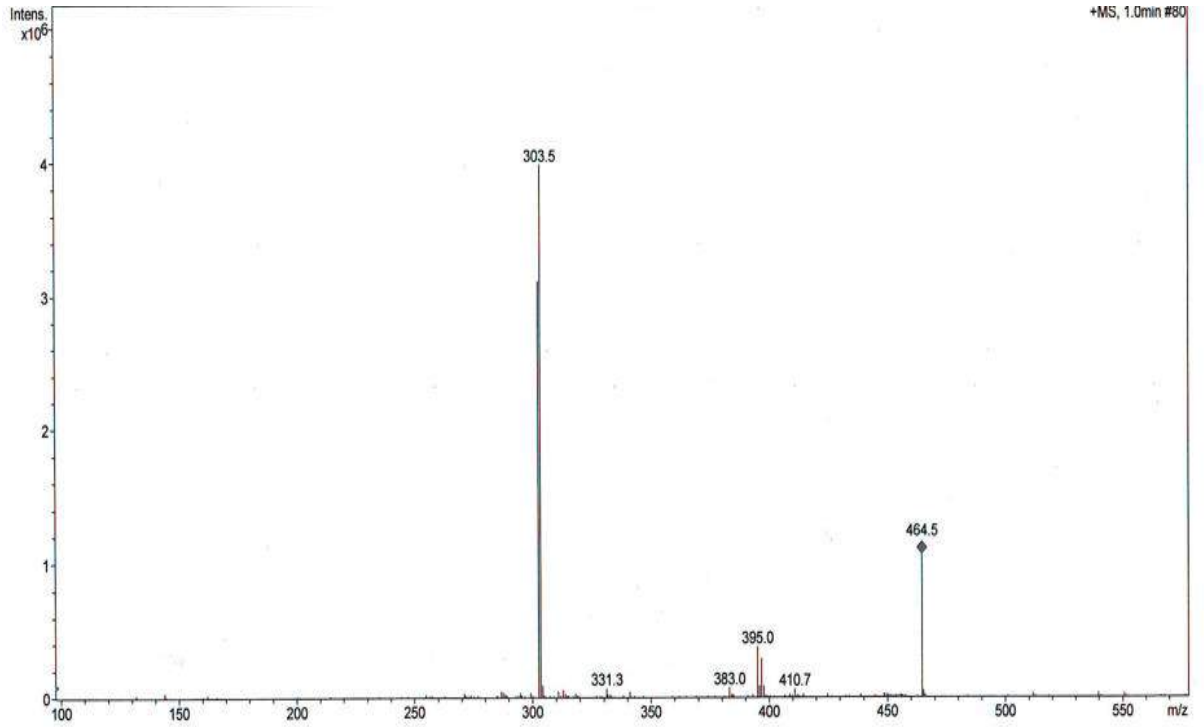
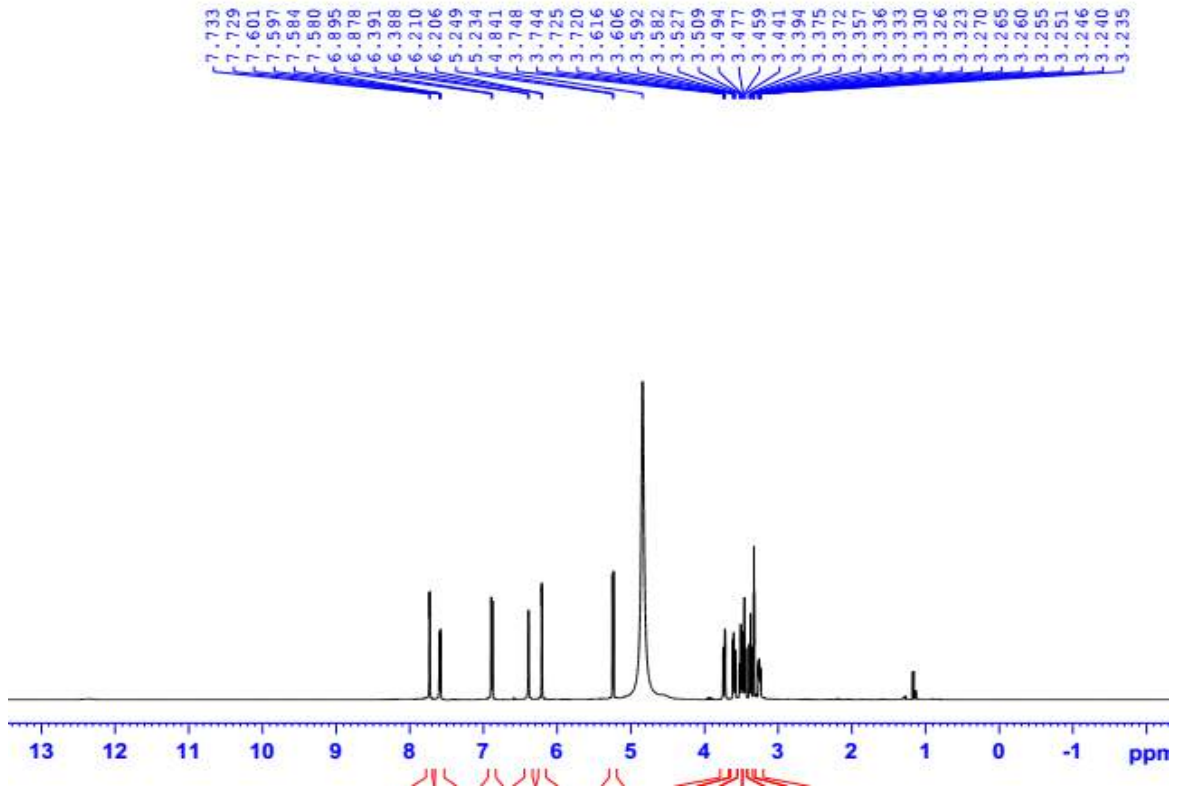


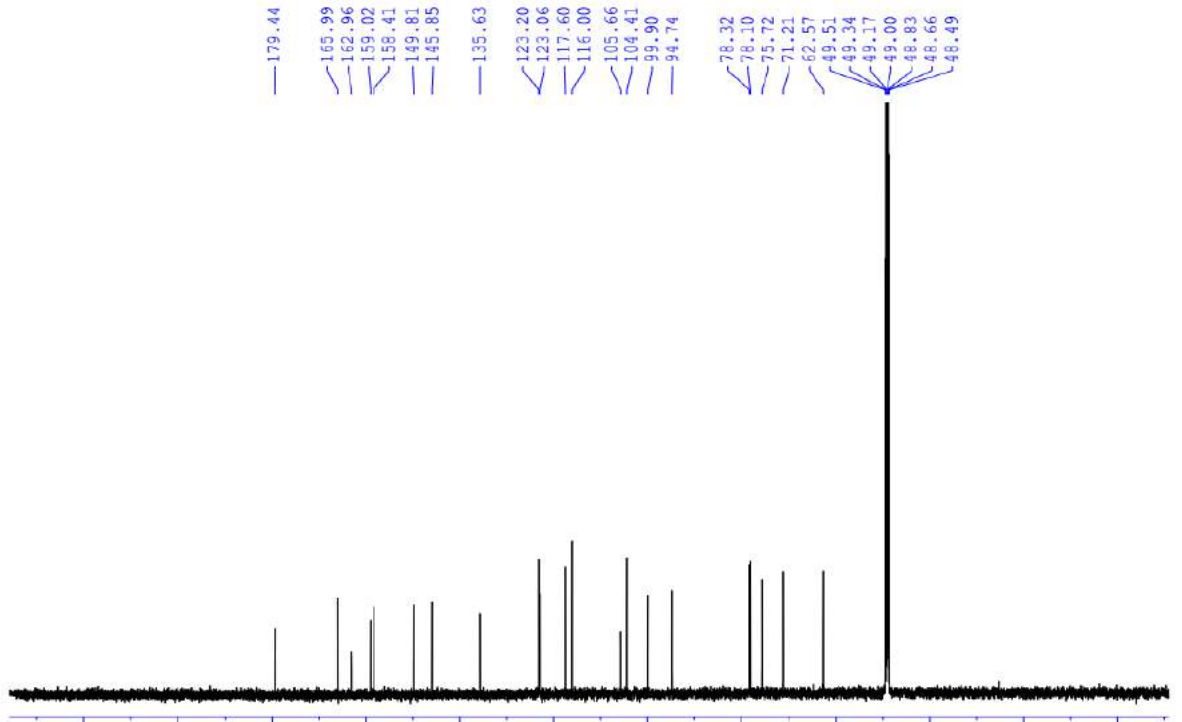
15. Phụ lục phổ hợp chất WC7



Quercetin-3-*O*- β -D- glucoside

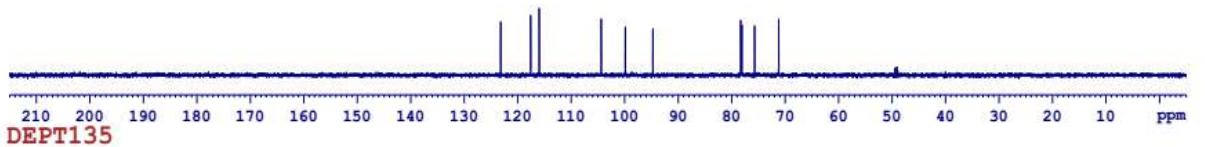
- CTPT $C_{21}H_{19}O_{12}$
- KLPT $M = 463$
- Phổ ESI-MS
- Phổ 1H NMR
- Phổ ^{13}C NMR
- Phổ DEPT

15.1. Phổ Khối lượng phân tử ESI-MS của hợp chất **WC7**15.2. Phổ ¹H NMR của hợp chất **WC7**

15.3. Phổ ^{13}C NMR của hợp chất WC7

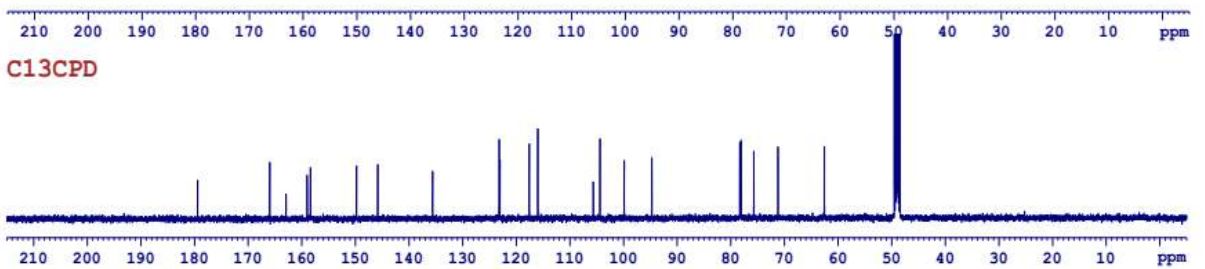
15.4. Phổ DEPT của hợp chất WC7

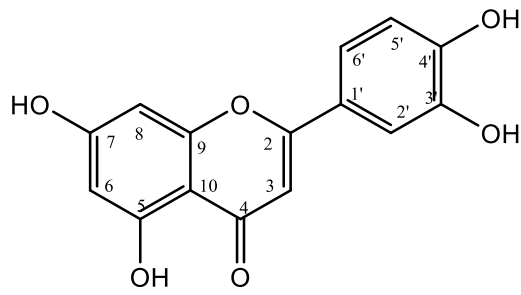
DEPT90



CH&CH3

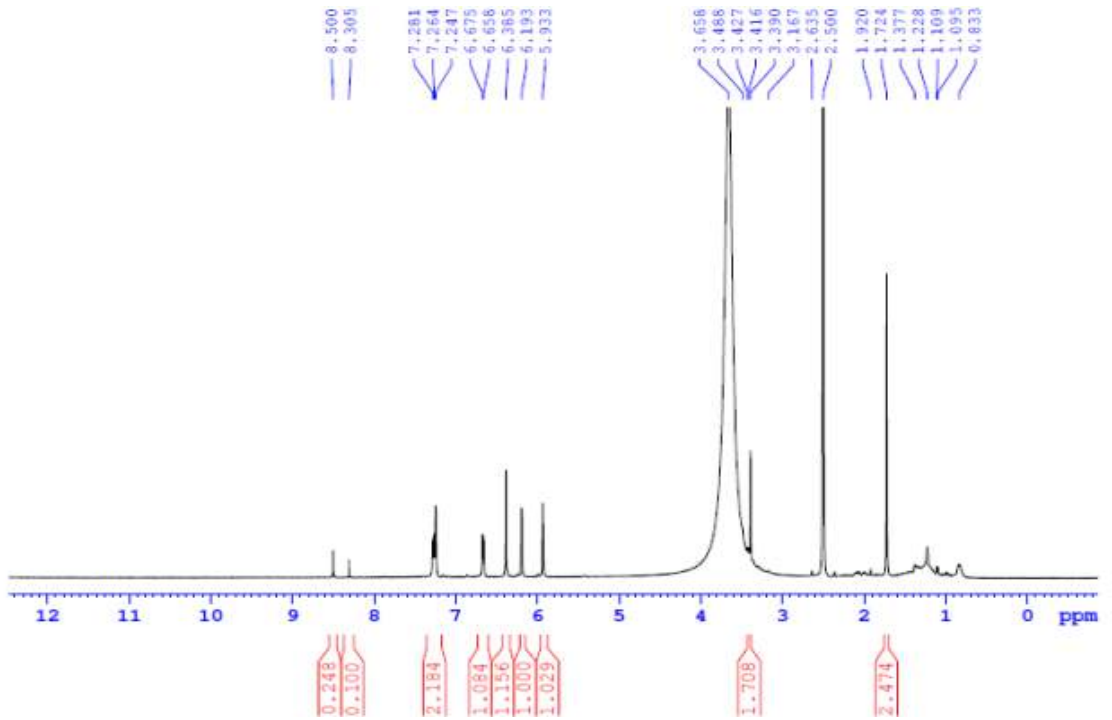
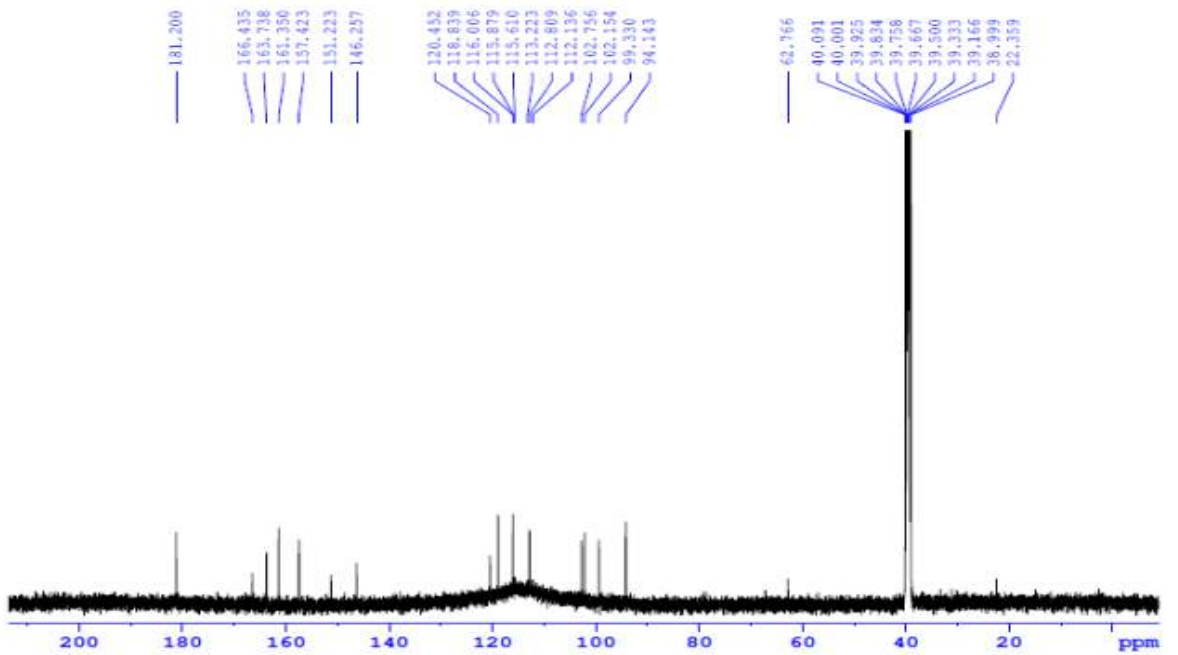
CH2



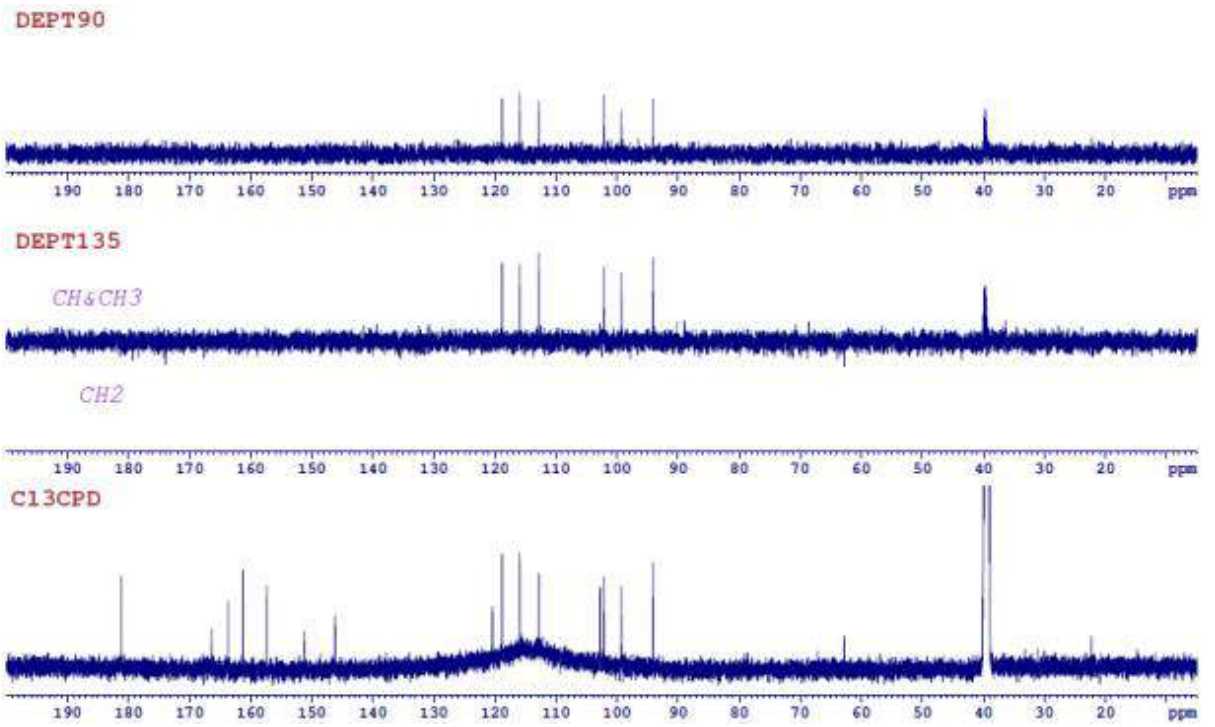
16. Phụ lục phổ hợp chất WC8

Luteolin

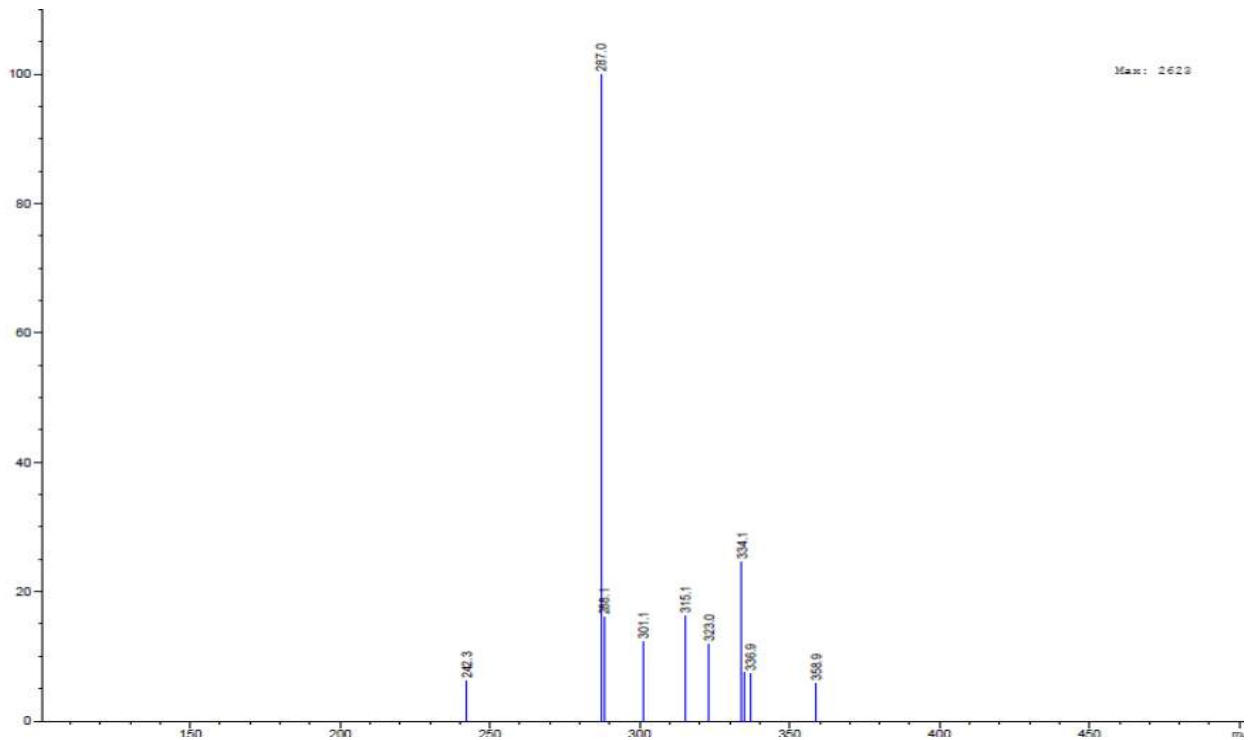
- CTPT $C_{15}H_{10}O_6$
- KLPT $M = 286$
- Phổ 1H NMR
- Phổ ^{13}C NMR
- Phổ DEPT
- Phổ MS

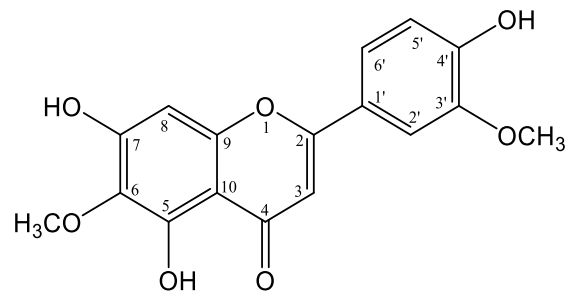
16.1. Phổ ^1H NMR của hợp chất WC816.2. Phổ ^{13}C NMR của hợp chất WC8

16.3. Phổ DEPT của hợp chất WC8



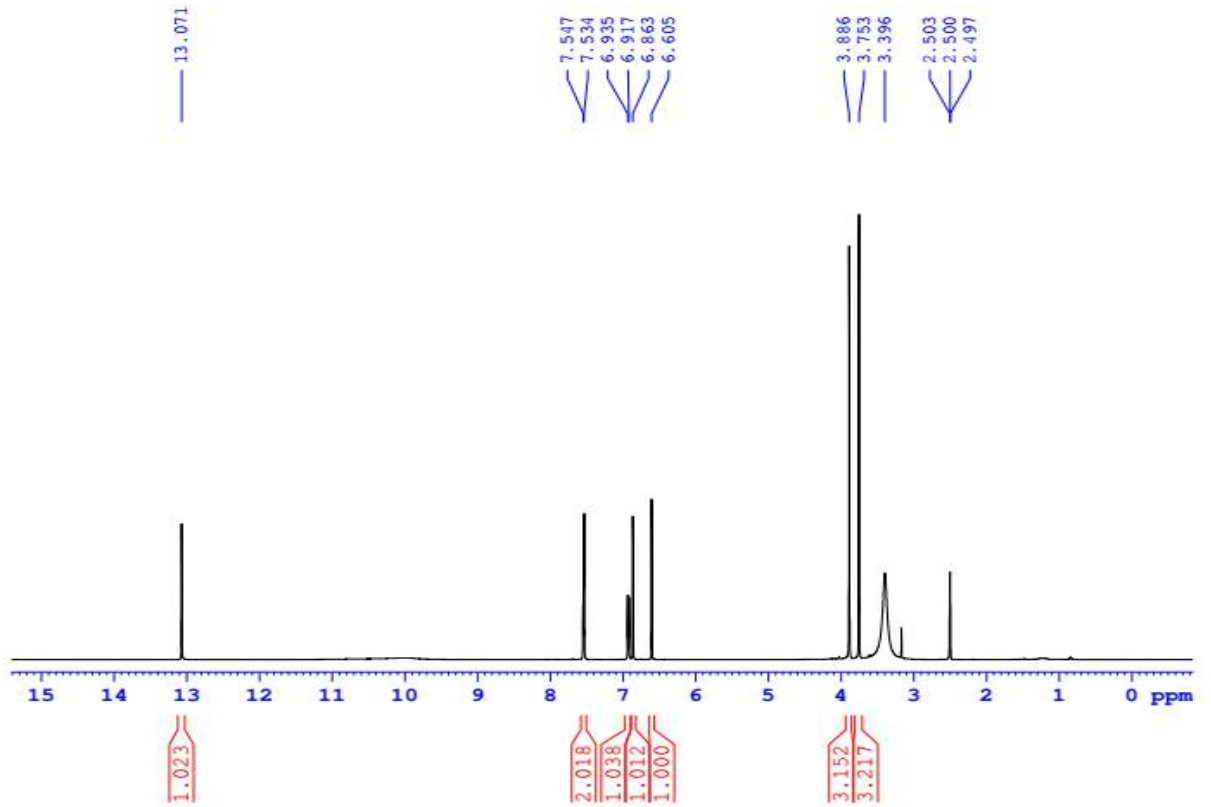
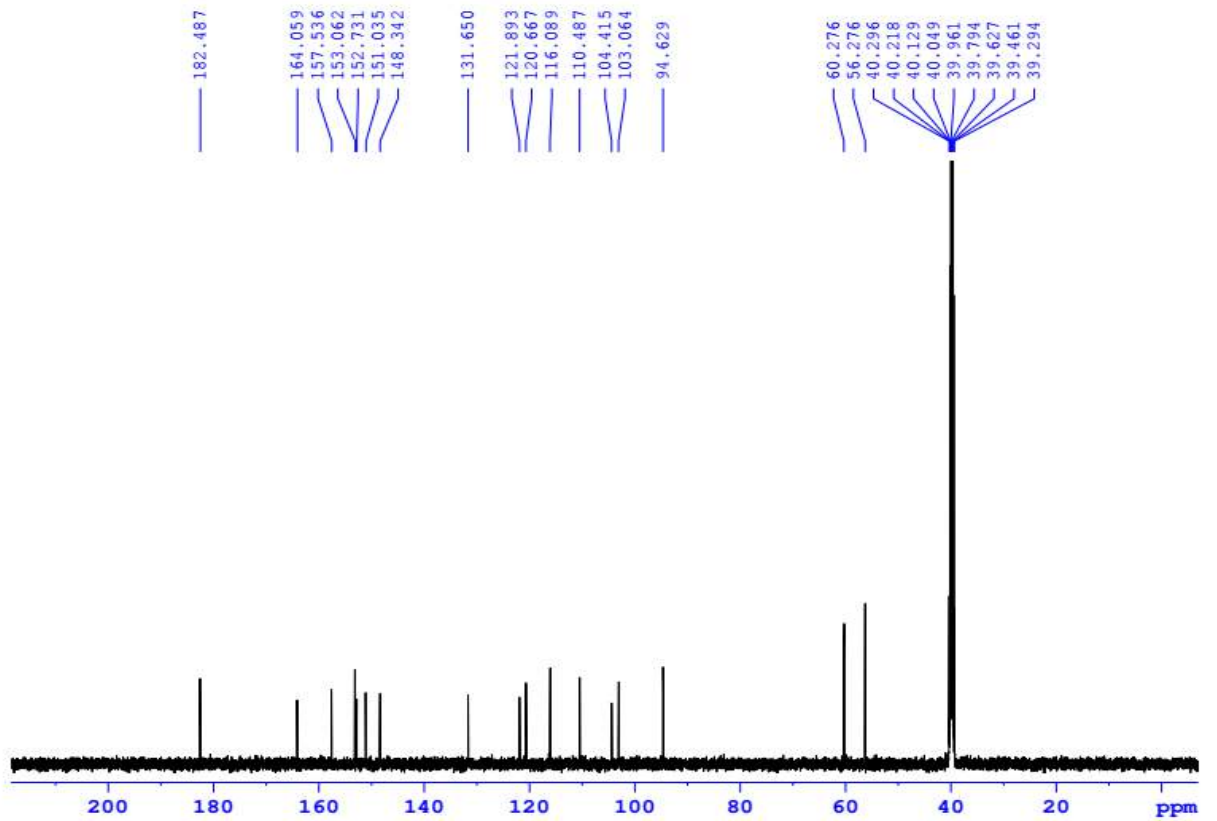
16.4. Phổ MS của hợp chất WC8



17. Phụ lục phổ hợp chất WC9.

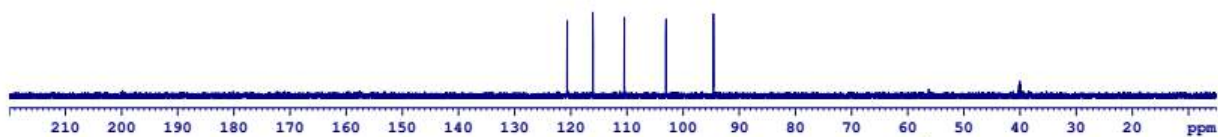
Jaceosidin

- CTPT là $C_{17}H_{14}O_7$
- KLPT $M = 330$
- Phổ 1H NMR
- Phổ ^{13}C NMR
- Phổ DEPT
- Phổ ESI-MS

17.1. Phổ ^1H NMR của hợp chất **WC9**17.2. Phổ ^{13}C NMR của hợp chất **WC9**

17.3. Phổ DEPT của hợp chất WC9

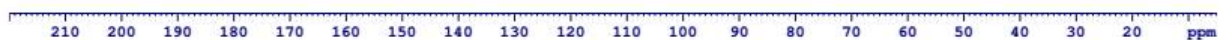
DEPT90



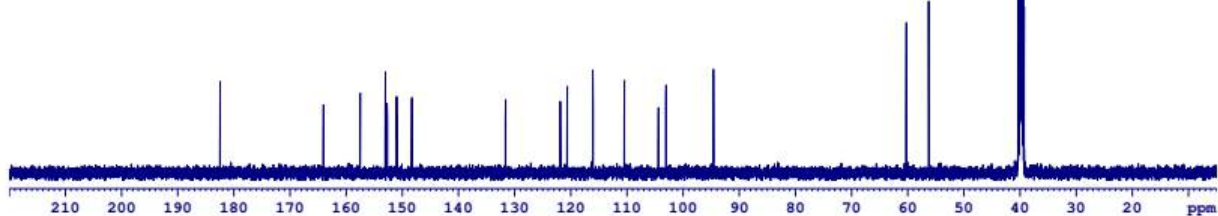
DEPT135



CH2

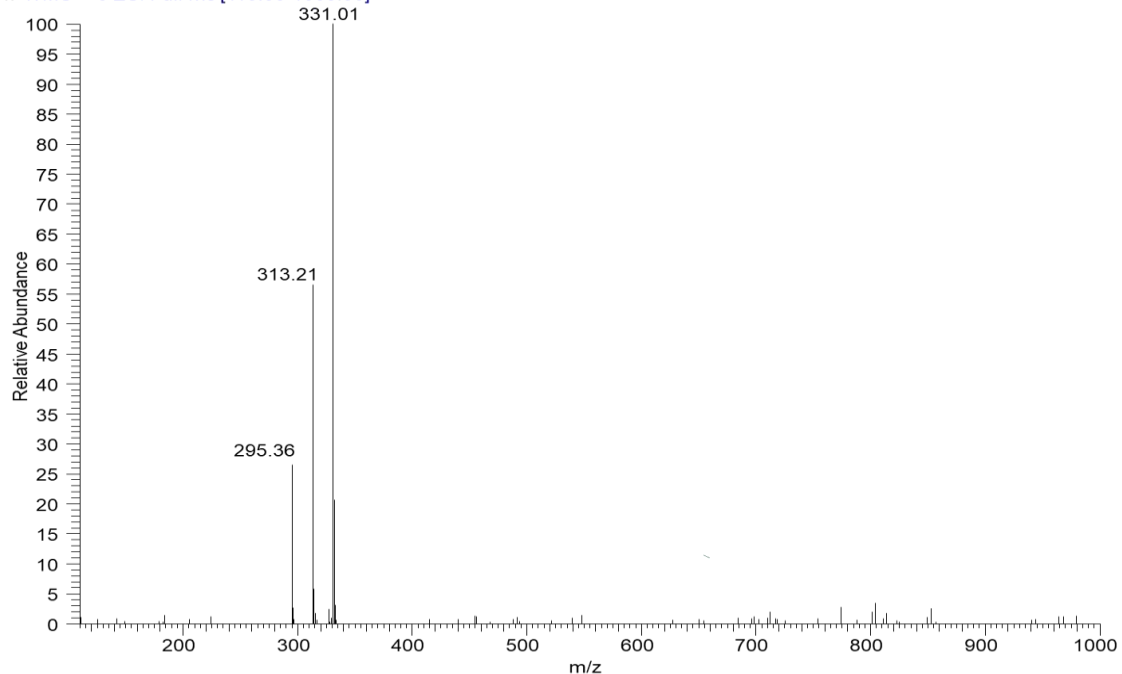


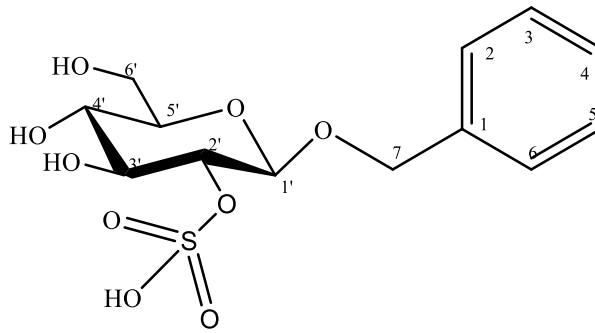
C13CPD



17.4. Phổ ESI-MS của WC9

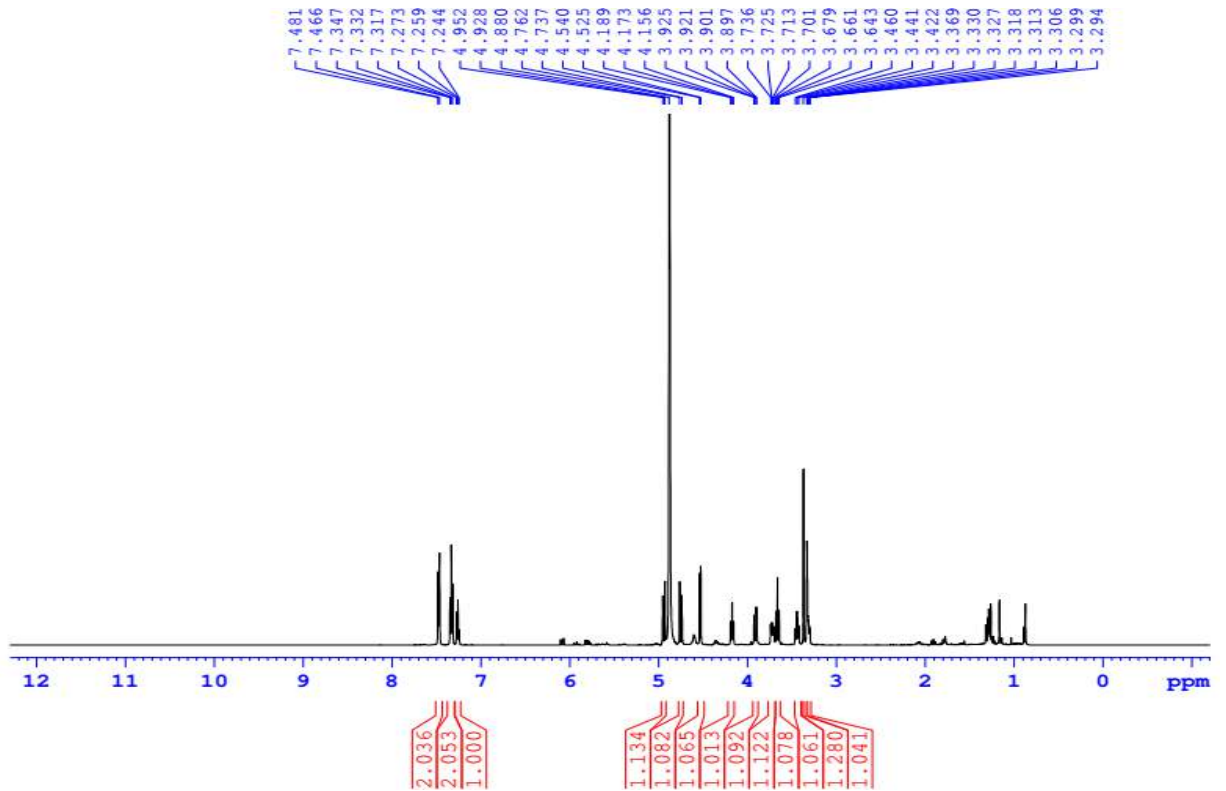
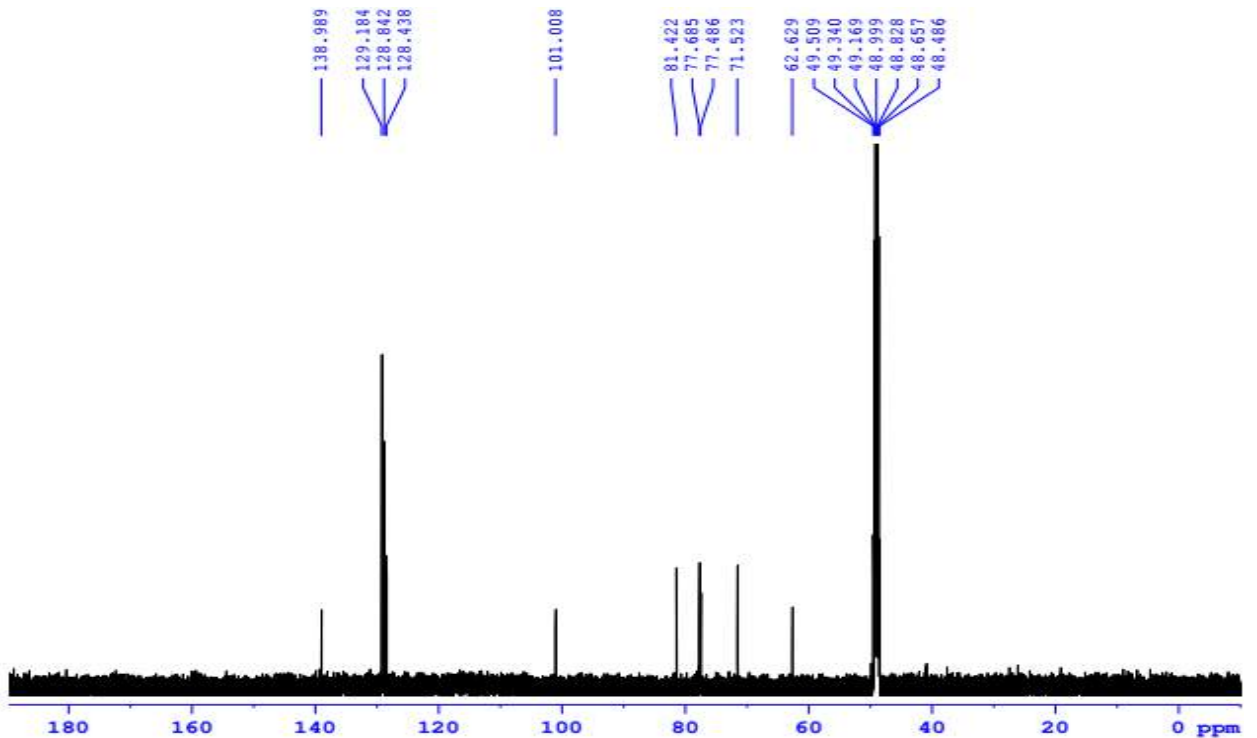
T: ITMS + c ESI Full ms [110.00-1000.00]

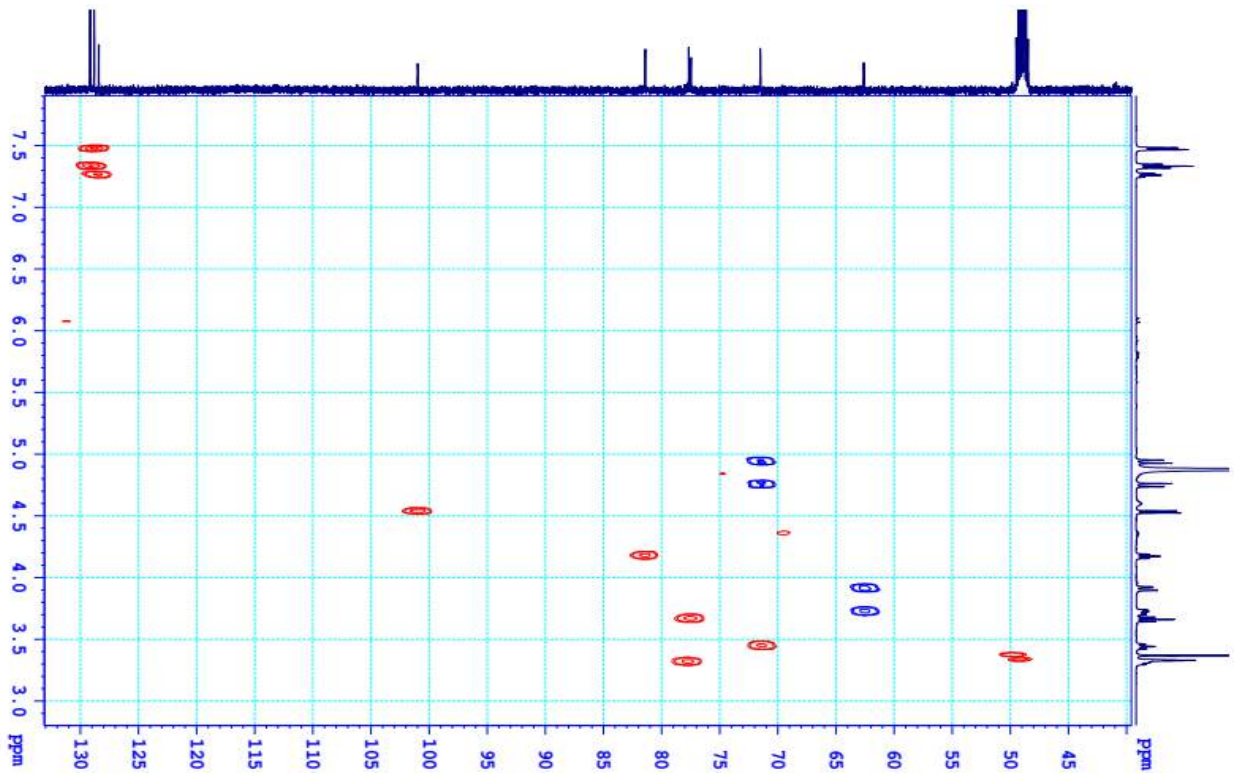
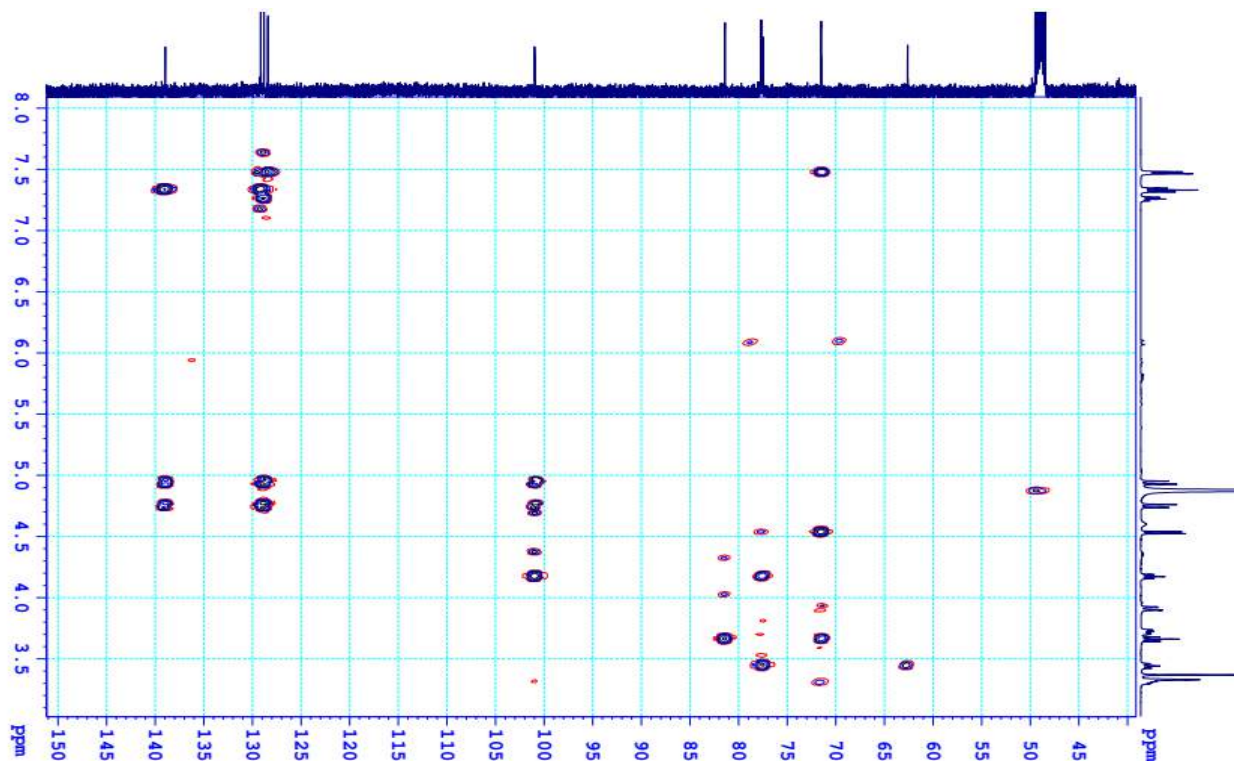


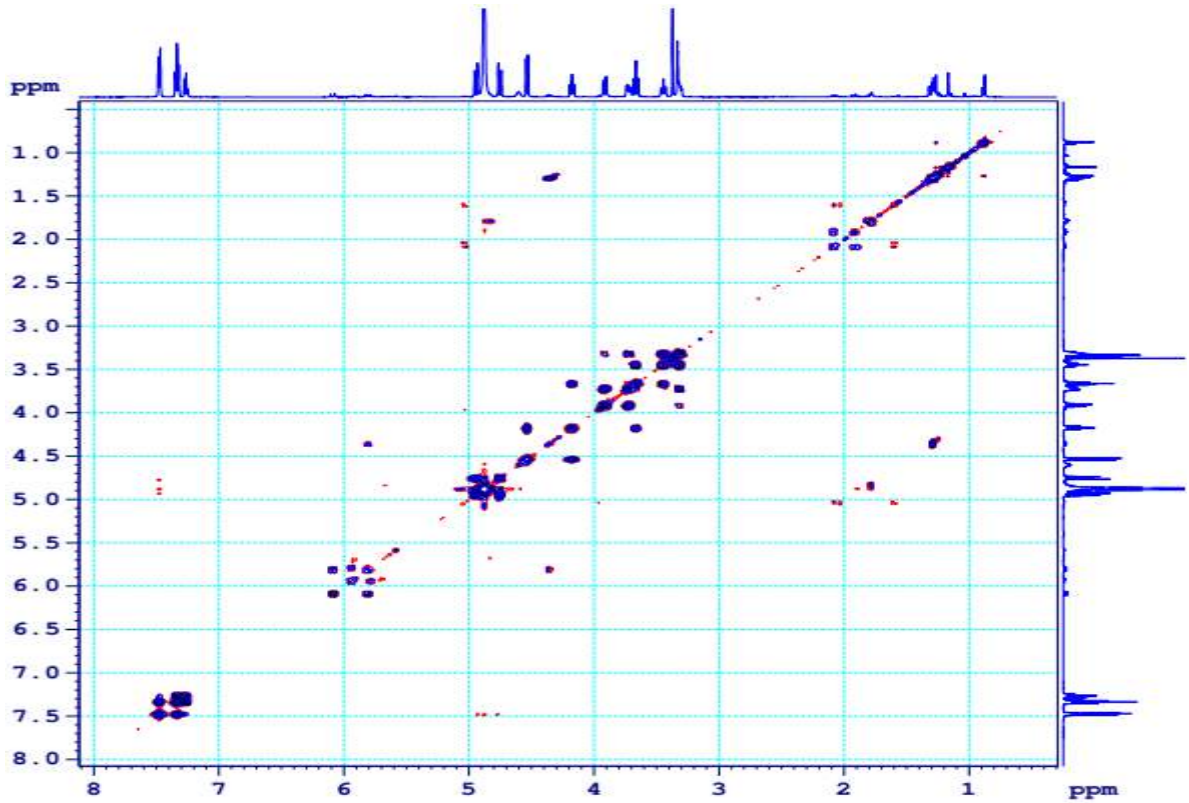
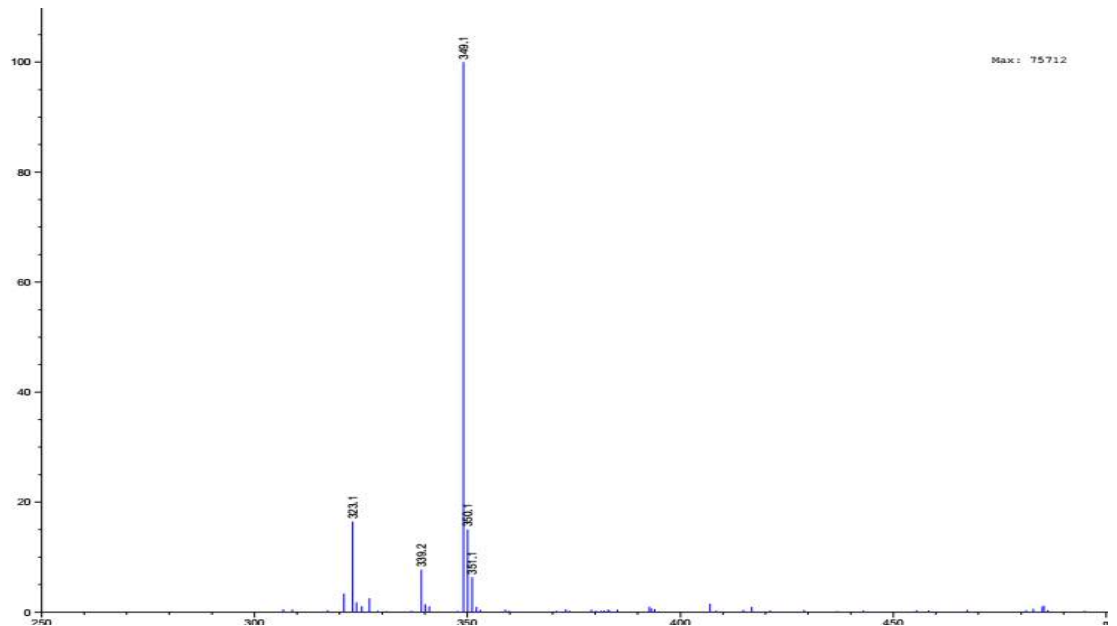
18. Phụ lục phổ hợp chất WC10

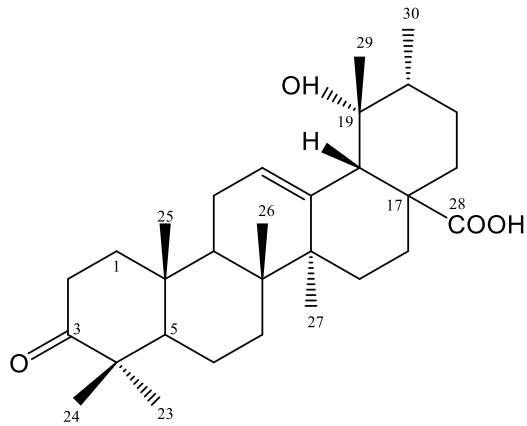
Savadoside

- CTPT: $C_{13}H_{18}O_9S$
- KLPT $M = 350$
- Phổ 1H NMR
- Phổ ^{13}C NMR
- Phổ HSQC
- Phổ HMBC
- Phổ COSY
- Phổ MS

18.1. Phổ ^1H NMR của hợp chất WC1018.2. Phổ ^{13}C NMR của hợp chất WC10

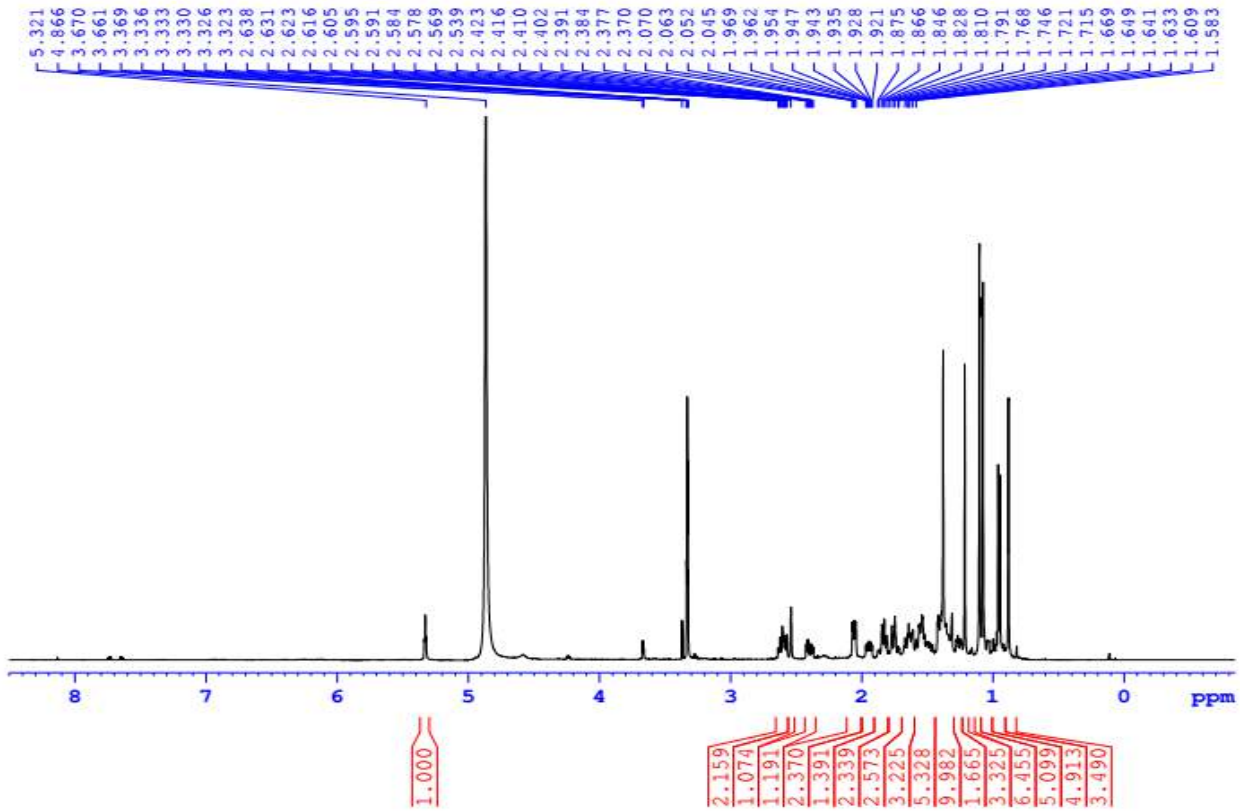
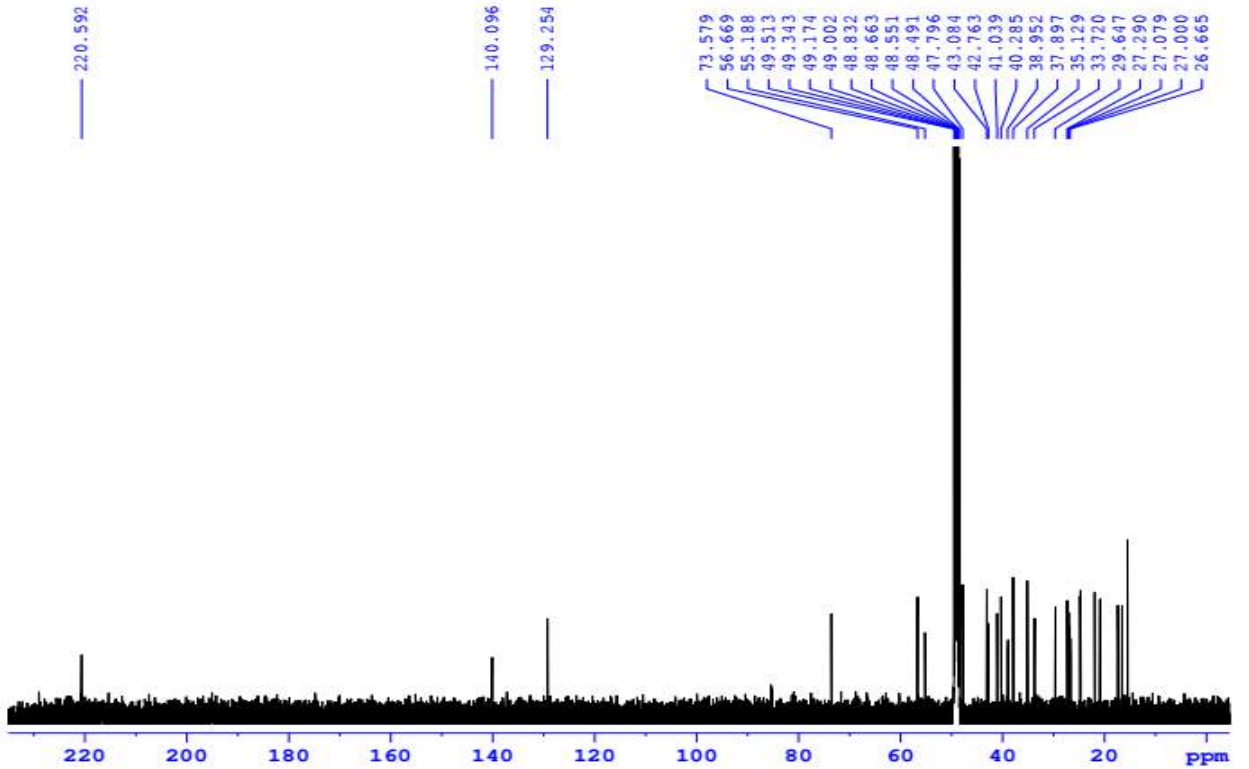
18.3. Phổ HSQC của hợp chất **WC10**18.4. Phổ HMBC của hợp chất **WC10**

18.5. Phổ COSY của hợp chất **WC10**18.7. Phổ MS của hợp chất **WC10**

19. Phụ lục phổ hợp chất WC11.

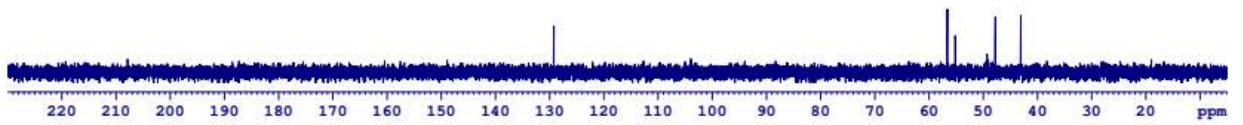
pomonic acid

- CTPT: $C_{30}H_{46}O_4$
- KLPT: 470
- Phổ 1H MNR
- Phổ ^{13}C NMR
- Phổ DEPT
- Phổ HSQC
- Phổ HMBC
- Phổ NOESY
- Phổ ESI-MS

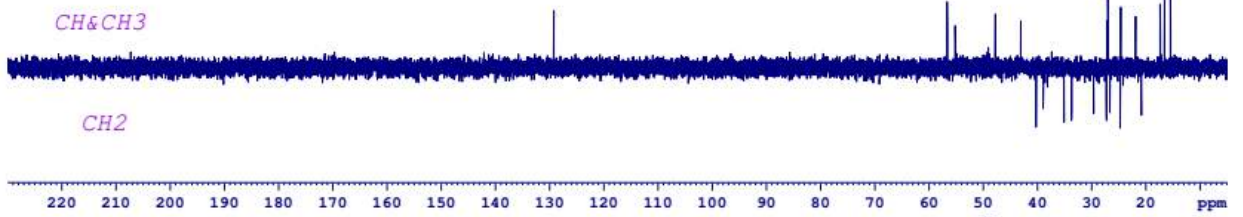
19.1. Phổ ^1H MNR của hợp chất WC1119.2. Phổ ^{13}C NMR của hợp chất WC11

19.3. Phổ DEPT của hợp chất WC11

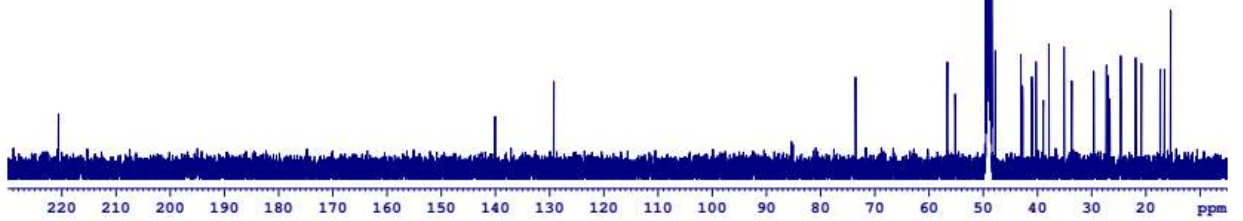
DEPT90



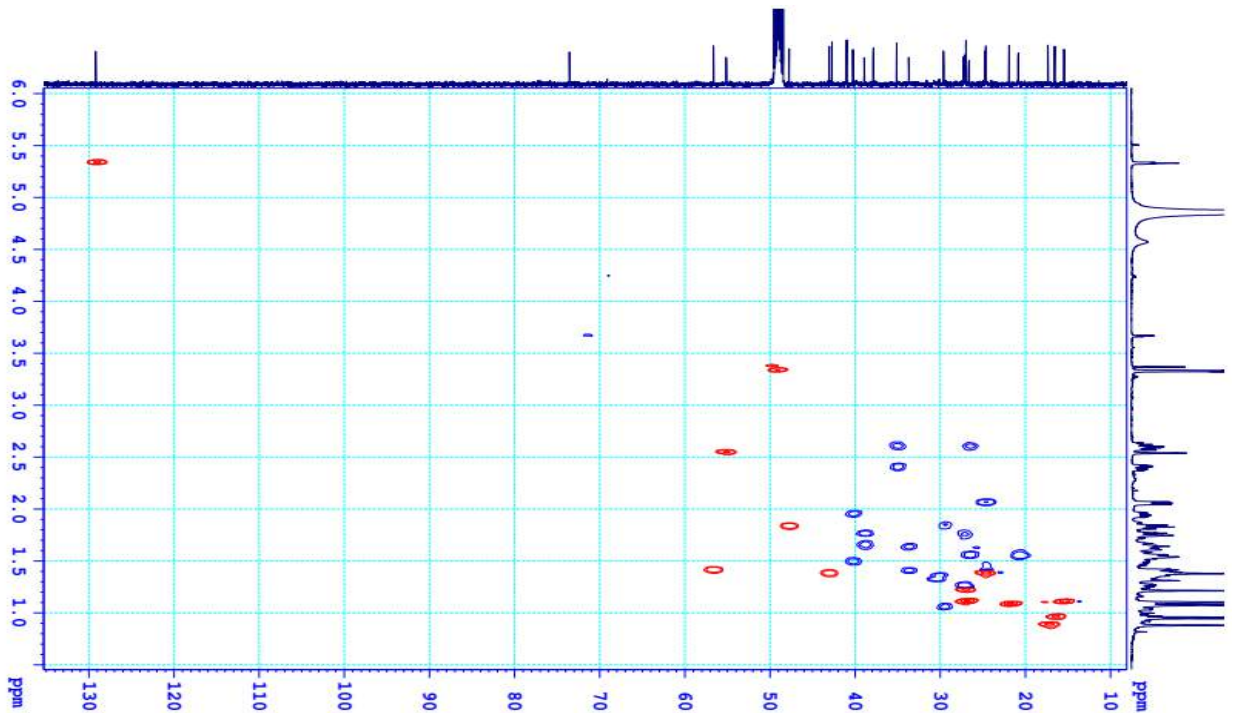
DEPT135



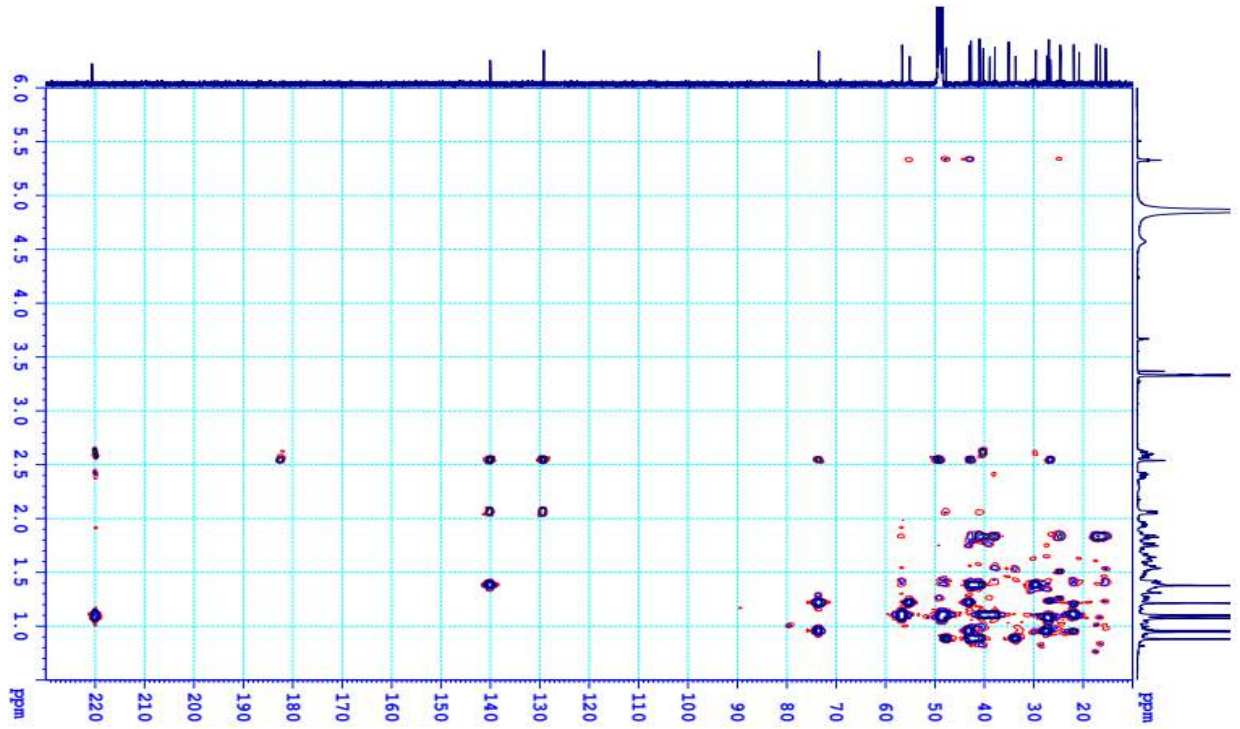
C13CPD



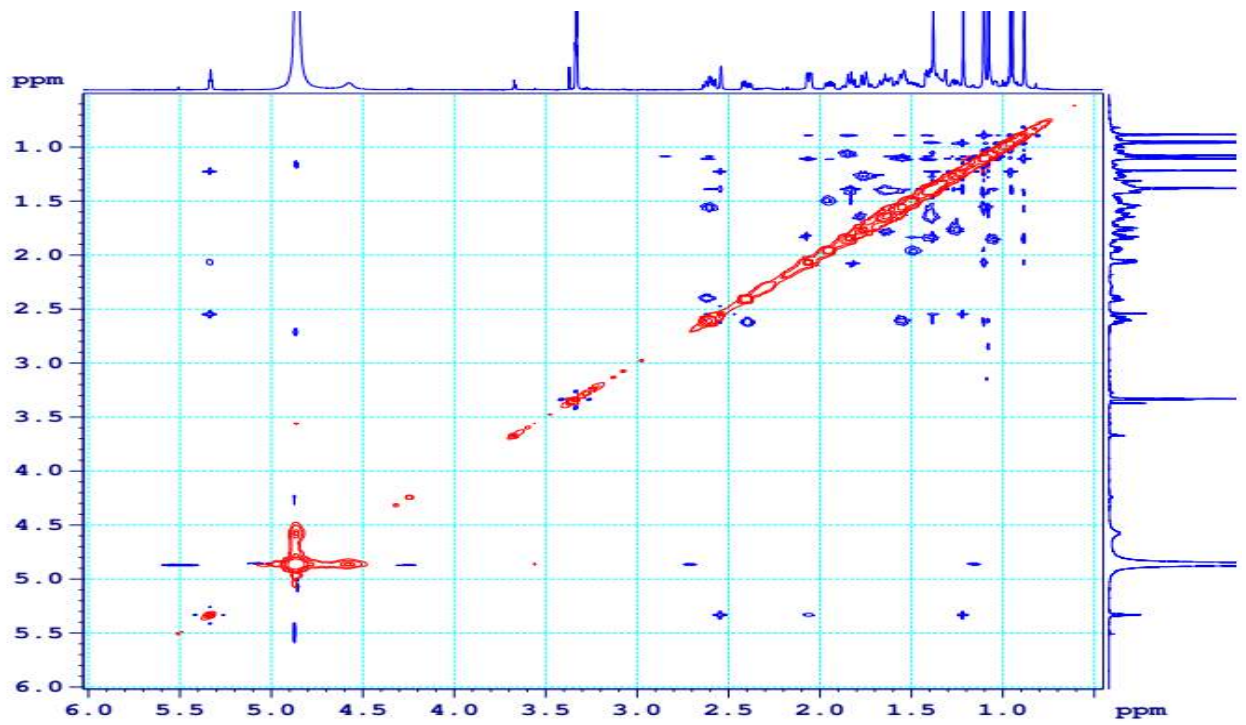
19.4. Phổ HSQC của hợp chất WC11



19.5. Phổ HMBC của hợp chất WC11

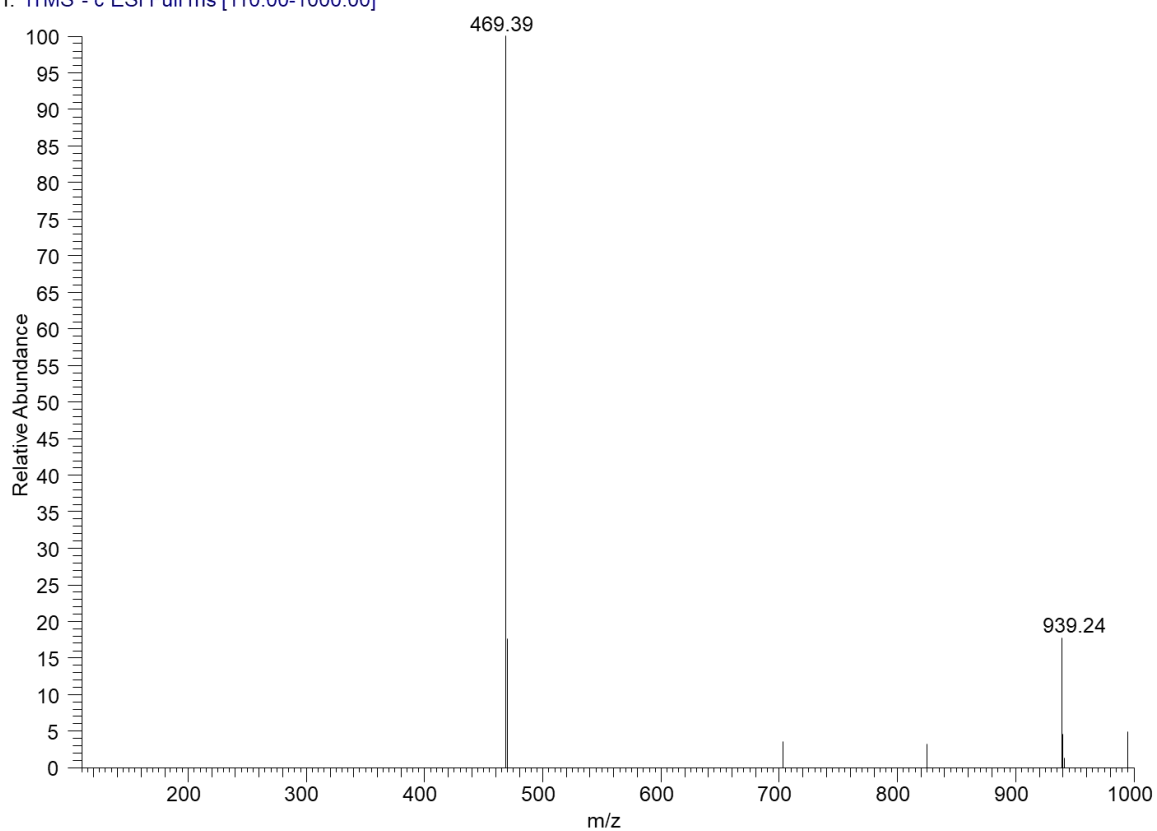


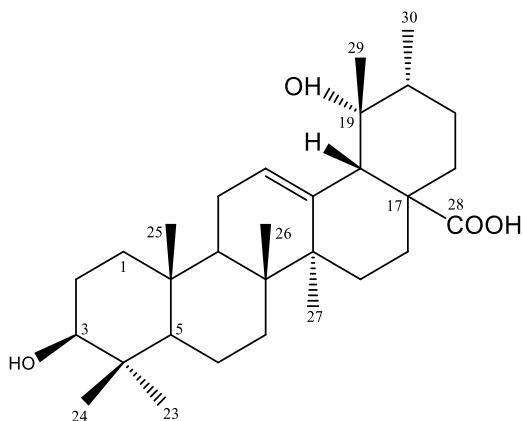
19.6. Phổ NOESY của hợp chất WC11



19.7. Phổ ESI-MS của WC11

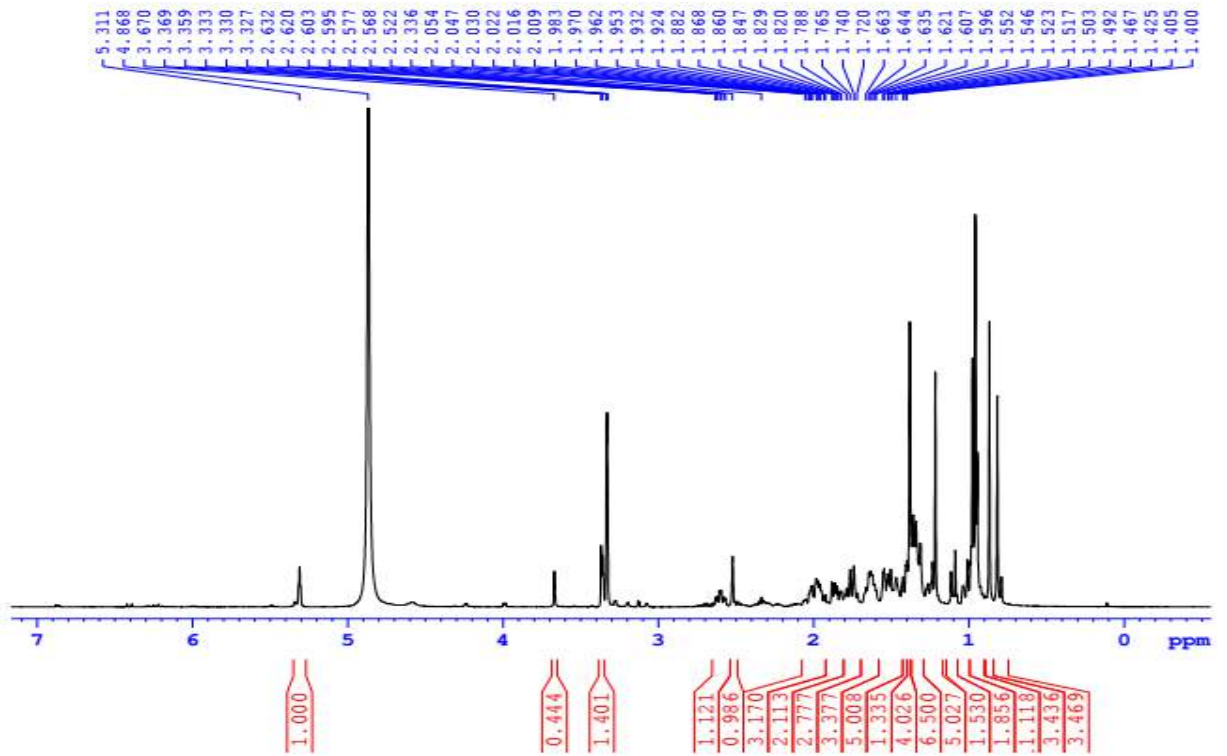
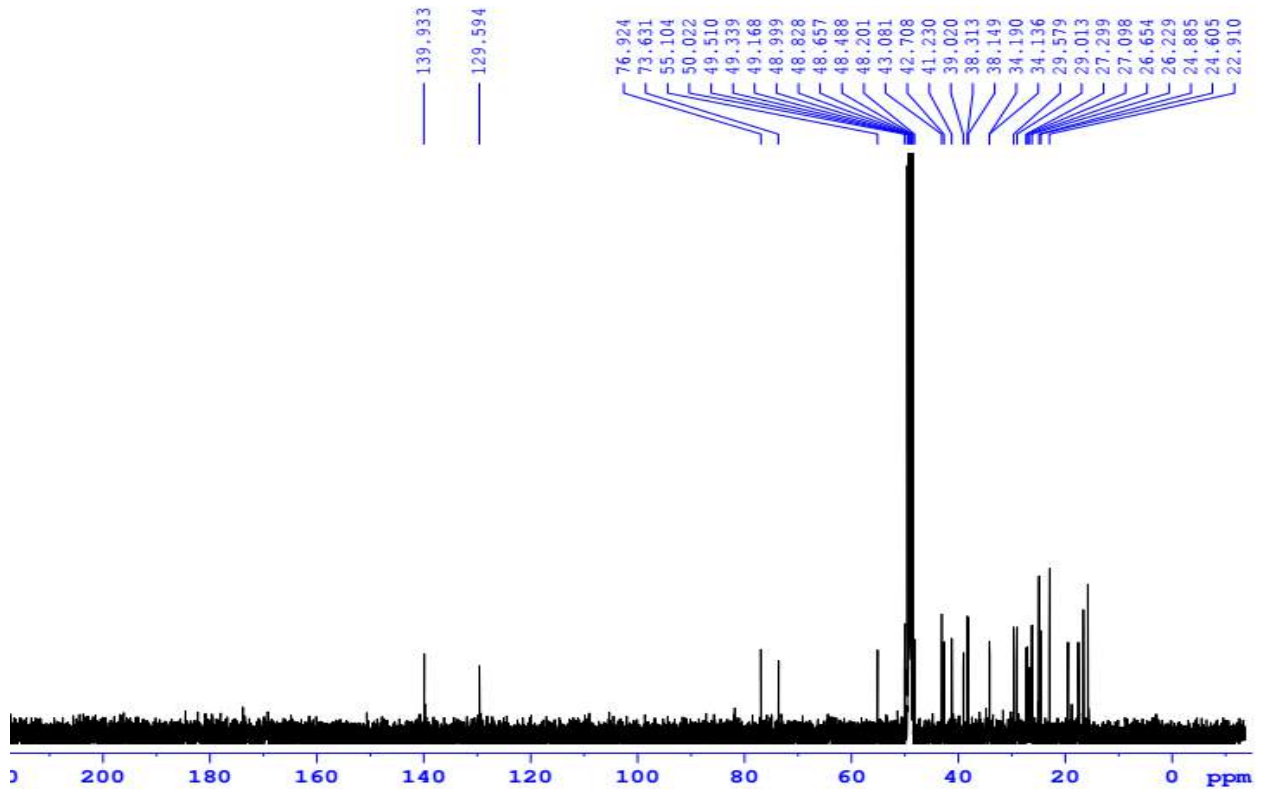
T: ITMS - c ESI Full ms [110.00-1000.00]



20. Phụ lục phổ hợp chất WC12.

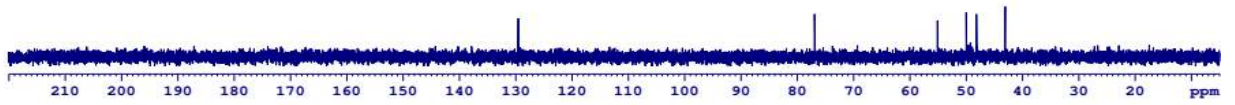
Pubescenolic acid

- CTPT $C_{30}H_{48}O_4$
- KLPT $M = 472$
- Phổ 1H NMR
- Phổ ^{13}C NMR
- Phổ DEPT
- Phổ HSQC
- Phổ HMBC
- Phổ COSY
- Phổ NOESY

20.1. Phổ ^1H NMR của hợp chất WC1220.2. Phổ ^{13}C NMR của hợp chất WC12

20.3. Phổ DEPT của hợp chất WC12

DEPT90



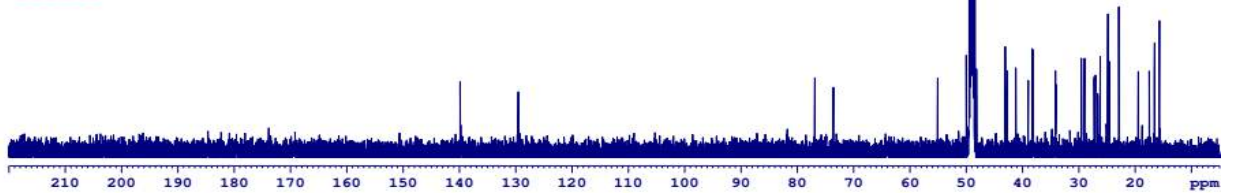
DEPT135

CH&CH3

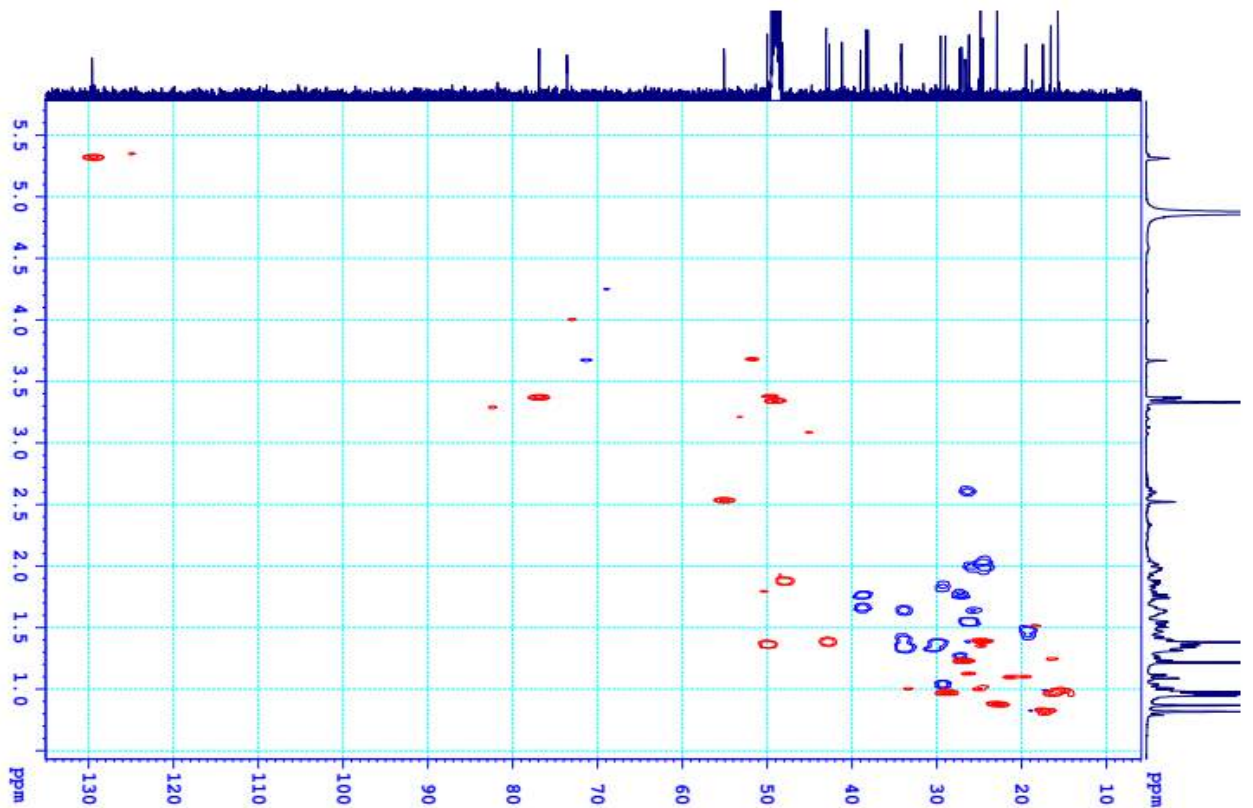


CH2

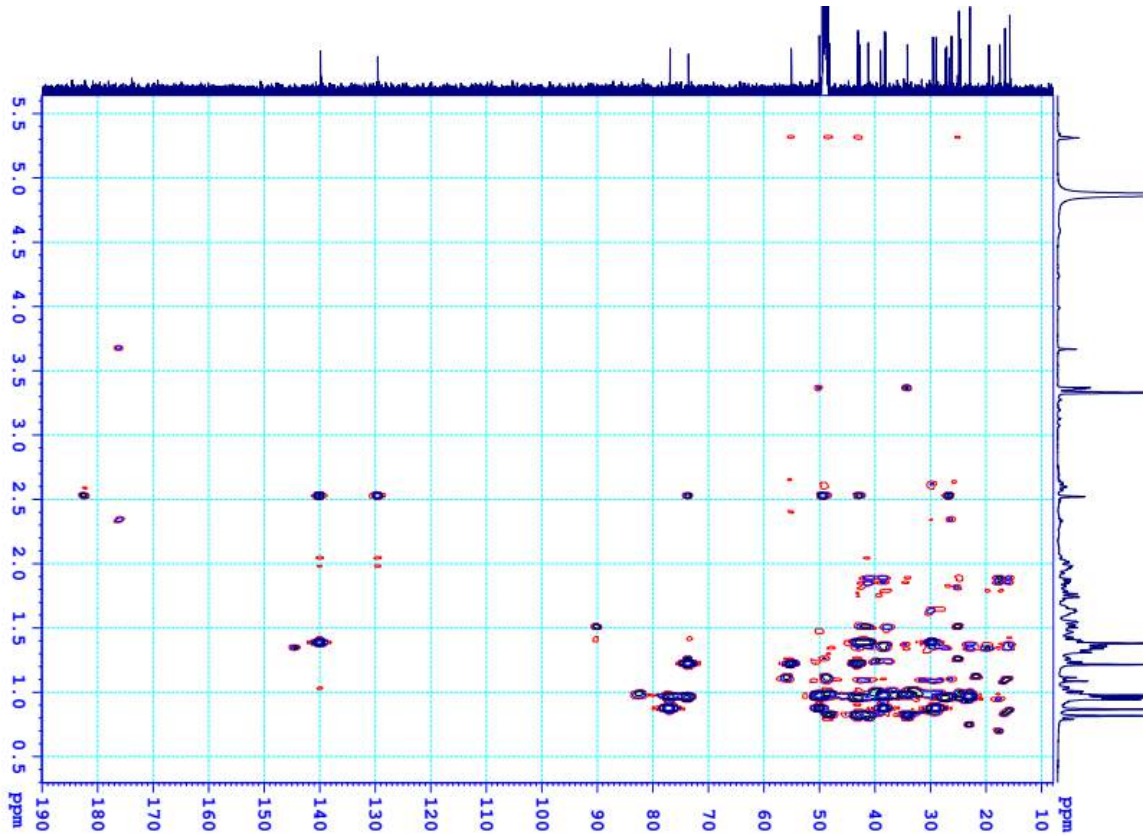
C13CPD



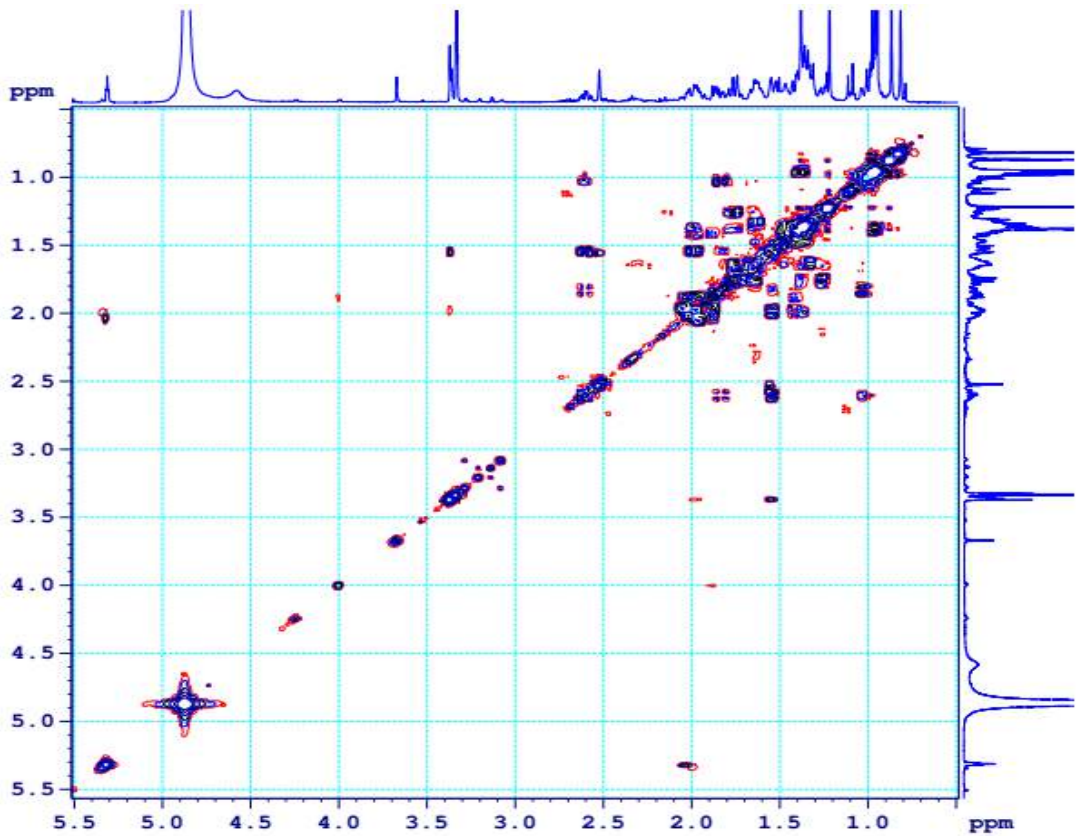
20.4. Phổ HSQC của hợp chất WC12



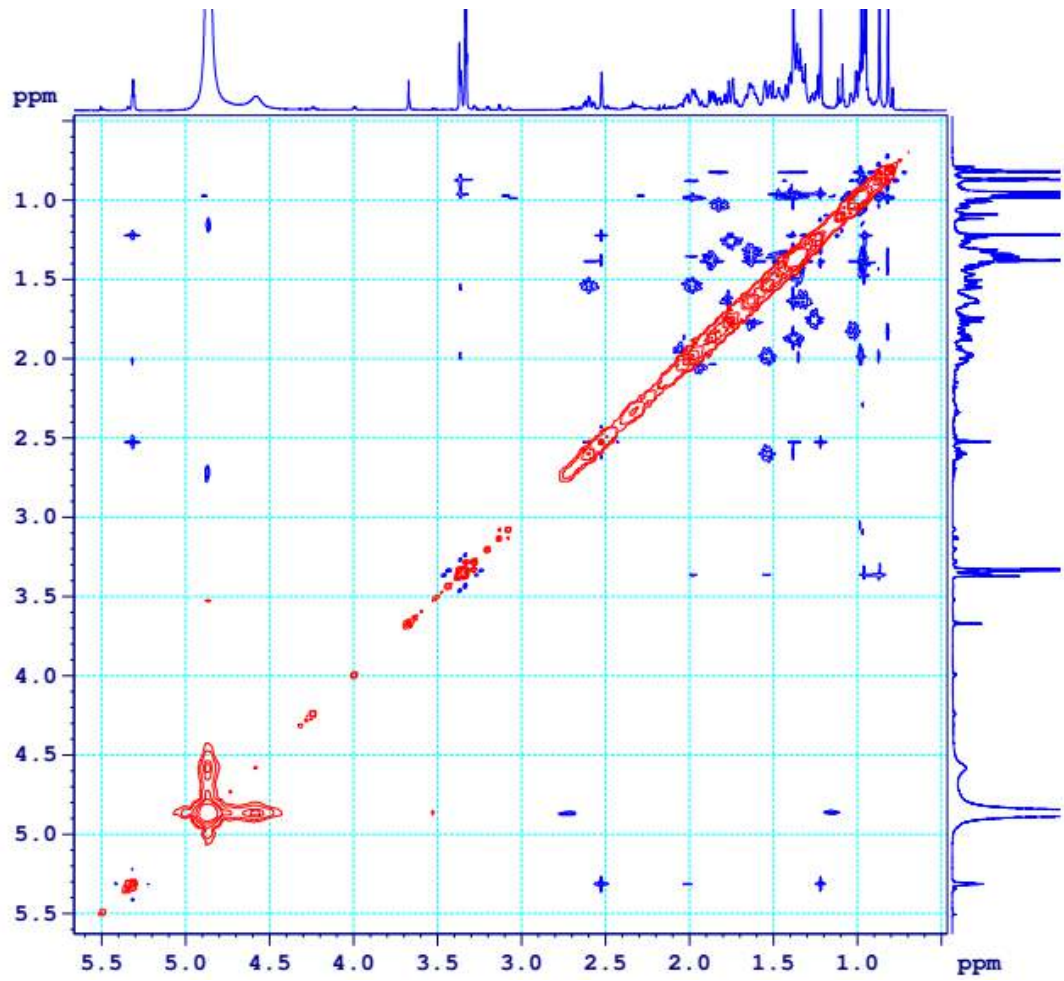
20.5. Phổ HMBC của hợp chất WC12



20.6. Phổ COSY của hợp chất WC12



20.7. Phổ NOESY của hợp chất WC12




21. Phụ lục giám định mẫu

21.1. Giám định mẫu Sài đất

<p>VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT <u>Phòng Thực vật học</u></p>	<p>CỘNG HOÀ XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM <u>Độc lập – Tự do – Hạnh phúc</u></p>		
<p>KẾT QUẢ GIÁM ĐỊNH TÊN KHOA HỌC MẪU THỰC VẬT</p>			
<p>Chúng tôi nhận được đề nghị giám định tên khoa học cho 01 mẫu tiêu bản thực vật như sau:</p>			
<p>Mẫu tiêu bản được thu tại P. Thành Công – Tp. Hà Nội, ngày thu mẫu 14/09/2017, người thu mẫu: Nguyễn Thị Luyến (số hiệu mẫu: 2016.55-W1).</p>			
<p>Mẫu mang đến giám định là mẫu tiêu bản ở dạng mẫu tươi, vừa được thu hái, chưa qua xử lý hoá chất và nhiệt độ. Mẫu tiêu bản có đủ tiêu chuẩn để định tên khoa học, bao gồm cả cơ quan sinh dưỡng (cành, lá) và cơ quan sinh sản (hoa,..). Kết quả giám định:</p>			
<p>* Mẫu mang số hiệu: 2016.55-W1</p>			
<ul style="list-style-type: none"> - Tên khoa học: <i>Sphagneticola calendulacea</i> (L.) Pruski - Tên đồng nghĩa: <i>Wedelia chinensis</i> (Osbeck) Merr. - Thuộc họ Cúc – Asteraceae - Tên Việt Nam: Sài đất, Húng trám, Ngổ núi,.... 			
<table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; width: 60%;"> <p>Xác nhận Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật TL. VIỆN TRƯỞNG PI TRƯỞNG PHÒNG QLTH</p> </td> <td style="text-align: center; vertical-align: top; width: 40%;"> <p>Hà Nội, ngày 25 tháng 12 năm 2017 Người giám định</p> </td> </tr> </table>		<p>Xác nhận Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật TL. VIỆN TRƯỞNG PI TRƯỞNG PHÒNG QLTH</p>	<p>Hà Nội, ngày 25 tháng 12 năm 2017 Người giám định</p>
<p>Xác nhận Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật TL. VIỆN TRƯỞNG PI TRƯỞNG PHÒNG QLTH</p>	<p>Hà Nội, ngày 25 tháng 12 năm 2017 Người giám định</p>		
<table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: bottom; width: 60%;">  <p><i>Cao Thị Kim Dung</i></p> </td> <td style="text-align: center; vertical-align: bottom; width: 40%;">  <p>Đỗ Văn Hải</p> </td> </tr> </table>		 <p><i>Cao Thị Kim Dung</i></p>	 <p>Đỗ Văn Hải</p>
 <p><i>Cao Thị Kim Dung</i></p>	 <p>Đỗ Văn Hải</p>		

21.2. Giám định mẫu Sài đất ba thù

<p>VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT Phòng Thực vật học</p>	<p>CỘNG HOÀ XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM <u>Độc lập – Tự do – Hạnh phúc</u></p>
<p>KẾT QUẢ GIÁM ĐỊNH TÊN KHOA HỌC MẪU THỰC VẬT</p>	
<p>Chúng tôi nhận được đề nghị giám định tên khoa học cho 01 mẫu tiêu bản thực vật như sau:</p>	
<p>Mẫu tiêu bản được thu tại Thái Bình, ngày thu mẫu 14/09/2017, người thu mẫu: Nguyễn Thị Luyến (số hiệu mẫu: 2016.55-W2).</p>	
<p>Mẫu mang đến giám định là mẫu tiêu bản ở dạng mẫu tươi, vừa được thu hái, chưa qua xử lý hoá chất và nhiệt độ. Mẫu tiêu bản có đủ tiêu chuẩn để định tên khoa học, bao gồm cả cơ quan sinh dưỡng (cành, lá) và cơ quan sinh sản (hoa,...). Kết quả giám định:</p>	
<p>* Mẫu mang số hiệu: 2016.55-W2</p>	
<ul style="list-style-type: none"> - Tên khoa học: <i>Sphagneticola trilobata</i> (L.) Pruski - Tên đồng nghĩa: <i>Wedelia trilobata</i> (L.) Hitchc. - Thuộc họ Cúc – Asteraceae - Tên Việt Nam: Sài đất ba thù. 	
<p>Xác nhận Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật TL. VIỆN TRƯỞNG TRƯỞNG PHÒNG QLTH</p>	<p>Hà Nội, ngày 25 tháng 12 năm 2017 Người giám định</p>
 <p><i>Cao Thị Kim Dung</i></p>	 <p>Đỗ Văn Hải</p>