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

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ

BÙI VĂN TRUNG

NGHIÊN CỨU PHÂN TÍCH THÀNH PHẦN, CẤU TRÚC HÓA HỌC VÀ ĐỊNH LƯỢNG HỢP CHẤT CÓ TÁC DỤNG BẢO VỆ GAN CỦA HAI LOÀI BÀN TAY MA

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

BÙI VĂN TRUNG

NGHIÊN CỨU PHÂN TÍCH THÀNH PHẦN, CẤU TRÚC HÓA HỌC VÀ ĐỊNH LƯỢNG HỢP CHẤT CÓ TÁC DỤNG BẢO VỆ GAN CỦA HAI LOÀI BÀN TAY MA

Chuyên ngành: Hóa phân tích

Mã số: 9440118

LUẬN ÁN TIẾN SĨ HÓA HỌC

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:

1. GS.TS. Phạm Hùng Việt
2. PGS.TS. Dương Hồng Anh

Hà Nội – 2023

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan:

Luận án này là công tình nghiên cứu của tôi dưới sự hướng dẫn của GS.TS. Phạm Hùng Việt và PGS.TS. Dương Hồng Anh.

Các số liệu, kết quả trong luận án của tôi là trung thực và chưa được công bố trong công trình nào khác.

Hà Nội, ngày tháng năm 2023

Tác giả luận án

Bùi Văn Trung

LỜI CẢM ƠN

Luận án này được hoàn thành tại Phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ phân tích phục vụ Kiểm định môi trường và An toàn thực phẩm – Trường Đại học Khoa học tự nhiên – Đại học Quốc gia Hà Nội, Viện Hóa sinh biển – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam và Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương. Trong suốt quá trình thực hiện luận án, tác giả đã nhận được rất nhiều sự giúp đỡ quý báu của các thầy cô, các nhà khoa học, các đồng nghiệp, bạn bè và gia đình.

Với tấm lòng chân thành và biết ơn sâu sắc, tôi xin được gửi lời cảm ơn tới GS.TS. Phạm Hùng Việt và PGS.TS. Dương Hồng Anh, những người thầy vô cùng tận tâm và nhiệt huyết đã định hướng, hướng dẫn và giúp đỡ tôi trong suốt quá trình học tập cũng như thực hiện luận án. Thầy và cô đã luôn quan tâm, giúp đỡ, động viên và tạo mọi điều kiện thuận lợi cho tôi để hoàn thiện luận án này.

Tôi xin gửi lời cảm ơn chân thành tới tập thể các thầy cô tại Phòng Nghiên cứu cấu trúc – Viện Hóa sinh biển, đặc biệt là PGS.TS. Phan Văn Kiệm, người thầy đã hướng dẫn tôi trong những bước đầu tiếp cận với chuyên môn về hóa học các hợp chất thiên nhiên, là tiền đề để tôi phân lập, chiết tách các chất từ dược liệu. Những kiến thức quý báu thầy truyền đạt không những là nền tảng giúp tôi phát triển để thực hiện một số nội dung lớn của luận án, mà còn đang rất hữu ích với những công việc của tôi hiện tại.

Tôi xin trân trọng cảm ơn Ban Lãnh đạo Viện và các anh/chị trong Khoa Vật lý – Đo lường, Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương đã tạo điều kiện về thời gian, cơ sở vật chất, trang thiết bị hiện đại cho tôi thực hiện luận án.

Tôi xin trân trọng cảm ơn Ban Giám đốc cùng các cán bộ phòng Đào tạo, Học viện Khoa học và Công nghệ - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã thiết kế chương trình và kế hoạch đào tạo hợp lý cho tôi cũng như luôn giúp đỡ kịp thời các thủ tục trong học tập để tôi hoàn thành luận án này đúng thời hạn.

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

Tác giả

Bùi Văn Trung

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN i
LỜI CẢM ƠN i
MỤC LỤC i
DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT iv
DANH MỤC BẢNG vii
DANH MỤC HÌNH viii
MỞ ĐẦU 1
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN 3
1.1. Tổng quan về bài thuốc "Bàn tay ma" 3
1.2. Tổng quan về hai loài dược liệu *H. terminalis* và *H. lobata* 4
1.2.1. Họ Quắn hoa (Proteaceae) 4
1.2.2. Chi *Heliciopsis* Sleum. 6
1.2.3. Loài Bàn tay ma trắng - *Heliciopsis terminalis* (Kurz) Sleumer 7
1.1.4. Loài Bàn tay ma đỏ - *Heliciopsis lobata* (Merr.) Sleumer 9
1.1.5. So sánh hai loài Bàn tay ma qua các nghiên cứu đã công bố 13
1.1.6. Tri thức sử dụng cây thuốc Bàn tay ma 15
1.2. Một số phương pháp đánh giá tác dụng bảo vệ gan 17
1.2.1. Đánh giá tác dụng bảo vệ tế bào gan trên mô hình *in vitro* 17
1.2.2. Đánh giá tác dụng bảo vệ gan trên mô hình *in vivo* 21
1.2.3. Phương hướng áp dụng các mô hình bảo vệ gan trong luận án 22
1.3. Chất đánh dấu của dược liệu và phương pháp xác định 23
1.3.1. Chất đánh dấu của dược liệu và ứng dụng 23
1.3.2. Phương pháp xác định chất đánh dấu của dược liệu 26
1.3.3. Phương pháp xác định chất đánh dấu có tác dụng bảo vệ gan trong dược liệu Bàn tay ma 26
1.4. Tóm tắt các vấn đề đề tài luận án cần giải quyết 27

CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU 29
2.1. Đối tượng nghiên cứu 29
2.2. Phương pháp nghiên cứu 30
2.2.1. Áp dụng các phương pháp phân tích hóa lý hiện đại để phân tích cấu trúc một số thành phần hóa học của hai loài Bàn tay ma 31
2.2.2. Đánh giá tác dụng bảo vệ gan của hai loài Bàn tay ma 33
2.2.3. Xây dựng quy trình định tính và định lượng chất đánh dấu có tác dụng bảo vệ gan của hai loài Bàn tay ma 36
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN 38
3.1. Cấu trúc của một số thành phần hóa học được phân lập từ dược liệu Bàn tay ma trắng và dược liệu Bàn tay ma đỏ 38
3.1.1. Phân tính xác định cấu trúc một số thành phần hóa học từ loài Bàn tay ma trắng (*H. terminalis*) 38
3.1.2. Phân tích xác định cấu trúc một số thành phần hóa học từ loài Bàn tay ma đỏ (*H. lobata*) 54
3.2. Tác dụng bảo vệ gan của hai loài dược liệu Bàn tay ma 72
3.2.1. Tác dụng bảo vệ gan của hai loài Bàn tay ma trên mô hình in vivo 72
3.2.2. Tác dụng bảo vệ tế bào gan của các hợp chất phân lập từ loài Bàn tay ma trắng (*H. terminalis*) và loài Bàn tay ma đỏ (*H. lobata*) 80
3.2.3. Một số tác dụng liên quan đến khả năng bảo vệ gan của hợp chất 3,5-Dimethoxy-4-hydroxy-1-*β*-D-glucopyranoside 83
3.2.4. Đánh giá độc tính của dược liệu Bàn tay ma đỏ 86
3.3. Xây dựng quy trình đính tính và định lượng hợp chất 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1-*β*-D-glucopyranoside trong dược liệu Bàn tay ma 88
3.3.1. Xác định chất đánh dấu có tác dụng bảo vệ gan từ dược liệu Bàn tay ma đỏ 88
3.3.2. Xây dựng qui trình định tính 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1-*β*-D-glucopyranoside trong dược liệu Bàn tay ma 90
3.3.3. Xây dựng qui trình định lượng 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1-*β*-D-glucopyranoside trong dược liệu Bàn tay ma 91

3.3.4. Quy trình định tính và định lượng 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1-*β*-D-glucopyranoside trong dược liệu Bàn tay ma.....98

3.3.5. Sơ bộ xác định hàm lượng 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1-*β*-D-glucopyranoside trong mẫu HL11 đã tinh chế.....99

3.3.6. Thẩm định quy trình định tính và định lượng 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1-*β*-D-glucopyranoside trong dược liệu Bàn tay ma.....101

3.3.7. Định lượng 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1-*β*-D-glucopyranoside trong cao chiết nước dược liệu Bàn tay ma đỏ.....108

CHƯƠNG 4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ 111

4.1. Kết luận.....111

4.2. Kiến nghị 112

DANH MỤC CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN.....113

TÀI LIỆU THAM KHẢO 114

DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

Kí hiệu	Tiếng Anh	Diễn giải
^{13}C-NMR	Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân ^{13}C
^{1}H-NMR	Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân ^{1}H
Allo	Allopyranose	Nhóm đường allopyranose
ALP	Alkaline phosphatase	Enzyme alkaline phosphatase
ALT	Alanine aminotransferase	Enzyme alanine aminotransferase
AOAC international	Association of Official Analytical Collaboration International	Hiệp hội các tổ chức hóa phân tích quốc tế chính thống
Api	Apiofuranoside	Nhóm đường apiofuranoside
Ara(f)	Arabinofuranoside	Nhóm đường arabinofuranoside
Ara(p)	Arabinopyranoside	Nhóm đường arabinopyranoside
AST	Aspartate aminotransferase	Enzyme aspartate aminotransferase
CD	Circular dichroism Spectroscopy	Phổ lưỡng sắc tròn nhằm xác định độ quay cực của một đồng phân quang học trong một phân tử chất hữu cơ có một hoặc nhiều hơn carbon bất đối.
COSY	Correlation Spectroscopy	Phổ hai chiều tương quan ^{1}H-^{1}H
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarisation Transfer Spectroscopy	Kỹ thuật tăng cường tín hiệu phổ NMR của ^{13}C mà không bị biến dạng pic nhờ sự chuyển phân cực phổ chuyển phân cực của ^{1}H.
DMSO	Dimethylsulfoxide	Dimethylsulfoxide
DPPH	1,1- diphenyl-2-picrylhydrazyl	1,1- diphenyl-2-picrylhydrazyl

Kí hiệu	Tiếng Anh	Diễn giải
EC_{50}	Half maximal effective concentration	Nồng độ hiệu quả tối đa một nửa
EMA	European Medicines Agency	Cơ quan Dược phẩm châu Âu
Gal	Galactopyranoside	Nhóm đường galactopyranoside
Glu	Glucopyranose	Nhóm đường glucopyranose
GSH	Glutathione	Glutathione
HepG2	Human hepatocellular carcinoma cell GepG2	Dòng tế bào ung thư biểu mô gan ở người HepG2
HKE-293A	Human embryonic kidney 293 cell	Dòng tế bào gốc thận ở phôi người HKE-293A
HMBC	Heteronuclear Mutiple Bond Connectivity Spectroscopy	Phổ tương tác dị hạt nhân (^{13}C-^{1}H) gián tiếp 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 sử dụng nguồn ion hóa bằng phun điện tử
HSQC	Heteronuclear Single-Quantum Coherence	Phổ tương tác dị hạt nhân (^{13}C-^{1}H) trực tiếp 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
LD	Lethal dose	Liều gây chết động vật thí nghiệm
IL	Interleukin	Interleukin
LPS	Lipopolysaccharide	Lipopolysaccharide

Kí hiệu	Tiếng Anh	Diễn giải
MTT	MTT assy	Phương pháp định lượng tế bào sống bằng phương pháp so màu
NO	Nitric oxide	Gốc tự do nitric oxide ($NO^{\cdot}$)
NOESY	Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy	Phổ cộng hưởng từ tăng cường nhờ hiệu ứng Nuclear Overhauser.
PAR	Paracetamol	Paracetamol
RAW 264.7	Mammalian cell line	Dòng tế bào đại thực bào RAW 264.7
RSD	Relative standard deviation	Độ lệch chuẩn tương đối
SRB	Sulforhodamine B	Sulforhodamine B
TBARs	thiobarbituric acid reactive substances	Cơ chất phản ứng với acid thiobarbituric
TLC	Thin layer chromatography	Sắc ký lớp mỏng
TMS	Tetramethylsilane	$(CH_3)_4Si$ được sử dụng làm chất chuẩn xác định độ chuyển dịch hóa học của các hạt nhân được nghiên cứu.
TNF	Tumor necrosis factor	Yếu tố hoạt tử khối u
WHO	World Health Organization	Tổ chức Y tế thế giới

DANH MỤC BẢNG

Bảng 2.1. Liều cao chiết sử dụng cho chuột thử nghiệm 34

Bảng 3.1. Số liệu phổ NMR của hợp chất HT9.....47

Bảng 3.2. Số liệu phổ NMR của hợp chất HL12 và hợp chất tham khảo 64

Bảng 3.3. Khả năng bảo vệ tế bào HepG2 của mẫu phân lập từ dược liệu Bàn tay ma trắng *(H. terminalis)* 81

Bảng 3.4. Khả năng bảo vệ tế bào HepG2 của mẫu phân lập từ dược liệu Bàn tay ma đỏ *(H. lobata)* 82

Bảng 3.5. Khả năng gây độc tế bào của các mẫu trên dòng tế bào HEK-293A.....87

Bảng 3.6. Kết quả thử độ tan của hợp chất, 5-dimethoxy-4-hydroxy-1-β-D glucopyranoside trong một số dung môi phân cực.....92

Bảng 3.7. Kết quả khảo sát thời gian siêu âm mẫu 96

Bảng 3.8. Chương trình pha động định lượng HL11 trong dược liệu Bàn tay ma đỏ...98

Bảng 3.9. Kết quả xác định hàm lượng 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1-β-D-glucopyranoside trong mẫu HL11 101

Bảng 3.10. Kết quả đánh giá độ lặp lại của thông số mẫu chuẩn.....103

Bảng 3.11. Nồng độ và diện tích pic của các mẫu đánh giá độ tuyến tính 104

Bảng 3.12. Kết quả đánh giá độ lặp lại và độ chính xác trung gian.....105

Bảng 3.13. Kết quả đánh giá độ đúng của phương pháp.....106

Bảng 3.14. Kết quả đánh giá độ lặp lại và độ chính xác trung gian.....109

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1. Các hợp chất phenyl glycosid được phân lập từ lá cây Bàn tay ma trắng.....8

Hình 1.2. Một số bộ phận của cây Bàn tay ma trắng và Bàn tay ma đỏ 13

Hình 2.1. Mẫu tiêu bản Dược liệu và bột dược liệu Bàn tay ma trắng 29

Hình 2.2. Mẫu tiêu bản Dược liệu và bột dược liệu Bàn tay ma đỏ.....29

Hình 2.3. Sơ đồ nghiên cứu dược liệu Bàn tay ma đỏ và Bàn tay ma trắng 30

Hình 3.1. Sơ đồ phân lập và tinh chế các hợp chất từ loài Bàn tay ma trắng *(H. terminalis)* 39

Hình 3.2. Cấu trúc hóa học của hợp chất HT1 40

Hình 3.3. Cấu trúc hóa học của hợp chất HT2 41

Hình 3.4. Cấu trúc hóa học của hợp chất HT3 42

Hình 3.5. Cấu trúc hóa học của hợp chất HT4 42

Hình 3.6. Cấu trúc hóa học của hợp chất HT5 43

Hình 3.7. Cấu trúc hóa học của hợp chất HT6 44

Hình 3.8. Cấu trúc hóa học của hợp chất HT7 45

Hình 3.9. Cấu trúc hóa học của hợp chất HT8 46

Hình 3.10. Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC, COSY của hợp chất HT9 47

Hình 3.11. Phổ 1H-NMR của hợp chất HT9.....49

Hình 3.12. Phổ 13C-NMR của hợp chất HT9.....49

Hình 3.13. Phổ HSQC của hợp chất HT9.....50

Hình 3.14. Phổ HMBC của hợp chất HT9 51

Hình 3.15. Phổ H-H COSY của hợp chất HT9 52

Hình 3.16. Cấu trúc hóa học của hợp chất HT10 53

Hình 3.17. Qui trình phân lập và tinh chế các hợp chất từ cây Bàn tay ma đỏ *(H. lobata)* 55

Hình 3.18. Cấu trúc hóa học của hợp chất HL1 56

Hình 3.19. Cấu trúc hóa học của hợp chất HL2 57

Hình 3.20. Cấu trúc hóa học của hợp chất HL3 57

Hình 3.21. Cấu trúc hóa học của hợp chất HL4 58

Hình 3.22. Cấu trúc hóa học của hợp chất HL5 59
Hình 3.23. Cấu trúc hóa học của hợp chất HL7 60
Hình 3.24. Cấu trúc hóa học của hợp chất HL8 60
Hình 3.25. Cấu trúc hóa học của hợp chất HL9 61
Hình 3.26. Cấu trúc hóa học của hợp chất HL10 62
Hình 3.27. Cấu trúc hóa học của hợp chất HL11 63
Hình 3.28. Cấu trúc hóa học của hợp chất HL12 và hợp chất tham khảo.....63
Hình 3.29. Các tương tác HMBC, COSY chính của hợp chất HL12.....64
Hình 3.30. Phổ 1H-NMR của hợp chất HL12.....65
Hình 3.31. Phổ 13C-NMR của hợp chất HL12 66
Hình 3.32. Phổ HSQC của hợp chất HL12.....67
Hình 3.33. Phổ HMBC của hợp chất HL12 68
Hình 3.34. Phổ H-H COSY của hợp chất HL12 69
Hình 3.35. Cấu trúc hóa học của hợp chất HL13 70
Hình 3.36. Cấu trúc hóa học của hợp chất HL14 71
Hình 3.37. Tỷ lệ chuột thí nghiệm còn sống sau khi uống mẫu thử.....73
Hình 3.38. Ảnh hưởng của cao chiết nước các dược liệu Bàn tay ma trên hình ảnh giải phẫu đại thể gan chuột 74
Hình 3.39. Ảnh hưởng của cao chiết nước các dược liệu Bàn tay ma lên sự thay đổi tỷ lệ % khối lượng gan chuột trên khối lượng chuột nghiên cứu 75
Hình 3.40. Ảnh hưởng của cao chiết nước các dược liệu Bàn tay ma lên hoạt độ enzyme gan ALT (U/L) ở các lô chuột nghiên cứu 76
Hình 3.41. Ảnh hưởng của cao chiết nước các dược liệu Bàn tay ma lên hoạt độ enzyme gan AST (U/L) ở các lô chuột nghiên cứu 77
Hình 3.42. Ảnh hưởng của cao chiết nước các dược liệu Bàn tay ma lên cơ chất của TBARs trên các lô chuột nghiên cứu 78
Hình 3.43. Tác động của hợp chất HL11 lên nồng độ các cytokine tại thời điểm 24h.84
Hình 3.44. Tác động của hợp chất HL11 lên nồng độ các cytokine tại thời điểm 48h.85

Hình 3.45. So sánh tín hiệu hợp chất (*Z*)-5,5'-(hexadec-8-ene-1,16-diyl)bis(benzene-1,3-diol) trong hai loài dược liệu.....89

Hình 3.46. Phổ UV-VIS của các chất HL9, HL10 và HL11 tại các vị trí pic chất xuất hiện trên sắc ký đồ của ba chất.....93

Hình 3.47. Sắc ký đồ mẫu hỗn hợp HL9, HL10 và HL11 ở thể tích tiêm 5 µl và 10 µl phân tích ở bước sóng 278 nm. 94

Hình 3.48. Sắc ký đồ của các dung dịch được phân tích ở bước sóng 278 nm.....97

Hình 3.49. Sắc ký đồ mẫu trắng (A) và mẫu nguyên liệu HL11 (B) và độ tinh khiết của pic HL11 (C).....100

Hình 3.50. Sắc ký đồ đánh giá độ đặc hiệu của phương pháp: A – mẫu chuẩn, B – mẫu thử định lượng 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1-*β*-D-glucopyranoside 102

Hình 3.51. Mối tương quan tuyến tính giữa diện tích pic và nồng độ chất phân tích.104

Hình 3.52. Kết quả xác định giới hạn định lượng của phương pháp 107

Hình 3.53. Sắc ký đồ mẫu cao chiết nước dược liệu Bàn tay ma đỏ.....109

MỞ ĐẦU

Khí hậu gió mùa cùng với sự đa dạng về địa hình, thổ nhưỡng đã tạo nên sự phong phú về thảm thực vật ở Việt Nam. Sự ưu đãi ấy của thiên nhiên cùng với kiến thức y học cổ truyền qua hàng ngàn năm phát triển đã giúp sàng lọc được rất nhiều dược liệu, bài thuốc, phương thức chữa trị quý báu. Mặc dù ngày nay y học hện đại rất phát triển, nhưng y học cổ truyền đang được sử dụng rộng rãi để bảo vệ, chăm sóc sức khỏe nhân dân ta [1-3]. Tuy nhiên, để tìm ra được một dược liệu hoặc một bài thuốc tốt, quá trình sàng lọc truyền thống ấy thường phải trải qua những thử nghiệm trên người rất lâu dài, không thể tránh khỏi những rủi ro cho sức khỏe bệnh nhân.

Dùng các bằng chứng khoa học làm sáng tỏ tác dụng của các dược liệu, bài thuốc trong dân gian là cách giúp nhân dân và các y, bác sĩ có thể đánh giá một cách chính xác công dụng những dược liệu đang lưu hành và sử dụng hiện nay. Đây là cũng là phương án để tìm ra các dược liệu mới, loại lọc dần các dược liệu ít hoặc không có tác dụng ra khỏi danh mục các cây thuốc tại Việt Nam. Từ đó khẳng định lại vai trò điều trị của các dược liệu quý để có phương án bảo tồn, phát triển chúng.

Bài thuốc "Bàn tay ma", đã được nhóm nghiên cứu liên ngành do GS.TS. Phạm Hùng Việt chủ trì nghiên cứu trong chương trình Phát triển Khoa học Công nghệ vùng Tây Bắc giai đoạn 2017 – 2019, gồm 3 thành phần dược liệu phơi khô: thân cây Bàn tay ma, phần trên mặt đất cây Giảo cổ lam và thân cây Cà gai leo. Bài thuốc đã được chứng minh tác dụng bảo vệ gan, lợi mật và được cấp bằng Giải pháp hữu ích theo QĐ số 79345/QĐ-SHTT, ngày 07/11/2018 của Cục Sở hữu trí tuệ [4]. Trong bài thuốc trên, Giảo cổ lam và Cà gai leo là hai vị được liệu đã được chứng minh là có tác dụng bảo vệ gan tốt, và cũng đã được nghiên cứu kĩ về thành phần hóa học cho hướng tác dụng bảo vệ gan [5-8]. Trong khi đó, vị thuốc có hàm lượng lớn nhất, được xem là vị chủ trong bài thuốc này, là Bàn tay ma thì vẫn chưa được nghiên cứu nhiều theo hướng tác dụng điều trị bệnh về gan.

Ngoài ra, theo thông tin từ kết quả điều tra của nhóm nghiên cứu của PGS.TS. Trần Văn Ơn (Trường đại học Dược Hà Nội), có hai loài dược liệu cùng có tên là Bàn tay ma là loài Bàn tay ma trắng *Heliciopsis lobata* (Merr.) Sleumer và loài Bàn tay ma đỏ *Heliciopsis terminalis* (Kurz.) Sleumer thuộc chi *Helicopsis* Sleumer. Hai loài này được dùng nhiều ở vùng Tây Bắc để điều trị các bệnh về gan dưới dạng đơn thành phần

hoặc dùng phối hợp với các dược liệu khác. Hình thái hai loài dược liệu này khá tương đồng nhau, khả năng bảo vệ gan của hai loài này cũng mới chỉ được điều tra theo kinh nghiệm của dân gian mà chưa có minh chứng khoa học cho tác dụng này. Tỷ lệ nhận biết, phân biệt được hai loại dược liệu này chỉ có khoảng 40 %, nên việc dùng thay thế nhau giữa hai loại dược liệu này vẫn đang diễn ra. Nếu ít nhất một trong hai loài không có tác dụng bảo vệ gan hoặc có độc tính thì việc sử dụng như vậy không những không chữa được bệnh gan mà còn có thể gây nên những hậu quả không đáng có [9].

Một số công bố gần đây tập trung nghiên cứu vào thành phần hóa học và hoạt tính của lá cây Bàn tay ma đỏ nhưng chưa có những nghiên cứu về tác dụng bảo vệ gan của dược liệu này [10-15]. Song song quá trình thực hiện luận án này, nhóm tác giả Byeol Ryu, Đại học quốc gia Seoul, đã phân lập được 10 hợp chất từ lá cây Bàn tay ma trắng và đánh giá tác dụng của các hợp chất này trên các mô hình *in vitro* liên quan đến khả năng dung nạp glucose mà không phải bảo vệ gan [16].

Do vậy, đề tài ***"Nghiên cứu phân tích thành phần, cấu trúc hóa học và định lượng hợp chất có tác dụng bảo vệ gan của hai loài Ban tay ma"*** được thực hiện trên đối tượng là hai loài Bàn tay ma trắng *(H. terminalis)* và Bàn tay ma đỏ *(H. lobata)* với các mục tiêu sau: (i) Xác định được thành phần hóa học và cấu trúc của các hợp chất hữu cơ được phân lập từ hai loài Bàn tay ma bằng các phương pháp phân tích hóa lý hiện đại; (ii) Đánh giá được tác dụng bảo vệ gan của hai loài Bàn tay ma và (iii) Xây dựng được quy trình định tính và định lượng được chất đánh dấu có tác dụng bảo vệ gan của hai loài Bàn tay ma có độ chính xác và độ tin cậy cao nhằm có thể áp dụng quy trình này trong thực tế.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN

1.1. Tổng quan về bài thuốc "Bàn tay ma"

Bài thuốc "Bàn tay ma" có nguồn từ ông lang Nguyễn Quyết Thắng – Hội Y học cổ truyền tỉnh Bắc Kạn, gồm các dược liệu khô: 30 g thân cây Bàn tay ma trắng (*Heliciopsis terminalis* Kurz.), 5 g phần trên mặt đất của cây Giảo cổ lam (*Gynostemma pentaphyllum* Thunb.) và 10 g thân cây Cà gai leo (*Solanum procumbens* Lour.). Bài thuốc đã được chứng minh tác dụng bảo vệ gan và lợi mật, được cấp bằng Giải pháp hữu ích theo QĐ số 79345/QĐ-SHTT, ngày 07/11/2018 của Cục Sở hữu trí tuệ [4].

Bài thuốc này đã được sàng lọc từ 152 bài thuốc điều trị các bệnh gan, mật của đồng bào vùng Tây Bắc [17]. Qua thử nghiệm tác dụng *in vivo* trên mô hình chuột nhắt trắng chủng Swiss., cao chiết nước bài thuốc thể hiện tác dụng bảo vệ gan khi làm giảm các triệu chứng hoại tử và viêm gan trên chuột gây độc bằng paracetamol; tác dụng lợi mật qua việc làm tăng khối lượng mật tiết ra khi sử dụng thuốc. Trong mô hình thí nghiệm đã thực hiện, liều gấp đôi liều thông thường của bài thuốc cho tác dụng bảo vệ gan và lợi mật đều tốt hơn liều thông thường. Bài thuốc cũng được chứng minh là an toàn trên mô hình chuột thí nghiệm khi cho chuột uống liều tối đa không thấy chuột chết và không xuất hiện bất kì biểu hiện nào của độc tính cấp. Ngoài ra, sau 4 tuần thử nghiệm độc tính bán trường diễn ở liều gấp đôi liều thông thường của bài thuốc, các biểu hiện bị nhiễm độc của chuột thí nghiệm cũng không được quan sát thấy [18].

Trong ba thành phần của bài thuốc, Giảo cổ lam và Cà gai leo đã được nghiên cứu rất nhiều và đều được chứng minh tác dụng bảo vệ gan. Đối với Giảo cổ lam, thành phần chính tạo nên tác dụng bảo vệ gan là saponin, liều đạt đỉnh khi thử tác dụng bảo vệ gan trên chuột quy đổi ra liều cho người là khoảng 20 g, trong khi liều dùng trong bài thuốc là 5 g. Đối với Cà gai leo, tác dụng bảo vệ gan được chứng minh là chỉ do nhóm glycoalkaloid tạo nên. Lượng glycoalkaloid lại tập trung chủ yếu ở quả (0,45 %), lá (0,36 %) và rễ (0,20 %), trong khi ở thân – bộ phận dùng trong bài thuốc chỉ là 0,08 %. Theo các kết quả đã công bố phía trên, có thể nói cà gai leo không đóng vai trò quan trọng trong tác dụng bảo vệ gan của bài thuốc. Tuy nhiên, khi sử dụng phối hợp các thành phần với nhau, vai trò của chúng trong bài thuốc cũng rất phức tạp.

Riêng vị thuốc Bàn tay ma, hàm lượng trong bài thuốc là khá lớn, mặc dù bài thuốc Bàn tay ma đã được công bố, nhưng hai loài Bàn tay ma đỏ và trắng còn sử dụng

nhầm lẫn trong nhân dân với tỷ lệ cao và chưa có minh chứng khoa học nhiều về công dụng bảo vệ gan của hai loài dược liệu này [9]. Tập trung nghiên cứu hai vị thuốc Bàn tay ma với định hướng tác dụng bảo vệ gan sẽ giúp cung cấp bằng chứng khoa học để đánh giá đúng đắn vai trò và tác dụng thực tế của hai loài dược liệu này. Qua đó có thể có cơ sở để tối ưu hóa bài thuốc "Bàn tay ma" qua việc sử dụng loại dược liệu phù hợp hoặc để xác định các chất đánh dấu để kiểm soát chất lượng của dược liệu, của bài thuốc và các sản phẩm từ dược liệu này.

1.2. Tổng quan về hai loài dược liệu *H. terminalis* và *H. lobata*

Hai loài *Heliciopsis terminalis* (Kurz.) Sleumer và *Heliciopsis lobata* (Merr.) Sleumer ở Việt Nam được sử dụng chung với tên là Bàn tay ma. Nhiều nơi trong cộng đồng vẫn sử dụng lẫn lộn hai loài này để chữa cùng một loại bệnh mà chưa có nhiều kiến thức để phân biệt hai loài này. Cả hai loài *H. terminalis* và *H. lobata* đều thuộc chi *Heliciopsis* Sleum, họ Quắn hoa (Protaceae).

1.2.1. Họ Quắn hoa (Proteaceae)

Họ Quắn hoa (Proteaceae) còn có tên gọi khác là họ Chẹo thui, họ Cơm vàng hay họ Đũng,…[19] là một họ tương đối lớn, với khoảng 80 chi và 1.700 loài [20, 21]. Tên Proteaceae bắt nguồn từ tên thần Proteus của Hy Lạp, một vị thần có thể thay đổi nhiều dạng, nó phản ánh sự đa dạng về mặt hình thái của họ thực vật này [22].

Họ Proteaceae hiện tại được chia ra thành 7 phân họ, bao gồm: *Bellendenoideae, Caranarvonioideae, Eidotheoideae, Grevilleoideae, Persoonioideae, Proteoideae* và *Sphalmioideae* [23].

Họ Quắn hoa thường phân bố ở nhiều nơi trên thế giới, đa dạng nhất ở Úc, tiếp đến là ở Nam Phi, Nam Mỹ, New Caledonia, New Guinea, Malesia, Nam và Đông Á, Châu Phi, Trung Mỹ, Madagascar, New Zealand, Fiji, nam Ấn Độ, Sri Lanka, Vanuatu, và Micronesia [20, 21, 23, 24]. Ở Việt Nam có 3 chi: *Grevillea, Helicia, Heliciopsis* với khoảng 15 loài [19, 25].

Nhìn chung, các cây trong họ Proteaceae thường là các cây bụi hoặc cây thân gỗ lâu năm, một số loài cây có thể cao lên tới hơn 40 m, tuy nhiên cũng có một số loài thuộc chi *Stirlingia* là cây thân thảo. Cây thường lưỡng tính hoàn toàn, nhưng đôi khi cũng đơn tính cùng gốc hoặc đơn tính khác gốc, nhiều loại trong họ này có cụm "rễ proteoid" [20, 22, 23].

"Rễ proteoid" là loại rễ đặc biệt, phát triển theo mùa theo mùa, được tạo ra để giúp cây thích nghi với các loại đất nghèo dinh dưỡng [26]. Đây là những rễ ngắn, dày đặc, được sinh ra theo chiều ngang trên rễ bình thường và được gắn rất nhiều lông hút. Chúng chủ yếu được hình thành trong mùa tăng trưởng và lụi dần vào cuối mùa rồi được thay thế lại vào năm sau. Hoạt động của rễ proteoid cũng tương tự như việc cộng sinh với nấm *Mycorrhiza* ở các họ khác, nhằm tạo ra bề mặt rộng hơn để tăng khả năng hấp thu trong môi trường mà các chất dinh dưỡng và nước khan hiếm [20, 22].

Lá mọc so le hoặc cũng có trường hợp mọc đối hoặc mọc vòng, lá mọc đơn hoặc lá kép lông chim, hiếm khi có lá hình chân chim, thường có xẻ răng cưa ở mép lá. Lá có thể có cuống hoặc không cuống, gân lá hình lông chim hoặc đôi khi là gân song song hoặc hình bàn tay, một số trường hợp rút gọn thành gân đơn. Lá thường xanh, đa dạng về kích thước, hình dáng và đặc điểm mép lá. Không có lá kèm [20].

Cụm hoa đơn hoặc kép, mọc ở nách lá, cành, thân hoặc ngọn, thường không phân nhánh, hoặc hiếm khi phân nhánh. Hoa nở theo chiều ngang thành từng cặp hoặc đôi khi đơn lẻ, cụm hoa chùm, đôi khi là bông hoặc tụ lại thành đầu. Lá bắc của cặp hoa thường nhỏ, đôi khi cùng lớn lên với hoa và hóa gỗ. Lá bắc của hoa thường nhỏ hoặc không có. Hoa lưỡng tính hoặc hiếm khi đơn tính khác gốc, đối xứng tỏa tròn hoặc đối xứng 2 bên. Hoa mẫu 3, 4 hoặc 5, bao hoa thường có dạng ống khi đang ra nụ, cánh hoa ngắn. Nhị 4, đối diện bao hoa. Chỉ nhị thường được gắn liền với bao hoa và không tách biệt. Bao phấn thường 2 ô, mở theo chiều dọc. Bầu trên, 1 ô, không hoặc có cuống. Noãn 1 hoặc 2 (hoặc nhiều hơn), đính noãn treo hoặc đính noãn mép. Quả đại, đóng hoặc hạch. Hạt 1 hoặc 2 (hoặc vài đến nhiều), đôi khi có cánh. Hạt không có nội nhũ hoặc chỉ để lại vết. Phôi thường thẳng, lá mầm dày hay mỏng, giàu chất béo. Rễ mầm ngắn ở dưới [23, 27].

Nhờ có hoa đẹp và tuổi thọ cây tương đối dài, nhiều loài trong họ Quắn hoa đã được sử dụng phổ biến để trang trí, thậm chí một số loài có hoa đẹp còn được trồng để xuất khẩu. Trồng cây thuộc họ Proteaceae là một ngành công nghiệp phát triển mạnh, tạo ra công ăn việc làm ở các đất nước mà những cây hoa này được trồng, thường là ở những vùng không sản xuất nông nghiệp [28]. Một số loài có hoa đẹp được trồng để kinh doanh là *Banksia* L.f., *Leucadendron* R.Br., *Leucospermum* R.Br. và *Protea* L.. Các loài thuộc chi *Aulax* Berg., *Grevillea* R.Br. ex Knight, *Isopogon* R.Br. ex Knight,

Mimetes Salisb, *Paranomus* Salisb, *Serruria* Salisb and *Telopea* R.Br được sử dụng ở mức độ thấp hơn [26]. Ngoài việc công dụng làm cây cảnh, các loài *Grevillea*, *Hakea* Schrad & J.C.Wendl và *Macadamia* F.Muell được còn trồng để sản xuất thực phẩm, làm hàng rào hoặc chắn gió.

Với sự đa dạng về thực vật, mục đích sử dụng của các loài thuốc họ Quắn hoa cũng khác nhau. Trong lĩnh vực dược liệu, rất nhiều cây thuốc thuộc họ này đã được nhân dân sàng lọc và ứng dụng trong điều trị bệnh cho cộng đồng [1, 2, 19, 29, 30].

1.2.2. Chi Heliciopsis Sleum.

Các cây thuộc chi này là dạng cây gỗ, đơn tính khác gốc. Lá đơn, mọc so le, nguyên hoặc chia thùy hoặc lá kép lông chim. Cụm hoa bông hoặc chùm, rất hiếm chia nhánh, hay mọc thành từng cặp. Lá bắc của cặp hoa thẳng, hình dùi hoặc hình mác, không rụng. Lá bắc của hoa thường rụng sớm. Bao hoa thẳng, mỏng. Cánh hoa hình chùy đến elip, cuốn ngoài lúc đang còn nụ. Nhị hoa gần như không có chỉ nhị, dính vào cánh hoa. Bao phấn hình thuôn; hơi nhọn. Nhị lép có trong hoa cái. Hạt phấn nhỏ 3 thùy, có màng ngoài như lưới. Tuyến mật 4, rời nhau. Bầu nhụy có 2 noãn. Núm nhụy chủ yếu là hình chùy. Bầu lép có trong hoa đực. Quả hạch, vỏ quả ngoài trơn, mỏng; vỏ quả giữa xốp, hoặc có nhiều sợi mềm xuyên tâm, đôi khi tiêu giảm khi chín; vỏ quả trong cứng, hóa gỗ, hiếm khi mỏng, mặt ngoài có lỗ lưới. Hạt 1 và hình cầu hoặc hạt 2 và bán cầu, vỏ hột mỏng, lá mầm béo [19, 23].

Chi *Heliciopsis* Sleum có khoảng 10 loài, phân bố ở Đông Nam Á, Đông Himalaya. Trung Quốc có 3 loài, trong đó có 2 loài đặc hữu [23].

Ở Việt Nam có hai loài là *H. terminalis* và *H. lobata* được gọi với nhiều tên khác nhau [2, 3, 30, 31]. Gần đây, tên gọi Bàn tay ma được sử dụng phổ biến nhất. Sở dĩ có tên gọi là "Bàn tay ma" vì theo truyền thuyết của người Tày (Cao Bằng, Bắc Kạn), cây mọc ở các rừng thiêng, nơi an táng người chết, lá cây xẻ thuỳ như những bàn tay khổng lồ, canh giữ nơi an nghỉ của những người đã khuất [3, 30]. Hình thái hai loài này tương đối giống nhau, nên việc phân biệt hai loài này trong nhân dân vẫn còn nhiều khó khăn. Năm 2017, nhóm nghiên cứu của PGS.TS. Trần Văn Ơn, Trường Đại học Dược Hà Nội đã tiến hành nghiên cứu để phân biệt hai loài này và cũng đã tiến hành điều tra tình hình nhận biết của hai loài Bàn tay ma ở một số vùng dân tộc ở Bắc Kạn, nơi mà dược liệu này đang được sử dụng phổ biến ở Việt Nam [9].

1.2.3. Loài Bàn tay ma trắng - Heliciopsis terminalis (Kurz) Sleumer

Tên khoa học : *Heliciopsis terminalis* (Kurz.) Sleumer

Tên Việt Nam : Bàn tay ma trắng, Đúng, Mạ sưa phân thùy.

Chi : *Heliciopsis* Sleum

Họ : Protaceace.

1.2.3.1. Đặc điểm thực vật

Loài Bàn tay ma trắng là loại cây thân gỗ, có chiều cao từ 5 đến 15 m, đường kính 35 – 50 cm. Cành non có lông tơ màu gỉ sắt, sáng bóng. Lá lưỡng hình, phiến lá đơn hoặc xẻ ba thùy đến xẻ hình lông chim; cuống lá dài 1 – 2,5 cm đối với lá đơn, và 4 – 5 cm đối với lá xẻ thùy; phiến lá mỏng dai, có màu sáng bóng khi già, gốc hình nêm đến nhỏ hẹp dần, mép nguyên, đỉnh hơi nhọn, nhọn hoặc đôi khi hơi sắc nhọn; gân phụ hình mạng nổi rõ trên cả hai bề mặt. Phiến lá đơn hình mác đến thuôn dài, kích thước 12-35 × 4-10 cm. Phiến lá xẻ kích thước 25-60 × 15-50 cm, 1 – 7 đôi thùy, xoan hơi tròn.

Cụm hoa ở nách lá hoặc có hoa ở cành, hiếm khi ở đầu nhánh ngắn, có nhiều lông; lá bắc của các cặp hoa dài và hẹp kích thước 0,5 – 2 mm; lá bắc hoa dài và hẹp, ca. 0,5 mm. Bao hoa màu trắng hoặc hơi vàng. Cụm hoa đực dài 10 – 20 cm. Cụm hoa cái mập, dài 15 – 22 cm. Hoa đực: cuống dài 5 – 7 mm; bao hoa 1,1 – 1,4 cm; bao phấn ca. 2,5 mm; nhị hoa nhẵn; vòi nhị hình chùy. Hoa cái: cuống hoa 8 – 10 mm; bao hoa ca. 1,2 cm; cao 1,5 mm; bầu dục dạng trứng, nhẵn; vòi nhụy ca. 1 cm, đỉnh ± nén; đầu nhụy ở bên. Quả hơi nâu, hình elip, kích thước 3-4,5 × 1,7-3 cm; vỏ ngoài ca. dày 0,5 mm; vỏ quả giữa ca. dày 1,5 mm, sợi mềm hầu như không có khi khô; vỏ quả trong dày 0,5 – 1,5 mm. Hoa nở từ tháng 3 đến tháng 6; quả từ tháng 8 đến tháng 11 [25, 32, 33].

1.2.3.2. Phân bố

Cây mọc ở rừng mưa, dưới 100 m đến 700 m, có nơi còn tìm thấy loại này mọc ở độ cao tới 1400 m. Cây phân bố chủ yếu ở vùng Đông Nam Á như Việt Nam, Lào, Campuchia, Thái Lan, Myanma và vùng phía nam của Trung Quốc [2, 30, 34]. Ở Trung Quốc, Bàn tay ma trắng được tìm thấy ở phía Đông Quảng Đông, phía Đông Nam Quảng Tây, Hải Nam, phía Bắc đến Đông Nam Vân Nam [32].

Ở Việt Nam, Bàn tay ma trắng được phân bố ở các tỉnh Quảng Ninh (huyện Móng Cái, Hà Cối), Hà Nội (huyện Ba Vì), Đà Nẵng (huyện Hải Vân, Liên Chiểu), Kon Tum (huyện Đắc Tô, Ngọc Pan), Đắc Lắc (huyện Đắc Mil, Đức Minh), Lâm Đồng (huyện Di Linh, Đinh trang Thượng), Khánh Hòa (TP. Nha trang, huyện Phú Hữu) [2, 32, 35].

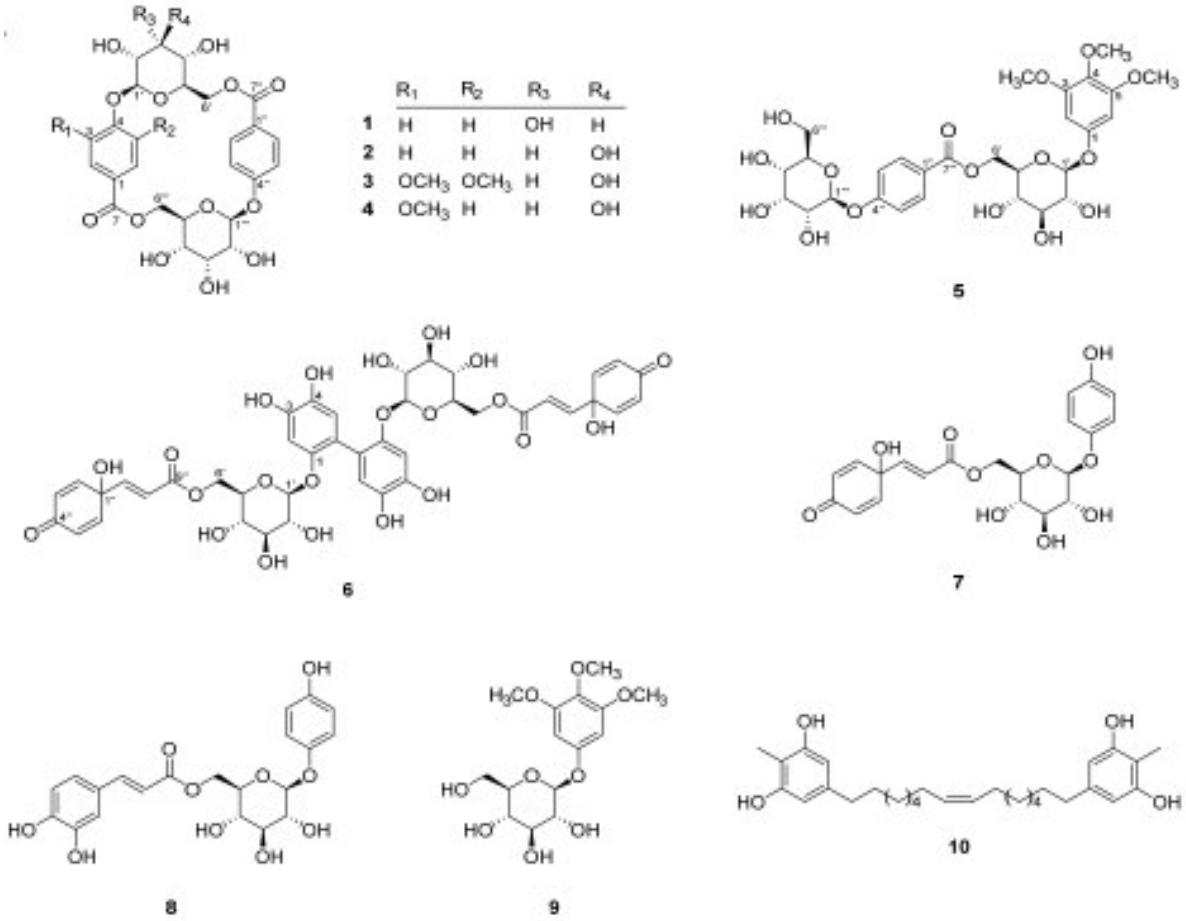
1.2.3.3. Bộ phận dùng và công dụng

Rễ, vỏ, lá có vị nhạt, chát, tính mát, có ít độc; có tác dụng thanh nhiệt, giải độc; bổ thận, an thần [2]. Ở Việt Nam và Trung Quốc, Bàn tay ma trắng đang được nhân dân sử dụng làm thuốc, nhưng cách dùng mỗi nơi lại khác nhau [32].

Vỏ thân và lá Bàn tay ma trắng được cho là có công dụng kiềm chế vi khuẩn và thanh nhiệt giải độc. Ở Việt Nam, Bàn tay ma trắng được sử dụng làm thuốc chống độc, chữa viêm tụy [2, 35]. Ở Vân Nam (Trung Quốc), vỏ và lá cây được dùng làm thuốc tránh thai; còn ở Quảng Tây, được dùng trị viêm tuyến mang tai [2].

1.2.3.4. Thành phần hóa học của cây Bàn tay ma trắng

Thành phần hóa học của cây Bàn tay ma trắng ít được nghiên cứu trước đây. Song song với luận án này, nhóm nghiên cứu của tác giả Byeol Ryu và cộng sự tại trường Đại học Quốc gia Seoul đã phân lập và xác định được 10 hợp chất thuộc nhóm glycosid từ cao chiết (methanol 70 %) của lá cây Bàn tay ma trắng trồng tại huyện Phú Lương, tỉnh Thái Nguyên, trong đó có 5 hợp chất lần đầu tiên được công bố (Hình 1.1) [16].



Hình 1.1. Các hợp chất phenyl glycosid được phân lập từ lá cây Bàn tay ma trắng [16]

Đặc biệt trong các hợp chất mới, có tới 4 hợp chất macrocylic glycosid (**1-4**), đây là những hợp chất chuyển hóa thứ cấp, rất hiếm tìm thấy trong tự nhiên. Bên cạnh đó, nhóm nghiên cứu đã chứng minh rằng một số hợp chất phân lập từ loài này có khả năng giúp tăng dung nạp glucose trên mô hình *in vitro*. Đây là nghiên cứu đầu tiên được công bố về khả năng cải thiện hấp thu đường huyết của cây Bàn tay ma trắng [16].

Bên cạnh những hợp chất đã được phân lập, gần đây nhóm nghiên cứu của PGS.TS. Trần Văn Ơn đã tiến hành xác định các nhóm chất chính trong các bộ phận của cây Bàn tay ma trắng. Kết quả cho thấy thân, rễ và lá Bàn tay ma trắng có chứa nhiều các hợp chất nhóm flavonoid, đường khử và polyphenol. Ngoài ra còn có các hợp chất khác như caroten, polysarcharid, caroten, sterol và acid amin [9].

1.1.4. Loài Bàn tay ma đỏ - Heliciopsis lobata (Merr.) Sleumer

Tên khoa học : *Heliciopsis lobata* (Merr.) Sleumer

Tên Việt Nam : Bàn tay ma, Đũng, Đìa chụn

Chi : *Heliciopsis* Sleum

Họ : Protaceace

1.1.2.1. Đặc điểm thực vật

Loài Bàn tay ma đỏ cũng là loại cây thân gỗ, có chiều cao khoảng 5 – 20 m. Cành non và lá non có lông măng màu gỉ sắt [2, 33, 35, 36]. Lá lưỡng hình, phiến lá đơn hoặc xẻ hình lông chim; cuống lá dài 4 – 8 cm; phiến lá có lông, gốc hình nêm, có khía dọc ở mặt trục dọc theo các gân hình mạng sáng bóng, mép nguyên, đỉnh hơi nhọn; gân mạng nổi rõ. Phiến lá đơn thuôn dài, kích thước 10-25 × 5-7 cm. Phiến lá hình lông chim, kích thước 20-60 × 20-40 cm, 2 – 8 đôi thùy, các thùy hơi tròn. Cụm hoa hình chùy, nhiều lông; lá bắc của cặp hoa hình mác, ca. 1 mm. Cụm hoa đực dài 7 – 12 cm. Cụm hoa cái dài 2 – 5 cm. Bao hoa màu vàng nhạt, có lông tơ. Hoa đực: cuống hoa dài 1 – 2 mm đến không cuống; bao hoa dài 0,8 – 1,2 cm; bao phấn ca. 2mm; nhị hoa nhẵn. Hoa cái: cuống ca. 3mm; bao hoa ca. 1 cm, nhiều lông; bầu hình trứng, nhẵn; vòi nhụy ca. 8 mm, đỉnh hình chùy; đầu nhụy ở bên. Quả màu xanh hơi vàng, hình elipsoid đến hình elipsoid dạng hình trứng, hơi bị nén, kích thước 7-9 × 5-6 cm; vỏ quả ngoài ca. dày 1 mm; vỏ quả giữa dày 2 – 4 mm, nhiều sợi mềm và bền khi khô; vỏ quả trong dày 3 – 4 mm. Ra hoa từ tháng 5 đến tháng 7; ra quả tháng 11 đến tháng 12 [2, 35, 36].

1.1.2.2. Phân bố, sinh thái

Khác với sự phân bố rộng rãi của cây Bàn tay ma trắng, cây Bàn tay ma đỏ chưa thấy nói đến ở các nước khác trên thế giới mà chỉ thấy xuất hiện ở Việt Nam và ở vùng Hải Nam, Trung Quốc [3, 27, 36]. Ở Việt Nam, cây Bàn tay ma đỏ chủ yếu phân bố rải rác ở các tỉnh miền núi phía Bắc như Lào Cai, Yên Bái, Hà Giang, Bắc Kạn, Lạng Sơn, Tuyên Quang, Phú Thọ (huyện Thanh Sơn), Bắc Giang, Vĩnh Phúc (huyện Tam Đảo) [30, 35]. Ngoài ra còn phân bố ở Ninh Bình và ở Nghệ An [35].

Bàn tay ma đỏ thuộc loại cây gỗ nhỡ, mọc nhanh trong các rừng cây lá rộng thường xanh thứ sinh do khai thác gỗ, trên đất ferralit đỏ vàng, có nhiều mùn và tầng đất thịt sâu. Độ cao phân bố thường chỉ vài trăm mét, song không vượt quá độ cao 800 m. Cây mọc từ hạt, sau 8 – 10 năm mới có hoa quả nhiều, cây tái sinh tự nhiên tốt từ hạt. Quả cây chín có thể ăn được [3, 30].

1.1.2.3. Công dụng và bộ phận dùng

Theo dân gian, bộ phận dùng của Bàn tay ma đỏ là toàn cây, đã phơi hay sấy khô. Gần đây một số nhóm nghiên cứu tập trung khai thác vào thành phần hóa học và công dụng của lá cây. Dược liệu Bàn tay ma đỏ có vị nhạt, tính mát, có tác dụng thanh nhiệt, giải độc [3].

Theo điều tra, toàn cây Bàn tay ma được đồng bào người Dao ở vùng núi phía Bắc cắt nhỏ, phơi khô, sắc nước để uống với liều từ 60 – 90 g để chữa bệnh thấp khớp, nấu nước tắm cho phụ nữa sau sinh để chống đau nhức, phục hồi sức khỏe. Ngoài ra, dược liệu này cũng được người ta dùng để chữa bệnh lao hạch, viêm gan virus [3, 30, 35].

Ở Trung Quốc, lá cây Bàn tay ma đỏ được dùng để điều trị một số bệnh viêm như viêm tai giữa, viêm bàng quang và ở một số vùng người ta còn dùng để điều trị ung thư theo kinh nghiệm của dân gian [15].

Một số bài thuốc sử dụng Bàn tay ma đỏ tại Việt Nam theo tác giả Nguyễn Viết Thân điều tra được trong cộng đồng tại Việt Nam [30] như sau:

+ *Bài thuốc chữa phong thấp, đau mỏi xương khớp:* Vỏ rễ cây Bàn tay ma 12 g, Ngũ gia bì 12 g, Âm thạch quyết (*Humata repens*), sắc uống chung, ngày 1 thang.

+ *Chữa viêm gan vàng da lâu ngày:* Gỗ cây Bàn tay ma (cả vỏ) 15g, Hài nhi cúc 15 g, Cỏ mật gấu 10 g, Nhân trần 10 g, Nghệ vàng 10 g, sắc uống mỗi ngày 1 thang, dùng trong 7-10 ngày (1 liệu trình), sau 1 tuần dùng tiếp một liệu trình nữa.

+ *Bài thuốc chữa sản phụ sau khi sinh mệt mỏi, đau nhức người:* Cành lá cây Bàn tay ma từ 1-2 kg, sắc nước tắm.

1.1.2.4. Thành phần hóa học

Mặc dù theo dân gian, bộ phận dùng của Bàn tay ma đỏ là toàn cây, tuy nhiên các nghiên cứu gần đây chỉ tập trung nghiên cứu vào thành phần hóa học và công dụng của một số thành phần hóa học được phân lập từ lá cây này.

Nghiên cứu về các hợp chất của cây Bàn tay ma đỏ được công bố vào năm 2006 bởi nhóm nghiên cứu của tác giả Q. Q. He, Đại học Dược Trung Quốc. Nhóm nghiên cứu này đã phân lập và xác định được cấu trúc của 03 hợp chất phenolic glycosid từ dịch chiết nước sôi của lá cây Bàn tay ma đỏ trồng tại tỉnh Hải Nam, Trung Quốc [14]. Các hợp chất này là các dẫn xuất của arbutin, lần lượt là: 6′-[(E)-2″-hydroxymethyl, 2″-butenoyl] arbutin **(1)**, 6′-[(E)-4″-hydroxycinnamoyl] arbutin **(2)** và 6′-[(E)-3″,4″-dihydroxycinnamoyl] arbutin **(3).**

Năm 2008, hợp chất phenolic glycosid tiếp theo được đặt tên là 6′-E-(2″-methyl-2″-butenoyl) arbutin **(4)** từ lá Bàn tay ma đỏ được nhóm tác giả M. Liu phân lập và công bố với cấu trúc [11].

Cũng trong năm 2008, nhóm nghiên cứu của tác giả Dan Li đã sử dụng một số hệ sắc ký cột gồm cột silica gel, nhôm oxyd trung tính và Sephadex LH-20 để phân lập được 7 hợp chất tiếp theo từ lá cây Bàn tay ma đỏ [12]. Các hợp chất được nhóm tác giả phân lập và xác định cấu trúc lần lượt là: myricetin **(5)**; myricitrin **(6)**; syringetin-3-*O*-*β*-D-glucopyranoside **(7)**; hydroquinone **(8)**; D-1-*O*-methyl-Myo-inositol **(9)**; medioresinol **(10)** và *β*-sitosterol **(11)**.

Từ cao chiết cồn 70 % của lá cây Bàn tay ma đỏ, tác giả Mingsheng Liu cùng đồng nghiệp đã phân lập và tinh chế ra một dẫn xuất arbutin khác là 6′-(2,5-dihydroxycinnamoyl) arbutin **(12)** từ pha n-butanol lần lượt qua hệ sắc ký cột polyamid và Sephadex LH-20 [13].

Bốn dẫn xuất arbutin khác và grevillic acid cũng từ cao chiết nước lá Bàn tay ma đỏ được nhóm nghiên cứu của Trường đại học Dược Trung Quốc nghiên cứu phân lập vào năm 2016 [15]. Các hợp chất này bao gồm: 6'-[(E)-2''-methoxy- 5''-hydroxycinnamoyl] arbutin **(13)**, 2'-[(E)-2'', 5''- dihydroxycinnamoyl] arbutin **(14)**, 6'-[(E)-2''-hydroxymethyl-2''-butenylacyl] arbutin **(15)**, 6'-[(E)-4''-hydroxycinnamoyl] arbutin **(16)**, và acid grevillic **(17)**.

Trong các hợp chất đã phân lập từ các tác giả Trung Quốc, nhiều hợp chất vẫn còn mới, chưa được nghiên cứu hoặc định hướng nghiên cứu về tác dụng sinh học, tuy nhiên

cũng có nhiều hợp chất rất phổ biến và đã được chứng minh có tác dụng sinh học. Cụ thể như sau:

- ***Myricetin*** **(5)** là một flavonoid tự nhiên, có nhiều trong các loại rau, củ, hoa quả và có nhiều tác dụng sinh học quan trọng. Myricetin với khả năng nổi bật là chống oxy hóa và chống lại các gốc tự do nên giúp bảo vệ lipid khỏi quá trình proxyd hóa lipid [37]. Myricetin có thể làm giảm các tiến triển của quá trình ung thư da và ung thư phổi trên mô hình *in vivo* [38, 39]. Myricetin cũng làm ức chế quá trình phiên mã ngược của một số loại viru nên chất này cũng có khả năng chống lại sự phát triển của virus bạch hầu và một số virus ức chế miễn dịch ở người [40, 41]. Một số tác dụng khác của myricetin có thể kể đến như khả năng chống kết tập tiểu cầu, chống đông máu [42], chống xơ vữa động mạch [43, 44], khả năng điều trị tiểu đường trên mô hình *in vivo* [45], bảo vệ tế bào thần kinh khỏi sự oxy hóa do stress hoặc trong bệnh Parkinson [46] và khả năng chống viêm [45].

- ***Myricitrin (6)*** có khả năng làm giảm bớt rối loạn chức năng ty thể thần kinh gây ra bởi tác nhân độc thần kinh MPP^+ và tăng khả năng sống của gen DJ-1, một tác nhân của gen PARK7, do đó có khả năng làm giảm các thoái hóa thần kinh ở người cao tuổi, đặc biệt là giảm các triệu chứng của bệnh Parkinson [46, 47].

- Một số chất được phân lập bởi nhóm nghiên cứu W. Y. Qi năm 2016 đã được sàng lọc tác dụng chống ung thư trên dòng tế bào gây ung thư dạ dày MGC-803, tác dụng này ở mức vừa phải đối với các chất trên, riêng chất 2'-[(E)-2'', 5''-dihydroxycinnamoyl] arbutin **(14)** ở nồng động 20 µg/ml có thể ức chế tới 43 % sự phát triển của tế bào MGC-803 so với đối chứng.

Ở trong nước, nhóm nghiên cứu của tác giả Nguyễn Thị Phương Lan đã sàng lọc và chứng minh được trong lá cây Bàn tay ma đỏ thu hái tại tỉnh Cao Bằng có chứa các lớp hợp chất steroid, glycoside, triterpen, lipid và este. Các phân đoạn dịch chiết n-hexane, ethyl acetate, n-butanol của cao chiết methanol lá Bàn tay ma đỏ đều có khả năng kháng lại các dòng vi khuẩn *E. Coli, Salmonella, Streptococcus pyogenes, Shigella spp.* và *Staphylococcus aureus* [10].

Một số hợp chất cũng được tác giả Nguyễn Thị Phương Lan phân lập được, gồm: *β*-sitosterol **(18)**, *β*-sitosterol-3-*O*-*β*-D-glucopyranosid **(19)**, stigmast-5,22-dien-24R-3*β*-ol **(20)**, 3-acetyl-6-oxo-spirostan **(21)**, taraxerol **(22)**.

Cũng qua khảo sát sơ bộ các nhóm hợp chất trong các bộ phận của cây Bàn tay ma đỏ, DS. Hoàng Thị Quyên cho thấy các nhóm chất chính trong rễ, thân và lá cây Bàn tay ma đỏ gồm flavonoid, đường khử, polyphenol và polysarcharide và sterol [9]. Ngoài ra, trong rễ và thân cây còn có acid amin và caroten. Các kết quả này phù hợp với những nhóm chất mà các tác giả khác đã nghiên cứu bên trên.

1.1.5. So sánh hai loài Bàn tay ma qua các nghiên cứu đã công bố

Trong thực tế, cả hai loài *H. terminalis* và *H. lobata* cùng được sử dụng làm thuốc và dùng chung tên gọi Bàn tay ma. Gần đây, nhiều nơi đã nhận ra sự khác nhau giữa hai loài này và qua đặc điểm về thực vật đặt tên cho hai loài với tên gọi dân gian khác nhau là Bàn tay mà trắng và Bàn tay ma đỏ tương ứng. Đặc điểm thực vật của hai loài này nhiều tài liệu vẫn chưa thống nhất mô tả để phân biệt chúng, tác dụng điều trị của hai loài vẫn chưa được minh chứng làm rõ.

Hình 1.2. Một số bộ phận của cây Bàn tay ma trắng (trái) và Bàn tay ma đỏ (phải) [9]

Việc phân biệt hai loài này cả về đặc điểm thực vật và tác dụng điều trị là cần thiết. Theo thông tin chưa được công bố từ nhóm nghiên cứu của do PGS.TS. Trần Văn Ơn, Trường đại học Dược Hà Nội, chủ trì, các tác giả đã tiến hành phân biệt hai loài thông qua đặc điểm thực vật, và đặc điểm vi phẫu của chúng (Hình 1.2). Cũng trong nghiên cứu này, lần đầu tiên tại Việt Nam, hai loài cây Bàn tay ma được phân loại và giám định tên khoa học một cách đầy đủ [9]. Theo đó, một số đặc điểm quan trọng để giúp nhận biết và phân biệt hai loài này bao gồm:

**** Về đặc điểm hình thái:***

Nhìn tổng thể về hình thái thì hai loài này có một số đặc điểm khác nhau có thể sử dụng để nhận biết hai loài (Hình 1.2) như sau [9]:

Cây Bàn tay ma trắng *(H. terminalis)*	Cây Bàn tay ma đỏ (*H. lobata)*
+ Cao từ 5-10m, + Lông nhung tiêu giảm + Phần vỏ thân và vỏ rễ phía trong lớp bần màu màu trắng hơi vàng + Phần gỗ màu trắng ngà, có nhiều vân ngang màu vàng nhạt. + Cuống lá dài 5-10 cm, đường kính 5-8 mm, hơi phình ở gốc cuống. + Phiến lá dài 40-80 cm, rộng 20-40 cm + Mặt trên lá trưởng thành nhẵn, mặt dưới màu nhạt hơn, cả 2 mặt lá đều không có lông nhung. + Gân lá lồi rõ ở mặt dưới, hơi lồi ở mặt trên, không có lông.	+ Cao từ 10-20m + Phần thân và lá non màu nâu đỏ, có nhiều lông nhung bao phủ. + Phần vỏ thân và vỏ rễ phía trong lớp bần màu hồng đến đỏ và có nhựa mủ màu đỏ + Phần gỗ màu hồng, có nhiều vân ngang màu đỏ nâu. + Cuống lá dài 10-20 cm, đường kính 8-11 mm, phình to ở gốc cuống. + Phiến lá dài 60-120cm, rộng 40-80 cm + Mặt trên lá gần như không có lông hoặc có lông mọc tập trung trên gân lá, mặt dưới màu nhạt hơn, có lông nhung bao phủ. + Gân lá lồi cả 2 mặt, nổi nhiều hơn ở mặt dưới, bề mặt được bao phủ bởi lông.

**** Đặc điểm vi học:***

Đặc điểm vi phẫu rễ, thân và lá của hai lài này khá tương đồng nhau, đặc biệt là đặc điểm vi phẫu rễ thì gần như giống nhau hoàn toàn. Với hình ảnh vi phẫu lá và thân thì có thể phân biệt hai loài này thông qua sự xuất hiện của hình ảnh lông che chở ở loài Bàn tay ma đỏ, còn loài Bàn tay ma trắng thì không có [9].

Tương tự như vậy, hình ảnh soi bột lá và bột thân của hai loài cũng tương tự nhau, chỉ khác nhau ở đặc điểm về lông che chở có ở loài Bàn tay ma đỏ, trong khi đó, hình ảnh bột rễ của hai loài thì hoàn toàn như nhau. Điều này cũng phù hợp với hình ảnh vi phẫu thân và lá của hai loài [9].

**** Về hoá học***

Nhóm chức đặc trưng nhất của hai loài chính là polyphenol, được thể hiện qua sự xuất hiện phản ứng hóa học đặc trưng của các nhóm phenyl glycoside [9]. Tuy nhiên, chưa thấy sự trùng lặp về các chất đã công bố của các tác giả khác trong hai loài này. Kết quả phân tích sắc ký lớp mỏng của nhóm tác giả Hoàng Thị Quyên, Trần Văn Ơn cũng cho thấy sự khác nhau về thành phần hóa học của hai loài dược liệu này.

1.1.6. Tri thức sử dụng cây thuốc Bàn tay ma

Hai loài Bàn tay ma đỏ và trắng có hình thức tương đối giống nhau nên nếu chưa từng tiếp xúc với cả hai loài hoặc chưa có kinh nghiệm sử dụng thì khá khó để nhận biết và phân biệt hai loài này. Tri thức sử dụng hai loài này trong dân gian cũng đa dạng, việc sử dụng nhầm lẫn có thể ảnh hưởng đến khả năng điều trị bệnh của dược liệu này bởi vì thành phần các chất hóa học trong hai loài là rất khác nhau. Các kiến thức sử dụng để điều trị bệnh được viết trong các sách dược liệu hiện nay cũng chỉ từ điều tra trong nhân dân, nhưng chưa có số liệu rõ ràng [2, 3], thậm chí có tài liệu còn không tách biệt hai loài này trong sử dụng điều trị [30].

Trong cùng nghiên cứu trên, nhóm nghiên cứu của PGS.TS. Trần Văn Ơn, đã tiến hành điều tra tri thức sử dụng hai loài Bàn tay ma, vừa là giúp phân biệt hai loài, vừa đánh giá được tình hình sử dụng hai loài để điều trị bệnh trong nhân dân. Nhóm nghiên cứu đã tiến hành điều tra tri thức sử dụng của người dân tại xã Lục Bình (huyện Bạch Thông), xã Lạng San (huyện Na Rì) và xã Yên Mỹ (huyện Chợ Đồn) tỉnh Bắc Kạn và thu được các tri thức về phân loại, bộ phận dùng, cách chế biến, cách sử dụng cũng như công dụng và mức độ sử dụng cây Bàn tay ma tại địa phương theo phương pháp phỏng vấn bán cấu trúc với số lượng người cung cấp thông tin là 46, thu được kết quả sau:

1.1.6.1. Tỷ lệ nhận biết, tên gọi và thông tin phân biệt các loài

Thông qua hình ảnh minh họa và mẫu cây tươi, có khoảng 63 % số người nhận biệt được mẫu cây đang điều tra là Bàn tay ma. Trong đó, ở các địa phương có cây Bàn tay ma mọc thì tỉ lệ trả lời đúng cao hơn, lên tới trên 70 %, còn ở địa phương không có cây Bàn tay ma mọc thì tỉ lệ này chỉ khoảng 30 % mà thôi [9].

Trong số những người nhận biết được cây Bàn tay ma, họ đều gọi cây Bàn tay ma là “Mừ phi” (tiếng Tày), trong đó dịch theo tiếng Tày “mừ” có nghĩa là bàn tay, “phi” có nghĩa là ma, “mừ phi” nghĩa là bàn tay ma. Một số ít người biết được tiếng Kinh của cây đang hỏi là Bàn tay ma. Tuy nhiên, trong những người nhận biết được cây đang hỏi thì chỉ có 21 người biết được có 2 loài Bàn tay ma, trong 21 người này lại chỉ có 16 người có khả năng phân biệt được hai loài Bàn tay ma đỏ và trắng [9]. Tính ra chỉ có 16/46 người (chiếm 35 %) có thể phân biệt được hai loài này. Tỉ lệ này là khá nhỏ, chưa kể đến khả năng sử dụng để điều trị bệnh.

Trong những người có khả năng phân biệt 2 loài Bàn tay ma, họ đều dùng các đặc điểm hình thái để nhận dạng. Kết quả nghiên cứu trên cũng cho thấy, mặc dù có rất nhiều đặc điểm thực vật có thể dùng để phân biệt hai loài, nhưng đặc điểm về màu vỏ

thân, vỏ gỗ và màu gỗ được sử dụng để nhận thức nhiều nhất. Điều này có thể giải thích được bởi vì đây là hai bộ phận hay dùng nhất của hai loài Bàn tay ma đang nghiên cứu.

1.1.6.2. Công dụng của cây Bàn tay ma

Tỷ lệ người cung cấp tin cho rằng cây Bàn tay ma dùng để chữa các bệnh liên quan đến gan như: viêm gan, xơ gan, tăng men gan, uống nhiều rượu bia,…là 41,30 % (tương ứng với 19/46 người cung cấp tin). Trong đó có 21,05 % người biết công dụng chưa bệnh của cây bàn tay ma đánh giá loài Bàn tay ma đỏ có tác dụng tốt hơn loài Bàn tay ma trắng. Các triệu chứng được bệnh được mô tả cụ thể là chướng bụng, vàng da, vàng mắt, nước tiểu vàng, sợ thịt mỡ, sợ; nổi mụn trên lưng…[9]

Ngoài ra, một số rất ít người, khoảng 2 % cho rằng cây Bàn tay ma còn được dùng để chữa thấp tim, suy tim, đau nhức xương khớp.

1.1.6.3. Bộ phận dùng, cách chế biến và sử dụng

** Bộ phận dùng*

Có 15 trong số 46 người cung cấp tin chiếm (32,61 %) biết về bộ phận dùng của cây Bàn tay ma. Bộ phận dùng được trả lời nhiều nhất là thân và rễ, trong đó rễ hay được sử dụng hơn và được đánh giá là có tác dụng tốt hơn thân. Khi dùng thân, thường dùng 50-60 cm đoạn thân nằm sát mặt đất. Đôi khi dùng cả lá, nhưng không dùng để uống như thân và rễ mà dùng để đun nước tắm.

** Chế biến*

Dược liệu tươi sau khi thu hái về cần rửa sạch, thái nhỏ. Có thể dùng tươi nếu dùng trong vài ngày, muốn dùng trong thời gian lâu hơn cần phơi khô hoặc sao khô, tuy nhiên gỗ dễ bị mục nên không nên để lâu.

** Cách sử dụng*

- Để chữa bệnh về gan, thường dùng thân và rễ (khoảng 2 nắm tay dược liệu) đun sôi với nước ít nhất 15 phút, gạn lấy nước uống, ngày dùng 2-3 lần, có thể kết hợp với tắm bằng nước lá Bàn tay ma đun sôi. Để đạt được hiệu quả chữa bệnh tốt hơn, có thể dùng phối hợp Bàn tay ma với 2-3 dược liệu khác [9, 18, 30].

- Chữa bệnh về tim như suy tim, thấp tim thì cần dùng phối hợp với nhiều loại dược liệu khác thành các thang thuốc uống [30].

- Chữa bệnh đau nhức xương khớp phải phối hợp với nhiều loại dược liệu khác để đắp ngoài [2, 3].

- Có thể sử dụng nước sắc loãng từ thân và rễ cây Bàn tay ma thay thế nước uống hằng ngày để tăng cường chức năng gan [9].

** Mức độ đã sử dụng cây thuốc*

Mức độ sử dụng cây Bàn tay ma của người dân tại Bắc Kạn tương đối cao: 30,43 % người cung cấp tin đã từng sử dụng cây Bàn tay ma làm thuốc, trong số đó 10,87 % hay dùng và 2,10 % sử dùng thường xuyên [9].

Cây Bàn tay ma đã được sử dụng từ lâu đời và tri thức sử dụng của nó được truyền miệng từ thế hệ này qua thế hệ khác, tuy nhiên trong vài năm gần đây, mức độ sử dụng được đánh giá là tăng lên rõ rệt và các thầy lang cũng thu hái cây thuốc với số lượng lớn hơn mạnh làm cho số lượng cây trong rừng giảm đi đáng kể [2].

Hiện nay cây Bàn tay ma được thu hái từ rừng là chủ yếu, cây chưa được trồng tại vườn. Việc mua bán cây Bàn tay ma còn hạn chế, chủ yếu vẫn là thu hái từ tự nhiên. Trên thị trường giá bán Bàn tay ma khoảng 5.000-6.000đ/1 kg dược liệu khô [2].

1.2. Một số phương pháp đánh giá tác dụng bảo vệ gan

Gan là một trong những cơ quan lớn nhất của cơ thể, đảm nhận những chức năng vô cùng quan trọng đối với cơ thể như: biến đổi thức ăn thành những chất cần thiết cho sự sống và phát triển; sản xuất ra nhiều chất quan trọng sử dụng cho cơ thể; giải độc và bài tiết các chất độc trong cơ thể. Bên cạnh đó, gan cũng tạo ra mật, một chất dịch cần thiết cho sự tiêu hóa [48, 49]. Tuy nhiên, thực tế hiện nay là số người mắc các bệnh về gan mật ngày càng gia tăng và mức độ nghiêm trọng của bệnh cũng tăng lên đáng kể. Các bệnh lý gan mật phổ biến nhất phải kể đến rối loạn chức năng gan, tăng men gan, viêm gan, áp xe gan, xơ gan, ung thư gan, và bệnh lý đường mật.

Để hạn chế ảnh hưởng đến sức khỏe còn người, nhiều mô hình nghiên cứu thuốc tiền lâm sàng đã được ứng dụng để sàng lọc, phát triển thuốc mới cũng như kiểm chứng các thuốc đang sử dụng. Một số mô hình thử nghiệm bảo vệ gan *in vitro* và *in vivo* được sử dụng để sàng lọc tác dụng bảo vệ gan của hai dược liệu Bàn tay ma sẽ được trình bày trong luận án này.

1.2.1. Đánh giá tác dụng bảo vệ tế bào gan trên mô hình in vitro

Phương pháp đánh giá tác dụng bảo vệ tế bào gan trên mô hình *in vitro* thường sử dụng là phương pháp chứng minh khả năng bảo vệ tế bào gan của các mẫu nghiên cứu. Trong đó, dòng tế bào ung thư gan HepG2 hoặc Hep3B được sử dụng thay thế dòng tế bào gan thường, các tế bào này được nuôi cấy trong môi trường thích hợp để phát triển [50, 51].

Tác dụng bảo vệ gan được đánh giá thông qua việc so sánh sự phát triển của tế bào khi gây độc bằng CCl_4 hoặc paracetamol với tế bào được nuôi cấy trong cùng điều kiện nhưng có tác động của mẫu cần nghiên cứu. Kết quả này được xác định thông qua phương pháp MTT [52]. Mức độ duy trì sự phát triển hoặc làm giảm sự phá hủy của các tế bào ung thư gan khi của mẫu thử dưới tác động của chất gây độc thể hiện tác dụng bảo vệ tế bào gan của mẫu nghiên cứu [53]. Khi gây độc bằng CCl_4 thường sẽ cho kết quả nghiên cứu rõ ràng hơn là thử với paracetamol [54].

Phương pháp này thường được áp dụng để nghiên cứu tác dụng bảo vệ tế bào gan của các phân đoạn mẫu nghiên cứu đã được làm giàu chất định hướng tác dụng hoặc để đánh giá tác dụng này của các chất đã tinh chế [50, 53].

Sau khi xác định được khả năng bảo vệ tế bào gan của các mẫu nghiên cứu, những mẫu có tiềm năng sẽ tiếp tục được xem xét một số cơ chế liên quan như khả năng chống oxy hóa, khả năng quét gốc tự do, khả năng chống viêm.

1.2.1.1. Đánh giá khả năng chống oxy hóa của mẫu nghiên cứu trên mô hình in vitro

Một số tác nhân có khả năng gây oxy hóa mạnh như gốc tự do hoặc một số nhóm chất tương tự ($FeSO_4$, DPPH…) khi vào cơ thể sẽ gắn vào các phân tử sinh học quan trọng như protein, lipid, acid nucleic… gây ra nhiều nguy hại, điển hình như ung thư, xơ vữa động mạch, phá vỡ tế bào,.. [55]. Qua đó, chúng trực tiếp làm ảnh hưởng đến hoạt động sinh lý bình thường của cơ thể, thậm chí là bất hoạt một số cơ quan trong cơ thể. Khi tiếp xúc với chất gây hại, cơ thể sẽ có những phản ứng để chống lại các chất gây hại này [56]. Đối với các gốc tự do và các chất gây ra phản ứng oxy hóa, tế bào ở các cơ quan tiếp xúc với nó sẽ bị phá hủy, kèm với đó sẽ tạo ra các chất có khả năng phản ứng để ngăn chặn quá trình oxy hóa xảy ra hoặc làm giảm bớt tác động của các phản ứng ấy [56].

Phản ứng oxy hóa điển hình gây ra sự tổn hại nghiêm trọng của tế bào là quá trình peroxyd hóa lipid màng tế bào. Khi các phản ứng peroxyd hóa được kích hoạt, màng tế bào bị phá hủy và tế bào bị chết. Vì vậy, khi một mẫu nghiên cứu có khả năng ức chế phản ứng phản ứng peroxyd hóa lipid màng tế bào càng mạnh thì hoạt tính bảo vệ tế bào và chống oxi hóa càng tốt. Cơ chế đánh giá hoạt tính này dựa trên phản ứng tạo cặp của chất của acid thiobarbituric (TBA), là sản phẩm trực tiếp của phản ứng peroxyd hóa

lipid màng tế bào, với acid thiobarbituric (TBARs) để tạo chất hấp thụ quang phổ VIS ở bước sóng 532 nm [57].

Áp dụng nguyên lý này, để kiểm tra tác dụng bảo vệ gan có liên quan đến quá trình chống oxy hóa hay không, người ta cho tế bào gan hoặc dòng tế bào khác tương tự tiếp xúc với các chất oxy hóa (thường là $FeSO_4$, DPPH, gốc tự do $OH^{\cdot}$) [56]. Mẫu phân tích và chứng dương được đưa vào để đánh giá tác động chống oxy hóa. Sau quá trình thử nghiệm, xác định sản phẩm của quá trình peroxyd hóa lipid bằng cách cho phản ứng với TBA để tạo TBARs và đo độ hấp thụ ở 532 nm. Mẫu phân tích có tác dụng chống oxy hóa càng tốt thì sản phẩm của quá trình peroxyd hóa lipid càng ít.

Bên cạnh xác định khả năng chống oxy hóa qua phản ứng TBARs, mẫu phân tích còn có thể được đánh giá qua khả năng quét gốc tự do với DPPH ở các mức nồng độ khác nhau với mẫu đối chứng là acid ascorbic (Vitamin C) hoặc D,L-α tocopherol (Vitamin E), quercetin, acid gallic… và đo quang ở bước sóng thích hợp [58, 59].

1.2.1.2. Đánh giá khả năng chống viêm thông qua tác nhân nitric oxide và một số cytokine

Viêm là một phản ứng có lợi của cơ thể giúp chống lại sự xâm hại của các mầm bệnh hoặc các yếu tố có hại tác động vào cơ thể [60]. Khi phát hiện ra sự xâm nhập của yếu tố bất lợi, các dưỡng bào và các đại thực bào sẽ nhận biết và tiết ra các chất trung gian để kích hoạt các phản ứng viêm như chemokine, cytokine, amin vận mạch, eicosanoid và một số chất khác để phân giải protein. Tác dụng chính của các chất trung gian này là tạo ra các phản ứng viêm tại chỗ để loại bỏ các tác nhân gây hại, các dị vật được nhận dạng [61]. Hiện tượng các phản ứng xảy ra đồng loạt này thường gắn liền với các đáp ứng đặc trưng của cơ thể là sưng, nóng (sốt), đỏ, đau. Tuy nhiên, phản ứng viêm này không phải lúc nào cũng tốt vì nó không thể phân biệt được đâu là tế bào gây hại và đâu là tế bào lành [61, 62]. Chính vì vậy trong nhiều trường hợp phản ứng viêm quá độ còn tiêu diệt luôn cả các tế bào lành, làm tổn hại các cơ quan bị viêm, thậm chí còn ảnh ưởng đến toàn thân trong trường hợp phản ứng quá độ "bão cytokine" [62, 63].

Ngăn chặn các phản ứng viêm giúp tạo cơ hội để phát hiện, khoanh vùng và loại bỏ các tác nhân gây hại bằng cách kết hợp với các thuốc bảo vệ hoặc các biện pháp điều trị thích hợp, đồng thời cũng giúp cơ thể tạm thời không bị các yếu tự nhiên nội tại làm tổn thương [64].

Việc chống viêm sẽ được thực hiện theo hai phương án, một là ngăn chặn và loại bỏ yếu tố có hại, hai là ngăn chặn các tác nhân trung gian kích hoạt các phản ứng viêm. Cơ chế của các phản ứng viêm vẫn còn chưa rõ ràng hoàn toàn, tuy nhiên việc đánh giá kết quả của phản ứng viêm đã có mô hình cụ thể, thông qua xác định hàm lượng các chất tiền viêm, là các cytokine, trong huyết thanh [61]. Các cytokine thông dụng nhất hiện nay liên quan đến quá trình viêm có thể xác định được là interleukin-1 (IL-1), interleukin 6 (IL-6), interleukin 10 (IL-10) và yếu tố hoạt tử khối u *(tumor necrosis factor – TNF-α)*. Trong khi, IL-1, IL-6 và TNF-α là bộ ba chất trung gian kích hoạt phản ứng viêm (hay còn gọi là các interleukin tiền viêm) [65], IL-10 cũng được tạo ra trong quá trình viêm nhưng bởi tế bào lympho T, và có tác dụng chống viêm, điều tiết quá trình viêm trở về cân bằng và bảo vệ các tế bào lành trong cơ thể [66].

Như vậy, trong phép thử phản ứng viêm, mẫu có tác dụng tốt là mẫu làm cho hàm lượng các cytokine IL-1, IL6 và TNF-*α* giảm đi, còn hàm lượng IL-10 tăng lên. Hiện nay việc định lượng các cytokine này trên mô hình *in vitro* để đánh giá tác dụng chống viêm của các mẫu nghiên cứu đã có thể thực hiện được rộng rãi ở nhiều phòng thí nghiệm. Trong đó, dòng tế bào thử tác dụng viêm là dòng tế bào đại thực bào của chuột *RAW 264.7* được kích hoạt tạo phản ứng viêm bằng cách cho tiếp xúc với độc tố của vi khuẩn (thường sử dụng lipopolysaccharid – LPS) có mặt mẫu thử ở các nồng độ khác nhau [31, 67]. Các bộ kit thử nghiệm thương mại cũng đã được thiết kế sẵn giúp phép thử đơn giản và có độ chính xác cao [68, 69].

Nitric oxide (NO) được tổng hợp bởi nhiều loại tế bào khác nhau trong cơ thể, cùng với các cytokine IL-1, IL6 và TNF-α, NO được xem như là một trong những tín hiệu quan trọng giúp kích hoạt các phản ứng miễn dịch và phản ứng viêm trong cơ thể để chống lại các tác nhân gây hại bên ngoài tấn công [70-73]. Ức chế sản sinh NO cũng chính là ức chế sự kích thích quá trình viêm.

Quá trình đánh giá khả năng ức chế sản sinh NO của mẫu nghiên cứu cũng được thực hành trên dòng tế bào đại thực bào của chuột *RAW 264.7* được kích hoạt sản sinh NO bằng cách cho tiếp xúc với độc tố của vi khuẩn (thường sử dụng lipopolysaccharid – LPS) có mặt mẫu thử ở các nồng độ khác nhau [74]. Mẫu sau nghiên cứu đươc phản ứng tạo màu với thuốc thử Griess để đo độ hấp thụ quang và tính toán lượng NO sinh ra trong quá trình phản ứng [75].

Gan đảm nhiệm nhiều vai trò quan trọng, và tiếp xúc và phân giải nhiều loại đối tượng khác nhau, nên khả năng gặp phải chất độc hại hoặc các vi khuẩn, virus gây bệnh là khó tránh khỏi. Khi gan gặp vấn đề, NO cùng với các tín hiệu miễn dịch khác được kích thích để sinh ra nhiều hơn nhằm kích hoạt các phản ứng miễn dịch và viêm chống lại các tác nhân gây hại. Phản ứng miễn dịch và phản ứng viêm thường là phản ứng có lợi cho cơ thể, nhưng khi nó được kích hoạt quá mức sẽ gây ra rất nhiều tác hại, cần phải kiểm soát. Như vậy, đánh giá tác dụng ức chế sản sinh NO và đánh giá các thông số của IL-1, IL6, TNF-α và IL-10 là một trong những nội dung liên quan cần được nghiên cứu khi đánh giá tác dụng bảo vệ gan [76, 77].

1.2.2. Đánh giá tác dụng bảo vệ gan trên mô hình in vivo

Các phép thử trên mô hình *in vivo* được tiến hành trước khi nghiên cứu sâu hơn về hóa học để khẳng định tác dụng của mẫu thử, để xác định liều dùng của mẫu thử hoặc để khẳng định các kết quả sau khi đã nghiên cứu *in vitro* trước khi sử dụng cho người. Tác dụng bảo vệ gan *in vivo* thường được tiến hành trên mô hình chuột cống hoặc chuột nhắt gây độc gan bằng CCl_4 hoặc paracetamol ở liều cao [78-82].

Đánh giá tác dụng bảo vệ gna trước hết người ta quan tâm đến sự thay đổi hình thái gan. Theo đó, các chỉ tiêu ban đầu sẽ được xem xét là tỉ lệ khối lượng gan, hình thái gan (quan sát hình ảnh giải phẫu đại thể gan, và mô bệnh học vi phẫu) [78, 80].

Khi tiếp xúc với các tác nhân gây độc gan, cơ chế giải độc gan sẽ được kích hoạt để chống lại tác động của chất độc. Khi đó, tế bào gan sẽ bị phá hủy một phần, giải phóng ra các enzyme alanine transaminase (ALT) và aspartate transaminase (AST), đây là hai enzyme có nhiều nhất ở tế bào gan, khi tế bào gan bị vỡ sẽ giải phóng vào trong máu khiến cho nồng độ hai enzyme này tăng lên nhiều so với bình thường [82]. Kèm theo đó là quá trình peroxyd hóa lipid màng tế bào gan, và quá trình kích thích sản sinh ra glutathion (GSH) để chống lại các tác nhân oxy hóa xảy ra tại gan [80, 81].

Như vậy, khi gan bị gây độc, hàm lượng enzyme ALT, AST trong máu tăng lên, các sản phẩm của quá trình peroxyd hóa lipid (cơ chất của acid thiobarbituric) và hàm lượng GSH tại gan tăng lên. Các chỉ số này được xác định bằng các bộ kit thuốc thử và phương pháp định lượng tương ứng.

Một số chỉ tiêu khác cũng phản ánh mức độ tổn thương gan như chỉ số ALP (alkaline phosphate), chỉ số bilirubin và cholesterol toàn phần cũng phản ánh mức độ

tổn thương gan [83, 84]. Tuy nhiên, các chỉ số này thay đổi còn phụ thuộc vào trạng thái hoạt động của các cơ quan khác. ALP được sinh ra chủ yếu bởi các tế bào gan, xương và thận, do đó chỉ số ALP tăng không chỉ liên quan đến rối loạn chức năng gan mà còn liên quan đến rối loạn chức năng của xương, của thận [83, 85]. Bilirubin có nguồn gốc từ việc quá trình phá hủy các tế bào hồng cầu (do già đi và chết hoặc do bệnh lý tan máu) và được chuyển hóa ở gan rồi đào thải qua đường tiêu hóa, tiết niệu [86]. Tăng chỉ số bilirubin có thể do chức năng gan kém hoặc tan hồng cầu trong máu [85, 87, 88]. Còn với cholesterol, mặc dù được tổng hợp và ester chính tại gan, nhưng việc tăng cholesterol còn phụ thuộc vào chế độ ăn, tuổi tác, cân nặng, mức độ vận động…. chứ không phải tăng cholesterol toàn phần là nghĩ ngay đến tổn thương gan [89]. Do đó, các chỉ số ALP, bilirubin và cholesterol toàn phần cũng là các chỉ số để đánh giá chức năng gan nhưng không phải lúc nào cũng được đưa vào để đánh giá tác dụng bảo vệ gan trong các mô hình các nghiên cứu đánh giá tác dụng bảo vệ gan *in vivo*.

Để đánh giá tác dụng bảo vệ gan của mẫu nghiên cứu, chuột được chia thành các lô khác nhau, trong đó có lô chứng dương, chứng bệnh, chứng sinh lý và các lô sử dụng mẫu nghiên cứu ở các liều khác nhau. Khả năng bảo vệ gan của mẫu nghiên cứu được đánh giá thông qua khả năng phục hồi các chỉ số và trạng thái gan so với chứng sinh lý và chứng bệnh lý [78-82].

Những mẫu nghiên cứu có tác dụng bảo vệ gan còn được đánh giá thêm độc tính cấp ở mô hình *in vitro* và *in vivo* để xác định độ an toàn cho người sử dụng.

Trên mô hình *in vitro*, xác định độc tính trên tế bào được thực hiện theo phương pháp của Monks [90]. Đây là phương pháp thử độ độc tế bào được thực hiện theo phương pháp thử độ độc tế bào ung thư *in vitro* được Viện Ung thư Quốc gia Hoa Kỳ (National Cancer Institute – NCI) xác nhận là phép thử độ độc tế bào chuẩn nhằm sàng lọc, phát hiện các chất có khả năng kìm hãm sự phát triển hoặc diệt TBUT ở điều kiện *in vitro*.

Trên mô hình *in vivo*, độc tính cấp của mẫu nghiên cứu được đánh giá theo hướng dẫn của Bộ Y tế đã ban hành [91].

1.2.3. Phương hướng áp dụng các mô hình bảo vệ gan trong luận án

Do kiến thức sử dụng các dược liệu Bàn tay ma trong nhân dân theo điều tra còn chưa có tính nhất quán cao [9], việc đánh giá tác dụng bảo vệ gan của hai loài dược liệu

này là cần thiết. Để khẳng định tác dụng bảo vệ gan của các dược liệu, luận án sẽ tiến hành đánh giá tác dụng bảo vệ gan đồng thời trên hai phương diện:

+ Đánh giá tác dụng bảo vệ gan trên mô hình *in vivo* của hai dược liệu qua cao chiết nước của hai dược liệu (phương pháp sắc thuốc truyền thống).

+ Đánh giá tác dụng bảo vệ gan của các thành phần hóa học đã phân lập được từ hai dược liệu trên mô hình *in vitro*.

Kết quả bảo vệ gan trên mô hình *in vivo* của cao chiết nước và các thành phần hóa học có hoạt tính bảo vệ gan sẽ giúp khẳng định tác dụng bảo vệ gan của dược liệu nghiên cứu. Sau khi tác dụng bảo vệ gan được đánh giá, dược liệu sẽ được đánh giá độ an toàn qua phép thử độc tính cấp, phép thử độc tế bào thường. Các hoạt chất có độ an toàn cao sẽ được đánh giá tiếp một số cơ chế bảo vệ gan như khả năng chống oxy hóa, ức chế sản sinh yếu tố NO và ức chế/cảm ứng cytokine tiền viêm.

1.3. Chất đánh dấu của dược liệu và phương pháp xác định

Thực vật đã được chứng minh là nguồn tài nguyên dược liệu lớn nhất đã và đang được con người sử dụng để điều trị bệnh. Việc ứng dụng khoa học công nghệ để phát triển và hiện đại hóa lĩnh vực y, dược cổ truyền đang là xu thế hiện nay trên thế giới. Bên cạnh việc sử dụng dược liệu để phát triển các nguồn thuốc mới, việc đánh giá tác dụng điều trị, kiểm soát chất lượng của các dược liệu hiện hành là rất quan trọng [92-97]. Kiểm soát chất lượng dược liệu gắn liền với các đặc tính của dược liệu và các thành phần hóa học đặc trưng hay còn gọi là "chất đánh dấu hóa học" (chemical markers) của dược liệu (sau đây sẽ được gọi tắt là "chất đánh dấu").

1.3.1. Chất đánh dấu của dược liệu và ứng dụng

Nhiều dược liệu vẫn được nhân dân ta sử dụng để điều trị bệnh, nhưng không phải dược liệu nào cũng được kiểm soát chất lượng một cách khoa học [2, 3, 35, 98]. Để có được dược liệu được tốt, cần phải được tiến hành kiểm soát chất lượng từ khâu trồng trọt cho đến khâu thu hái, chế biến và sử dụng [92, 93, 95, 96, 99]. Muốn vậy, bên cạnh có các phương pháp phân tích hiện đại, cần phải nghiên cứu xác định được các thành phần chính quyết định tác dụng của dược liệu mới có thể đánh giá được tất cả các khâu trong quá trình trên. Các thành phần chính như vậy của dược liệu được gọi là các chất đánh dấu của dược liệu.

Theo Tổ chức Y tế thế giới (World Health Oganization – WHO), chất đánh dấu của dược liệu là những chất đối chiếu mà được xác định thành phần về mặt hóa học của dược liệu ấy. Chất này có thể đóng góp hoặc không đóng góp về mặt điều trị của dược liệu [94]. Tuy nhiên đối với nhiều chất, cho dù chất ấy góp phần vào tác dụng điều trị, nhưng bằng chứng về hiệu quả điều trị lâm sàng của các chất ấy không phải lúc nào cũng sẵn có. Vì vậy, WHO và Cơ quan dược phẩm châu Âu (European Medicines Agency – EMA) hướng dẫn lựa chọn chất đánh dấu theo hai tiêu chí:

+ Chất đánh dấu phải có tác dụng điều trị hoặc có tác dụng sinh học liên quan đến tác dụng điều trị của dược liệu [94, 100].

+ Nếu các chất tìm được của dược liệu mà không có tác dụng, dược liệu và các sản phẩm liên quan của dược liệu có thể được kiểm soát chất lượng bằng các chất đánh dấu với các thành phần đặc trưng khác [94].

Số lượng dược liệu hiện nay rất lớn, nhưng những dược liệu đã được tìm ra chất đánh dấu và có chất đánh dấu được sử dụng để kiểm soát chất lượng là chưa nhiều [1-3, 35]. Một số chất đánh dấu điển hình đang được sử dụng trong các dược điển [98, 101-103], như:

+ Artemisinin dùng định tính và định lượng Thanh hao hoa vàng; acid ganoderic A dùng định tính và định lượng Nấm linh chi; silymarin dùng định tính và định lượng cao khế sữa; gentiopicrin dùng định tính và định lượng dược liệu Tần giao; lobetyolin dùng định tính Đảng sâm; curcumin dùng định tính và định lượng Nghệ; notoginsenosid R_1, ginsenosid Rg1, ginsenosid Rb1 dùng định tính và định lượng Tam thất; ginsenosid Re, ginsenosid Rb1 và ginsenosid Rg1 dùng kiểm tra chất lượng dược liệu nhân sâm;….

+ Trong trường hợp chưa xác định được chất chính có tác dụng, nhóm chất có thể được sử dụng làm chất đánh dấu của dược liệu như trường hợp của dược liệu Giảo cổ lam (định lượng bằng saponin toàn phần), Ngải cứu và Quế (dùng tinh dầu là nhóm chất đánh dấu)…

Chất đánh dấu thường là thành phần hóa học chính và đại diện cho tác dụng sinh học chính của dược liệu nên nếu có phương pháp định tính, định lượng thích hợp, chất đánh dấu của dược liệu mang đến nhiều giá trị thực tiễn trong ứng dụng phát triển và kiểm soát chất lượng dược liệu [104], gồm:

- *Kiểm tra chất lượng dược liệu:* Dược liệu được kiểm tra theo các giám sát của cơ quan quản lý hoặc được cơ sở sản xuất kiểm tra trước khi đưa vào dây chuyền sản xuất theo quy định của GMP theo các tiêu chuẩn cơ sở, tiêu chuẩn dược điển.

- *Phân biệt nguồn gốc các loại dược liệu và xác định vùng trồng dược liệu:* Các dược liệu được trồng ở các vùng khác nhau, điều kiện trồng khác nhau có thể sẽ cho thành phần các chất trong dược liệu khác nhau. Qua hàm lượng các chất đánh dấu và tỷ lệ hàm lượng các chất đánh dấu có thể phân biệt được nguồn gốc của các dược liệu. Ngoài ra, qua hàm lượng của các chất đánh dấu có thể lựa chọn được vùng trồng tốt nhất hoặc điều kiện nuôi trồng tốt nhất cho dược liệu.

- *Xác định thời gian thu hái:* Hàm lượng các chất trong dược liệu có thể thay đổi theo mùa, theo thời gian trồng trọt, đặc biệt là các dược liệu là lá hoặc quả thì ảnh hưởng rất nhiều bởi mùa thu hái. Cần xác định hàm lượng các chất đánh dấu của dược liệu để lựa chọn thời điểm thu hái hợp lý, cho hàm lượng chất lớn nhất.

- *Xác định bộ phận dùng của dược liệu:* Bộ phận dùng của dược liệu khác nhau cũng có thể thành phần hóa học của chúng cũng khác nhau nhiều do mục đích tổng hợp các chất của các bộ phận dược liệu là khác nhau. Các dược liệu trước đây được dùng theo kinh nghiệm của nhân dân, sau này khi các phương tiện phân tích hiện đại phát triển đã dần xác định được các chất đánh dấu riêng cho từng bộ phận dùng. Khi ấy, bộ phận dùng nào của cây phù hợp nhất với tác dụng điều trị sẽ được lựa chọn để sử dụng thông qua các chất đánh dấu.

- *Xác định điều kiện bảo quản và thời hạn sử dụng của dược liệu:* Nhiều chất trong dược liệu có độ ổn định không cao, nhất là các chất dễ bị oxy hóa hoặc những chất dễ bị phân hủy bởi nhiệt độ. Xác định được đích danh các chất đánh dấu của dược liệu và xây dựng được phương pháp định lượng các chất sẽ giúp theo dõi được độ ổn định của dược liệu, qua đó xác định được thời gian bảo quản của dược liệu. Dựa vào các điều kiện bảo quản khắc nghiệt để phân hủy các chất trong dược liệu, đánh giá hàm lượng chất đánh dấu ở các điều kiện ấy sẽ giúp xác định được điều kiện ổn định nhất của dược liệu và xây dựng được tiêu chí bảo quản thích hợp cho dược liệu.

- *Xây dựng qui trình chiết xuất trong sản xuất các sản phẩm từ dược liệu:* Chất đánh dấu thường là chất đại diện cho hoạt tính sinh học của các dược liệu. Sau khi xác định được các chất đánh dấu và phương pháp định lượng chất đánh dấu, chất đánh dấu

được sử dụng nhằm tối ưu hóa qui trình chiết xuất hoặc tinh chế để sản xuất cao, sản phẩm từ dược liệu. Các điều kiện tối ưu sao cho hàm lượng chất đánh dấu có được trong sản phẩm là lớn nhất, hiệu quả kinh tế cao nhất.

- *Ứng dụng trong nghiên cứu thuốc mới:* Rất nhiều hoạt chất tân dược được nghiên cứu phát triển từ các thành phần hóa học của dược liệu. Từ các chất đánh dấu của dược liệu, người ta có thể đánh giá tác dụng tiền lâm sàng, lâm sàng qua các pha rồi sử dụng làm chất ấy để ứng dụng trong sản xuất thuốc ở qui mô công nghiệp hoặc từ khung của chất đánh dấu, người ta có thể thay đổi cấu trúc để tối ưu hóa tác dụng của các chất này, nhằm nâng cao hiệu quả điều trị.

1.3.2. Phương pháp xác định chất đánh dấu của dược liệu

Từ các đặc trưng và vai trò của đánh dấu, các tiêu chí của chất được lựa chọn là chất đánh dấu của một dược liệu sẽ gồm [94, 100]:

+ Là thành phần có hàm lượng đủ lớn trong dược liệu;

+ Nếu là chất đánh dấu định lượng thì phải có tác dụng đặc trưng cho tác dụng điều trị của dược liệu;

+ Nếu là chất đánh dấu định tính dược liệu thì phải đặc trưng cho dược liệu đó hoặc loài của dược liệu đó. Nếu chất đánh dấu vừa là định tính, vừa là định lượng sẽ phù hợp nhất, còn nếu không thì có thể chọn chất đánh dấu đặc trưng hơn để định tính.

+ Các chất đánh dấu nên là chất mà có khả năng đánh giá được bằng các phương pháp thông thường như TLC, HPTLC, HPLC, hoặc GC.

+ Các chất đánh dấu khác nhau có thể được lựa chọn cho cùng một dược liệu khi nó được chuẩn bị bằng các cách khác nhau hoặc theo tác dụng điều trị khác nhau của dược liệu ấy.

+ Chất đánh dấu cho một dược liệu có thể là một chất hoặc một nhóm chất đặc trưng của dược liệu.

1.3.3. Phương pháp xác định chất đánh dấu có tác dụng bảo vệ gan trong dược liệu Bàn tay ma

Theo hướng dẫn của WHO và EMA, phương pháp lựa chọn chất đánh dấu cho dược liệu Bàn tay ma sẽ được dự kiến lựa chọn như sau [94, 95]:

+ Lựa chọn chất đánh dấu có tác dụng bảo vệ tế bào gan từ kết quả thử nghiệm *in vivo* và *in vitro*. Chất đánh dấu cần phải là chất có tác dụng bảo vệ gan trong dược liệu có tác dụng bảo vệ gan.

+ Nếu có nhiều chất có tác dụng, lựa chọn một số chất có hàm lượng lớn để làm chất đánh dấu.

+ Chất đánh dấu phải an toàn trong phạm vi điều trị (ở nồng độ có tác dụng không gây độc tế bào gan và tế bào thường).

+ Phương pháp định tính, định lượng chất đánh dấu dự kiến sẽ xây dựng trên các phương pháp phân tích thông dụng hiện nay, ưu tiên phương pháp HPLC detector DAD vì phương pháp này là phương pháp phổ biến tại các phòng thí nghiệm, vừa có khả năng định lượng, vừa có khả năng định tính chất đánh dấu.

1.4. Tóm tắt các vấn đề đề tài luận án cần giải quyết

Từ các nghiên cứu trong và ngoài nước về hai loài Bàn tay ma *H. terminalis* và *H. lobata* đặc biệt là nghiên cứu gần đây nhất của nhóm tác giả Hoàng Thị Quyên và Trần Văn Ơn về thực vật, thành phần hóa học và tri thức sử dụng hai loài này ở Việt Nam, có thể rút ra một số nhận xét rằng:

- Hai loài có đặc điểm thực vật tương đối tương đồng nhau, một số đặc điểm nổi bật nhất giúp phân biệt hai loài là loài Bàn tay ma đỏ có lông che chở màu hồng ở thân, ngọn và lá; loài Bàn tay ma trắng không có. Màu sắc vỏ rễ, vỏ thân và gỗ của dược liệu Bàn tay ma đỏ có màu hồng đến đỏ; dược liệu Bàn tay ma trắng các bộ phận này màu trắng. Cây Bàn tay ma trắng phân bố rộng rãi hơn cây Bàn tay ma đỏ. Vì hai loài này tương đối giống nhau về hình thức nên việc phân biệt hai loài này vẫn còn khá khó khăn trong nhân dân.

- Thành phần hóa học hai loài cũng tương đối giống nhau về nhóm chất, nhưng các chất trong đó lại khác nhau.

- Lá cây ít được sử dụng ở Việt Nam, nhưng thành phần hóa học của lá cả hai loài lại đã được nghiên cứu bởi nhiều nhóm khác nhau. Thân và rễ hai loài Bàn tay ma được sử dụng nhiều ở Việt Nam nhưng chưa có nhiều nghiên cứu về nó.

- Hai loài Bàn tay ma đỏ và trắng đều được sử dụng làm thuốc, bệnh phổ biến nhất đang được người dân vùng Tây Bắc sử dụng dược liệu Bàn tay ma để điều trị là bệnh gan. Loài Bàn tay ma đỏ được cho là có tác dụng tốt hơn loài Bàn tay ma trắng.

- Hiện nay mức độ sử dụng hai loài Bàn tay ma ngày càng phổ biến hơn, nhưng tồn tại một số vấn đề cần phải giải quyết đi đôi với với điều này. Thứ nhất, nguồn dược liệu đang sử dụng chủ yếu là nguồn tự nhiên, vai trò của hai loài này chưa được đánh giá đúng đắn để có biện pháp bảo tồn, phát triển. Thứ hai, cả hai dược liệu Bàn tay ma đều là cây gỗ lâu năm, trên thị trường các dược liệu này được thương mại với bộ phận dùng chủ yêu là thân, cành hoặc rễ đã phơi khô. Trong đó thân và cành được bán phổ biến hơn là rễ cây. Nếu sử dụng rễ cây thì rất khó bảo tồn và phát triển nguồn dược liệu; còn nếu thân và cành mà có tác dụng thì khi cắt bớt thành phần cây để lấy dược liệu vẫn duy trì được sự phát triển của cây mà ít ảnh hưởng đến cây. Cuối cùng, kiến thức sử dụng của hai loài này vẫn còn phức tạp, chưa nhất quán, cần đánh giá đúng khả năng bảo vệ gan của mỗi loài để lựa chọn loài dược liệu phù hợp khi điều trị.

Như vậy, cần phải có những nghiên cứu sâu hơn để cung cấp thêm các minh chứng về tác dụng điều trị bệnh của hai loài này, nhất là tác dụng điều trị bệnh gan như kinh nghiệm dân gian đang sử dụng. Đồng thời cần phải nghiên cứu sâu hơn về thành phần hóa học của hai loài này để xác định các chất đánh dấu, giúp kiểm soát chất lượng dược liệu, đồng thời là đích để phát triển các dạng bào chế hiện đại để tiện dụng hơn, hoặc phục vụ cho mục đích phân phối, kinh doanh để mang lại giá trị nhiều hơn cho cộng đồng. Đánh giá đúng tiềm năng của các loài dược liệu này giúp đưa ra những chính sách hợp lý để bảo tồn, phát huy nguồn dược liệu quý tại Việt Nam.

Vì các lý do trên, đề tài của luận án tập trung nghiên cứu phân tích thành phần và tác dụng sinh học của các hợp chất phân lập từ hai loài dược liệu Bàn tay ma trắng và Bàn tay ma đỏ, từ đó xác định chất đánh dấu và xây dựng phương pháp định tính, định lượng chất đánh dấu để phục vụ công tác tiêu chuẩn hóa, kiểm soát chất lượng, thu hái và chế biến dược liệu. Các phương pháp đã được đề cập bên trên rất khả thi để áp dụng cho đề tài nhằm đáp ứng các yêu cầu của quá trình hiện đại hóa ngành y, dược cổ truyền.

CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Mẫu cây tươi của dược liệu Bàn tay ma trắng và dược liệu Bàn tay ma đỏ được thu hái ở huyện Bạch Thông, tỉnh Bắc Kạn vào tháng 12/2019 và tháng 8/2021, được giám định thực vật bởi ThS. Nghiêm Đức Trọng, Trường Đại học Dược Hà Nội (Phụ lục 5) với tên khoa học là *Heliciopsis terminalis* (Kurz.) Sleumer và *Heliciopsis lobata* (Merr.) Sleumer, cả hai loài đều thuộc chi Heliciopsis Sleum, họ Quắn hoa (Protaceace).

Hình 2.1. Mẫu tiêu bản dược liệu và bột dược liệu Bàn tay ma trắng (lấy từ phần thân và cành của cây Bàn tay ma trắng – *Heliciopsis terminalis*)

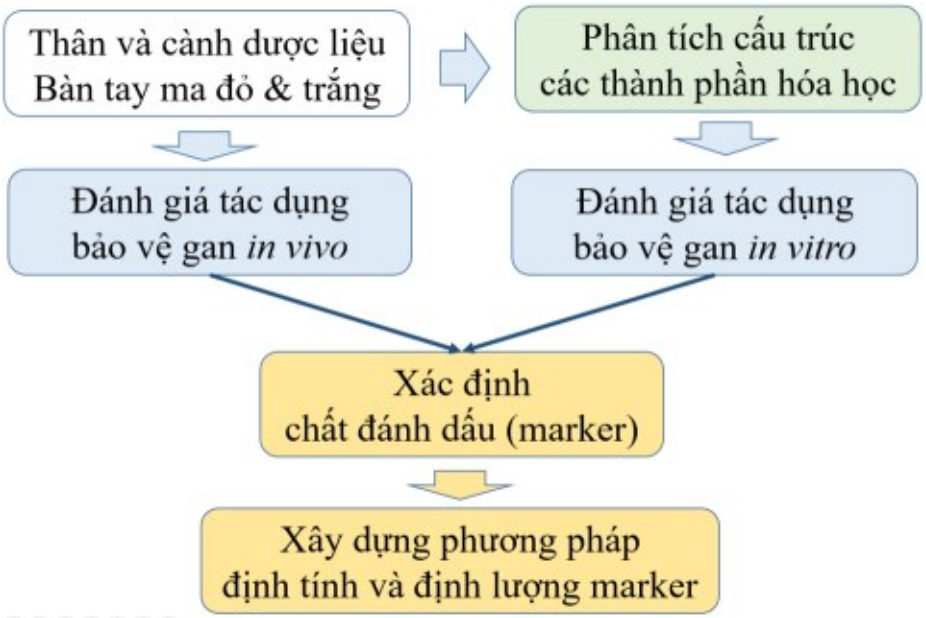
Hình 2.2. Mẫu tiêu bản dược liệu và bột dược liệu Bàn tay ma đỏ (lấy từ phần thân và cành của cây Bàn tay ma đỏ – *Heliciopsis lobata*)

Gỗ của các cây này (thân và cành) được cắt thành lát mỏng, phơi khô, nghiền nhỏ. Các mẫu phần gỗ và bột được lưu tiêu bản tại Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương với các mã số lần lượt là:

+ Dược liệu Bàn tay ma trắng: HTG1219 và HTB1219 cho mẫu thu hái năm 2019; HTG0821 và HTB0821 cho mẫu thu hái năm 2021 (Hình 2.1);

+ HLG1219 và HLB1219 cho mẫu thu hái năm 2019; HLG0821 và HLB0821 cho mẫu thu hái năm 2021 (Hình 2.2).

2.2. Phương pháp nghiên cứu



Hình 2.3. Sơ đồ nghiên cứu dược liệu Bàn tay ma đỏ và Bàn tay ma trắng

Đề tài thực hiện nhằm phân tích xác định các hợp chất có tác dụng bảo vệ gan của hai loài dược liệu, từ đó xây dựng phương pháp định tính và định lượng các hợp chất này trong dược liệu phục vụ công tác kiểm tra, giám sát chất lượng dược liệu sau này. Do đó, các nội dung chính của đề tài tập trung nghiên cứu vào thân và cành Bàn tay ma trắng (*H. terminalis)* và Bàn tay ma đỏ (*H. lobata)*, gồm: Áp dụng các phương pháp phân tích hóa lý hiện đại để xác định cấu trúc các hợp chất hóa học trong hai loài dược liệu; đánh giá tác dụng bảo vệ gan trên mô hình *in vivo* với cao chiết của hai dược liệu và tác dụng bảo vệ tế bào gan của các hợp chất được phân lập từ hai loài. Sau khi khẳng định được tác dụng bảo vệ gan của mỗi loài và các chất liên quan, tiếp tục tiến hành đánh giá một số cơ chế liên quan tác dụng bảo vệ gan cũng như đánh giá độ an toàn của cao chiết, và của các hợp chất tiềm năng. Từ các chất tiềm năng sẽ sàng lọc ra

các chất phù hợp làm chất đánh dấu đại diện cho tác dụng bảo vệ gan của dược liệu đang nghiên cứu. Tiếp đó, luận án sẽ nghiên cứu xây dựng phương pháp phân tích chất đánh dấu có tác dụng bảo vệ gan để sau này phục vụ kiểm soát chất lượng dược liệu. Mô hình nghiên cứu hai dược liệu được thể hiện như Hình 2.3.

Để thực hiện các nội dung trên, đề tài sử dụng các phương pháp nghiên cứu sau:

2.2.1. Áp dụng các phương pháp phân tích hóa lý hiện đại để phân tích cấu trúc một số thành phần hóa học của hai loài Bàn tay ma

2.2.1.1. Chiết xuất dược liệu

Phương pháp sử dụng là siêu âm bột dược liệu và methanol với tỷ lệ dược liệu – dung môi là 1 : 3 (kl/tt) ở nhiệt độ không quá 50 ^{o}C. Chiết lặp lại 03 lần, gom dung dịch sau siêu âm để cô quay loại dung môi để thu được cao chiết methanol.

Cao chiết methanol sau đó được thêm nước tạo thành hỗn dịch trong pha nước, hỗn dịch này được lần lượt chiết với các dung môi ít phân cực như n-hexane, dichloromethane và ethyl acetate. Bay hơi dung môi ở các phân đoạn dung môi để thu được cao chiết ở các pha. Lựa chọn dung môi thích hợp để chiết 3 lần ở mỗi pha với tỉ lệ pha nước và pha dung môi hữu cơ là 1 : 1.

2.2.1.2. Phân lập các thành phần hóa học từ cao chiết dược liệu

Cao chiết được ở các phân đoạn được phân lập và tinh chế trên các hệ sắc ký kết hợp pha thuận và pha đảo (gồm cả sắc ký cột và sắc ký lỏng điều chế). Các phân đoạn được phát hiện bằng sắc ký lớp mỏng (TLC) hoặc sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC).

** Phương pháp sắc ký lớp mỏng:*

Chất mang Silica gel 60 GF254 (0,25 mm; Merck), RP-18 F254S (0,25 mm; Merck). Một số dung môi thông thường dùng để triển khai bản mỏng như: n-hexane, chloroform, ethyl acetate, acetone, methanol và nước. Các chất được phát hiện bằng đèn tử ngoại ở hai bước sóng 254 nm và 365 nm hoặc phun dung dịch H_2SO_4 10 % trong ethanol và sấy khô đến khi hiện vết.

** Phương pháp sắc ký cột điều chế:*

Cao chiết ở các phân đoạn được triển khai trên hệ sắc ký cột với các chất hấp phụ được lựa chọn để sử dụng là: silica gel (0,040-0,063 mm; Merck); và RP-18 (0,2 mm; Merck) hoặc RP18 (30-50 µm; Fujisilisa Chemical Ltd.) hoặc Diaion HP-20 (Misubishi Chem. Ind. Co., Ltd.) cho hệ sắc ký pha đảo.

Pha động cho hệ sắc ký pha thuận là hỗn hợp của các dung môi n-hexane, dichloromethane, ethyl acetate, methanol, acetone và nước ở các tỷ lệ thích hợp. Trong khi đó, hệ sắc ký lỏng pha đảo dùng hệ dung môi là hỗn hợp nước với acetone hoặc methanol. Các phân đoạn được gom bằng máy hứng phân đoạn tự động DC-1500C EYELA (Tokyo Rikakikai, Nhật Bản). Vết chất ở các phân đoạn được phát hiện bằng sắc ký lớp mỏng TCL hoặc bằng thiết bị HPLC Shimdazu LC20 A detector PDA (Shimadzu, Nhật Bản) với điều kiện thử thích hợp.

** Phương pháp sắc ký lỏng điều chế:*

Điều chế chất tinh khiết bằng thiết bị sắc ký lỏng điều chế Pure C-850 BUCHI (Thụy Sỹ) với điều kiện sắc ký như sau: Cột C18 (250 x 10 mm; 5 µm); tốc độ dòng 4,0 ml/phút; thể tích tiêm từ 0,8 – 1,2 ml. Rửa giải bằng hỗn hợp dung môi nước và acetonitrile hoặc methanol với các tỷ lệ thích hợp. Các chất được phát hiện bằng detector PDA ở các cực đại hấp thụ phù hợp.

2.2.1.3. Nghiên cứu phân tích xác định cấu trúc hóa học các thành phần

Các hợp chất sau khi được tinh chế đến độ tinh khiết thích hợp, được đo phổ khối, phổ cộng hưởng từ hạt nhân, phổ lưỡng sắc tròn (CD), phổ hồng ngoại (IR) để xác định cấu trúc. Cấu trúc của các chất được xác định từ các tài liệu tham khảo hoặc từ các dữ liệu phổ thu được.

** Phổ khối lượng phân giải cao HR-ESI-MS:*

Sử dụng thiết bị phân tích phổ khối phân giải cao Agilent 6530 Accurate Mass QTOF LC/MS của Viện Hóa sinh biển, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

** Phổ cộng hưởng từ hạt nhân NMR:*

Phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) được đo trên máy: Bruker AM500 FT-NMR của Viện Hoá học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Chất chuẩn là TMS (Tetramethyl Silane).

Các kỹ thuật đo phổ cộng hưởng từ sử dụng thực hiện luận án gồm:

+ Phổ cộng hưởng từ hạt nhân một chiều: ^{1}H-NMR, ^{13}C NMR và DEPT.

+ Phổ cộng hưởng từ hạt nhân hai chiều: HSQC, HMBC, COSY và NOESY.

Dung môi hòa tan các mẫu bao gồm methanol_d_4, chloroform_d_1 và DMSO_d_6. Dung môi được lựa chọn sao cho phải hòa tan được mẫu phân tích và các tín hiệu phân tích không bị che khuất.

** Phổ lưỡng sắc tròn (CD):*

Phổ lưỡng sắc tròn của mẫu nghiên cứu được đo trên thiết bị đo phổ CD ChirascanTM CD spectrometer (Applied Photophysics Ltd., Surrey, UK) tại Viện Hóa sinh biển – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

** Phương pháp xác định đường:*

Thực hiện theo phương pháp của Laurence Voutquenne (Phụ lục 1.1) [105] và Lihua Yan (Phụ lục 1.2) [106].

2.2.2. Đánh giá tác dụng bảo vệ gan của hai loài Bàn tay ma

2.2.2.1. Đánh giá tác dụng bảo vệ gan của cao chiết nước dược liệu Bàn tay ma trắng (H. terminalis) và dược liệu Bàn tay ma đỏ (H. lobata) trên mô hình in vivo

** Chuẩn bị mẫu:*

Mẫu dược liệu (thân và cành) của hai loài Bàn tay ma trắng và đỏ được nghiền nhỏ, xác định độ ẩm lần lượt là 8,6 % và 8,4 %.

Lấy 2,0 kg bột dược liệu khô, thêm 5 lít nước, đun sôi trong 2 giờ. Gạn lấy dịch chiết. Làm lặp lại quá trình chiết thêm 2 lần, gộp dịch chiết của 3 lần, lọc. Cô quay chân không ở 80 ^{o}C để thu được cao chiết đặc quánh.

Cao chiết sau khi cô của hai dược liệu như sau:

+ Cao chiết nước dược liệu Bàn tay ma trắng (BTMT): Khối lượng 62 g, độ ẩm 29 % (hiệu suất chiết khoảng 3,1 %);

+ Cao chiết nước dược liệu Bàn tay ma đỏ (BTMĐ): Khối lượng 80 g, độ ẩm 32 % (hiệu suất chiết khoảng 4,0 %).

Cao chiết sau đó được thêm nước với lượng thích hợp để pha loãng và cho chuột uống ở các thí nghiệm.

** Đánh giá tác dụng bảo vệ gan:*

Tác dụng bảo vệ gan của hai dược liệu nghiên cứu được tiến hành trên mô hình chuột nhắt trắng, gây độc gan bằng paracetamol (PAR) [54, 81, 107, 108]. Mẫu đối chứng dương là silymarin [109].

Chuột nhắt trắng chủng Swiss albino, cả hai giống, khỏe mạnh, trọng lượng 25,0 ± 2,0 g (nguồn gốc Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương) được sử dụng để nghiên cứu đánh giá tác dụng bảo vệ gan. Chuột được nuôi trong điều kiện đầy đủ thức ăn và nước uống theo nhu cầu tại phòng thí nghiệm của Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương trước 7 ngày và trong suốt thời gian nghiên cứu.

Chuột nhắt trắng thí nghiệm được chia ngẫu nhiên làm 10 lô, số lượng chuột trong mỗi lô được chia cụ thể như sau:

+ Lô 1 (đối chứng sinh lý, 8 con): Chuột uống nước cất;

+ Lô 2 (đối chứng bệnh lý, 14 con): Chuột uống PAR và nước cất;

+ Lô 3 – 5 (lô thử, 14 con): Chuột uống PAR và cao chiết BTMĐ;

+ Lô 6 – 8 (lô thử, 14 con): Chuột uống PAR và cao chiết BTMT;

+ Lô 9 (đối chứng dương, 8 con): Chuột uống PAR và silymarin liều 70 mg/kg.

Chuột thí nghiệm được uống nước hoặc mẫu nghiên cứu liên tục trong 7 ngày. Ở lô chứng dương, chuột uống silymarin liều 70 mg/kg (tính liều từ viên nang Legalon, của hãng Madaus, lô B1602390, chứa 70 mg silymarin). Chuột ở các lô thử uống mẫu nghiên cứu theo thiết kế liều ở Bảng 2.1.

Bảng 2.1. Liều cao chiết sử dụng cho chuột thử nghiệm [110]

Đối tượng sử dụng/qui đổi	**Liều thí nghiệm (g/kg)**		
Liều quy đổi dược liệu sử dụng trên người	60,0	120,0	240,0
Liều qui đổi dược liệu sử dụng trên chuột	14,4	28,8	57,6
Liều cao chiết BTMĐ cho chuột uống	0,56	1,15	2,30
Liều cao chiết BTMT cho chuột uống	0,45	0,89	1,79

Cuối ngày thứ 4, cho chuột nhịn đói, nước uống tự do. Ngày thứ 5, sau uống 1 giờ, gây tổn thương gan chuột ở tất cả các lô (trừ lô chứng sinh lý) bằng uống PAR (liều 200 mg/kg với thể tích 0,1 ml/10g thể trọng chuột (tính liều từ viên nén Paracetamol, sản xuất bởi Sanofi Aventis, lô 17094, chứa 500 mg paracetamol). Ngày thứ 6, sau uống 1 giờ, gây tổn thương gan chuột ở tất cả các lô (trừ lô chứng sinh lý) bằng uống PAR liều 350 mg/kg với thể tích 0,1 ml/10g thể trọng chuột. Ngày thứ 7, sau khi cho chuột uống (nước hoặc mẫu thử) 1 giờ, chuột ở tất cả các lô bị giết để lấy máu và gan [82].

Máu được để đông tự nhiên ở nhiệt độ phòng khoảng 60 phút, li tâm 3000 v/phút trong 10 phút, hút lấy huyết thanh để định lượng hoạt độ enzyme aspartate aminotransferase (AST) và alanine aminotransferase (ALT). ALT, AST huyết thanh và protein gan được đo bằng kit sẵn có do hãng Erba (Séc) cung cấp theo hướng dẫn của nhà sản xuất bằng thiết bị định lượng sinh hóa bán tự động Humanlyser 2000 (Đức) [111].

Mẫu gan được cân để xác định tỷ lệ khối lượng tương đối giữa gan và khối lượng chuột, quan sát đại thể và định lượng các cơ chất (là sản phẩm của quá trình peroxyd hóa lipid) phản ứng với acid thiobarbituric (TBARs).

Định lượng TBARs: Định lượng TBARs theo phương pháp Wasowich và Balahoroglu [112, 113]. Quy trình định lượng TBARs được tóm tắt như sau: cân 100 mg gan, nghiền đồng thể trong 1 ml dung dịch đệm RIPPA bằng máy nghiền bi Ultr Turrax T25 của (IKA Labortechnik). Hút 100 µl dịch đồng thể cho vào ống nghiệm có 1ml H_2O, thêm vào đó 1 ml dung dịch acid thiobarbituric 0,25 % pha trong acid acetic, đun cách thủy nhiệt độ 100 ^oC trong 60 phút, để nguội, thêm 25 µl HCl 5N, lắc đều, thêm vào 3,5 ml n-butanol, ly tâm 3000v/phút x 10 phút bằng máy ly tâm Mikro 22R của hãng Hettich (Đức), hút phần n-butanol đo quang ở bước sóng 532 nm bằng thiết bị quang phổ UV-VIS mini 1240 (Shimadzu – Nhật Bản).

Hàm lượng TBARs được tính theo phương trình hồi quy tuyến tính của chất chuẩn là 1,1,3,3-tetraethoxypropane với các nồng độ 0,2; 0,3; 0,4; 0,6 và 0,8 nmol/ml. Giá trị TBARs được thể hiện dưới dạng nmol/g protein gan. Lượng TBARs trong mẫu thử giảm so với đối chứng gây bệnh sẽ biểu hiện khả năng ức chế quá trình peroxy hóa lipid (POL) của chất thử.

2.2.2.2. Đánh giá hoạt tính bảo vệ tế bào gan của các hợp chất phân lập từ dược liệu Bàn tay ma đỏ và dược liệu Bàn tay ma trắng

Trên mô hình *in vitro,* tác dụng bảo vệ tế bào gan của các mẫu nghiên cứu được thử nghiệm trên dòng tế bào ung thư gan HepG2 khi gây độc bằng CCl_4. Mô hình này được tiến hành theo 2 bước, nuôi cấy tế vào và thử tác dụng bảo vệ tế bào gan dưới tác động của CCl_4 (xem Phụ lục 1.2) [53, 54].

2.2.2.3. Đánh giá tác dụng chống oxy hóa

** Đánh giá khả năng quét gốc tự do DPPH:*

Hoạt tính quét gốc tự do 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) được thử nghiệm theo phương pháp được mô tả bởi nhóm nghiên cứu của các tác giả Saito [114] và K. Pyrzynska [115], tiến hành tại Khoa Dược lý, Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương. Quy trình thử nghiệm theo Phụ lục 1.3.1.

** Đánh giá khả năng chống quá trình peroxyd hóa lipid trên mô hình in vitro*

Phương pháp chống oxi hóa thông qua ức chế quá trình peroxidation lipid màng tế bào (thử nghiệm MDA) được thực hiện theo phương pháp của N. Zhu cùng cộng sự

và của Viện Dược liệu - Bộ Y Tế (2006), có sự thay đổi nhỏ cho phù hợp với điều kiện của phòng thí nghiệm [116]. Quy trình thử nghiệm theo Phụ lục 1.3.2.

2.2.2.4. Đánh giá khả năng ức chế NO

Khả năng ức chế NO được thực hiện trên các mẫu đã xác định được là có tác dụng bảo vệ gan và có độ an toàn cao trên mô hình *in vitro*. Phép thử này được thực hiện trên mô hình gây độc dòng tế bào đại thực bào RAW264.7, tiến hành qua hai bước: nuôi cấy tế bào (nhân tế bào lên) và thử tác dụng ức chế NO [74, 75, 117]. Qui trình thử nghiệm tiến hành theo Phục lục 1.4.

2.2.2.5. Đánh giá khả năng cảm ứng/ức chế cytokine

Khả năng cảm ứng/ức chế cytokine của các mẫu nghiên cứu được đánh giá trên dòng đại thực bào RAW 264.7 tương tự như với phép thử khả năng ức chế NO. Phép thử cần tiến hành qua hai giai đoạn: nuôi cấy tế bào và thử tác động cytokine. Các cytokine được quan tâm là IL-6, IL-10 và TNF-α [51, 75]. Quy trình thử nghiệm mô tả chi tiết ở Phụ lục 1.5.

2.2.2.6. Đánh giá độc tính tế bào trên mô hình in vitro

Phương pháp thử tác dụng bảo vệ tế bào gan được thực hiện theo mô hình phổ biến được sử dụng là nhuộm Sulforhodamin B (SRB) [97]. Dòng tế bào được chọn để thử nghiệm độc tính là dòng tế bào gốc thận ở phôi người (human embryonic kidney cells) với mã là HEK-293A. Phép thử được thực hiện theo Phụ lục 1.6.

2.2.2.7. Đánh giá độc tính cấp của cao chiết nước dược liệu trên mô hình in vivo

Độc tính cấp được đánh giá theo quy định hiện hành của Bộ Y tế [91] và tác giả Đỗ Trung Đàm [118]. Quy trình thử nghiệm mô tả chi tiết theo Phụ lục 1.7.

2.2.3. Xây dựng quy trình định tính và định lượng chất đánh dấu có tác dụng bảo vệ gan của hai loài Bàn tay ma

2.2.3.1. Xác định chất đánh dấu có tác dụng bảo vệ gan của hai loài Bàn tay ma

Chất đánh dấu được xác định theo hướng dẫn của Tổ chức Y tế thế giới (WHO) và EMA [96, 100], bao gồm:

+ Là chất chính (có thành phần lớn), đại diện cho mẫu nghiên cứu;

+ Là chất có hoạt tính bảo vệ gan và có độ an toàn tương đối cao;

+ Khả thi để định tính và định lượng bằng các phương pháp thường quy.

Trong nền mẫu dược liệu đa dạng và phức tạp về thành phần hợp chất, phương pháp định tính và định lượng hợp chất có tác dụng bảo vệ gan được ưu tiên là phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao.

2.2.3.2. Xây dựng phương pháp định tính chất đánh dấu có tác dụng bảo vệ gan của hai loài Bàn tay ma

- *Định tính bằng phương pháp HPLC:* Tiến hành cùng phần định lượng.

- *Thẩm định phương pháp định tính:* Thẩm định độ đặc hiệu của phương pháp theo hướng dẫn của ICH và AOAC [119, 120].

2.2.3.3. Xây dựng phương pháp định lượng chất đánh dấu có tác dụng bảo vệ gan của hai loài Bàn tay ma

- *Xây dựng phương pháp:*

+ Xây dựng chương trình sắc ký định lượng mẫu nghiên cứu;

+ Xây dựng phương pháp chuẩn bị mẫu.

- Thẩm định phương pháp định lượng: Thẩm định theo các tiêu chí hướng dẫn của AOAC, gồm: Độ đặc hiệu, độ thích hợp hệ thống, độ tuyến tính, giới hạn định lượng, độ đúng và độ lặp lại.

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Cấu trúc của một số thành phần hóa học được phân lập từ dược liệu Bàn tay ma trắng và dược liệu Bàn tay ma đỏ

3.1.1. Phân tính xác định cấu trúc một số thành phần hóa học từ loài Bàn tay ma trắng (H. terminalis)

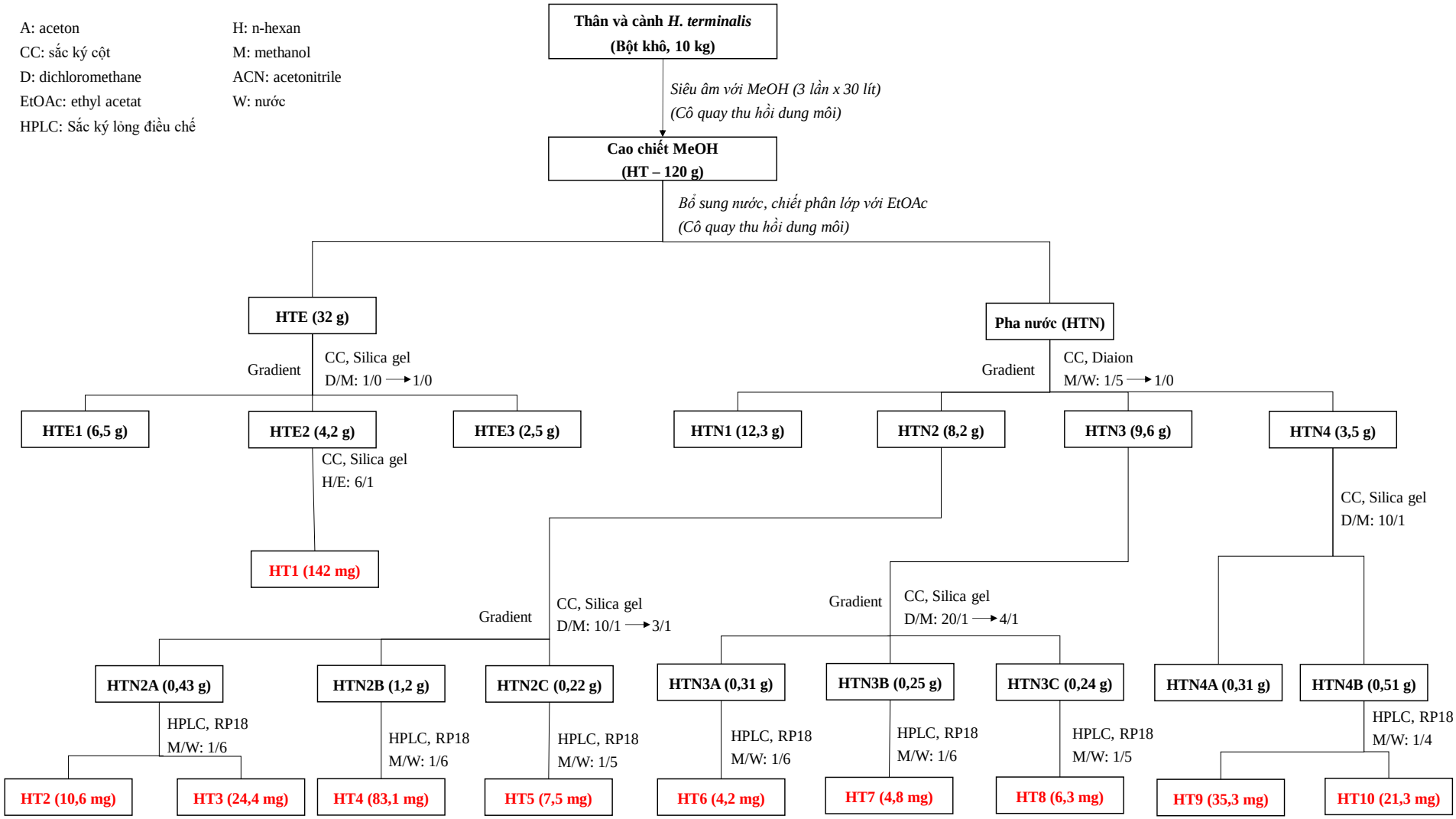
Thân và cành cây Bàn tay ma trắng *(H. terminalis)* được chặt nhỏ, phơi khô, nghiền thành bột (10 kg). Chiết siêu âm 3 lần với 30 lít methanol, mỗi lần siêu âm 2 giờ. Gộp dịch chiết 3 lần, cô quay chân không để loại dung môi thu được 120 g cao chiết methanol toàn phần **(HT)**.

Cao chiết **HT** được thêm vào 3 lít nước để phân bố. Thêm 3 lít ethyl acetate, chiết lắc phân bố hai pha, để phân lớp, rút dịch ethyl acetate. Lặp lại quá trình thêm 2 lần, gộp dịch chiết ethyl acetate và bay hơi dung môi, thu được 32 g cao ethyl acetate **(HTE)**. Pha nước được cô quay bay hơi đến hết ethyl acetate, thêm nước để pha loãng, lọc, thu được dịch chiết nước **(HTN)**.

Phân đoạn ethyl acetate **(HTE)** được phân tách trên cột silica gel, rửa giải gradient bằng hệ dung môi dichloromethane/methanol với tỉ lệ methanol tăng dần từ *(1: 0→0:1, v/v)*. Sau rửa giải thu được 5 phân đoạn nhỏ hơn gồm: **HTE1** (6,5 g), **HTE2** (4,2 g) và **HTE3** (2,2 g). Phân đoạn **HTE1** là phân đoạn chứa nhiều chất không phân cực dạng dầu, không nghiên cứu phân đoạn này. Phân đoạn **HTE5** thử đánh giá qua sắc ký lớp mỏng ở các điều kiện khác nhau, không có vết chất hiển thị trên bản mỏng. Phần này có thể chứa nhiều chất phân cực hoặc các chất keo, bỏ không phân tích tiếp.

Phân đoạn **HTE2** được tiếp tục phân tách trên sắc ký cột silica gel, pha động là n-hexane/ethyl acetate với tỷ lệ *(6/1, v/v)*, thu được 01 phân đoạn. Tiến hành đánh giá bằng sắc ký lớp mỏng cho thấy phân đoạn này tinh khiết. Như vậy phân đoạn **HTE2** thu được chất tinh khiết **HT1** (142 mg). Chất này thu được lượng khá lớn.

Dịch chiết nước **(HTN)** được đưa lên hệ sắc ký cột với pha tĩnh là hạt nhồi diaion, rửa giải gradient bằng hỗn hợp methanol/nước với tỷ lệ tăng dần từ 20 % đến 100 %, thu được 4 phân đoạn **HTN1** (12,3 g), **HTN2** (8,2 g), **HTN3** (9,6 g) và **HTN4** (3,5 g). Theo bản chất của hệ sắc ký cột diaion, phần **HTN1** là phân đoạn chứa các chất phân cực, đường, muối… nên không được phân tích tiếp.



Hình 3.1. Sơ đồ phân lập và tinh chế các hợp chất từ loài Bàn tay ma trắng *(H. terminalis)*

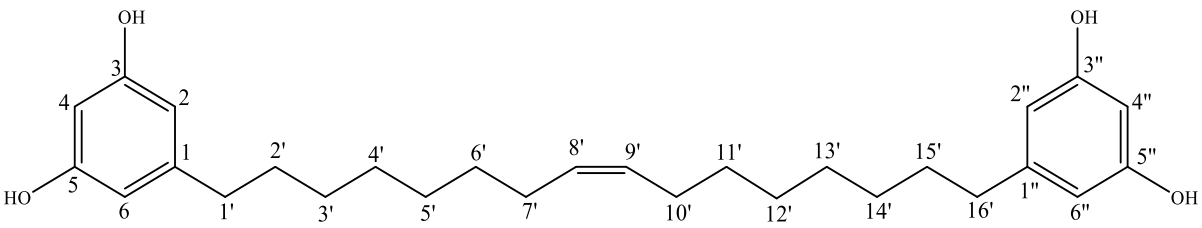
Phần **HTN2** được nhồi lên cột silica gel, rửa giải gradient bằng hệ pha động dichloromethane/nước với tỉ lệ tăng dần từ *(10/1 ⟶ 3/1, v/v)*, thu được 3 phân đoạn **HTN2A** (0,43 g), **HTN2B** (1,24 g) và **HTN2C** (0,22 g). Tiếp tục tinh chế các phân đoạn này trên hệ sắc ký lỏng điều chế, cột RP18, pha động sử dụng để rửa giải cho ba phân đoạn là hỗn hợp methanol/nước với tỷ lệ thể tích lần lượt là *(1/6, 1/6 và 1/5)*. Sau tinh chế, phân đoạn **HTN2A** cho chất **HT2** (10,6 mg) và **HT3** (24,4 mg); phân đoạn **HTN2B** cho chất **HT4** (83,1 mg); phân đoạn **HTN2C** cho chất **HT5** (7,5 mg). Chất **HT4** có lượng khá lớn.

Phân đoạn **HTN3** được phân tách trên cột silica gel, rửa giải gradient bằng hỗn hợp dichloromethane/nước với tỉ lệ tăng dần từ *(20/1⟶ 4/1, v/v)* thu được 3 phân đoạn nhỏ hơn, gồm **HTN3A** (0,31 g), **HTN3B** (0,25 g) và **HTN3C** (0,24 g). Các phân đoạn này được hòa trong methanol, tiếp tục tinh chế trên hệ sắc ký lỏng điều chế, cột RP18, pha động sử dụng để rửa giải là hỗn hợp methanol/nước với tỷ lệ (về thể tích) là 1/6, 1/6 và 1/5 tương ứng cho ba phân đoạn, thu được ba chất tinh khiết **HT6** (4,2 mg), **HT7** (4,8 mg), **HT8** (6,3 mg).

Phân đoạn **HTN4** được phân tách trên cột silica gel với pha động là dichloromethane/methanol *(10/1, v/v)*, thu được hai phân đoạn **HTN4A** (0,31 g) và **HTN4B** (0,51 g). Kiểm tra bằng HPLC, phân đoạn **HTN4A** không có vết chất tách riêng, bỏ không phân tách tiếp. Phân đoạn **HTN4B** chứa vết của hai chất tác biệt, được tiếp tục điều chế trên sắc ký lỏng điều chế RP18. Rửa giải bằng hệ dung môi methanol – nước tỷ lệ 1 : 4 (v/v) thu được hai chất tinh khiết **HT9** (35,3 mg) và **HT10** (21,3 mg). Sơ đồ qui trình phân lập và tinh chế các chất từ cây Bàn tay ma trắng *(H. terminalis)* được trình bày ở Hình 3.1.

Các chất tinh khiết sau khi phân lập, tinh chế được kiểm tra hình thái, xác định các thông số phổ HR-ESI-MS và NMR để xác định cấu trúc. Kết quả như sau:

*3.1.1.1. Hợp chất **HT1***

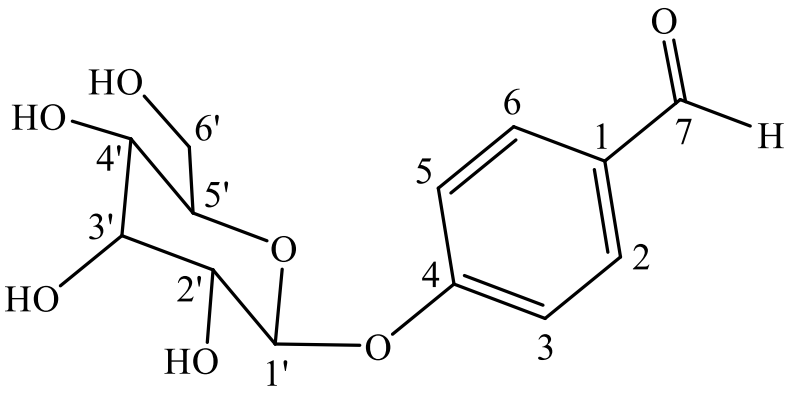


Hình 3.2. Cấu trúc hóa học của hợp chất **HT1**

Bột vô định hình màu trắng. Phổ HR-ESI-MS *m/z* 463,2799 $[M+Na]^+$. Phổ ^{1}H-NMR (500 MHz, CD_3OD): $\boldsymbol{\delta_H}$ 6,15 (1H, *t*, *J* = 2,0 Hz, H-2, H-6, H-2″, H-6″); 6,11 (1H, *t*, *J* = 2,0 Hz, H-4, H-4″); 2,45 (2H, *t*, *J* = 7,5 Hz, H-1′); 1,57(2H, *m*, H-2′, H-15′); 1,33 (2H, *m*, H-3′, H-4′, H-5′, H-6′, H-11′, H-12′, H-13′, H-14′); 5,35 (1H, *t*, *J* = 4,5 Hz, H-8′, H-9′); 2,03 (2H, *m*, H-10′); 2,45 (2H, *t*, *J* = 7,5 Hz, H-16′). Phổ ^{13}C-NMR (125 MHz, CD_3OD): $\boldsymbol{\delta_C}$ 146,4 (C-1, C-1″); 108,0 (C-2, C-6, C-2″, C-6″); 159,2 (C-3, C-5, C-3″, C-5″); 101,0 (C-4, C-4″); 37,0 (C-1′, C-16′); 32,4 (C-2′, C-15′); 30,7 (C-3′, C-14′); 30,8 (C-4′, C-13′); 30,3 (C-5′; C-6′, C-11′, C-12′); 28,1 (C-7′, C-10′); 130,8 (C-8′, C-9′).

Từ các kết quả phân tích phổ kết hợp với so sánh tài liệu tham khảo, hợp chất **HT1** được xác định là *(Z)*-5,5'-(hexadec-8-ene-1,16-diyl)bis(benzene-1,3-diol), một hợp chất đã biết năm 1997 từ loài *Grevilea glauca* [121] (xem Phục lục 2.1.1). Hợp chất này có công thức phân tử là $C_{28}H_{40}O_4$ và công thức cấu tạo được trình bày ở Hình 3.2.

*3.1.1.2. Hợp chất **HT2***



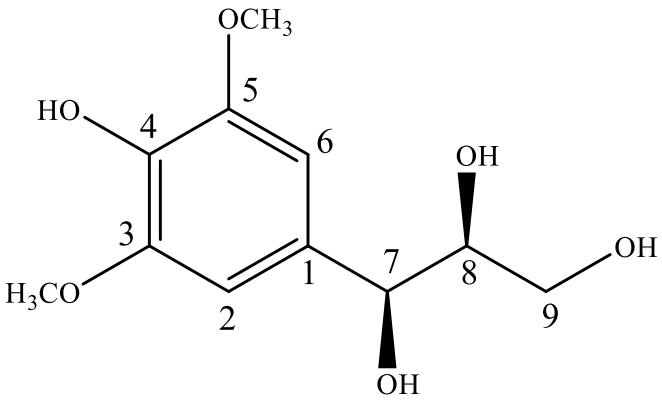
Hình 3.3. Cấu trúc hóa học của hợp chất **HT2**

Chất rắn vô định hình màu trắng. Phổ HR-ESI-MS *m/z* 319,0594 $[M+Cl]^-$. Phổ ^{1}H-NMR (500 MHz, DMSO-*d6*): $\boldsymbol{\delta_H}$ 7,86 (1H, *d*, *J* = 9,0 Hz, H-2, H-6); 7,18 (1H, *d*, *J* = 9,0 Hz, H-3, H-5); 9,89 (1H,*s* , H-7); 5,25 (1H, *d*, *J* = 7,5 Hz, H-1′); 3,46 (1H, *dd*, *J* = 7,5 Hz, 3,0 Hz, H-2′); 3,95 (1H, *t*, *J* = 3,0 Hz, H-3′); 3,42 (1H, *dd*, *J* = 9,0 Hz, 3,0 Hz, H-4′); 3,73 (1H, *ddd*, *J* = 9,0 Hz, 5,5 Hz, 2,5 Hz, H-5′); 3,45 (1H, dd, *J* = 11,5 Hz, 5,5 Hz) và 3,68 (1H, dd, *J* = 11,5 Hz, 2,5 Hz) (H-6′). Phổ ^{13}C-NMR (125 MHz, CD_3OD): $\boldsymbol{\delta_C}$ 130,4 (C-1, C-6); 131,6 (C-2); 111,4 (C-3, C-5); 162,4 (C-4); 191,4 (C-7); 91,8 (C-1′); 70,2 (C-2′); 71,4 (C-3′); 66,9 (C-4′); 74,8 (C-5′); 60,8 (C-6′).

Từ các kết quả phân tích phổ kết hợp với so sánh tài liệu tham khảo, hợp chất **HT2** được xác định là helicide [122] (xem Phụ lục 2.1.2). Hợp chất này có công thức phân tử là $C_{16}H_{16}O_7$ và công thức cấu tạo được trình bày ở Hình 3.3 và đã được tìm thấy

từ nhiều loài cây khác nhau, nhưng đây là lần đầu tiên được phân lập từ chi *Heliciopsis* Sleum và dữ liệu phổ của hợp chất này lần đầu tiên được công bố.

*3.1.1.3. Hợp chất **HT3***

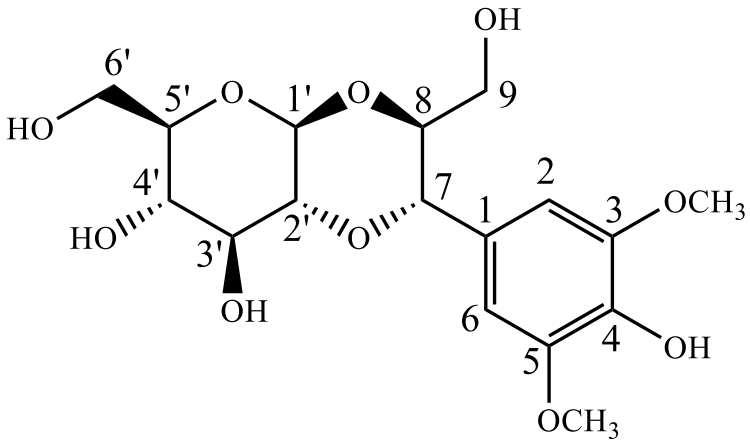


Hình 3.4. Cấu trúc hóa học của hợp chất **HT3**

Bột kết tinh không màu. Phổ HR-ESI-MS *m/z* 243,0871 $[M-H]^-$. Phổ ^{1}H-NMR (500 MHz, CD_3OD): $\boldsymbol{\delta_H}$ 6,71 (1H, *s*, H-2, H-6); 4,55 (1H, *d*, *J* = 6,0 Hz, H-7); 3,68 (1H, *m*, H-8); 3,40 (dd, *J* = 11,5 Hz, 5,0 Hz) và 3,53 (1H, dd, *J* = 11,5 Hz, 4,0 Hz) (H-9); 3,87 (3H, *s*, 3,5-OMe). Phổ ^{13}C-NMR (125 MHz, CD_3OD): $\boldsymbol{\delta_C}$ 134,1 (C-1, C-4); 105,3 (C-2, C-6); 149,1 (C-3, C-5); 75,6 (C-7); 77,6 (C-8); 64,3 (C-9): 56,9 (3,5-OME).

Từ các kết quả phân tích phổ kết hợp với so sánh tài liệu tham khảo, hợp chất **HT3** được xác định là *threo*-syringylglycerol, công thức phân tử là $C_{11}H_{16}O_6$ và công thức cấu tạo được trình bày ở Hình 3.4 [123, 124] (xem Phục lục 2.1.3). Hợp chất này đã được phân lập từ nhiều loài khác nhau như *Coix lachryma-jobi*, *Fraxinus sieboldiana*, *Ilex pubescens*, *Iodes cirrhosa* nhưng đây là lần đầu tiên được phân lập từ chi *Heliciopsis* Sleum.

*3.1.1.4. Hợp chất **HT4***

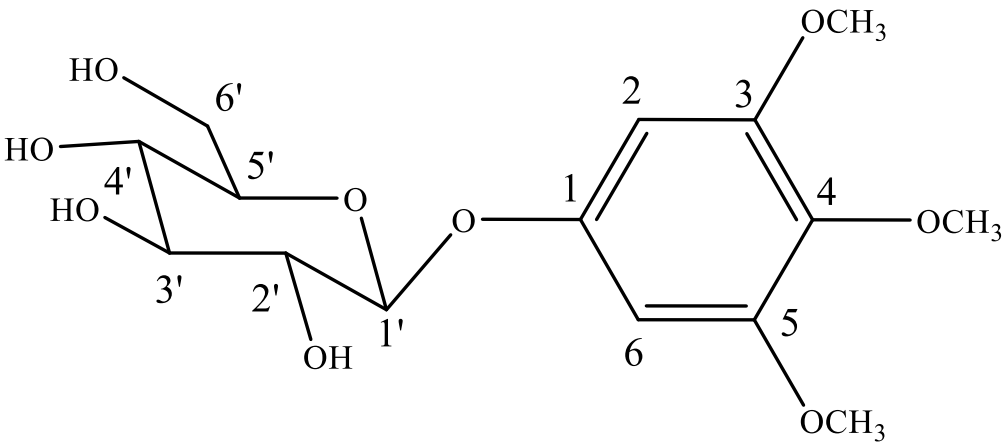


Hình 3.5. Cấu trúc hóa học của hợp chất **HT4**

Chất bột vô định hình màu trắng. Phổ HR-ESI-MS *m/z*: 406,1699 $[M+NH_4]^+$. Phổ ^{1}H-NMR (500 MHz, CD_3OD): $\boldsymbol{\delta_H}$ 6,73 (1H, *s*, H-2, H-6); 4,47 (1H, *d*, *J* = 9,5 Hz, H-7); 3,82 (1H, *m*, H-8); 3,42 (1H, *m*, H-9); 3,85 (3H, *s*, 3,5-OMe); 4,62 (1H, *d*, *J* = 7,5 Hz, H-1′); 3,17 (1H, dd, *J* = 9,0 Hz, 7,5 Hz, H-2′); 3,61 (1H, *t*, *J* = 9,0 Hz, H-3′); 3,43 (1H, *t*, *J* = 9,0 Hz, H-4′); 3,50 (1H, *m*, H-5′); 3,74 (1H, *dd*, 12,0 Hz, 5,5 Hz) và 3,94 (*dd*, 12,0 Hz, 2,5 Hz) (H-6′). Phổ ^{13}C-NMR (125 MHz, CD_3OD): $\boldsymbol{\delta_C}$ 129,3 (C-1); 106,3 (C-2, C-6); 149,2 (C-3, C-5); 137,0 (C-4); 80,5 (C-7); 82,6 (C-8); 62,1 (C-9): 56,9 (3,5-OME); 99,8 (C-1′); 80,8 (C-2′); 75,1 (C-3′); 71,9 (C-4′); 79,8 (C-5′); 62,6 (C-6′).

Từ các kết quả phân tích phổ kết hợp với so sánh tài liệu tham khảo, hợp chất **HT3** được xác định là ficuscarpanoside B [125] (xem Phụ lục 2.1.4) với công thức phân tử là $C_{17}H_{24}O_{10}$ và công thức cấu tạo được trình bày ở Hình 3.5. Hợp chất này cũng đã được phân lập từ một số loài khác nhau như *Ficus microcarpa*, *Stauntonia brachyanthera*, *Erica arborea*, *Stauntonia brachyanthera và Ilex kudingcha*, nhưng đây là lần đầu tiên được phân lập từ chi *Helicopsis* Sleum.

*3.1.1.5. Hợp chất **HT5***

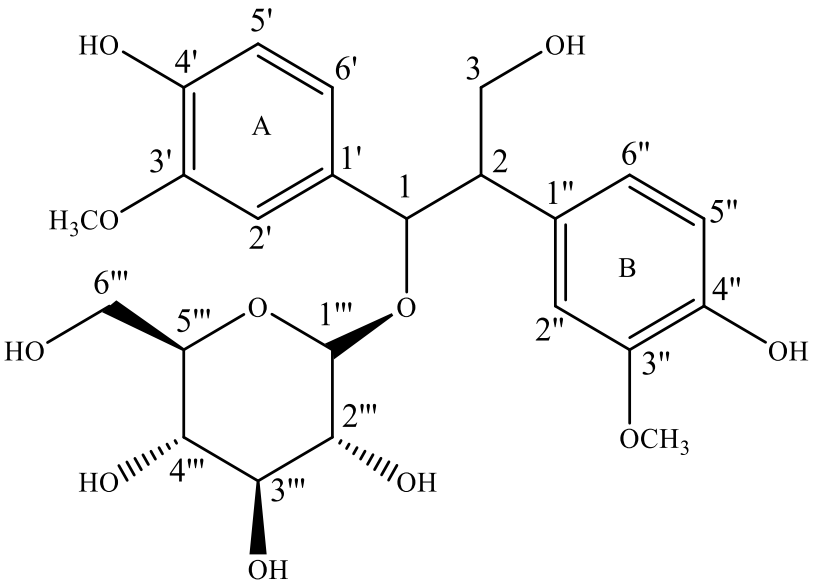


Hình 3.6. Cấu trúc hóa học của hợp chất **HT5**

Chất rắn vô định hình màu trắng. Phổ HR-ESI-MS *m/z*: 381,0954 $[M+Cl]^-$. Phổ ^{1}H-NMR (500 MHz, CD_3OD): $\boldsymbol{\delta_H}$ 6,51 (1H, *s*, H-2, H-6); 3,83 (6H, *s*, 3,5-OMe); 3,72 (3H, *s*, 4-OMe); 4,80 (1H, *d*, J= 7,5Hz, H-1′); 3,30-3,49, (H-2′, H-3′, H-4′, H-5′); 3,93 (*dd*, 12,0 Hz, 2,0 Hz) và 3,69 (*dd*, 12,0 Hz, 6,5 Hz) (2H, H-6′).Phổ ^{13}C-NMR (125 MHz, CD_3OD): $\boldsymbol{\delta_C}$ 156,0 (C-1); 96,2 (C-2, C-6); 154,8 (C-3, C-5); 134,5 (C-4); 56,6 (3,5-OME), 61,2 (4-OMe); 103,2 (C-1′); 75,0 (C-2′); 78,1 (C-3′); 71,7 (C-4′); 78,4 (C-5′); 62,7 (C-6′).

Từ các kết quả phân tích phổ kết hợp với so sánh tài liệu tham khảo, hợp chất **HT5** được xác định là 3,4,5-trimethoxyphenyl-*β*-D-glucopyranoside [126] (xem Phụ lục 2.1.5) với công thức phân tử là $C_{15}H_{22}O_9$ và công thức cấu tạo được tình bày ở Hình 3.6. Đây là hợp chất cũng đã được tìm thấy ở nhiều loài thực vật khác nhau như *Toussaintia orientalis, Saraca indica, Walsura yunnanensis, Cladogynos orientalis*.. nhưng đây là lần đầu tiên được phân lập từ chi *Helicopsis* Sleum.

*3.1.1.6. Hợp chất **HT6***

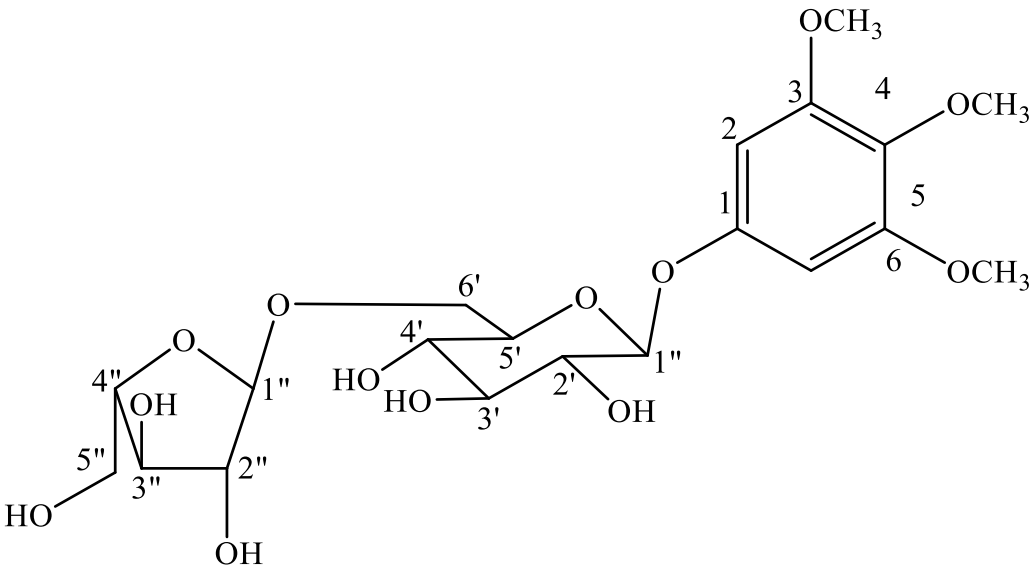


Hình 3.7. Cấu trúc hóa học của hợp chất **HT6**

Chất rắn vô định hình màu trắng; Phổ HR-ESI-MS *m/z*: 317,1478 $[M+Cl]^-$. Phổ ^{1}H-NMR (500 MHz, CD_3OD): $\boldsymbol{\delta_H}$ 5,82 (1H, *d* , *J* = 4,5 Hz, H-1); 2,96 (1H, *m*, H-2); 4,10 (1H, *dd*, *J* = 10,5 Hz, 8,0 Hz) và 3,68 (*) (H-3); 6,70 (1H, *d*, *J* = 2,0 Hz, H-2); 6,65 (1H, *d*, *J* = 8,0 Hz, H-5′); 6,68 (1H, *dd*, *J* = 8,0 Hz, 2,0 Hz, H-6′); 6,67 (1H, *d*, *J* = 2,0 Hz, H-2″); 6,69 (1H, *d*, *J* = 8,0 Hz, H-5″); 6,57 (1H, *dd*, J = 8,0 Hz, 2,0 Hz, H-6″); 4,17 (1H, *d*, J = 7,5Hz, H-1‴); 3,30 (1H, *dd*, J = 9,0 Hz, 7,5 Hz, H-2‴); 3,25 (1H, *t*, J = 9,0 Hz, H-3‴); 3,27 (1H, *t*, J = 9,0 Hz, H-4‴); 3,19 (*m*, H-5‴); 3,67 (*) và 3,90 (1H, *dd*, J = 12,0 Hz, 2,5 Hz, H-6‴); 3,66 (3H, *s*, 3′-OMe); 3,75 (3H, *s*, 3″-OMe). Phổ ^{13}C-NMR (125 MHz, CD_3OD): $\boldsymbol{\delta_C}$ 79,2 (C-1); 56,1 (C-2); 64,2 (C-3); 132,8 (C-1′); 112,7 (C-2′), 148,5 (C-3′); 146,7 (C-4′); 115,5 (C-5′); 121,3 (C-6′); 131,5 (C-1″); 115,0 (C-2″); 148,2 (C-3″); 146,1 (C-4″); 115,3 (C-5″); 123,6 (C-6″); 101,4 (C-1‴); 75,3 (C-2″); 78,3 (C-3″); 72,1 (C-4″); 77,8 (C-5″); 63,1 (C-6″); 56,2 (3′-OMe); 56,4 (3″-OMe).

Từ các kết quả phân tích phổ kết hợp với so sánh tài liệu tham khảo, hợp chất HT6 được xác định là hovetrichoside B [127] (xem Phụ lục 2.1.6), với công thức phân tử là $C_{23}H_{30}O_{11}$ và công thức cấu tạo được trình bày ở Hình 3.7. Hợp chất này đã được tìm thấy từ nhiều loài khác nhau, như *Acer buergerianum*, *Hovenia trichocarpa*, *Lagerstroemia Indica*,... đây cũng là lần đầu tiên được phân lập từ chi *Helicopsis* Sleum.

3.1.1.7. Hợp chất ***HT7***

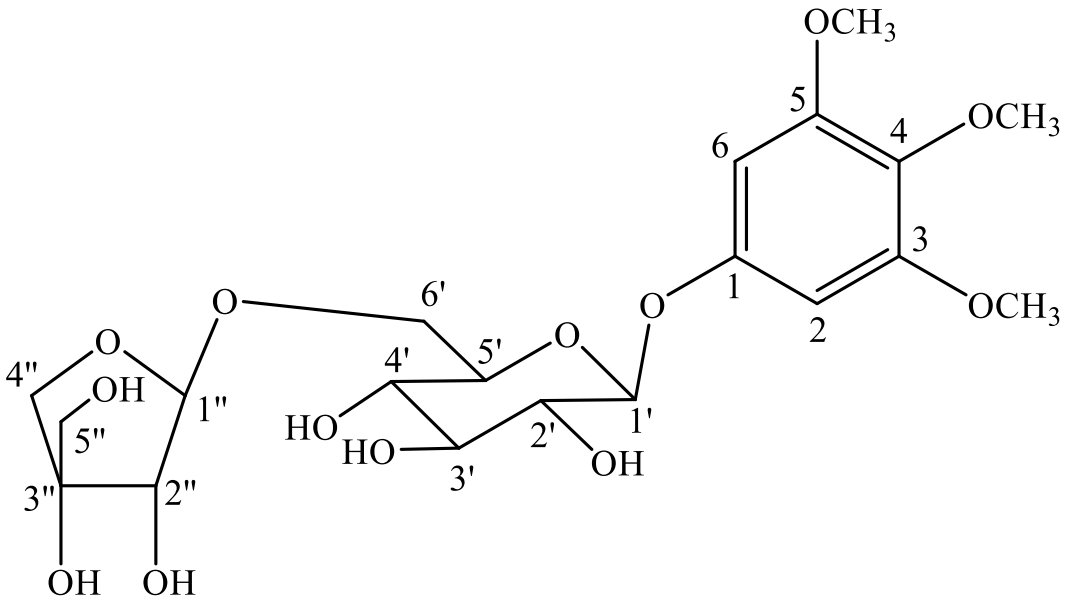


Hình 3.8. Cấu trúc hóa học của hợp chất **HT7**

Chất rắn màu trắng; Phổ HR-ESI-MS *m/z*: 496,2024 $[M+NH_4]^+$. Phổ ^{1}H-NMR (500 MHz, CD_3OD): $\boldsymbol{\delta_H}$ 6,48 (1H, *s*, H-2, H-6); 3,84 (6H, *s*, 3,5-OMe); 3,73 (3H, *s*, 4-OMe); 4,82 (1H, *, H-1′); 3,54 (1H, *dd*, *J* = 9,0 Hz, 7,5 Hz, H-2′); 3,47 (1H, *t*, *J* = 9,0 Hz, H-3′); 3,36 (1H, *t*, *J* = 9,0 Hz, H-4′); 3,63 (1H, *m*, H-5′); 4,12 (1H, *dd*, *J* = 12,0 Hz, 1,5 Hz) và 3,60 (1H, *dd*, *J* = 12,0 Hz, 3,0 Hz) (H-6′); 4,94 (1H, *d*, *J* = 1,5 Hz, H-1‴); 3,98 (1H, *dd*, *J* = 3,0 Hz, 1,5 Hz, H-2‴); 3,84 (1H, *dd*, *J* = 9,0 Hz, 3,0 Hz, H-3‴); 3,95 (1H, *m*, H-4‴); 3,74 (1H, *dd*, *J* = 12,0 Hz, 3,0 Hz) và 3,62 (*) (H-5‴). Phổ ^{13}C-NMR (125 MHz, CD_3OD): $\boldsymbol{\delta_C}$ 155,9 (C-1); 96,3 (C-2, C-6); 154,8 (C-3, C-5); 134,6 (C-4); 56,8 (3,5-OME), 61,2 (4-OMe); 103,0 (C-1′); 74,9 (C-2′); 77,8 (C-3′); 71,8 (C-4′); 76,9 (C-5′); 68,1 (C-6′); 109,9 (C-1″); 83,3 (C-2″); 78,9 (C-3″); 85,8 (C-4″); 63,0 (C-5″).

Từ các kết quả phân tích phổ kết hợp với so sánh tài liệu tham khảo, hợp chất HT7 được xác định là rhyncoside C [128] (xem Phụ lục 2.1.7) với công thức phân tử là $C_{20}H_{30}O_{13}$ và công thức cấu tạo được trình bày ở Hình 3.8. Hợp chất này có ở nhiều cây khác nhau như *Bruguiera sexangula*, *Elaeagnus pungen*, *hizophoraceae mangroves*,... nhưng đây là lần đầu tiên được phân lập từ chi *Heliciopsis* Sleum.

*3.1.1.8. Hợp chất **HT8***

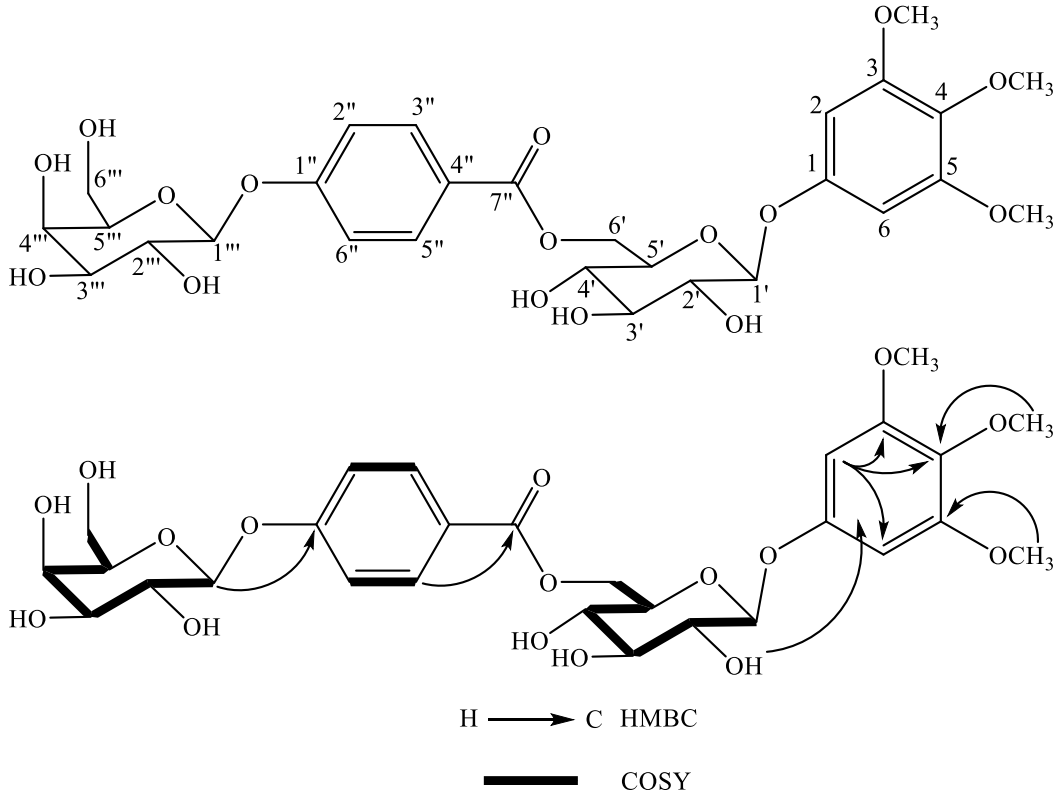


Hình 3.9. Cấu trúc hóa học của hợp chất **HT8**

Chất rắn kết tinh màu trắng. Phổ HR-ESI-MS *m/z*: 496,2025 $[M+NH_4]^+$. Phổ ^{1}H-NMR (500 MHz, CD_3OD): $\boldsymbol{\delta_H}$ 6,48 (1H, *s*, H-2, H-6); 3,83 (6H, *s*, 3,5-OMe); 3,72 (3H, *s*, 4-OMe); 4,82 (1H, d, *J* = 7,5 Hz, H-1′); 3,40 (1H, *dd*, *J* = 9,0 Hz, 7,5 Hz, H-2′); 3,48 (1H, *m*, H-3′); 3,35 (1H, *m*, H-4′); 3,61 (1H, *m*, H-5′); 4,06 (1H, *d*, *J* = 9,0 Hz) và 3,83 (1H, *d*, *J* = 9,0 Hz) (H-6′); 4,99 (1H, *d*, *J* = 2,5 Hz, H-1‴); 3,89 (1H, d, *J* = 2,5Hz, H-2‴); 3,97 (1H, *d*, *J* = 9,5 Hz) và 3,76 (1H, *d*, *J* = 9,5 Hz) (H-4‴); 3,57 (1H, *s*, H-5‴). Phổ ^{13}C-NMR (125 MHz, CD_3OD): $\boldsymbol{\delta_C}$ 155,9 (C-1); 96,4 (C-2, C-6); 154,8 (C-3, C-5); 134,7 (C-4); 56,7 (3,5-OME), 61,3 (4-OMe); 103,2 (C-1′); 74,9 (C-2′); 77,9 (C-3′); 71,6 (C-4′); 77,0 (C-5′); 68,7 (C-6′); 110,9(C-1″); 87,9 (C-2″); 80,5 (C-3″); 74,9 (C-4″); 65,4 (C-5″).

Từ các kết quả phân tích phổ kết hợp với so sánh tài liệu tham khảo, hợp chất **HT8** được xác định là 3,4,5-trimethoxyphenyl *β*-D-apiofuranosyl-(1″-6′)-*β*-D-glucopyranoside, đã được phân lập từ loài *Betula pendula* [129] (xem Phụ lục 2.1.8) với công thức phân tử là $C_{20}H_{30}O_{13}$ và công thức cấu tạo được trình bày ở Hình 3.9, lần đầu tiên hợp chất này được phân lập từ chi *Heliciopsis* Sleum.

3.1.1.9. Hợp chất ***HT9***



Hình 3.10. Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC, H-H COSY của hợp chất **HT9**

** Tính chất và thông số phổ:*

+ Chất rắn kết tinh màu trắng

+ Phổ HR-ESI-MS *m/z*: 646,2348 $[M+NH_4]^+$

+ Tính toán lý thuyết cho công thức $[C_{28}H_{40}NO_{16}]^+$: 646,2347

+ Số liệu phổ ^{1}H NMR (500 MHz) và ^{13}C NMR (125 MHz) xem Bảng 3.9 và Phụ lục 3.9.2 & 3.9.3.

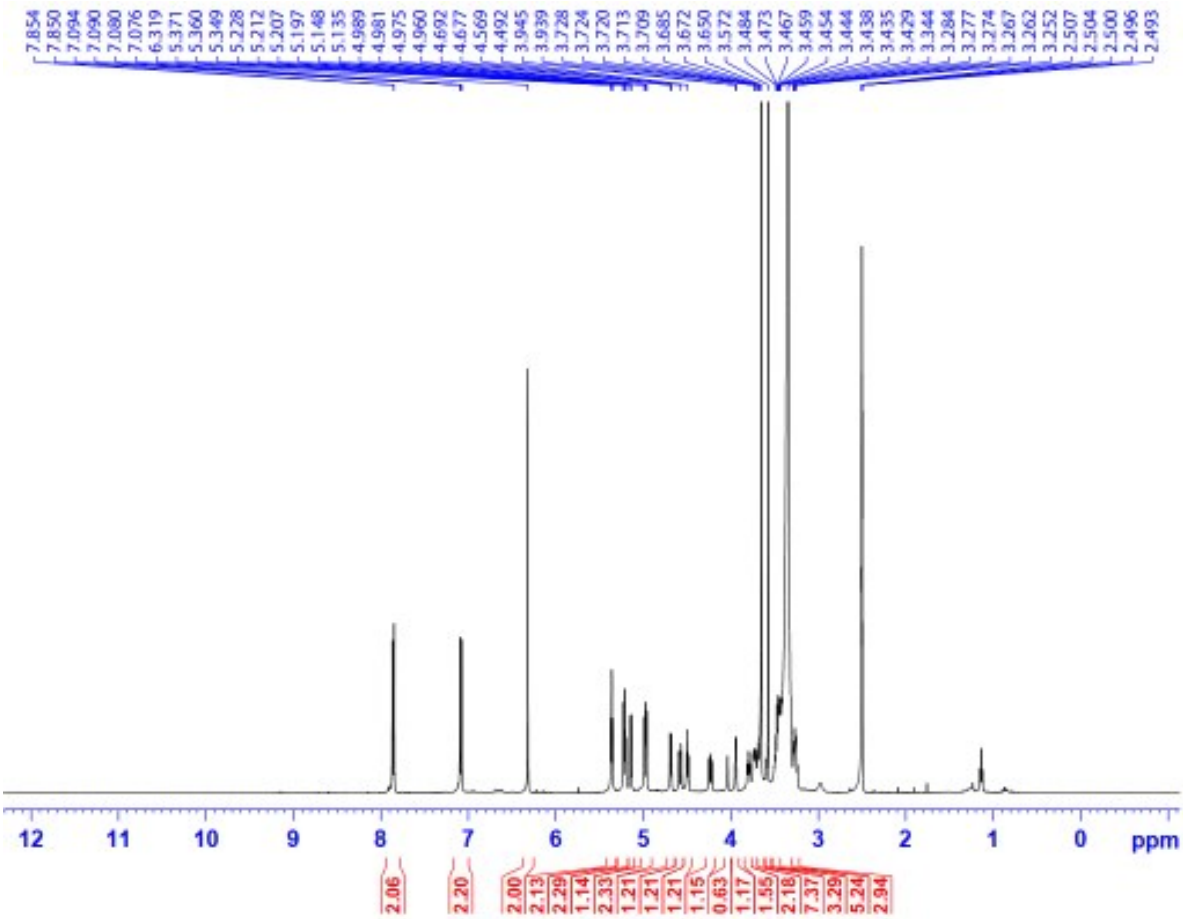
Bảng 3.1. Số liệu phổ NMR của hợp chất **HT9**

C	δ_C**[a,b]**	δ_H**[a,c] (độ bội,** ***J*** **= Hz)**
1	153,5	-
2,6	94,4	6,32 (2H, s)
3,5	153,0	-
4	132,7	-
1″	161,4	-
2″, 6″	115,9	7,09 (2H, d, *J* = 8,0)

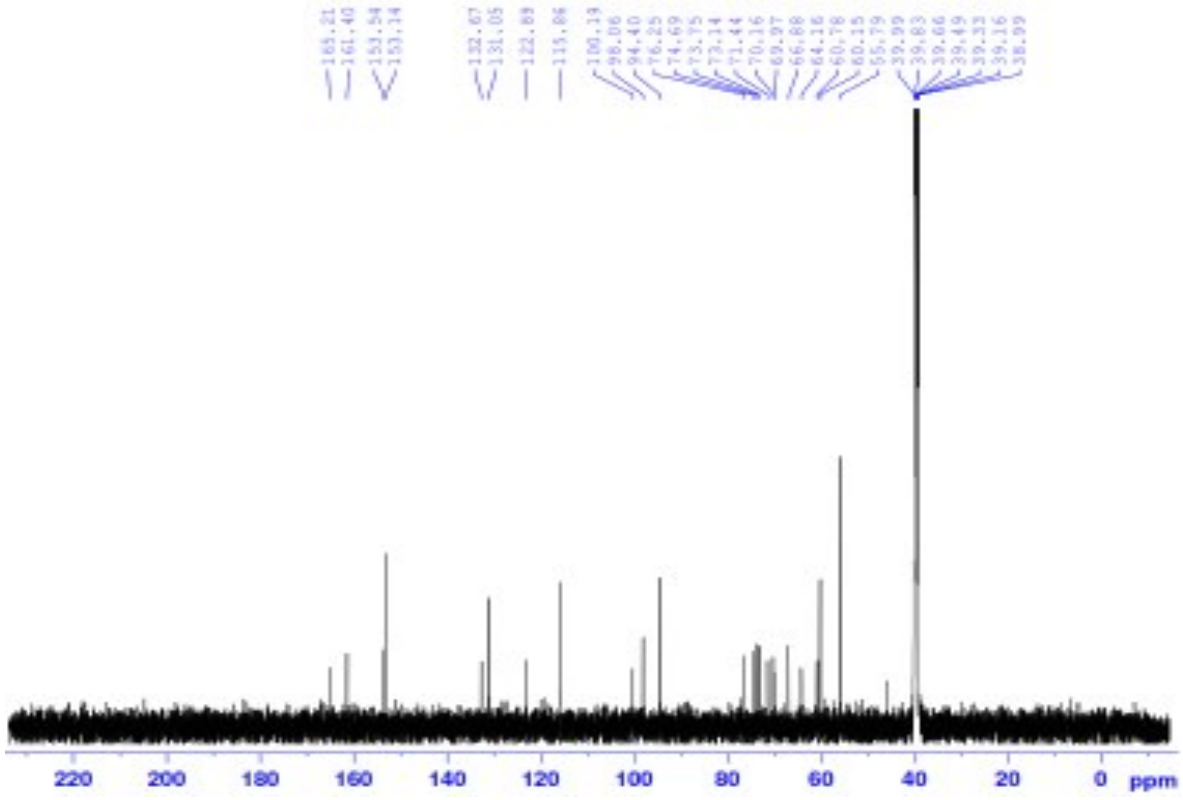
3″, 5″	131,1	7,85 (2H, d, *J* = 8,0)
4″	122,7	-
7″	165,2	-
3,5-OMe	55,8	3,65 (6H, s)
4-OMe	60,2	3,57 (3H, s)
β-D-Glc		
1′	100,2	4,97 (1H, d, *J* = 7,5)
2′	73,1	3,25 (*)
3′	76,3	3,33 (*)
4′	70,0	3,26 (*)
5′	73,8	3,80 (1H, ddd, *J* = 9,0, 5,0, 2,0)
6′	64,2	4,57 (1H, dd, *J* = 12,0, 2,0) 4,22 (1H, dd, *J* = 12,0, 5,0)
***β*-D-Gal**		
1‴	98,1	5,22 (1H, d, *J* = 7,5)
2‴	70,2	3,44 (*)
3‴	71,4	3,94 (1H, dd, *J* = 6,0, 3,0)
4‴	67,0	3,42 (*)
5‴	74,7	3,72 (1H, m)
6‴	60,8	3,69 (*) 3,47 (*)

Đo trong [a]DMSO-d6, [b]125 MHz, [c]500 MHz, [*]tín hiệu bị lấp

Hợp chất **HT9** thu được dưới dạng chất kết tinh màu trắng. Trên phổ khối lượng phân giải cao HR-MS của hợp chất **HT9** xuất hiện pic ion giả phân tử tại *m/z* 646,2348 $[M+NH_4]^+$. Kết quả này phù hợp với số khối của ion $[C_{28}H_{40}NO_{16}]^+$ với tính toán lý thuyết là 646,2347. Qua đó, cho phép xác định công thức phân tử của hợp chất **HT9** là $C_{28}H_{36}O_{16}$ (với sai số là Δ = 0,2 ppm). Trên phổ IR của hợp chất HT9 xuất hiện tín hiệu của một số nhóm chức tại 3343 cm^{-1} (OH), 1701 cm^{-1} (CO), 1608 cm^{-1} (olefinic), 1078 cm^{-1} và 1038 cm^{-1} (ether).

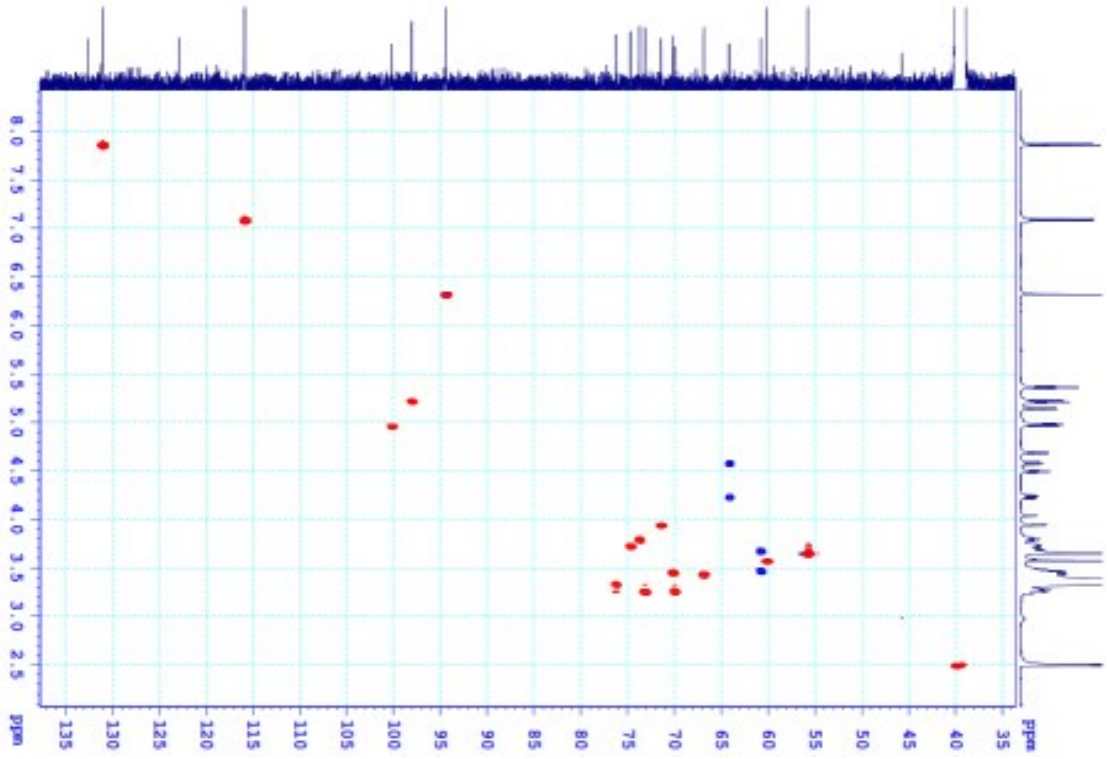


Hình 3.11. Phổ 1H-NMR của hợp chất HT9



Hình 3.12. Phổ 13C-NMR của hợp chất HT9

Phổ ^{1}H-NMR của hợp chất **HT9** (Hình 3.11) xuất hiện ở vùng trường thấp với 5 tín hiệu đặc trưng của các vòng thơm từ 7,16 – 7,97 ppm. Trong đó hai tín hiệu tại δ_H 7,85 (2H, d, J = 8,0 Hz) và 7,09 (2H, d, J = 8,0 Hz) chứng tỏ sự có mặt của một vòng thơm thế *para*, tín tại δ_H 6,32 (2H, s) gợi ý sự có mặt của một vòng thơm thứ hai thế tại các vị trí 1,3,4,5. Hai phân tử đường được nhận dạng bởi hai tín hiệu proton anome tại δ_H 5,22 (1H, d, J = 7,5 Hz) và 4,97 (1H, d, J = 7,5 Hz), các tín hiệu còn lại của hai phân tử đường xuất hiện trong vùng có độ dịch chuyển hóa học từ 3,25 – 4,59 ppm. Hai tín hiệu singlet của nhóm methoxy tại δ_H 3,65 (6H, s) và 3,57 (3H, s), trên phổ ^{1}H NMR của hợp chất này xuất hiện thêm các tương tác spin-spin của các proton thuộc phân tử đường (xem bảng 3.9) là do xuất hiện thêm các tương tác của các proton của nhóm hydroxy với các proton của nhóm methine carbinol mà chúng gắn vào (vì đo trong dung môi DMSO-d_6).

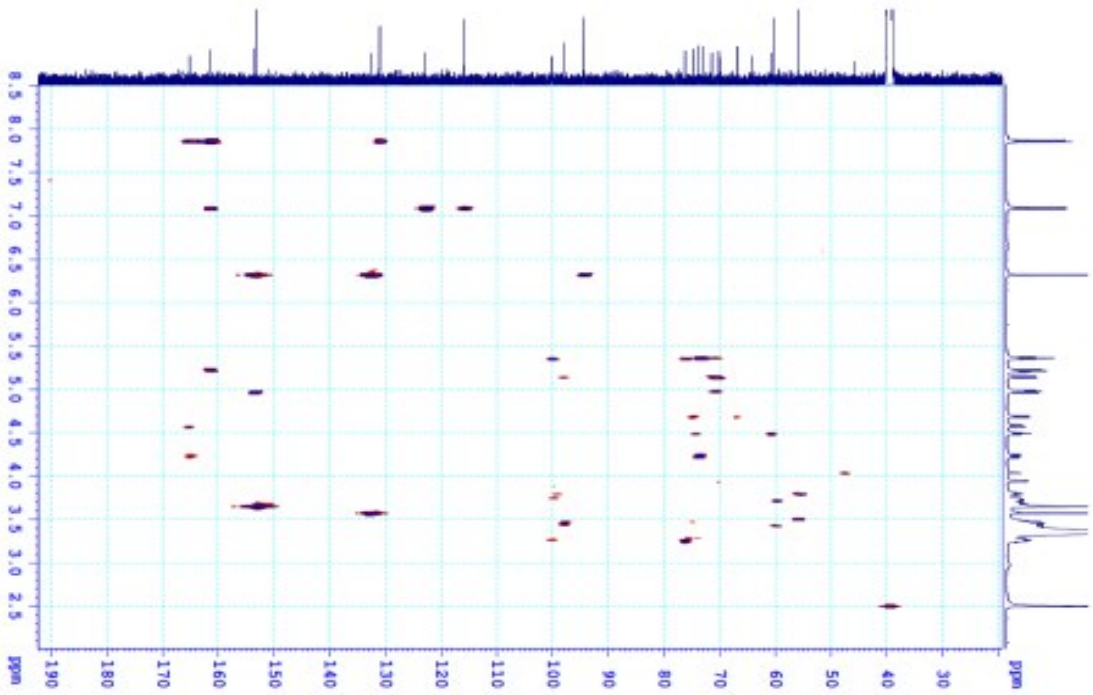


Hình 3.13. Phổ HSQC của hợp chất HT9

Phổ ^{13}C-NMR cùng với phổ HSQC của hợp chất **HT9** (Hình 3.12) khẳng định sự có mặt của 23 tín hiệu đặc trưng cho 28 nguyên tử carbon, trong đó 4 tín hiệu đặc trưng cho 6 nguyên tử carbon của một vòng thơm thế *para* tại δ_C 161,4, 115,9 x 2, 131,2 x 2 và 122,9; 4 tín hiệu đặc trưng cho 6 nguyên tử carbon của một vòng thơm thế 1,3,4,5 tại δ_C 153,5, 153,1 x 2, 132,7 và 94,4 x 2; nhóm carbonyl este tại δ_C 165,2; 2 tín hiệu của ba nhóm methoxy tại δ_C 60,2 và 55,6 x 2. Tiếp đó là 12 tín hiệu carbon còn lại thuộc về

hai phân tử đường, trong đó hai carbon anome đặc trưng tại δ_C 100,2 và 98,1 và hai carbon oximethylen tại δ_C 64,2 và 60,8. Sự dịch chuyển về phía trường thấp hơn của carbon oximethylen tại δ_C 64,2 chứng tỏ rằng nhóm oximethylen này đã được gắn vào nhóm C=O thông qua liên kết este.

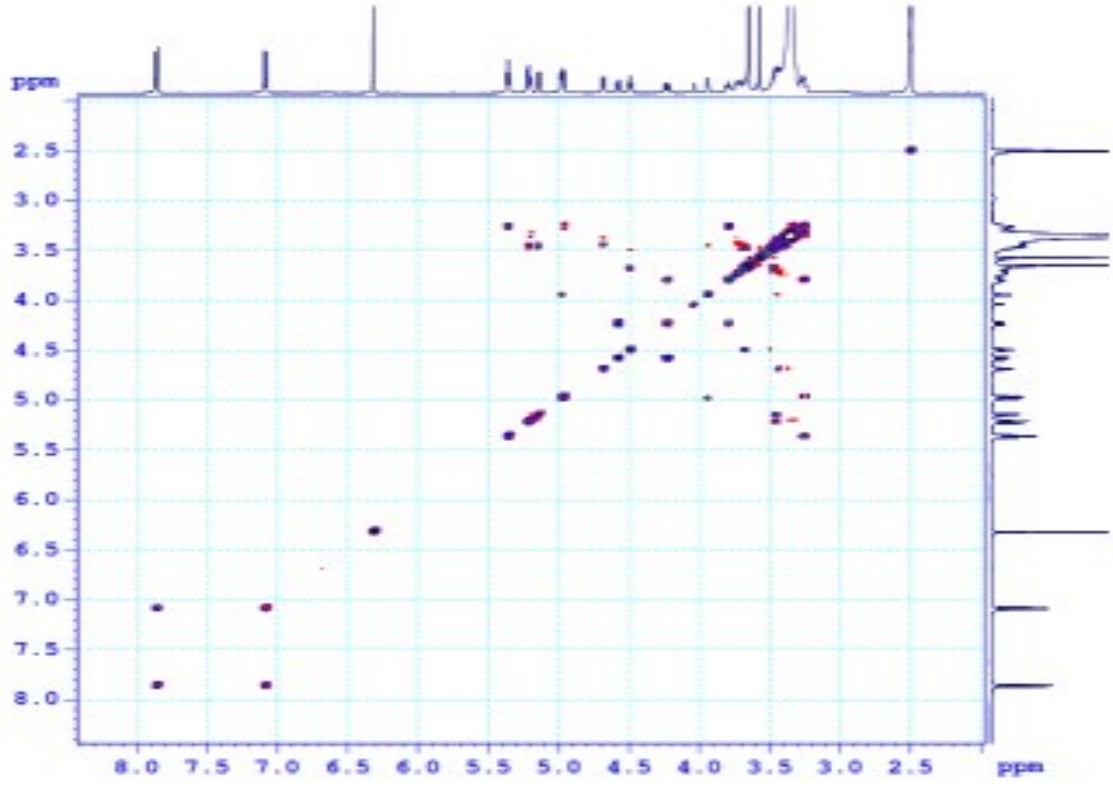
Sự hình thành liên kết este này còn được chứng minh bằng tương tác HMBC giữa proton H-6′ (δ_H 4,57/4,22) của phân tử đường thứ nhất với nhóm C=O tại δ_C 165,2. Đồng thời có sự xuất hiện tương tác HMBC giữa proton anome tại δ_H 4,97 với C-1 (δ_C 153,5) của vòng thơm thế 1,3,4,5 giúp xác định phân tử đường này gắn với vòng thơm thế 1,3,4,5 tại vị trí C-1 qua cầu oxy và tương tác HMBC giữa proton anome thứ hai tại δ_C 5,22 với tín hiệu C-1″ (δ_C 161,4) của vòng thơm thế *para* giúp xác định phân tử đường này gắn với vòng thơm thế *para* tại vị trí C-1″ qua cầu oxy.



Hình 3.14. Phổ HMBC của hợp chất HT9

Các giá trị độ dịch chuyển hóa học của hai vòng thơm được xác định nhờ các tương tác HSQC và HMBC. Trên phổ HSQC, tín hiệu proton H-2 tại δ_H 6,32 tương tác với carbon C-2 tại δ_C 94,4 và tương tác HMBC của H-2 với C-3/C-4 (δ_C 132,7)/C-1, giữa proton nhóm methoxy tại δ_H 3,65 với C-3, C-5, giữa proton của nhóm methoxy tại δ_H 3,57 với C-4 đã khẳng định giá trị tương ứng trong vòng thơm thế 1,3,4,5 và các nhóm methoxy lần lượt gắn vào C-3/C-4/C-5 của vòng thơm thế 1,3,4,5. Tương tự như vậy, các giá trị độ dịch chuyển hóa học của proton và carbon còn lại được xác định chính

xác nhờ phân tích phổ hai chiều HSQC và HMBC, đồng thời khẳng định trật tự nối giữa hai phân tử đường với hai vòng thơm tương ứng như được chỉ ra trên Hình 3.10.



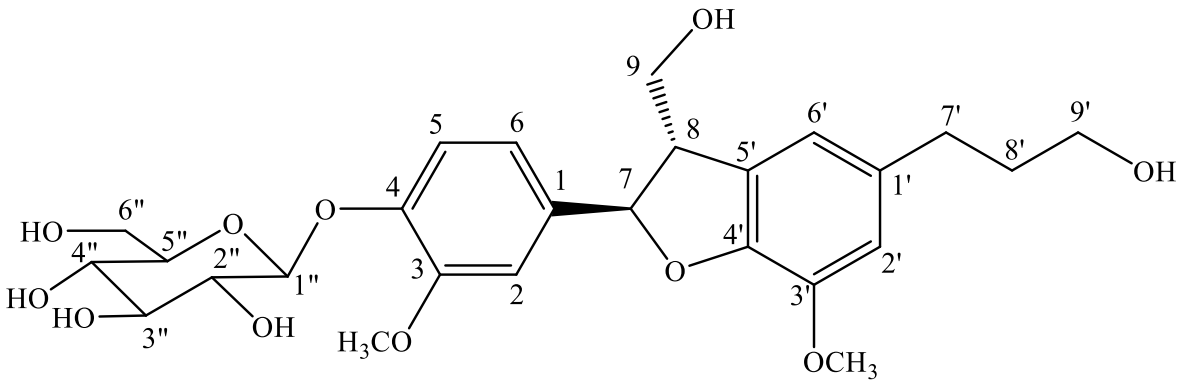
Hình 3.15. Phổ H-H COSY của hợp chất HT9

Trên phổ H-H COSY xuất hiện tương tác giữa các proton H-1′-H-2′-H-3′-H-4′-H-5′-H-6′ tương ứng với các carbon tại δ_C 100,2, 73,1, 76,3, 70,0, 73,8 và 64,2 thông qua phổ HSQC và giá trị hằng số tương tác khá lớn của proton anome tại δ_H 4,97 (1H, d, J = 7,5 Hz) giúp xác định đây là phân tử đường glucose và có cấu hình β-glucopyranose. Tương tác giữa các proton H-1′′′′-H-2′′′′, H-3′′′′-H-4′′′′-H-5′′′′-H-6′′′′ tương ứng với các carbon tại δ_C 98,1, 70,2, 71,4, 67,0, 74,7 và 60,8 thông qua phổ HSQC và giá trị hằng số tương tác khá lớn của proton anome tại δ_H 5,22 (1H, d, J = 7,5 Hz) giúp xác định đây là phân tử đường galacose có liên kết β-glycosid.

Phương pháp xác định đường được cải tiến từ phương pháp của nhóm tác giả Laurence Voutquenne [105]. Qua đó, xác định được $\alpha_{glucose} = +0{,}451$, tương ứng với $[\alpha]_D^{20} = +16{,}4$ cho đường glucose; và $\alpha_{galactose} = +0{,}982$, tương ứng với $[\alpha]_D^{20} = +42{,}2$. Qua đó, có thể xác định hai đường đang phân tích có cấu hình của các đường D-glucose và D-galactose.

Với các kết quả phân tích nêu trên, hợp chất **HT9** được xác định là một hợp chất mới và được đặt tên là **helitermioside**.

*3.1.1.10. Hợp chất **HT10***



Hình 3.16. Cấu trúc hóa học của hợp chất HT10

Chất bột vô định hình màu trắng. Phổ HR-ESI-MS *m/z*: 577,1793 $[M+Cl]^-$. Phổ ^{1}H-NMR (500 MHz, CD_3OD): $\boldsymbol{\delta_H}$ 7,05 (1H, *d*, *J* = 2,0 Hz, H-2); 7,16 (1H, *d*, *J* = 8,0 Hz, H-5); 6,95 (1H, *dd*, *J* = 8,0 Hz, 2,0 Hz, H-6); 5,57 (1H, *d*, *J* = 6,0 Hz, H-7); 3,47 (1H, *m*, H-8); 3,85 (1H, *m*) và 3,76 (1H, *m*) (H-9); 6,75 (1H, *s*, H-2′); 6,74 (1H, *s*, H-6′); 2,65 (2H, *t*, *J* = 6,5 Hz, H-7′); 2,65 (2H, *t*, *J* = 6,5 Hz, H-8′); 3,59 (2H, *t*, *J* = 6,5 Hz, H-9′); 4,90 (1H, *d*, *J* = 7,5 Hz, H-1″); 3,50 (1H, *, H-2″); 3,40 (1H, *, H-3″, H-4″); 3,35 (1H, *m*, H-5″); 3,87 (1H, dd, *J* = 12,0 Hz, 2,5 Hz) và 3,70 (1H, dd, *J* = 12,0 Hz, 5,5 Hz) (H-6″); 3,85 (3H, *s*, 3-OMe); 3,89 (3H, *s*, 3'-OMe). Phổ ^{13}C-NMR (125 MHz, CD_3OD): $\boldsymbol{\delta_C}$ 138,4 (C-1); 111,3 (C-2); 151,0 (C-3); 147,6 (C-4); 118,1 (C-5); 119,4 (C-6); 88,5 (C-7); 55,7 (C-8); 65,1 (C-9); 137,1 (C-1′); 114,3 (C-2′); 145,3 (C-3′); 147,5(C-4′); 129,6 (C-5′); 118,0 (C-6′); 32,9 (C-7′); 35,8 (C-8′); 62,2 (C-9′); 102,8 (C-1″); 74,9 (C-2″); 78,2 (C-3″); 71,4 (C-4″); 77,9 (C-5″); 62,5 (C-6″); 56,7 (C-3-OMe); 56,8 (C-3'-OMe).

Từ các kết quả phân tích phổ kết hợp với so sánh tài liệu tham khảo, hợp chất HT10 được xác định là *7R,8S*-dihydrodehydrodiconeferyl alcohol 4-*O*-*β*-D-glucopyranoside, đã được phân lập từ loài *Viburnum awabuki* [130] (xem Phụ lục 2.1.9). Hợp chất này có công thức phân tử là $C_{26}H_{34}O_{11}$ và công thức cấu tạo được trình bày ở Hình 3.16, lần đầu tiên được phân lập từ chi *Heliciopsis* Sleum.

Như vậy, nghiên cứu này đã xác định được 10 hợp chất từ dược liệu Bàn tay ma trắng. Trong đó có một hợp chất mới và 09 hợp chất đã biết, nhưng đây là các hợp chất lần đầu tiên phân lập được từ chi *Heliciopsis* Sleum.

3.1.2. Phân tích xác định cấu trúc một số thành phần hóa học từ loài Bàn tay ma đỏ (H. lobata)

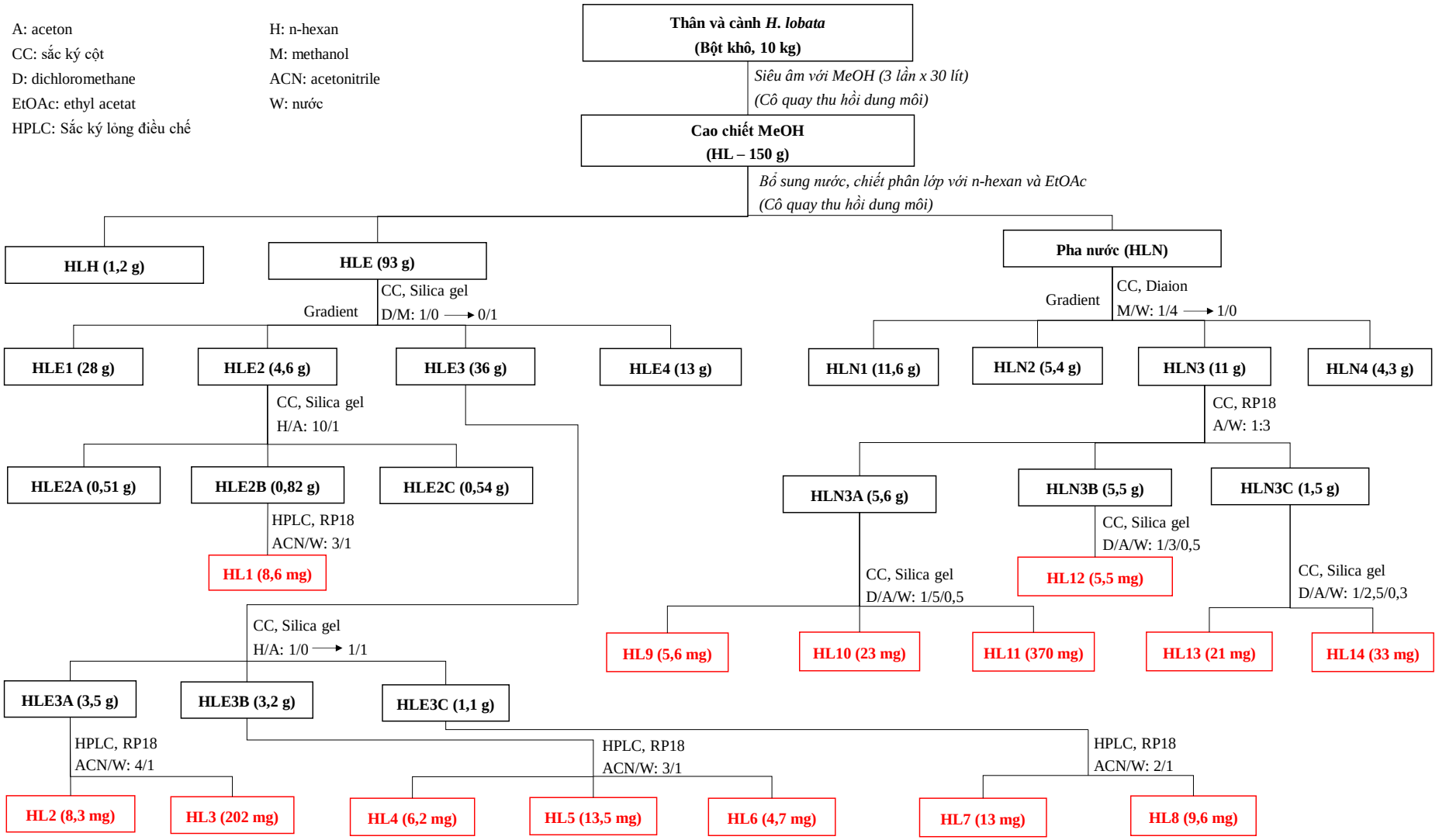
Thân và cành cây Bàn tay ma trắng *(H. lobata)* được chặt nhỏ, phơi khô, nghiền thành bột (10 kg). Chiết siêu âm 3 lần với 30 lít methanol, mỗi lần siêu âm 2 giờ. Gộp dịch chiết 3 lần, cô quay chân không để loại dung môi thu được 150 g cao methanol toàn phần **(HL)**.

Cặn **HL** được bổ sung thêm 3 lít nước để phân bố. Lần lượt chiết đồng thể tích 3 lần với n-hexane và ethyl acetate. Gộp dịch chiết các pha n-hexane và ethyl acetate, cô quay bay hơi dung môi thu được cao n-hexane **HLH** (1,2 g) và cao ethyl acetate **HLE** (93 g). Pha nước được cô quay bay hơi đến hết ethyl acetate, thêm nước để pha loãng, lọc, thu được dịch chiết nước **(HLN)**.

Cao **HLH** chứa nhiều chất dầu, rất không phân cực, khối lượng nhỏ nên không tiếp tục nghiên cứu. Cao **HLE** được phân tách trên cột silica gel, rửa giải gradient bằng hệ dung môi dichloromethane/methanol với tỉ lệ methanol tăng dần từ *(1: 0 → 0:1, v/v)*. Sau rửa giải thu được 4 phân đoạn nhỏ hơn gồm: **HLE1** (28 g), **HLE2** (4,6 g), **HLE3** (36 g) và **HTE4** (13 g). Phân đoạn **HLE1** là phân đoạn chứa nhiều chất không phân cực dạng dầu, không nghiên cứu phân đoạn này. Phân đoạn **HLE4** thử đánh giá qua sắc ký lớp mỏng ở các điều kiện khác nhau, không có vết chất hiển thị trên bản mỏng. Phần này có thể chứa nhiều chất phân cực hoặc các chất keo, bỏ qua không phân tách tiếp.

Phân đoạn **HLE2** được tiếp tục phân tách trên sắc ký cột silica gel, pha động là n-hexane/acetone với tỷ lệ *(10/1, v/v)*, thu được 3 phân đoạn **HLE2A** (0,51 g), **HLE2B** (0,82 g) và **HLE2C** (0,54 g). Tiến hành phân lập các phân đoạn HLE2A trên hệ sắc ký lỏng điều chế, cột C18, pha động acetonitril/nước tỷ lệ 3:1 thu được chất tinh khiết ký hiệu là **HL1** (8,6 mg).

Phân đoạn **HLE3** được phân tách trên sắc ký cột silica gel, rửa giải gradient với hệ pha động là hỗn hợp n-hexane/acetone với tỷ lệ *(10/1 → 1/1, v/v)*, thu được 3 phân đoạn **HLE3A** (3,5 g), **HLE3B** (3,2 g), **HLE3C** (1,1 g). Phân đoạn **HLE3A** phân tách trên sắc ký lỏng điều chế, cột C18, pha động acetonitril và nước tỷ lệ 4:1 thu được hai chất **HL2** (8,3 mg) và **HL3** (202 mg). Tiếp tục tách phân đoạn **HLE3B** và **HLE3C** trên hệ sắc ký lỏng điều chế, cột C18, rửa giải bằng hỗn hợp acetonitril và nước tỷ lệ 3:1 và 2:1. Sau điều chế, phân đoạn **HLE3B** cho 3 chất **HL4** (6,2 mg), **HL5** (13,5 mg) và **HL6** (4,7 mg); phân đoạn **HLE3C** cho 2 chất **HL7** (13 mg) và **HL8** (9,6 mg).



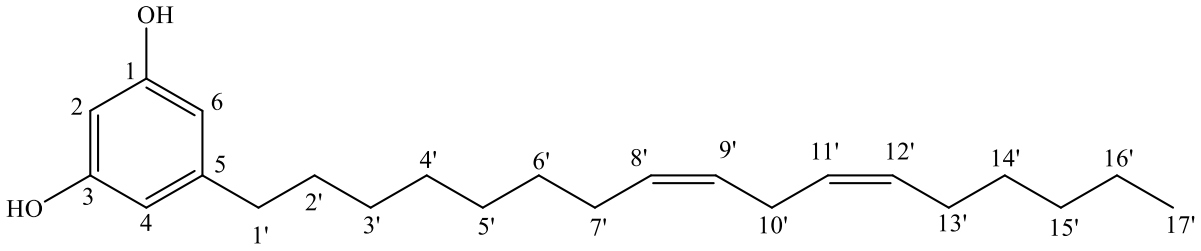
Hình 3.17. Qui trình phân lập và tinh chế các hợp chất từ cây Bàn tay ma đỏ *(H. lobata)*

Dịch chiết nước **(HLN)** được đưa lên hệ sắc ký cột với pha tĩnh là hạt nhồi diaion, rửa giải gradient bằng hỗn hợp methanol/nước với tỷ lệ tăng dần từ 20 % đến 100 %, thu được 4 phân đoạn **HLN1** (11,6 g), **HLN2** (5,4 g), **HLN3** (11 g) và **HTN4** (4,3 g). Các phần **HLN1**, **HLN2** và **HLN4** kiểm tra bằng sắc ký lớp mỏng với các điều kiện khác nhau, không có vết chất nổi bật và tách khỏi hỗn hợp, không tiếp tục phân tách.

Phần **HLN3** được phân lập trên hệ sắc ký cột pha đảo C18, rửa giả bằng hệ pha động gồm hỗn hợp acetone và nước tỷ lệ *(3/1, v/v)*, thu được 3 phân đoạn **HLN3A** (5,6 g), **HLN3B** (5,5 g) và **HLN3C** (1,5 g). Phân đoạn **HLN3A** được rửa giải trên hệ sắc ký cột silica gel, pha động dichloromethane/acetone/nước tỷ lệ thể tích 1/5/0,5 thu được 3 chất tinh khiết **HL9** (5,6 mg), **HL10** (23 mg) và **HL11** (370 mg). Tinh chế phân đoạn **HLN3B** trên hệ sắc ký cột silica gel, pha động dichloromethanee/acetone/nước tỷ lệ thể tích 1/3/0,5 thu được chất **HL12** (5,5 mg). Tương tự như vậy, phân tách phân đoạn **HLN3C** trên hệ sắc ký cột silica gel, pha động hỗn hợp dichloromethane/acetone/nước tỷ lệ 1/2,5/0,3 *(v/v/v)* thu được hai chất tinh khiết **HL13** (21 mg) và **HL14** (33 mg).

Các chất tinh khiết sau khi phân lập, tinh chế được kiểm tra hình thái, xác định các thông số phổ HR-ESI-MS và NMR để xác định cấu trúc. Kết quả như sau:

*3.1.2.1. Hợp chất **HL1***

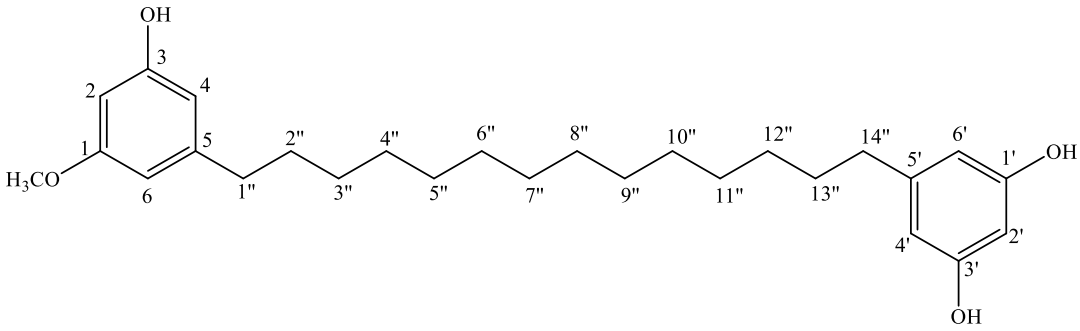


Hình 3.18. Cấu trúc hóa học của hợp chất **HL1**

Chất dầu không màu. Phổ HR-ESI-MS *m/z*: 343,2628 $[M-H]^-$. Phổ ^{1}H-NMR (500 MHz, CD_3OD): $\boldsymbol{\delta_H}$ 6,14 (1H, *t*, *J* = 2,0 Hz, H-2, H-6); 6,10 (1H, *t*, *J* = 2,0 Hz, H-4); 2,46 (2H, *t*, *J* = 7,5 Hz, H-1′); 1,59 (2H, *m*, H-2′,); 1,35 (2H, *m*, H-3′, H-4′, H-5′, H-6′, H-14′,); 2,07 (2H, dt, *J* = 7,0 Hz, 7,0 Hz, H-7′, H-13′,); 5,36 (1H, *m*, H-8′, H-9′, H-11′, H-12′,); 2,80 (2H, *t*, *J* = 6,5 Hz, H-10′,); 1,32 (2H, *m*, H-15′,); 1,34 (2H, *m*, H-16′,); 0,92 (3H, *t*, *J* = 7,0 Hz, H-17′). Phổ ^{13}C-NMR (125 MHz, CD_3OD): $\boldsymbol{\delta_C}$ 159,3 (C-1, C-3); 101,0 (C-2); 107,9 (C-4, C-6); 146,3 (C-5); 37,0 (C-1′); 32,7 (C-2′, C-15′); 30,3 (C-3′); 30,5 (C-4′; C-5′; C-6′);); 28,2 (C-7′, C-13′); 130,9 (C-8′, C-12′); 129,1 (C-9′, C-11′); 26,5 (C-10′); 30,7 (C-14′); 23,6 (C-16′); 14,4 (C-17′).

Từ các kết quả phân tích phổ kết hợp với so sánh tài liệu tham khảo, hợp chất **HL1** được xác định là (8'Z,11'Z)-5-(heptadeca-8',11'-dienyl)benzene-l,3-diol, được phân lập từ loài hải miên biển vùng Australia năm 1991 [131] (xem Phụ lục 2.2.1). Hợp chất này có công thức phân tử là $C_{23}H_{36}O_2$ và công thức cấu tạo được trình bày ở Hình 3.18, lần đầu tiên được phân lập từ chi *Helicopsis* Sleum.

*3.1.2.2. Hợp chất **HL2***

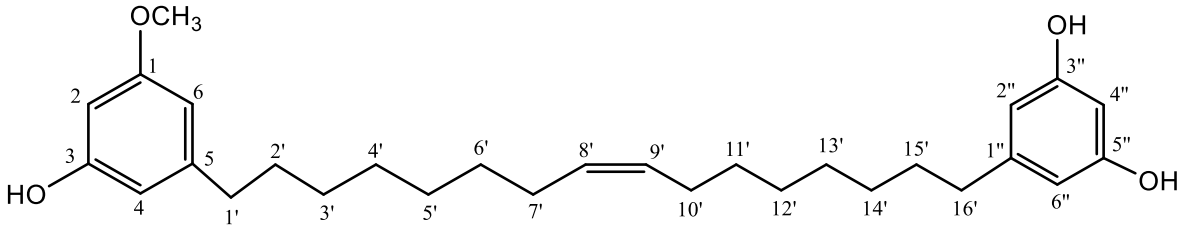


Hình 3.19. Cấu trúc hóa học của hợp chất **HL2**

Chất bột màu trắng, vô định hình. Phổ HR-ESI-MS *m/z*: m/z 451,2791 $[M+Na]^+$. Phổ ^{1}H-NMR (500 MHz, CD_3OD): $\boldsymbol{\delta_H}$ 6,19 (1H, *t*, *J* = 2,0 Hz, H-2); 6,24 (1H, *t*, *J* = 2,0 Hz, H-4, H-6); 6,10 (2H, *t*, *J* = 2,0 Hz, H-2′); 6,14 (2H, *t*, *J* = 2,0 Hz, H-4′, H-6′); 2,49 (2H, *t*, *J* = 7,5 Hz, H-1″); 1,58 (2H, *m*, H-2″, H-13″,); 1,33 (2H, *m*, H-3″, H-12″); 1,30 (2H, *m*, H-4″, H-5″, H-6″, H-7″, H-8″, H-9″, H-10″, H-11″,); 2,45 (*t*, *J* = 7,5 Hz, H-14″,); 3,74 (3H, *s*, 1-OMe). Phổ ^{13}C-NMR (125 MHz, CD_3OD): $\boldsymbol{\delta_C}$ 162,2 (C-1); 99,7 (C-2); 159,3 (C-3, C-1′, C-3′); 109,0 (C-4); 146,4 (C-5, C-5′); 106,6 (C-6); 101,0 (C-2′); 108,0 (C-4′, C-6′); 37,1 (C-1″); 32,4 (C-2″, C-13″); 30,3 (C-3″, C-12 ″); 30,6 (C-4″, C-11″); 30,7 (C-5″, C-6″, C-7″, C-8″, C-9″, C-10″); 37,0 (C-14″); 55,5 (CH_3CO).

Từ các kết quả phân tích phổ kết hợp với so sánh tài liệu tham khảo, hợp chất **HL2** được xác định là bisgravillol, đã được phân lập từ loài *Grevillea robusta* [132] (xem Phụ lục 2.1.2). Hợp chất này có công thức phân tử là $C_{27}H_{40}O_4$ và công thức cấu tạo được trình bày ở Hình 3.19, lần đầu tiên được phân lập từ chi *Helicopsis* Sleum.

*3.1.2.3. Hợp chất **HL3***

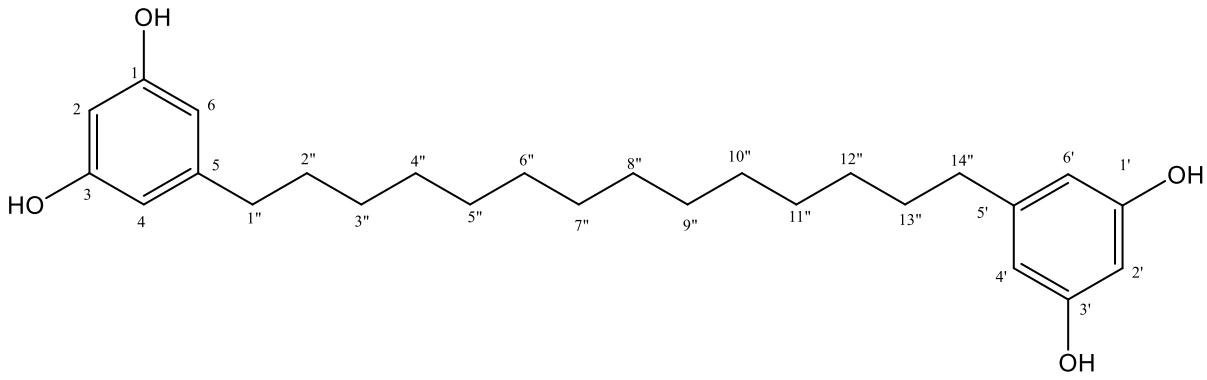


Hình 3.20. Cấu trúc hóa học của hợp chất **HL3**

Chất dầu không màu. Phổ HR-ESI-MS *m/z*: 477,2948 $[M+Na]^+$. Phổ ^{1}H-NMR (500 MHz, CD_3OD): $\boldsymbol{\delta_H}$ 6,19 (1H, *t*, *J* = 2,0 Hz, H-2); 6,24 (1H, *t*, *J* = 2,0 Hz, H-4, H-6); 2,49 (2H, *t*, *J* = 7,5 Hz, H-1′); 1,57 (2H, *m*, H-2′); 1,33 (2H, *m*, H-3′, H-4′, H-5′, H-6′, H-11′, H-12′, H-13′, H-14′); 2,03 (2H, *m*, H-7′, H-10′); 2,44 (1H, *dd*, *J* = 5,5 Hz, 5,0 Hz, H-8′, H-9′); 1,57 (2H, *m*, H-15′); 2,44 (2H, *t*, *J* = 7,5 Hz, H-16′); 6,15 (1H, *d*, *J* = 2,0 Hz, H-2″, H-6″); 6,11 (1H, *t*, *J* = 2,0 Hz, H-4″); 3,73 (3H, *s*, 1-OMe). Phổ ^{13}C-NMR (125 MHz, CD_3OD): $\boldsymbol{\delta_C}$ 159,2 (C-1, C-3″, C-5″); 99,7 (C-2); 162,2 (C-3); 106,6 (C-4); 146,4 (C-5, C-1″); 109,0 (C-6); 37,1 (C-1′); 32,4 (C-2′, C-15′); 30,2 (C-3′, C-14′); 30,6 (C-4′, C-13′); 30,8 (C-5′, C-12′); 30,5 (C-6′, C-11′); 28,1(C-7′, C-10′); 130,8 (C-8′, C-9′); 37,0 (C-16′); 108,6 (C-2″, C-6″); 101,0 (C-4″); 55,5 (CH_3CO).

Từ các kết quả phân tích phổ kết hợp với so sánh tài liệu tham khảo, hợp chất **HL3** được xác định là *(Z)*-5-(16-(3-hydroxy-5-methoxyphenyl)hexade-8-en-1-yl) hay là 1-(3,5-dihydroxyphenyl)-16-hydroxy-5-methoxyphenyl)-8-hexedecene, một hợp chất thuộc lớp chất alkylresorcinol với tên gọi khác là oncostemonol D, đã được phân lập từ loài *Oncostemon bojerianum* [133] (xem Phụ lục 2.1.3). Hợp chất này có công thức phân tử là $C_{29}H_{42}O_4$ và công thức cấu tạo được trình bày ở Hình 3.20.

*3.1.2.4. Hợp chất **HL4***



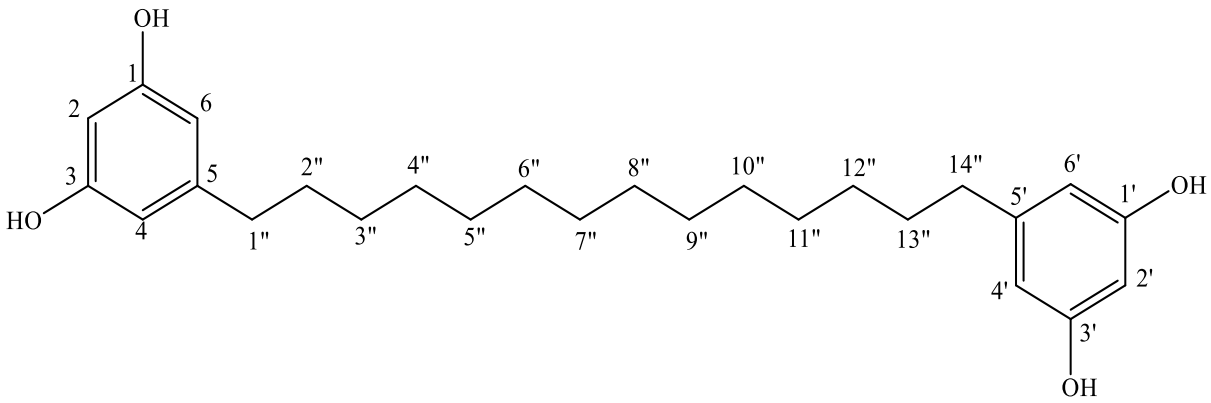
Hình 3.21. Cấu trúc hóa học của hợp chất **HL4**

Chất dầu màu vàng. Phổ HR-ESI-MS *m/z*: 461,2650 $[M+Na]^+$. Phổ ^{1}H-NMR (500 MHz, CD_3OD): $\boldsymbol{\delta_H}$ 6,14 (1H, *t*, *J* = 2,0 Hz, H-2, H-6, H-2′, H-6′); 6,10 (1H, *t*, *J* = 2,0 Hz, H-4, H-4′); 2,46 (2H, *t*, *J* = 6,5 Hz, H-1″, H-16″); 1,60 (2H, *m*, H-2″, H-15″); 1,36 (2H, *m*, H-3″, H-13″, H-14″); 1,42 (2H, *m*, H-4″, H-12″); 2,08 (2H, *m*, H-5″, H-11″); 5,32-5,34 (1H,*m*, H-6″,H-7″, H-9″, H-10″); 2,79 (2H, *t*, *J* = 6,0 Hz, H-8″). Phổ ^{13}C-NMR (125 MHz, CD_3OD): $\boldsymbol{\delta_C}$ 146,4 (C-1); 107,9 (C-2; C-6; C-2′, C-6′); 159,3 (C-3, C-5, C-3′, C-5′); 101,0 (C-4, C-4′), 146,2 (C-1′); 37,0 (C-1″); 32,4 (C-2″); 30,3 (C-3″, C-14″); 30,7

(C-4″, C-12″); 28,2 (C-5″); 129,2 (C-6″); 131,0 (C-7″); 26,7 (C-8″); 130,8 (C-9″); 129,0 (C-10″); 28,0 (C-11″); 30,5 (C-13″); 31,9 (C-15″); 36,8 (C-16″).

Từ các kết quả phân tích phổ kết hợp với so sánh tài liệu tham khảo, hợp chất **HL4** được xác định là grevirobstol A, một hợp chất thuộc nhóm phenolic kiểu alkenylresorcinol đã biết, được tách từ cây *Grevillea robusta* năm 2000 [134] (xem Phụ lục 2.1.4). Hợp chất này có công thức phân tử là $C_{28}H_{38}O_4$ và công thức cấu tạo được trình bày ở Hình 3.21, lần đầu tiên được phân lập từ chi *Helicopsis* Sleum.

*3.1.2.5. Hợp chất **HL5***



Hình 3.22. Cấu trúc hóa học của hợp chất **HL5**

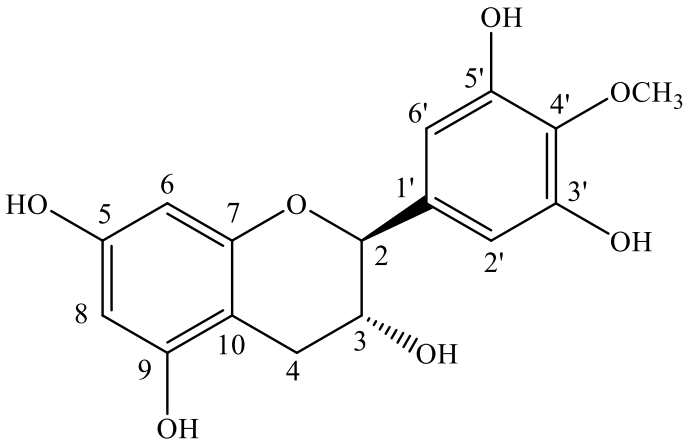
Chất dầu không màu. Phổ HR-ESI-MS *m/z*: 437,2637 $[M+Na]^+$. Phổ ^{1}H-NMR (500 MHz, CD_3OD): $\boldsymbol{\delta_H}$ 6,01 (1H, *t*, *J* = 2,0 Hz, H-2, H-2′)6,14 (1H, *t*, *J* = 2,0 Hz, H-4, H-6, H-4′, H-6′); 2,45 (2H, *t*, *J* = 7,5 Hz, H-1″, H-14″); 1,58(2H, *m*, H-2″, H-13″); 1,33 (2H, *m*, H-3″, H-4″, H-5″, H-6″,H-7″, H-8″, H-9″, H-10″, H-11″, H-12″). Phổ ^{13}C-NMR (125 MHz, CD_3OD): $\boldsymbol{\delta_C}$ 159,3 (C-1, C-3, C-1′, C-3′); 101,0 (C-2, C-2′); 108,0 (C-4, C-6, C-4′, C-6′);146,4 (C-5, C-5′); 37,0 (C-1″, C-14″); 32,4 (C-2″, C-13″); 30,3 (C-3″, C-12″); 30,6 (C-4″, C-11″); 30,7 (C-5″, C-10″); 30,8 (C-6″, C-7″, C-8″, C-9″).

Từ các kết quả phân tích phổ kết hợp với so sánh tài liệu tham khảo, hợp chất **HL5** được xác định là 5,5'-(hexadecane-1,14-diyl)bis(benzene-1,3-diol), một hợp chất đã biết từ năm 1999, gần đây được phân lập từ loài *Grevillea whiteana* [135, 136] (xem Phụ lục 2.1.5). Công thức phân tử của **HL5** là $C_{26}H_{38}O_4$, công thức cấu tạo được trình bày ở Hình 3.22, hợp chất này lần đầu tiên được phân lập từ chi *Helicopsis* Sleum.

*3.1.2.6. Hợp chất **HL6***

Trùng với hợp chất HT1 (Xem hợp chất **HT1**).

*3.1.2.7. Hợp chất **HL7***

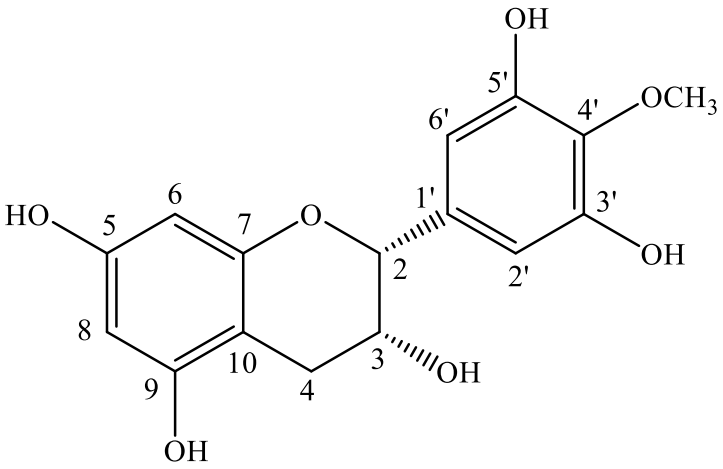


Hình 3.23. Cấu trúc hóa học của hợp chất HL7

Chất rắn màu vàng nhạt. Phổ HR-ESI-MS *m/z*: 319,0810 $[M-H]^-$. Phổ ^{1}H-NMR (500 MHz, CD_3OD): $\boldsymbol{\delta_H}$ 4,58 (1H, *d*, *J* = 7,0 Hz, H-2); 3,99 (1H, *m*, H-3); 2,81 (1H, *dd*, *J* = 16,5 Hz, 5,5 Hz và 2,53 (1H, *dd*, *J* = 16,5 Hz, 8,0 Hz); 5,95 (1H, *d*, *J* = 2,5 Hz, H-6); 5,90 (1H, *d*, *J* = 2,5Hz, H-8); 6,44 (1H, *s*, H-2″, H-6″); 3,81 (3H, *s*). Phổ ^{13}C-NMR (125 MHz, CD_3OD): $\boldsymbol{\delta_C}$ 82,6 (C-2); 68,7 (C-3); 28,0 (C-4); 157,8 (C-5); 96,4 (C-6); 157,6 (C-7); 95,5 (C-8); 156,7 (C-9); 100,7 (C-10); 136,7 (C-1′); 107,4 (C-2′); 151,6 (C-3′); 136,4 (C-4′); 151,6 (C-5′); 107,4 (C-6′); 60,7 ($COCH_3$).

Từ các kết quả phân tích phổ kết hợp với so sánh tài liệu tham khảo, hợp chất **HL7** được xác định là 4'-*O*-methyl-ent-gallocatechin, đã được phân lập từ loài *Cassia trachypus*, *Viburnum awabuki* và *Cassine papillosa* [130, 137, 138] (xem Phụ lục 2.1.7). Hợp chất này có công thức phân tử là $C_{16}H_{16}O_7$ và công thức cấu tạo được trình bày như Hình 3.23, lần đầu tiên được phân lập từ chi *Helicopsis* Sleum.

*3.1.2.8. Hợp chất **HL8***

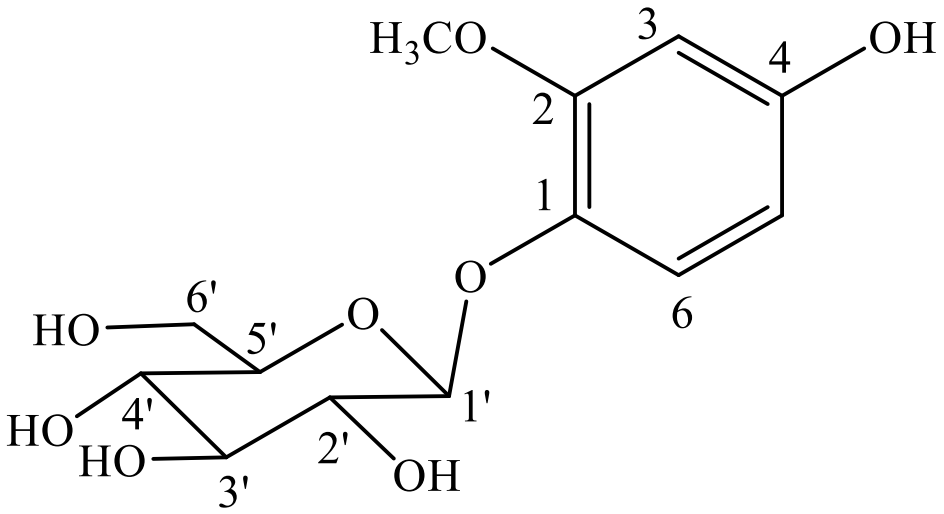


Hình 3.24. Cấu trúc hóa học của hợp chất **HL8**

Chất rắn màu vàng nhạt. Phổ HR-ESI-MS *m/z*: 319,0812 $[M-H]^-$. Phổ ^{1}H-NMR (500 MHz, CD_3OD): $\boldsymbol{\delta_H}$ 4,83 (1H, *brs*, H-2); 4,21 (1H, *brq*, H-3); 2,88 (1H, *dd*, *J* = 16,5 Hz, 4,5 Hz và 2,75 (1H, *dd*, *J* = 16,5 Hz, 2,5 Hz); 5,97 (1H, *d*, *J* = 2,5 Hz, H-6); 5,95 (1H, *d*, *J* = 2,5Hz, H-8); 6,56 (1H, *s*, H-2″, H-6″); 3,82 (3H, *s*). Phổ ^{13}C-NMR (125 MHz, CD_3OD): $\boldsymbol{\delta_C}$ 79,7 (C-2); 67,4 (C-3); 29,1 (C-4); 157,2 (C-5); 96,5 (C-6); 158,0 (C-7); 95,9 (C-8); 157,7 (C-9); 100,1 (C-10); 136,8 (C-1′); 107,2 (C-2′); 151,3 (C-3′); 136,1 (C-4′); 151,3 (C-5′); 107,2 (C-6′); 60,8 ($COCH_3$).

Từ các kết quả phân tích phổ kết hợp với so sánh tài liệu tham khảo, hợp chất **HL8** được xác định là (-)-4'-*O*-methyl-epi-gallocatechin, đã được phân lập từ loài *Viburnum awabuki* và *Cassine papillosa* [137, 138] (xem Phụ lục 2.1.8). Hợp chất này có công thức phân tử là $C_{16}H_{16}O_7$ và công thức cấu tạo được trình bày như Hình 3.24, lần đầu tiên được phân lập từ chi *Helicopsis* Sleum.

*3.1.2.9. Hợp chất **HL9***

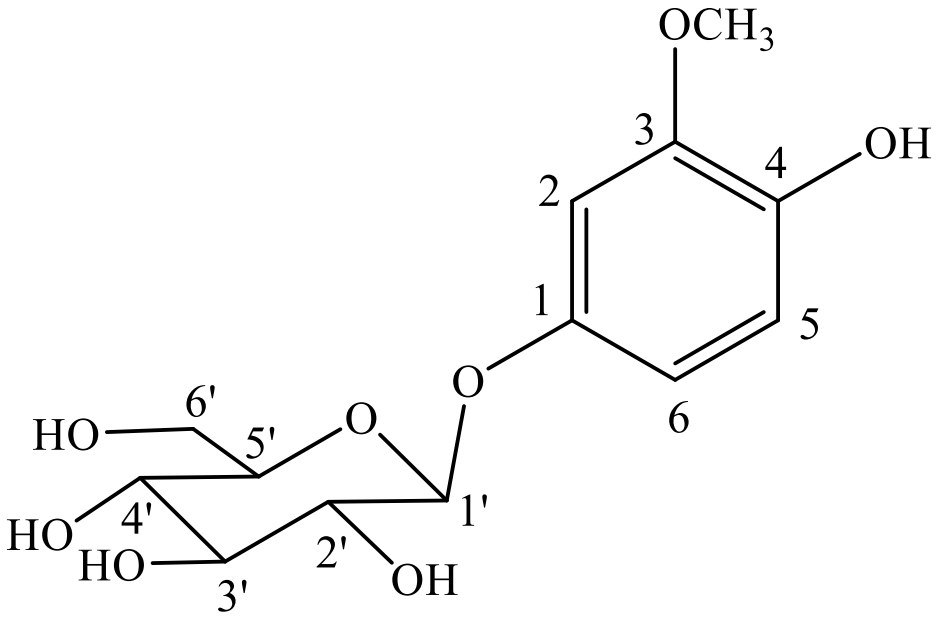


Hình 3.25. Cấu trúc hóa học của hợp chất **HL9**

Chất bột vô định hình không màu. Phổ HR-ESI-MS *m/z*: 301,0918 $[M-H]^-$. Phổ ^{1}H-NMR (500 MHz, CD_3OD): $\boldsymbol{\delta_H}$ 6,49 (1H, d, *J* = 2,5 Hz, H-2); 7,03 (1H, *d*, *J* = 8,5 Hz, H-5); 6,32 (1H, *dd*, *J* = 8.5 Hz, 2,5 Hz, H-6); 3,83 (3H, *s*, 3,5-OMe); 4,72 (1H, *d*, *J* = 7,5 Hz, H-1′); 3,45 (1H, *dd*, *J* = 9,0 Hz, 7,5 Hz, H-2′); 3,43 (1H, *t*, *J* = 9,0 Hz, H-3′); 3,70 (1H, *t*, *J* = 9,0 Hz, H-4′); 3,40 (1H, *m*, H-5′); 3,70 (1H, *dd*, *J* = 11,5 Hz, 5,5 Hz) và 3,87 (1H, *dd*, *J* = 11,5 Hz, 2,5 Hz). Phổ ^{13}C-NMR (125 MHz, CD_3OD): $\boldsymbol{\delta_C}$ 154,9 (C-1); 101,9 (C-2); 152,1 (C-3); 141,1 (C-4); 120,6 (C-5); 107,2 (C-6); 56,6 ($COCH_3$); 104,4 (C-1′); 75,1 (C-2′); 77,9 (C-3′); 71,4 (C-4′); 78,1 (C-5′); 62,6 (C-6′).

Từ các kết quả phân tích phổ kết hợp với so sánh tài liệu tham khảo, hợp chất **HL9** được xác định là isotachioside [139] (xem Phụ lục 2.1.9). Hợp chất này có công thức phân tử là $C_{13}H_{18}O_8$ và công thức cấu tạo được trình bày như Hình 3.25, đã được phân lập từ nhiều loài khác nhau như *Berchemia racemosa, Myrsine seguinii, Betula pendula,...* nhưng lần đầu tiên được phân lập từ chi *Helicopsis* Sleum.

*3.1.2.10. Hợp chất **HL10***

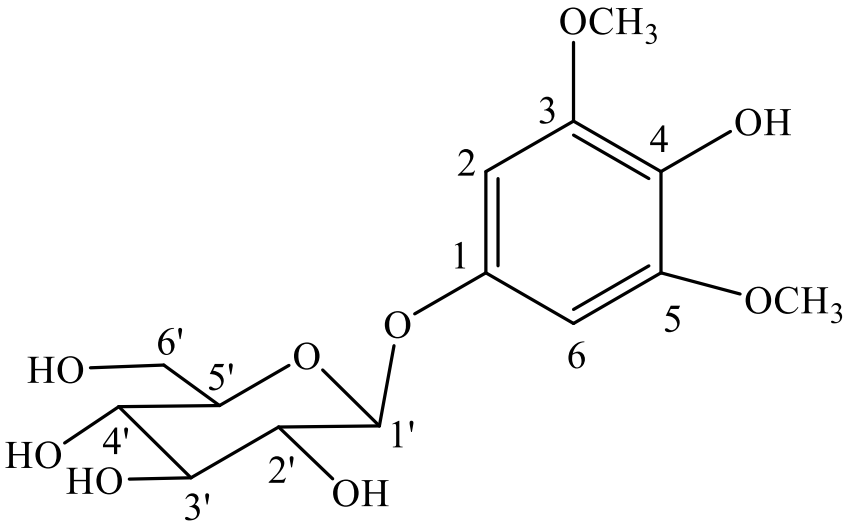


Hình 3.26. Cấu trúc hóa học của hợp chất **HL10**

Chất bột vô định hình không màu. Phổ HR-ESI-MS *m/z*: 301,0919 $[M-H]^-$. Phổ ^{1}H-NMR (500 MHz, CD_3OD): $\boldsymbol{\delta_H}$ 6,83 (1H, *d*, *J* = 2,5 Hz, H-2); 6,71 (1H, *d*, *J* = 8,5 Hz, H-5); 6,61 (1H, *dd*, *J* = 8.5 Hz, 2,5 Hz, H-6); 3,85 (3H, *s*, 3,5-OMe); 4,76 (1H, *d*, *J* = 7,5 Hz, H-1′); 3,43 (1H, *dd*, *J* = 9,0 Hz, 7,5 Hz, H-2′); 3,45 (1H, *t*, *J* = 9,0 Hz, H-3′); 3,37 (1H, *t*, *J* = 9,0 Hz, H-4′); 3,40 (1H, *m*, H-5′); 3,70 (1H, *dd*, *J* = 11,5 Hz, 5,5 Hz) và 3,92 (1H, *dd*, *J* = 11,5 Hz, 2,5 Hz). Phổ ^{13}C-NMR (125 MHz, CD_3OD): $\boldsymbol{\delta_C}$ 152,8 (C-1); 104,9 (C-2); 149,3 (C-3); 143,0 (C-4); 116,0 (C-5); 110,1 (C-6); 56,4 ($COCH_3$); 103,8 (C-1′); 75,0 (C-2′); 78,1 (C-3′); 71,6 (C-4′); 78,2 (C-5′); 62,7 (C-6′).

Từ các kết quả phân tích phổ kết hợp với so sánh tài liệu tham khảo, hợp chất **HL10** được xác định là tachioside [139] (xem Phụ lục 2.1.10). Hợp chất này có công thức phân tử là $C_{13}H_{18}O_8$ và công thức cấu tạo được trình bày như Hình 3.26, đã được phân lập từ nhiều loài khác nhau, như *Myrsine seguinii, Sarcolobus globosus, Sarcolobus globosus,...* nhưng đây là lần đầu tiên được phân lập từ chi *Helicopsis* Sleum.

*3.1.2.11. Hợp chất **HL11***

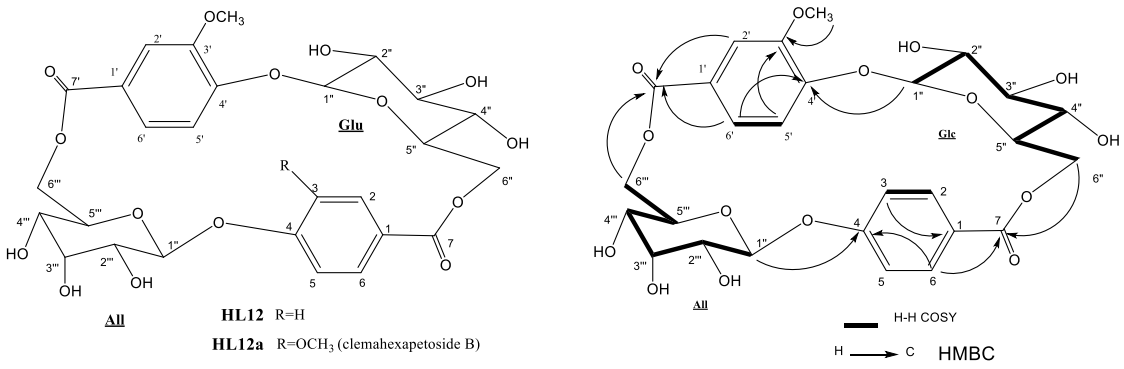


Hình 3.27. Cấu trúc hóa học của hợp chất **HL11**

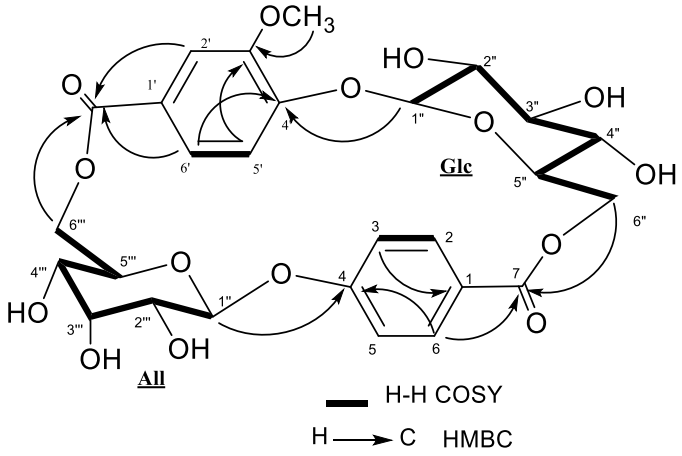
Chất bột vô định hình không màu. Phổ HR-ESI-MS *m/z*: 355,0984 $[M+Na]^+$. Phổ ^{1}H-NMR (500 MHz, CD_3OD): $\boldsymbol{\delta_H}$ 6,83 (1H, *d*, *J* = 2,5 Hz, H-2, H-6); 3,71 (3H, *s*, 3,5-OMe); 4,68 (1H, *d*, *J* = 7,5 Hz, H-1′); 3,18 (1H, *dd*, *J* = 9,0 Hz, 7,5 Hz, H-2′); 3,28 (1H, *t*, *J* = 9,0 Hz, 9,0 Hz H-3′); 3,11 (1H, *m*, H-4′); 3,28 (1H, *m*, H-5′); 3,43 (1H, dd, *J* = 12,0 Hz, 6,5 Hz) và 3,72 (1H, *dd*, *J* = 12,0 Hz, 3,0 Hz). Phổ ^{13}C-NMR (125 MHz, CD_3OD): $\boldsymbol{\delta_C}$ 150,3 (C-1); 95,1 (C-2, C-6); 148,2 (C-3, C-5); 130,4 (C-4); 55,9 ($COCH_3$); 101,7 (C-1′); 73,3 (C-2′); 76,8 (C-3′); 70,2 (C-4′); 77,7 (C-5′); 61,0 (C-6′).

Từ các kết quả phân tích phổ kết hợp với so sánh tài liệu tham khảo, hợp chất **HL11** được xác định là 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1-*β*-D-glucopyranoside, đã được phân lập từ loài *Hypericum geminiflorum* [140] (xem Phụ lục 2.1.11). Hợp chất này có công thức phân tử là $C_{15}H_{22}O_9$ và công thức cấu tạo được trình bày như Hình 3.27, lần đầu tiên được phân lập từ chi *Helicopsis* Sleum.

*3.1.2.12. Hợp chất **HL12***



Hình 3.28. Cấu trúc hóa học của hợp chất **HL12** và hợp chất tham khảo



Hình 3.29. Các tương tác HMBC, COSY chính của hợp chất **HL12**

** Tính chất và thông số phổ:*

+ Chất bột vô định hình

+ Phổ HR-ESI-MS *m/z*: 593,1499 $[M-H]^-$

+ Tính toán lý thuyết cho công thức $C_{27}H_{29}O_{15}$: 593,1506

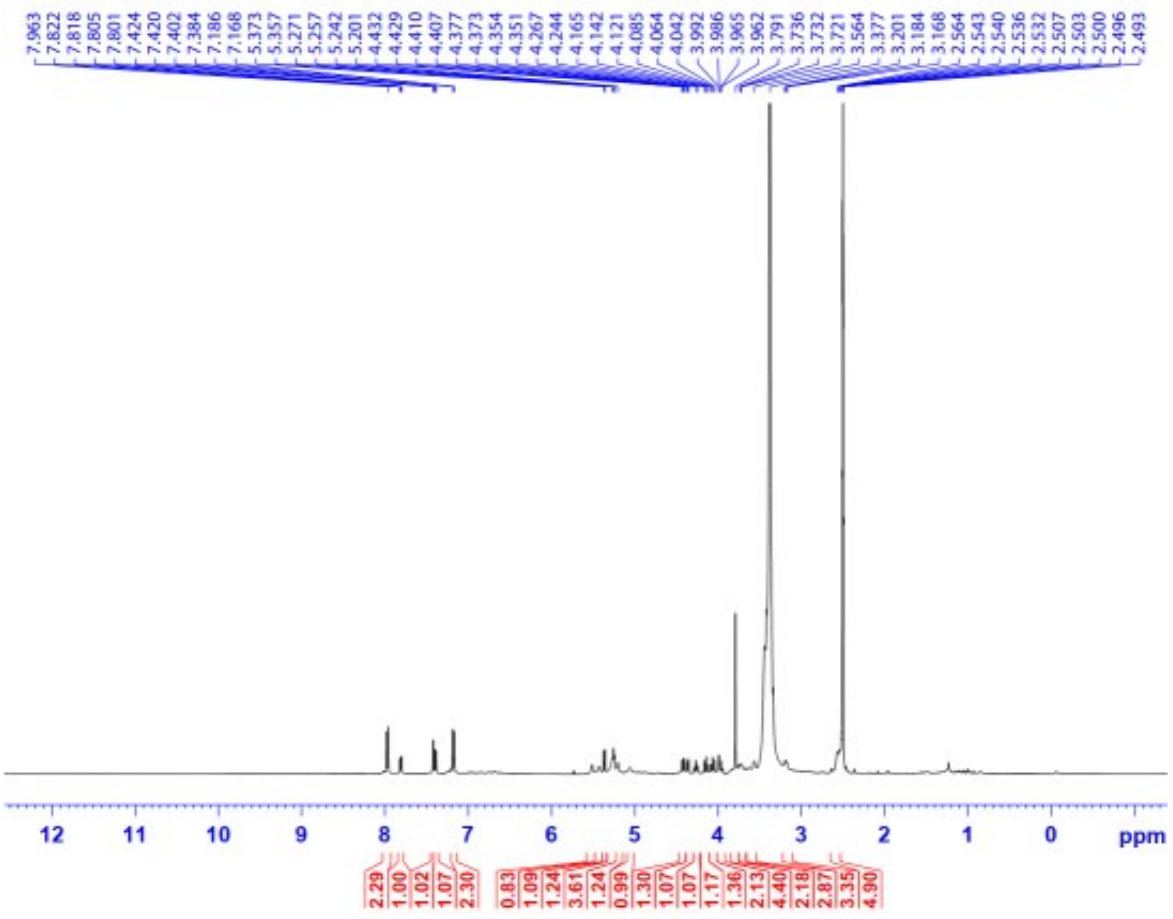
+ Số liệu phổ ^{1}H-NMR (500 MHz) và ^{13}C-NMR (125 MHz) xem Bảng 3.21 và Phụ lục 3.21.2 & 3.21.3.

Bảng 3.2. Số liệu phổ NMR của hợp chất **HL12** và hợp chất tham khảo

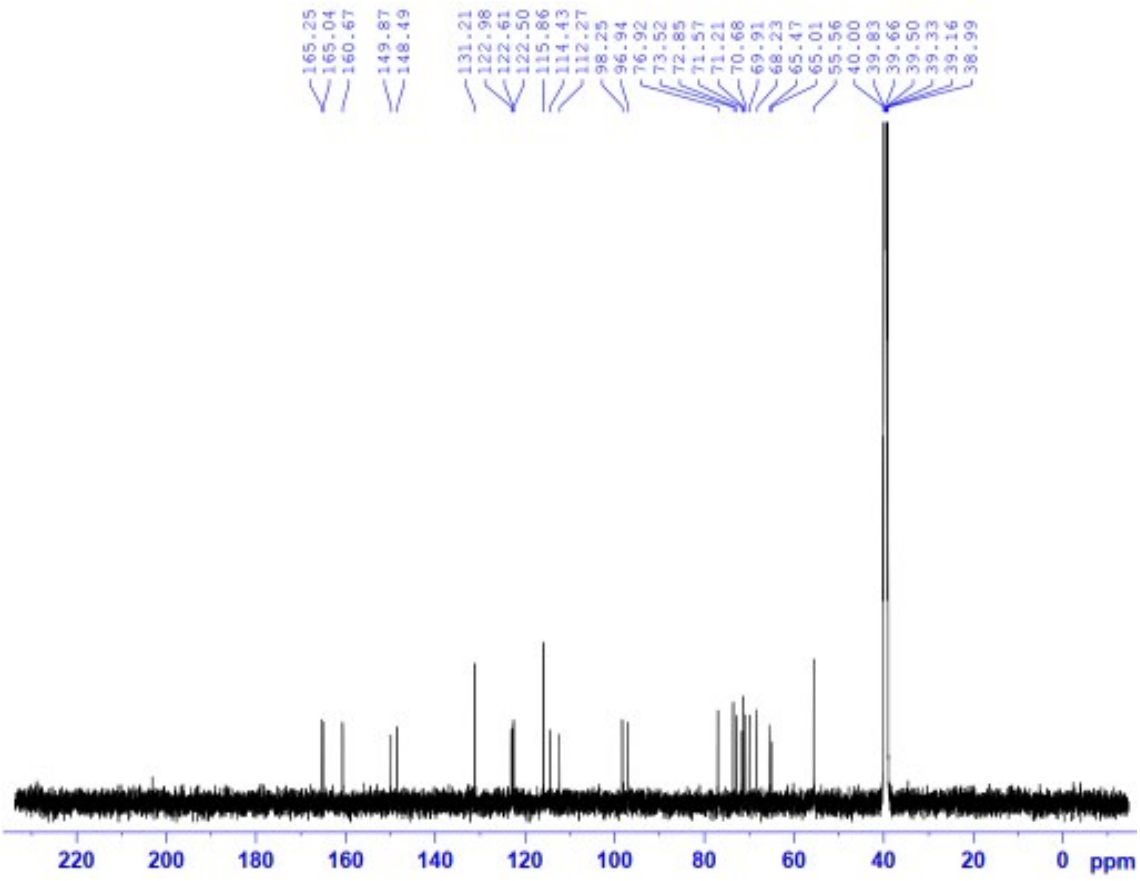
C	**$^{\#}\delta_C$[1]**	**δ_C[a,b]**	**δ_H[a,c] (độ bội, *J* = Hz)**
1	123,1	122,6	-
2	112,2	131,2	7,97 (1H, d, J = 8,5)
3	148,5	115,9	7,18 (1H, d, J = 8,5)
4	150,1	160,7	-
5	114,4	115,9	7,18 (1H, d, J = 8,5)
6	122,5	131,2	7,97 (1H, d, J = 8,5)
7	165,3	165,0	-
1′	123,1	122,5	-
2′	112,1	112,3	7,42 (1H, d, J = 2,0)
3′	148,4	148,5	-
4′	149,8	149,9	-
5′	114,3	114,4	7,39 (1H, d, J = 8,5)
6′	122,4	123,0	7,81 (1H, dd, J = 8,5, 2,0)
7′	165,2	165,3	-
3-OMe	55,5	-	-
3′-OMe	55,5	55,6	3,79 (3H, s)
***β*-D-Glc**			

1″	98,2	98,3	5,25 (1H, d, J = 7,5)
2″	72,8	72,8	3,38 (*)
3″	76,9	76,9	3,39 (*)
4″	70,6	70,7	3,18 (1H, dd, J = 9,0, 9,0)
5″	73,5	73,5	3,97 (1H, m)
6″	65,5	65,1	4,42 (1H, dd, J = 11,5, 1,5) 4,06 (1H, br d, J = 11,5)
***β*-D-All**			
1‴	96,7	96,9	5,36 (1H, d, J = 8,0)
2‴	71,7	69,9	3,56 (1H, m)
3‴	69,8	71,6	3,98 (1H, br d, J = 2,5)
4‴	68,2	68,2	3,45 (*)
5‴	71,5	71,2	4,25 (1H, m)
6‴	65,1	65,1	4,36 (1H, dd, J = 11,5, 2,0) 4,14 (1H, br d, J = 11,5)

Đo trong [a]DMSO-d_6, [b]125 MHz, [c]500 MHz, [*]tín hiệu bị lấp, [#]δ_C của Clemahexapetoside B đo trong DMSO-d_6 [141]



Hình 3.30. Phổ 1H-NMR của hợp chất HL12

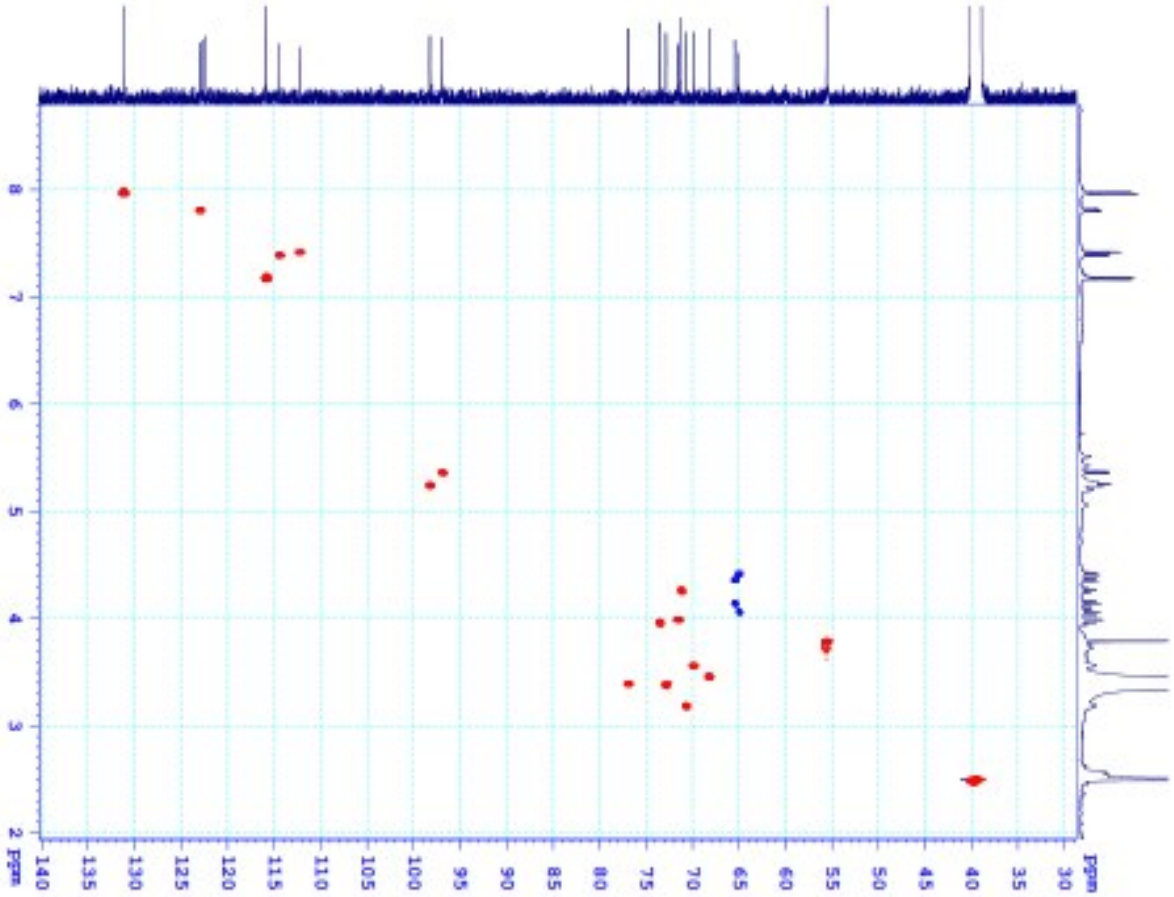


Hình 3.31. Phổ 13C-NMR của hợp chất HL12

Hợp chất **HL12** được phân lập từ phân đoạn nước dưới dạng chất bột vô định hình. Phổ ^{1}H-NMR của hợp chất **HL12** xuất hiện ở vùng trường thấp với 5 tín hiệu đặc trưng của các vòng thơm từ 7,16-7,97 ppm. Trong đó hai tín hiệu tại δ_H 7,97 (2H, d, J = 8,5 Hz) và 7,18 (2H, d, J = 8,5 Hz) chứng tỏ sự có mặt của một vòng thơm thế *para*; ba tín hiệu tương tác theo hệ ABX tại δ_H 7,81 (1H, dd, J = 8,5, 2,0 Hz), 7,39 (1H, d, J = 8,5 Hz) và 7,42 (1H, d, J = 2,0 Hz) chứng tỏ sự có mặt của một vòng thơm thứ hai thế tại các vị trí 1,3,4. Hai phân tử đường được nhận dạng bởi hai tín hiệu proton anome tại δ_H 5,36 (1H, d, J = 8,0 Hz) và 5,25 (1H, d, J = 7,5 Hz), các tín hiệu còn lại của hai phân tử đường xuất hiện trong vùng có độ dịch chuyển hóa học từ 3,20-4,50 ppm. Một nhóm methoxy được xác định bởi tín hiệu singlet tại δ_H 3,79 (3H, s).

Phổ ^{13}C-NMR cùng với phổ HSQC của hợp chất **HL12** khẳng định sự có mặt của 25 tín hiệu đặc trưng cho 27 nguyên tử carbon, trong đó 4 tín hiệu đặc trưng cho 6 nguyên tử carbon của một vòng thơm thế *para* tại δ_C 160,7, 115,9 x 2, 131,2 x 2 và 122,6, 6 tín hiệu của một vòng thơm thế 1,3,4 tại δ_C 149,9, 148,5, 122,5, 123,0, 114,4 và 112,3, hai nhóm carbonyl este tại δ_C 165,3 và 165,9, tín hiệu của một nhóm methoxy tại δ_C 55,6, 12 tín hiệu carbon còn lại thuộc về hai phân tử đường, trong đó hai carbon

anome tại δ_C 98,3 và 96,9, hai carbon oximethylen tại δ_C 68,2 và 65,1. Sự dịch chuyển về phía trường thấp hơn của hai tín hiệu carbon oximethylen chứng tỏ rằng hai nhóm oximethylen này đã được gắn vào hai nhóm C=O thông qua liên kết este. Sự hình thành hai liên kết este này còn được chứng minh bằng tương tác HMBC giữa proton H-6‴ (δ_H 4,36/4,14) của phân tử đường thứ nhất với nhóm C=O tại δ_C 165,3 và tương tác HMBC giữa proton H-6″ (δ_H 4,06/4,42) của phân tử đường thứ hai với nhóm C=O tại δ_C 165,0. Đồng thời có sự xuất hiện tương tác HMBC giữa proton anome tại δ_H 5,36 với C-4 (δ_C 160,7) của vòng thơm thế para và tương tác HMBC giữa proton anome thứ hai tại δ_C 5,25 với tín hiệu C-4′ (δ_C 149,9) của vòng thơm thế 1,3,4.

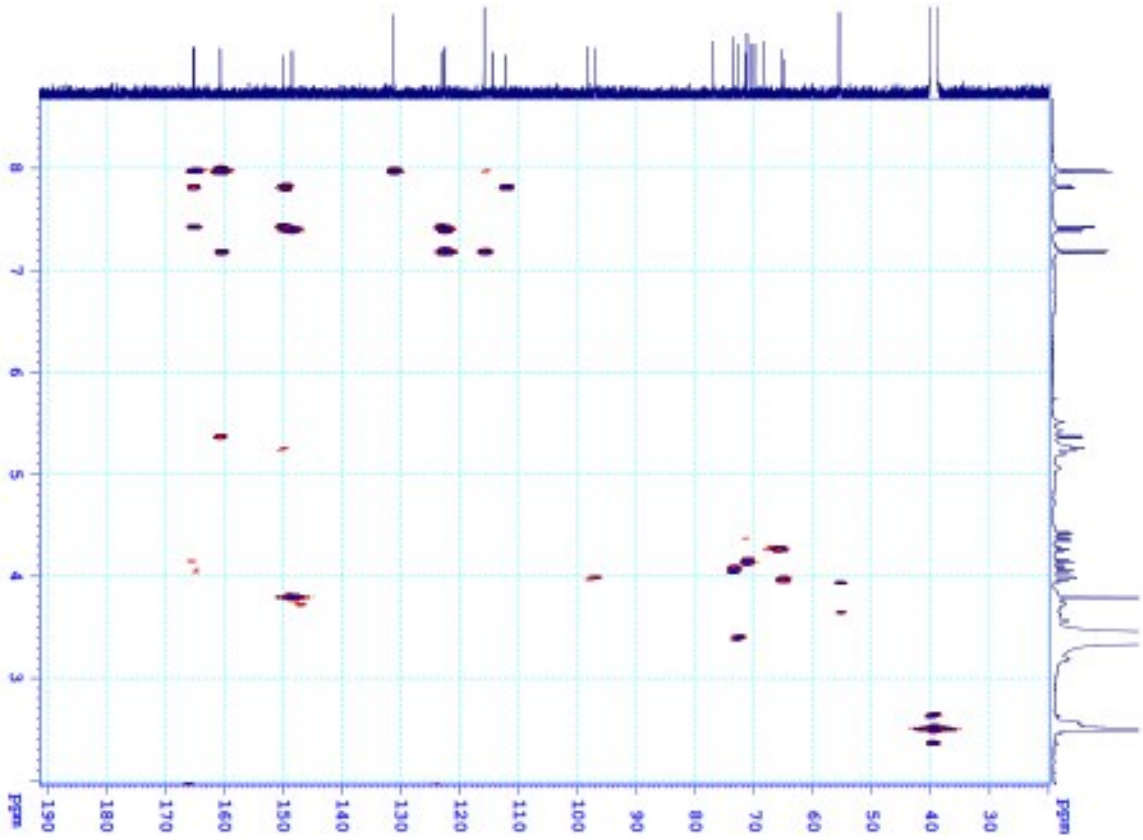


Hình 3.32. Phổ HSQC của hợp chất HL12

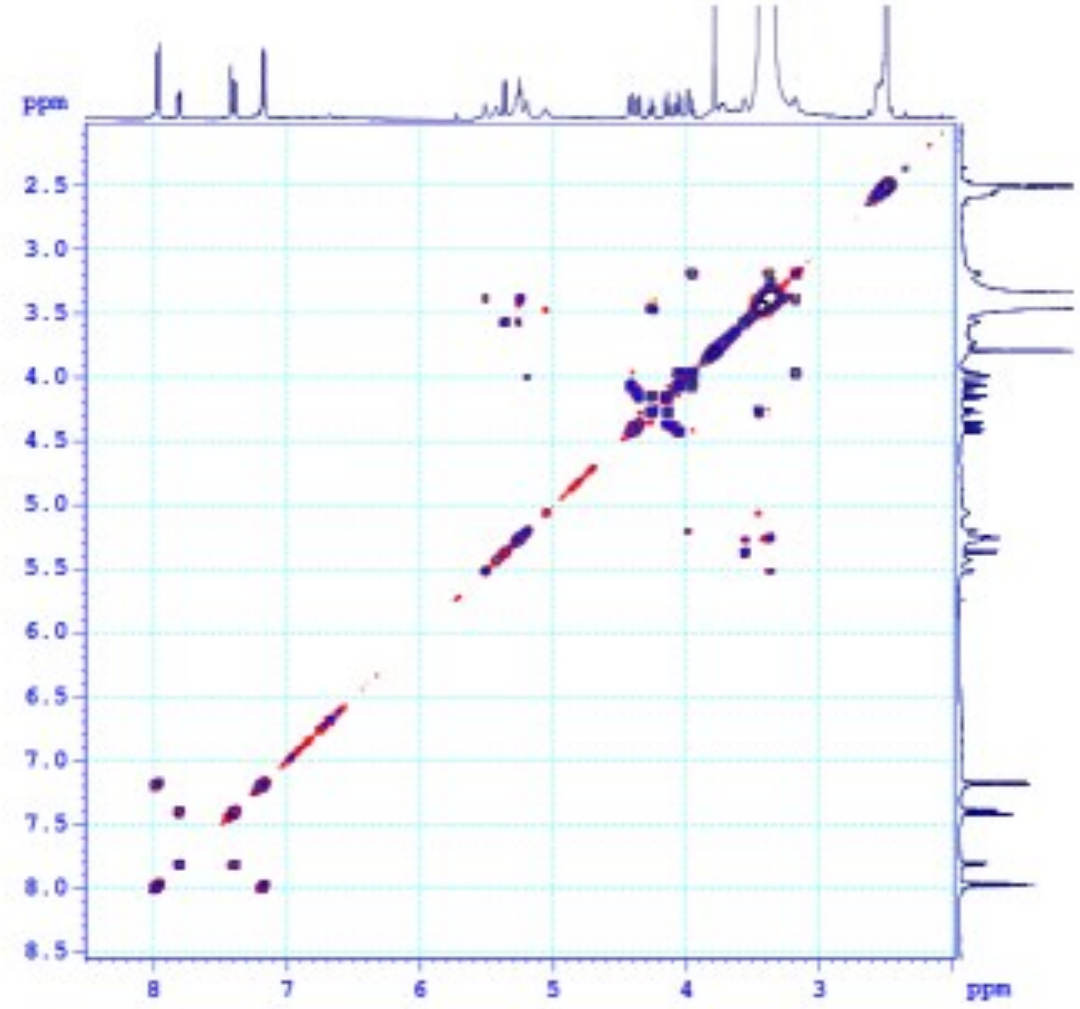
Các giá trị độ dịch chuyển hóa học của hai vòng thơm được xác định nhờ các tương tác HSQC và HMBC. Trên phổ HSQC, tín hiệu proton tại δ_H 7,81, 7,39, 7,42 lần lượt có tương tác với các carbon tương ứng tại δ_C 123,0, 114,4, 112,3. Đồng thời tương tác HMBC giữa H-6′ với C-4′/C-2′/C-7′, giữa H-2′ với C-4′, C-7′, giữa proton của nhóm methoxy tại δ_H 3,79 với C-3′ (δ_C 148,5) đã khẳng định nhóm methoxy gắn vào C-3′ của vòng thơm thế 1,3,4. Tương tự như vậy, các giá trị độ dịch chuyển hóa học của proton

và carbon còn lại được xác định chính xác nhờ phân tích phổ hai chiều HSQC và HMBC, đồng thời khẳng định trật tự nối giữa hai phân tử đường với hai vòng thơm tương ứng như được chỉ ra trên Hình 3.28. Với kết quả phân tích nêu trên, hợp chất **HL12** dự đoán có cấu trúc hóa học gần giống với cấu trúc hóa học của hợp chất clemahexapetoside B [141], trong đó hợp chất **HL12** thiếu một nhóm methoxy ở vị trí C-3 so với hợp chất clemahexapetoside B.

Phân tích và so sánh các dữ kiện phổ NMR của hai hợp chất nêu trên cho thấy sự trùng khớp hoàn toàn về giá trị phổ NMR của hai phân tử đường, trong đó có một đường allose và một đường glucose (Bảng 3.2), cũng như sự trùng khớp tương ứng giữa các giá trị phổ NMR của một đơn vị acid vallinic. Sự khác biệt xuất hiện ở vòng thơm thế para so với số liêu của một đơn vị acid vallinic thứ hai của hợp chất clemahexapetoside B (Bảng 3.2). Giá trị hằng số tương tác khá lớn của hai proton anome tại δ_H 5,25 (1H, d, J = 7,5 Hz) của đường glucose và δ_H 5,36 (1H, d, J = 8,0 Hz) của đường allose chứng tỏ cấu hình của hai phân tử đường là β-glucopyranose và β-allopyranose.



Hình 3.33. Phổ HMBC của hợp chất HL12



Hình 3.34. Phổ H-H COSY của hợp chất HL12

Ngoài ra, trên phổ H-H COSY xuất hiện tương tác giữa các proton H-1″-H-2″-H-3″-H-4″-H-5″-H-6″ của phân tử đường glucose và tương tác giữa các proton H-1‴-H-2‴, H-3‴-H-4‴-H-5‴-H-6‴ của phân tử đường allose. Kết hợp với phổ HSQC có thể gán chính xác các giá trị độ dịch chuyển hóa học của các phân tử đường này (Bảng 3.21). Phân tích kiểu tương tác spin giữa các proton của phân tử đường allose cũng như giá trị hằng số tương tác *J* cho thấy H-3‴ xuất hiện dưới dạng broad doublet với giá trị hằng số tương tác khá nhỏ (*J* = 2,5 Hz) chứng tỏ H-3‴ phải chiếm vị trí equatorial, đúng với cấu hình của đường allose và phù hợp hoàn toàn với dữ kiện đã công bố cho hợp chất clemahexapetoside B [141]. Phân tích các giá trị hằng số tương tác của phân tử đường glucose cho thấy các proton của phân tử đường này đều có hằng số tương tác *J* khá lớn, phù hợp với cấu hình axial của các proton H-1″, H-2″, H-3″, H-4″, H-5″.

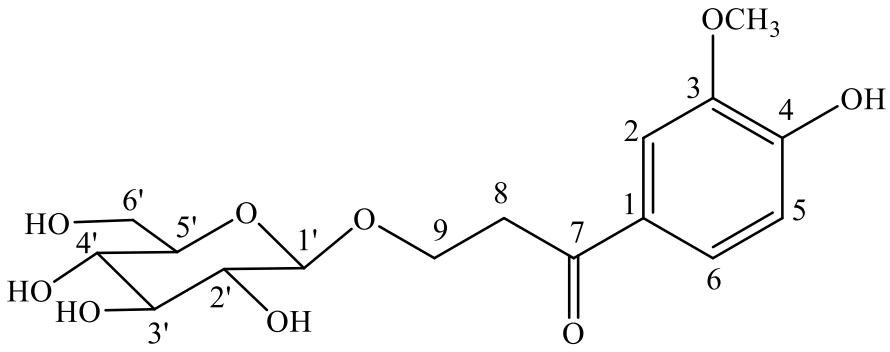
Thêm vào đó, từ kết quả định tính HPLC, trên sắc ký đồ của mẫu **HL12** sau khi thủy phân xuất hiện hai pic chính có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của các

mẫu đường chuẩn D-glucose (ở khoảng 11,2 phút) và D-allose (ở khoảng 13,7 phút). Điều này giúp khẳng định cấu hình của hai đường trong phân tử hợp chất **HL12** lần lượt là D-glucose và D-allose.

Như vậy, công thức phân tử dự kiến của hợp chất **HL12** là $C_{27}H_{30}O_{15}$. Công thức phân tử này được khẳng định chính xác thông qua phổ khối lượng phân giải cao HR-MS với sự xuất hiện pic ion tại m/z 593,1499 $[M-H]^-$ cho thấy hợp chất **HL12** có công thức phân tử $C_{27}H_{30}O_{15}$ (tính toán lí thuyết cho công thức phân tử $C_{27}H_{29}O_{15}$: 593,1506) với sai số Δ = -1,2 ppm.

Từ các dữ kiện phổ và phân tích nêu trên, cấu trúc hóa học của hợp chất **HL12** được xác định là một hợp chất macroxyclic glycoside mới và được đặt tên là **helilobatoside A** [142].

*3.1.2.13. Hợp chất **HL13***



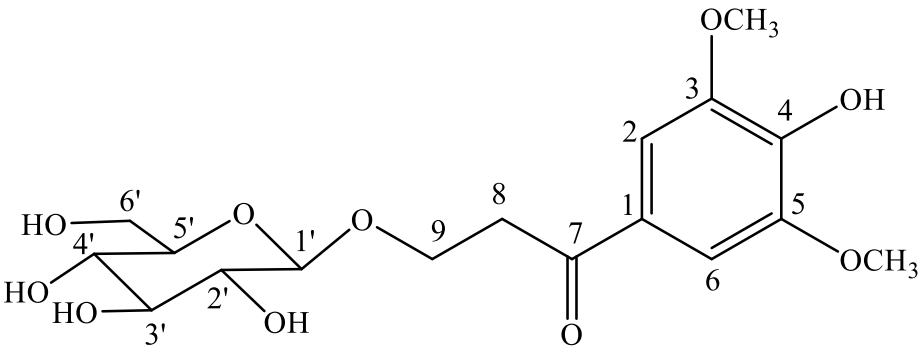
Hình 3.35. Cấu trúc hóa học của hợp chất **HL13**

Chất bột màu trắng, vô định hình. Phổ HR-ESI-MS *m/z*: 357,1175 $[M-H]^-$. Phổ ^{1}H-NMR (500 MHz, CD_3OD): $\boldsymbol{\delta_H}$ 7,57 (1H, *d*, *J* = 2, 0 Hz, H-2); 6,88 (1H, *d*, J = 8,5 Hz, H-5); 7,62 (1H, *dd*, *J* = 8,5 Hz, 2,0 Hz, H-6); 3,32 (2H, *m*, H-8); 4,01 (*dd*, 12,5 Hz, 9,0 Hz) và 4,27 (*dd*, 12,5 Hz, 9,0 Hz) (H-9); 3,94 (3H, *s*, 3-OMe); 4,33 (1H, *d*, *J* = 7,5 Hz, H-1′); 3,17 (1H, *d*, J = 9,0 Hz, 7,5 Hz, H-2′); 3,37 (1H, *t*, *J* = 9,0 Hz, H-3′); 3,29 (1H, *t*, *J* = 9,0 Hz, H-4′); 3,29 (1H, *m*, H-5′); 3,67 (1H, *dd*, *J* = 11,5 Hz, 6,0 Hz) và 3,84 (1H, *dd*, *J* = 11,5 Hz, 2,0 Hz) (H-6′). Phổ ^{13}C-NMR (125 MHz, CD_3OD): $\boldsymbol{\delta_C}$ 130,9 (C-1); 112,0 (C-2); 149,1 (C-3); 153,6 (C-4); 115,9 (C-5); 124,9 (C-6); 199,4 (C-7); 39,4 (C-8); 66,5 (C-9); 56,4 (3-OMe); 104,7 (C-1′); 75,1 (C-2′); 78,0 (C-3′, C-5′); 71,6 (C-4′); 62,7 (C-6′).

Từ các kết quả phân tích phổ kết hợp với so sánh tài liệu tham khảo, hợp chất **HL13** được xác định là *β*-Hydroxypropiovanillone 3-*O*-*β*-D-glucopyranoside [142, 143]

(xem Phụ lục 2.1.12). Hợp chất này có công thức phân tử là $C_{16}H_{22}O_9$ và công thức cấu tạo được trình bày như Hình 3.35. Đây là hợp chất đã được tìm từ nhiều loài khác nhau như *Lagerstroemia indica, Elsholtzia ciliate, Elsholtzia ciliate*,... nhưng lần đầu tiên được phân lập từ chi *Helicopsis* Sleum.

*3.1.2.14. Hợp chất **HL14***



Hình 3.36. Cấu trúc hóa học của hợp chất **HL14**

Chất bột màu trắng ngà. Phổ HR-ESI-MS *m/z*: 387,1283 $[M-H]^-$. Phổ ^{1}H-NMR (500 MHz, CD_3OD): $\boldsymbol{\delta_H}$ 7,35 (1H, *s*, H-2, H-6); 3,32 (2H, *m*, H-8); 4,29 (1H, *dd*, *J* = 12,5 Hz, 9,0 Hz) và 4,03 (1H, *dd*, *J* = 12,5 Hz, 9,0 Hz) (H-9); 3,94 (3H, *s*, 3,5-OMe); 4,36 (1H, *d*, *J* = 7,5 Hz, H-1′); 3,17 (1H, *dd*, *J* = 9,0 Hz, 7,5 Hz, H-2′); 3,37 (1H, *t*, *J* = 9,0 Hz, H-3′); 3,29 (*, H-4′, H-5′); 3,66 (1H, *dd*, *J* = 11,5 Hz, 5,5 Hz) và 3,84 (1H, *dd*, *J* = 11,5 Hz, 2,0 Hz) (H-6′). Phổ ^{13}C-NMR (125 MHz, CD_3OD): $\boldsymbol{\delta_C}$ 129,0 (C-1); 107,4 (C-2, C-6); 149,1 (C-3, C-5); 142,5 (C-4); 199,3 (C-7); 39,4 (C-8); 66,6 (C-9); 56,9 (3,5-OMe); 104,7 (C-1′); 75,1 (C-2′); 78,0 (C-3′); 71,6 (C-4′); 78,1 (C-5′); 62,7 (C-6′).

Từ các kết quả phân tích phổ kết hợp với so sánh tài liệu tham khảo, hợp chất **HL14** được xác định là 3′,5′-dimethoxy-3,4′-dihydroxypropiophenone 3-*O*-*β*-D-glucoside, đã được phân lập từ loài *Stipagrostis plumosa* [142, 143] (xem Phụ lục 2.1.13). Hợp chất này có công thức phân tử là $C_{17}H_{24}O_{10}$ và công thức cấu tạo được trình bày như Hình 3.36, lần đầu tiên được phân lập từ chi *Helicopsis* Sleum.

Sau quá trình phân lập và tinh chế, đã xác định được 14 hợp chất từ dược liệu Bàn tay ma đỏ. Trong đó có một hợp chất mới và 13 hợp chất đã biết, nhưng đây là các hợp chất lần đầu tiên phân lập được từ chi *Heliciopsis* Sleum.

So với loài Bàn tay ma trắng, có 01 hợp chất chung của hai loài (hợp chất **HT1** và hợp chất **HL6**, tên là *(Z)*-5,5'-(hexadec-8-ene-1,16-diyl)bis(benzene-1,3-diol).

3.2. Tác dụng bảo vệ gan của hai loài dược liệu Bàn tay ma

Đề tài luận án đã đánh giá được tác dụng bảo vệ gan của cao chiết nước và các chất phân lập được từ hai loài Bàn tay ma. Kết quả như sau:

3.2.1. Tác dụng bảo vệ gan của hai loài Bàn tay ma trên mô hình in vivo

Để đánh giá tác dụng bảo vệ gan của hai loài dược liệu Bàn tay ma theo kinh nghiệm sử dụng của nhân dân, cả hai dược liệu được chiết với nước sôi, cô đặc thành cao để làm thí nghiệm. Liều sử dụng được thiết kế thay đổi xung quanh liều dược liệu đang sử dụng trong dân gian và từ liều dược liệu của bài thuốc Bàn tay ma mà nhóm nghiên cứu của GS.TS. Phạm Hùng Việt cùng cộng sự đã nghiên cứu.

Theo điều tra của nhóm tác giả Đỗ Huy Bích, Viện Dược Liệu, liều sử dụng trong dân gian đối với cây Bàn tay ma đỏ là 60 – 90 g/người/ngày [3]. Đối với Dược liệu Bàn tay ma đỏ, liều thiết kế sẽ thay đổi xung quanh lượng đang dùng này. Còn trong bài thuốc Bàn tay ma đã được công nhận sở hữu trí tuệ của nhóm GS.TS. Phạm Hùng Việt thì dược liệu Bàn tay ma trắng được sử dụng với hai loại dược liệu là Cà gai leo và Giảo cổ lam trong bài thuốc với liều 30 g/người/ngày cho thành phần dược liệu Bàn tay ma trắng. Tuy vậy, ở công bố về đánh giá tác dụng bảo vệ gan của bài thuốc Bàn tay ma của nhóm tác giả này, liều gấp đôi liều thông thường của bài thuốc có tác dụng tốt hơn liều đang sử dụng trong dân gian [18]. Nghĩa là với lượng dược liệu Bàn tay ma trắng là 60 g/người/ngày kết hợp với hai dược liệu có tác dụng bảo vệ gan tốt là Cà gai leo và Giảo cổ lam thì cho tác dụng bảo vệ gan tốt hơn liều thông thường. Do đó, khi thử nghiệm tác dụng bảo vệ gan đơn độc của loài Bàn tay ma trắng, liều thấp nhất nên là liều 60 g/người/ngày.

Kết hợp cả kiến thức thực tiễn và kết quả nghiên cứu hiện có và cùng với các thông tin mà nhóm nghiên cứu của PGS.TS. Trần Văn Ơn cung cấp rằng hai loài dược liệu này vẫn được ông lang, bà mễ dùng lẫn lộn, thay thế nhau [9], liều nghiên cứu đã được thiết kế chung cho cả hai loài dược liệu là 60 g, 120 g và 240 g dược liệu trên người/ngày. Qua đó, lượng cao chiết được sử dụng trong thí nghiệm sẽ được quy đổi theo lượng dược liệu, đồng thời liều cao chiết cũng được quy đổi từ người sang chuột nhắt trắng theo các hướng dẫn hiện hành. Kết quả quy đổi như Bảng 2.1.

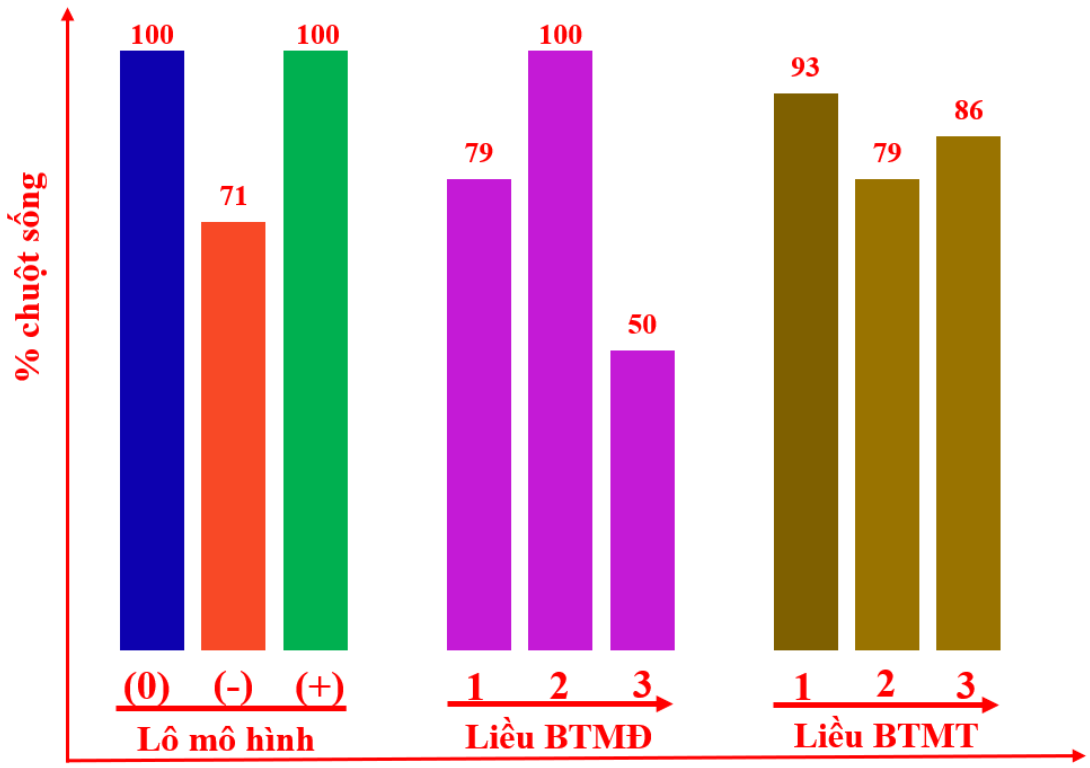
Ký hiệu các lô chuột thí nghiệm trong mô hình như sau:

- *Sly: lô sinh lý, chuột uống nước cất;*
- *(-): Lô bệnh lý, chuột uống PAR;*

- *(+): Lô chứng dương, chuột uống uống PAR và silymarin;*
- *BTMĐ: Cao chiết nước bàn tay ma đỏ;*
- *BTMT: Cao chiết nước Bàn tay ma trắng.*

Các liều 1, 2 và 3 lần lượt là liều chuột uống cao chiết tương ứng với liều quy đổi dược liệu là 60 g, 120 g và 240 g dược liệu cho người trong ngày.

Tỷ lệ chuột nghiên cứu còn sống sau khi gây độc bằng PAR ở các lô biểu diễn như Hình 3.37.



Hình 3.37. Tỷ lệ chuột thí nghiệm còn sống sau khi uống mẫu thử

Kết quả tỷ lệ khối lượng gan và khối lượng chuột, định lượng enzyme ALT và AST, thực hiện quan sát mô bệnh học gan và đánh giá khả năng chống oxy hóa qua TBARs chỉ thực hiện trên số chuột còn sống. Như đã trình bày ở phần tổng quan, các chỉ số enzym ALP, GSH và bilirubin không được đánh giá ở nghiên cứu này.

3.2.1.1. Kết quả quan sát đại thể gan và tỷ lệ khối lượng gan so với khối lượng chuột

Kết quả đại thể gan chuột (Hình 3.38) cho thấy ở lô sinh lý (Lô 1), gan màu đỏ nâu, mặt nhẵn, mật độ mềm, không có hiện tượng phù nền, xung huyết. Ngược lại, ở lô bệnh lý, màu nâu đỏ của gan bị bạc, phù nền, xung huyết, bề mặt gan sần sùi, có các chấm huyết và các điểm tổn thương nổi rải rác. Hiện tượng tương tự cũng quan sát được trên hình ảnh đại thể của gan chuột uống cao chiết nước Bàn tay ma trắng (lô 6-8).

SL **(-)** **(+)**

HL liều 1 **HL liều 2** **HL liều 3**

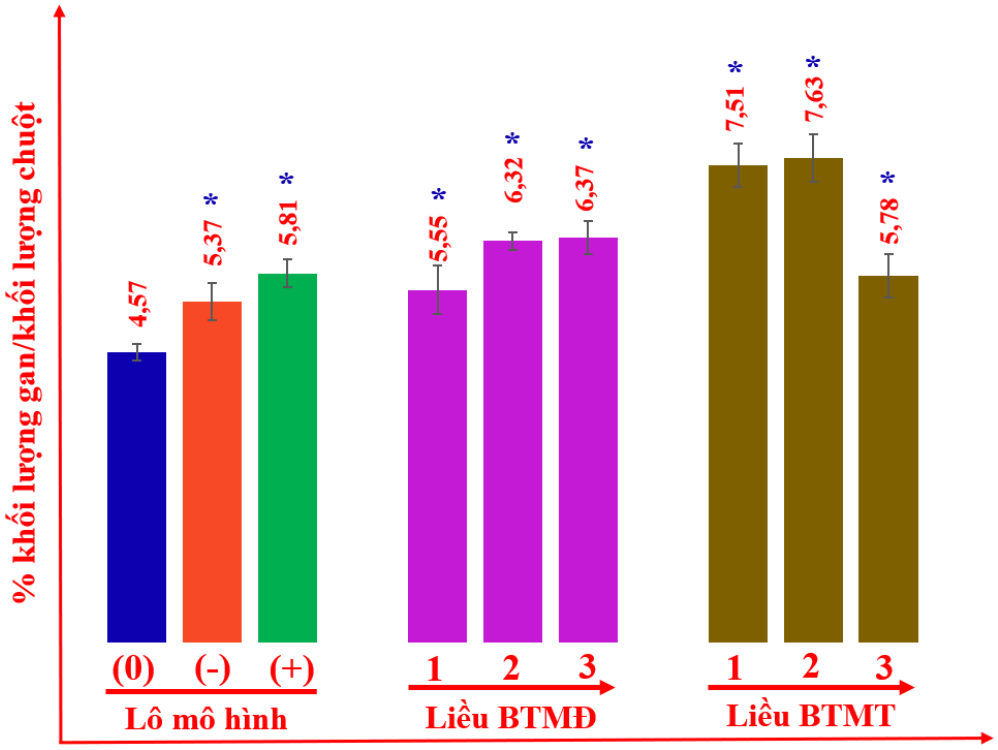
HT liều 1 **HT liều 2** **HT liều 3**

Hình 3.38. Ảnh hưởng của cao chiết nước các dược liệu Bàn tay ma trên hình ảnh giải phẫu đại thể gan chuột

Đối với chuột uống cao chiết nước Bàn tay ma đỏ, lô 3 và lô 4 bề mặt gan nhẵn, bóng, hình thái gần tương tự như bề mặt gan chuột ở lô 1 mặc dù màu sắc vẫn còn nhạt hơn lô 1 một chút. Gan chuột ở lô 5 màu nhạt hơn và bề mặt gan không bóng bằng các lô 3, lô 4 và lô 6; các điểm tổn thương trên bề mặt găn vẫn còn rất nhiều, có thể quan sát thấy được mặc dù không rõ ràng như gan chuột ở lô 2. Hình ảnh đại thể gan chuột ở lô 9 (lô chứng dương) cũng cho thấy nhiều nét tương đồng với gan chuột ở lô sinh lý và lô uống cao chiết nước Bàn tay ma đỏ liều 2 (lô 4).

Kết quả đại phẫu có thể giúp dự đoán rằng cao chiết nước dược liệu Bàn tay ma đỏ ở liều thấp và liều trung bình cho tác dụng bảo vệ gan tốt, liều cao thì tác dụng ấy

giảm. Trong khi đó, cao chiết nước dược liệu Bàn tay ma trắng hầu như không có tác dụng làm giảm các triệu chứng tổn thương gan gây ra bởi paracetamol.



*: *p so với lô sinh lý <0,05*

Hình 3.39. Ảnh hưởng của cao chiết nước các dược liệu Bàn tay ma lên sự thay đổi tỷ lệ % khối lượng gan chuột trên khối lượng chuột nghiên cứu

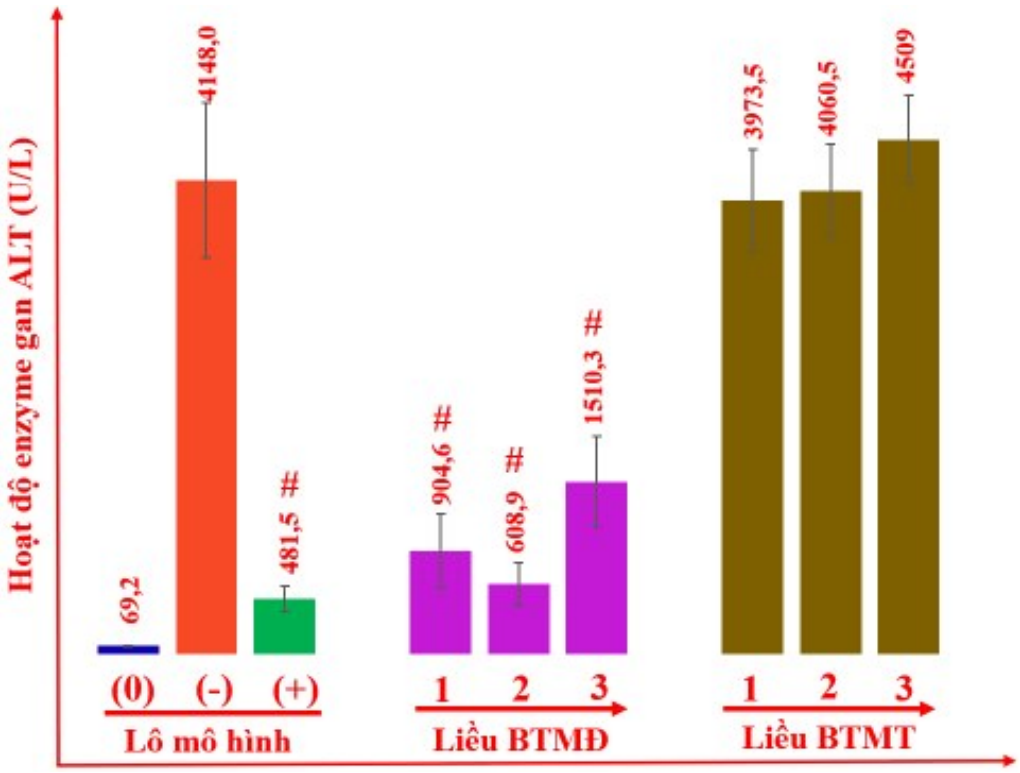
Tỷ lệ khối lượng gan chuột và khối lượng chuột ở lô chứng sinh lý có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô bệnh lý và các lô còn lại, tuy nhiên chưa có sự khác biệt về tỷ lệ này giữa lô bệnh lý và các lô sử dụng mẫu thử cũng như chứng dương (Hình 3.39). Mức độ tăng tỷ lệ khối lượng gan so với khối lượng cơ thể chuột này có thể được giải thích là do các mẫu sử dụng chưa có tác dụng hoặc vì dùng paracetamol để gây độc chuột bằng hai liều ở hai ngày liên tiếp nên kể các mẫu cao cho chuột uống có tác dụng thì trong thời gian ngắn cũng chưa đủ để phục hồi thể trạng gan về trạng thái ban đầu.

3.2.1.2. Tác dụng của mẫu nghiên cứu lên hoạt độ enzyme ALT và AST

Kết quả tác dụng của cao chiết lên hoạt độ enzym ALT được trình bày ở Hình 3.40.

Hoạt độ enzyme ALT ở lô bệnh lý (lô 2) cao hơn rất nhiều so với lô chứng sinh lý. Cả silymarin và các liều cao chiết dược liệu Bàn tay ma đỏ đều có xu hướng làm giảm men gan ALT, trong đó lô chuột uống cao chiết liều 1,15 g/kg làm giảm hoạt độ ALT nhiều nhất, gần tương đương với silymarin liều 70mg/kg. Ngược lại, dược liệu Bàn tay ma trắng hầu như không có tác dụng làm giảm hoạt độ hai enzyme này.

Các enzyme ALT và AST tập trung chủ yếu ở tế bào gan, khi tế bào gan bị tổn thương và vỡ ra thì các enzyme này được giải phóng vào trong máu. Hàm lượng các enzyme này trong máu càng cao thì mức độ tổn thương gan càng nghiêm trọng. Xác định hàm lượng (thông qua hoạt độ) các enzyme này sẽ đánh giá được mức độ tổn thương gan.

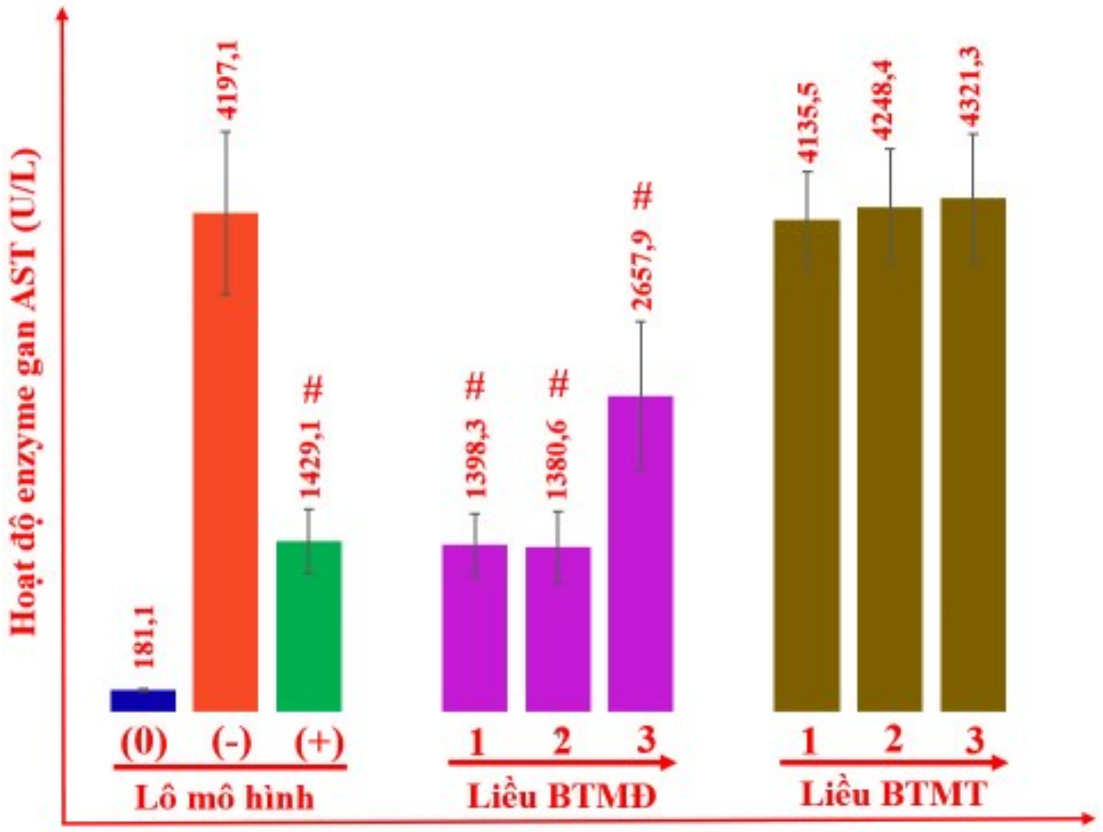


#: *p so với lô bệnh lý <0,05*

Hình 3.40. Ảnh hưởng của cao chiết nước các dược liệu Bàn tay ma lên hoạt độ enzyme gan ALT (U/L) ở các lô chuột nghiên cứu

Sự phù hợp của mô hình nghiên cứu được thể hiện ở việc tăng đồng thời hoạt độ cả ALT và AST ở lô bệnh lý so với lô chứng sinh lý, trong khi đó lô chứng dương đã làm giảm hoạt độ hai enzyme này so với lô bệnh lý (kết quả ở Hình 3.40 và Hình 3.41). Cao chiết nước của dược liệu Bàn tay ma trắng hầu như không có tác dụng làm giảm hoạt độ hai enzyme này ở cả ba liều thử nghiệm.

Ngược lại, cả ba liều cao thử nghiệm của cao chiết dược liệu Bàn tay ma đỏ đều làm giảm hoạt độ các enzyme ALT và AST. Trong đó, liều 0,56 g/kg và liều 1,15 g/kg cho tác dụng giảm hoạt độ hai enzyme tương đương với silymarin liều 70 mg/kg (khoảng hơn 80 % hoạt độ ALT và khoảng 70 % hoạt độ AST); liều 2,30 g/kg có tác dụng ít hơn hai liều còn lại (liều này làm giảm 65 % hoạt độ ALT và chỉ khoảng 38 % hoạt độ AST).



#: *p so với lô bệnh lý <0,05*

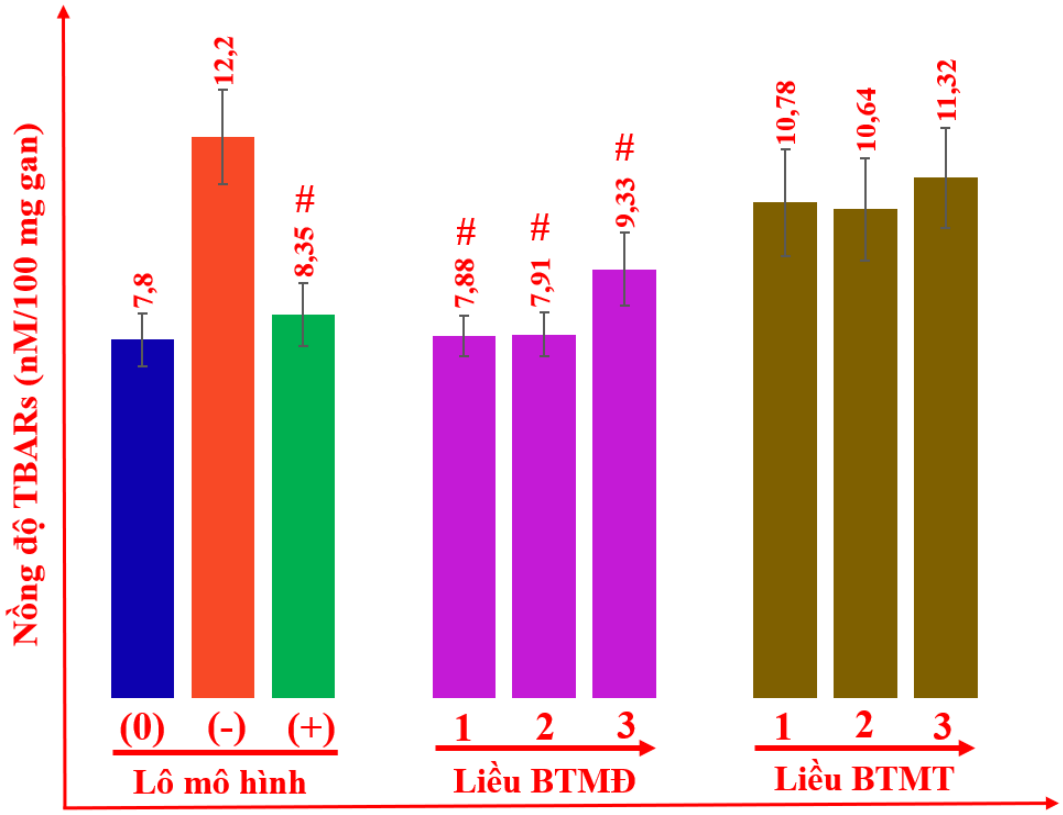
Hình 3.41. Ảnh hưởng của cao chiết nước các dược liệu Bàn tay ma lên hoạt độ enzyme gan AST (U/L) ở các lô chuột nghiên cứu

3.2.1.3. Tác dụng của mẫu nghiên cứu lên cơ chất của TBARs

Nồng độ TBARs được tính từ phương trình hồi qui tuyến tính được thiết lập từ độ hấp thụ của chất chuẩn 1,1,3,3-tetraethoxypropane với các nồng độ 0,2; 0,3; 0,4; 0,6 và 0,8 nmol/ml. Kết quả nồng độ TBARs tạo thành từ các mẫu gan trong mô hình nghiên cứu được trình bày tóm tắt ở Hình 3.42.

Mẫu gan thử ở chứng bệnh lý cho nồng độ TBARs là 12,21 nmol/100mg gan, cao hơn nồng độ này trong mẫu chứng sinh lý với độ tin cậy là 95 %. Nồng độ TBARs tạo thành từ phản ứng của các mẫu gan ở các lô chuột uống mẫu cao chiết Bàn tay ma đỏ và silymarin nhìn chung là giảm, đặc biệt ở hai lô 3 và lô 4, tương ứng với lô có chuột uống cao chiết dược liệu Bàn tay ma đỏ liều 0,56 g/kg và 1,15 g/kg thể trọng. Cao chiết Bàn tay ma trắng có làm giảm nồng độ TBARs so với chứng bệnh lý, nhưng sự giảm này còn ít hơn nhiều so với các mẫu cao chiết từ Bàn tay ma đỏ, khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê so với lô chứng bệnh lý.

Kết quả định lượng TBARs cũng đã chứng minh sự phù hợp của mô hình thí nghiệm đã thiết kế bởi nồng độ TBARs sau phản ứng ở lô bệnh lý cao hơn đáng kể so với lô sinh lý và lô chứng dương (Hình 3.42).



#: p so với lô bệnh lý <0,05

Hình 3.42. Ảnh hưởng của cao chiết nước các dược liệu Bàn tay ma lên cơ chất của TBARs trên các lô chuột nghiên cứu

Hoạt tính của các chất trong cao chiết đã làm giảm đáng kể quá trình peroxyd hóa lipid thể hiện thông qua kết quả định lượng TBARs ở lô chuột uống cao chiết. Mức độ peroxyd hóa lipid giảm tới gần như 100 % ở các lô chuột uống cao chiết nước dược liệu Bàn tay ma đỏ ở liều 1 và liều 2; ở liều cao nhất của dược liệu này tuy khả năng ức chế quá trình peroxyd hóa lipid có thấp hơn hai liều đầu nhưng cũng giảm tới 65 %. Khả năng ức chế quá trình peroxyd hóa lipid ở gan của cao chiết nước dược liệu Bàn tay ma trắng thấp hơn nhiều so với cao chiết nước dược liệu Bàn tay ma đỏ. Khả năng ức chế tối đa cũng chỉ đạt được khoảng 35 % nhưng khả năng ức chế này ở cả ba liều thử nghiệm đều không rõ ràng khi so sánh thống kê chỉ số TBARs giữa ba lô chuột uống cao chiết với lô chuột ở chứng bệnh lý.

3.2.1.4. Đánh giá chung về tác dụng bảo vệ gan trên mô hình in vivo

Sự khác nhau của kết quả giải phẫu gan đại thể, hoạt động enzyme gan và nồng độ cơ chất của TBARs của chuột ở lô chứng sinh lý, chứng bệnh lý và chứng dương chứng tỏ nghiên cứu này đã thiết kế được mô hình phù hợp để đánh giá tác dụng bảo vệ gan của cao chiết nước dược liệu Bàn tay ma đỏ và dược liệu Bàn tay ma trắng. Trong đó, chuột ở chứng bệnh lý đã được gây độc bằng paracetamol (PAR) với hai liều thích hợp, silymarin trong mẫu viên nang Legalon đã giúp làm giảm độc tính của PAR tác động lên gan chuột. Cao chiết nước dược liệu Bàn tay ma đỏ có tác dụng bảo vệ gan nhưng khả năng bảo vệ gan phụ thuộc liều sử dụng; còn cao chiết nước dược liệu Bàn tay ma trắng hầu như không thể hiện tác dụng bảo vệ gan.

Mặc dù các thông số bên trên đã thể hiện tác dụng bảo vệ gan ở một số lô chuột uống cao chiết hoặc chứng dương, tuy nhiên tỷ lệ khối lượng gan trên thể trọng chuột chưa cho thấy tác dụng này. Trong mô hình, chứng sinh lý có tỷ lệ khối lượng gan trên thể trọng thấp hơn có ý nghĩa thống kê so với các lô chuột uống PAR, nhưng không có sự khác biệt thống kê giữa lô chứng bệnh lý và các lô uống PAR còn lại. Điều này có thể giải thích là vì độc tính với gan khi gây độc bằng hai liều PAR khá cao. Độc tính ấy giúp đánh giá rõ được tác dụng của cao chiết thông qua các thông số đã xác định bên trên (quan sát đại thể, hoạt độ ALT, AST và TBARs), nhưng cũng có nhược điểm là sẽ làm quá trình phục hồi các tổn thương gan lâu hơn. Ở thời điểm đánh giá kết quả, các lô chuột uống mẫu thử và chứng dương đã được phục hồi nhưng chưa hoàn toàn nên tỷ lệ khối lượng gan trên tỷ trọng chuột vẫn còn cao hơn so với lô chứng sinh lý và tương đương với lô chứng bệnh lý. Các kết quả định lượng hoạt độ enzyme ALT, AST và kết quả định lượng TBARs phù hợp với kết quả giải phẫu gan đại thể.

Về liều sử dụng của dược liệu Bàn tay ma đỏ, các lô chuột uống liều 0,56 g/kg và liều 1,15 g/kg thể hiện tác dụng bảo vệ gan tốt, đồng thời số lượng chuột chết giảm đi so với lô chứng bệnh lý, nhất lô uống liều 1,15g/kg không làm chuột thí nghiệm chết; lô chuột uống cao chiết liều 2,30g/kg vừa thể tác dụng bảo vệ gan ít hơn so với hai lô còn lại, số lượng chuột thí nghiệm chết nhiều (chết 7/14 chuột thí nghiệm, chết nhiều hơn 3 chuột so với lô chứng bệnh lý). Như vậy, liều 1,15 g/kg tính theo khối lượng cao trên thể trọng chuột (tương ứng với liều 120 g dược liệu trong ngày sử dụng cho người) cho tác dụng bảo vệ gan tốt nhất, tiếp đến là liều 0,56 g/kg (tương ứng với liều 60 g dược liệu trong ngày sử dụng cho người). Liều 2,30 g/kg (tương ứng với liều 240 g dược

liệu trong ngày sử dụng cho người) có thể hiện tác dụng bảo vệ gan, tuy nhiên số lượng chuột chết khi nghiên cứu lại khá nhiều, ở liều cao có thể gây ra độc tính.

Có thể kết luận rằng ở các liều thử nghiệm của hai loại dược liệu, cao chiết nước dược liệu Bàn tay ma đỏ có tác dụng bảo vệ gan, còn cao chiết nước của dược liệu Bàn tay ma trắng chưa thể hiện tác dụng này. Liều có tác dụng bảo vệ gan ở dược liệu Bàn tay ma đỏ là 0,56 g cao chiết/kg chuột và 1,15 g cao chiết/kg chuột, trong đó liều thứ hai có tác dụng tốt hơn.

3.2.2. Tác dụng bảo vệ tế bào gan của các hợp chất phân lập từ loài Bàn tay ma trắng (H. terminalis) và loài Bàn tay ma đỏ (H. lobata)

Bên cạnh việc thử tác dụng của cao chiết nước toàn phần hai loài dược liệu, 10 chất từ dược liệu Bàn tay ma trắng và 14 chất từ dược liệu Bàn tay ma đỏ sẽ được sàng lọc tác dụng bảo vệ gan trên mô hình *in vitro* nhằm xác định các chất đánh dấu có tác dụng bảo vệ gan của hai loài dược liệu này. Các chất nghiên cứu được chia làm hai lô thử song song, các lô mẫu đánh giá tác dụng bảo vệ HepG2 dưới tác động của CCl_4 (ký hiệu là **+ CCl_4**) và các lô mẫu đánh giá độc tính của chất nghiên cứu lên dòng tế bào HepG2 khi không có mặt CCl_4 (ký hiệu là **-CCl_4**). Thí nghiệm được tiến hành theo thiết kế ở Mục 2.2.5. Kết quả bảo vệ tế bào gan của các hợp chất được thể hiện ở Bảng 3.27 và Bảng 3.28.

Nhìn chung, các chất phân lập được từ dược liệu Bàn tay ma trắng tuy ít độc với tế bào gan HepG2, nhưng hầu như không có tác dụng bảo vệ dòng tế bào này dưới tác động gây độc của CCl_4; trong khi đó, một số chất phân lập phân cực phân lập từ dược liệu Bàn tay ma đỏ có tác dụng bảo vệ tế bào gan, mặc dù một số chất ít phân cực của được phân lập từ dược liệu này lại gây độc dòng tế bào thử nghiệm.

Như vậy, sau quá trình sàng lọc tác dụng bảo vệ gan trên mô hình *in vivo* và *in vitro* có thể khẳng định rằng dược liệu Bàn tay ma trắng chưa thể hiện tác dụng bảo vệ gan, còn dược liệu Bàn tay ma đỏ thể hiện tác dụng bảo vệ tương đối tốt. Dược liệu bàn tay ma trắng và các chất phân lập từ dược liệu này sẽ không tiếp tục nghiên cứu nữa. Trong các hợp chất phân lập được từ hai dược liệu này, chỉ có hợp chất HL11 là thể hiện tác dụng bảo vệ gan tốt nhất. Hợp chất HL11 là hợp chất tiềm năng nhất dự kiến làm chất đánh dấu cho loài dược liệu có tác dụng bảo vệ gan – loài Bàn tay ma đỏ. Một số cơ chế liên quan đến tác dụng bảo vệ gan của hợp chất này sẽ được nghiên cứu tiếp.

Bảng 3.3. Khả năng bảo vệ tế bào HepG2 của mẫu phân lập từ dược liệu Bàn tay ma trắng *(H. terminalis)*

Tên mẫu thử	**% HepG2 sống (-CCl_4)**		**% bảo vệ HepG2 (+ CCl_4)**			***EC_{50} (µg/ml)***
	20 µg/ml	***100 µg/ml***	***4 µg/ml***	***20 µg/ml***	***100 µg/ml***	
HT1	101,22 ± 6,11	99,56 ± 5,02	3,02 ± 1,43	7,12 ± 1,26	20,95 ± 3,25	-
HT2	106,46 ± 5,02	101,40 ± 4,46	0,08 ± 1,33	1,80 ± 2,10	10,40 ± 1,82	>100
HT3	97,47 ± 4,25	109,39 ± 4,28	-0,40 ± 1,71	-0,10 ± 2,38	4,55 ± 2,64	-
HT4	84,70 ± 4,26	80,39 ± 3,47	-0,17 ± 2,21	0,39 ± 3,05	-0,23 ± 1,63	-
HT5	89,01 ± 2,64	80,54 ± 3,28	-0,06 ± 2,86	3,56 ± 1,63	14,79 ± 2,52	-
HT6	86,91 ± 4,11	82,00 ± 5,03	2,06 ± 1,48	11,30 ± 2,44	20,76 ± 1,35	>100
HT7	88,43 ± 3,28	77,01 ± 2,66	2,56 ± 1,29	0,81 ± 3,25	7,30 ± 2,81	-
HT8	91,45 ± 3,26	86,65 ± 3,53	0,94 ± 3,64	5,06 ± 2,75	6,88 ± 2,04	-
HT9	94,31 ± 5,23	86,43 ± 4,03	2,29 ± 1,88	3,37 ± 2,32	9,42 ± 2,62	>100
HT10	85,43 ± 5,63	82,07 ± 2,15	0,20 ± 2,95	5,59 ± 1,40	10,16 ± 2,74	-
Quercetin	101,22 ± 6,11	99,56 ± 5,02	7,56 ± 2,38	24,00 ± 3,04	59,59 ± 2,42	73,10 ± 3,39

Bảng 3.4. Khả năng bảo vệ tế bào HepG2 của mẫu phân lập từ dược liệu Bàn tay ma đỏ *(H. lobata)*

Tên mẫu thử	**% HepG2 sống (-CCl_4)**		**% bảo vệ HepG2 (+CCl_4)**			***EC_{50}* (µg/ml)**
	20 µg/ml	***100 µg/ml***	***4 µg/ml***	***20 µg/ml***	***100 µg/ml***	
HL1	75,33 ± 3,38	29,72 ± 3,58	2,19 ± 1,23	6,46 ± 2,18	7,00 ± 1,57	-
HL2	90,13 ± 1,82	22,62 ± 2,47	0,20 ± 2,06	3,87 ± 1,64	7,83 ± 2,24	-
HL3	62,94 ± 2,17	20,10 ± 2,12	1,59 ± 1,18	1,49 ± 2,08	6,74 ± 3,44	-
HL4	88,40 ± 3,05	12,59 ± 3,05	-0,07 ± 1,08	1,01 ± 1,11	1,80 ± 2,26	-
HL5	52,32 ± 1,88	13,32 ± 3,04	-0,50 ± 2,02	-0,59 ± 1,35	0,59 ± 2,07	-
HL6	100,24 ± 2,31	82,07 ± 3,67	1,00 ± 2,04	13,52 ± 1,44	35,56 ± 1,07	> 100
HL7	99,83 ± 3,49	94,22 ± 2,74	1,21 ± 1,14	1,21 ± 2,16	-0,37 ± 3,03	-
HL8	96,27 ± 2,15	97,23 ± 3,36	0,79 ± 1,31	-0,20 ± 2,06	-0,10 ± 3,42	-
HL9	104,93 ± 2,58	102,05 ± 2,01	1,28 ± 1,13	2,36 ± 1,23	4,20 ± 2,14	-
HL10	91,82 ± 3,07	101,56 ± 2,37	0,79 ± 0,02	6,57 ± 0,59	16,16 ± 1,33	>100
HL11	102,52 ± 3,21	81,72 ± 3,16	1,40 ± 1,21	10,22 ± 1,06	52,25 ± 4,36	**95,68 ± 2,68**
HL12	93,98 ± 2,85	97,45 ± 2,69	-1,38 ± 2,23	-0,73 ± 2,07	-2,35 ± 3,22	-
HL13	94,58 ± 2,42	75,33 ± 3,74	1,72 ± 1,37	1,91 ± 2,28	10,93 ± 1,68	-
HL14	97,83 ± 1,65	64,14 ± 4,12	0,40 ± 1,26	1,62 ± 1,12	2,19 ± 1,25	-
Quercetin	100,93 ± 2,17	101,52 ± 2,33	3,79 ± 1,38	21,09 ± 1,14	66,68 ± 3,94	67,19 ± 5,76

3.2.3. Một số tác dụng liên quan đến khả năng bảo vệ gan của hợp chất 3,5-Dimethoxy-4-hydroxy-1-β-D-glucopyranoside

3.2.3.1. Tác dụng chống oxy hóa của hợp chất 3,5-Dimethoxy-4-hydroxy-1-β-D-glucopyranoside trên mô hình in vitro

Khả năng bảo vệ gan của các hợp chất hữu cơ thường liên quan đến tác dụng chống oxy hóa. Trong kết quả bảo vệ gan của cao chiết nước dược liệu Bàn tay ma đỏ, khả năng chống oxy hóa thông qua quá trình ức chế quá trình peroxyd hóa lipid đã của dược liệu này là rất tốt. Chất đánh dấu của dược liệu này có thể cũng sẽ thể hiện tác dụng đặc trưng này.

Kết quả thử tác dụng chống oxy hóa của hợp chất HL11 (3,5-Dimethoxy-4-hydroxy-1-*β*-D-glucopyranoside) trên mô hình *in vitro* trình bày chi tiết ở Phục lục 4.1. Theo đó, các chứng dương acid ascorbic trong mô hình quét gốc tự do DPPH và Trolox trong mô hình định lượng TBARs hoạt động ổn định. Hợp chất **HL11** có tác dụng quét gốc tự do DPPH tương đương acid ascorbic, đồng thời cũng đã thể hiện tác dụng chống lại quá trình peroxyd hóa lipid, IC_{50} cho hai mô hình tương ứng là 6,07 ± 0,17 µg/ml và 89,55 ± 8,26 µg/ml. Các tác dụng này phù hợp với khả năng chống oxy hóa của cao chiết nước dược liệu Bàn tay ma đỏ đã nghiên cứu.

3.2.3.2. Tác dụng chống viêm của hợp chất 3,5-Dimethoxy-4-hydroxy-1-β-D-glucopyranoside trên mô hình in vitro

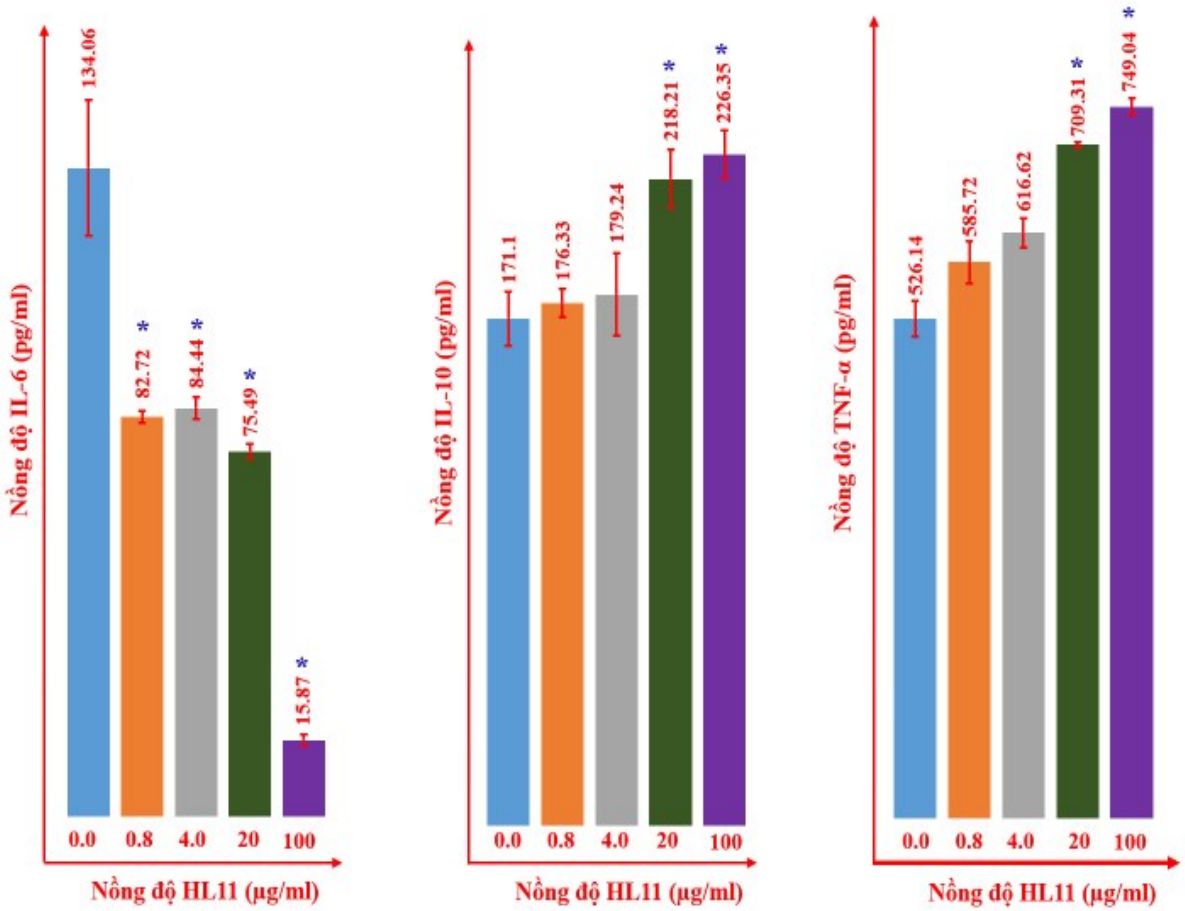
** Tác dụng ức chế yếu tố NO của hợp chất 3,5-Dimethoxy-4-hydroxy-1-β-D-glucopyranoside trên mô hình in vitro*

Kết quả nghiên cứu cho thấy chất đối chứng dương L-NMMA hoạt động ổn định trong thí nghiệm nên thí nghiệm được thiết kế là khả thi để xác định khả năng ức chế NO, mẫu **HL11** có khả năng ức chế tế bào đại thực bào sinh NO với IC_{50} là 76,49 ± 2,46 µg/ml. Mẫu **HL11** không gây độc cho tế bào đại thực bào RAW 264.7. Kết quả chi tiết trình bày tại Phụ lục 4.2.

Như vậy khả năng chống viêm của hợp chất HL11 có liên quan đến khả năng ức chế tế bào đại thực bào sinh NO với IC_{50} là khoảng 76 µg/ml.

** Tác dụng ức chế cytokine tiền viêm của hợp chất 3,5-Dimethoxy-4-hydroxy-1-β-D-glucopyranoside trên mô hình in vitro*

Kết quả thí nghiệm cho thấy ở nồng độ 100 µg/ml và 100 µg/ml, mẫu không gây ảnh hưởng đến sự phát triển của tế bào RAW 264.7 nên dải nồng độ 100-20-4-0,8 µg/ml được sử dụng để xác định tác động của mẫu thí nghiệm đến sự sản sinh các cytokine. Khả năng ức chế các cytokine tiền viêm của hợp chất HL11 được đánh giá tại thời điểm là sau 24 giờ và sau 48 giờ ủ mẫu.

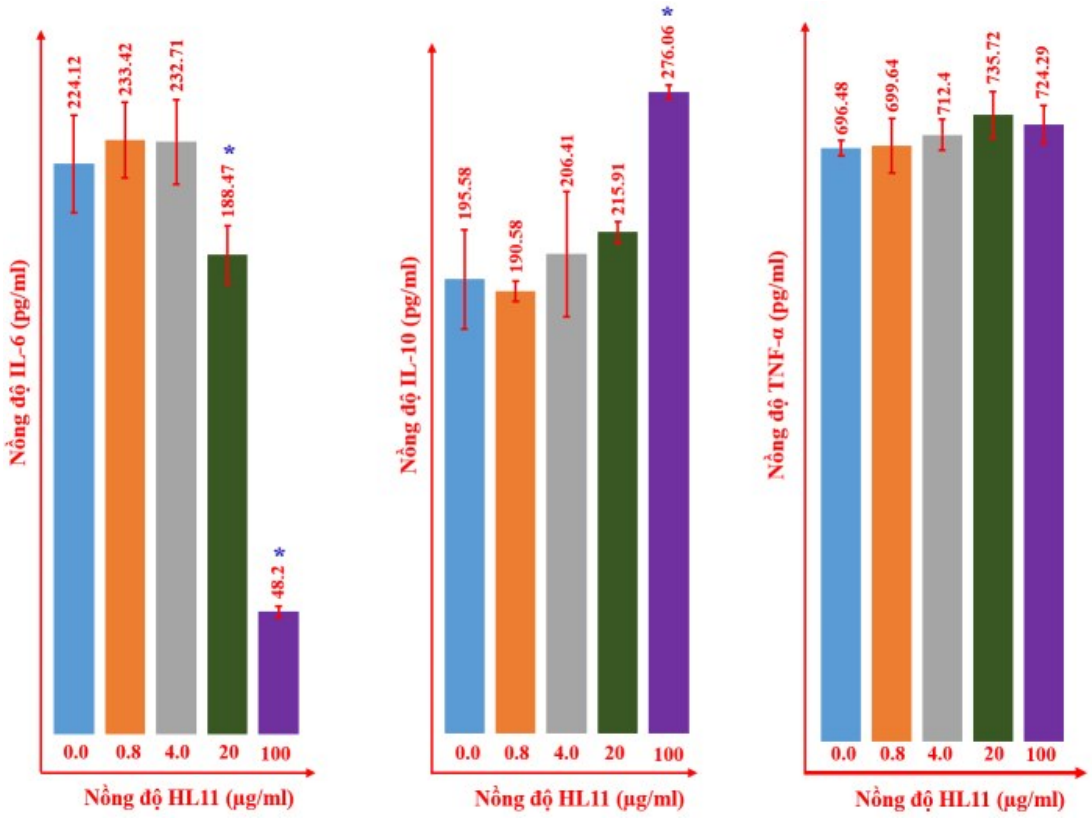


**: p≤ 0,5 so với đối chứng*

Hình 3.43. Tác động của hợp chất HL11 lên nồng độ các cytokine tại thời điểm 24h

Tác dụng ức chế cytokine tiền viêm của mẫu nghiên cứu được thể hiện ở Hình 3.43 và Hình 3.44. Qua kết quả nghiên cứu có thể nhận thấy mẫu HL11 có khả năng làm ức chế sự sản sinh IL-6, làm tăng sự sản sinh IL-10 và TNF-α. Các tác động của mẫu lên nồng độ cytokine giảm dần theo nồng độ và theo thời gian.

Tại thời điểm 24h, nồng độ mẫu 20 µg/ml trở lên, tác động ức chế sản sinh IL-6, kích thích tăng sinh IL-10 và TNF-α một cách rõ rệt. Các xu hướng này cũng thể hiện ở các mức nồng độ mẫu thấp hơn tại 0,8 µg/ml và 4 µg/ml, tuy nhiên sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với đối chứng chỉ nhận thấy được ở khả năng ức chế tăng sinh IL-6.



**: p≤ 0,5 so với đối chứng*

Hình 3.44. Tác động của hợp chất HL11 lên nồng độ các cytokine tại thời điểm 48h

Sau 48h, tác các tác động của mẫu lên các cytokine vẫn có xu hướng tưng tự như tại thời điểm 24h, tuy nhiên các tác động này không còn rõ rệt nữa. Sự ức chế tăng IL-6 và kích thích tăng IL-10 chỉ có ý nghĩa ở nồng độ mẫu thử ở 100 µg/ml. Trong khi đó, các tác động này hầu như không còn phân biệt được so với đối chứng ở nồng độ mẫu nhỏ hơn.

Tác động ức chế IL-6 và tăng sinh IL-10 của mẫu nghiên cứu sẽ làm ức chế quá trình viêm theo con đường IL-6 và IL-10. Mặc dù vậy, mẫu lại có tác động làm tăng sinh TNF-α, điều này có thể đã dẫn đến kích thích quá trình viêm theo con đường TNF-α và làm kích hoạt quá trình chết tế bào theo chương trình. Kết quả của quá trình ấy có thể được nhận thấy tại thời điểm 24h, nồng độ mẫu 20 µg/ml và 100 µg/ml làm tăng sinh TNF-α có ý nghĩa so với mẫu đối chứng, khi đó nồng độ tế bào nghiên cứu cũng giảm đi một chút so với đối chứng. Ngược lại, ở các mẫu mà sự tăng nồng độ TNF-α không nhiều, lượng tế bào trong mẫu nghiên cứu hầu như không thay đổi so với đối chứng. Tác động này của hợp chất HL11 có thể liên quan đến nguyên nhân độc tính gan khi sử dụng cao chiết ở nồng độ cao, dẫn đến lượng chuột chết khá nhiều trong thí nghiệm bảo vệ gan ở mô hình *in vivo*.

Như vậy, mẫu nghiên cứu có khả năng chống viêm, thông qua con đường ức chế sự tăng sinh IL-6 và kích thích sự tăng sinh IL-10; tuy vậy lại làm tăng hàm lượng TNF-*α* nên có thể gây ra một số độc tính khi sử dụng ở hàm lượng cao. Kết quả này phù hợp với kết quả đánh giá khả năng bảo vệ gan của mẫu HL11 trên mô hình *in vitro* trên các tế bào gan. Nồng độ 20 µg/ml và 100 µg/ml có tác dụng bảo vệ tế bào gan, nhưng nồng độ 100 µg/ml lại làm giảm lượng tế bào gan sống còn lại (Mục 3.4).

3.2.4. Độc tính của dược liệu Bàn tay ma đỏ

Như các kết quả đã nghiên cứu bên trên, dược liệu Bàn tay ma đỏ có tác dụng bảo vệ gan, nhưng dải chất chính của dược liệu này khá rộng. Các chất có độ phân cực thấp lại có xu hướng gây độc tế bào gan HepG2 và không có tác dụng bảo vệ dòng tế bào này. Cao chiết nước của dược liệu này lại thể hiện tác dụng bảo vệ gan tốt ở các liều nghiên cứu. Đồng thời, hợp chất có tác dụng bảo vệ gan tốt nhất được dự kiến chọn làm chất đánh dấu cho dược liệu này lại nằm ở pha nước khi phân lập. Do đó, độc tính của dược liệu này tập trung vào pha nước và các chất trong pha nước.

3.2.4.1. Độc tính cấp của cao chiết nước dược liệu Bàn tay ma đỏ

Cho lô chuột uống hỗn hợp mẫu đến liều 23,04 g cao/kg thể trọng chuột (gấp 10 lần liều cao nhất thử tác dụng bảo vệ gan – liều 3) mà vẫn chưa thấy chuột chết.

Cân một lượng chính xác cao chiết, thêm từ từ một lượng chính xác nước cất đến khi tạo hỗn hợp sánh đặc nhất mà vẫn có thể cho qua kim đầu tù cho chuột uống được liều cao nhất có thể cho chuột uống là 32,60 g cao/kg thể trọng chuột (cao gấp 14 lần liều cao nhất thử tác dụng bảo vệ gan). Đây là liều đặc nhất có thể cho chuột uống với thể tích tối đa (0,4 ml/10g chuột) nên không tiếp tục cho chuột uống liều cao hơn.

Sau khi uống, tất cả các chuột không có biểu hiện gì bất thường, vận động, bài tiết bình thường. Sau 3 ngày theo dõi, không có chuột nào chết, tất cả các chuột đều khỏe mạnh, ăn uống, vận động, bài tiết bình thường.

Như vậy ở liều cao nhất có thể cho chuột uống, cao chiết chưa thể hiện độc tính cấp. Có thể thấy rằng liều LD_0 (nếu có) chắc chắn sẽ lớn hơn hoặc bằng 32,60 g/kg tính theo khối lượng cao chiết trên thể trọng chuột thử nghiệm. Khả năng làm chết chuột ở liều 2,30 g/kg có thể là do tác động bất lợi nào đó khi sử dụng đồng thời cao chiết ở liều cao và paracetamol.

3.2.4.2. Độc tính trên tế bào thường của các hợp chất được phân lập từ pha nước của dược liệu Bàn tay ma đỏ

Qua các kết quả nghiên cứu các phần trên, có thể thấy hợp chất HL11 là hợp chất chính liên quan đến tác dụng bảo vệ gan của cao chiết nước dược liệu Bàn tay ma đỏ. Hiện nay hợp chất HL11 chưa được sử dụng độc lập để điều trị bệnh gan, do đó trong nghiên cứu đánh giá độc tính tế bào thương của hợp chất HL11, các hợp chất được phân lập cùng với HL11 cũng sẽ được đánh giá độc tính kèm với hợp chất này. Kết quả đánh giá độc tính của các chất phân lập từ pha nước của dược liệu Bàn tay ma đỏ được thể hiện ở Bảng 3.5.

Các mẫu HL11, HL13 và HL14 cho thấy khả năng gây độc dòng tế bào lành HEK-293A với giá trị IC_{50} trong khoảng nồng độ 16,58 – 68,29 µg/mL; các mẫu còn lại chưa thể hiện hoạt tính gây độc ở nồng độ nghiên cứu.

Bảng 3.5. Khả năng gây độc tế bào của các mẫu trên dòng tế bào HEK-293A

Tên mẫu thử	**% ức chế ở các nồng độ**				**IC_{50} ((µg/ml)**
	0,8 (µg/ml)	**4 (µg/ml)**	**20 (µg/ml)**	**100 (µg/ml)**	
HL9	-6,13	-4,68	-2,98	0,78	*>100*
HL10	-0,07	1,41	2,91	5,25	*>100*
HL11	4,50	6,66	67,9	91,70	**16,58 ± 1,986**
HL12	-1,83	3,40	4,75	6,00	*>100*
HL13	-0,43	1,32	7,50	95,05	66,50 ± 6,72
HL14	-1,59	2,55	5,05	100,70	68,29 ± 6,89

Theo tiêu chuẩn của Viện ung thư quốc gia Hoa Kỳ (NCI), cặn chiết được coi có hoạt tính tốt với $IC_{50} \leq 20$ µg/ml, còn chất tinh khiết được coi có hoạt tính gây độc mạnh khi $IC_{50} \leq 5$ µM [97]. Trong các mẫu nghiên cứu, mẫu HL11 có khả năng gây độc tế bào mạnh nhất với IC_{50} là 16,58 ± 1,986 µg/mL, tương ứng với 49,94 ± 5,98 µM. Nồng độ giá trị này vẫn lớn hơn nhiều so với giá trị tham chiếu, do đó hợp chất HL11, HL13 và HL14 có độc tính với tế bào thường nhưng ở mức độ chưa cao.

Như vậy, ở nồng độ cao thì một số hợp chất phân lập từ pha nước của dược liệu Bàn tay ma đỏ vẫn thể hiện độc tính với tế bào thường. Khi sử dụng để điều trị bệnh gan, cần cân nhắc thiết kế liều phù hợp với hiệu quả điều trị bệnh.

3.3. Xây dựng quy trình đính tính và định lượng hợp chất 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1-*β*-D-glucopyranoside trong dược liệu Bàn tay ma đỏ

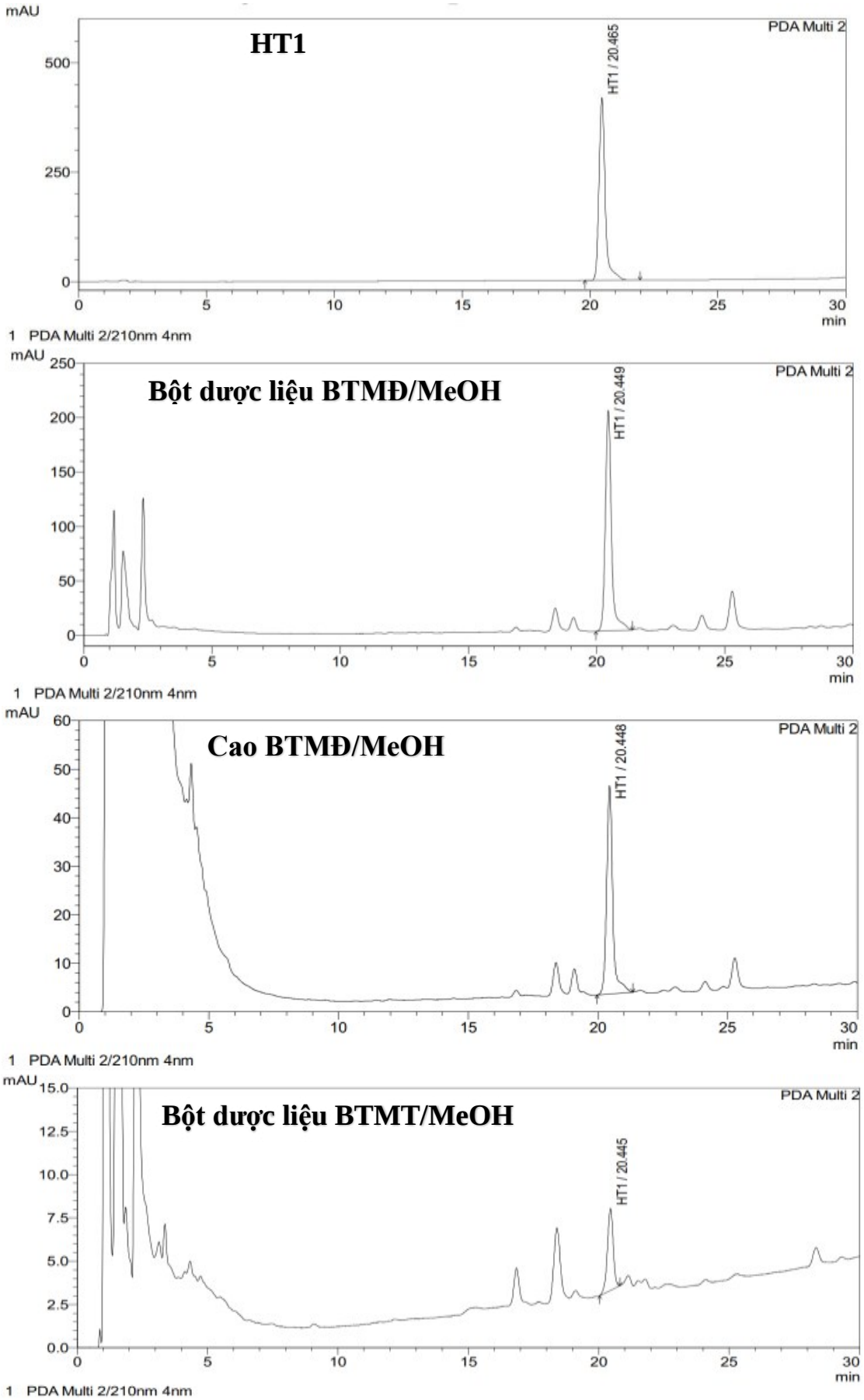
3.3.1. Xác định chất đánh dấu có tác dụng bảo vệ gan từ dược liệu Bàn tay ma đỏ

Hợp chất *(Z)*-5,5'-(hexadec-8-ene-1,16-diyl)bis(benzene-1,3-diol) là hợp chất chung của hai loài dược liệu, có tác dụng chống oxy hóa nhẹ [144]. Kết quả nghiên cứu trong luận án cũng cho thấy hợp chất này có khả năng bảo vệ tế bào gan nhưng phải ở nồng độ khá cao (IC50 > 100 µg/ml). Hợp chất này cũng được phân lập với lượng lớn từ dược liệu Bàn tay ma đỏ, do đó cũng có thể là tiềm năng cho chất đánh dấu của dược liệu này.

Tuy nhiên, qua khảo sát bằng phương pháp HPLC, kết quả cho thấy hợp chất này có nhiều ở dược liệu Bàn tay ma đỏ nhưng trong cao chiết nước của dược liệu Bàn tay ma đỏ và trong dược liệu Bàn tay ma trắng thì hàm lượng chất này rất thấp (Hình 3.45). Như vậy, chất này không đặc trưng cho cao chiết nước của dược liệu Bàn tay ma đỏ (phần có tác dụng bảo vệ gan), cũng không đặc trưng cho dược liệu Bàn tay ma trắng. Do đó, hợp chất **HT1 (HL6)** không phải là ưu tiên lựa chọn làm chất đánh dấu định hướng tác dụng bảo vệ gan của hai loài Bàn tay ma.

Trong hai loài dược liệu đã nghiên cứu, dược liệu Bàn tay ma trắng chưa thể hiện tác dụng bảo vệ gan trên mô hình in vivo, các hợp chất phân lập từ dược liệu này cũng không thể hiện hoạt tính bảo vệ tế bào gan. Cao chiết nước của dược liệu Bàn tay ma đỏ thể hiện hoạt tính bảo vệ gan tương đối tốt, một số hợp chất phân lập từ dược liệu này cũng đã được chứng minh có tác dụng bảo vệ tế bào gan. Do đó, lựa chọn chất đánh dấu định hướng tác dụng bảo vệ gan của hai loài sẽ chỉ tập trung nghiên cứu trên loài này.

Hiện nay các nghiên cứu về thành phần hóa học của dược liệu Bàn tay ma đỏ để định hướng tác dụng bảo vệ gan còn rất ít. Các nghiên cứu của luận án đã đưa ra các bằng chứng khoa học chứng minh về công dụng của dược liệu này, như vậy dược liệu này có thể sử dụng để điều trị bệnh gan. Khi được sử dụng trong điều trị, bên cạnh các phương pháp định tính, nhận dạng dược liệu truyền thống, cần có thêm các phương pháp hiện đại giúp kiểm soát chất lượng của dược liệu này ở mức độ cao hơn, trong đó, việc xác định và đánh giá hàm lượng các chất đánh dấu của dược liệu này là một trong những nhiệm vụ quan trọng nhất.



Hình 3.45. So sánh tín hiệu hợp chất *(Z)*-5,5'-(hexadec-8-ene-1,16-diyl)bis(benzene-1,3-diol) trong hai loài dược liệu

Hợp chất HL11 (3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1-β-D-glucopyranoside) là hợp chất được phân lập ra với lượng nhiều nhất từ pha nước của dược liệu Bàn tay ma đỏ. Cao chiết nước của dược liệu Bàn tay ma đỏ cũng chứa lượng khá lớn hợp chất này so với trong dược liệu (xem Mục 3.3.). Hợp chất HL11 có tác dụng bảo vệ tế bào gan ở nồng độ thích hợp, nằm trong khoảng nghiên cứu, cơ chế bảo vệ gan liên quan đến khả năng chống viêm, chống oxy hóa. Ở nồng độ cao, hợp chất HL11 có gây độc tế bào gan và tế bào thường. Trong khi đó các hợp chất HL9, HL10, HL12, HL13 và HL14 từ pha nước của dược liệu Bàn tay ma đỏ mặc dù có tác dụng bảo vệ gan rất kém nhưng đều rất ít độc tính ở nồng độ cao nhất đã thử nghiệm trên dòng tế bào HepG2.

Liên hệ với tác dụng của cao chiết nước dược liệu Bàn tay ma đỏ, mặc dù ở liều cao nhất thử nghiệm độc lập, cao chiết nước dược liệu Bàn tay ma đỏ chưa gây độc cho chuột, nhưng khi sử dụng cùng với yếu tố bất lợi là paracetamol, liều cao của cao chiết nước làm cho chuột chết với số lượng lớn. Các tác động này cũng là những xu thế tác dụng đặc trưng của hợp chất HL11, việc điều chỉnh liều sử dụng trên thực tế có thể tối ưu được hiệu quả của dược liệu Bàn tay ma đỏ cũng như hợp chất HL11 để vừa đạt mục tiêu điều trị và vừa giảm độc tính.

Như vậy có thể khẳng định rằng hợp chất HL11 chính là hợp chất đặc trưng cho tác dụng bảo vệ gan của dược liệu Bàn tay ma đỏ. Ngoài ra, hợp chất HL11 có vòng thơm và hấp thụ quang phổ UV ở cực đại khoảng 278 nm (xem Mục 3.4.2 – Hình 3.47), đây cũng là hợp chất khá phân cực có thể phân tích bởi phương pháp HPLC nên khả thi để định lượng trong dược liệu.

Từ các kết quả trên, hợp chất HL11 (3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1-β-D-glucopyranoside) được lựa chọn là chất đánh dấu định hướng tác dụng bảo vệ gan của dược liệu Bàn tay ma đỏ *(Heliciopsis lobata)*.

3.3.2. Xây dựng qui trình định tính 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1-β-D-glucopyranoside trong dược liệu Bàn tay ma

Hợp chất 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1-β-D-glucopyranoside nằm trong pha nước của dược liệu Bàn tay ma đỏ, trong nền mẫu dược liệu phức tạp, rất khó để định tính trực tiếp dược liệu này bằng các phản ứng hóa học. Hợp chất này rất phân cực, và có một số hợp chất có cấu trúc tương tự hợp chất này là HL9, HL10. Các hợp chất này vừa rất phân cực, vừa có cấu trúc tương tự như vậy rất khó tách nhau bởi hệ sắc ký lớp mỏng.

Do đó, phương pháp định tính dự kiến sẽ xây dựng chính là so sánh thời gian lưu pic chất phân tích của mẫu chuẩn và mẫu thử trong phép định lượng. Khi định lượng sẽ giúp định tính được luôn hợp chất này.

Như vậy, phương pháp định tính hợp chất 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1-*β*-D-glucopyranoside trong dược liệu Bàn tay ma đỏ là phương pháp HPLC, đánh giá sự xuất hiện của hợp chất thông qua thời gian lưu tương đối của pic mẫu thử và mẫu chuẩn. Thẩm định phương pháp định tính hợp chất 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1-*β*-D-glucopyranoside trong dược liệu được trình bày ở phần thẩm định độ đặc hiệu của phương pháp định lượng.

3.3.3. Xây dựng qui trình định lượng 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1-β-D-glucopyranoside trong dược liệu Bàn tay ma

Vì chất phân tích 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1-*β*-D-glucopyranoside khá phân cực nhưng lại khó tan trong các dung môi phân cực thông thường, ngoài ra định lượng các hợp chất trong dược liệu khá phức tạp vì nền mẫu dược liệu thường chứa nhiều thành phần và trong đó có những thành phần có cấu trúc rất tương tự nhau. Do đó, phương pháp ưu tiên sử dụng là phương pháp HPLC pha đảo. Quá trình xây dựng phương pháp định tính và định lượng chất nghiên cứu được thực hiện qua các bước: i) Xác định dung môi hòa tan chất nghiên cứu và chiết chất nghiên cứu từ dược liệu; ii) Khảo sát xác định điều kiện sắc ký tối ưu để phân tích các chất nghiên cứu; iii) Khảo sát điều kiện chuẩn bị mẫu dược liệu cho quy trình phân tích. Sau đây là các kết quả khảo sát để xây dựng phương pháp định tính và định lượng 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1-*β*-D-glucopyranosid trong dược liệu Bàn tay ma đỏ:

3.3.3.1. Khảo sát điều kiện hòa tan của mẫu 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1-β-D-glucopyranoside

Cân chính xác khoảng 5 mg mẫu HL11 sau khi sấy cho vào các ống nghiệm riêng biệt thích hợp, thêm 1,0 ml các dung môi nghiên cứu, siêu âm 30 phút. Sau 30 phút siêu âm, ống dung môi nào chưa tan lại tiếp tục bổ sung cùng dung môi để được các thể tích sau khi thêm dung môi lần lượt này 2 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml, 50 ml, 100 ml và 200 ml. Sau mỗi lần thêm dung môi, tiến hành siêu âm thêm 30 phút, duy trì nhiệt độ siêu âm trong khoảng 25 ± 5 ^{o}C. Sau khi siêu âm, ống nghiệm nào mẫu tan hoàn toàn thì dừng lại, thử đến tối đa 200 ml dung môi.

Bảng 3.6. Kết quả thử độ tan của hợp chất, 5-dimethoxy-4-hydroxy-1-*β*-D glucopyranoside trong một số dung môi phân cực

Thể tích (ml)	**2,0**	**5,0**	**10**	**20**	**50**	**100**	**200**
Nước	-	-	-	-	-	-	-
Acetonitril	-	-	-	-	+		
Methanol	-	-	-	+			
Ethanol	-	-	-	-	-	-	-
Ethanol 50 %	+						
Methanol 50 %	-	-	-	+			
Acetonitril 50 %	-	-	+				

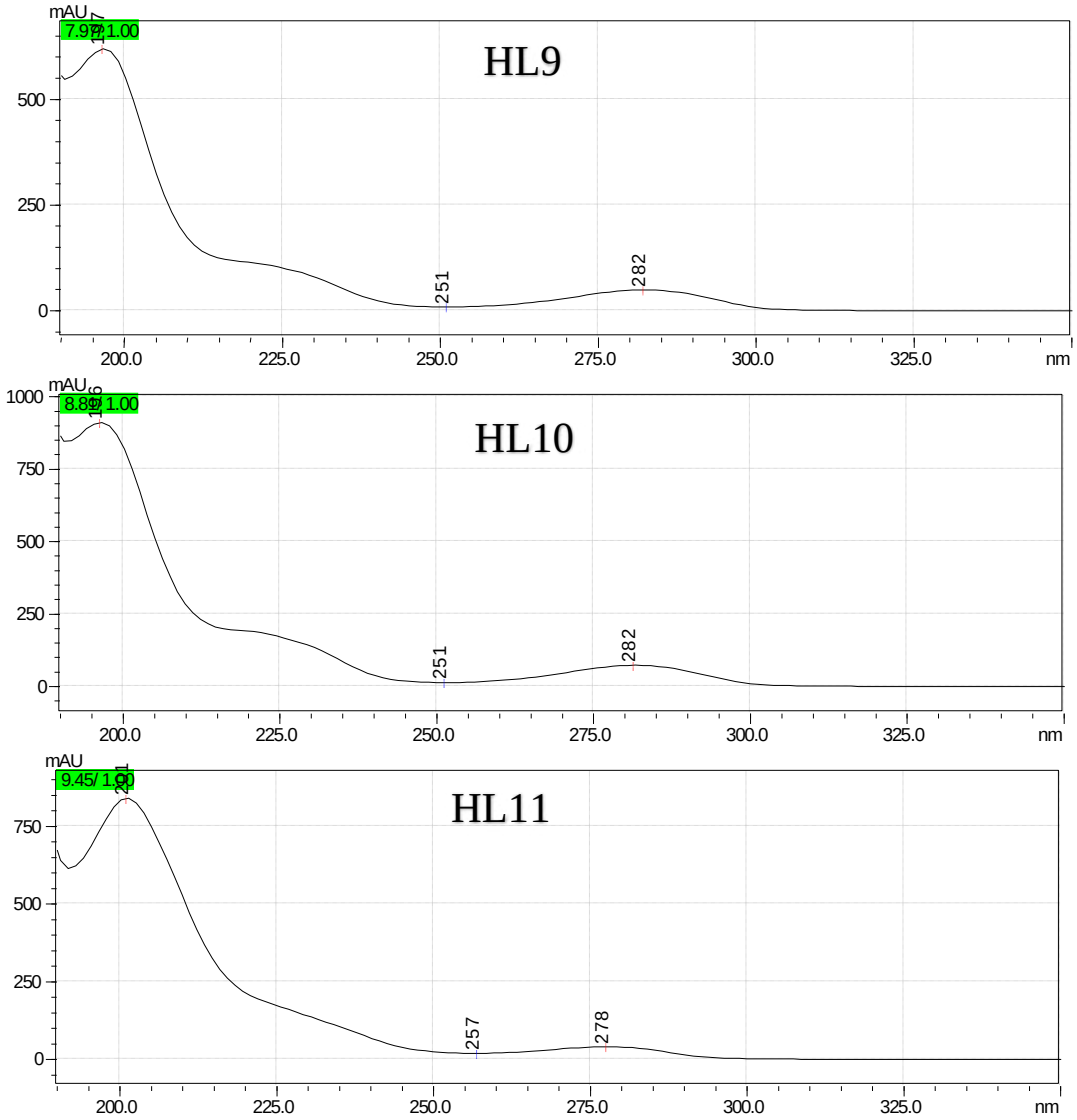
Không thử các dung môi không tan trong nước vì dự kiến sử dụng sắc ký lỏng pha đảo để định lượng hợp chất HL11.

Như vậy so với các dung môi thông dụng đã thử, hỗn hợp ethanol – nước với tỷ lệ 50 – 50 có khả năng hòa tan mẫu chất nghiên cứu tốt nhất. Hỗn hợp dung môi này sẽ được lựa chọn để làm dung môi chiết hợp chất HL11 từ mẫu dược liệu nghiên cứu, cũng như sẽ sử dụng làm dung môi để pha mẫu trong quá trình định lượng.

3.3.3.2. Khảo sát điều kiện sắc ký

Hợp chất HL11 thu được từ pha nước của dịch chiết dược liệu Bàn tay ma đỏ là hợp chất khá phân cực, nghiên cứu này lựa chọn hệ sắc ký pha đảo để xây dựng phương pháp định lượng cho hợp chất này trong dược liệu Bàn tay ma đỏ. Cột phân tích được lựa chọn để khảo sát ban đầu là cột C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm).

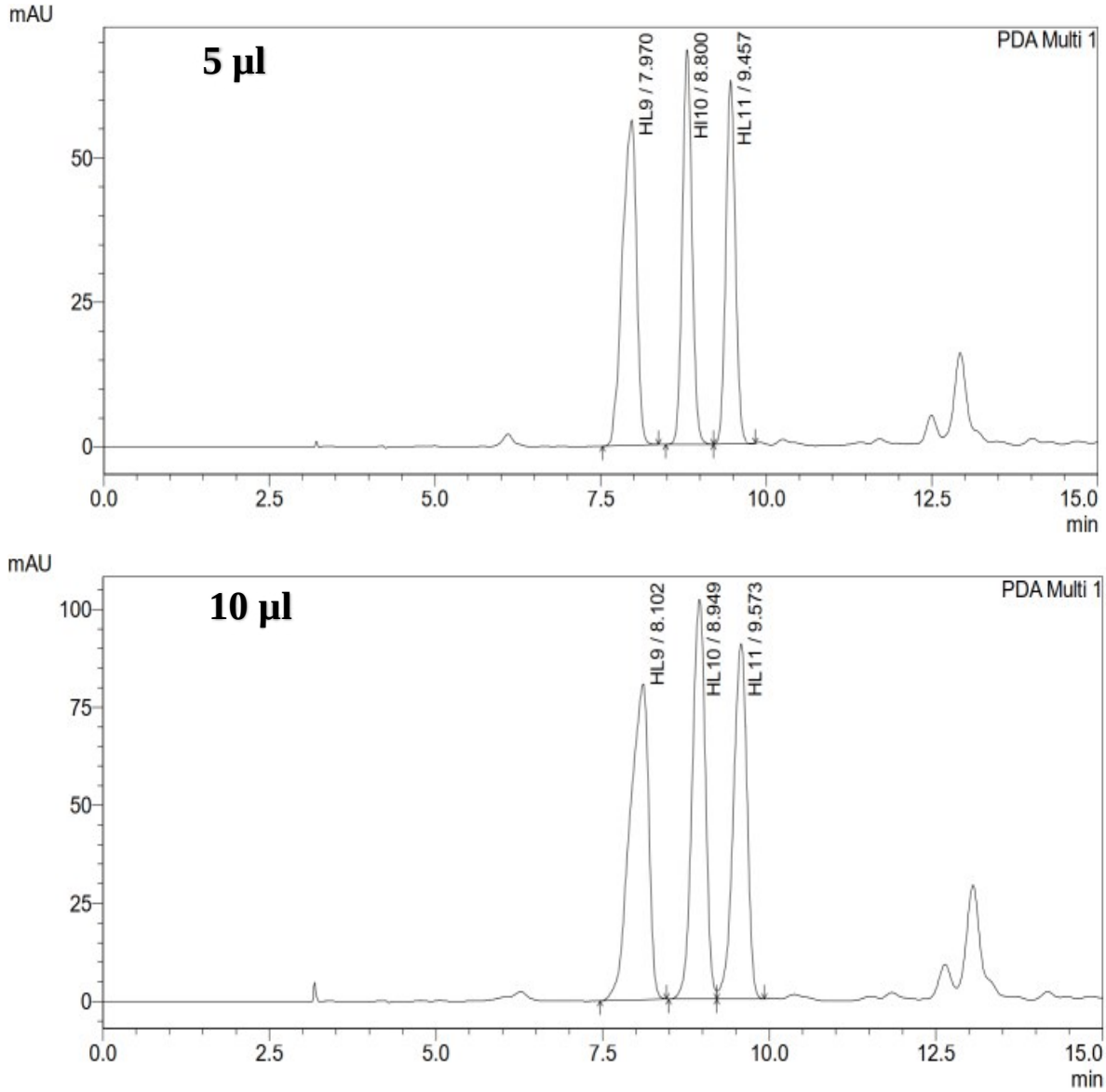
Trong nền mẫu dược liệu có nhiều thành phần có thể gây ảnh hưởng cho chất nghiên cứu trong quá trình phân tích định tính và định lượng, vì vậy để đảm bảo hiệu quả phân tích cần phải đánh giá khả năng tách các chất của phương pháp trên cơ sở xác định độ phân giải R giữa hợp chất HL11 với các hợp chất có cấu trúc hóa học tương tự có trong thành phần của dịch cao chiết dược liệu. Trong nghiên cứu về phần gỗ cây Bàn tay ma đỏ, ba hợp chất isotachiosid (HL9), tachioside (HL10) và 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1-*β*-D-glucopyranosid được phân lập có cấu trúc hóa học tương tự nhau. Hai hợp chất HL9 và HL10 vừa tan tốt trong methanol, ethanol, cũng tan tốt trong ethanol 50 % và có khả năng sẽ rửa giải hầu như đồng thời với hợp chất HL11. Do đó, các hợp chất HL9 và HL10 được sử dụng để khảo sát nhằm lựa chọn chất đánh giá độ phân giải của hệ sắc ký lỏng hiệu năng cao nhằm tối ưu điều kiện phân tích hợp chất HL11.



Hình 3.46. Phổ UV của các chất HL9, HL10 và HL11 tại các vị trí pic chất xuất hiện trên sắc ký đồ của ba chất

Cả 3 hợp chất HL9, HL10 và HL11 đều có nhân thơm trong cấu trúc nên có khả năng hấp thụ các bức xạ trong vùng ánh sáng tử ngoại và/hoặc khả kiến. Do đó, nghiên cứu này dự kiến sẽ sử dụng detector DAD để phát hiện và phân tích các hợp chất trên. Thật vậy, hình 2 là phổ UV của cả 3 hợp chất trên đo trong khoảng bước sóng tử ngoại từ 190 – 350 nm. Phổ UV của hợp chất HL11 có 2 cực đại tại 201 nm và tại 278 nm và ở khoảng 225 nm phổ có dáng dốc nhẹ. Nếu phân tích chất tinh khiết có thể chọn phân tích ở 201 nm hoặc 225 nm. Tuy nhiên, ở các bước sóng ngắn rất nhiều tạp chất trong nền mẫu dược liệu có thể hấp thụ và gây sai số khi phân tích. Bên cạnh đó, khi phân tích đồng thời cùng hai hợp chất HL9 và HL10, các hợp chất này cũng có cực đại hấp thụ ở 282 nm, gần với cực đại hấp thụ 278 nm của hợp chất HL11. Do đó, sử dụng bước sóng 278 nm có thể phân tích được đồng thời cả ba chất trên.

Để giảm khả năng tương tác hút, đẩy giữa các chất khi tồn tại ở dạng ion trong hệ sắc ký, có thể làm ảnh hưởng đến khả năng tách các chất, pha động được sử dụng là hỗn hợp acid phosphoric 0,1 % với dung môi hữu cơ là acetonitril hoặc methanol. Do độ tan của HL11 trong hỗn hợp acetonitril và nước tốt hơn là methanol và nước, nên hệ pha động ưu tiên lựa chọn là hỗn hợp acid phosphoric 0,1 % và acetonitril ở tỷ lệ thích hợp để tránh hiện tượng bão hòa chất trong cột khi tiến hành sắc ký khi tăng nồng độ chất phân tích hoặc thể tích tiêm mẫu.



Hình 3.47. Sắc ký đồ mẫu hỗn hợp HL9, HL10 và HL11 ở thể tích tiêm 5 µl và 10 µl phân tích ở bước sóng 278 nm.

Nghiên cứu này cũng đã tiến hành khảo sát một số điều kiện pha động của hỗn hợp acetonitril và acid phosphoric 0,1 % để tách hỗn hợp HL9, HL10 và HL11 với cùng nồng độ 0,5 mg/ml, tốc độ dòng 1,0 ml/phút, gồm các điều kiện pha động như sau: Đẳng

dòng ở tỷ lệ dung môi khác nhau (5 %, 7,5 % và 10 %) và gradient dung môi ở các điều kiện khác nhau. Sau quá trình khảo sát đã lựa chọn được chương trình pha động cho kết quả tách tốt nhất đối với 3 chất cần quan tâm (độ phân giải giữa HL9 và HL10 là 2,85; độ phân giải giữa HL10 và HL11 là 2,35) và thời gian lưu mẫu HL11 là khoảng 9,5 phút. Kết hợp với quá trình khảo sát phân tích mẫu thử, chương trình pha động đã được thiết kế thêm để rửa giải các tạp chất ít phân cực hơn ra khỏi cột sau khi phân tích, kết quả chi tiết được trình bày ở Bảng 3.8.

Kết quả khảo sát trên cũng cho thấy thứ tự rửa giải của các hợp chất trên lần lượt là HL9, HL10 và HL11 (Hình 3.47). Điều này cũng hoàn toàn phù hợp với sự tương tự về cấu trúc của 3 hợp chất đang phân tích. Cụ thể là: Hợp chất HL10 có cùng nhóm thế (-OCH3 và -OH) với hợp chất HL9, nhưng vị trí nhóm thế (-OCH3) của hợp chất HL10 gần với vị trí nhóm thế của hợp chất HL11 hơn. Do đó, muốn tách được hợp chất HL11 khỏi hai hợp chất HL9 và HL10 ở hệ sắc ký lỏng pha đảo chỉ cần tách được hai hợp chất HL11 và HL10 ra khỏi nhau. Như vậy, để đảm bảo hiệu năng của phương pháp định lượng HL11, chất đánh giá độ phân giải chất phân giải được lựa chọn là hợp chất HL10, đồng thời độ phân giải của các pic hai hợp chất HL10 và HL11 tối thiểu phải là 1,5.

Thể tích tiêm mẫu được lựa chọn sao cho thể tích ấy thông dụng, đảm bảo độ sai số cho phép và cho khả năng tách tốt nhất. Kết quả đánh giá độ phân giải của ba chất HL9, HL10 và HL11 khi thay đổi thể tích tiêm từ 5 µl lên 10 µl cũng cho thấy khi sử dụng thể tích tiêm là 5 µl, độ phân giải giữa HL9, HL10 và HL11 lần lượt là 2,85 và 2,35; khi sử dụng thể tích tiêm 10 µl, các thông số này thay đổi tương ứng là 1,88 và 1,66 (Hình 3.47). Ở cả hai trường hợp sử dụng thể tích tiêm 5 µl lên 10 các đáp ứng pic đủ lớn. Theo đó, thể tích tiêm mẫu được lựa chọn là 5 µl để phân tích.

3.3.3.3. Khảo sát điều kiện chuẩn bị mẫu

Cân chính xác khoảng 2,0 g mẫu bột dược liệu Bàn tay ma đỏ, cho vào 4 bình định mức 20 ml khác nhau, đánh số từ 1 đến 4. Thêm 15 ml ethanol 50 % vào các bình, tiến hành siêu âm đồng thời các bình, duy trì nhiệt độ siêu âm từ 25 ± 5 ^{o}C. Sau 15 phút, 30 phút, 60 phút và 120 phút lần lượt lấy các bình số 1, 2, 3 và 4 ra khỏi máy siêu âm. Để nguội, bổ sung ethanol 50 % đến vạch, lắc đều. Lọc qua màng 0,45 µm.

Tiến hành sắc ký các mẫu trên theo chương trình sắc ký đã xây dựng, xác định giá trị tỷ lệ diện tích pic HL11 trên khối lượng mẫu thử (S/m). Kết quả như sau (Bảng 3.7):

Bảng 3.7. Kết quả khảo sát thời gian siêu âm mẫu

Mẫu phân tích	Thời gian siêu âm (phút)	Giá trị S/m
1	15	2,31
2	30	2,59
3	60	2,56
4	120	2,63

Trong đó: S tính theo đơn vị mAU.S; m tính theo đơn vị mg

Khi các mẫu được pha loãng ở cùng thể tích, tính trên một đơn vị khối lượng, giá trị diện tích pic chất phân tích càng lớn thì lượng chất giải phóng càng nhiều. Trong trường hợp này, giá trị S/m sẽ tỷ lệ với lượng chất được giải phóng ra. Sau 30 phút, thời gian siêu âm 30 phút, giá trị S/m hầu như không thay đổi. Như vậy, sau 30 phút, lượng hợp chất HL11 được giải phóng ra đã gần như hoàn toàn.

Để tiếp tục loại bớt sai số do lượng dược liệu chiếm chỗ trong mẫu, lấy 10,0 g mẫu dược liệu được cân vào bình nón 200 ml, lần lượt chiết siêu âm 3 lần với 100 ml ethanol 50 %. Gộp dịch chiết 3 lần, cô quay chân không đến khoảng 10 ml. Chuyển dịch sau cô quay vào bình chiết, tráng 2 lần với khoảng 10 ml nước. Chiết 3 lần với đồng thể tích ethyl acetate. Gộp dịch chiết ethyl acetate, cô quay chân không loại dung môi.

Dịch chiết nước được chuyển vào bình cô quay, tráng, rửa bằng ethanol 50 %. Cô quay chân không loại dung môi. Thêm 5 ml ethanol 50 %, siêu âm 15 phút. Thu dịch lọc vào bình định mức 25 ml. Lặp lại quá trình thêm 2 lần, gộp các dịch chiết, để nguội, thêm ethanol 50 % vừa đủ thể tích. Lọc qua màng 0,45 μm thu được dung dịch A.

Cắn ethyl acetate tiến hành theo qui trình tương tự như cắn nước sau khi cô quay, thu được dung dịch B.

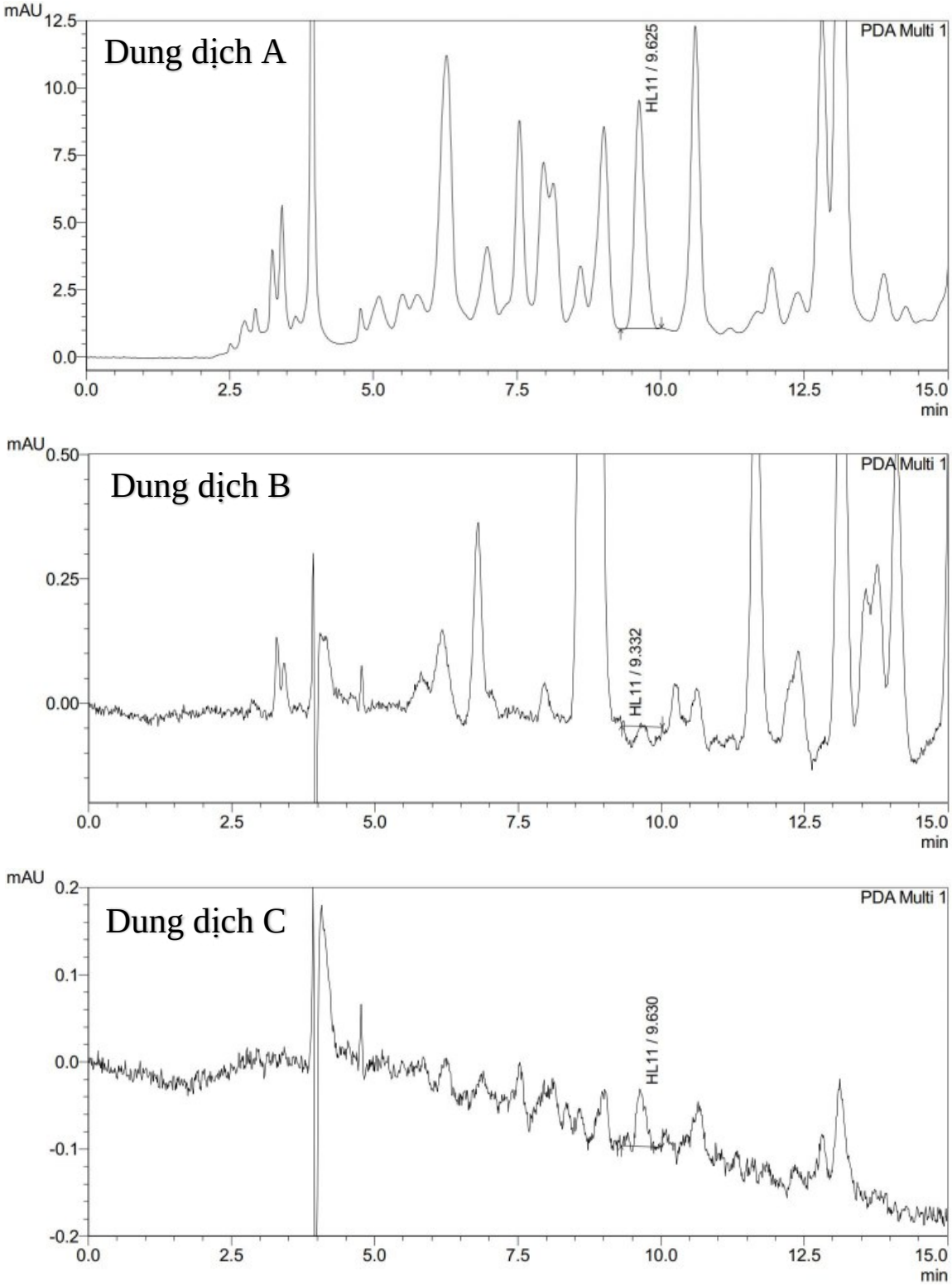
Mẫu dược liệu khi chiết 3 lần bằng 50 ml ethanol 50 % tiếp tục được chiết thêm 3 lần nữa với cùng quy trình. Gộp dịch chiết, tiến hành như với dịch chiết ở 3 lần đầu tiên. Cặn nước sau khi chiết với ethyl acetate cũng được xử lý như với cặn chiết ban đầu, thu được dung dịch C.

Tiến hành sắc ký các dung dịch A, B và C theo chương trình sắc ký đã xây dựng. Kết quả như sau (Hình 3.48):

+ Dung dịch A cho pic sắc ký có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của pic hợp chất HL11.

+ Dung dịch B không xuất hiện pic tại thời gian lưu của pic hợp chất HL11.

+ Dung dịch C cho pic sắc ký có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của pic chất pic chất HL11, tuy nhiên tỷ lệ pic này so với pic thu được ở dung dịch A là 0,7 %.



Hình 3.48. Sắc ký đồ của các dung dịch A, B và C được phân tích ở bước sóng 278 nm

Như vậy, sau 3 lần chiết với ethanol 50 % đã chiết hầu như kiệt HL11 trong mẫu dược liệu (sai số không quá 1 %). Chiết bằng ethyl acetate đã loại bớt tạp ít phân cực trong mẫu HL11 mà không làm ảnh hưởng đến kết quả phân tích của mẫu HL11.

Sau quá trình khảo sát, quy trình định lượng hợp chất 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1-*β*-D-glucopyranoside trong dược liệu Bàn tay ma đỏ đã được xây dựng và trình bày ở mục 3.3.4.

3.3.4. Quy trình định tính và định lượng 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1-β-D-glucopyranoside trong dược liệu Bàn tay ma

Phương pháp sắc ký lỏng (Phụ lục 5.3 Dược điển Việt Nam V).

- *Điều kiện sắc ký:*

+ Cột C18 (250 x 4,6 mm; 5µm).

+ Pha động: chạy đồng thời hai dung dịch gồm acid phosphoric 0,1 % (dung dịch A) và acetonitril (dung dịch B) theo chương trình sau (Bảng 3.8):

Bảng 3.8. Chương trình pha động định lượng HL11 trong dược liệu Bàn tay ma đỏ

Thời gian (phút)	**% dung dịch A**	**% dung dịch B**
0	95,0 %	5,0 %
15	85,0 %	15,0 %
20	20,0 %	80,0 %
30	20,0 %	80,0 %
31	95,0 %	5,0 %
35	95,0 %	5,0 %

+ Tốc độ dòng: 1,0 ml/phút.

+ Detector: PDA đặt ở bước sóng 278 nm.

+ Thể tích tiêm: 5 µl.

- *Chuẩn bị mẫu:*

+ Dung dịch chuẩn: Hòa tan và pha loãng mẫu chuẩn 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1-*β*-D-glucopyranoside trong ethanol 50 % để thu được các dung dịch chuẩn có nồng độ chính xác khoảng 0,075 mg/ml.

+ Dung dịch đánh giá độ phân giải: Dung dịch chứa tachioside và 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1-β-D-glucopyranoside với nồng độ 0,5 mg/ml.

+ Mẫu thử: Cân chính xác khoảng 10 g bột dược liệu Bàn tay ma đỏ vào bình nón 200 ml. Thêm 100 ml ethanol 50 %, siêu âm 30 phút. Gạn dịch chiết, tiếp tục thêm 100 ml ethanol 50%, lặp lại quá trình trên thêm 2 lần. Gộp dịch chiết 3 lần, cô quay chân không ở 60 ^oC đến khi còn khoảng 20 ml. Chuyển vào bình chiết, tráng và thêm nước vừa đủ khoảng 50 ml. Chiết 3 lần với ethyl acetate, loại phần ethyl acetate. Phần dịch pha nước được chuyển vào bình cô quay, tráng rửa bằng ethanol 50 %. Cô quay chân không đến cắn, để nguội. Thêm 5 ml ethanol 50 %, siêu âm 15 phút, chuyển dịch sau siêu âm vào bình định mức 25 ml. Lặp lại quá trình thêm 2 lần với cùng thể tích ethanol 50 %. Gộp dịch chiết vào bình định mức 25 ml, siêu âm thêm 15 phút. Để nguội, thêm ethanol 50 % đến vạch, lọc qua màng 0,45 μm thu được dung dịch thử.

Tiến hành sắc ký các dung dịch trên, ghi lại sắc ký đồ các mẫu phân tích.

- *Đánh giá kết quả:*

+ Độ thích hợp hệ thống: Độ phân giải của pic tachioside và pic 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1-β-D-glucopyranoside không được ít hơn 1,5.

+ Định tính: Sắc ký đồ của mẫu thử phải cho pic chính có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của pic hợp chất 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1-*β*-D-glucopyranoside trên sắc ký đồ của mẫu chuẩn.

+ Định lượng: Hàm lượng 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1-*β*-D-glucopyranoside (%, kl/kl) trong mẫu dược liệu được tính như sau:

$$\text{HL (\%, kl/kl)} = \frac{C_{chuẩn} \text{ x } 25 \text{ x } 100 \text{ x } 100}{m_{thử} \text{ x } (100 - L)}$$

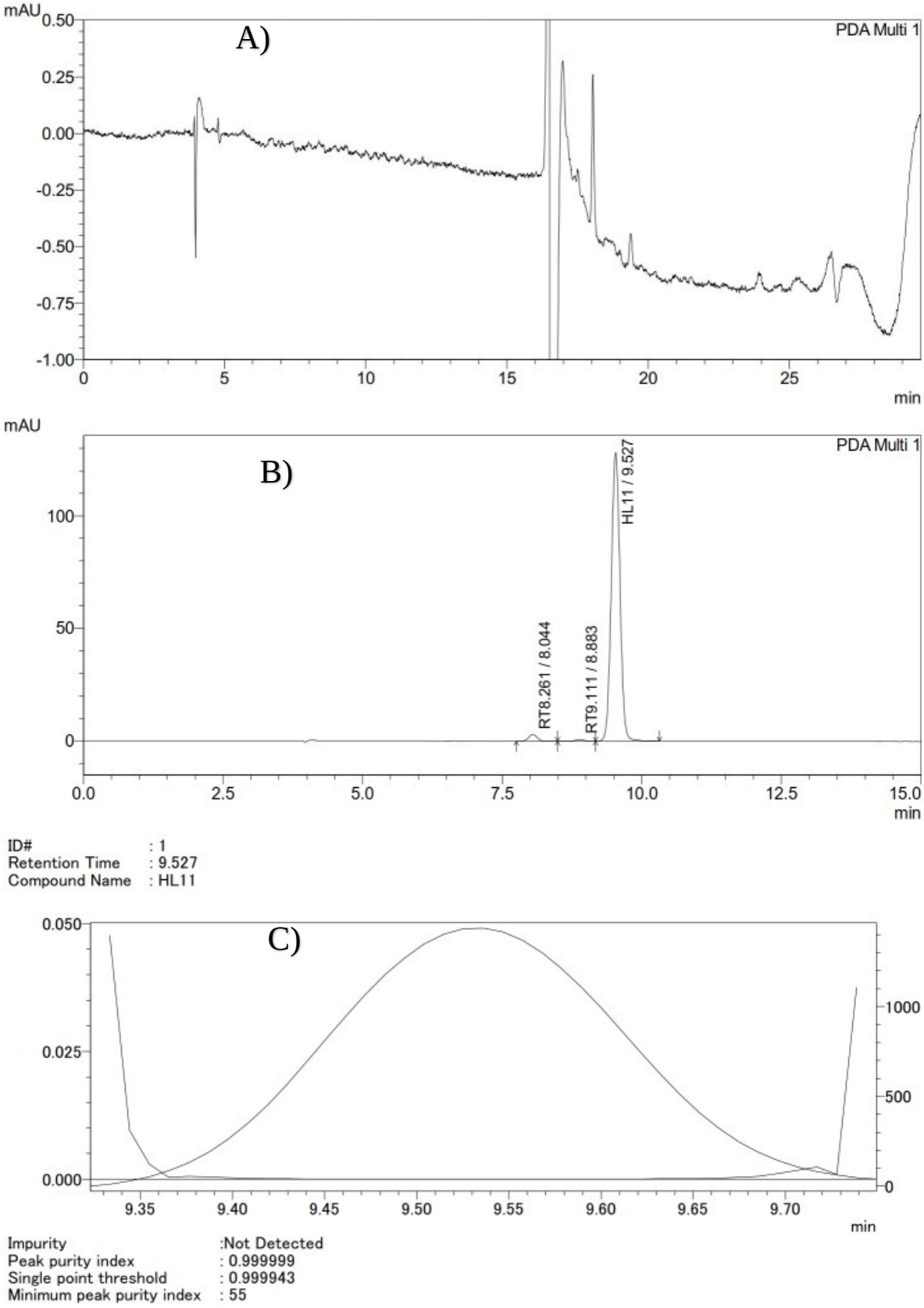
Trong đó: + Với L là độ ẩm của mẫu dược liệu (%)

+ $C_{chuẩn}$ là nồng độ mẫu chuẩn (mg/ml)

+ $m_{thử}$ là khối lượng dược liệu (mg)

3.3.5. Sơ bộ xác định hàm lượng 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1-β-D-glucopyranoside trong mẫu HL11 đã tinh chế

Lấy lượng mẫu 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1-*β*-D-glucopyranoside (HL11) còn lại sau khi được phân lập và tinh chế từ dược liệu Bàn tay ma đỏ được nghiền mịn, sấy 24h trong tủ sấy chân không có mặt P_2O_5. Sau thời gian sấy, thu được 283 mg mẫu hợp chất HL11 để tiến hành thử nghiệm. Khi đó xem như nguyên liệu đã được sấy đến khối lượng không đổi và tồn tại dưới dạng khan. Hàm lượng chất 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1-*β*-D-glucopyranoside sẽ được đánh giá bằng phương pháp chuẩn hóa diện tích pic.



Hình 3.49. Sắc ký đồ mẫu trắng (A) và mẫu nguyên liệu HL11 (B) và độ tinh khiết của pic HL11 (C)

Sử dụng điều kiện sắc ký như đã xây dựng để định lượng HL11 trong dược liệu Bàn tay ma đỏ, tiến hành phân tích mẫu nguyên liệu HL11 (sau khi đã làm sấy) với nồng độ 1,0 mg/ml. So sánh sắc ký đồ của mẫu thử và sắc ký đồ của mẫu trắng được sắc ký đồng thời, xác định diện tích các pic khác ngoài các pic trùng với mẫu trắng.

Kết quả như sau: Trên sắc ký đồ của mẫu nguyên liệu HL11 xuất hiện 02 pic phụ tương ứng với thời gian lưu của chất HL9 và HL10; pic HL11 tinh khiết với hệ số là 0,999999 (Hình 3.49). Kết quả xác định hàm lượng HL11 như sau:

Bảng 3.9. Kết quả xác định hàm lượng 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1-β-D-glucopyranoside trong mẫu HL11

Mẫu tiêm	**$S_{Pic\ 1}$ (mAU.S)**	**$S_{Pic\ 2}$ (mAU.S)**	**S_{pic_HL11} (mAU.S)**	**% S_{pic_HL11}**
Thử 1	35652	15964	1382897	96,4
Thử 2	35859	15736	1387372	96,4
Thử 3	35318	15513	1390716	96,5
Trung bình				**96,4**

Như vậy, theo phương pháp chuẩn hóa diện tích pic, hàm lượng 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1-*β*-D-glucopyranoside trong mẫu HL11 sau khi điều chế là 96,4 % tính theo chế phẩm khan. Hàm lượng này sẽ sử dụng làm giá trị để thẩm định phương pháp định lượng 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1-*β*-D-glucopyranoside trong dược liệu.

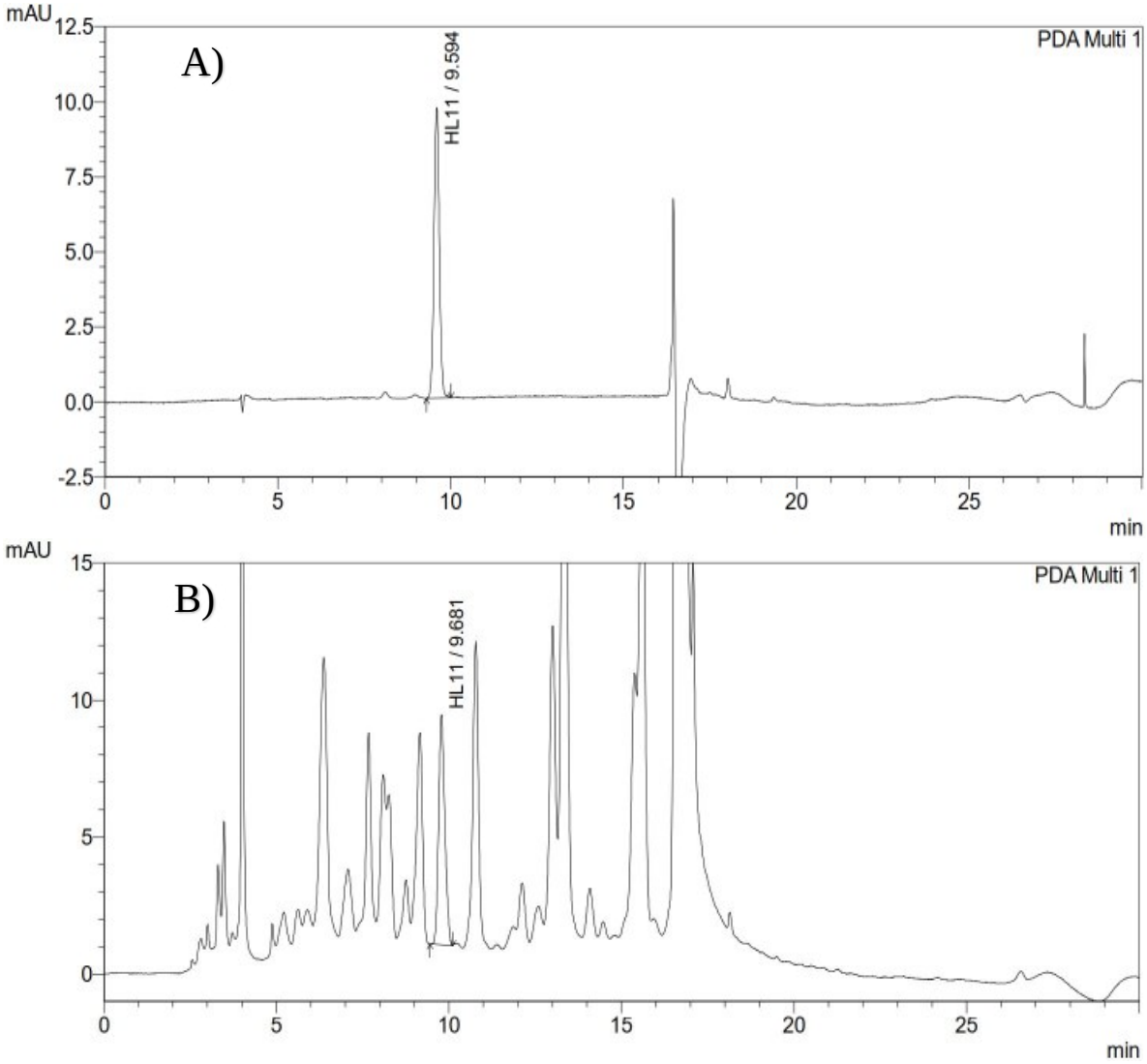
3.3.6. Thẩm định quy trình định tính và định lượng 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1-β-D-glucopyranoside trong dược liệu Bàn tay ma

Phương pháp định lượng 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1-*β*-D-glucopyranoside trong dược liệu Bàn tay ma đỏ sẽ được thẩm định theo hướng dẫn của AOAC international, gồm các chỉ tiêu sau: Độ đặc hiệu, độ thích hợp hệ thống, độ tuyến tính, độ đúng, độ lặp lại và giới hạn định lượng [119].

3.3.6.1. Độ đặc hiệu

Tiêm vào hệ thống sắc ký mẫu trắng (dung môi pha mẫu, ethanol 50 %), mẫu chuẩn và dung dịch thử (sử dụng dung dịch chuẩn ở nồng độ 0,075 mg/ml ở đánh giá độ tuyến tính, dung dịch thử 1 ở phần đánh giá độ lặp lại). So sánh thời gian lưu của pic 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1-*β*-D-glucopyranoside ở các mẫu. Kết quả thử độ đặc hiệu

của phương pháp được trình bày ở Hình 3.50 và 3.49. Trong đó, sắc ký đồ của mẫu chuẩn xuất hiện pic chính có thời gian lưu ở 9,59 phút (Hình 3.50); sắc ký đồ của mẫu thử xuất hiện pic chính có thời gian lưu 9,681 phút (Hình 3.50); còn sắc ký đồ của mẫu trắng không xuất hiện pic có thời gian lưu khoảng 9,6 phút (Hình 3.49). Như vậy phương pháp đã xây dựng là đặc hiệu để định lượng 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1-*β*-D-glucopyranoside trong dược liệu Bàn tay ma đỏ.



Hình 3.50. Sắc ký đồ đánh giá độ đặc hiệu của phương pháp: A – mẫu chuẩn, B – mẫu thử định lượng 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1-β-D-glucopyranoside

3.3.6.2. Độ thích hợp hệ thống

Pha dung dịch thích hợp hệ thống chứa HL10 và HL11 với nồng độ khoảng 0,5 mg/ml. Tiêm dung dịch đánh giá độ thích hợp hệ thống và tiêm lặp lại 6 lần dung dịch chuẩn ở phần thử độ lặp lại vào hệ thống sắc ký, xác định diện tích pic, thời gian lưu và độ phân giải của các hợp chất HL10 và HL11. Kết quả đánh giá độ thích hợp hệ thống

của phương pháp được đánh giá thông qua độ phân giải của pic HL10 và HL11 trên sắc ký đồ của dung dịch đánh giá độ phân giải và độ lặp lại của diện tích pic, thời gian lưu được trình bày ở Bảng 3.10.

Kết quả cho thấy độ phân giải của mẫu pic hợp chất HL10 và pic hợp chất HL11 trên sắc ký đồ của dung dịch thử độ thích hợp hệ thống là 2,271. Độ lặp lại thời gian lưu và diện tích pic của pic HL11 trên sắc ký đồ của mẫu chuẩn lần lượt là 0,36 % và 0,65 % (Bảng 3.10). Theo đó, độ lặp lại của diện tích pic và thời gian lưu đều không quá 2,0 %; độ phân giải giữa 2 pic HL10 và HL11 khoảng trên 2,2 đáp ứng yêu cầu (RS ≥ 1,5). Như vậy, phương pháp đạt độ thích hợp hệ thống để định lượng 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1-*β*-D-glucopyranoside trong mẫu dược liệu Bàn tay ma đỏ.

Bảng 3.10. Kết quả đánh giá độ lặp lại của thông số mẫu chuẩn

TT	**t_R (phút)**	**S_{pic} (mAU.S)**
1	9,594	104054
2	9,630	103708
3	9,644	103227
4	9,651	102935
5	9,626	102960
6	9,559	102122
Trung bình	**9,617**	**103167,7**
RSD	**0,4 %**	**0,7 %**

*Trong đó: + **t_R** là thời gian lưu của pic chất HL11*

*+ **S_{pic}** là diện tích pic chất HL11*

*+ **R_S** là độ phân giải giữa pic HL10 và HL11*

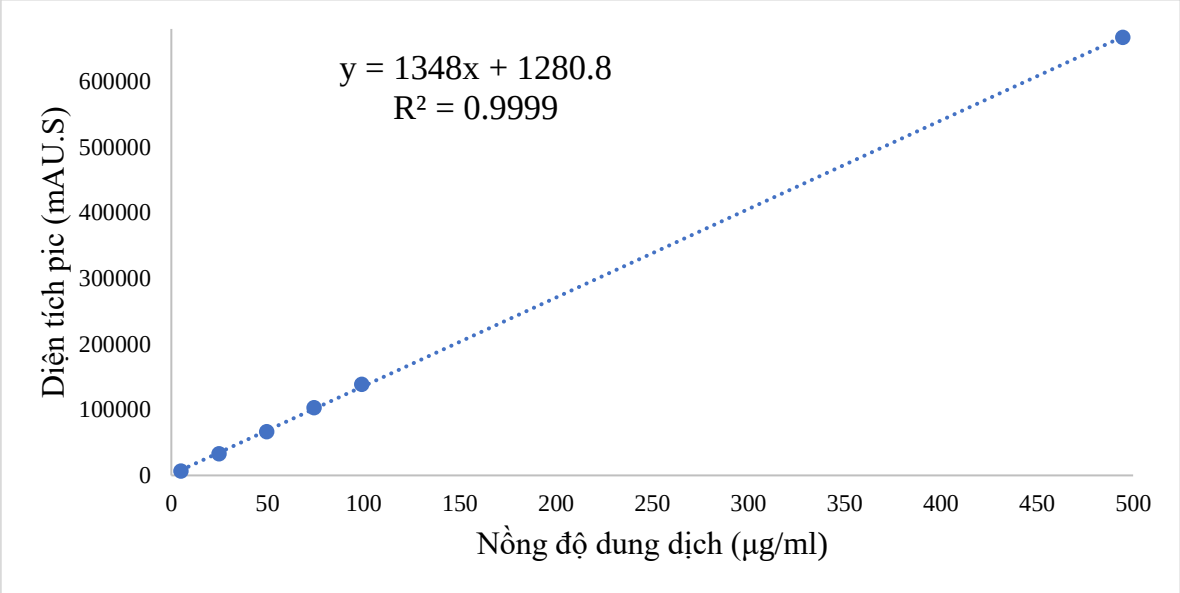
3.3.6.3. Độ tuyến tính

Hòa tan và pha loãng 10,26 mg nguyên liệu HL11 trong vừa đủ 20,0 ml bằng ethanol 50 %. Hút và pha loãng dung dịch này để thu được dãy dung dịch chuẩn có nồng độ như Bảng 3.11.

Bảng 3.11. Nồng độ và diện tích pic của các mẫu đánh giá độ tuyến tính

$C_{dự\ kiến}$ (µg/ml)	5,0	25,0	50,0	75,0	100,0	500,0
$C_{thực}$ (µg/ml)	4,95	24,73	49,45	74,18	98,91	494,53
S_{pic} (mAU.S)	6425	32808	66777	103168	138631	667117

Tiến hành sắc ký các dung dịch chuẩn, ghi lại sắc ký đồ và diện tích pic. Thiết lập mối tương quan tuyến tính giữa diện tich pic và nồng độ chất phân tích trong mẫu. Kết quả mối tương quan tuyến tính giữa diện tích pic và nồng độ mẫu phân tích tương ứng thu được như Hình 3.51.



Hình 3.51. Mối tương quan tuyến tính giữa diện tích pic và nồng độ chất phân tích

Hệ số tương quan tuyến tính (R) giữa diện tích pic và nồng độ chất phân tích là 0,99995 (> 0,998); hệ số chắn là 1280,8, tương ứng với % Y là 1,24 % (< 2,0 %) đáp ứng các yêu cầu đặt ra. Như vậy phương pháp đạt yêu cầu về độ tuyến tính để định lượng 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1-*β*-D-glucopyranoside trong mẫu dược liệu Bàn tay ma đỏ.

3.3.6.4. Độ lặp lại và độ chính xác trung gian của phương pháp

Chuẩn bị mẫu thử theo quy trình phân tích, tiến hành 2 ngày, mỗi ngày 6 thử, xác định hàm lượng chất 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1-β-D-glucopyranoside trong mẫu dược liệu (Dược liệu Bàn tay ma đỏ có độ ẩm 8,4 %). Kết quả đánh giá độ lặp lại và độ chính xác trung gian của phương pháp được trình bày ở Bảng 3.12. Phương pháp đã xây dựng có độ lặp lại RSD (n = 6) = 3,1 % và độ chính xác trung gian với RSD (n = 12) = 3,2 %

đáp ứng các yêu cầu qui định theo hướng dẫn của AOAC international với các giới hạn tương ứng là 3,7 % và 6 %.

Bảng 3.12. Kết quả đánh giá độ lặp lại và độ chính xác trung gian

TT	**Ngày 16/10/2022** $m_{chuẩn}$ = 10,26 mg; $S_{TB\_chuẩn}$ = 103168 mAU.S			**Ngày 18/10/2022** $m_{chuẩn}$ = 10,15 mg; $S_{TB\_chuẩn}$ = 104434 mAU.S		
	$m_{thử}$ (g)	$S_{thử}$ (mAU)	$HL_{thử}$ (%)	$m_{thử}$	$S_{thử}$ (mAU)	$HL_{thử}$ (%)
1	10,0636	105991	0,0207	10,1024	102445	0,0195
2	10,2623	102344	0,0196	10,1434	108032	0,0204
3	10,1392	108023	0,0209	10,0824	106124	0,0202
4	10,1045	100242	0,0195	10,2964	105262	0,0196
5	10,0547	101123	0,0197	10,1523	107226	0,0203
6	10,1621	106428	0,0206	10,3452	101023	0,0187
Trung bình (n = 6)			**0,0202**	**Trung bình (n = 6)**		**0,0198**
RSD (n = 6)			**3,1 %**	**RSD (n = 6)**		**3,3 %**
HL_{TB} (n = 12) = 0,0200 (%, kl/kl); RSD = 3,2 %						

(Trong đó: Dung dịch chuẩn pha trong bình định mức 20 ml, hút chính xác 3,0 ml pha loãng trong 20 ml. Dung môi pha mẫu là ethanol 50 %).

3.3.6.5. Độ đúng và khoảng làm việc

Độ đúng của phương pháp được thực hiện bằng cách thêm chuẩn vào nền mẫu thử tại các mức nồng độ thử khoảng 50 %, 100 % và 200 % của nồng độ chuẩn làm việc, tương ứng khoảng 0,0375 mg/ml; 0,075 mg/ml và 0,150 mg/ml. Thực hiện như sau:

+ Pha dung dịch chuẩn gốc: Cân 10,24 mg chuẩn 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1-β-D-glucopyranoside, hòa tan và pha loãng vừa đủ trong 20,0 ml ethanol 50 %.

+ Mẫu thử độ đúng ở nồng độ bằng 50 % nồng độ định lượng: Hút chính xác 1,0 ml dung dụng chuẩn gốc vào bình nón 200 ml có chứa sẵn chính xác khoảng 2,5 g mẫu thử. Tiến hành chuẩn bị mẫu thử theo quy trình phân tích.

+ Mẫu thử độ đúng ở nồng độ bằng 100 % nồng độ định lượng: Hút chính xác 2,0 ml dung dụng chuẩn gốc vào bình nón 200 ml có chứa sẵn chính xác khoảng 5 g mẫu thử. Tiến hành chuẩn bị mẫu thử theo quy trình phân tích.

+ Mẫu thử độ đúng ở nồng độ bằng 200 % nồng độ định lượng: Hút chính xác 4,0 ml dung dụng chuẩn gốc vào bình nón 200 ml có chứa sẵn chính xác khoảng 10 g mẫu thử. Tiến hành chuẩn bị mẫu thử theo quy trình phân tích.

Lấy hàm lượng 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1-β-D-glucopyranoside trong mẫu thử là 0,0202 % tính theo chế phẩm khan, như kết quả ở phần thử độ lặp lại (Bảng 3.12). Kết quả đánh giá độ đúng thể hiện ở Bảng 3.13. Theo yêu cầu của AOAC international, độ với mẫu có hàm lượng từ 0,01 % đến 0,1 %, độ thu hồi mẫu trung bình phải đạt từ 95 % đến 105 %. Tại 3 hàm lượng thử, kết quả phân tích cho độ thu hồi từ đạt từ 97,1 % đến 97,9 %. Như vậy phương pháp định lượng đã xây dựng có độ đúng đạt yêu cầu.

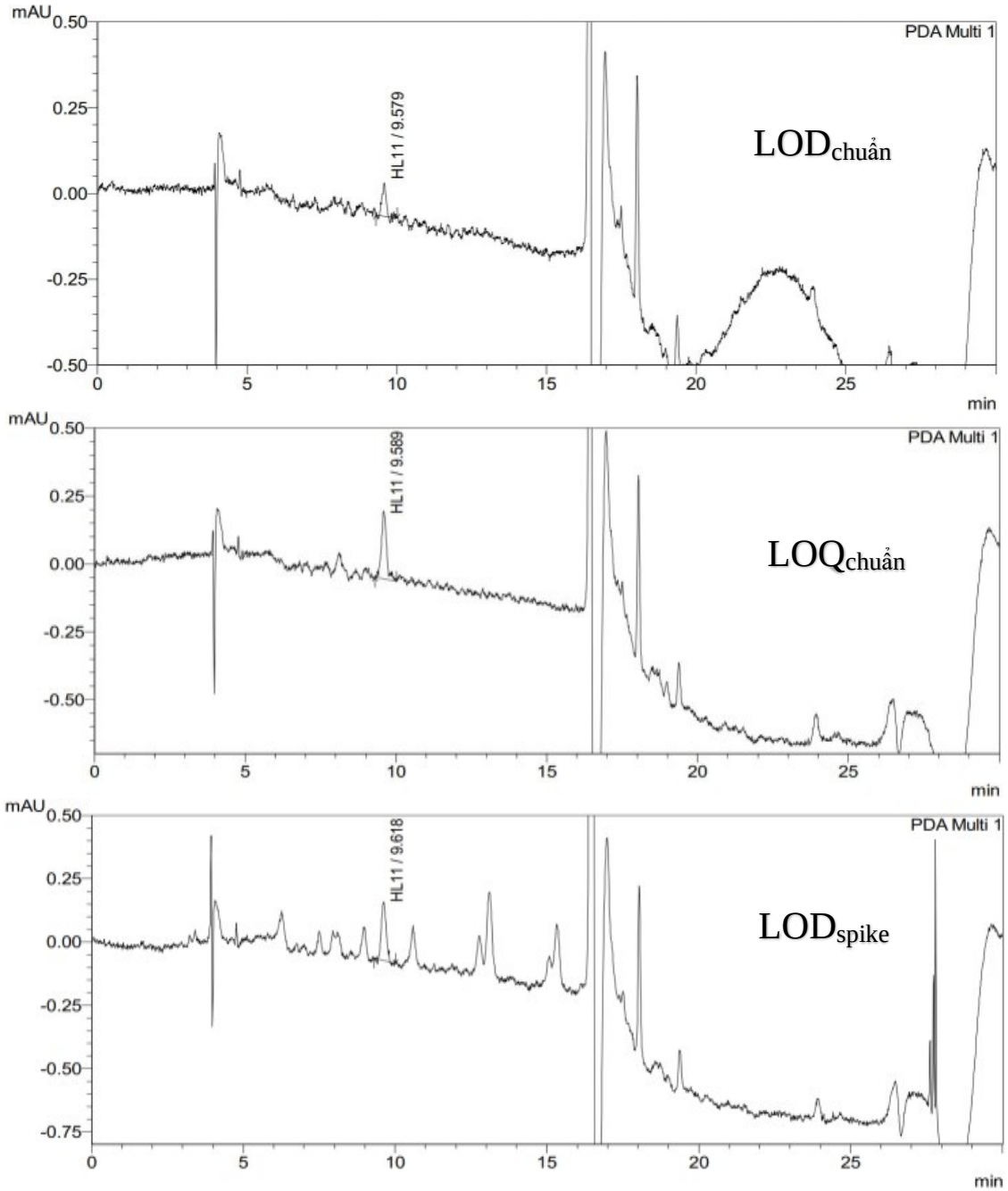
Bảng 3.13. Kết quả đánh giá độ đúng của phương pháp

$m_{dược\ liệu}$ (g)	$m_{chuẩn}$ (mg)	$S_{pic\ thử}$ (mAU.S)	$m_{ban\ đầu}$ (mg)	$m_{tìm\ lại}$ (mg)	% thu hồi	
2,5214	0,494	52765	0,467	0,948	98,8	**TB: 97,1 %** **RSD: 1,8 %**
2,5343	0,494	52016	0,469	0,935	97,2	
2,5476	0,494	51212	0,471	0,921	95,4	
5,0106	0,987	102842	0,927	1,849	96,6	**TB: 97,6 %** **RSD: 1,2 %**
5,0515	0,987	104125	0,935	1,872	97,4	
5,0233	0,987	105428	0,929	1,895	98,9	
10,1525	1,974	204543	1,879	3,677	95,4	**TB: 97,9 %** **RSD: 2,7 %**
10,2828	1,974	217024	1,903	3,901	100,6	
10,4262	1,974	212152	1,929	3,814	97,7	

Phương pháp đã xây dựng có độ tuyến tính từ 0,005 mg/ml đến 0,5 mg/ml; độ đúng đáp ứng yêu cầu từ 0,0375 mg/ml đến 0,15 mg/ml. Như vậy khoảng làm việc của phương pháp đã xây dựng là từ 0,0375 mg/ml đến 0,15 mg/ml.

3.3.6.6. Giới hạn định lượng của phương pháp

Để xác định giới hạn định lượng của phương pháp, trước tiên sẽ xác định giới hạn phát hiện của phương pháp.



Hình 3.52. Kết quả xác định giới hạn định lượng của phương pháp

Pha loãng dần dung dịch chuẩn được chuẩn bị ở phần đánh giá độ tuyến tính của phương pháp và tiêm vào hệ thống sắc ký. Đến nồng độ 0,2 µg/ml thì thu được pic chất 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1-β-D-glucopyranoside có đáp ứng pic gấp khoảng 3 lần độ nhiễu đường nền (Hình 3.52). Tiếp tục pha loãng gấp đôi dung dịch trên, tiêm vào hệ thống sắc ký. Sắc ký đồ của dung dịch này hầu như không xuất hiện đáp ứng pic tại vị

trí có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của pic hợp chất 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1-*β*-D-glucopyranoside. Như vậy, giới hạn phát hiện (LOD) của phương pháp đối với dung dịch chuẩn ở khoảng 0,2 µ/ml. Giới hạn định lượng (LOQ) của dung dịch chuẩn sẽ ở khoảng gấp 3,3 lần giới hạn phát hiện của dung dịch chuẩn, tương ứng với nồng độ 0,66 µg/ml.

Tiến hành pha loãng dung dịch chuẩn ở phần đánh giá độ tuyến tính của phương pháp để thu được dung dịch có nồng độ 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1-*β*-D-glucopyranoside khoảng 0,66 µg/ml, thu được dung dịch $LOQ_{chuẩn}$. Hút đồng lượng dung dịch chuẩn và thử, pha loãng đến nồng độ 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1-*β*-D-glucopyranoside khoảng 0,66 µg/ml, thu được dung dịch LOQ_{spike}. Tiêm các dung dịch trên vào hệ thống sắc ký, tiêm lặp lại 06 lần dung dịch LOQ_{spike}.

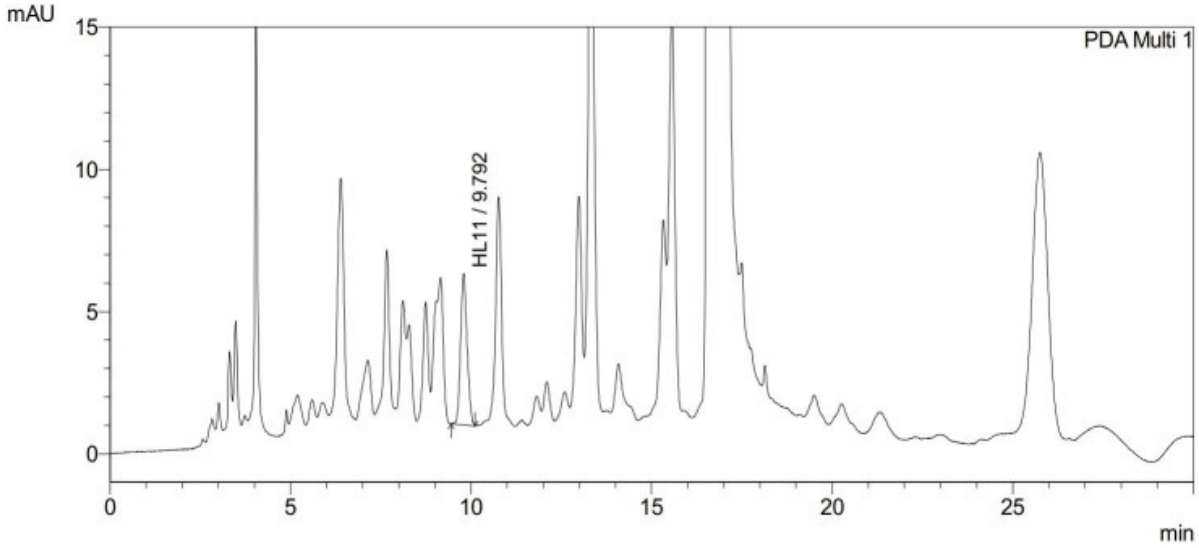
Kết quả thu được như sau: Pic 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1-*β*-D-glucopyranoside xuất hiện rõ ràng trên sắc ký đồ (Hình 3.52); độ lệch chuẩn tương đối diện tích pic hợp chất 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1-*β*-D-glucopyranoside trên sắc ký đồ dung dịch LOQ_{spike} là 3,8 (n = 6) (nhỏ hơn 7,3 % theo yêu cầu của AOAC). Như vậy, phương pháp đã xây dựng có giới hạn định lượng là khoảng 0,66 µg/ml đối với hợp chất 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1-*β*-D-glucopyranoside trong dược liệu Bàn tay ma đỏ.

3.3.7. Định lượng 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1-*β*-D-glucopyranoside trong cao chiết nước dược liệu Bàn tay ma đỏ

Áp dụng phương pháp định lượng 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1-*β*-D-glucopyranoside trong dược liệu Bàn tay ma đỏ đã xây dựng để định lượng hợp chất này trong cao chiết nước dược liệu Bàn tay ma đỏ.

+ Mẫu chuẩn: Chuẩn bị như trong phần định lượng 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1-*β*-D-glucopyranoside trong dược liệu Bàn tay ma đỏ, sử dụng dung dịch chuẩn ở phần đánh giá độ tuyến tính.

+ Mẫu thử: Mẫu cao chiết có độ ẩm 32 % được chuẩn bị ở phần thử tác dụng bảo vệ gan của dược liệu Bàn tay ma đỏ trên mô hình *in vivo*. Cân chính xác khoảng 0,5 g cao chiết, cho vào bình nón thích hợp, thêm 3 ml ethanol 50 %, siêu âm 30 phút. Hút dung dịch thu được vào bình định mức 10 ml. Lặp lại thêm 2 lần chiết, gom dịch chiết vào bình định mức 10 ml ban đầu. Làm vừa đủ bằng ethanol 50 %, lọc qua màng 0,45 µm thu được dung dịch thử.



Hình 3.53. Sắc ký đồ mẫu cao chiết nước dược liệu Bàn tay ma đỏ

Kết quả như sau:

+ Sắc ký đồ định lượng mẫu cao chiết dược liệu Bàn tay ma đỏ (Hình 3.43).

+ Kết quả xác định hàm lượng 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1-*β*-D glucopyranoside trong dược liệu Bàn tay ma đỏ (Bảng 3.14):

Bảng 3.14. Kết quả đánh giá độ lặp lại và độ chính xác trung gian

TT	**m_{cao} (g)**	**$S_{pic\ thử}$ (mAU.S)**	**Hàm lượng (%)**
1	0,5114	66414	0,137
2	0,5046	65700	0,138
3	0,5227	65212	0,132
		Trung bình (%)	**0,136**
		RSD (%)	**2,37**

Như vậy hàm lượng 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1-*β*-D glucopyranoside trong cao chiết nước là 0,136 % tính theo chế phẩm khan (độ ẩm cao chiết là 32 %).

Áp dụng phương pháp định lượng 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1-*β*-D-glucopyranoside (HL11) trong dược liệu để định lượng hợp chất này trong cao chiết nước, kết quả cho thấy pic chất HL11 vẫn tác khỏi pic chất tachiosid (HL10) và nền mẫu. Phương pháp vẫn đặc hiệu để định lượng hợp chất này trong cao chiết.

Phương pháp chiết nước truyền thống (sắc thuốc) cho hiệu suất chiết tính theo khối lượng cao và khối lượng dược liệu ban đầu là 4,0 %, độ ẩm dược liệu là 8,4 %. Do đó, hiệu suất chiết cao tương ứng tính theo lượng cao khan và dược liệu khô kiệt là khoảng 2,97 (%, kl/kl).

Hàm lượng 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1-*β*-D glucopyranoside trong mẫu dược liệu là 0,0202 % tính theo dạng dược liệu khô kiệt (hàm lượng đã được xác định từ phần đánh giá độ lặp lại của phương pháp, Mục 3.3.6.4), hàm lượng hợp chất này trong cao chiết là 0,136 % tính theo chế phẩm khan. Do đó, nếu tính theo hiệu suất chiết chất 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1-*β*-D glucopyranoside, khi chiết bằng phương pháp chiết nước truyền thống, hiệu suất đạt khoảng 20 % (xem công thức tính bên dưới).

$$\text{Hiệu suất (\%)} = \frac{2{,}97 \times 0{,}136}{1000 \times 0{,}0202} \times 100 = 20{,}0\ \%$$

Cao chiết nước dược liệu Bàn tay ma đỏ đã được chứng minh tác dụng bảo vệ gan và đang được nhân dân ta sử dụng để điều trị một số bệnh về gan. Hợp chất 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1-*β*-D glucopyranoside là hợp chất chính có khả năng bảo vệ gan tốt nhất được phân lập từ dược liệu. Sự xuất hiện của hợp chất này có trong cao chiết nước với hàm lượng khoảng 20,0 % hàm lượng trong dược liệu cũng như sự phù hợp của các hoạt tính của dược liệu này trên mô hình *in vitro* so với kết quả nghiên cứu của cao chiết nước trên mô hình in vivo là những minh chứng để khẳng định được đây chính là chất đánh dấu của dược liệu này.

Căn cứ vào hiệu suất chiết hoạt chất 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1-*β*-D glucopyranoside trong mẫu dược liệu theo phương pháp chiết nước truyền thống (sắc thuốc), có thể tính liều sử dụng cho hợp chất 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1-*β*-D glucopyranoside khi sử dụng độc lập. Ngoài ra, căn cứ trên hiệu suất chiết hợp chất 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1-*β*-D glucopyranoside, có thể điều chỉnh các điều kiện chiết xuất thích hợp để nâng cao hiệu quả chiết xuất.

CHƯƠNG 4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

4.1. Kết luận

Đây là công trình đầu tiên nghiên cứu song song về hai loài Bàn tay ma trồng tại Việt Nam nhằm xác định hợp chất có tác dụng bảo vệ gan của hai loài này bằng các phương pháp phân tích hóa lý, sinh học hiện đại. Từ đó xây dựng được phương pháp định tính và định lượng phù hợp giúp kiểm soát chất lượng dược liệu Bàn tay ma và các sản phẩm liên quan khi sử dụng trong nhân dân. Cụ thể, luận án thu được các kết quả chính như sau:

- Về thành phần hóa học của hai dược liệu: Đề tài lần đầu tiên phân lập được 10 hợp chất từ loài Bàn tay ma trắng *(H. terminalis)* và 14 hợp chất từ loài Bàn tay ma đỏ *(H. lobata)*. Trong đó, hai loài có hợp chất chung là 5,5'-(hexadecane-1,16-diyl)bis(benzene-1,3-diol). Đặc biệt, trong các hợp chất đã phân lập, từ mỗi loài đã tìm được 01 hợp chất mới, được đặt tên là helitermioside (phân lập từ loài loài *H. terminalis*) và helobatoside A phân lập từ loài *(H. lobata)*.

- Về tác dụng bảo vệ gan của hai loài Bàn tay ma: Nghiên cứu cũng lần đầu tiên đánh giá tác dụng bảo vệ gan song song cả hai loài trên mô hình *in vivo* và *in vitro*. Qua đó, đã chứng minh được cả cao chiết nước cũng như các chất đã phân lập từ loài Bàn tay ma trắng đều chưa thể hiện được tác dụng bảo vệ gan ở liều thí nghiệm, cao chiết nước dược liệu Bàn tay ma đỏ cho tác dụng bảo vệ gan tốt ở liều tương đương với liều 60 g và 120 g dược liệu cho người sử dụng trong ngày. Đồng thời từ các chất phân lập từ dược liệu này cũng sàng lọc ra được hợp chất 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1-*β*-D-glucopyranoside **(HL11)** được phân lập từ loài Bàn tay ma đỏ là hợp chất chính và có tác dụng bảo vệ tế bào gan, chống viêm, chống oxy hóa. Tiếp đó, nghiên cứu này cũng đã chứng minh được cao chiết nước loài Bàn tay ma đỏ và một số hợp chất phân lập từ pha nước dược liệu này có độ an toàn tương đối cao. Kết quả này cung cấp minh chứng khoa học về tác dụng bảo vệ gan của hai loài Bàn tay ma được sử dụng tại Việt Nam, góp phần giúp các thầy thuốc và người dân sử dụng hai loài hiệu quả, đúng mục đích hơn.

- Xây dựng phương pháp định tính và định lượng chất đánh dấu có tác dụng bảo vệ gan: Từ tác dụng bảo vệ gan của hai loài cũng như các thành phần hóa học đã phân lập được, nghiên cứu này đã sàng lọc được hợp chất 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1-*β*-D-glucopyranoside để sử dụng làm chất đánh dấu có tác dụng bảo vệ gan của loài Bàn

tay ma đỏ. Từ đó, đã xây dựng được phương pháp định tính và định lượng hợp chất **HL11** trong dược liệu Bàn tay ma đỏ bằng phương pháp HPLC detector DAD. Phương pháp định tính đã đáp ứng tất cả các yêu cầu theo hướng dẫn của ICH và AOAC international. Áp dụng phương pháp để kiểm tra hàm lượng **HL11** trong dược liệu Bàn tay ma đỏ và trong cao chiết nước của dược liệu Bàn tay ma đỏ, kết quả cho thấy trong dược liệu chứa khoảng 0,02 % và trong cao chiết chứa khoảng 0,136 % lượng **HL11** tính theo chế phẩm khan. Theo đó, phương pháp chiết nước sôi (sắc thuốc) truyền thống đạt khoảng 20 % nếu tính theo hiệu suất chiết **HL11** từ dược liệu Bàn tay ma đỏ. Qua đây, nghiên cứu đã cung cấp thêm công cụ hữu hiệu cho công tác kiểm soát chất lượng của dược liệu Bàn tây ma cũng như các sản phẩm liên quan khi lưu hành trên thị trường.

4.2. Kiến nghị

- Kết quả luận án đã đưa ra các minh chứng khoa học chứng minh dược liệu Bàn tay ma trắng chưa thể hiện tác dụng bảo vệ gan, trong khi dược liệu Bàn tay ma đỏ thể hiện tác dụng bảo vệ gan tương đối tốt cả trên mô hình *in vivo* và *in vitro*. Do đó cần lưu ý phân biệt hai dược liệu này khi sử dụng.

-Tiếp tục xây dựng tiêu chuẩn cơ sở cho dược liệu, cao chiết và thiết lập chất chuẩn 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1-*β*-D-glucopyranosid để sử dụng cho kiểm soát chất lượng dược liệu Bàn tay ma đỏ.

- Dược liệu Bàn tay ma đỏ có tác dụng bảo vệ gan, hợp chất 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1-*β*-D-glucopyranoside rất đặc trưng cho các tác dụng bảo vệ gan cũng như tác dụng không mong muốn của dược liệu này. Cần tiếp tục nghiên cứu về độc tính của dược liệu Bàn tay ma đỏ và hợp chất 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1-*β*-D-glucopyranoside để ứng dụng trong điều trị.

- Tiếp tục nghiên cứu phương án sử dụng hợp chất 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1-*β*-D-glucopyranoside thay thế dược liệu Bàn tay ma đỏ.

- Nghiên cứu các phương pháp chiết cho hiệu quả điều trị và hiệu quả kinh tế cao hơn dựa trên chất đánh dấu 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1-*β*-D-glucopyranoside. Chú ý cần đánh giá độc tính và điều chỉnh liều phù hợp khi thay đổi phương pháp chiết vì trong dược liệu này có một số chất gây độc.

DANH MỤC CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. Phan Minh Giang, Do Thi Thao, Nguyen Thi Nga, Bui Van Trung, Duong Hong Anh, and Pham Hung Viet. Evaluation of the antioxidant, hepatoprotective, and anti-inflammatory activities of bisresorcinol isolated from trunk of *Heliciopsis terminalis*. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, **2019**, 52(7).

2. Bui Van Trung, Do Thi Thao, Duong Hong Anh, Phan Van Kiem, and Pham Hung Viet. Antioxidant and Hepatoprotective Activity of Phenyl Glycosides Isolated From *Heliciopsis lobata*. *Natural Product Communications*, **2020**, 15(8): 1-7.

3. Bui Van Trung, Nguyen Thu Hang, Duong Hong Anh, Pham Hung Viet. Evaluation of the Hepatoprotective Activity of the Wood of Heliciopsis lobata (Merr.) Sleumer. *VNU Journal of Science: Medical and Pharmaceutical Sciences*, **2022**, 38(4), Doi: https://doi.org/10.25073/2588-1132/vnumps.4448.

4. Bui Van Trung, Duong Hong Anh, Pham Hung Viet, Phan Van Kiem. Hepatoprotective and Antioxidant Activities of Phenolic Compounds from *Heliciopsis terminalis*. *Natural Product Communications*, **2023**, 18(5): 1-4.

5. Bùi Văn Trung, Hà Thị Thuy Thủy, Duong Hồng Anh, Phạm Hùng Việt. Xây dựng qui trình định tính và định lượng 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1-*β*-D-glucopyranoside từ dược liệu Bàn tay ma đỏ (Heliciopsis lobata). *Tạp chí Kiểm nghiệm thuốc*, **2023**, 21(80): 21-27.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Đỗ Tất Lợi, *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, Hà Nội, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, 1991.
2. Võ Văn Chi, *Từ điển cây thuốc Việt Nam*, Hà Nội, Nhà xuất bản Y học, 2012.
3. Đỗ Huy Bích và cộng sự, *Cây thuốc và Động vật làm thuốc ở Việt Nam*, Hà Nội, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, 2011.
4. Phạm Hùng Việt và cộng sự, *Hỗn hợp chứa cao chiết của các cây bàn tay ma (Heliciopsis terminalis (Kurs) Sleumer (Proteaceae)), giảo cổ lam (Gynostemma pentaphyllum (Thunb.) Makino (Cucurbitaceae)), và cà gai leo (Solanum procumbens Lour. (Solanaceae), thuốc bảo vệ gan và lợi mật, và thực phẩm bảo vệ sức khỏe chứa hỗn hợp này*, Việt Nam, VN 1-2018-04560, 2018.
5. Phạm Tuấn Anh, *Nghiên cứu thành phần hóa học và một số tác dụng sinh học của 3 loài thuốc chi Gynostemma Blume ở Việt Nam*, Luận án tiến sĩ, Trường đại học Dược Hà Nội, 2011.
6. Pham Thanh Ky, et al., *Dammarane-type saponin from Gynostemma pentaphyllum*, Phytochemistry, 2010, 71(7-8), 994-1001,
7. Thân Kiều My và cộng sự, *Nghiên cứu tác dụng bảo vệ gan, chống oxy hó của saponin chiết xuất từ Giảo cổ lam*, Tạp chí Dược học, 2014, Số 4 năm 54, 45-8,
8. Trương Thị Thu Hiền và cộng sự, *Đánh giá tác dụng bảo vệ gan của cây Cà gai leo (Solanum procumbens Lour.) trên mô hình gây tổn thương gan bằng paracetamol ở chuột nhắt trắng*, Tạp chí Y - Dược học quân sự, 2018, 6-2018, 14-21,
9. Hoàng Thị Quyên, *Nghiên cứu đặc điểm thực vật, thành phần hóa học và điều tra tri thức sử dụng của cây Bàn tay ma tại Bắc Kạn*, Khóa luận tốt nghiệp dược sĩ, Trường Đại học Dược Hà Nội, 2017.
10. Nguyễn Thị Phương Lan, *Nghiên cứu thành phần hóa học của lá cây Bàn tay ma Heliciopsis lobata (Merr.) Sleum họ Proteaceae ở Cao Bằng*, Luận văn thạc sĩ, Trường Đại học Thái Nguyên, 2010.
11. M. Liu, et al, *A new phenolic glucoside from the leaves of Heliciopsis lobata*, Fitoterapia, 2008, 79(5), 398-9, 10.1016/j.fitote.2008.03.006.

12. D. Li, et al., *Studies on chemical constituents of Heliciopsis lobata II*, China journal of Chinese materia medica, 2008, 33(4), 409-11,

13. M. Liu, et al, *A new arbutin derivative from the leaves of Heliciopsis lobata*, Natural product research, 2010, 24(19), 1861-4, 10.1080/14786419.2010.482938.

14. Q. Q. He, et al, *Phenolic glycosides from leaves of Hopiciopsis lobata*, Journal of Asian natural products research, 2006, 8, 373-7, 10.1080/10286020500172251.

15. W. Y. Qi, et al., *New arbutin derivatives from the leaves of Heliciopsis lobata with cytotoxicity*, Chinese journal of natural medicines, 2016, 14(10), 789-93, 10.1016/s1875-5364(16)30094-2.

16. B. Ryu, et al., *Heliciopsides A-E, Unusual Macrocyclic and Phenolic Glycosides from the Leaves of Heliciopsis terminalis and Their Stimulation of Glucose Uptake*, 2022, 15(11), 10.3390/ph15111315.

17. Phạm Hùng Việt và cộng sự, *Báo cáo đề tài: Nghiên cứu đánh giá và phát triển một số bài thuốc dân gian có tác dụng điều trị bệnh gan, mật của các dân tộc vùng Tây Bắc.* Trường Đại học Khoa học tự nhiên - Đại học Quốc Gia Hà Nội, 2018, Mã số KHCN-TB.11C/13-18

18. Bùi Văn Trung và cộng sự, *Tác dụng bảo vệ gan và lợi mật của bài thuốc dân gian "Bàn tay ma" thuộc tỉnh Bắc Kạn*, Tạp chí Dược liệu, 2018, 23(2),

19. Nguyễn Tiến Bân, *Cẩm nang tra cứu và nhận biết các họ thực vật hạt kín ở Việt Nam*, Nhà xuất bản Nông nghiệp1997, 54.

20. P. H. Weston, *Flowering Plants. Eudicots: Berberidopsidales, Buxales, Crossosomatales, Fabales p.p., Geraniales, Gunnerales, Myrtales p.p., Proteales, Saxifragales, Vitales, Zygophyllales, Clusiaceae Alliance, Passifloraceae Alliance, Dilleniaceae, Huaceae, Picramniaceae, Sabiaceae*, Heidelberg, Springer Berlin, Heidelberg, 2007, 2007//, 364-404 p.

21. P. Westonand, N. Barker, *A new suprageneric classification of the Proteaceae, with an annotated checklist of genera*, Telopea, 2006, 11, 10.7751/telopea20065733.

22. A. E. Orchard, *Flora of Australia*, CSIRO Publishing, 1995, 16.

23. Q. Huaxing, P. H. Weston, *Protaceae*, *Flora of China 5*, St. Louis, Science Press, Beijing & Missouri Botanical Garden Press, 2003, 1992-1999.

24. Mike Pole, *The Proteaceae record in New Zealand*, Australian Systematic Botany, 1998, 11, 10.1071/SB97019.

25. TT Nghiên cứu Tài nguyên và Môi trường - ĐHQG Hà Nội, Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật - Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam, *Heliciopsis lobata (Merr.) Sleum, Danh lục các loài thực vật Việt Nam*, Nhà xuất bản Nông Nghiệp, 2005, 14.

26. M. Watt, J. Evans, *Proteoid Roots. Physiology and Development*, Plant physiology, 1999, 121, 317-24, 10.1104/pp.121.2.317.

27. Royal Botanic Gardens, *Heliciopsis lobata (Merr.) Sleumer*, 1955, https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:704529-1.

28. P. Crous, et al, *Cultivation and Diseases of Proteaceae: Leucadendron, Leucospermum and Protea*, Utrecht, The Netherlands, CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, 2013, 01/01.

29. Đàm Văn Vinh và cộng sự, *Tri thức bản địa sử dụng cây thuốc của cộng đồng dân tộc thiểu số tại xã Đức Thông, huyện Thạch An, tỉnh Cao Bằng*, Tạp chí Khoa học và Công nghệ Lâm nghiệp, 2020, 1, 103-12,

30. Nguyễn Viết Thân, *Cây thuốc Việt Nam và những bài thuốc thường dùng*, Hà Nội, Nhà xuất bản Y học, 2021.

31. C. Li, et al., *Antioxidant and Inflammatory Effects of Nelumbo nucifera Gaertn. Leaves*, Oxidative medicine and cellular longevity, 2021, ID 8375961, 10.1155/2021/8375961.

32. C. Y. Wu, T. Z. Hsu, *Heliciopsis terminalis (Kurz) Sleumer, Blumea. 8: 80. 1955.*, 2022, http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=2&taxon_id=200006460.

33. Phạm Hoàng Hộ, *Cây cỏ Việt Nam*, Hà Nội, Nhà xuất bản trẻ, 2002, 14-17.

34. Royal Botanic Gardens, *Heliciopsis terminalis (Kurz) Sleumer*, 1955, https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:704532-1.

35. Viện Dược liệu, *Danh lục cây thuốc Việt Nam*, Hà Nội, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, 2016.

36. Jia Shan Long Yan Shu, *Heliciopsis Sleumer, Blumea. 8: 79. 1955*, 2022, http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=2&taxon_id=114878.

37. K. C. Ong, H. Khoo, *Biological effects of myricetin*, General Pharmacology: The Vascular System, 1997, 29(2), 121-6, 10.1016/S0306-3623(96)00421-1.

38. M. K. Buening, et al, *Activation and inhibition of benzo(a)pyrene and aflatoxin B1 metabolism in human liver microsomes by naturally occurring flavonoids*, Cancer research, 1981, 41(1), 67-72,

39. R. P. Deutsch-Wenzel, et al., *Experimental studies in rat lungs on the carcinogenicity and dose-response relationships of eight frequently occurring environmental polycyclic aromatic hydrocarbons*, Journal of the National Cancer Institute, 1983, 71(3), 539-44,

40. K. Ono, H. Nakane, *Mechanisms of inhibition of various cellular DNA and RNA polymerases by several flavonoids*, Journal of biochemistry, 1990, 108(4), 609-13, 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a123251.

41. K. Ono, et al., *Differential inhibitory effects of various flavonoids on the activities of reverse transcriptase and cellular DNA and RNA polymerases*, European journal of biochemistry, 1990, 190(3), 469-76, 10.1111/j.1432-1033.1990.tb15597.x.

42. A. B. Santhakumar, A. C. Bulmer, I. Singh, *A review of the mechanisms and effectiveness of dietary polyphenols in reducing oxidative stress and thrombotic risk*, Journal of human nutrition and dietetics : the official journal of the British Dietetic Association, 2014, 27(1), 1-21, 10.1111/jhn.12177.

43. S. M. Wedworth, S. Lynch, *Dietary flavonoids in atherosclerosis prevention*, The Annals of pharmacotherapy, 1995, 29(6), 627-8, 10.1177/106002809502900614.

44. J. A. Berliner, et al., *Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics*, Circulation, 1995, 91(9), 2488-96, 10.1161/01.cir.91.9.2488.

45. Y. Li, Y. Ding, *Minireview: Therapeutic potential of myricetin in diabetes mellitus*, Food Science and Human Wellness, 2012, 1(1), 19-25, 10.1016/j.fshw.2012.08.002.

46. K. Zhang, et al., *Myricetin attenuated MPP(+)-induced cytotoxicity by anti-oxidation and inhibition of MKK4 and JNK activation in MES23.5 cells*, Neuropharmacology, 2011, 61(1-2), 329-35, 10.1016/j.neuropharm.2011.04.021.

47. Z. Cai, et al., *Myricitrin alleviates MPP^+-induced mitochondrial dysfunction in a DJ-1-dependent manner in SN4741 cells*, Biochemical and biophysical research communications, 2015, 458(2), 227-33, 10.1016/j.bbrc.2015.01.060.

48. A. Blann, *What is the purpose of liver function tests?*, Nursing times, 2014, 110(6), 17-9,

49. V. Racanelli, B. Rehermann, *The liver as an immunological organ*, Hepatology (Baltimore, Md), 2006, 43(2 Suppl 1), S54-62, 10.1002/hep.21060.

50. N. K. Jain, A. K. Singhai, *Ameliorative effects of Spinacia oleracea L. seeds on carbon tetrachloride (CCl4) – induced hepatotoxicity: in vitro and in vivo studies*, Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 2012, 2(1, Supplement), S232-S7, 10.1016/S2221-1691(12)60166-X.

51. A. Pareek, et al., *Antioxidant and hepatoprotective activity of Fagonia schweinfurthii (Hadidi) Hadidi extract in carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in HepG2 cell line and rats*, Journal of ethnopharmacology, 2013, 150(3), 973-81, 10.1016/j.jep.2013.09.048.

52. V. N. Sumantran, *Cellular chemosensitivity assays: an overview*, Methods in molecular biology (Clifton, NJ), 2011, 731, 219-36, 10.1007/978-1-61779-080-5_19.

53. E. Alsayed, M Tolba, M. Karonen, *Antioxidant and Hepatoprotective Activities of Flavonoids from Bauhinia hookeri*, Records of Natural Products, 2016, 10, 812-7,

54. L. T. González, et al., *In vitro assessment of hepatoprotective agents against damage induced by acetaminophen and CCl(4)*, BMC complementary and alternative medicine, 2017, 17(1), 39, 10.1186/s12906-016-1506-1.

55. G. Shabir, et al., *Antioxidant and Antimicrobial Attributes and Phenolics of Different Solvent Extracts from Leaves, Flowers and Bark of Gold Mohar [Delonix regia (Bojer ex Hook.) Raf.]*, 2011, 16(9), 7302-19,

56. J. A. Badmus, et al., *Lipid peroxidation inhibition and antiradical activities of some leaf fractions of Mangifera indica*, Acta poloniae pharmaceutica, 2011, 68(1), 23-9,

57. J. A. D. De Leon, C. R. Borges, *Evaluation of Oxidative Stress in Biological Samples Using the Thiobarbituric Acid Reactive Substances Assay*, Journal of visualized experiments : JoVE, 2020, (159), 10.3791/61122.

58. H. F. Wang, Y. K. Wang, K. H. Yih, *DPPH free-radical scavenging ability, total phenolic content, and chemical composition analysis of forty-five kinds of essential oils*, Journal of cosmetic science, 2008, 59(6), 509-22,

59. J. Nishida, J. Kawabata, *DPPH radical scavenging reaction of hydroxy- and methoxychalcones*, Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 2006, 70(1), 193-202, 10.1271/bbb.70.193.

60. M. Song, et al, *MKL1 is an epigenetic mediator of TNF-α-induced proinflammatory transcription in macrophages by interacting with ASH2*, FEBS letters, 2017, 591(6), 934-45, 10.1002/1873-3468.12601.

61. R. Medzhitov, *Origin and physiological roles of inflammation*, Nature, 2008, 454(7203), 428-35, 10.1038/nature07201.

62. J. S. Pober, W. C. Sessa, *Evolving functions of endothelial cells in inflammation*, Nature Reviews Immunology, 2007, 7(10), 803-15, 10.1038/nri2171.

63. C. Nathan, *Neutrophils and immunity: challenges and opportunities*, Nature reviews Immunology, 2006, 6(3), 173-82, 10.1038/nri1785.

64. C. Nathan, *Points of control in inflammation*, Nature, 2002, 420(6917), 846-52, 10.1038/nature01320.

65. W. E. Naugler, M. Karin, *The wolf in sheep's clothing: the role of interleukin-6 in immunity, inflammation and cancer*, Trends in molecular medicine, 2008, 14(3), 109-19, 10.1016/j.molmed.2007.12.007.

66. W. Ouyang, et al., *Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease*, Annual review of immunology, 2011, 29, 71-109, 10.1146/annurev-immunol-031210-101312.

67. N. Navaei-Alipour, et al., *The effects of honey on pro- and anti-inflammatory cytokines: A narrative review*, Phytotherapy research : PTR, 2021, 35(7), 3690-701, 10.1002/ptr.7066.

68. A. Mosca, et al., *Antioxidant activity of Hydroxytyrosol and Vitamin E reduces systemic inflammation in children with paediatric NAFLD*, Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver, 2021, 53(9), 1154-8, 10.1016/j.dld.2020.09.021.

69. W. Jiang, et at., *Effects of mild moxibustion intervention on serum and liver amyloid-A protein, serum IL-6, TNF-alpha and IL-10 contents in atherosclerosis rabbits*, Acupuncture research, 2014, 39(1), 63-7,

70. P. Tripathi, et al., *The role of nitric oxide in inflammatory reactions*, FEMS immunology and medical microbiology, 2007, 51(3), 443-52, 10.1111/j.1574-695X.2007.00329.x.

71. P. Tripathi, *Nitric oxide and immune response*, Indian journal of biochemistry & biophysics, 2007, 44(5), 310-9,

72. T. J. Guzik, R. Korbut, T. Adamek-Guzik, *Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation*, Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society, 2003, 54(4), 469-87,

73. J. W. Coleman, *Nitric oxide in immunity and inflammation*, International immunopharmacology, 2001, 1(8), 1397-406, 10.1016/s1567-5769(01)00086-8.

74. H. Liao, et al., *Effect of honghua (Flos Carthami) on nitric oxide production in RAW 264.7 cells and alpha-glucosidase activity*, Journal of traditional Chinese medicine, 2014, 34(3), 362-8, 10.1016/s0254-6272(14)60103-5.

75. S. Cheenpracha, et al., *Inhibition of nitric oxide (NO) production in lipopolysaccharide (LPS)-activated murine macrophage RAW 264.7 cells by the norsesterterpene peroxide, epimuqubilin A*, Marine drugs, 2010, 8(3), 429-37, 10.3390/md8030429.

76. F. M. S. Oliveira, et al., *Nitric oxide contributes to liver inflammation and parasitic burden control in Ascaris suum infection*, Experimental parasitology, 2022, 238, 108267, 10.1016/j.exppara.2022.108267.

77. X. Zhang, et al., *Nitric oxide inhibits autophagy and promotes apoptosis in hepatocellular carcinoma*, Cancer science, 2019, 110(3), 1054-63, 10.1111/cas.13945.

78. B. D. Hiraganahalli, et al., *Hepatoprotective and antioxidant activity of standardized herbal extracts*, Pharmacognosy magazine, 2012, 8(30), 116-23, 10.4103/0973-1296.96553.

79. X. Meng, et al., *Antioxidant activity and hepatoprotective effect of 10 medicinal herbs on CCl(4)-induced liver injury in mice*, World journal of gastroenterology, 2020, 26(37), 5629-45, 10.3748/wjg.v26.i37.5629.

80. K. G. Singhal, G. D. Gupta, *Hepatoprotective and antioxidant activity of methanolic extract of flowers of Nerium oleander against CCl4-induced liver injury in rats*,

Asian Pacific journal of tropical medicine, 2012, 5(9), 677-85, 10.1016/s1995-7645(12)60106-0.

81. K. Lahon, S. Das, *Hepatoprotective activity of Ocimum sanctum alcoholic leaf extract against paracetamol-induced liver damage in Albino rats*, Pharmacognosy research, 2011, 3(1), 13-8, 10.4103/0974-8490.79110.
82. N. T. Selvam, et al., *Hepatoprotective activity of methanolic extract of Syzygium jambos (Linn.) leaf against paracetamol intoxicated Wistar albino rats*, Ayu, 2013, 34(3), 305-8, 10.4103/0974-8520.123133.
83. U. Sharma, D. Pal, R. Prasad, *Alkaline Phosphatase: An Overview*, Indian Journal of Clinical Biochemistry, 2014, 29(3), 269-78, 10.1007/s12291-013-0408-y.
84. K. D. Ayenew, Y. Wasihun, *Hepatoprotective effect of methanol extract of Agave americana leaves on paracetamol induced hepatotoxicity in Wistar albino rats*, BMC complementary medicine and therapies, 2023, 23(1), 99, 10.1186/s12906-023-03931-y.
85. S. Gowda, et al., *A review on laboratory liver function tests*, The Pan African medical journal, 2009, 3, 17,
86. N. Yazigi, W. F. Balistreri. Bilirubin. In: Fernandes J, Saudubray J-M, Van den Berghe G, Tada K, Buist NRM, editors. Inborn Metabolic Diseases: Diagnosis and Treatment. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1995. p. 349-57.
87. H. Lin, et al., *The application value of mean red blood cell volume and red blood cell volume distribution width combined with total serum bilirubin in the early screening of neonatal hemolytic disease*, BMC Pediatrics, 2023, 23(1), 19, 10.1186/s12887-022-03812-2.
88. E. Lang, et al., *Conjugated bilirubin triggers anemia by inducing erythrocyte death*, Hepatology (Baltimore, Md), 2015, 61(1), 275-84, 10.1002/hep.27338.
89. M. Janičko, et al., *Serum cholesterol is a significant and independent mortality predictor in liver cirrhosis patients*, Annals of Hepatology, 2013, 12(4), 413-9, https://doi.org/10.1016/S1665-2681(19)31342-0.
90. A. Monks, et al., *Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines*, Journal of the National Cancer Institute, 1991, 83(11), 757-66, 10.1093/jnci/83.11.757.

91. Cục Khoa học Công nghệ và Đào tạo - Bộ Y tế, Quyết định Số 141/QĐ-K2ĐT ngày 27/10/2015 về việc ban hành tài liệu chuyên môn "Thử nghiệm tiền lâm sàng và lâm sàng thuốc đông y, thuốc từ dược liệu", Hà Nội 2015.

92. World Health Organization, *WHO guidelines on good agricultural and collection practices (GACP) for medicinal plants* Geneva, 2003, https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/42783/9241546271.pdf;jsessionid=CE038712BF5BB2720FC60C6112BAE21E?sequence=1.

93. World Health Organization, *WHO guidelines on good manufacturing practices (GMP) for herbal medicines* Geneva, 2007, https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/43672/9789241547161_eng.pdf?sequence=1.

94. World Health Organization, *WHO guidelines for selecting marker substances of herbal origin for quality control of herbal medicines*, 2017, https://www.who.int/docs/default-source/medicines/norms-and-standards/guidelines/quality-control/trs1003-annex1-marker-substances-herbal-medicine-quality-control.pdf?sfvrsn=f4ac0cca_0.

95. European Medicines Agency, *Guideline on quality of herbal medicinal products/traditional herbal medicinal products*, 2022, https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/final-guideline-quality-herbal-medicinal-products/traditional-herbal-medicinal-products-revision-3_en.pdf.

96. European Medicines Agency, *Guideline on specifications: test procedures and acceptance criteria for herbal substances, herbal preparations and herbal medicinal products/traditional herbal medicinal products* 2011, https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-specifications-test-procedures-acceptance-criteria-herbal-substances-herbal-preparations_en.pdf.

97. J. P. Hughes, et al., *Principles of early drug discovery*, British journal of pharmacology, 2011, 162(6), 1239-49, 10.1111/j.1476-5381.2010.01127.x.

98. Hội đồng Dược điển Việt Nam - Bộ Y tế, *Dược điển Việt Nam V*, Hà Nội, Nhà xuất bản Y học, 2017.

99. World Health Organization, *Quality control methods for herbal materials* Geneva, 2011, https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44479/9789241500739_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y.

100. European Medicines Agency, *Reflection paper on markers used for quantitative and qualitative analysis of herbal medicinal products and traditional herbal medicinal products*, 2008, https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/reflection-paper-markers-used-quantitative-qualitative-analysis-herbal-medicinal-products_en.pdf.

101. British Pharmacopoeia Commission, *British Pharmacopoeia*, London2021.

102. United State Pharmacopoeia Commission, *The United State Pharmacopoeia 44 and National Formulary 38*, 2021.

103. Chinese Pharmacopoeia Commission, *Pharmacopoeia of The People's Republic of China*, London, China Medical Science Press, 2015.

104. S. Li, et al., *Chemical markers for the quality control of herbal medicines: an overview*, Chinese medicine, 2008, 3, 7, 10.1186/1749-8546-3-7.

105. L. Voutquenne-Nazabadioko, et al., *Triterpenoid saponins from the roots of Gypsophila trichotoma Wender*, Phytochemistry, 2013, 90, 114-27, 10.1016/j.phytochem.2013.03.001.

106. L.Yan, et al., *Two New Macrocyclic Compounds from the Stems of Clematis armandii*, Heterocycles, 2006, 68, 10.3987/COM-06-10787.

107. P. Cao, et al., *Angelica sinensis polysaccharide protects against acetaminophen-induced acute liver injury and cell death by suppressing oxidative stress and hepatic apoptosis in vivo and in vitro*, International journal of biological macromolecules, 2018, 111, 1133-9, 10.1016/j.ijbiomac.2018.01.139.

108. D. Ezhilarasan, S. Raghunandhakumar, *Boldine treatment protects acetaminophen-induced liver inflammation and acute hepatic necrosis in mice*, Journal of biochemical and molecular toxicology, 2021, 35(4), e22697, 10.1002/jbt.22697.

109. Z. Papackova, et al., *Silymarin prevents acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice*, PloS one, 2018, 13(1), e0191353, 10.1371/journal.pone.0191353.

110. Cục Khoa học Công nghệ và Đào tạo - Bộ Y tế, Quyết định số 141/QĐ-K2ĐT ngày 27/10/2015: "Thử nghiệm tiền lâm sàng và lâm sàng thuốc đông y, thuốc từ dược liệu", Hà Nội 2015.

111. N. Akther, et al., *Hepatoprotective activity of Marrubium vulgare against paracetamol induced toxicity*, Journal of Pharmacy Research, 2013, 7(7), 565-70, https://doi.org/10.1016/j.jopr.2013.06.023.

112. Wasowicz W, Nève J, Peretz A, *Optimized steps in fluorometric determination of thiobarbituric acid-reactive substances in serum: importance of extraction pH and influence of sample preservation and storage*, Clinical chemistry, 1993, 39(12), 2522-6,

113. Balahoroğlu R, Dülger H, Özbek H, Bayram I, Şekeroğlu M, *Protective Effects Of Antioxidants On The Experimental Liver And Kidney Toxicity In Mice*, European Journal of General Medicine (ISSN: 1304-3897) Vol 5 Num 3, 2008, 5, 10.29333/ejgm/82598.

114. S. Saito, J. Kawabata, *Effects of electron-withdrawing substituents on DPPH radical scavenging reactions of protocatechuic acid and its analogues in alcoholic solvents*, Tetrahedron, 2005, 61, 8101-8, 10.1016/j.tet.2005.06.040.

115. K. Pyrzynska, Pękal A, *Application of free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) to estimate antioxidant capacity of food samples*, Anal Methods, 2013, 5, 10.1039/C3AY40367J.

116. N. Zhu, et al., *Antioxidative flavonoid glycosides from Quinoa seeds (Chenopodium quinoa wild)* Journal of Food Lipids, 2001, 8(1), 37-44, 10.1111/j.1745-4522.2001.tb00182.x.

117. N. R.Bernardes, et al., *Nitric oxide production, inhibitory, antioxidant and antimycobacterial activities of the fruits extract and flavonoid content of Schinus terebinthifolius*, Revista Brasileira de Farmacognosia, 2014, 24(6), 644-50, https://doi.org/10.1016/j.bjp.2014.10.012.

118. Đỗ Trung Đàm, *Phương pháp xác định độc tính cấp của thuốc*, Hà Nội, Nhà xuất bản Y học, 2014.

119. AOAC International, *Guidelines for Standard Method Performance Requirements*, 2016, http://www.eoma.aoac.org/app_f.pdf.

120. European Medicines Agency, *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1)*, 1996, https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-2-r1-validation-analytical-procedures-text-methodology-step-5_en.pdf.

121. A. Fürstner, G. Seidel, *Shortcut Syntheses of Naturally Occurring 5-Alkylresorcinols with DNA-Cleaving Properties*, The Journal of Organic Chemistry, 1997, 62(8), 2332-6, 10.1021/jo962423i.

122. C. Wei-Shin, et al., *Die Struktur des Hypocrellins und seines Photooxidationsproduktes Peroxyhypocrellin*, 1981, 1981(10), 1880-5,

123. H. Otsuka, et al., *Phenolic compounds from Coix lachryma-jobi var. Ma-yuen*, Phytochemistry, 1989, 28(3), 883-6, 10.1016/0031-9422(89)80136-0.

124. M. Gan, et al., *Glycosides from the root of Iodes cirrhosa*, Journal of natural products, 2008, 71(4), 647-54, 10.1021/np7007329.

125. M. A. Ouyang, Y. H. Kuo, *Water-soluble constituents from aerial roots of Ficus microcarpa*, Journal of Asian natural products research, 2006, 8(7), 625-30, 10.1080/10286020500208576.

126. H. G. Jin, et al., *A new megastigmane glycoside from Akebia quinata*, Archives of pharmacal research, 2015, 38(5), 591-7, 10.1007/s12272-014-0357-x.

127. K. Yoshikawa, N. Mimura, S. Arihara, *Isolation and absolute structures of enantiomeric 1,2-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,3-propanediol 1-O-glucosides from the bark of Hovenia trichocarpa*, Journal of natural products, 1998, 61(9), 1137-9, 10.1021/np980003d.

128. S. Bao, et al, *Rhyncosides A—F, Phenolic Constituents from the Chinese Mangrove Plant Bruguiera sexangula var. rhynchopetala*, Chemical & pharmaceutical bulletin, 2007, 55, 1175-80, 10.1248/cpb.55.1175.

129. E. Hiltunen, T. Pakkanen, L. Alvila, *Phenolic extractives from wood of birch (Betula pendula)*, Holzforschung, 2004, 58, 326, 10.1515/HF.2004.050.

130. N. Matsuda, et al., *Isolation and Absolute Structures of the Neolignan Glycosides with the Enantimetric Aglycones from the Leaves of Viburnum awabuki K. KOCH*, Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 1996, 44(5), 1122-3, 10.1248/cpb.44.1122.

131. R. A. Barrow, *Alkyl and alkenyl resorcinols from an Australian marine sponge, Haliclona sp. (Haplosclerida : Haliclonidae)*, Aust J Chem, 1991, 44, 1393-405,

132. T. H. Chuang, P. L. Wu, *Cytotoxic 5-alkylresorcinol metabolites from the leaves of Grevillea robusta*, Journal of natural products, 2007, 70(2), 319-23, 10.1021/np0605687.

133. V. S. P. Chaturvedula, et al., *New Cytotoxic Bis 5-Alkylresorcinol Derivatives from the Leaves of Oncostemon bojerianum from the Madagascar Rainforest*, Journal of natural products, 2002, 65(11), 1627-32, 10.1021/np0201568.

134. A. S. Ahmed, et al., *Phenolic constituents from Grevillea robusta*, Phytochemistry, 2000, 53(1), 149-54, 10.1016/s0031-9422(99)00484-7.

135. H. Wang, et al., *Prenylated alkylbisphenols from Grevillea whiteana*, Nat Prod Commun, 2009, 4(7), 951-8,

136. Y. Suzuki, Y. Esumi, I. Yamaguchi, *Structures of 5-alkylresorcinol-related analogues in rye*, Phytochemistry, 1999, 52(2), 281-9, 10.1016/S0031-9422(99)00196-X.

137. F. Delle Monache, et al., *A bianthraquinone and 4'-O-methyl-ent-gallocatechin fromCassia trachypus*, Phytochemistry, 1992, 31(1), 259-61, 10.1016/0031-9422(91)83049-Q.

138. S. E. Drewes, M. J. Mashimbye, *Flavanoids and triterpenoids from Cassine papillosa and the absolute configuration of 11,11-dimethyl-1,3,8,10-tetra-hydroxy-9-methoxypeltogynan*, Phytochemistry, 1993, 32(4), 1041-4, 10.1016/0031-9422(93)85252-M.

139. S. Inoshiri, et al., *Aromatic glycosides from Berchemia racemosa*, Phytochemistry, 1987, 26(10), 2811-4, 10.1016/S0031-9422(00)83595-5.

140. C. Mei-Ing, et al., *Phenolics from Hypericum geminiflorum*, Phytochemistry, 1997, 44(5), 943-7, https://doi.org/10.1016/S0031-9422(96)00644-9.

141. S. Shi, et al., *Macrocyclic glycosides from Clematis hexapetala*, 2006, 89(12), 3002-6,

142. Bui Van Trung, et al., *Antioxidant and Hepatoprotective Activity of Phenyl Glycosides Isolated From Heliciopsis lobata*, Natural Product Communications, 2020, 15(8), 10.1177/1934578X20946255.

143. M. Bawazeer, et al., *Cytotoxic Potential of Phenolic Glycosides from Stipagrostis plumosa*, 2021, 31(6), 842-7,

144. Phan Minh Giang, et al., *Evaluation of the Antioxidant, Hepatoprotective, and Anti-Inflammatory Activities of Bisresorcinol Isolated from the Trunk of Heliciopsis Terminalis*, Pharmaceutical Chemistry Journal, 2019, 53(7), 628-34, 10.1007/s11094-019-02051-7.

PHỤ LỤC LUẬN ÁN

“NGHIÊN CỨU PHÂN TÍCH THÀNH PHẦN, CẤU TRÚC HÓA HỌC VÀ ĐỊNH LƯỢNG HỢP CHẤT CÓ TÁC DỤNG BẢO VỆ GAN CỦA HAI LOÀI BÀN TAY MA”

DANH SÁCH CÁC PHỤ LỤC

PHỤ LỤC 1: PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU SỬ DỤNG TRONG LUẬN ÁN ... PL1
Phụ lục 1.1. Phương pháp xác định đường PL1
Phụ lục 1.2. Đánh giá hoạt tính bảo vệ tế bào gan trên mô hình in vitro PL2
Phụ lục 1.3. Đánh giá tác dụng chống oxy hóa PL2
Phụ lục 1.3.1. Đánh giá khả năng quét gốc tự do DPPH PL2
Phụ lục 1.3.2. Đánh giá khả năng chống quá trình peroxyd hóa lipid PL3
Phụ lục 1.4. Xác định khả năng ức chế NO PL4
Phụ lục 1.5. Đánh giá khả năng cảm ứng/ức chế cytokine PL7
Phụ lục 1.6. Đánh giá độc tính tế bào trên mô hình in vitro PL8
Phụ lục 1.7. Đánh giá độc tính cấp trên mô hình in vivo PL9
PHỤ LỤC 2: PHÂN TÍCH XÁC ĐỊNH CẤU TRÚC HÓA HỌC CÁC HỢP CHẤT PHÂN LẬP TỪ HAI LOÀI BÀN TAY MA TRẮNG *(HELICOPSIS TERMINALIS)* VÀ BÀN TAY MA TRẮNG *(HELICIOPSIS LOBATA)* PL10
Phụ lục 2.1. Phân tích xác định các hợp chất phân lập từ loài Bàn tay ma trắng *(H. terminalis)* PL11
Phụ lục 2.1.1. Xác định cấu trúc hợp chất HT1 ..... PL11
Phụ lục 2.1.2. Xác định cấu trúc hợp chất HT2 ..... PL13
Phụ lục 2.1.3. Xác định cấu trúc hợp chất HT3 ..... PL15
Phụ lục 2.1.4. Xác định cấu trúc hợp chất HT4 ..... PL17
Phụ lục 2.1.5. Xác định cấu trúc hợp chất HT5 ..... PL19
Phụ lục 2.1.6. Xác định cấu trúc hợp chất HT6 ..... PL21
Phụ lục 2.1.7. Xác định cấu trúc hợp chất HT7 ..... PL24
Phụ lục 2.1.8. Xác định cấu trúc hợp chất HT8 ..... PL26
Phụ lục 2.1.9. Xác định cấu trúc hợp chất HT10 ..... PL29
Phụ lục 2.2. Phân tích xác định các hợp chất phân lập từ loài Bàn tay ma đỏ *(H. terminalis)* PL32
Phụ lục 2.2.1. Xác định cấu trúc hợp chất HL1 ..... PL32
Phụ lục 2.2.2. Xác định cấu trúc hợp chất HL2 ..... PL35
Phụ lục 2.2.3. Xác định cấu trúc hợp chất HL3 ..... PL37
Phụ lục 2.2.4. Xác định cấu trúc hợp chất HL4 ..... PL40
Phụ lục 2.2.5. Xác định cấu trúc hợp chất HL5 ..... PL43

Phụ lục 2.2.6. Xác định cấu trúc hợp chất HL6 ..... PL45
Phụ lục 2.2.7.. Xác định cấu trúc hợp chất HL7 ..... PL45
Phụ lục 2.2.8. Xác định cấu trúc hợp chất HL8 ..... PL48
Phụ lục 2.2.9.. Xác định cấu trúc hợp chất HL9 ..... PL50
Phụ lục 2.2.10. Xác định cấu trúc hợp chất HL10 ..... PL52
Phụ lục 2.2.11. Xác định cấu trúc hợp chất HL11 ..... PL54
Phụ lục 2.2.12. Xác định cấu trúc hợp chất HL13 ..... PL56
Phụ lục 2.2.13. Xác định cấu trúc hợp chất HL14 ..... PL59
PHỤ LỤC 3. DỮ LIỆU PHÂN TÍCH TRONG LUẬN ÁN **PL62**
Phụ lục 3.1. Phổ HR-MS và NMR của hợp chất HT1 & HL6: (*Z*)-5,5'-(hexadec-8-ene-1,16-diyl)bis(benzene-1,3-diol) PL62
Phụ lục 3.1.1. Phổ HR-MS của hợp chất HT1 & HL6 ..... PL62
Phụ lục 3.1.2. Phổ ^{1}H-NMR của hợp chất HT1 & HL6 ..... PL62
Phụ lục 3.1.3. Phổ ^{13}C-NMR của hợp chất HT1 & HL6 ..... PL63
Phụ lục 3.1.4. Phổ HSQC của hợp chất HT1 & HL6 ..... PL63
Phụ lục 3.1.5. Phụ lục Phổ HMBC của hợp chất HT1 & HL6 ..... PL64
Phụ lục 3.2. Phổ HR-MS và NMR của hợp chất HT2: Helicide PL65
Phụ lục 3.2.1. Phổ HR-MS của hợp chất HT2 ..... PL65
Phụ lục 3.2.2. Phổ ^{1}H-NMR của hợp chất HT2 ..... PL65
Phụ lục 3.2.3. Phổ ^{13}C-NMR của hợp chất HT2 ..... PL66
Phụ lục 3.2.4. Phổ HSQC của hợp chất HT2 ..... PL66
Phụ lục 3.2.5. Phổ HMBC của hợp chất HT2 ..... PL67
Phụ lục 3.3. Phổ HR-MS và NMR của hợp chất HT3: *Threo*-syringylglycerol PL68
Phụ lục 3.3.1. Phổ HR-MS của hợp chất HT3 ..... PL68
Phụ lục 3.3.2. Phổ ^{1}H-NMR của hợp chất HT3 ..... PL68
Phụ lục 3.3.3. Phổ 13C-NMR của hợp chất HT3 ..... PL69
Phụ lục 3.4. Phổ HR-MS và NMR của hợp chất HT4: Ficuscarpanoside B PL70
Phụ lục 3.4.1. Phổ HR-MS của hợp chất HT4 ..... PL70
Phụ lục 3.4.2. Phổ ^{1}H-NMR của hợp chất HT4 ..... PL70
Phụ lục 3.4.3. Phổ ^{13}C-NMR của hợp chất HT4 ..... PL71
Phụ lục 3.4.4. Phổ HSQC của hợp chất HT4 ..... PL71
Phụ lục 3.4.5. Phổ HMBC của hợp chất HT4 ..... PL72

Phụ lục 3.5. Phổ HR-MS và NMR của hợp chất HT5: 3,4,5-Trimethoxyphenyl-β-D-glucopyranoside PL73
Phụ lục 3.5.1. Phổ HR-MS của hợp chất HT5 ..... PL73
Phụ lục 3.5.2. Phổ ^{1}H-NMR của hợp chất HT5 ..... PL74
Phụ lục 3.5.3. Phổ ^{13}C-NMR của hợp chất HT5 ..... PL74
Phụ lục 3.6. Phổ HR-MS và NMR của hợp chất HT6: Hovetrichoside A PL75
Phụ lục 3.6.1. Phổ HR-MS của hợp chất HT6 ..... PL75
Phụ lục 3.6.2. Phổ ^{1}H-NMR của hợp chất HT6 75
Phụ lục 3.6.3. Phổ ^{13}C-NMR của hợp chất HT6 ..... PL76
Phụ lục 3.6.4. Phổ HSQC của hợp chất HT6 ..... PL76
Phụ lục 3.6.5. Phổ HMBC của hợp chất HT6 ..... PL77
Phụ lục 3.7. Phổ HR-MS và NMR của hợp chất HT7: Rhyncosede C PL78
Phụ lục 3.7.1. Phổ HR-MS của hợp chất HT7 ..... PL78
Phụ lục 3.7.2. Phổ ^{1}H-NMR của hợp chất HT7 ..... PL78
Phụ lục 3.7.3. Phổ ^{13}C-NMR của hợp chất HT7 ..... PL79
Phụ lục 3.7.4. Phổ HSQC của hợp chất HT7 ..... PL79
Phụ lục 3.7.5. Phổ HMBC của hợp chất HT7 ..... PL80
Phụ lục 3.8. Phổ HR-MS và NMR của hợp chất HTN8: 3,4,5-Trimethoxyphenyl β-D-apiofuranosyl-(1″-6′)-β-D-glucopyranoside PL81
Phụ lục 3.8.1. Phổ HR-MS của hợp chất HT8 ..... PL81
Phụ lục 3.8.2. Phổ ^{1}H-NMR của hợp chất HT8 ..... PL81
Phụ lục 3.8.3. Phổ ^{13}C-NMR của hợp chất HT8 ..... PL82
Phụ lục 3.8.4. Phổ HSQC của hợp chất HT8 ..... PL82
Phụ lục 3.8.5. Phổ HMBC của hợp chất HT8 ..... PL83
Phụ lục 3.9. Phổ HR-MS, IR và NMR của hợp chất HT9 – Heliterminozide A PL84
Phụ lục 3.9.1. Phổ HR-MS của hợp chất HT9 ..... PL84
Phụ lục 3.9.2. Phổ IR của hợp chất HT9 ..... PL84
Phụ lục 3.9.3. Phổ ^{1}H-NMR của hợp chất HT9 ..... PL85
Phụ lục 3.9.4. Phổ ^{13}C-NMR của hợp chất HT9 ..... PL85
Phụ lục 3.9.5. Phổ HSQC của hợp chất HT9 ..... PL86
Phụ lục 3.9.6. Phổ HMBC của hợp chất HT9 ..... PL86
Phụ lục 3.9.7. Phổ COSY của hợp chất HT9 ..... PL87

Phụ lục 3.10. Phổ HR-MS, NMR và ECD của hợp chất HT10: 7R,8S-dihydrodehydrodiconeferyl alcohol 4-O-β-D-glucopyranoside PL88
Phụ lục 3.10.1. Phổ HR-MS của hợp chất HT10 ..... PL88
Phụ lục 3.10.2. Phổ ^{1}H-NMR của hợp chất HT10 ..... PL88
Phụ lục 3.10.3. Phổ ^{13}C-NMR của hợp chất HT10 ..... PL89
Phụ lục 3.10.4. Phổ HSQC của hợp chất HT10 ..... PL89
Phụ lục 3.10.5. Phổ HMBC của hợp chất HTN10 ..... PL90
Phụ lục 3.10.6. Phổ ECD của hợp chất HTN10 ..... PL90
Phụ lục 3.11. Phổ HR-MS và NMR của hợp chất HL1: (8'Z,11'Z)-5-(heptadeca-8',11'-dienyl)benzene-l,3-diol PL91
Phụ lục 3.11.1. Phổ HR-MS của hợp chất HL1 ..... PL91
Phụ lục 3.11.2. Phổ ^{1}H-NMR của hợp chất HL1 ..... PL91
Phụ lục 3.11.3. Phổ ^{13}C-NMR của hợp chất HL1 ..... PL92
Phụ lục 3.11.4. Phổ HSQC của hợp chất HL1 ..... PL92
Phụ lục 3.11.5. Phổ HMBC của hợp chất HL1 ..... PL93
Phụ lục 3.12. Phổ HR-MS và NMR của hợp chất HL2: Bisgravillol PL94
Phụ lục 3.12.1. Phổ HR-MS của hợp chất HL2 ..... PL94
Phụ lục 3.12.2. Phổ ^{1}H-NMR của hợp chất HL2 ..... PL94
Phụ lục 3.12.3. Phổ ^{13}C-NMR của hợp chất HL2 ..... PL95
Phụ lục 3.12.4. Phổ HSQC của hợp chất HL2 ..... PL95
Phụ lục 3.12.5. Phổ HMBC của hợp chất HL2 ..... PL96
Phụ lục 3.13. Phổ HR-MS và NMR của hợp chất HL3: Oncostemonol D PL97
Phụ lục 3.13.1. Phổ HR-MS của hợp chất HL3 ..... PL97
Phụ lục 3.13.2. Phổ ^{1}H-NMR của hợp chất HL3 ..... PL97
Phụ lục 3.13.3. Phổ ^{13}C-NMR của hợp chất HL3 ..... PL98
Phụ lục 3.13.4. Phổ HSQC của hợp chất HL3 ..... PL98
Phụ lục 3.13.5. Phổ HMBC của hợp chất HL3 ..... PL99
Phụ lục 3.14. Phổ HR-MS và NMR của hợp chất HL4: Grevirobstol A PL100
Phụ lục 3.14.1. Phổ HR- -MS của hợp chất HL4 ..... PL100
Phụ lục 3.14.2. Phổ ^{1}H-NMR của hợp chất HL4 ..... PL100
Phụ lục 3.14.3 Phổ ^{13}C-NMR của hợp chất HL4 ..... PL101
Phụ lục 3.14.4. Phổ HSQC của hợp chất HL4 ..... PL101

Phụ lục 3.14.5. Phổ HMBC của hợp chất HL4 ..... PL102
Phụ lục 3.15. Phổ HR-MS và NMR của hợp chất HL5: 5,5'-(hexadecane-1,16-diyl)bis(benzene-1,3-diol) PL103
Phụ lục 3.15.1. Phổ HR- -MS của hợp chất HL5 ..... PL103
Phụ lục 3.15.2. Phổ ^{1}H-NMR của hợp chất HL5 ..... PL103
Phụ lục 3.15.3. Phổ ^{13}C-NMR của hợp chất HL5 ..... PL104
Phụ lục 3.15.4. Phổ HSQC của hợp chất HL5 ..... PL104
Phụ lục 3.15.5. Phổ HMBC của hợp chất HL5 ..... PL105
Phụ lục 3.16. Phổ HR-MS và NMR của hợp chất HL7: 4'-*O*-methyl-ent-gallocatechin PL106
Phụ lục 3.16.1. Phổ HR-MS của hợp chất HL7 ..... PL106
Phụ lục 3.16.2. Phổ ^{1}H-NMR của hợp chất HL7 ..... PL106
Phụ lục 3.16.3. Phổ ^{13}C-NMR của hợp chất HL7 ..... PL107
Phụ lục 3.16.4. Phổ HSQC của hợp chất HL7 ..... PL107
Phụ lục 3.16.5. Phổ HMBC của hợp chất HL7 ..... PL108
Phụ lục 3.17. Phổ HR-MS và NMR của hợp chất HL8: (-)-4'-*O*-methoxy-epi-gallocatechin PL109
Phụ lục 3.17.1. Phổ HR-MS của hợp chất HL8 ..... PL109
Phụ lục 3.17.2. Phổ ^{1}H-NMR của hợp chất HL8 ..... PL109
Phụ lục 3.17.3. Phổ ^{13}C-NMR của hợp chất HL8 ..... PL110
Phụ lục 3.17.4. Phổ HSQC của hợp chất HL8 ..... PL110
Phụ lục 3.17.5. Phổ HMBC của hợp chất HL8 ..... PL111
Phụ lục 3.18. Phổ HR-MS và NMR của hợp chất HL9: Isotachioside PL112
Phụ lục 3.18.1. Phổ HR-MS của hợp chất HL9 ..... PL112
Phụ lục 3.18.2. Phổ ^{1}H-NMR của hợp chất HL9 ..... PL112
Phụ lục 3.18.3. Phổ ^{13}C-NMR của hợp chất HL9 ..... PL113
Phụ lục 3.18.4. Phổ HSQC của hợp chất HL9 ..... PL113
Phụ lục 3.18.5. Phổ HMBC của hợp chất HL9 ..... PL114
Phụ lục 3.19. Phổ HR-MS và NMR của hợp chất HL10: Tachioside PL115
Phụ lục 3.19.1. Phổ HR-MS của hợp chất HL10 ..... PL115
Phụ lục 3.19.2. Phổ ^{1}H-NMR của hợp chất HL10 ..... PL115
Phụ lục 3.19.3. Phổ ^{13}C-NMR của hợp chất HL10 ..... PL116

Phụ lục 3.19.4. Phổ HSQC của hợp chất HL10 ..... PL116
Phụ lục 3.19.5. Phổ HMBC của hợp chất HL10 ..... PL117
Phụ lục 3.20. Phổ HR-MS và NMR của hợp chất HL11: 3,5-Dimethoxy-4-hydroxy-1-*β*-D-glucopyranoside. PL118
Phụ lục 3.20.1. Phổ HR-MS của hợp chất HL11 ..... PL118
Phụ lục 3.20.2. Phổ ^{1}H-NMR của hợp chất HL11 ..... PL118
Phụ lục 3.20.3. Phổ ^{13}C-NMR của hợp chất HL11 ..... PL119
Phụ lục 3.20.4. Phổ HSQC của hợp chất HL11 ..... PL120
Phụ lục 3.20.5. Phổ HMBC của hợp chất HL11 ..... PL120
Phụ lục 3.21. Phổ HR-MS và NMR của hợp chất HL12: Helilobatoside A PL121
Phụ lục 3.21.1. Phổ HR- -MS của hợp chất HL12 ..... PL121
Phụ lục 3.21.2. Phổ ^{1}H-NMR của hợp chất HL12 ..... PL121
Phụ lục 3.21.3. Phổ ^{13}C-NMR của hợp chất HL12 ..... PL122
Phụ lục 3.21.4. Phổ HSQC của hợp chất HL12 ..... PL122
Phụ lục 3.21.5. Phổ HMBC của hợp chất HL12 ..... PL123
Phụ lục 3.21.6. Phổ COSY của hợp chất HL12 ..... PL123
Phụ lục 3.21.7. Sắc ký đồ của đường D-allose phân tích bằng HPLC PL124
Phụ lục 3.21.8. Sắc ký đồ của đường D-glucose phân tích bằng HPLC PL124
Phụ lục 3.21.9. Sắc ký đồ của hợp chất HL12 phân tích bằng HPLC PL125
Phụ lục 3.22. Phổ HR-MS và NMR của hợp chất HL13: *β*-Hydroxypropiovanillone 3-O-*β*-D-glucopyranoside PL126
Phụ lục 3.22.1. Phổ HR-MS của hợp chất HL13 ..... PL126
Phụ lục 3.22.3. Phổ ^{1}H-NMR của hợp chất HL13 ..... PL126
Phụ lục 3.22.3. Phổ ^{13}C-NMR của hợp chất HL13 ..... PL127
Phụ lục 3.22.4. Phổ HSQC của hợp chất HL13 ..... PL127
Phụ lục 3.22.5. Phổ HMBC của hợp chất HL13 ..... PL128
Phụ lục 3.23. Phổ HR-MS và NMR của hợp chất HL14: 3′,5′-Dimethoxy-3,4′-dihydroxypropiophenone 3-O-*β*-D-glucoside PL129
Phụ lục 3.23.1. Phổ HR-MS của hợp chất HL14 ..... PL129
Phụ lục 3.23.2. Phổ ^{1}H-NMR của hợp chất HL14 ..... PL129
Phụ lục 3.23.3. Phổ ^{13}C-NMR của hợp chất HL14 ..... PL130
Phụ lục 3.23.4. Phổ HSQC của hợp chất HL14 ..... PL131

Phụ lục 3.23.5. Phổ HMBC của hợp chất HL14 ..... PL131
PHỤ LỤC 4. MỘT SỐ KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU PL132
Phụ lục 4.1. Kết quả chống oxy hóa của hợp chất 3,5-Dimethoxy-4-hydroxy-1-*β*-D-glucopyranoside trên mô hình in vitro PL132
Phụ lục 4.2. Đánh giá tác dụng ức chế yếu tố NO của hợp chất 3,5-Dimethoxy-4-hydroxy-1-*β*-D-glucopyranoside trên mô hình in vitro PL132
PHỤ LỤC 5: KẾT QUẢ GIÁM ĐỊNH THỰC VẬT CÁC MẪU NGHIÊN CỨU PL133

PHỤ LỤC 1: PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU SỬ DỤNG TRONG LUẬN ÁN

Phụ lục 1.1. Phương pháp xác định đường

- Phương pháp 1:

Lấy 10 mg hợp chất HT9 thủy phân bằng 1 ml dung dịch HCl 1N trong 3 giờ, triển khai trên bản mỏng silica gel kích thước (10 x 20 cm) là 2-butanone – isopropanol – acetone – nước với tỷ lệ (20 : 10 : 7 : 6). Mẫu khai triển song song với các vết đối chiếu D-glucose và D-galactose. Phát hiện vị trí các vết bằng phu thuốc thử H_2SO_4 10 % trong ethanol và sấy khô. Tại vị trí trên bản mỏng điều chế tương ứng với vị trí của vết D-glucose (R_f = 0,43) và D-galactose (R_f = 0,36), cạo vết silica gel, gom lại và lọc, rửa bằng methanol để thu được phần dịch lọc có chứa các đường tương ứng. Cô quay chân không, thu được 1,10 mg cắn D-glucose và 0,93 mg cắn D-galactose. Tiến hành pha các mẫu trong chính xác 20,0 ml nước, và đo năng suất quay cực ở 20 ^oC, chiều dài ống đo 0,5 dm.

- Phương pháp 2:

Mẫu nghiên cứu được trộn với dimethyl sulfoxide (DMSO) với nồng độ khoảng 100 µg/ml, thêm khoảng 10 µl acid trifluoroacetic (TFA) và cho vào ống, đậy kín. Đun nóng hỗn hợp ở 105 ^oC trong 2 giờ. Để nguội, hòa hỗn hợp với 10 ml nước. Lắc hỗn hợp với ethyl acetate (2 lần x 5 ml), lấy phần nước, cô quay loại dung môi. Hòa sản phẩm cuối cùng với hỗn hợp methanol – nước (8 : 2), lọc qua màng 0,45 µl (mẫu thử).

Mẫu thử được tiêm vào hệ sắc ký lỏng hiệu năng cao Hitachi của Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương, detector Alltech ELSD 800 (Alltech, U.S.A) với điều kiện sắc ký như sau:

+ Cột: NH_2P-50 (250 x 4,6 µm; 5µm);

+ Pha động: Acetoneitril – nước tỉ lệ 8 : 2;

+ Tốc độ dòng: 1,0 ml/phút;

+ Thể tích tiêm: 10 µl;

+ Detector: ELSD, khí nitơ với tốc độ dòng 2,8 ml/phút, nhiệt độ 40 ^oC.

Mẫu được so sánh với các mẫu đường chuẩn về thời gian lưu để xác định loại đường của mẫu phân tích.

Phụ lục 1.2. Đánh giá hoạt tính bảo vệ tế bào gan trên mô hình *in vitro*

Mô hình này được tiến hành theo 2 bước, nuôi cấy tế vào và thử tác dụng bảo vệ tế bào gan dưới tác động của CCl_4.

**** Nuôi cấy tế bào***

Dòng tế bào HepG2 (do GS. TS. J. M. Pezzuto, Trường Đại học Long Island, US và GS. Jeanette Maier, trường Đại học Milan, Italia cung cấp) được nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy DMEM (GIBICO) với thành phần kèm theo gồm 2 mM L-glutamine, 10 mM HEPES, và 1,0 mM natri pyruvate, ngoài ra bổ sung 10 % fetal bovine serum – FBS (GIBCO) và nuôi trong tủ ấm CO_2 ở điều kiện 37 ^oC, 5 % CO_2.

**** Xác định khả năng bảo vệ tế bào gan***

- Tế bào HepG2 với nồng độ 3 x 10^4 tế bào/giếng được được đưa vào các giếng thử nghiệm trong đĩa 96 giếng. Ủ 24 giờ ở điều kiện 37 ^oC, 5 % CO_2.

- Thêm mẫu thí nghiệm hoặc mẫu đối chứng (quercetin) ở các nồng độ khác nhau được đưa vào các giếng nuôi cấy. Bổ sung vào các giếng CCl4 nồng độ 40 mM. Ủ đĩa thêm 2 giờ ở cùng điều kiện nuôi cấy.

- Loại bỏ môi trường nuôi cấy, thêm 50µl MTT (1mg/ml) vào mỗi giếng. Ủ đĩa ở nhiệt độ 37 ^oC trong 4 giờ.

- Hỗn hợp có màu formazal hình thành sau phản ứng được hòa tan bằng DMSO. Đo giá trị độ hấp thụ quang (OD) của các mẫu ở bước sóng 540 nm.

Hiệu quả bảo vệ tế bào gan được xác định theo công thức:

$$\%\ \text{hiệu quả bảo vệ} = \frac{OD_{\text{mẫu thử+CCl4}} - OD_{\ CCl4}}{OD_{\text{mẫu chứng}} - OD_{CCl4}} \times 100$$

Trong đó: $OD_{\text{mẫu chứng}}$ là độ hấp thụ của giếng tế bào chỉ chứa dung môi pha mẫu.

Giá trị tính toán được xác định dựa trên giá trị trung bình của 3 lần thử lặp lại.

Phụ lục 1.3. Đánh giá tác dụng chống oxy hóa

Phụ lục 1.3.1. Đánh giá khả năng quét gốc tự do DPPH

Quy trình thí nghiệm thực hiện như sau: cho 5 ml DPPH (0,8 mM, pha trong metanol) vào mỗi ống nghiệm đã chứa 1 ml mẫu thử nghiệm tại các nồng độ khác nhau (từ 0 – 1000 µg/ml). Ủ ấm 30 phút trong điều kiện không có ánh sáng, sau đó,

tiến hành đo mật độ quang OD ở bước sóng 517 nm. Giá trị mật độ quang OD phản ánh khả năng kháng oxi hóa của mẫu. Mẫu đối chứng (dương) trong thí nghiệm là axit ascorbic (15 µg/ml), đối chứng âm là nước cất hai lần. Tỉ lệ phần trăm hoạt tính kháng oxi hóa được xác định theo công thức sau:

Tỉ lệ % hoạt tính loại gốc tự do

$$\text{DPPH} = \frac{ODc - ODm}{ODc} \times 100$$

Trong đó:

+ ODm là giá trị mật độ quang của mẫu thử;

+ Odc là giá trị mật độ quang của chứng âm.

Từ tỉ lệ % hoạt tính loại gốc tự do DPPH, xây dựng phương trình tương quan tuyến tính để làm cơ sở xác định giá trị IC_{50} (là nồng độ mà có thể loại 50% gốc tự do DPPH) - tức là giá trị để so sánh khả năng chống oxi hóa của các mẫu thử. Mẫu nào có giá trị IC_{50} càng thấp thì hoạt tính chống oxi hóa càng cao

Phụ lục 1.3.2. Đánh giá khả năng chống quá trình peroxyd hóa lipid

Phương pháp chống oxi hóa thông qua ức chế quá trình peroxidation lipid màng tế bào (thử nghiệm TBARs) được thực hiện theo phương pháp của N. Zhu và cộng sự và của Viện Dược liệu - Bộ Y Tế (2006), có sự thay đổi nhỏ cho phù hợp với điều kiện của phòng thí nghiệm. Xác định khả năng ức chế peroxy hoá lipid của mẫu nghiên cứu qua việc xác định hàm lượng cơ chất của acid thiobarbituric, là sản phẩm của quá trình peroxy hoá lipid màng tế bào. TBARS có khả năng phản ứng với acid thiobarbituric để tạo thành phức hợp trimethin (có màu hồng) có đỉnh hấp thu cực đại ở $\lambda = 532$ nm.

**** Pha mẫu thử:***

Cân mẫu sau đó pha thành các nồng độ 10.000 µg/ml, 2000 µg/ml, 400 µg/ml, 80 µg/ml, 16µg/ml nên sau khi cho 0,1 ml mẫu thử ở các nồng độ thử nghiệm được cho phản ứng với 1 ml dịch đồng thể não và thêm 0,8 ml đệm phosphat, 0,1 ml hệ Fenton vừa đủ 2 ml thì nồng độ mẫu trong ống thử giảm xuống 20 lần còn 500 µg/ml, 100 µg/ml, 20 µg/ml, 4 µg/ml; 0,8 µg/ml.

**** Cách tiến hành:***

- Tách não chuột và nghiền đồng thể trong dung dịch đệm phosphat (pH=7,4) theo tỉ lệ 1:10 ở nhiệt độ 0 – 4 ^oC.

- Lấy 1ml dịch đồng thể thêm vào 0,1 ml mẫu thử ở các nồng độvà 0,8ml đệm phosphat thêm 0,1 ml hệ Fenton ($FeSO_4$ 0,1 mM: H_2O_2 15mM theo tỉ lệ 1:1). Ủ hỗn hợp ở 37 ^oC trong 15 phút.
- Dừng phản ứng bằng 1 ml acid tricloacetic 10 %. Li tâm 12000 vòng trong 5 phút.
- Lấy dịch trong cho phản ứng với 1 ml acid thiobarbituric 0,8% (theo tỉ lệ 2:1). Ủ ở nhiệt độ 100 ^oC 15 phút.
- Làm lạnh và tiến hành đo ở bước sóng $\lambda = 532$ nm.
- Trolox được sử dụng làm chất đối chiếu tham khảo.

Tính toán kết quả

Công thức tính phần trăm hoạt tính chống oxi hoá (HTCO)

$$\mathbf{HTCO\ (\%) = [(OD_C - OD_T)/OD_C] \times 100}$$

Trong đó: + OD_C là mật độ quang của giếng chứng không có mẫu thử

+ OD_T là mật độ quang của mẫu thử.

Phụ lục 1.4. Xác định khả năng ức chế NO

Khả năng ức chế NO được thực hiện trên các mẫu đã xác định được là có tác dụng bảo vệ gan và có độ an toàn cao trên mô hình *in vitro*. Phép thử này được thực hiện trên mô hình gây độc dòng tế bào đại thực bào RAW264.7, tiến hành qua hai bước: nuôi cấy tế bào (nhân tế bào lên) và thử tác dụng ức chế NO. Đánh giá khả năng ức chế NO chỉ có ý nghĩa khi được thực hiện trên các tế bào sống, do đó tiến hành thêm việc xác định lượng tế bào sống trong điều kiện như đã thử ức chế NO.

**** Nuôi cấy tế bào***

Dòng tế bào RAW264.7, do GS. TS. Domenico Delfino, Đại học Perugia, Italia cung cấp, được nuôi cấy trong môi trường Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), cung cấp bởi hãng Life Technologies, Inc., (Gaithersburg, MD, Mỹ), với thành phần kèm theo gồm 2 mM L-glutamine, 10 mM HEPES, và 1,0 mM sodium pyruvate, ngoài ra bổ sung 10 % fetal bovine serum – FBS (GIBCO).

Tế bào được cấy chuyển sau 3 đến 5 ngày với tỉ lệ (1:3) và nuôi trong tủ ấm CO_2 ở điều kiện 37 ^oC, 5 % CO_2.

**** Xác định khả năng ức chế sản sinh NO của đại thực bào RAW264.7***

- Tế bào RAW 274.7 được đưa vào đĩa 96 giếng ở nồng độ 2 x 10^5 tb/giếng và nuôi trong tủ ấm ở 37°C và 5% CO_2 trong 24h.

- Tiếp theo, môi trường nuôi cấy được loại bỏ, thay bằng môi trường DMEM không có FBS trong 3h.

- Tế bào sau đó được ủ mẫu nghiên cứu ở các nồng độ khác nhau trong 2h trước khi được kích thích sản sinh yếu tố NO bằng LPS (10 μg/mL) trong 24h.

- Một số giếng không được ủ mẫu mà chỉ sử dụng dung dịch pha mẫu được coi là đối chứng âm. Trong khi đối chứng dương được sử dụng là N^G-Methyl-L-arginine acetate (L-NMMA) (Sigma) ở các nồng độ từ 0,8 – 100 μg/ml)**.**

- Nitrite (NO_2^-), được xem là chỉ thị cho việc tạo NO, sẽ được xác định nhờ bộ Griess Reagent System (Promega Cooperation, WI, USA). Cụ thể là, 100 μL môi trường nuôi tế bào (ủ mẫu) được chuyển sang đĩa 96 mới và được thêm vào 100 μL Griess reagent: 50 μL of 1 % (w/v) sulfanilamide trong 5 % (v/v) phosphoric acid và 50 μL 0,1 % (w/v) N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride pha trong nước.

- Hỗn hợp này được ủ tiếp ở nhiệt độ phòng trong 10 phút và hàm lượng nitrite sẽ được đo bằng máy microplate reader ở bước sóng 540 nm. Môi trường DMEM không FBS được sử dụng như giếng trắng (blank).

- Hàm lượng nitrite của từng mẫu thí nghiệm được xác định nhờ vào đường cong hàm lượng chuẩn $NaNO_2$ và được so sánh % với mẫu chứng âm (LPS).

Khả năng ức chế sản sinh NO của các mẫu được xác định theo công thức:

$$\% \text{ ức chế } = 100\% - [\text{hàm lượng } NO_{\text{mẫu thử}} / \text{hàm lượng } NO_{LPS}] * 100$$

Phép thử được lặp lại 3 lần để đảm bảo tính chính xác. Giá trị IC_{50} (nồng độ ức chế 50% sự hình thành NO) sẽ được xác định nhờ vào phần mềm máy tính TableCurve 2Dv4.

- Đưa tế bào RAW 264.7 sau nuôi cấy vào các đĩa 96 giếng để có nồng độ tế bào 2 x 10^5 tb/giếng, sau đó đặt vào tủ ấm ở 37 ^{o}C và 5 % CO_2 nuôi cấy trong 24 giờ.

- Loại bỏ môi trường nuôi cấy ban đầu, thêm môi trường DMEM không có FBS trong 3 giờ.

- Thêm mẫu nghiên cứu với các nồng độ thử nghiệm khác nhau vào các giếng chứa tế bào, ủ trong 2 giờ, sau đó thêm LPS nồng độ 10µg/ml trong 24 giờ để kích thích sản sinh yếu tố NO.

- Song song với các giếng chứa mẫu thử nghiệm, tiến hành tương tự với các mẫu chứng âm (là giếng chỉ thêm vào sử dụng dung dịch pha mẫu) và các mẫu chứng dương (là các giếng được thêm N^G-Methyl-L-arginine acetate (L-NMMA) (Sigma) ở các nồng độ từ 0,8 – 100 µg/ml).

- Sau thời gian ủ mẫu tạo NO, tiến hành hút 100 µl môi trường ủ mẫu ở từng giếng đưa sang đĩa 96 giếng mới. Thêm 100 µL thuốc thử Griess (cung cấp bởi hãng Promega Cooperation, WI, Mỹ).

- Ủ hỗn hợp 10 phút ở nhiệt độ phòng để phản ứng NO được chuyển thành nitrit và phản ứng tạo màu với thuốc thử. Đo độ hấp thụ của hỗn hợp sau phản ứng ở bước song 540 nm. Các giếng chứa DMEM không chứa FBS được sử dụng làm mẫu trắng.

- Hàm lượng nitrit trong các mẫu thử nghiệm được xác định bằng phương pháp hồi quy tuyến tính của các mẫu chuẩn $NaNO_2$ ở các nồng độ khác nhau và được so sánh % với mẫu chứng âm (LPS).

- Khả năng ức chế sản sinh NO được xác định bởi phương trình:

$$\% \text{ ức chế} = 100\ \% - \frac{\text{hàm lượng } NO_{\text{mẫu thử}}}{\text{hàm lượng } NO_{LPS}} \times 100$$

- Kết quả được xác định dựa trên giá trị trung bình của 3 lần thử nghiệm lặp lại tại từng giếng. Giá trị IC_{50} (nồng độ ức chế 50 % sự hình thành NO) được xác định bằng phần mềm TableCurve 2Dv4.

**** Xác định khả năng gây độc tế bào RAW264.7***

Khả năng gây độc tế bào RAW264.7 của mẫu nghiên cứu được xác định bằng phương pháp MTT, như sau:

- Đĩa nuôi cấy tế bào để thử nghiệm sự biểu hiện NO ở trên, sau khi thu dịch nổi để xác định hàm lượng NO sẽ được thêm vào mỗi giếng là 90 µL môi trường nuôi cấy tế bào và 10 µL MTT (nồng độ cuối cùng là 5 mg/mL). Sau 4h, loại bỏ môi trường, tinh thể formazan được hòa tan bằng 50 µL DMSO 100%.

- Giá trị OD đo ở bước sóng 540 nm bằng máy quang phổ BioTek Elx800. Khả năng sống sót của tế bào khi có mặt chất thử sẽ được xác định thông qua công thức sau:

$$\% \text{ tế bào sống sót} = \frac{OD_{\text{mẫu thử}} - OD_{\text{đối chứng rắng}}}{OD_{DMSO} - OD_{\text{đối chứng trắng}}} \text{ x } 100$$

Phụ lục 1.5. Đánh giá khả năng cảm ứng/ức chế cytokine

Khả năng cảm ứng/ức chế cytokine của các mẫu nghiên cứu được đánh giá trên dòng đại thực bào RAW 264.7 tương tự như với phép thử khả năng ức chế NO. Phép thử cần tiến hành qua hai giai đoạn: nuôi cấy tế bào và thử tác động cytokine. Các cytokine được quan tâm là IL-6, IL-10 và TNF-α.

**** Nuôi cấy tế bào***

Nuôi cấy tế bào RAW 264.7 trong môi trường nuôi cấy gồm DMEM, L-glutamin 2 mM, HEPES 10 mM, và sodium pyruvate 1,0 mM, ngoài ra bổ sung FBS 10 % và nuôi trong tủ ấm ở điều kiện 37 ^oC, 5% CO_2.

**** Xác định tác động của mẫu thử đến sự tổng hợp các cytokine***

- Đưa tế bào RAW 264.7 với nồng độ 5×10^4 tế bào trong 190 µl môi trường vào các giếng thí nghiệm, ủ ở 37 ^oC qua đêm.

- Thêm vào các giếng chứa mẫu thử 10 µl mẫu thử ở các nồng độ khác nhau pha trong DMSO 10 %. Song song làm giếng mẫu trắng, thay 10 µl mẫu thử bằng 10 µl DMSO 10 % để làm đối chứng âm.

- Sau 2 giờ, thêm vào các giếng thử nghiệm dung dịch LPS với nồng độ 1 µg/ml.

- Sau 24 giờ và 48 giờ, lấy dịch nuôi tế bào ở các giếng thử nghiệm để tiến hành định tính và định lượng các cytokine IL-6, IL-10 và TNF-α trong môi trường nuôi cấy.

Hàm lượng các cytokine được xác định bằng bộ kit IL-6, IL-10, TNF-α mouse ELISA Kit (BioVision) và theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Tiến hành như sau:

- Thêm 100 µl dung dịch thu được sau nuôi cấy vào các giếng thí nghiệm, một giếng đối chứng âm thay mẫu thử bằng100 µl dung môi. Ủ bản ở 37 ^oC trong 90 phút.

- Loại bỏ dịch nổi, thêm 100 µl kháng thể của IL-6, IL-10, TNF-α có gắn biotin vào các giếng. Duy trì bản ở nhiệt độ 37 ^{o}C trong 60 phút.

- Rửa bản 5 lần bằng dung dịch PBS 0,01M, thêm 100 µl hỗn hợp Avidin-Biotin-Peroxidase Complex vào các giếng thí nghiệm. Tiếp tục ủ bản ở 37 ^{o}C trong 30 phút.

- Tiếp tục rửa bản 5 lần bằng dung dịch PBS 0,01M. Thêm 90 µl cơ chất TMB vào các giếng thí nghiệm. Ủ bản ở 37 ^{o}C, trong 20-25 phút, tránh ánh sáng. Dừng phản ứng bằng 100 µl dung dịch stop solution.

- Đọc kết quả trên máy Tecan GENios Promicroplate reader ở 450 nm.

Phụ lục 1.6. Đánh giá độc tính tế bào trên mô hình in vitro

Thử nghiệm theo phương pháp nhuộm Sulforhodamin B.

Dòng tế bào được chọn để thử nghiệm độc tính là dòng tế bào gốc thận ở phôi người (human embryonic kidney cells) với mã là HEK-293A. Phép thử được thực hiện theo các bước sau:

- Trypsin hóa tế bào và điều chỉnh mật độ tế bào về khoảng $3x10^4$ tế bào/ml.

- Pha mẫu thử thành các nồng độ 100 – 20 – 4 – 0,8 µg/ml, đưa vào các giếng của đĩa 96 giếng. Ủ trong tủ ấm 72 giờ. Giếng đối chứng ngày 0 là giếng được thay mẫu thử bằng 180 µl TBUT. Sau 1 giờ, giếng đối chứng ngày 0 tế bào sẽ được cố định bằng Trichloracetic acid – TCA (Sigma Aldrich).

- Sau 72 giờ, cố định tế bào bằng TCA trong 1 giờ, nhuộm tế bào bằng sulforhodamine B (SRB – Sigma Aldrich) trong 30 phút ở 37 ^{o}C và rửa 3 lần bằng acid acetic. Để khô ở nhiệt độ phòng. Thêm 10 mM unbuffered Tris base để hòa tan SRB, lắc nhẹ trong 10 phút.

- Xác định OD của các mẫu thí nghiệm bằng máy ELISA Plate Reader (Bio-Rad) ở 515 nm.

Phần trăm ức chế sự phát triển của tế bào khi có mặt chất thử sẽ được xác định thông qua công thức sau:

$$\% \text{ ức chế} = 100\ \% - \frac{OD_{\text{mẫu thử}} - OD_{\text{ngày 0}}}{OD_{DMSO} - OD_{\text{ngày 0}}} \times 100$$

Kết quả được tính toán trên giá trị trung bình của 3 lần lặp lại thử nghiệm.

Sử dụng dung dịch ellipticine ở các nồng độ 0,08 – 10 µg/ml chất đối chứng dương và DMSO 10 % làm đối chứng âm.

Xác định IC_{50} (nồng độ ức chế 50% sự phát triển) bằng phần mềm máy tính TableCurve 2Dv4.

Cặn chiết được coi có hoạt tính tốt với $IC_{50} \leq 20$ µg/ml, chất tinh khiết được coi có hoạt tính tốt khi $IC_{50} \leq 5$ µM.

Phụ lục 1.7. Đánh giá độc tính cấp trên mô hình *in vivo*

Trước khi chuột uống mẫu thử, cho chuột nhịn đói qua đêm và uống nước tự do theo nhu cầu. Chia chuột thành các lô 10 con, cho uống mỗi lô một mức liều nhất định.

Đường dùng thuốc: đường uống, dùng kim cong đầu tù bơm trực tiếp mẫu thử vào dạ dày chuột với thể tích 0,4 ml/10 g chuột. Tìm liều tối đa mà không có chuột nào của lô thí nghiệm chết (LD0) và liều tối thiểu để 100 % chuột của lô thí nghiệm chết (LD100). Thử thêm 2-4 liều trung gian giữa 2 liều nói trên để xác định LD50.

Thời gian theo dõi: Chuột được để ở phòng thí nghiệm có khí hậu đảm bảo để mọi hoạt động của chuột bình thường. Theo dõi và quan sát các biểu hiện về hành vi, hoạt động, ăn uống, bài tiết của chuột và số chuột sống chết trong 03 ngày. Chuột chết được mổ để đánh giá tổn thương đại thể. Theo dõi chuột sống sót thêm 1 tuần nữa.

LD50 được tính theo phương pháp Behrens- Karber:

$$LD50 = LD100 - \frac{\sum(d \times z)}{n}$$

Trong đó:

+ LD50 & LD100 lần lượt là liều làm chết 50 % và 100 % số chuột thí nghiệm

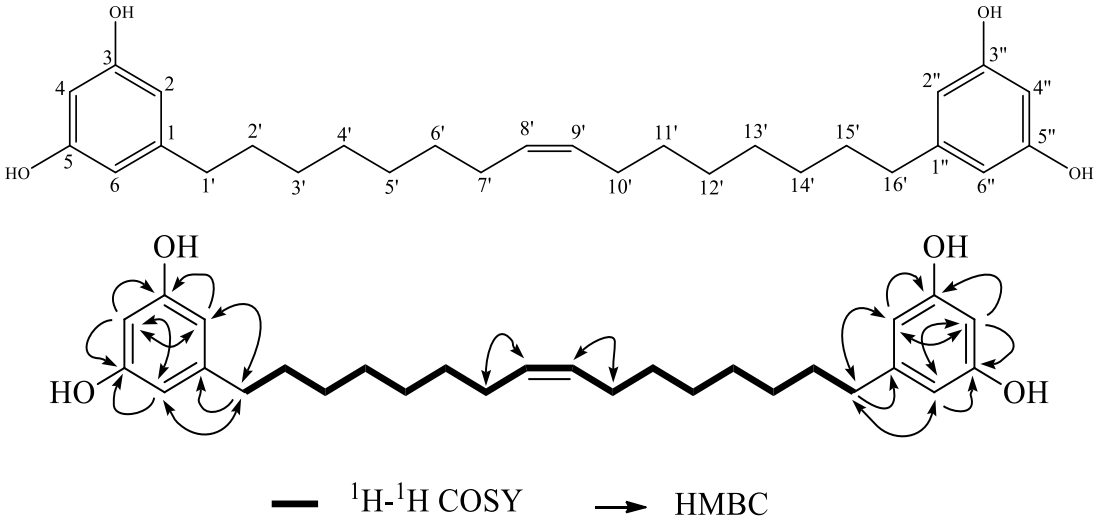
+ d là hiệu số liều của 2 liều kế tiếp; z là số chuột chết giữa 2 liều kế tiếp

+ n là số chuột thí nghiệm

PHỤ LỤC 2: PHÂN TÍCH XÁC ĐỊNH CẤU TRÚC HÓA HỌC CÁC HỢP CHẤT PHÂN LẬP TỪ HAI LOÀI BÀN TAY MA TRẮNG *(HELICOPSIS TERMINALIS)* VÀ BÀN TAY MA TRẮNG *(HELICIOPSIS LOBATA)*

Phụ lục 2.1. Phân tích xác định các hợp chất phân lập từ loài Bàn tay ma trắng *(H. terminalis)*

Phụ lục 2.1.1. Xác định cấu trúc hợp chất HT1



Hình 1. Cấu trúc hóa học và các tương tác COSY, HMBC của hợp chất HT1

** Tính chất và thông số phổ:*

+ Bột vô định hình màu trắng

+ Phổ HR-ESI-MS *m/z* 463,2799 $[M+Na]^+$

+ Tính toán lý thuyết cho công thức $[C_{28}H_{40}O_4Na]^+$: 463,2824

+ Số liệu phổ ^{1}H-NMR (500 MHz) và ^{13}C-NMR (125 MHz) xem Bảng 1 và Phụ lục 3.1.1 & 3.1.2.

Bảng 1. Số liệu phổ NMR của hợp chất HT1 và hợp chất tham khảo

C	**$^{\#}\delta_C$**	**δ_C[a,b]**	**δ_H[a,c] (độ bội, *J* =Hz)**
1	145,3	146,4	-
2	107,3	108,0	6,15 (t, *J* = 2,0)
3	159,5	159,2	-
4	100,8	101,0	6,11 (t, *J* = 2,0)
5	159,5	159,2	-
6	107,3	108,0	6,15 (t, *J* = 2,0)
1'	36,8	37,0	2,45 (t, *J* = 7,5)
2'	32,2	32,4	1,57 (m)
3'	30,4	30,7	1,33 (m)

4'	30,7	30,8	1,33 (m)
5'	30,2	30,3	1,33 (m)
6'	30,2	30,3	1,33 (m)
7'	28,0	28,1	2,03(m)
8'	130,5	130,8	5,35 (t, *J* = 4,5)
9'	130,5	130,8	5,35 (t, *J* = 4,5)
10'	28,0	28,1	2,03 (m)
11'	30,2	30,3	1,33 (m)
12'	30,2	30,3	1,33 (m)
13'	30,7	30,8	1,33 (m)
14'	30,4	30,7	1,33 (m)
15'	32,2	32,4	1,57(m)
16'	36,8	37,0	2,45 (t, *J* = 7,5)
1"	145,3	146,4	-
2"	107,3	108,0	6,15 (t, *J* = 2,0)
3"	159,5	159,2	-
4"	100,8	101,0	6,11 (t, *J* = 2,0)
5"	159,5	159,2	-
6"	107,3	108,0	6,15 (t, *J* = 2,0)

[a]methanol-d_4, [b]125MHz, [c]500MHz, [#]δ_C số liệu của hợp chất (*Z*)-5,5'-(hexadec-8-ene-1,16-diyl)bis(benzene-1,3-diol) đo trong methanol-d_4

** Phân tích xác định cấu trúc:*

Hợp chất **HT1** thu được từ phần dịch chiết ethyl acetate dưới dạng bột vô định hình màu trắng sau khi tiến hành phân lập qua các cột sắc ký pha thường, pha đảo và HPLC điều chế. Trên phổ khối lượng phân giải cao HR-MS của hợp chất **HT1** xuất hiện pic ion giả phân tử tại *m/z* 463,2799 $[M+Na]^+$. Kết quả này phù hợp với số khối của ion $[C_{28}H_{40}O_4Na]^+$ với tính toán lý thuyết là 463,2824. Qua đó, có thể xác định công thức phân tử của hợp chất **HT1** là $C_{28}H_{40}O_4$ với sai số Δ = -5,4 ppm.

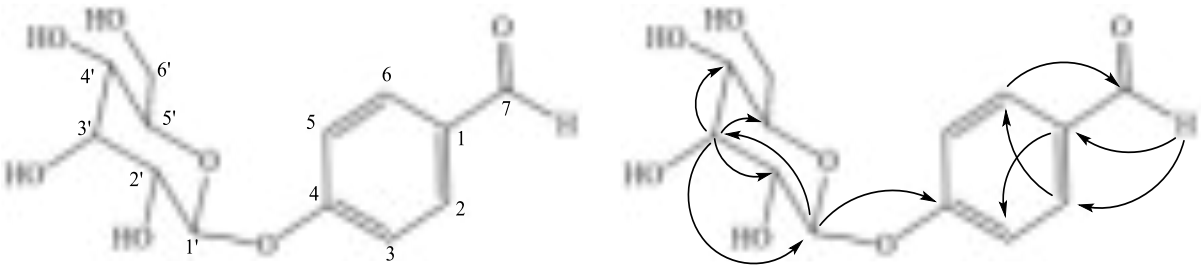
Phổ ^{1}H-NMR của hợp chất **HT1** xuất hiện các tín hiệu của 3 proton vòng thơm thế 1,3,5 và có tính đối xứng trục bậc 2 bởi hai proton chập nhau tại δ_H 6,15 (2H, s) và một proton tại δ_H 6,11 (s), tín hiệu của một nối đôi ngoài vòng xuất hiện tại δ_H 5,35

ppm, các tín hiệu sp^3 CH_2 còn lại được xác định trong khoảng δ_H 1,32-2,45. Kết quả phổ ^{13}C-NMR và HSQC cũng khẳng định rõ sự có mặt của vòng thơm thế 1,3,5 với sự xuất hiện của 4 tín hiệu carbon vòng thơm duy nhất tại δ_C 159,2 (C), 146,4 (C), 108,0 (CH) và 101,0 (CH), trong đó có 4 tín hiệu của nhóm thế phenol tại δC 159,2 ppm. Tiếp đến là tín hiệu của nối đôi tại δ_C 130,8 và 7 tín hiệu methylene tại δ_C 37,0, 32,4, 30,8, 30,5, 30,3, 30,2, 28,1.

Phổ khối phân giải cao xác định hợp chất có 28 nguyên tử carbon mà trên phổ chỉ xuất hiện tín hiệu của 14 nguyên tử và vị trí nối đôi chỉ có một proton δ_H 5,35 ứng với 1 carbon δ_C 130,8 chứng tỏ công thức này đối xứng tại vị trí nối đôi (đối xứng trục bậc hai), bởi vì nếu nối đôi nằm khác đi, tức là lệch khỏi vị trí đối xứng tương đối thì hai proton của nối đôi này sẽ cộng hưởng ở các độ dịch chuyển hóa học khác nhau. Nối đôi có cấu hình *Z* bởi hằng số tương tác *J* của proton nối đôi khá nhỏ (*J* = 4,5 Hz).

Như vậy, công thức phân tử của **HT1** là $C_{28}H_{40}O_4$ và có tên là *(Z)*-5,5'-(hexadec-8-ene-1,16-diyl)bis(benzene-1,3-diol), một hợp chất đã biết năm 1997.

Phụ lục 2.1.2. Xác định cấu trúc hợp chất HT2



Hình 2. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC chính của hợp chất HT2

** Tính chất và thông số phổ:*

+ Chất rắn vô định hình màu trắng

+ Phổ HR-ESI-MS *m/z* 319,0594 $[M+Cl]^-$

+ Tính toán lý thuyết cho công thức $[C_{13}H_{16}O_7Cl]^-$: 319,0585

+ Số liệu phổ ^{1}H NMR (500 MHz) và ^{13}C NMR (125 MHz) xem Bảng 2 và Phụ lục 3.2.1 & 3.2.2.

Bảng 2. Số liệu phổ NMR của HT2 và hợp chất tham khảo

C	**δ_C[a,b]**	**δ_H[a,c] (độ bội, *J* = Hz)**
1	130,4	-
2	131,6	7,86 (1H, d, *J* = 9,0)

3	111,4	7,18 (1H, d, *J* = 9,0)
4	162,4	-
5	111,4	7,18 (1H, d, *J* = 9,0)
6	130,4	7,86 (1H, d, *J* = 9,0)
7	191,4	9,89 (1H, s)
***β*-D-Allo**		
1′	98,1	5,25 (1H, d, *J* = 7,5)
2′	70,2	3,46 (1H, dd, *J* = 7,5, 3,0)
3′	71,4	3,95 (1H, t, *J* = 3,0)
4′	66,9	3,42 (1H, dd, *J* = 9,0, 3,0)
5′	74,8	3,73 (1H, ddd, *J* = 9,0, 5,5, 2,5)
6′	60,8	3,45 (1H, dd, *J* = 11,5, 5,5) 3,68 (1H, dd, *J* = 11,5, 2,5)

[a]DMSO-*d6*, [b]125MHz, [c]500MHz.

** Phân tích xác định cấu trúc:*

Hợp chất **HT2** nhận được dưới dạng chất rắn vô định hình màu trắng. Trên phổ khối lượng phân giải cao HR-MS của hợp chất **HT2** xuất hiện pic ion giả phân tử tại *m/z* 319,0594 $[M+Cl]^-$. Kết quả này phù hợp với số khối của ion $[C_{13}H_{16}O_7Cl]^-$ với tính toán lý thuyết là 319,0585. Qua đó, có thể xác định công thức phân tử của hợp chất **HT2** là $C_{13}H_{16}O_7$ với sai số Δ = 2,8 ppm.

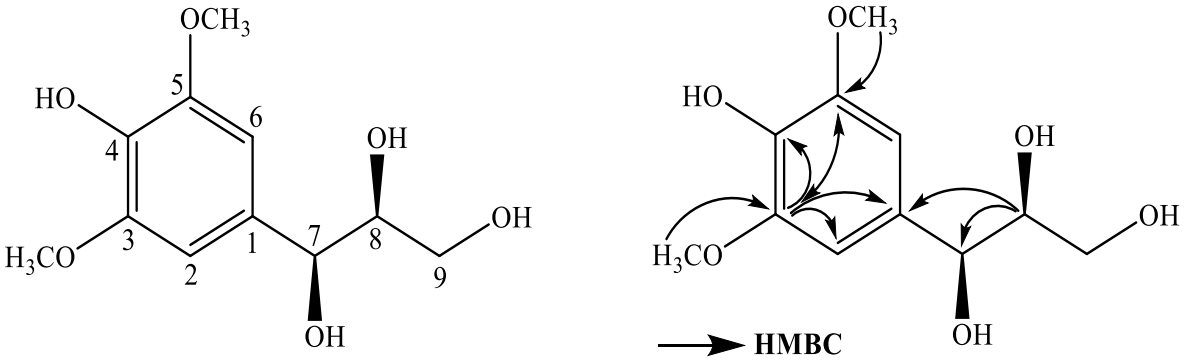
Trên phổ ^{1}H-NMR của hợp chất **HT2** xuất hiện 2 tín hiệu tại δ_H 7,86 (2H, d, *J* = 9,0 Hz) và 7,18 (2H, d, *J* = 9,0 Hz) chứng tỏ sự có mặt của một vòng thơm thế *para*, tín hiệu của nhóm andehyd tại δ_H 9,89 (1H, s). Ngoài ra, trên phổ ^{1}H-NMR còn xuất hiện các tín hiệu của một phân tử đường allose. Điển hình là tín hiệu proton anome xuất hiện tại δ_H 5,25 (1H, d, *J* = 7,5 Hz), hai tín hiệu của nhóm oximethylene xuất hiện tại δ_H 3,45 (1H, dd, *J* = 11,5, 5,5 Hz) và 3,68 (1H, dd, *J* = 11,5, 2,5 Hz), các tín hiệu khác của phân tử đường cộng hưởng trong vùng độ dịch chuyển hóa học từ 3,42 ppm đến 3,95 ppm.

Phổ ^{13}C-NMR và HSQC của hợp chất **HT2** xuất hiện 11 tín hiệu của 13 nguyên tử carbon. Trong đó có 4 tín hiệu đặc trưng cho vòng thơm thế *para* tại δ_C 162,4, 131,6 x 2, 130,4 và 111,4 x 2; tín hiệu carbon andehyd tại δ_C 191,4; và 6 tín hiệu carbon của phân tử đường allose xuất hiện tại δ_C 98,1, 70,2, 71,4, 66,9, 74,8 và 60,8.

Các giá trị độ dịch chuyển hóa học của proton tương ứng với từng nguyên tử carbon được xác định nhờ phổ HSQC. Phân tử đường allose được xác định gắn vào vị trí C-4 của vòng thơm thông qua tương tác HMBC giữa proton H-1′ (δ_H 5,25) với

carbon C-4 (δ_C 162,4). Nhóm andehyd được xác định gắn vào C-1 của vòng thơm thông qua tương tác HMBC giữa H-7 (δ_H 9,89) với carbon C-1 (δ_C 130,4). Điều này cũng minh họa rõ thêm cấu trúc hóa học của hợp chất **HT2** như được chỉ ra trên Hình 2. Giá trị hằng số tương tác giữa H-1′ và H-2′ của phân tử đường (J = 7,5 Hz) chứng tỏ cả hai proton này đều chiếm các vị trí *axial*, tức là liên kết *β* giữa phân tử đường với aglycon. Phân tích kiểu tương tác spin giữa các proton của phân tử đường allose cũng như giá trị hằng số tương tác J cho thấy H-3′ xuất hiện dưới dạng triplet với hằng số tương tác khá nhỏ (J = 3,0 Hz) chứng tỏ H-3′ phải chiếm vị trí *equatorial*, đúng với cấu hình của đường allose. Từ những biện luận nêu trên, hợp chất **HT2** được xác định là helicide.

Phụ lục 2.1.3. Xác định cấu trúc hợp chất HT3



Hình 3. Cấu trúc hóa học của hợp chất HT3

** Tính chất và thông số phổ:*

+ Bột kết tinh không màu

+ Phổ HR-ESI-MS *m/z* 243,0871 $[M-H]^-$

+ Tính toán lý thuyết cho công thức $[C_{11}H_{15}O_6]^-$: 243,0869

+ Số liệu phổ ^{1}H NMR (500 MHz) và ^{13}C NMR (125 MHz) xem Bảng 3 và Phụ lục 3.3.1 & 3.3.2.

Bảng 3. Số liệu phổ NMR của HT3 và hợp chất tham khảo

C	**$^{\#}\delta_C$**	**$\delta_C^{a,b}$**	**$\delta_H^{a,c}$ (độ bội, J = Hz)**
1	134,1	134,1	-
2	104,1	105,3	6,71 (1H, s)
3	147,4	149,1	-
4	133,4	134,1	-
5	147,4	149,1	-
6	104,1	105,3	6,71 (1H, s)

7	72,9	75,6	4,55 (1H, d, *J* = 6,0)
8	75,8	77,6	3,68 (1H, m)
9	62,5	64,3	3,40 (1H, dd, *J* = 11,5, 5,0 Hz) 3,53 (1H, dd, *J* = 11,5, 4,0 Hz)
3,5-OMe	56,4	56,9	3,87 (3H, s)

[a] methanol-d_4, [b]125MHz, [c]500MHz, [#]δ_C số liệu của hợp chất *threo*-syringylglycerol trong DMSO-*d6*

** Phân tích xác định cấu trúc:*

Hợp chất **HT3** được phân lập từ phân đoạn HTN2A. Trên phổ khối lượng phân giải cao HR-MS của hợp chất **HT3** xuất hiện pic ion giả phân tử tại *m/z* 243,0871 $[M-H]^-$. Kết quả này phù hợp với số khối của ion $[C_{11}H_{15}O_6]^-$ với tính toán lý thuyết là 243,0869. Qua đó, có thể xác định công thức phân tử của hợp chất **HT3** là $C_{11}H_{16}O_7$ với sai số Δ = 0,8 ppm.

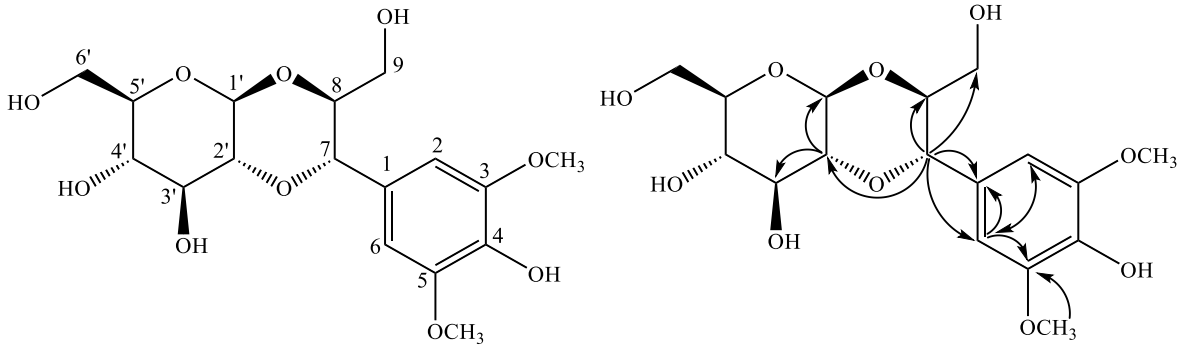
Phổ ^{1}H-NMR của hợp chất **HT3** xuất hiện tín hiệu singlet tại δ_H 6,71 với cường độ tích phân tương ứng với 2H cho thấy sự có mặt của một vòng thơm thế tại 4 vị trí và có trục đối xứng bậc 1. Cùng với đó là sự xuất hiện tín hiệu của hai nhóm methoxy tại δ_H 3,87 (6H, s) chứng tỏ hai nhóm methoxy này gắn vào vòng thơm và nằm ở hai vị trí đối xứng nhau nên hai nhóm methoxy đã bị chập vào nhau hoàn toàn. Tín hiệu của nhóm oxymethylene tại δ_H 3,40 (1H, dd, *J* = 11,5, 5,0 Hz)/ 3,53 (1H, dd, *J* = 11,5, 4,0 Hz) và 2 tín hiệu nhóm oxymethine tại δ_H 4,55 (1H, d, *J* = 6,0 Hz), 3,68 (1H, m).

Phổ ^{13}C-NMR của hợp chất **HT3** xuất hiện 8 tín hiệu của 11 nguyên tử carbon, 4 tín hiệu đặc trưng cho vòng thơm đối xứng bậc 1 vì vòng thơm đối xứng trục bậc 1 nên có 2 cặp tín hiệu carbon chập vào nhau tại δ_C 104,1 và 147,4 và hai tín hiệu còn lại chập nhau tại tại δ_C 134,1. Nhóm methoxy tại δ_C 56,8, nhóm oxymethylene tại δ_C 64,3 và 2 nhóm oxymethine tại δ_C 77,6, 75,6.

Kết hợp so sánh với tài liệu tham khảo, nhận thấy số liệu hợp chất **HT3** phù hợp với cấu trúc của hợp chất *erythro*-syringylglycerol hoặc *threo*-syringylglycerol. Theo nghiên cứu của nhóm tác giả Maoluo Gan và cộng sự, cấu hình của một số aglycons tương tự hợp chất HT3 sẽ là dạng *erythro*- khi $\Delta\ \delta_{C7-C8} < 1,0$ ppm, còn sẽ là dạng *threo* khi $\Delta\ \delta_{C7-C8} \geq 2,0$ pp. Trong trường hợp của hợp chất **HT3**, giá trị này là 2,0, do đó cấu hình của hợp chất này có dạng *thero*.

Như vậy, có thể khẳng định rằng cấu trúc hóa học của hợp chất **HT3** được xác định là *threo*-syringylglycerol.

Phụ lục 2.1.4. Xác định cấu trúc hợp chất HT4



Hình 4. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC chính của hợp chất HT4

** Tính chất và thông số phổ:*

+ Bột vô định hình màu trắng

+ Phổ HR-ESI-MS *m/z*: 406,1699 $[M+NH_4]^+$

+ Tính toán lý thuyết cho công thức $[C_{17}H_{28}NO_{10}]^+$: 406,1713

+ Số liệu phổ ^1H NMR (500 MHz) và ^{13}C NMR (125 MHz) xem Bảng 4 và Phụ lục 3.4.2 và 3.4.3.

Bảng 4. Số liệu phổ NMR của HT4 và hợp chất tham khảo

C	$^{\#}\delta_C$	δ_C[a,b]	δ_H[a,c] **(độ bội, *J* = Hz)**
1	129,3	129,3	-
2	106,3	106,3	6,73 (1H, s)
3	149,2	149,2	-
4	136,9	137,0	-
5	149,2	149,2	-
6	106,3	106,3	6,73 (1H, s)
7	80,4	80,5	4,47 (1H, d, *J* = 9,5)
8	82,5	82,6	3,82 (1H, m)
9	62,1	62,1	3,42 (1H, m)
3,5-OMe	56,9	56,9	3,85 (3H, s)
***β*-D-Glc**			
1′	99,7	99,8	4,62 (1H, d, *J* = 7,5)
2′	80,8	80,8	3,17 (1H, dd, *J* = 9,0, 7,5)
3′	75,0	75,1	3,61 (1H, t, *J* = 9,0)
4′	71,9	71,9	3,43 (1H, t, *J* = 9,0)

5′	79,8	79,8	3,50 (m)
6′	62,5	62,6	3,74 (1H, dd, J = 12,0, 5,5) 3,94 (1H, dd, J = 12,0, 2,5)

[a]methanol-d_4, [b]125MHz, [c]500MHz, [#]δ_C số liệu của ficuscarpanoside B đo trong methanol-d_4

** Phân tích xác định cấu trúc:*

Hợp chất **HT4** được phân lập dưới dạng bột vô định hình màu trắng. Trên phổ khối lượng phân giải cao HR-MS của hợp chất **HT4** xuất hiện pic ion giả phân tử tại *m/z* 406,1699 $[M+NH_4]^+$. Kết quả này phù hợp với số khối của ion $[C_{17}H_{28}NO_{10}]^+$ với tính toán lý thuyết là 406,1713. Qua đó, cho phép xác định công thức phân tử của hợp chất **HT4** là $C_{17}H_{24}O_{10}$ với sai số Δ = -3,4 ppm.

Phổ ^{1}H-NMR của hợp chất **HT4** xuất hiện tín hiệu singlet tại δ_H 6,73 với cường độ tích phân tương ứng với 2H cho thấy sự có mặt của một vòng thơm thế tại 4 vị trí và có trục đối xứng bậc 1. Cùng với sự xuất hiện tín hiệu của hai nhóm methoxy tại δ_H 3,85 (6H, s) chứng tỏ hai nhóm methoxy này gắn vào vòng thơm và nằm ở hai vị trí đối xứng nhau nên hai nhóm methoxy đã bị chập vào nhau hoàn toàn. Phân tử đường được nhận dạng bởi tín hiệu proton anome tại δ_H 4,62 (1H, d, J = 7,5 Hz), các tín hiệu còn lại của hai phân tử đường xuất hiện trong vùng có độ dịch chuyển hóa học từ 3,17 – 3,94 ppm.

Phổ ^{13}C-NMR cùng với phổ HSQC của hợp chất **HT4** khẳng định sự có mặt 14 tín hiệu của 17 nguyên tử carbon, 4 tín hiệu đặc trưng cho vòng thơm đối xứng bậc 1 vì vòng thơm đối xứng trục bậc 1 nên có 2 cặp tín hiệu carbon chập vào nhau tại δ_C 106,3 và 149,2 và hai tín hiệu còn lại tại δ_C 137,0 và 129,3; hai nhóm methoxy tại δ_C 56,9x2, nhóm oxymethylene tại δ_C 62,1; 6 tín hiệu carbon còn lại thuộc phân tử đường glucose (có thêm liên kết glycoside tại C-2′) tại δ_C 99,8, 80,8, 75,1, 71,9, 79,8 và 62,6. Qua đó có thể dự đoán rằng phân tử **HT4** gồm hai phần là phần đường và phần syringoylglycerol.

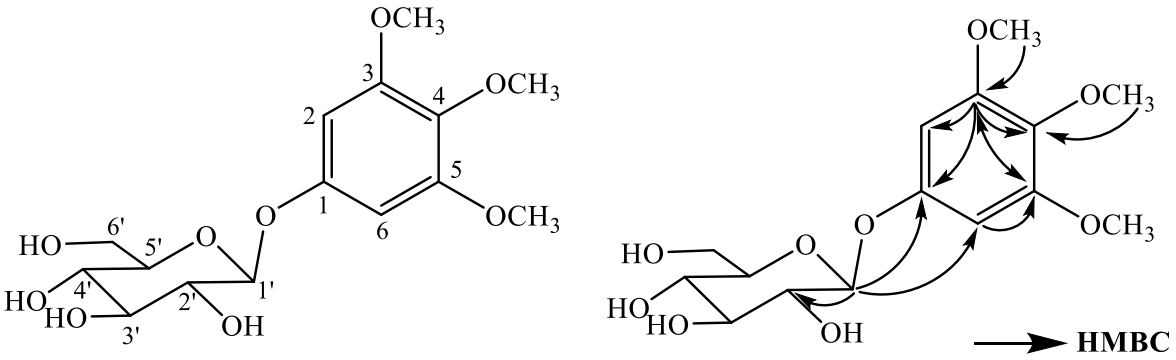
Tương tác HMBC giữa H-7 (δ_H 4,47) với C-1/C-2/C-6/C-8/C-9/C-2’ và giữa H-2 (δ_H 6,73) với C-1/C-4/C-5/C-7 giúp xác định được vị trí carbon C-7 C-8 và C-9.

So sánh dữ liệu phổ với tài liệu tham khảo, nhận thấy cấu trúc của hợp chất **HT4** hoàn toàn phù hợp với hợp chất ficuscarpanoside B. Tương tác HMBC giữa proton H-7 (δ_H 4,47 với C-2′ (δ_C 80,8)/C-1 (δ_C 129,3)/C-2 (δ_C 106,3)/C-8 (δ_C 82,6)/C-9

(δ_C 62,1), giữa proton methoxy (δ_H 3,85) với C-3, C-5 (δ_C 149,2). Đồng thời có sự xuất hiện tương tác HMBC giữa proton H-2, H-6 (δ_H 6,72) với C-1 (δ_C 129,3)/C-3/C-4 (δ_C 137,0)/C-7 (δ_C 80,4) giúp khẳng định chính xác các vị trí C-7, C-8, C-9, của vòng thơm và hai nhóm methoxy gắn với vòng thơm tại vị trí đối xứng C-3 và C-5.

Từ các dữ kiện phổ và phân tích nêu trên, có thể khẳng định rằng cấu trúc hóa học của hợp chất **HT4** được xác định là ficuscarpanoside B.

Phụ lục 2.1.5. Xác định cấu trúc hợp chất HT5



Hình 5. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC chính của hợp chất HT5

** Tính chất và thông số phổ:*

+ Chất rắn vô định hình màu trắng

+ Phổ HR-ESI-MS *m/z*: 381,0954 $[M+Cl]^-$

+ Tính toán lý thuyết cho công thức $C_{15}H_{22}ClO_9$: 381,0952

+ Số liệu phổ ^1H NMR (500 MHz) và ^{13}C NMR (125 MHz) xem Bảng 5 và Phụ lục 3.5.2 & 3.5.3.

Bảng 5. Số liệu phổ NMR của HT5 và hợp chất tham khảo

C	**$^{\#}\delta_C$**	**$\delta_C^{a,b}$**	**$\delta_H^{a,c}$ (độ bội, *J* = Hz)**
1	156,2	156,0	-
2	96,2	96,2	6,51 (s)
3	154,9	154,8	-
4	134,6	134,5	-
5	154,9	154,8	-
6	96,2	96,2	6,51 (s)
3,5-OCH_3	56,7	56,6	3,83 (s)
4-OCH_3	61,4	61,2	3,72 (s)

β-D-Glc			
1′	103,3	103,2	4,80 (d, 7,5)
2′	75,1	75,0	3,30-3,49
3′	78,2	78,1	3,30-3,49
4′	71,8	71,7	3,30-3,49
5′	78,6	78,4	3,30-3,49
6′	62,9	62,7	3,93 (dd, 12,0, 2,0) 3,69 (dd, 12,0, 6,5)

[a]methanol-d_4, [b]125MHz, [c]500MHz, [#]δ_C số liệu của 3,4,5-trimethoxyphenyl-β-D-glucopyranoside đo trong methanol-d_4

** Phân tích xác định cấu trúc:*

Hợp chất **HT5** nhận được dưới dạng chất rắn vô định hình màu trắng. Trên phổ khối lượng phân giải cao HR-MS của hợp chất **HT5** xuất hiện pic ion giả phân tử tại *m/z* 381,0954 $[M+Cl]^-$. Kết quả này phù hợp với số khối của ion $[C_{15}H_{22}O_9Cl]^-$ với tính toán lý thuyết là 381,0952. Qua đó, cho phép xác định công thức phân tử của hợp chất **HT5** là $C_{15}H_{22}O_9$ (với sai số là Δ = 0,5 ppm).

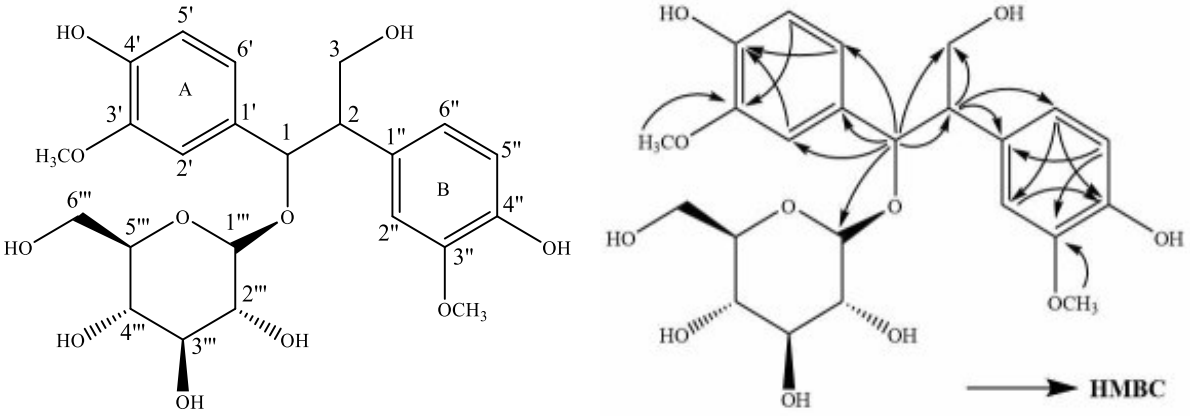
Phổ ^{1}H-NMR của hợp chất **HT5** xuất hiện tín hiệu singlet tại δ_H 6,51 với cường độ tích phân tương ứng với 2H cho thấy sự có mặt của một vòng thơm thế tại 4 vị trí và có trục đối xứng bậc 1. Cùng với sự xuất hiện tín hiệu của hai nhóm methoxy tại δ_H 3,83 (6H, s) chứng tỏ hai nhóm methoxy này gắn vào vòng thơm và nằm ở hai vị trí đối xứng nhau nên hai nhóm methoxy đã bị chập vào nhau hoàn toàn và nhóm methoxy tại δ_H 3,72 (3H, s) gắn vào vòng thơm tại vị trí số 4. Ngoài ra, trên phổ ^{1}H-NMR còn xuất hiện các tín hiệu của một phân tử đường glucose. Điển hình là tín hiệu proton gắn với carbon anome xuất hiện tại δ_H 4,85 (1H, d, J = 7,5 Hz), hai tín hiệu của nhóm oxymethylen xuất hiện tại δ_H 3,69 (1H, dd, J = 12,0, 6,5 Hz) và 3,94 (1H, dd, J = 12,0, 2,0 Hz). Các tín hiệu khác của phân tử đường cộng hưởng trong vùng độ dịch chuyển hóa học từ 3,30 ppm đến 3,49 ppm.

Phổ ^{13}C-NMR của hợp chất **HT5** xuất hiện 12 tín hiệu của 15 nguyên tử carbon, 4 tín hiệu đặc trưng cho vòng thơm đối xứng bậc 1 vì vòng thơm đối xứng trục bậc 1 nên có 2 cặp tín hiệu carbon chập vào nhau tại δ_C 96,2 và 154,8 và hai tín hiệu còn lại tại δ_C 156,0 và 134,5. Sáu tín hiệu carbon của phân tử đường glucose xuất hiện tại δ_C

103,2, 75,0, 78,1, 71,7, 78,4 (5 x CH_2) và 62,7 (CH_2), tín hiệu của nhóm methoxy được nhận ra tại δ_C 61,2 và 56,6.

Với kết quả phân tích nêu trên và kết hợp so sánh dữ liệu phổ tài liệu tham khảo, nhận thấy hợp chất **HT5** và hợp chất 3,4,5-trimethoxyphenyl-*β*-D-glucopyranoside hoàn toàn tương ứng về giá trị phổ NMR của vòng thơm thế 1,3,4,5 và phân tử đường glucopyranose (Bảng 5). Như vậy, hợp chất **HT5** được xác định là 3,4,5-trimethoxyphenyl-*β*-D-glucopyranoside.

Phụ lục 2.1.6. Xác định cấu trúc hợp chất HT6



Hình 6. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC chính của hợp chất HT6

** Tính chất và thông số phổ:*

+ Chất rắn vô định hình màu trắng;

+ Phổ HR-ESI-MS *m/z*: 317,1478 $[M+Cl]^-$

+ Tính toán lý thuyết cho công thức $C_{23}H_{30}ClO_{11}$: 317,1477

+ Số liệu phổ ^1H NMR (500 MHz) và ^{13}C NMR (125 MHz) xem Bảng 6 và Phụ lục 3.6.2 và 3.6.3.

Bảng 6. Số liệu phổ NMR của HT6 và hợp chất tham khảo

C	**$^{\#}\delta_C$**	**$\delta_C^{a,b}$**	**$\delta_H^{a,c}$ (độ bội, *J* = Hz)**
1	78,8	79,2	5,82 (1H, d, *J* = 4,5)
2	55,5	56,1	2,96 (1H, m)
3	64,0	64,2	4,10 (1H, dd, *J* = 10,5, 8,0) 3,68 (*)
1′	132,9	132,8	-
2′	112,3	112,7	6,70 (1H, d, *J* = 2,0)

3′	148,2	148,5	-
4′	146,7	146,7	-
5′	115,8	115,5	6,65 (1H, d, *J* = 8,0)
6′	120,8	121,3	6,68 (1H, dd, *J* = 8,0, 2,0)
1″	131,2	131,5	-
2″	114,6	115,0	6,67 (1H, d, *J* = 2,0)
3″	147,9	148,2	-
4″	146,6	146,1	-
5″	115,7	115,3	6,69 (1H, d, *J* = 8,0)
6″	123,3	123,6	6,57 (1H, dd, *J* = 8,0, 2,0)
***β*-D-Glc**			
1‴	102,7	101,4	4,17 (1H, d, *J* = 7,5)
2‴	75,3	75,3	3,30 (1H, dd, *J* = 9,0, 7,5)
3‴	79,1	78,3	3,25 (1H, t, *J* = 9,0)
4‴	72,6	72,1	3,27 (1H, t, *J* = 9,0)
5‴	78,1	77,8	3,19 (m)
6‴	63,5	63,1	3,67 (*) 3,90 (1H, dd, *J* = 12,0, 2,5)
3’-OMe	55,7	56,2	3,66 (3H, s)
3’’-OMe	55,7	56,4	3,75 (3H, s)

[a]methanol-d_4, [b]125MHz, [c]500MHz, [*)]tín hiệu bị che lấp, [#]δ_C số liệu của của hovetrichoside A đo trong pyridine-d_5.

* *Phân tích xác định cấu trúc:*

Hợp chất **HT6** thu được dưới dạng chất rắn vô định hình màu trắng. Trên phổ khối lượng phân giải cao HR-MS của hợp chất **HT6** xuất hiện pic ion giả phân tử tại *m/z* 317,1478 $[M+Cl]^-$. Kết quả này phù hợp với số khối của ion $[C_{23}H_{30}O_{11}Cl]^-$ với tính toán lý thuyết là 317,1477. Qua đó, cho phép xác định công thức phân tử của hợp chất **HT6** là $C_{23}H_{30}O_{11}$ (với sai số là Δ = 0,3 ppm).

Trên phổ cộng hưởng từ hạt nhân proton ^{1}H-NMR của **HT6** xuất hiện tín hiệu 6 tín hiệu tương tác theo hệ ABX tại δ_H 6,68 (1H, dd, *J* = 8,0, 2,0 Hz), 6,65 (1H, d, *J* =

8,0 Hz) và 6,70 (1H, d, *J* = 2,0 Hz); 6,57 (1H, dd, *J* = 8,0, 2,0 Hz), 6,69 (1H, d, *J* = 8,0 Hz) và 6,67 (1H, d, *J* = 2,0 Hz) chứng tỏ sự có mặt của hai vòng thơm thế tại các vị trí 1,3,4. Tín hiệu của 2 nhóm methoxy tại δ_H 3,66 (3H, s), 3,75 (3H, s), tín hiệu của 1 proton anome tại δ_H 4,17 (1H, d, *J* = 7,5 Hz) và các tín hiệu khác của phân tử đường có độ dịch chuyển hóa học từ 3,19-3,90 ppm.

Phân tích phổ carbon ^{13}C-NMR và HSQC thấy xuất hiện 23 tín hiệu carbon bao gồm 6 carbon không liên kết trực tiếp với hydro tại δ_C 148,5, 148,2, 146,7, 146,1, 132,8 và 131,5; 6 carbon methine của vòng thơm ở δ_C 123,6, 121,3, 115,7, 115,5, 115,0 và 112,7; 2 carbon methine tại δ_C 79,2, 56,1; 1 carbon oxymethylene tại δ_C 64,2, 6 carbon của phân tử đường glucose tại δ_C 101,4, 75,3, 78,3, 72,1, 77,8 và 63,1; 2 nhóm methoxy tại δ_C 56,4 và 56,2. So sánh số liệu với tài liệu tham khảo, nhận thấy hợp chất **HT6** tương tự như hợp chất hovetrichoside A.

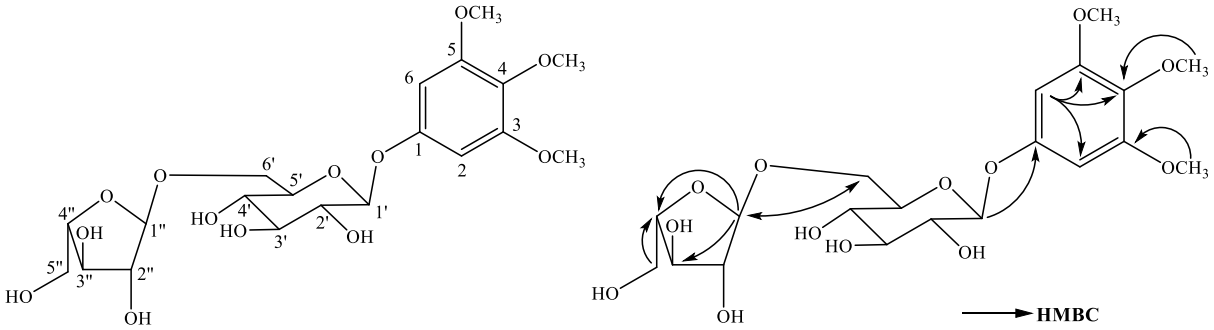
Tương tác HMBC giữa proton methoxy (δ_H 3,66) với C-3′ (δ_C 148,5), đồng thời có sự xuất hiện tương tác HMBC giữa proton H-2′ (δ_H 6,70) với C-4′ (δ_C 146,7), giữa proton H-5′ (δ_H 6,65) với C-3′, giữa proton H-6′ (δ_H 6,68) với C-4′, giữa proton H-1 (δ_H 5,28) với C-1′ (δ_C 132,8)/C-2′ (δ_C 112,7)/C-6′ (δ_C 121,3) giúp gắn chính xác giá trị các vị trí của vòng A, khẳng định nhóm methoxy gắn với vòng A tại vị trí C-3′ và vòng A liên kết trực tiếp với C-1.

Tương tác giữa H-1 với C-1‴ (δ_C 101,4) giúp xác định phân tử đường gắn với vị trí C-1 qua cầu oxy. Tương tác HMBC giữa proton methoxy (δ_H 3,75) với C-3 ″ (δ_C 148,2), đồng thời có sự xuất hiện tương tác HMBC giữa proton H-2'' (δ_H 6.67) với C-4″ (δ_C 146,1), giữa proton H-5″ (δ_H 6,69) với C-1″ (δ_C 131,5)/C-3″, giữa proton H-6′, (δ_H 6,57) với C-4″/C-2″ (δ_C 115,0), giữa proton H-2 (δ_H 2,96) với C-1″ /C-6″/C-3 (δ_C 64,2) giúp gắn chính xác giá trị các vị trí của vòng B, khẳng định nhóm methoxy gắn với vòng B tại vị trí C-3″ và vòng B liên kết trực tiếp với C-2.

So sánh với dữ liệu của tài liệu tham khảo, chất HT6 có cấu trúc tương tự chất hovetrichoside A hoặc chất hovetrichoside B. Xét giá trị độ dịch chuyển δ_C tại vị trí C-1, giá trị này tương ứng với giá trị δ_C 78,8 của cấu hình hợp chất hovetrichoside A, nhỏ hơn giá trị δ_C của C-1 (δ_C 82,3) trong cấu hình của hợp chất hovetrichoside B.

Từ những phân tích trên kết hợp với so sánh dữ liệu của tài liệu tham khảo, có thể khẳng định hợp chất **HT6** được xác định là hovetrichoside A.

Phụ lục 2.1.7. Xác định cấu trúc hợp chất HT7



Hình 7. **Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC chính của hợp chất HT7**

** Tính chất và thông số phổ:*

+ Chất rắn màu trắng

+ Phổ HR-ESI-MS *m/z*: 496,2024 $[M+NH_4]^+$

+ Tính toán lý thuyết cho công thức $C_{20}H_{34}NO_{13}$: 496,2030

+ Số liệu phổ ^1H NMR (500 MHz) và ^{13}C NMR (125 MHz) xem Bảng 7 và Phụ lục 3.7.2 & 3.7.3.

Bảng 7. Số liệu phổ NMR của HT7 và hợp chất tham khảo

C	**$^{\#}\delta_C$**	**δ_C[a,b]**	**δ_H[a,c] (Độ bội, *J* = Hz)**
1	155,2	155,9	-
2,6	95,4	96,3	6,48 (2H, s)
3,5	154,4	154,8	-
4	133,7	134,6	-
3,5-OMe	57,1	56,8	3,84 (6H, s)
4-OMe	61,4	61,2	3,73 (3H, s)
***β*-D-Glc**			
1′	102,0	103,0	4,82 (*)
2′	74,4	74,9	3,54 (1H, dd, *J* = 9,0, 7,5)
3′	77,7	77,8	3,47 (1H, t, *J* = 9,0)
4′	71,5	71,8	3,36 (1H, t, *J* = 9,0)
5′	76,7	76,9	3,63 (m)
6′	68,4	68,1	4,12 (1H, dd, *J* = 12,0, 1,5) 3,60 (1H, dd, *J* = 12,0, 3,0)

α-L-Ara(f)			
1″	109,6	109,9	4,94 (1H, d, *J* = 1,5)
2″	83,4	83,3	3,98 (1H, dd, *J* = 3,0, 1,5)
3″	78,5	78,9	3,84 (1H, dd, *J* = 9,0, 3,0)
4″	85,1	85,8	3,95 (m)
5″	62,2	63,0	3,74 (1H, dd, *J* = 12,0, 3,0) 3,62 (*)

Đo trong [a]methanol-*d*4, [b]125 MHz, [c]500 MHz, [*)]tín hiệu bị lấp, [#]δ_C của rhyncosede C đo trong DMSO-*d6*

** Phân tích xác định cấu trúc:*

Hợp chất **HT7** nhận được dưới dạng chất rắn vô định hình màu trắng. Trên phổ khối lượng phân giải cao HR-MS của hợp chất **HT7** xuất hiện pic ion giả phân tử tại *m/z* 496,2024 $[M+NH_4]^+$. Kết quả này phù hợp với số khối của ion $[C_{20}H_{34}NO_{13}]^+$ với tính toán lý thuyết là 496,2030. Qua đó, cho phép xác định công thức phân tử của hợp chất **HT7** là $C_{20}H_{30}O_{13}$ với sai số Δ = -1,2 ppm.

Trên phổ ^{1}H-NMR của hợp chất **HT7** xuất hiện ở vùng trường thấp với tín hiệu tại δ_H 6,48 (2H, s) gợi ý sự có mặt của một vòng thơm thứ hai thế tại các vị trí 1,3,4,5. Hai phân tử đường được nhận dạng bởi hai tín hiệu proton anome tại δ_H 4,82 và 4,94 (1H, d, *J* = 1,5 Hz), các tín hiệu còn lại của hai phân tử đường xuất hiện trong vùng có độ dịch chuyển hóa học từ 3,36 – 4,11 ppm. Hai tín hiệu singlet của nhóm methoxy tại δ_H 3,84 (6H, s) và 3,73 (3H, s).

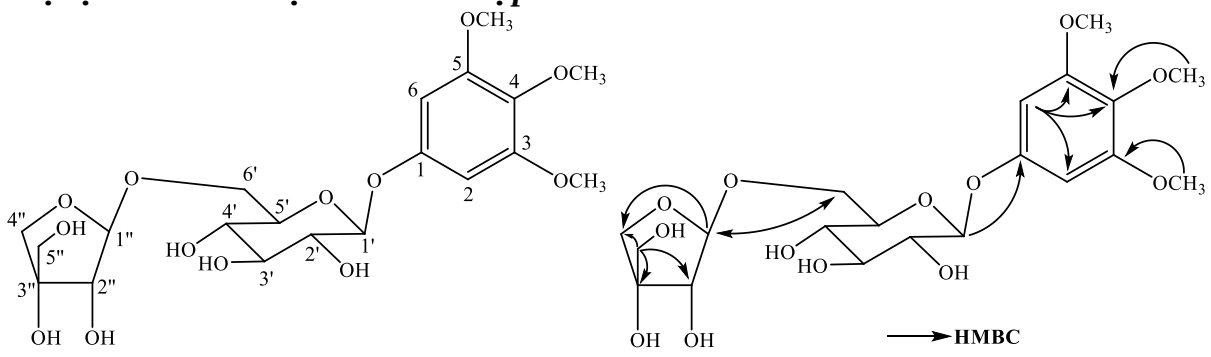
Phổ ^{13}C-NMR cùng với phổ HSQC của hợp chất **HT7** khẳng định sự có mặt của 17 tín hiệu đặc trưng cho 20 nguyên tử carbon, trong đó 4 tín hiệu đặc trưng cho 6 nguyên tử carbon của một vòng thơm thế 1,3,4,5 tại δ_C 155,9, 154,8 x 2, 134,6 và 96,3 x 2, 2 tín hiệu của ba nhóm methoxy tại δ_C 61,2 và 56,8 x 2. 11 tín hiệu carbon còn lại thuộc về hai phân tử đường, trong đó hai carbon anome đặc trưng tại δ_C 103,1 và 109,9 và hai carbon oximethylen tại δ_C 68,1 và 63,0. Sự dịch chuyển về phía trường thấp hơn của carbon oximethylen tại δ_C 68,1 chứng tỏ rằng nhóm oximethylen này đã được gắn vào một phân tử đường thông qua cầu oxy. Sự hình thành liên kết này còn được chứng minh bằng tương tác HMBC giữa proton H-6′ (δ_H 4,12/3,60) của phân tử đường thứ nhất với carbon anome tại δ_C 109,9. Đồng thời có sự xuất hiện tương tác HMBC giữa

proton anome tại δ_H 4,82 với C-1 (δ_C 155,9) của vòng thơm thế 1,3,4,5 giúp xác định phân tử đường này gắn với vòng thơm thế 1,3,4,5 tại vị trí C-1 qua cầu oxy.

Các giá trị độ dịch chuyển hóa học của vòng thơm được xác định nhờ các tương tác HSQC và HMBC. Trên phổ HSQC, tín hiệu proton H-2 tại δ_H 6,48 tương tác với carbon C-2 tại δ_C 96,3 và tương tác HMBC của H-2 với C-3 (δ_C 154,4)/C-4 (δ_C 134,6)/C-1, giữa proton nhóm methoxy tại δ_H 3,84 với C-3, C-5, giữa proton của nhóm methoxy tại δ_H 3,73 với C-4 đã khẳng định giá trị tương ứng trong vòng thơm thế 1,3,4,5 và các nhóm methoxy lần lượt gắn vào C-3/C-4/C-5 của vòng thơm thế 1,3,4,5. Tương tự như vậy, các giá trị độ dịch chuyển hóa học của proton và carbon còn lại được xác định chính xác nhờ phân tích phổ hai chiều HSQC và HMBC, đồng thời khẳng định trật tự nối giữa hai phân tử đường với vòng thơm được chỉ ra trên Hình 7.

Với kết quả phân tích nêu trên và kết hợp so sánh dữ liệu phổ tài liệu tham khảo, nhận thấy hợp chất **HT7** và hợp chất rhyncosede C hoàn toàn tương ứng về giá trị phổ NMR của vòng thơm thế 1,3,4,5 và hai phân tử đường, trong đó có một đường arafuranose và một đường glucopyranose (Bảng 7). Như vậy, hợp chất **HT7** được xác định là **rhyncoside C**.

Phụ lục 2.1.8. Xác định cấu trúc hợp chất HT8



Hình 8. Cấu trúc hóa học của hợp chất HT8 và các tương tác HMBC chính

** Tính chất và thông số phổ:*

+ Chất rắn vô kết tinh màu trắng

+ Phổ HR-ESI-MS *m/z*: 496,2025 $[M+NH_4]^+$

+ Tính toán lý thuyết cho công thức $C_{20}H_{34}NO_{13}$: 496,2030

+ Số liệu phổ ^1H NMR (500 MHz) và ^{13}C NMR (125 MHz) xem Bảng 8 và Phụ lục 3.8.2 & 3.8.3.

Bảng 8. **Số liệu phổ NMR của HT8 và hợp chất tham khảo**

C	**$^{\#}\delta_C$**	**$\delta_C^{a,b}$**	**$\delta_H^{a,c}$ (độ bội, *J* = Hz)**
1	156,2	155,9	-
2,6	96,3	96,4	6,48 (2H, s)
3,5	154,8	154,8	-
4	134,6	134,7	-
3,5-OMe	56,7	56,7	3,83 (6H, s)
4-OMe	61,3	61,2	3,72 (3H, s)
***β*-D-Glc**			
1′	103,2	103,2	4,82 (1H, d, *J* = 7,5)
2′	74,9	74,9	3,40 (1H, dd, *J* = 9,0, 7,5)
3′	77,9	77,9	3,48 (m)
4′	71,6	71,6	3,35 (m)
5′	77,0	77,0	3,61 (m)
6′	68,8	68,7	4,06 (1H, d, *J* = 9,0) 3,83 (1H, d, *J* = 9,0)
***β*-D-Api**			
1″	110,9	110,9	4,99 (1H, d, *J* = 2,5)
2″	77,9	87,9	3,89 (1H, d, *J* = 2,5)
3″	80,5	80,5	-
4″	74,9	74,9	3,97 (1H, d, *J* = 9,5) 3,76 (1H, d, *J* = 9,5)
5″	65,3	65,4	3,57 (1H, s)

[a]methanol-d_4, [b]125 MHz, [c]500 MHz, [*)] tín hiệu bị lấp, [#]δ_C của 3,4,5-trimethoxyphenyl *β*-D-apiofuranosyl-(1″-6′)-*β*-D-glucopyranoside đo trong methanol-d_4

** Phân tích xác định cấu trúc:*

Hợp chất **HT8** thu được dưới dạng chất rắn kết tinh màu trắng. Trên phổ khối lượng phân giải cao HR-MS của hợp chất **HT8** xuất hiện pic ion giả phân tử tại *m/z* 496,2025 $[M+NH_4]^+$. Kết quả này phù hợp với số khối của ion $[C_{20}H_{34}NO_{13}]^+$ với tính toán lý thuyết là 496,2030. Qua đó, cho phép xác định công thức phân tử của hợp chất **HT8** là $C_{20}H_{30}O_{13}$ (với sai số là Δ = -1,0 ppm).

Trên phổ ^{1}H-NMR của hợp chất **HT8** xuất hiện ở vùng trường thấp với tín hiệu tại δ_H 6,48 (2H, s) gợi ý sự có mặt của một vòng thơm thứ hai thế tại các vị trí 1,3,4,5. Hai phân tử đường được nhận dạng bởi hai tín hiệu proton anome tại δ_H 4,82 (1H, d, *J*

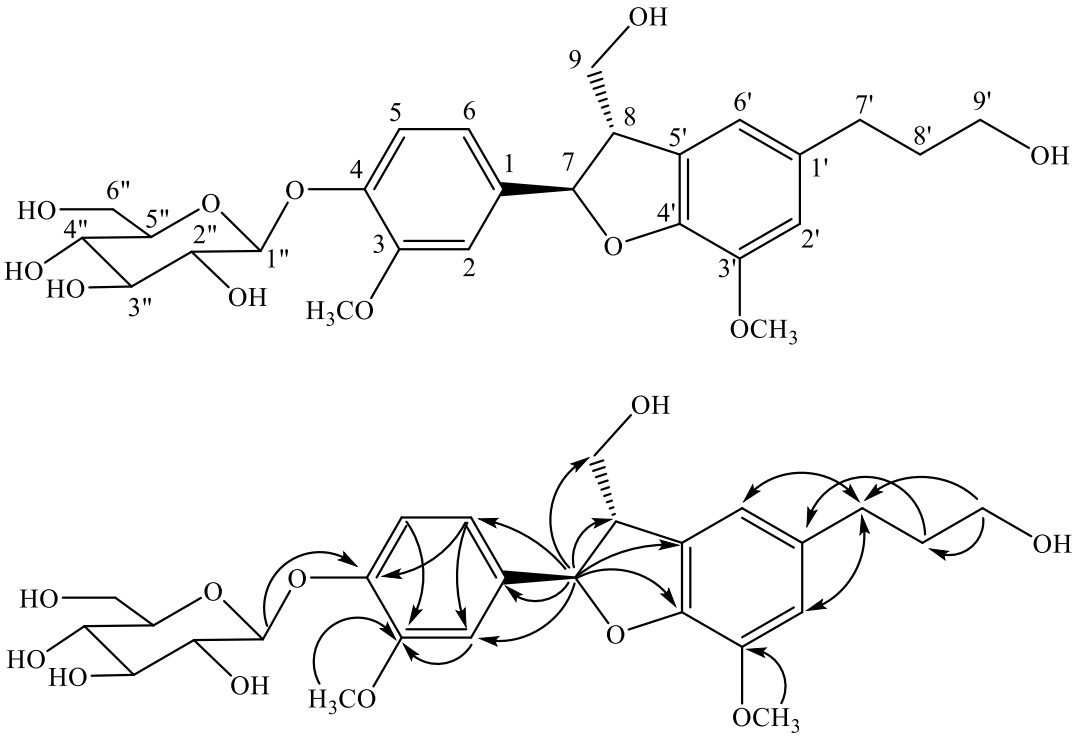
= 7,5 Hz)và 4,99 (1H, d, J = 2,5 Hz), các tín hiệu còn lại của hai phân tử đường xuất hiện trong vùng có độ dịch chuyển hóa học từ 3,35-4,09 ppm. Hai tín hiệu singlet của nhóm methoxy tại δ_H 3,83 (6H, s) và 3,72 (3H, s).

Phổ ^{13}C-NMR cùng với phổ HSQC của hợp chất **HT8** khẳng định sự có mặt của 17 tín hiệu đặc trưng cho 20 nguyên tử carbon, trong đó 4 tín hiệu đặc trưng cho 6 nguyên tử carbon của một vòng thơm thế 1,3,4,5 tại δ_C 155,9, 154,8 x 2, 134,7 và 96,4 x 2, 2 tín hiệu của ba nhóm methoxy tại δ_C 61,2 và 56,8 x 2. 11 tín hiệu carbon còn lại thuộc về hai phân tử đường, trong đó hai carbon anome đặc trưng tại δ_C 103,1 và 110,9 và hai carbon oximethylen tại δ_C 74,9, 68,7 và 65,4. Sự dịch chuyển về phía trường thấp hơn của carbon oximethylen tại δ_C 68,7 chứng tỏ rằng nhóm oximetHylen này đã được gắn vào một phân tử đường thông qua cầu oxy. Sự hình thành liên kết này còn được chứng minh bằng tương tác HMBC giữa proton H-6′ (δ_H 4,06/3,83) của phân tử đường thứ nhất với carbon anome tại δ_C 110,9. Đồng thời có sự xuất hiện tương tác HMBC giữa proton anome tại δ_H 4,82 với C-1 (δ_C 155,9) của vòng thơm thế 1,3,4,5 giúp xác định phân tử đường này gắn với vòng thơm thế 1,3,4,5 tại vị trí C-1 qua cầu Oxy. Các giá trị độ dịch chuyển hóa học của vòng thơm được xác định nhờ các tương tác HSQC và HMBC.

Trên phổ HSQC, tín hiệu proton H-2 tại δ_H 6,48 tương tác với carbon C-2 tại δ_C 96,4 và tương tác HMBC của H-2 với C-3 (δ_C 154,8)/C-4 (δ_C 134,7)/C-1, giữa proton nhóm methoxy tại δ_H 3,83 với C-3, C-5, giữa proton của nhóm methoxy tại δ_H 3,72 với C-4 đã khẳng định giá trị tương ứng trong vòng thơm thế 1,3,4,5 và các nhóm methoxy lần lượt gắn vào C-3/C-4/C-5 của vòng thơm thế 1,3,4,5. Tương tự như vậy, các giá trị độ dịch chuyển hóa học của proton và carbon còn lại được xác định chính xác nhờ phân tích phổ hai chiều HSQC và HMBC, đồng thời khẳng định trật tự nối giữa hai phân tử đường với vòng thơm được chỉ ra trên Hình 8.

Với kết quả phân tích nêu trên và kết hợp so sánh dữ liệu phổ tài liệu tham khảo, nhận thấy hợp chất **HT8** và hợp chất 3,4,5-trimethoxyphenyl β-D-apiofuranosyl-(1″-6′)-β-D-glucopyranoside hoàn toàn tương ứng về giá trị phổ NMR của vòng thơm thế 1,3,4,5 và hai phân tử đường, trong đó có một đường apiarafuranose và một đường glucopyranose (Bảng 8). Như vậy, hợp chất **HT8** được xác định là 3,4,5-trimethoxyphenyl-β-D-apiofuranosyl-(1″-6′)-β-D-glucopyranoside.

Phụ lục 2.1.9. Xác định cấu trúc hợp chất HT10



Hình 9. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC chính của hợp chất HT10

** Tính chất và thông số phổ:*

+ Bột vô định hình màu trắng

+ Phổ HR-ESI-MS *m/z*: 557,1793 $[M+Cl]^-$

+ Tính toán lý thuyết cho công thức $[C_{26}H_{34}ClO_{11}]^-$: 557,1790

+ Số liệu phổ ^1H NMR (500 MHz) và ^{13}C NMR (125 MHz) xem Bảng 9 và Phụ lục 3.10.2 & 3.10.3.

***Bảng 9.* Số liệu phổ NMR của HT10 và hợp chất tham khảo**

C	$^{\#}\delta_C$	δ_C[a,b]	δ_H[a,c] (độ bội, *J* = Hz)
1	138,4	138,4	-
2	111,2	111,3	7,05 (1H, d, *J* = 2,0)
3	150,9	151,0	-
4	147,6	147,6	-
5	118,2	118,1	7,16 (1H, d, *J* = 8,0)
6	119,4	119,4	6,95 (1H, dd, *J* = 8,0, 2,0)
7	88,5	88,5	5,57 (1H, d, *J* = 6,0)
8	55,6	55,7	3,47 (1H, m)

9	61,5	65,1	3,85 (1H, m) 3,76 (1H, m)
1’	137,1	137,1	-
2’	114,3	114,3	6,75 (1H, s)
3’	145,2	145,3	-
4’	147,5	147,5	-
5’	129,6	129,6	-
6’	118,0	118,0	6,74 (1H, s)
7’	32,9	32,9	2,65 (2H, t, *J* = 6,5)
8’	35,8	35,8	1,84 (2H, m)
9’	62,2	62,2	3,59 (2H, t, *J* = 6,5)
***β*-D-Glc**			
1’’	102,8	102,8	4,90 (1H, d, *J* = 7,5)
2’’	74,4	74,9	3,50 (*)
3’’	78,2	78,2	3,40 (*)
4’’	71,3	71,4	3,40 (*)
5’’	77,8	77,9	3,35 (1H, m)
6’’	62,5	62,5	3,87 (1H, dd, *J* = 12,0, 2,5) 3,70 (1H, dd, *J* = 12,0, 5,5)
3-OMe	56,7	56,7	3,85 (3H, s)
3’-OMe	56,8	56,8	3,89 (3H, s)

[a]methanol-d_4, [b]125MHz, [c]500MHz, [*)]tín hiệu bị che lấp, [#]δ_C số liệu của của chất tham khảo đo trong methanol-d_4

** Phân tích xác định cấu trúc:*

Hợp chất **HT10** cũng nhận được dưới dạng bột vô định hình màu trắng. Trên phổ khối lượng phân giải cao HR-MS của hợp chất **HT10** xuất hiện pic ion giả phân tử tại *m/z* 557,1793 $[M+Cl]^-$. Kết quả này phù hợp với số khối của ion $[C_{26}H_{34}ClO_{11}]^-$ với tính toán lý thuyết là 557,1790. Qua đó, cho phép xác định công thức phân tử của hợp chất **HT10** là $C_{26}H_{34}O_{11}$ với sai số Δ = 0,5 ppm.

Trên phổ cộng hưởng từ hạt nhân proton ^{1}H-NMR của **HT10** xuất hiện ở vùng trường thấp với 5 tín hiệu đặc trưng của các vòng thơm từ 6,74 – 7,17 ppm. Trong đó, 3 tín hiệu tương tác theo hệ ABX tại δ_H 6,95 (1H, dd, *J* = 8,0, 2,0 Hz), 7,16 (1H, d, *J* =

8,0 Hz) và 7,05 (1H, d, J = 2,0 Hz) chứng tỏ sự có mặt của vòng thơm thế tại các vị trí 1,3,4, 2 tín hiệu vòng thơm khác tại δ_H 6,74 (1H, s), 6,75 (1H, s). tín hiệu của 2 nhóm methoxy tại δ_H 3,85 (3H, s), 3,89 (3H, s), tín hiệu của 1 proton anome tại δ_H 4,90 (1H, d, J = 7,5 Hz) và các tín hiệu khác của phân tử đường có độ dịch chuyển hóa học từ 3,35 – 3,87 ppm.

Phân tích phổ carbon ^{13}C-NMR và HSQC thấy xuất hiện 24 tín hiệu carbon bao gồm 7 carbon không liên kết trực tiếp với hydro tại δ_C 151,0, 147,6, 147,5, 145,3, 138,4, 137,1 và 139,6, 7 carbon methine tại δ_C 119,4, 118,1, 118,0, 114,3, 111,3, 88,5 và 55,7, 4 carbon methylene tại δ_C 65,1, 62,2, 35,8 và 32,9, 6 carbon của phân tử đường glucose tại δ_C 102,8, 74,9, 78,2, 71,4, 77,9, và 62,5, 2 nhóm methoxy tại δ_C 56,8 và 56,7.

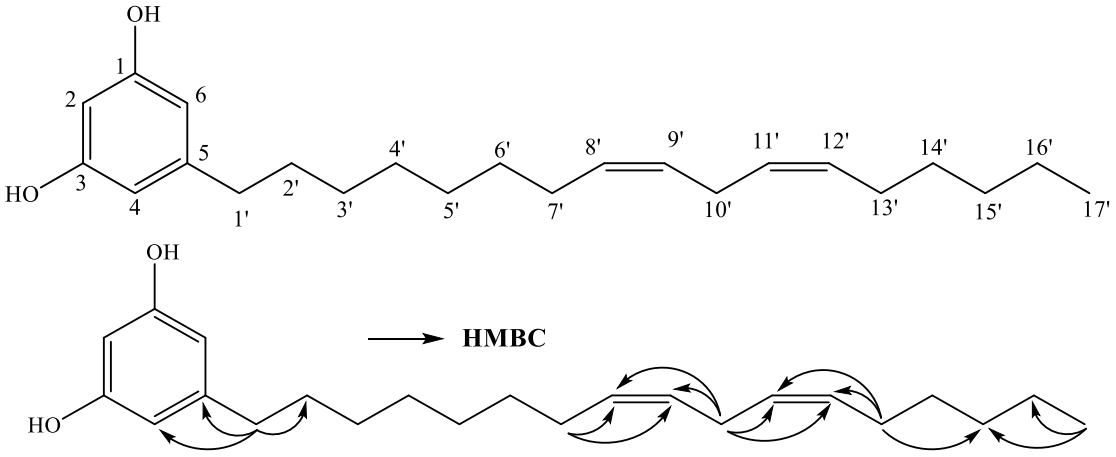
Tương tác HMBC giữa proton methoxy (δ_H 3,85) với C-3 (δ_C 151,8), giữa proton H-2 (δ_H 7,05) với C-4 (δ_C 147,6), giữa proton H-5 (δ_H 7,16) với C-3/C-1 (δ_C 138,4), giữa proton H-6 (δ_H 6,95) với C-4/C-2/C-1, giữa proton anome H-1″ (δ_H 4,90) với C-4 giúp gắn chính xác giá trị các vị trí của vòng thế 1,3,4, khẳng định nhóm methoxy gắn với vòng thơm này tại vị trí C-3 và phân tử đường gắn vào vị trí C-4, Tương tác HMBC giữa proton methoxy (δ_H 3,89) với C-3′ (δ_C 145,3), giữa proton H-6′ (δ_H 6,67) với C-7′ (δ_C 32,9), giữa proton H-7 (δ_H 5,57) với C-1/C-8 (δ_C 55,7)/C-9 (δ_C 65,1)/C4′ (δ_C 147,5)/C-5′(δ_C 129,6), giữa proton H-7′, (δ_H 2,65) với C-4′/C-2′(δ_C 114,3), giữa proton H-9′ (δ_H 3,59) với C-8′ (δ_C 35,8)/C-7′, giữa proton H-8′ (δ_H 1,84) với C-1′ (δ_C 137,1) giúp gắn chính xác giá trị các vị trí từ C-7 đến C-9, từ C-1′ đến C-9′ và khẳng định nhóm methoxy gắn với vòng thơm tại vị trí C-3′.

Từ những phân tích trên kết hợp với tài liệu tham khảo, có thể thấy rằng hợp chất **HT10** được xác định có cấu trúc tương đồng với các hợp chất dihydrodehydrodiconeferyl alcohol 4-*O*-*β*-D-glucopyranoside. Tiến hành đo phổ CD của hợp chất nghiên cứu, so sánh với phổ CD của các hợp chất dihydrodehydrodiconeferyl alcohol 4-*O*-*β*-D-glucopyranoside, thấy rằng phổ CD của chất HT10 tương đồng với phổ CD của *7R,8S*-dihydrodehydrodiconeferyl alcohol 4-*O*-*β*-D-glucopyranoside.

Như vậy, hợp chất **HT10** là *7R,8S*-dihydrodehydrodiconeferyl alcohol 4-*O*-*β*-D-glucopyranoside.

Phụ lục 2.2. Phân tích xác định các hợp chất phân lập từ loài Bàn tay ma đỏ *(H. terminalis)*

Phụ lục 2.2.1. Xác định cấu trúc hợp chất HL1



Hình 10. Cấu trúc hóa học của hợp chất HL1 và các tương tác HMBC chính

** Tính chất và thông số phổ:*

+ Chất dầu không màu

+ Phổ HR-ESI-MS *m/z*: 343,2628 $[M-H]^-$

+ Tính toán lý thuyết cho công thức $[C_{23}H_{35}O_2]^-$: 343,2637

+ Số liệu phổ ^{1}H-NMR (500 MHz) và ^{13}C-NMR (125 MHz) xem Bảng 10 và Phụ lục 2.11.2 & 2.11.3.

Bảng 10. Số liệu phổ NMR của hợp chất HL1 và hợp chất tham khảo

C	**$^{\#}\delta_C$**	**$\delta_C^{a,b}$**	**$\delta_H^{a,c}$ (độ bội, *J* = Hz)**
1	156,6	159,3	-
2	100,1	101,0	6,14 (t, *J* = 2,0)
3	156,6	159,3	-
4	108,0	107,9	6,10 (t, *J* = 2,0)
5	146,1	146,3	-
6	108,0	107,9	6,14 (t, *J* = 2,0)
1′	35,8	37,0	2,46 (t, *J* = 7,5)
2′	31,0	32,7	1,59 (m)
3′	29,2	30,3	1,35 (m)

4′	29,2	30,5	1,35 (m)
5′	29,3	30,5	1,35 (m)
6′	29,4	30,5	1,35 (m)
7′	27,2	28,2	2,07 (dt, *J* = 7,0, 7,0)
8′	130,1	130,9	5,36 (m)
9′	127,9	129,1	5,36 (m)
10′	25,6	26,5	2,80 (t, *J* = 6,5)
11′	128,0	129,1	5,36 (m)
12′	130,2	130,9	5,36 (m)
13′	27,2	28,2	2,07 (dt, *J* = 7,0, 7,0)
14′	29,6	30,7	1,35 (m)
15′	31,5	32,7	1,32 (m)
16′	22,5	23,6	1,34 (m)
17′	14,3	14,4	0,92 (t, *J* = 7,0)

[a]methanol-d_4, [b]125MHz, [c]500MHz, [#]δ_C số liệu của hợp chất (8'Z,11'Z)-5-(heptadeca-8',11'-dienyl)benzene-l,3-diol đo trong chloroform-d_1

** Phân tích xác định cấu trúc:*

Hợp chất **HL1** cũng thu được từ phần dịch chiết ethyl acetate dưới dạng chất dầu không màu sau khi tiến hành phân lập qua các cột sắc ký pha thường, pha đảo và HPLC điều chế. Trên phổ khối lượng phân giải cao HR-MS của hợp chất **HL1** xuất hiện pic ion giả phân tử tại *m/z* 343,2628 [M-H]- (tính toán lí thuyết cho công thức phân tử $C_{23}H_{35}O_2$: 343,2637) cho phép xác định công thức phân tử của hợp chất **HL1** là $C_{23}H_{36}O_2$ với sai số Δ = -2,6 ppm.

Phổ ^{1}H-NMR của hợp chất **HL1** xuất hiện các tín hiệu của 3 proton vòng thơm có độ dịch chuyển hóa học từ δ_H 6,10-6,14 ppm, tín hiệu của hai nối đôi ngoài vòng xuất hiện về phía trường cao (δ_H 5,36) so với vòng thơm, 1 tín hiệu methyl triplet tại δ_H 0,92, các tín hiệu CH_2 còn lại được xác định trong khoảng δ_H 1,29-2,80. Phổ ^{13}C-NMR và HSQC của hợp chất **HL1** khẳng định sự có mặt của vòng thơm thế 1,3,5 tại δ_C 159,3 x 2, 107,9 x 2 và 146,3, 101,0 , hai nối đôi được khẳng định tại δ_C 130,9 x 2,

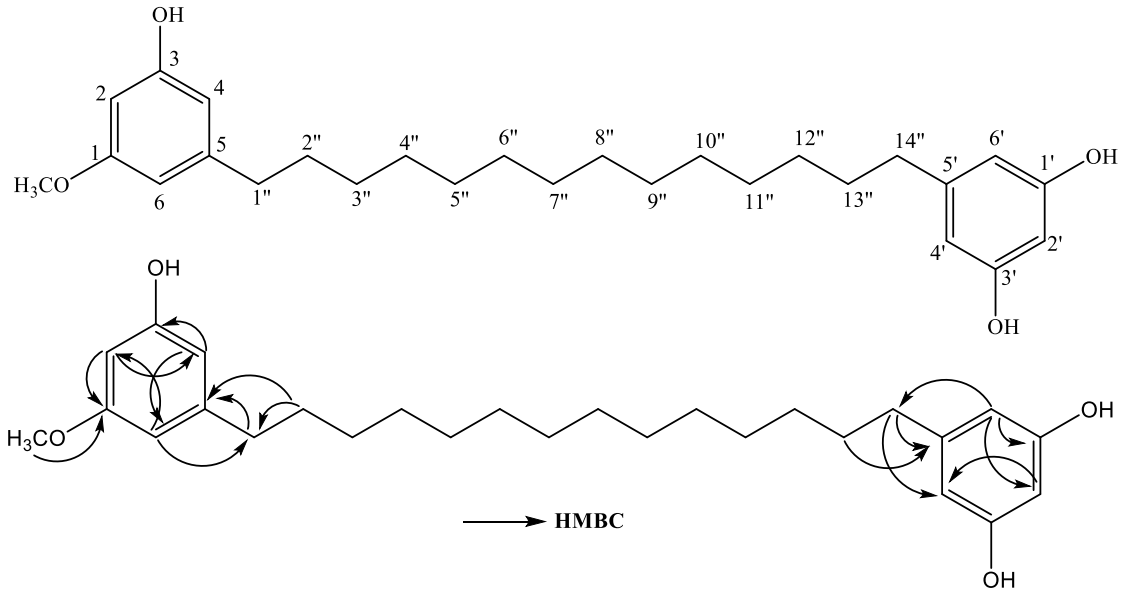
129,1 x 2, một mạch dài gồm 12 nhóm CH_2 và một nhóm CH_3. Bốn giá trị độ dịch chuyển hóa học của hai nối đôi này rất gần nhau nhưng lai không bị chập thành hai cặp tín hiệu, chứng tỏ chúng không hoàn toàn đối xứng mà chỉ nằm ở vị trí rất gần đối xứng.

Trên phổ HMBC xuất hiện tương tác giữa H-1′ với C-4/C-5/C-6/C-2′ và giữa H-4 với C-1′ giúp xác định lần lượt vị trí C-1′ và C-2′. Việc xác định vị trí của hai nôi đôi được xác định thông qua tương tác trên phổ hai chiều HSQC và HMBC. Trước hết, trên phổ ^{1}H-NMR xuất hiện tín hiệu ^{1}H tại H-10′ (δ_C 2,80), trong khi đó trên phổ HSQC lại xác định tín hiệu này là của một nhóm CH_2. Do đó, nhóm CH_2 này phải nằm ở vị trí giữa của mạch dài. Mặt khác, phổ HMBC cũng xuất hiện tương tác rất rõ giữa các proton của nhóm CH_2 này với carbon của nối đôi tại H-8′, H-12′ (δ_C 130,9) và H-9′, H-11′ (δ_C 129,1) và trên phổ COSY xuất hiện tương tác giữa H-9′-H-10′-H-11′. Như vậy hai nối đôi này phải nằm ngay cạnh nhóm methylene giữa mạch. Tương tác HMBC giữa H-7′ với C-8′/C-9′, giữa H-13′ với C-11′/C-12′ và tương tác COSY giữa H-7′ với H-8′, giữa H-13′ với H-12′ giúp xác định giá trị tại vị trí C-7′ và C-13′. Tương tác HMBC giữa H-17′ với C-16′/C-15′, giữa H-13′ với C-15′ giúp xác định được vị trí C-13′, C-14′, C-15′, C-16′, C-17′. Đây là 1 bên nhánh gồm 4 nhón CH_2 và 1 nhóm CH_3 đầu mạch. Phổ khối lượng phân giải cao khẳng định công thức phân tử của hợp chất **HL1** là $C_{23}H_{36}O_2$. Như vậy, trừ 6 carbon của vòng thơm thì mạch dài vẫn gồm 17C với nhóm CH_2 kẹp giữa hai nối đôi và ở vị trí trung tâm của nhánh mạch dài và 1 bên nhóm gồm 4 nhóm CH_2 và 1 nhóm CH_3 đầu mạch. Theo đó, bên mạch dài còn lại là một nhánh có 7 nhóm CH_2. Điều này đã tạo ra các cặp tín hiệu của nối đôi không giống nhau hoàn toàn như của một phân tử đối xứng.

Từ các kết quả phân tích trên kết hợp với so sánh tài liệu tham khảo, hợp chất **HL1** có cấu trúc hoàn toàn phù hợp với cấu trúc của hợp chất (8'Z,11'Z)-5-(heptadeca-8',11'-dienyl)benzene-l,3-diol. Việc gán các giá trị dịch chuyển hóa học của hợp chất **HL1** với kết quả tham khảo đã công bố cho hợp chất (8'Z,11'Z)-5-(heptadeca-8',11'-dienyl)benzene-l,3-diol cũng khẳng định thêm điều này.

Như vậy có thể khẳng định rằng hợp chất **HL1** được xác định là (8'Z,11'Z)-5-(heptadeca-8',11'-dienyl)benzene-l,3-diol.

Phụ lục 2.2.2. Xác định cấu trúc hợp chất HL2



Hình 11. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC chính của hợp chất HL2

** Tính chất và thông số phổ:*

+ Chất bột màu trắng, vô định hình

+ Phổ HR-ESI-MS *m/z*: m/z 451,2791 $[M+Na]^+$

+ Tính toán lý thuyết cho công thức $[C_{27}H_{40}O_4Na]^+$: 451,2824

+ Số liệu phổ ^{1}H-NMR (500 MHz) và ^{13}C-NMR (125 MHz) xem Bảng 11 và Phụ lục 3.12.2 & 3.12.3.

Bảng 11. Số liệu phổ NMR của hợp chất HL2 và hợp chất tham khảo

C	$^{\#}\delta_C$	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ **(độ bội, *J* = Hz)**
1	160,7	162,2	-
2	98,7	99,7	6,19 (t, *J* = 2,0)
3	156,4	159,3	-
4	107,9	109,0	6,24 (t, *J* = 2,0)
5	145,8	146,4	-
6	106,8	106,6	6,24 (t, *J* = 2,0)
1′	156,6	159,3	-
2′	100,1	101,0	6,10 (t, *J* = 2,0)
3′	156,6	159,3	-
4′	108,0	108,0	6,14 (t, *J* = 2,0)

5′	146,2	146,4	-
6′	108,0	108,0	6,14 (t, *J* = 2,0)
1″	36,0	37,1	2,49 (t, *J* = 7,5)
2″	31,1	32,4	1,58 (m)
3″	29,2-29,6	30,3	1,33 (m)
4″	29,2-29,6	30,6	1,30 (m)
5″	29,2-29,6	30,7	1,30 (m)
6″	29,2-29,6	30,7	1,30 (m)
7″	29,2-29,6	30,7	1,30 (m)
8″	29,2-29,6	30,7	1,30 (m)
9″	29,2-29,6	30,7	1,30 (m)
10″	29,2-29,6	30,7	1,30 (m)
11″	29,2-29,6	30,6	1,30 (m)
12″	29,2-29,6	30,3	1,33 (m)
13″	31,1	32,4	1,58 (m)
14″	35,8	37,0	2,45 (t, *J* = 7,5)
1-OMe	55,2	55,5	3,74 (s)

[a]methanol-d_4, [b]125MHz, [c]500MHz, [#]δ_C số liệu của của bisgravillol đo trong chloroform-d_1

** Phân tích xác định cấu trúc:*

Hợp chất **HL2** nhận được từ phần dịch chiết ethyl acetate dưới dạng chất bột màu trắng vô định hình. Trên phổ khối lượng phân giải cao HR-MS của hợp chất **HL2** xuất hiện pic ion giả phân tử tại *m/z* 451,2791 $[M+Na]^+$. Kết quả này phù hợp với số khối của ion $[C_{27}H_{40}O_4Na]^+$ với tính toán lý thuyết là 451,2824. Qua đó, cho phép xác định công thức phân tử của hợp chất **HL2** là $C_{27}H_{40}O_4$ với sai số Δ = -7,3 ppm.

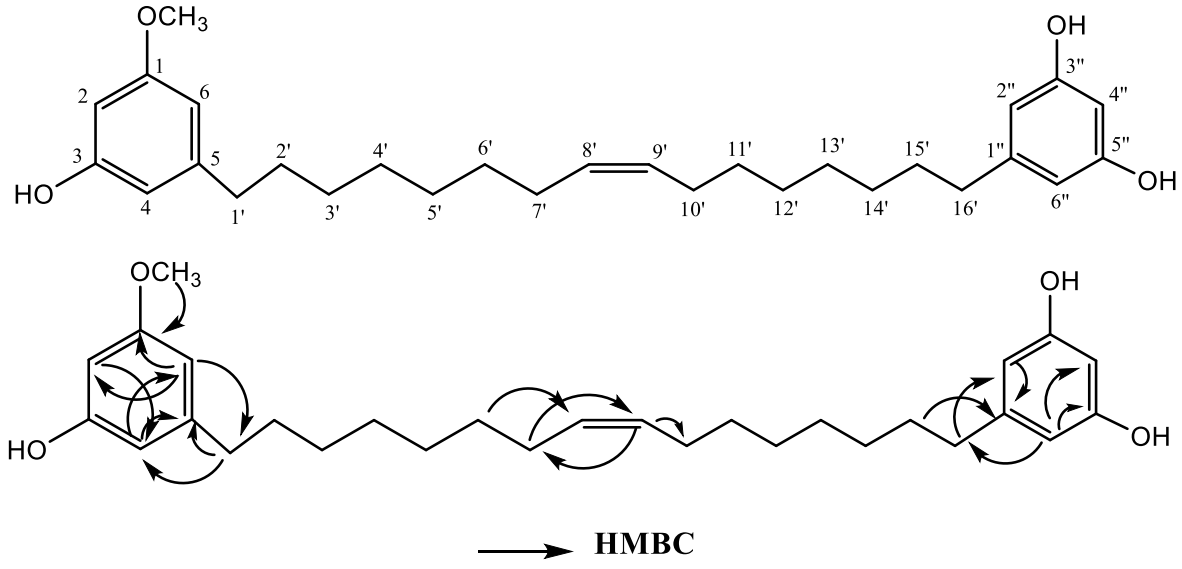
Phổ ^{1}H-NMR của hợp chất **HL2** xuất hiện tín hiệu của 6 proton vòng thơm tại δ_H 6,24 (2H, dd, *J* = 2,0, 2,0 Hz), 6,19 (1H, dd, *J* = 2,0, 2,0 Hz), 6,14 (2H, d, *J* = 2,0 Hz), 6,09 (1H, t, *J* = 2,0 Hz). Tín hiệu của một nhóm methoxy tại δ_H 3,74, tín hiệu của 14 nhóm CH_2 xuất hiện tại δ_H 2,50 (2H, t, *J* = 7,5 Hz), 2,45 (2H, t, *J* = 7,5 Hz), 1,59 (4H, m), δ_H 1,30-1,33 (20H).

Phổ ^{13}C-NMR cùng với phổ hai chiều HSQC khẳng định rõ thêm sự có mặt của hai vòng thơm và một mạnh thẳng nối hai vòng thơm với nhau qua 14 nhóm CH_2 mạch dài vì không có nhóm methyl nào. Xem xét tính đối xứng của hai vòng thơm thông qua phổ ^{1}H-NMR cũng như số lượng vạch carbon trên phổ ^{13}C-NMR cho thấy hai vòng thơm đều bị thế kiểu 1,3,5, trong đó một vòng có một nhóm methoxy.

Do đó, hợp chất **HL2** được dự đoán là bisgravillol có công thức phân tử là $C_{27}H_{40}O_4$. Kết quả phổ khối lượng phân giải cao cho thấy sự xuất hiện pic ion m/z 451,2791, hoàn toàn phù hợp với kết quả tính toán lý thuyết cho công thức $C_{27}H_{40}O_4Na$: 451,2824. Việc gán các giá trị độ dịch chuyển hóa học của của hợp chất **HL2** được tham khảo kết quả công bố cho hợp chất bisgravillol và phân tích trực tiếp phổ NMR của hợp chất này. Ngoài ra, kết quả xác định cấu trúc cũng như gán các giá trị phổ còn được xác định dựa vào phổ NMR hai chiều HSQC và HMBC.

Vậy hợp chất **HL2** được khẳng định là bisgravillol, hợp chất có tên khoa học là 5-(14-(3-hydroxy-5-methoxyphenyl)tetradecyl) benzene-1,3-diol.

Phụ lục 2.2.3. Xác định cấu trúc hợp chất HL3



Hình 12. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC chính của hợp chất HL3

** Tính chất và thông số phổ:*

+ Chất dầu không màu

+ Phổ HR-ESI-MS *m/z*: 477,2948 $[M+Na]^+$

+ Tính toán lý thuyết cho công thức $[C_{29}H_{42}O_4Na]^+$: 477,2981

+ Số liệu phổ ^{1}H NMR (500 MHz) và ^{13}C NMR (125 MHz) xem Bảng 12 và Phụ lục 3.13.2 & 3.13.3.

Bảng 12. Số liệu phổ NMR của HL3 và hợp chất tham khảo

C	**$^{\#}\delta_C$**	**δ_C[a,b]**	**δ_H[a,c] (độ bội, *J* = Hz)**
1	158,5	159,2	-
2	98,5	99,7	6,19 (t, *J* = 2,0 Hz)
3	161,0	162,2	-
4	105,4	106,6	6,24 (d, *J* = 2,0 Hz)
5	145,1	146,4	-
6	107,7	109,0	6,24 (d, *J* = 2,0 Hz)
1′	36,0	37,1	2,49 (t, *J* = 7,5 Hz)
2′	31,3	32,4	1,57 (m)
3′	28,7	30,2	1,33 (m)
4′	29,0	30,6	1,33 (m)
5′	29,1	30,8	1,33 (m)
6′	29,4	30,5	1,33 (m)
7′	26,9	28,1	2,03 (m)
8′	129,8	130,8	2,44 (dd, *J* = 5,5, 5,0 Hz)
9′	129,8	130,8	2,44 (dd, *J* = 5,5, 5,0 Hz)
10′	26,9	28,1	2,03 (m)
11′	28,7	30,5	1,33 (m)
12′	29,0	30,8	1,33 (m)
13′	29,1	30,6	1,33 (m)
14′	29,4	30,2	1,33 (m)
15′	31,3	32,4	1,57 (m)
16′	36,0	37,0	2,44 (t, *J* = 7,5 Hz)
1″	145,1	146,4	-
2″	106,9	108,6	6,15 (d, *J* = 2,0 Hz)
3″	158,5	159,2	-
4″	100,2	101,0	6,11 (t, *J* = 2,0 Hz)
5″	158,5	159,2	-
6″	106,9	108,6	6,15 (d, *J* = 2,0 Hz)
1-OMe	54,6	55,5	3,73 (s)

[a]methanol-d_4, [b]125MHz, [c]500MHz, $^{\#}\delta_C$ số liệu của của oncostemonol D đo trong acetone-d_6

** Phân tích xác định cấu trúc:*

Hợp chất **HL3** thu được từ phần dịch chiết ethyl acetate dưới dạng chất dầu không màu sau khi tiến hành phân lập qua các cột sắc ký pha thường, pha đảo và HPLC điều chế. Trên phổ khối lượng phân giải cao HR-MS của hợp chất **HL3** xuất hiện pic ion giả phân tử tại *m/z* 477,2948 $[M+Na]^+$. Kết quả này phù hợp với số khối của ion $[C_{29}H_{42}O_4Na]^+$ với tính toán lý thuyết là 477,2981. Qua đó, cho phép xác định công thức phân tử của hợp chất **HL3** là $C_{29}H_{42}O_4$ với sai số Δ = -6,9 ppm.

Phổ ^{1}H-NMR của hợp chất **HL3** xuất hiện các tín hiệu của 6 proton vòng thơm có độ dịch chuyển hóa học từ δ_H 6,10-6,25 ppm, tín hiệu của một nối đôi xuất hiện về phía trường cao hơn (δ_H 5,35) so với vòng thơm, tín hiệu của một nhóm methoxy được nhận ra tại δ_H 3,93 (3H, s), các tín hiệu CH_2 còn lại được xác định tại δ_H 2,49 (4H, m), 2,04 (4H, m), 1,55 (4H, m), 1,31 (16H, chồng lấp vào nhau).

Phổ ^{13}C-NMR của hợp chất **HL3** khẳng định sự có mặt của hai vòng thơm, một nối đôi và một mạch dài gồm 14 nhóm CH_2. Phân tích kỹ lưỡng sự tách vạch tương tác của các proton của hai vòng thơm với hằng số tương tác nhỏ (J = 2,0 Hz) và tính đối xứng của vòng thơm khi tín hiệu tại δ_H 6,15 có cường độ tích phân tương ứng là 2H, trong khi đó tín tín hiệu này xuất hiện trên phổ HSQC chí có tương tác với một giá trị carbon tại δ_C 108,0, cũng như cường độ pic carbon này cao gấp đôi các tín hiệu CH khác chứng tỏ sự chập nhau do tính đối xứng của vòng thơm này.

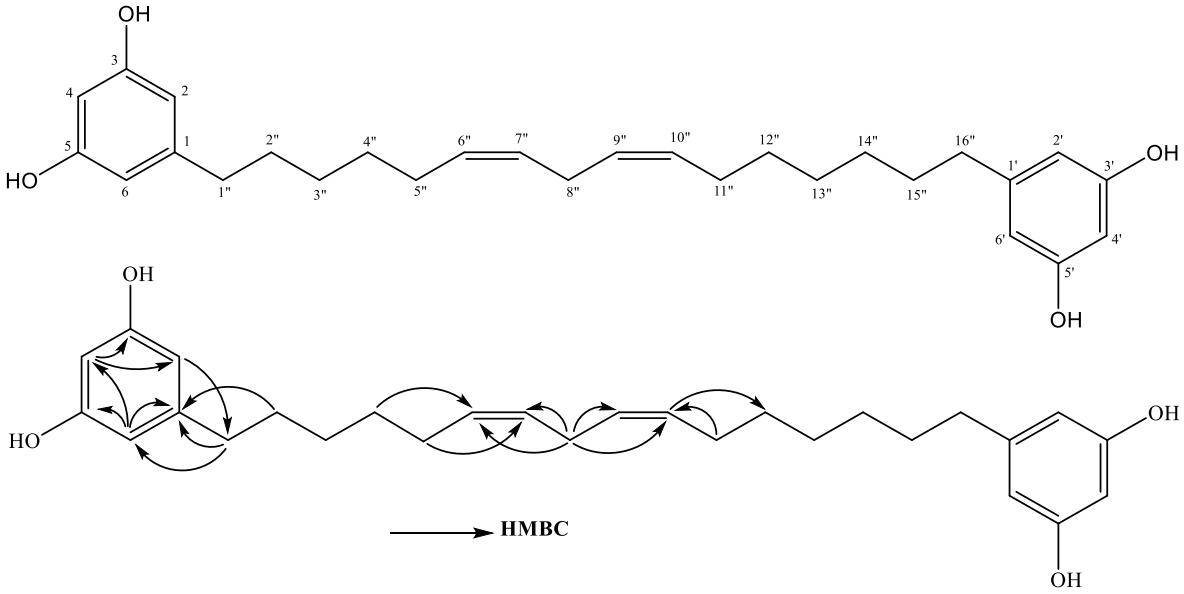
Ngoài ra, tín hiệu carbon không nối với nguyên tử H nào xuất hiện tại δ_C 159.2 có cường độ tích phân cao gấp đôi so với carbon bậc bốn khác chứng tỏ pic này là của 2C chập nhau của vòng thơm đối xứng thế 1,3,5. Ở vòng thơm thứ hai, do sự có mặt của một nhóm methoxy đã làm cho vòng này không còn đối xứng hoàn toàn nữa. Ở đó các giá trị độ dịch chuyển hóa học của hai carbon nối với nhóm OH và OCH_3 đã khác nhau (δ_C C-OH: 159,2; δ_C C-OCH_3: 162,2, được xác định nhờ tương tác HMBC của proton nhóm methoxy tại δ_H 3,73 với carbon tại δ_C 162,2). Vị trí của một nối đôi duy nhất được xác định nằm giữa mạch dài do sự xuất hiện của hai proton nối đôi nhưng chỉ có một pic tại δ_H 5,35 (2H, m), bởi vì nếu nối đôi nằm khác đi, tức là lệch khỏi vị trí đối xứng tương đối thì hai proton của nối đôi này sẽ cộng hưởng ở các độ dịch chuyển hóa học khác nhau. Điều này còn được chứng tỏ rõ hơn thông qua phổ ^{13}C-NMR và HSQC khi mà tín hiệu tại δ_C 130,8 vừa có cường độ cao hơn các pic khác,

vừa tương ứng có pic HSQC với chỉ một tín hiệu proton tại δ_C 5,35 (2H) chứng tỏ chúng bị chập vào nhau. Nối đôi có cấu hình *Z* bởi hằng số tương tác *J* của proton nối đôi khá nhỏ (*J* = 5,0 Hz).

Với các phân tích nêu trên, hợp chất **HL3** dự đoán có công thức phân tử là $C_{29}H_{42}O_4$ và có khối lượng phân tử M = 454. Nhận định này đã được chứng minh bằng phổ khối HR-MS với sự xuất hiện pic ion m/z 477,2948, hoàn toàn phù hợp với kết quả tính toán lý thuyết cho công thức $C_{29}H_{42}O_4Na$: 477,2981 với sai số là -7 ppm.

Như vậy, hợp chất **HL3** được xác định là *(Z)*-5-(16-(3-hydroxy-5-methoxyphenyl)hexade-8-en-1-yl) hay là 1-(3,5-dihydroxyphenyl)-16-hydroxy-5-methoxyphenyl)-8-hexedecene, một hợp chất thuộc lớp chất alkylresorcinol với tên gọi khác là oncostemonol D. Kết quả so sánh các giá trị phổ NMR của **HL3** cũng hoàn toàn phù hợp với các dữ liệu phổ NMR tương ứng đã công bố cho hợp chất oncostemonol D trong dung môi acetone-d_6.

Phụ lục 2.2.4. Xác định cấu trúc hợp chất HL4



Hình 14. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC chính của hợp chất HL4

** Tính chất và thông số phổ:*

+ Chất dầu màu vàng

+ Phổ HR-ESI-MS *m/z*: 461,2650 $[M+Na]^+$

+ Tính toán lý thuyết cho công thức $[C_{28}H_{38}O_4Na]^+$: 461,2668

+ Số liệu phổ ^{1}H-NMR (500 MHz) và ^{13}C-NMR (125 MHz) xem Bảng 13 và Phụ lục 3.14.2 & 3.14.3.

Bảng 13. Số liệu phổ NMR của hợp chất HL4 và hợp chất tham khảo

C	**$^{\#}\delta_C$**	**δ_C[a,b]**	**δ_H[a,c] (độ bội, *J* = Hz)**
1	146,2	146,4	-
2	107,9	107,9	6,14 (t, *J* = 2,0)
3	159,3	159,3	-
4	101,0	101,0	6,10 (t, *J* = 2,0)
5	159,3	159,3	-
6	107,9	107,9	6,14 (t, *J* = 2,0)
1′	146,2	146,2	-
2′	107,9	107,9	6,14 (t, *J* = 2,0)
3′	159,3	159,3	-
4′	101,0	101,0	6,10 (t, *J* = 2,0)
5′	159,3	159,3	-
6′	107,9	107,9	6,14 (t, *J* = 2,0)
1″	37,0	37,0	2,46 (t, *J* = 6,5)
2″	32,4	32,4	1,60 (m)
3″	30,3	30,3	1,36 (m)
4″	30,7	30,7	1,42 (m)
5″	28,0	28,2	2,08 (m)
6″	129,2	129,2	5,32-5,34 (m)
7″	131,0	131,0	5,32-5,34 (m)
8″	26,6	26,7	2,79 (t, *J* = 6,0)
9″	130,8	130,8	5,32-5,34 (m)
10″	129,0	129,0	5,32-5,34 (m)
11″	28,2	28,0	2,08 (m)
12″	30,7	30,7	1,42 (m)
13″	30,5	30,5	1,36 (m)
14″	30,3	30,3	1,36 (m)
15″	32,0	31,9	1,60 (m)
16″	36,8	36,8	2,46 (t, *J* = 6,5)

[a]methanol-d_4, [b]125MHz, [c]500MHz, $^{\#}\delta_C$ số liệu của grevirobstol A đo trong methanol-d_4

** Phân tích xác định cấu trúc:*

Hợp chất **HL4** cũng thu được từ phần dịch chiết ethyl acetate dưới dạng chất dầu màu vàng sau khi tiến hành phân lập qua các cột sắc ký pha thường, pha đảo và HPLC điều chế. Trên phổ khối lượng phân giải cao HR-MS của hợp chất **HL4** xuất hiện pic ion giả phân tử tại *m/z* 461,2650 $[M+Na]^+$. Kết quả này phù hợp với số khối của ion $[C_{28}H_{38}O_4Na]^+$ với tính toán lý thuyết là 461,2668. Qua đó, cho phép xác định công thức phân tử của hợp chất **HL4** là $C_{29}H_{42}O_4$ với sai số Δ = -3,9 ppm.

Phổ ^{1}H-NMR của hợp chất **HL4** xuất hiện các tín hiệu của 3 proton vòng thơm có độ dịch chuyển hóa học từ δ_H 6,10-6,15 ppm, tín hiệu của một nối đôi ngoài vòng xuất hiện về phía trường cao (δ_H 5,36), các tín hiệu CH_2 còn lại được xác định trong khoảng δ_H 1,20-2,85.

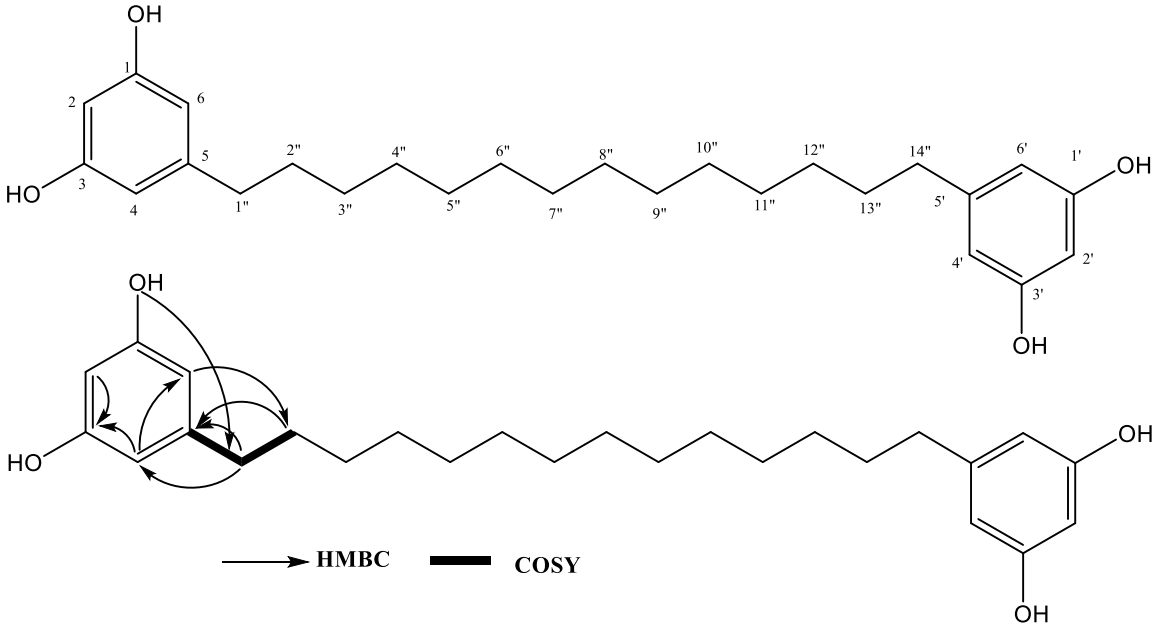
Phổ ^{13}C-NMR của hợp chất **HL4** khẳng định sự có mặt của hai vòng thơm, trong đó hai vòng thơm này giống nhau và cùng có trục đối xứng bậc hai bởi 4 cặp các tín hiệu bị chập vào nhau từng đôi một, hai nối đôi được khẳng định tại δ_C 131,0, 130,8, 129,2 và 129,0 và một mạch dài gồm 12 nhóm CH_2. Bốn giá trị độ dịch chuyển hóa học của hai nối đôi này rất gần nhau nhưng lai không bị chập thành hai cặp tín hiệu, chứng tỏ chúng không hoàn toàn đối xứng mà chỉ nằm ở vị trí rất gần đối xứng.

Việc xác định vị trí của hai nôi đôi được xác định thông qua tương tác trên phổ hai chiều HSQC và HMBC. Trước hết, trên phổ ^{1}H-NMR xuất hiện tín hiệu ^{1}H tại δ_C 2,79, trong khi đó trên phổ HSQC lại xác định tín hiệu này là của một nhóm CH_2. Như vậy nhóm CH_2 này phải nằm ở vị trí giữa của mạch dài. Mặt khác, trên phổ HMBC xuất hiện tương tác rất rõ giữa các proton của nhóm CH_2 này với carbon của nối đôi tai δ_C 131,0, 130,8, 129,2 và 129,0. Do đó, hai nối đôi này phải nằm ngay cạnh chóm methylen giữa mạch.

Ngoài ra, phổ khối lượng phân giải cao khẳng định công thức phân tử của hợp chất **HL4** là $C_{28}H_{38}O_4$. Theo đó, trừ 12 carbon của hai vòng thơm thì mạch dài vẫn gồm 16C với nhóm CH_2 kẹp giữa hai nối đôi và ở vị trí trung tâm của nhánh mạch dài. Như vậy, hai bên mạch dài gồm một nhánh có 6 nhóm CH_2 còn bên kia chỉ còn 5 nhóm CH_2. Điều này đã tạo ra các cặp tín hiệu của nối đôi không giống nhau hoàn toàn như của một phân tử đối xứng. Hai nối đôi này có cấu hình *Z* bởi hằng số tương tác *J* của các proton nối đôi này rất nhỏ (*J* = 6,0 Hz), tương tự như hợp chất grevirobstol A.

Việc gán các giá trị độ dịch chuyển hóa học được xác định trước hết tham khảo các giá trị tương ứng của hợp chất grevirobstol A, sau đó kiểm tra lại bằng phổ HSQC và HMBC. Các tương tác HMBC chủ yếu được chỉ ra trên Hình 14. Kết quả cho thấy bộ dữ liệu của hai hợp chất này là rất tương đồng. Từ kết quả phân tích nêu trên, hợp chất **HL4** được xác định là grevirobstol A, một hợp chất thuộc nhóm phenolic kiểu alkenylresorcinol đã biết, được tách từ cây *Grevillea robusta* năm 2000.

Phụ lục 2.2.5. Xác định cấu trúc hợp chất HL5



Hình 14. Cấu trúc hóa học và tương tác COSY, HMBC chính của hợp chất HL5

** Tính chất và thông số phổ:*

+ Chất dầu không màu

+ Phổ HR-ESI-MS *m/z*: 437,2637 $[M+Na]^+$

+ Tính toán lý thuyết cho công thức $[C_{26}H_{38}O_4Na]^+$: 437,2668

+ Số liệu phổ ^{1}H-NMR (500 MHz) và ^{13}C-NMR (125 MHz) xem Bảng 14 và Phụ lục 3.15.2 & 3.15.3.

Bảng 14. Số liệu phổ NMR của hợp chất HL5 và hợp chất tham khảo

C	**$^{\#}\delta_C$**	**$\delta_C^{a,b}$**	**$\delta_H^{a,c}$ (độ bội, *J* = Hz)**
1	159,4	159,3	-
2	101,1	101,0	6,01 (t, *J* = 2,0)
3	159,4	159,3	-
4	108,1	108,0	6,14 (t, *J* = 2,0)

5	146,5	146,4	-
6	108,1	108,0	6,14 (t, *J* = 2,0)
1′	159,4	159,3	-
2′	101,1	101,0	6,01 (t, *J* = 2,0)
3′	159,4	159,3	-
4′	108,1	108,0	6,14 (t, *J* = 2,0)
5′	146,5	146,4	-
6′	108,1	108,0	6,14 (t, *J* = 2,0)
1″	37,1	37,0	2,45 (t, *J* = 7,5)
2″	32,5	32,4	1,58 (m)
3″	30,4-30,6	30,3	1,33 (m)
4″	30,4-30,6	30,6	1,33 (m)
5″	30,4-30,6	30,7	1,33 (m)
6″	30,7	30,8	1,33 (m)
7″	30,8	30,8	1,33 (m)
8″	30,9	30,8	1,33 (m)
9″	30,7	30,8	1,33 (m)
10″	30,4-30,6	30,7	1,33 (m)
11″	30,4-30,6	30,6	1,33 (m)
12″	30,4-30,6	30,3	1,33 (m)
13″	32,6	32,4	1,58 (m)
14″	37,1	37,0	2,45 (t, *J* = 7,5)

[a]methanol-d_4, [b]125MHz, [c]500MHz, [#]δ_C số liệu của 5,5'-(hexadecane-1,16-diyl)bis(benzene-1,3-diol) đo trong acetone-d_6

** Phân tích xác định cấu trúc:*

Hợp chất **HL5** cũng thu được từ phần dịch chiết ethyl acetate dưới dạng chất dầu không màu sau khi tiến hành phân lập qua các cột sắc ký pha thường, pha đảo và HPLC điều chế. Trên phổ khối lượng phân giải cao HR-MS của hợp chất **HL5** xuất hiện pic ion giả phân tử tại *m/z* 437,2637 $[M+Na]^+$. Kết quả này phù hợp với số khối của ion $[C_{26}H_{38}O_4Na]^+$với tính toán lý thuyết là 437,2668. Qua đó, cho phép xác định công thức phân tử của hợp chất **HL5** là $C_{29}H_{42}O_4$ với sai số Δ = -7,1 ppm.

Phổ ^{1}H-NMR của hợp chất **HL5** xuất hiện các tín hiệu của 3 proton vòng thơm thế 1,3,5 và có tính đối xứng trục bậc hai bởi hai proton chập nhau tại δ_H 6,14 (2H) và một proton tại δ_H 6,01.

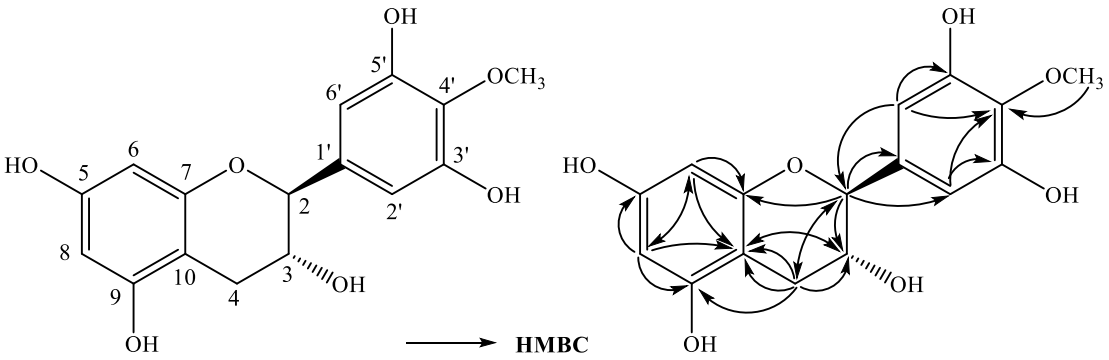
Kết quả phổ ^{13}C-NMR cũng khẳng định rõ sự có mặt của vòng thơm thế 1,3,5 với sự xuất hiện của 4 tín hiệu carbon vòng thơm duy nhất tại δ_C 159,3 (C), 146,4 (C), 108,0 (CH) và 101,0 (CH). Phổ ^{13}C-NMR của **HL5** tương tự phổ ^{13}C-NMR của hợp chất 5,5'-(hexadecane-1,16-diyl)bis(benzene-1,3-diol).

Chiều dài mạch gồm 14 nhóm methylen được xác định bằng phổ khối lượng phân giải cao. Kết quả phổ HR-MS cho pic ion giả phân tử tại m/z 437,2637, kết quả tính toán lý thuyết cho công thức $C_{26}H_{38}O_4Na$: 437,2668. Do đó, công thức phân tử của **HL5** chính xác là $C_{26}H_{38}O_4$, khẳng định mạch dài gồm 14 nhóm methylen. Như vậy, hợp chất **HL5** chính là 5,5'-(hexadecane-1,14-diyl)bis(benzene-1,3-diol), một hợp chất đã biết từ năm 1999. Tuy nhiên, đây là lần đầu tiên hợp chất 5,5'-(hexadecane-1,14-diyl)bis(benzene-1,3-diol) được phân lập từ cây Bàn tay ma đỏ *(Heliciopsis lobata)*.

Phụ lục 2.2.6. Xác định cấu trúc hợp chất HL6

*Trùng với hợp chất HT1 (Xem hợp chất **HT1**)*

Phụ lục 2.2.7.. Xác định cấu trúc hợp chất HL7



Hình 15. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC chính của hợp chất HL7

** Tính chất và thông số phổ:*

+ Chất rắn màu vàng nhạt

+ Phổ HR-ESI-MS *m/z*: 319,0810 $[M-H]^-$

+ Tính toán lý thuyết cho công thức $[C_{16}H_{15}O_7]^-$: 319,0818

+ Số liệu phổ ^{1}H-NMR (500 MHz) và ^{13}C-NMR (125 MHz) xem Bảng 15 và Phụ lục 3.16.2 & 3.16.3.

Bảng 15. Số liệu phổ NMR của hợp chất HL7 và hợp chất tham khảo

C	**$^{\#}\delta_C$**	**δ_C[a,b]**	**δ_H[a,c] (độ bội, *J* = Hz)**
2	82,25	82,6	4,58 (1H, d, *J* = 7,0)
3	68,06	68,7	3,99 (1H, m)
4	28,22	28,0	2,81 (1H, dd, *J* = 16,5, 5,5) 2,53 (1H, dd, *J* = 16,5, 8,0)
5	157,15	157,8	-
6	96,06	96,4	5,95 (1H, d, *J* = 2,5)
7	157,08	157,6	-
8	95,27	95,5	5,90 (1H, d, *J* = 2,5)
9	156,44	156,7	-
10	100,32	100,7	-
1’	136,17	136,7	-
2’	107,22	107,4	6,44 (1H, s)
3’	150,95	151,6	-
4’	135,66	136,4	-
5’	150,95	151,6	-
6’	107,22	107,4	6,44 (1H, s)
4-OMe	60,47	60,7	3,81 (3H, s)

[a]methanol-d_4, [b]125MHz, [c]500MHz, $^{\#}\delta_C$ số liệu của của 4'-O-methyl-ent-gallocatechin đo trong methanol-d_4 đo trong acetone-d_6

* *Phân tích xác định cấu trúc:*

Hợp chất **HL7** thu được dưới dạng chất rắn màu vàng nhạt. Trên phổ khối lượng phân giải cao HR-MS của hợp chất **HL7** xuất hiện pic ion giả phân tử tại *m/z* 319,0810 $[M-H]^-$. Kết quả này phù hợp với số khối của ion $[C_{16}H_{15}O_7]^-$ với tính toán lý thuyết là 319,0818. Qua đó, cho phép xác định công thức phân tử của hợp chất **HL7** là $C_{16}H_{16}O_7$ với sai số Δ = -2,5 ppm.

Trên phổ cộng hưởng từ hạt nhân proton ^{1}H-NMR của hợp chất **HL7** xuất hiện tín hiệu singlet tại δ_H 6,44 với cường độ tích phân tương ứng với 2H cho thấy sự có mặt của một vòng thơm thế tại 4 vị trí và có trục đối xứng bậc, 2 tín hiệu của vòng thơm tại các giá trị δ_H 5,95 (1H, d, J = 2,5 Hz), 5,90 (1H, d, J = 2,5 Hz) và tín hiệu nhóm methoxy tại δ_H 3,81 (3H, s).

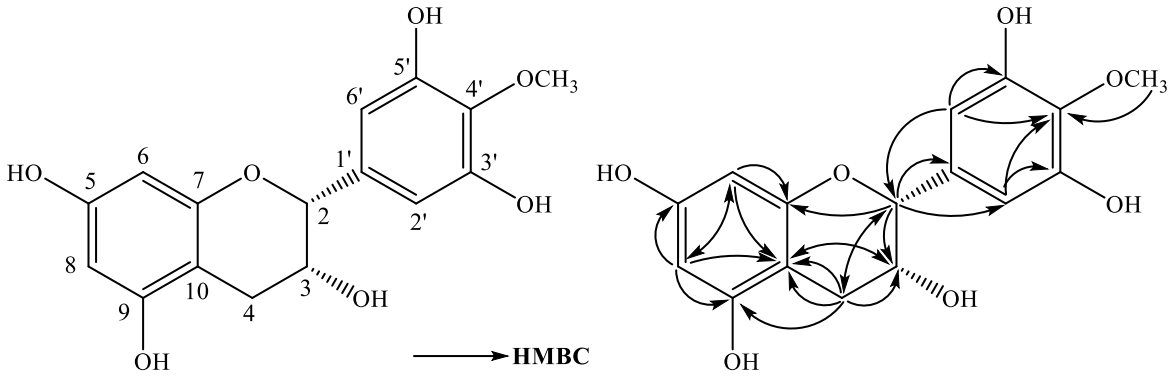
Phân tích phổ carbon ^{13}C-NMR thấy xuất hiện 14 tín hiệu của 16 nguyên tử carbon bao gồm 8 carbon không liên kết trực tiếp với hydro tại δ_C 157,8, 157,6, 156,7, 151,6 x 2, 136,7, 136,4 và 100,5, 6 carbon methine ở δ_C 107,4 x 2, 96,4, 95,5, 82,0 và 68,7, 1 carbon methylene tại δ_C 28,0 và 1 carbon methoxy tại δ_C 60,7. So sánh số liệu với tài liệu tham khảo, nhận thấy hợp chất **HL7** tương tự như hợp chất 4'-O-Methyl-ent-gallocatechin hoặc (-)-4'-*O*-methyl-ent-gallocatechin, là các đồng phân thuộc khung flavanoid.

Tương tác HMBC giữa proton methoxy (δ_H 3,81) với C-4′ (δ_C 136,4), đồng thời có sự xuất hiện tương tác HMBC giữa proton H-2′, H-6′ (δ_H 6,44) với C-1′ (δ_C 136,7)/C-3′ (δ_C 151,6)/C-4′ (δ_C 136,4)/C-2 (δ_C 82,0) giúp gắn chính xác giá trị các vị trí của vòng thơm khẳng định nhóm methoxy gắn với vòng thơm tại vị trí C-4’ và vòng B liên kết với vòng C tại C-2/C-1′. Tương tác HMBC giữa proton H-8 (δ_H 5,95) với C-9 (δ_C 157,6)/C-10 (δ_C 100,5), giữa proton H-6 (δ_H 5,90) với C-5 (δ_C 156,7)/C-7 (δ_C 157,8)/C-8 (δ_C 96,4)/C-10 (δ_C 100,5) giúp xác định các giá trị tại vòng A. Tương tác HMBC giữa H-2 (δ_H 4,58) với C-1′ (δ_C 136,7)/C-2′ (δ_C 107,4)/C-3 (δ_C 68,7)/C-4 (δ_C 28,0) giúp xác định các giá trị tại vị trí C-2, C-3, C-4.

Proton H-2 xuất hiện dưới dạng doublet tại δ_H 4,58 và J = 7,0 Hz, chứng tỏ hai proton H-2/H-3 nằm ở khác phía của mặt phẳng (*trans*), tương ứng với cấu trúc của 4'-*O*-methyl-*ent*-gallocatechin. Cấu hình *trans* này sẽ tương ứng với hai trường hợp: Trường hợp thứ nhất H-2 (α) thì $\delta_{C\text{-}2}$ = 82,25 ppm, còn trường hợp thứ hai H-2 (β) thì $\delta_{C\text{-}2}$ = 79,17. Trong trường hợp của đề tài, hợp chất **HL7** có $\delta_{C\text{-}2}$ = 82,6 ppm, sẽ tương ứng với cấu hình H-2α.

Như vậy, từ những phân tích trên, hợp chất **HL7** được xác định là 4'-*O*-methyl-ent-gallocatechin.

Phụ lục 2.2.8. Xác định cấu trúc hợp chất HL8



Hình 16. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC chính của hợp chất HL8

** Tính chất và thông số phổ:*

+ Chất rắn màu vàng nhạt

+ Phổ HR-ESI-MS *m/z*: 319,0812 $[M-H]^-$

+ Tính toán lý thuyết cho công thức $[C_{16}H_{15}O_7]^-$: 319,0818

+ Số liệu phổ ^{1}H-NMR (500 MHz) và ^{13}C-NMR (125 MHz) xem Bảng 16 và Phụ lục 3.17.2 & 3.17.3.

Bảng 16. Số liệu phổ NMR của hợp chất HL8 và hợp chất tham khảo

C	**$^{\#}\delta_C$**	**δ_C[a,b]**	**δ_H[a,c] (độ bội, *J* =Hz)**
2	79,1	79,7	4,83 (1H, brs)
3	66,8	67,4	4,21 (1H, brq)
4	28,8	29,1	2,88 (1H, dd, *J* = 16,5, 4,5) 2,75 (1H, dd, *J* = 16,5, 2,5)
5	156,8	157,2	-
6	96,1	96,5	5,97 (1H, d, *J* = 2,5)
7	157,5	158,0	-
8	95,6	95,9	5,95 (1H, d, *J* = 2,5)
9	157,4	157,7	-
10	99,7	100,1	-
1’	136,2	136,8	-
2’	107,0	107,2	6,56 (1H, s)
3’	150,7	151,3	-

4’	135,3	136,1	-
5’	150,7	151,3	-
6’	107,0	107,2	6,56 (1H, s)
4-OMe	60,5	60,8	3,82 (3H, s)

[a]methanol-d_4, [b]125MHz, [c]500MHz, [#]δ_C số liệu của của hợp chất 4'-*O*-Methyl-epi-gallocatechin đo trong acetone-d_6

** Phân tích xác định cấu trúc:*

Hợp chất **HL8** thu được dưới dạng chất rắn màu vàng nhạt. Trên phổ khối lượng phân giải cao HR-MS của hợp chất **HL8** xuất hiện pic ion giả phân tử tại *m/z* 319,0812 $[M-H]^-$. Kết quả này phù hợp với số khối của ion $[C_{16}H_{15}O_7]^-$ với tính toán lý thuyết là 319,0818. Qua đó, cho phép xác định công thức phân tử của hợp chất **HL8** là $C_{16}H_{16}O_7$ với sai số Δ = -1,9 ppm.

Trên phổ cộng hưởng từ hạt nhân proton ^{1}H-NMR của hợp chất **HL8** xuất hiện tín hiệu singlet tại δ_H 6,56 với cường độ tích phân tương ứng với 2H cho thấy sự có mặt của một vòng thơm thế tại 4 vị trí và có trục đối xứng bậc, 2 tín hiệu của vòng thơm tại δ_H 5,95 (1H, d, J = 2,5 Hz), 5,97 (1H, d, J = 2,5 Hz) và tín hiệu nhóm methoxy tại δ_H 3,82 (3H, s). Giá trị $J_{2,3}$ = 0 Hz (brs) chứng tỏ hai proton H-2 và H-3 có cấu hình *cis*, tức là nằm cùng về một phía của mặt phẳng phân tử.

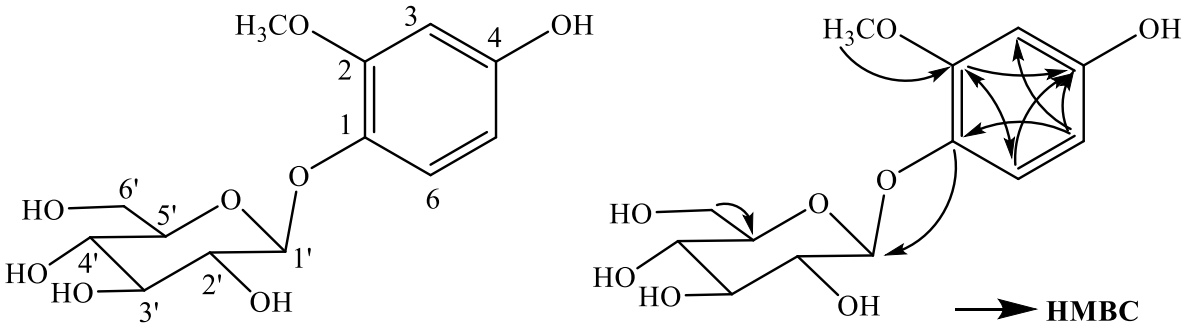
Phân tích phổ carbon ^{13}C-NMR thấy xuất hiện 14 tín hiệu của 16 nguyên tử carbon bao gồm 8 carbon không liên kết trực tiếp với hydro tại δ_C 157,2, 157,7, 158,0, 151,3 x 2, 136,8, 136,1 và 100,1; 6 carbon methine ở δ_C 107,2 x 2, 96,5, 95,5, 79,7 và 67,4; 1 carbon methylene tại δ_C 29,1 và 1 carbon methoxy tại δ_C 60,8. So sánh số liệu với tài liệu tham khảo, nhận thấy hợp chất **HL8** tương tự như hợp chất 4'-*O*-methyl-ent-gallocatechin hoặc (-)-4'-*O*-methyl-ent-gallocatechin, là các đồng phân thuộc khung flavanoid.

Tương tác HMBC giữa proton methoxy (δ_H 3,82) với C-4′ (δ_C 136,1), đồng thời có sự xuất hiện tương tác HMBC giữa proton H-2′, H-6′ (δ_H 6,56) với C-1′ (δ_C 136,8)/C-3′ (δ_C 151,3)/C-4′ (δ_C 136,1)/C-2 (δ_C 79,7) giúp gắn chính xác giá trị các vị trí của vòng thơm khẳng định nhóm methoxy gắn với vòng thơm tại vị trí C-4′ và vòng B liên kết với vòng C tại C-2/C-1′. Tương tác HMBC giữa proton H-8 (δ_H 5,95) với C-9 (δ_C 158,0)/C-10 (δ_C 100,1), giữa proton H-6 (δ_H 5,97) với C-5 (δ_C 157,2)/C-7 (δ_C

157,8)/C-8 (δ_C 96,5)/C-10 (δ_C 100,1) giúp xác định các giá trị tại vòng A. Tương tác HMBC giữa H-2 (δ_H 4,80) với C-1′ (δ_C 136,8)/C-2′ (δ_C 107,2)/C-3 (δ_C 67,4)/C-4 (δ_C 29,1) giúp xác định các giá trị tại vị trí C-2, C-3, C-4.

Như vậy, hợp chất **HL8** được xác định là (-)-4'-*O*-methyl-epi-gallocatechin.

Phụ lục 2.2.9. Xác định cấu trúc hợp chất HL9



Hình 17. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC chính của hợp chất HL9

** Tính chất và thông số phổ:*

+ Chất bột vô định hình không màu

+ Phổ HR-ESI-MS *m/z*: 301,0918 $[M-H]^-$

+ Tính toán lý thuyết cho công thức $[C_{13}H_{17}O_8]^-$: 301,0923

+ Số liệu phổ ^{1}H-NMR (500 MHz) và ^{13}C-NMR (125 MHz) xem Bảng 17 và Phụ lục 3.18.2 & 3.18.3.

Bảng 17. Số liệu phổ NMR của hợp chất HL9 và hợp chất tham khảo

C	**$^{\#}\delta_C$**	**δ_C[a,b]**	**δ_H[a,c] (độ bội, *J* = Hz)**
1	152,6	154,9	-
2	100,8	101,9	6,49 (1H, d, *J* = 2,5)
3	149,8	152,1	-
4	139,3	141,1	-
5	117,2	120,6	7,03 (1H, d, *J* = 8,5)
6	105,9	107,2	6,32 (1H, dd, *J* = 8,5, 2,5)
3,5-OMe	55,5	56,6	3,83 (3H, s)
***β*-D-Glc**			
1′	101,4	104,4	4,72 (1H, d, *J* = 7,5)
2′	73,2	75,1	3,45 (1H, dd, *J* = 9,0, 7,5)
3′	76,8	77,9	3,43 (1H, t, *J* = 9,0)
4′	69,7	71,4	3,70 (1H, t, *J* = 9,0)

5′	76,7	78,1	3,40 (1H, m)
6′	60,7	62,6	3,70 (1H, dd, *J* = 11,5, 5,5) 3,87 (1H, dd, *J* = 11,5, 2,5)

[a]methanol-d_4, [b]125MHz, [c]500MHz, [#]δ_C số liệu của isotachioside đo trong DMSO-d_6

** Phân tích xác định cấu trúc:*

Hợp chất **HL9** nhận được dưới dạng chất bột vô định hình không màu. Trên phổ ^{1}H-NMR của hợp chất **HL9** xuất hiện ba tín hiệu tương tác theo hệ ABX tại δ_H 6,32 (1H, dd, *J* = 8,5, 2,5 Hz), 7,03 (1H, d, *J* = 8,5 Hz) và 6,49 (1H, d, *J* = 2,5 Hz) chứng tỏ sự có mặt của một vòng thơm thứ hai thế tại các vị trí 1,3,4. Cùng với sự xuất hiện tín hiệu của nhóm methoxy tại δ_H 3,83 (3H, s). Ngoài ra, trên phổ ^{1}H-NMR còn xuất hiện các tín hiệu của một phân tử đường glucose. Điển hình là tín hiệu proton anome xuất hiện tại δ_H 4,72 (1H, d, *J* = 7,5 Hz), hai tín hiệu của nhóm oximethylen xuất hiện tại δ_H 3,70 (1H, dd, *J* = 11,5, 5,5 Hz) và 3,87 (1H, dd, *J* = 11,5, 2,5 Hz). Thêm vào đó, các tín hiệu khác của phân tử đường cộng hưởng trong vùng độ dịch chuyển hóa học từ 3,40 ppm đến 3,70 ppm.

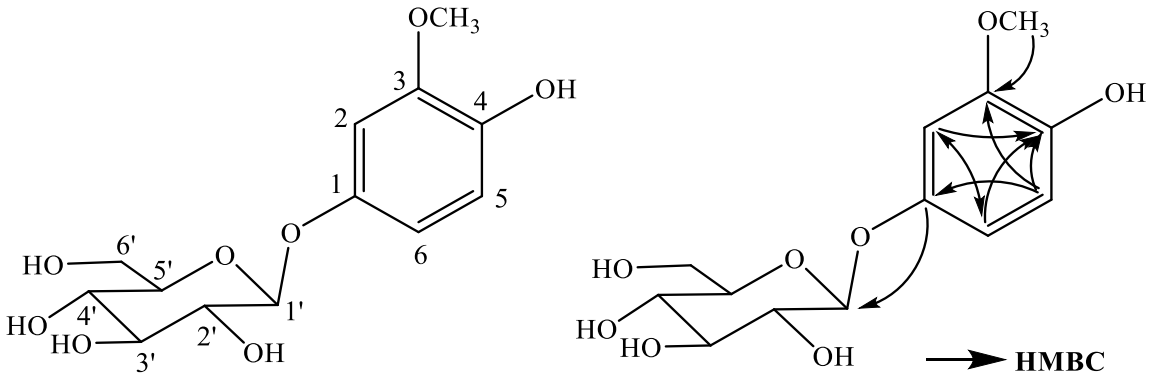
Trên phổ ^{13}C-NMR của hợp chất **HL9** xuất hiện 13 tín hiệu nguyên tử carbon, 6 tín hiệu của một vòng thơm thế 1,3,4 tại các giá trị δ_C 154,9, 152,1, 141,1, 120,6, 107,2 và 101,9, 6 tín hiệu carbon của phân tử đường glucose xuất hiện tại δ_C 104,4, 75,1, 77,9, 71,4, 78,1 và 62,6, tín hiệu của nhóm methoxy được nhận ra tại δ_C 56,6. Các giá trị độ dịch chuyển hóa học của proton tương ứng với từng nguyên tử carbon được xác định nhờ phổ HSQC. Phân tử đường glucose được xác định gắn vào vị trí C-4 của vòng thơm thông qua tương tác HMBC giữa proton H-1' (δ_H 4,72) với carbon C-4 (δ_C 141,1).

Các tương tác HMBC khác giữa proton của nhóm methoxy (δ_H 3,83) với carbon C-3 (δ_C 152,1) khẳng định nhóm methoxy gắn vào C-3, giữa H-2 (δ_H 6,49) với C-4 (δ_C 141,1)/C-6 (δ_C 107,2), giữa H-5 (δ_H 7,03) với C-4/C-3/C-1 (δ_C 154,9), giữa H-6 (δ_H 6,32) với C-4/C-2 (δ_C 101,9) cũng được xác định, Kết quả này chứng minh rõ thêm cấu trúc hóa học của hợp chất **HL9** như được chỉ ra trên hình 8. Giá trị hằng số tương tác giữa H-1′ và H-2′ của phân tử đường (*J* = 7,5 Hz) chứng tỏ cả hai proton này đều chiếm các vị trí *axial*, tức là liên kết giữa phân tử đường với aglycon là O-*β*-Glc.

Các giá trị độ dịch chuyển hóa học của hợp chất **HL9** còn được tham khảo và so sánh với các số liệu tương ứng đã công bố cho hợp chất isotachioside cho thấy sự

phù hợp hoàn toàn. Ngoài ra, trên phổ khối lượng phân giải cao HR-MS của hợp chất **HL9** xuất hiện pic ion giả phân tử tại *m/z* 301,0919 [M-H]- (tính toán lí thuyết cho công thức phân tử ion $[C_{13}H_{17}O_8]^-$ là 301,0923) cho phép xác định công thức phân tử của hợp chất **HL9** là $C_{13}H_{18}O_8$ với sai số Δ = -1,3 ppm. Như vậy, từ những biện luận nêu trên, hợp chất **HL9** được xác định là isotachioside.

Phụ lục 2.2.10. Xác định cấu trúc hợp chất HL10



Hình 18. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC chính của hợp chất HL10

** Tính chất và thông số phổ:*

+ Chất bột vô định hình không màu

+ Phổ HR-ESI-MS *m/z*: 301,0919 $[M-H]^-$

+ Tính toán lý thuyết cho công thức $[C_{13}H_{17}O_8]^-$ 301,0923

+ Số liệu phổ ^{1}H-NMR (500 MHz) và ^{13}C-NMR (125 MHz) xem Bảng 18 và Phụ lục 3.19.2 & 3.19.3.

Bảng 18. Số liệu phổ NMR của hợp chất HL10 và hợp chất tham khảo

C	**$^{\#}\delta_C$**	**$\delta_C^{a,b}$**	**$\delta_H^{a,c}$ (độ bội, *J* =Hz)**
1	150,6	152,8	-
2	102,4	104,9	6,83 (1H, d, *J* = 2,5)
3	147,7	149,3	-
4	141,2	143,0	-
5	115,1	116,0	6,71 (1H, d, *J* = 8,5)
6	107,4	110,1	6,61 (1H, dd, *J* = 8,5, 2,5)
3,5-OMe	55,4	56,4	3,85 (3H, s)
***β*-D-Glc**			
1′	101,6	103,8	4,76 (1H, d, *J* = 7,5)

2′	73,2	75,0	3,43 (1H, dd, *J* = 9,0, 7,5)
3′	76,9	78,1	3,45 (1H, t, *J* = 9,0)
4′	69,9	71,6	3,37 (1H, t, *J* = 9,0)
5′	76,6	78,2	3,40 (1H, m)
6′	60,8	62,7	3,70 (1H, dd, *J* = 11,5, 5,5) 3,92 (1H, dd, *J* = 11,5, 2,5)

[a]methanol-d_4, [b]125MHz, [c]500MHz, [#]δ_C số liệu của tachioside đo trong DMSO-d_6

** Phân tích xác định cấu trúc:*

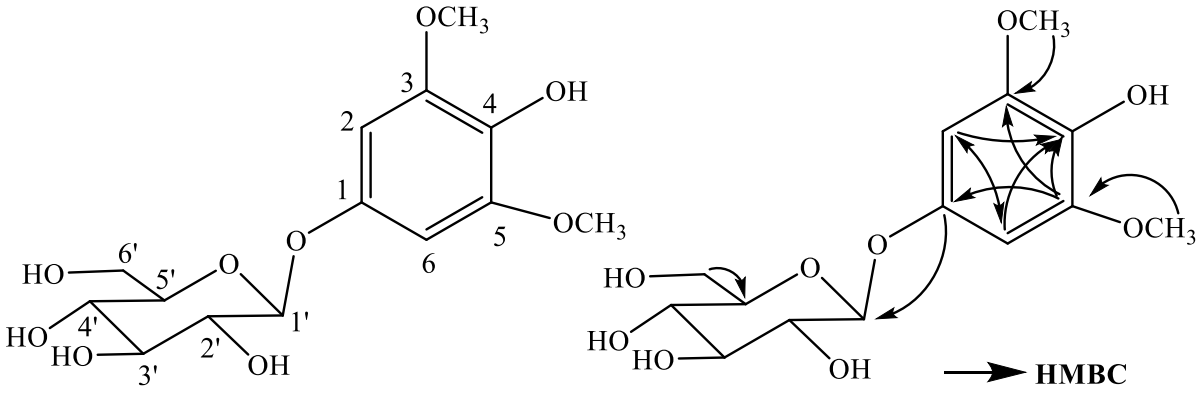
Hợp chất **HL10** nhận được dưới dạng chất bột vô định hình không màu. Trên phổ ^{1}H-NMR của hợp chất **HL10** xuất hiện ba tín hiệu tương tác theo hệ ABX tại δ_H 6,61 (1H, dd, *J* = 8,5, 2,5 Hz), 6,71 (1H, d, *J* = 8,5 Hz) và 6,83 (1H, d, *J* = 2,5 Hz) chứng tỏ sự có mặt của một vòng thơm thứ hai thế tại các vị trí 1,3,4. Cùng với sự xuất hiện tín hiệu của nhóm methoxy tại δ_H 3,85 (3H, s). Ngoài ra, trên phổ ^{1}H-NMR còn xuất hiện thêm các tín hiệu của một phân tử đường glucose. Điển hình là tín hiệu proton anome xuất hiện tại δ_H 4,76 (1H, d, *J* = 7,5 Hz), hai tín hiệu của nhóm oximethylen xuất hiện tại δ_H 3,70 (1H, dd, *J* = 11,5, 5,5 Hz) và 3,92 (1H, dd, *J* = 11,5, 2,5 Hz), và các tín hiệu khác của phân tử đường cộng hưởng trong vùng độ dịch chuyển hóa học từ 3,37 ppm đến 3,45 ppm.

Phổ ^{13}C-NMR của hợp chất **HL10** xuất hiện 13 tín hiệu nguyên tử carbon, 6 tín hiệu của một vòng thơm thế 1,3,4 tại δ_C 152,8, 149,3, 143,0, 116,0, 110,1 và 104,9, 6 tín hiệu carbon của phân tử đường glucose xuất hiện tại δ_C 103,8, 75,0, 78,1, 71,6, 78,2 và 62,7, tín hiệu của nhóm methoxy được nhận ra tại δ_C 56,4. Các giá trị độ dịch chuyển hóa học của proton tương ứng với từng nguyên tử carbon được xác định nhờ phổ HSQC. Phân tử đường glucose được xác định gắn vào vị trí C-1 của vòng thơm thông qua tương tác HMBC giữa proton H-1’ (δ_H 4,76) với carbon C-1 (δ_C 152,8). Các tương tác HMBC khác giữa proton của nhóm methoxy (δ_H 3,85) với carbon C-3 (δ_C 149,3) khẳng định nhóm methoxy gắn vào C-3, giữa H-2 (δ_H 6,38) với C-4 (δ_C 143,0)/C-6 (δ_C 110,1), giữa H-5 (δ_H 6,71) với C-4 (δ_C 143,0)/C-3 (δ_C 110,1)/C-1 (δ_C 152,8), giữa H-6 (δ_H 6,71) với C-4 (δ_C 143,0)/C-2 (δ_C 104,9) cũng được xác định. Kết quả này chứng minh rõ thêm cấu trúc hóa học của hợp chất **HL10** như được chỉ ra trên Hình 18.

Giá trị hằng số tương tác giữa H-1′ và H-2′ của phân tử đường (J = 7,5 Hz) chứng tỏ cả hai proton này đều chiếm các vị trí *axial*, tức là liên kết giữa phân tử đường với aglycon là O-*β*-Glc. Các giá trị độ dịch chuyển hóa học của hợp chất **HL10** còn được tham khảo và so sánh với các số liệu tương ứng đã công bố cho hợp chất tachioside cho thấy sự phù hợp hoàn toàn với cấu trúc trên.

Ngoài ra, trên phổ khối lượng phân giải cao HR-MS của hợp chất **HL10** xuất hiện pic ion giả phân tử tại *m/z* 301,0919 [M-H]- (tính toán lí thuyết cho công thức phân tử ion $[C_{13}H_{17}O_8]^-$ là 301,0923) cho phép xác định công thức phân tử của hợp chất **HL10** là $C_{13}H_{18}O_8$ với sai số Δ = -1,3 ppm. Điều này cũng phù hợp với công thức phân tử của tachioside. Như vậy hợp chất **HL10** được xác định là tachioside.

Phụ lục 2.2.11. Xác định cấu trúc hợp chất HL11



Hình 19. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC chính của hợp chất HL11

** Tính chất và thông số phổ:*

+ Chất bột vô định hình không màu

+ Phổ HR-ESI-MS *m/z*: 355,0984 $[M+Na]^+$

+ Tính toán lý thuyết cho công thức $[C_{14}H_{20}NaO_9]^+$: 355,1005.

+ Số liệu phổ ^{1}H-NMR (500 MHz) và ^{13}C-NMR (125 MHz) xem Bảng 19 và Phụ lục 3.20.2 & 3.20.3.

Bảng 19. Số liệu phổ NMR của hợp chất HL11 và hợp chất tham khảo

C	**$^{\#}\delta_C$**	**$\delta_C^{a,b}$**	**$\delta_H^{a,c}$ (độ bội, J = Hz)**
1	-	150,3	-
2	96,6	95,1	6,38 (1H, s)
3	149,3	148,2	-
4	132,8	130,4	-

5	149,3	148,2	-
6	96,6	95,1	6,38 (1H, s)
3,5-OMe	56,2	55,9	3,71 (3H, s)
***β*-D-Glc**			
1′	103,8	101,7	4,68 (1H, d, *J* = 7,5)
2′	75,1	73,3	3,18 (1H, dd, *J* = 9,0, 7,5)
3′	78,7	76,8	3,28 (1H, dd, *J* = 9,0, 9,0)
4′	71,6	70,2	3,11 (1H, m)
5′	79,0	77,7	3,28 (1H, m)
6′	62,6	61,0	3,43 (1H, dd, *J* = 12,0, 6,5) 3,72 (1H, dd, *J* = 12,0, 3,0)

[a]DMSO-d_6, [b]125MHz, [c]500MHz, [#]δ_C số liệu của 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1-β-D-glucopyranoside đo trong pyridine-d_5

** Phân tích xác định cấu trúc:*

Hợp chất **HL11** nhận được dưới dạng chất bột vô định hình không màu. Trên phổ ^{1}H-NMR của hợp chất **HL11** xuất hiện tín hiệu singlet tại δ_H 6,38 với cường độ tích phân tương ứng với 2H cho thấy sự có mặt của một vòng thơm thế tại 4 vị trí và có trục đối xứng bậc 1. Cùng với sự xuất hiện tín hiệu của hai nhóm methoxy tại δ_H 3,71 (6H, s) chứng tỏ hai nhóm methoxy này gắn vào vòng thơm và nằm ở hai vị trí đối xứng nhau nên hai nhóm methoxy đã bị chập vào nhau hoàn toàn. Ngoài ra, trên phổ ^{1}H-NMR còn xuất hiện các tín hiệu của một phân tử đường glucose. Điển hình là tín hiệu proton gắn với carbon anome xuất hiện tại δ_H 4,68 (1H, d, *J* = 7,5 Hz), hai tín hiệu của nhóm oximethylen xuất hiện tại δ_H 3,43 (1H, dd, *J* = 12,0, 6,5 Hz) và 3,72 (1H, dd, *J* = 12,0, 3,0 Hz), các tín hiệu khác của phân tử đường cộng hưởng trong vùng độ dịch chuyển hóa học từ 3,11 ppm đến 3,28 ppm.

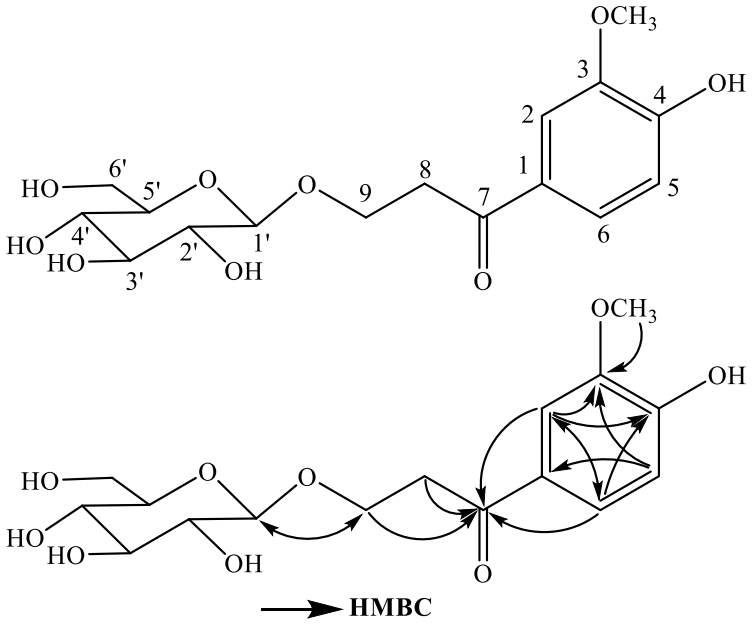
Phổ ^{13}C-NMR của hợp chất **HL11** xuất hiện 11 tín hiệu của 14 nguyên tử carbon, 4 tín hiệu đặc trưng cho vòng thơm đối xứng bậc 1 vì vòng thơm đối xứng trục bậc 1 nên có 2 cặp tín hiệu carbon chập vào nhau tại δ_C 96,6 và 148,2 và hai tín hiệu còn lại tại δ_C 150,3 và 130,4. Sáu tín hiệu carbon của phân tử đường glucose xuất hiện tại các giá trị δ_C 101,7, 73,3, 76,8, 70,2, 77,7 và 61,0 và tín hiệu của nhóm methoxy được nhận ra tại δ_C 55,9.

Các giá trị độ dịch chuyển hóa học của proton tương ứng với từng nguyên tử carbon được xác định nhờ phổ HSQC. Phân tử đường glucose được xác định gắn vào vị trí C-1 của vòng thơm thông qua tương tác HMBC giữa proton H-1' (δ_H 4,68) với carbon C-1 (δ_C 150,3). Các tương tác HMBC khác giữa proton của nhóm methoxy (δ_H 3,71) với carbon C-3 (δ_C 148,2), giữa H-2 (δ_H 6,38) với C-1 (δ_C 150,3), C-3/C-5 (δ_C 148,2) và C-4 (δ_C 130,4) cũng được xác định. Kết quả này chứng minh rõ thêm cấu trúc hóa học của hợp chất **HL11** như được chỉ ra trên hình 6. Giá trị hằng số tương tác giữa H-1′ và H-2′ của phân tử đường (J = 7,5 Hz) chứng tỏ cả hai proton này đều chiếm các vị trí *axial*, tức là liên kết giữa phân tử đường với aglycon là *O*-*β*-Glc. Các giá trị độ dịch chuyển hóa học của hợp chất **HL11** còn được tham khảo và so sánh với các số liệu tương ứng đã công bố cho hợp chất 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1-*β*-D-glucopyranoside cho thấy sự phù hợp hoàn toàn.

Ngoài ra, Trên phổ khối lượng phân giải cao HR-MS của hợp chất **HL11** xuất hiện pic ion giả phân tử tại *m/z* 355,0984 $[M+Na]^+$ (tính toán lí thuyết cho công thức phân tử của ion $[C_{14}H_{20}NaO_9]^+$ là 355,1005) cho phép xác định công thức phân tử của hợp chất **HL11** là $C_{15}H_{22}O_9$, phù hợp với công thức phân tử của hợp chất 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1-*β*-D-glucopyranoside với sai số Δ = -5,9 ppm.

Từ những biện luận nêu trên, hợp chất **HL11** được xác định là 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1-*β*-D-glucopyranoside.

Phụ lục 2.2.12. Xác định cấu trúc hợp chất HL13



Hình 20. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC chính của hợp chất HL13

** Tính chất và thông số phổ:*

+ Chất bột màu trắng, vô định hình

+ Phổ HR-ESI-MS *m/z*: 357,1175 $[M-H]^-$

+ Tính toán lý thuyết cho công thức $C_{16}H_{21}O_9$: 357,1186

+ Số liệu phổ ^{1}H-NMR (500 MHz) và ^{13}C-NMR (125 MHz) xem Bảng 20 và Phụ lục 3.22.2 & 3.22.3.

Bảng 20. Số liệu phổ NMR của hợp chất HL13 và hợp chất tham khảo

C	**$^{\#}\delta_C$**	**δ_C[a,b]**	**δ_H[a,c] (độ bội, *J* = Hz)**
1	128,6	130,9	-
2	110,0	112,0	7,57 (1H, d, *J* = 2,0)
3	147,5	149,1	-
4	151,8	153,6	-
5	111,1	115,9	6,88 (1H, d, *J* = 8,5)
6	123,1	124,9	7,62 (1H, dd, *J* = 8,5, 2,0)
7	196,4	199,4	-
8	38,1	39,4	3,32 (m)
9	64,7	66,5	4,01 (dd, 12,5, 9,0) 4,27 (dd, 12,5, 9,0)
3-OMe	55,6	56,4	3,94 (3H, s)
***β*-D-Glc**			
1′	103,2	104,7	4,33 (1H, d, *J* = 7,5)
2′	73,4	75,1	3,17 (1H, dd, *J* = 9,0, 7,5)
3′	76,9	78,0	3,37 (1H, t, *J* = 9,0)
4′	70,1	71,6	3,29 (1H, t, *J* = 9,0)
5′	76,8	78,0	3,29 (1H, m)
6′	61,1	62,7	3,67 (1H, dd, *J* = 11,5, 6,0) 3,84 (1H, dd, *J* = 11,5, 2,0)

[a]methanol-d_4, [b]125MHz, [c]500MHz, $^{\#}\delta_C$ số liệu của β-Hydroxypropiovanillone 3-*O*-*β*-D-glucopyranoside đo trong DMSO-*d6*

** Phân tích xác định cấu trúc:*

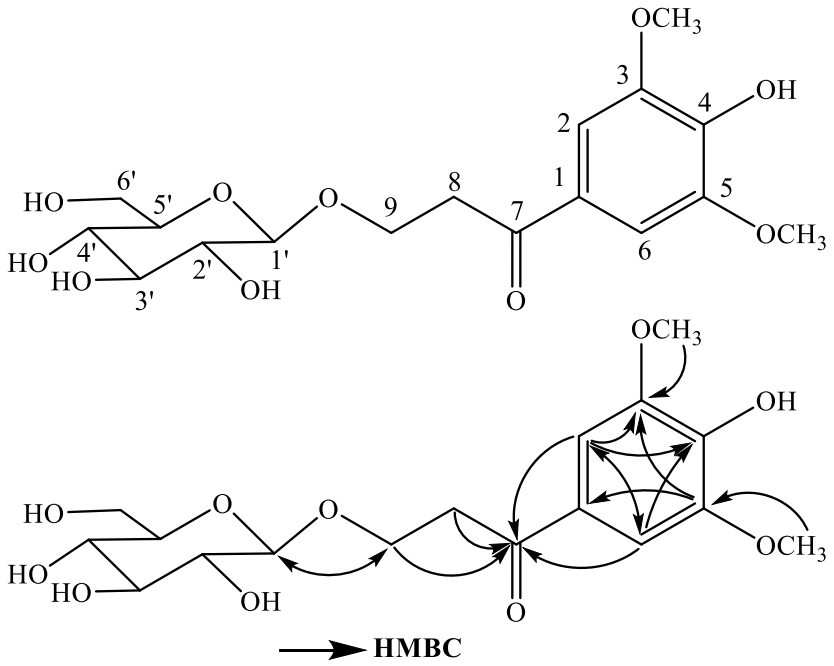
Hợp chất **HL13** được phân lập từ phân đoạn nước dưới chất bột màu trắng, vô định hình. Phổ ^{1}H-NMR của hợp chất **HL13** xuất hiện ở vùng trường thấp với 3 tín hiệu tương tác theo hệ ABX tại δ_H 7,62 (1H, dd, J = 8,5, 2,0 Hz), 6,88 (1H, d, J = 8,5 Hz) và 7,57 (1H, d, J = 2,0 Hz) chứng tỏ sự có mặt của một vòng thơm thứ hai thế tại các vị trí 1,3,4. Phân tử đường được nhận dạng bởi hai tín hiệu proton anome tại δ_H 4,33 (1H, d, J = 7,5 Hz), các tín hiệu còn lại của hai phân tử đường xuất hiện trong vùng có độ dịch chuyển hóa học từ 3,17-3,84 ppm. Một nhóm methoxy được xác định bởi tín hiệu singlet tại δ_H 3,94 (3H, s).

Phổ ^{13}C-NMR cùng với phổ HSQC của hợp chất **HL13** khẳng định sự có mặt 16 tín hiệu carbon, trong đó 6 tín hiệu carbon đặc trưng của một vòng thơm thế 1,3,4 tại δ_C 153,6, 149,1, 130,9, 124,9, 115,9 và 112,0, nhóm C=O tại δ_C 199,4, nhóm methoxy tại δ_C 55,6, 2 nhóm methylen tại δ_C 66,5 và 39,4, 6 tín hiệu carbon còn lại thuộc phân tử đường glucose tại δ_C 104,7, 75,1, 78,0, 71,6, 78,0 và 62,7.

Tương tác HMBC giữa proton H-1′ (δ_H 4,33) của phân tử đường với nhóm oxymethylen C-9 (δ_C 66,5) giúp xác định phân tử đường được gắn vào C-9. Tương tác HMBC giữa proton methoxy (δ_H 3,94) với C-3 (δ_C 149,1) khẳng định nhóm methoxy gắn với vong thơm tại vị trí C-3. Đồng thời có sự xuất hiện tương tác HMBC giữa proton H-2 (δ_H 7,57) với C-4 (δ_C 153,6)/C-6 (δ_C 129,9)/C-7 (δ_C 199,4), giữa H-5 (δ_H 6,88) với C-3/C-1 (δ_C 130,9), giữa H-6 (δ_H 7,62) với C-4/C-2 (δ_C 112,0)/C-7 giúp gắn chính xác các vị trí của vòng thơm. Tương tác HMBC giữa H-9 với C-7, giữa H-8 với C-7, giữa H-1′ với C-9 giúp xác định vị trí C-7, C-8, C-9. Giá trị hằng số tương tác khá lớn của proton anome tại δ_H 4,33 (1H, d, J = 7,5 Hz) chứng tỏ cấu hình của phân tử đường là β-glucopyranose. Ngoài ra, Trên phổ khối lượng phân giải cao HR-MS của hợp chất **HL13** xuất hiện pic ion giả phân tử tại m/z 357,1175 $[M-H]^-$ (tính toán lí thuyết cho công thức phân tử $[C_{16}H_{21}O_9]^-$ là 357,1186) cho phép xác định công thức phân tử của hợp chất **HL13** là $C_{16}H_{22}O_9$ với sai số với sai số Δ = -3,1 ppm.

Từ các dữ kiện phổ và phân tích nêu trên, cấu trúc hóa học của hợp chất **HL13** được xác định là β-Hydroxypropiovanillone 3-*O*-β-D-glucopyranosid

Phụ lục 2.2.13. Xác định cấu trúc hợp chất HL14



Hình 21. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC chính của hợp chất HL14

** Tính chất và thông số phổ:*

+ Chất bột màu trắng ngà

+ Phổ HR-ESI-MS *m/z*: 387,1283 $[M-H]^-$

+ Tính toán lý thuyết cho công thức $C_{17}H_{23}O_{10}$: 387,1291

+ Số liệu phổ ^{1}H-NMR (500 MHz) và ^{13}C -(125 MHz) xem Bảng 21 và Phụ lục 3.23.2 & 3.23.3.

Bảng 21. Số liệu phổ NMR của hợp chất HL14 và hợp chất tham khảo

C	**$^{\#}\delta_C$**	**δ_C[a,b]**	**δ_H[a,c] (độ bội, *J* = Hz)**
1	130,9	129,0	-
2	112,0	107,4	7,35 (1H, s)
3	149,1	149,1	-
4	153,6	142,5	-
5	115,9	149,1	-
6	124,9	107,4	7,35 (1H, s)
7	199,4	199,3	-
8	39,4	39,4	3,32 (2H, m)
9	66,5	66,6	4,29 (1H, dd, *J* = 12,5, 9,0) 4,03 (1H, dd, *J* = 12,5, 9,0)
3,5-OMe	56,4	56,9	3,94 (3H, s)

***β*-D-Glc**			
1′	104,7	104,7	4,36 (1H, d, *J* = 7,5)
2′	75,1	75,1	3,17 (1H, dd, *J* = 9,0, 7,5)
3′	78,0	78,0	3,37 (1H, t, *J* = 9,0)
4′	71,6	71,6	3,29 (*)
5′	78,0	78,1	3,29 (*)
6′	62,7	62,7	3,66 (1H, dd, *J* = 11,5, 5,5) 3,84 (1H, dd, *J* = 11,5, 2,0)

[a]methanol-d_4, [b]125MHz, [c]500MHz, [#]δ_C số liệu của hợp chất 3′,5′-Dimethoxy-3,4′-dihydroxypropiophenone 3-*O*-*β*-D-glucoside đo trong DMSO-*d6*, [*)]tín hiệu bị che lấp.

** Phân tích xác định cấu trúc:*

Hợp chất **HL14** được phân lập từ phân đoạn nước dưới dạng chất bột màu trắng ngà. Phổ ^{1}H-NMR của hợp chất **HL14** xuất hiện tín hiệu singlet tại δ_H 7,35 với cường độ tích phân tương ứng với 2H cho thấy sự có mặt của một vòng thơm thế tại 4 vị trí và có trục đối xứng bậc 1. Cùng với sự xuất hiện tín hiệu của hai nhóm methoxy tại δ_H 3,93 (6H, s) chứng tỏ hai nhóm methoxy này gắn vào vòng thơm và nằm ở hai vị trí đối xứng nhau nên hai nhóm methoxy đã bị chập vào nhau hoàn toàn. Phân tử đường được nhận dạng bởi tín hiệu proton anome tại δ_H 4,36 (1H, d, *J* = 7,5 Hz), các tín hiệu còn lại của hai phân tử đường xuất hiện trong vùng có độ dịch chuyển hóa học từ 3,17-3,84 ppm.

Phổ ^{13}C-NMR cùng với phổ HSQC của hợp chất **HL14** khẳng định sự có mặt 15 tín hiệu của 17 nguyên tử carbon, 4 tín hiệu đặc trưng cho vòng thơm đối xứng bậc 1 vì vòng thơm đối xứng trục bậc 1 nên có 2 cặp tín hiệu carbon chập vào nhau tại δ_C 107,4 và 149,1 và hai tín hiệu còn lại tại δ_C 142,5 và 129,0, nhóm C=O tại δ_C 199,3, nhóm methoxy tại δ_C 56,9, 2 nhóm methylen tại δ_C 66,6 và 39,4, 6 tín hiệu carbon còn lại thuộc phân tử đường glucose tại δ_C 104,7, 75,1, 78,0, 71,6, 78,1 và 62,7.

Hợp chất **HL14** có số liệu khá giống với hợp chất **HL13** chỉ khác tại vòng thơm ở hợp chất **HL14** gắn thêm 1 nhóm methoxy tại vị trí C-5 tạo thành vòng thơm thế ở 4 vị trí và có cấu trúc trục đối xứng bậc 1. Tương tác HMBC giữa proton H-1′ (δ_H 4,36) của phân tử đường với nhóm oxymethylen C-9 (δ_C 66,6) giúp xác định phân tử đường được gắn vào C-9. Tương tác HMBC giữa proton methoxy (δ_H 3,93) với C-3, C-5 (δ_C 149,1) khẳng định nhóm methoxy gắn với vòng thơm tại vị trí C-3, C-5. Đồng thời có sự xuất hiện tương tác HMBC giữa proton H-2, H-6 (δ_H 7,35) với C-1 (δ_C 129,0)/C-

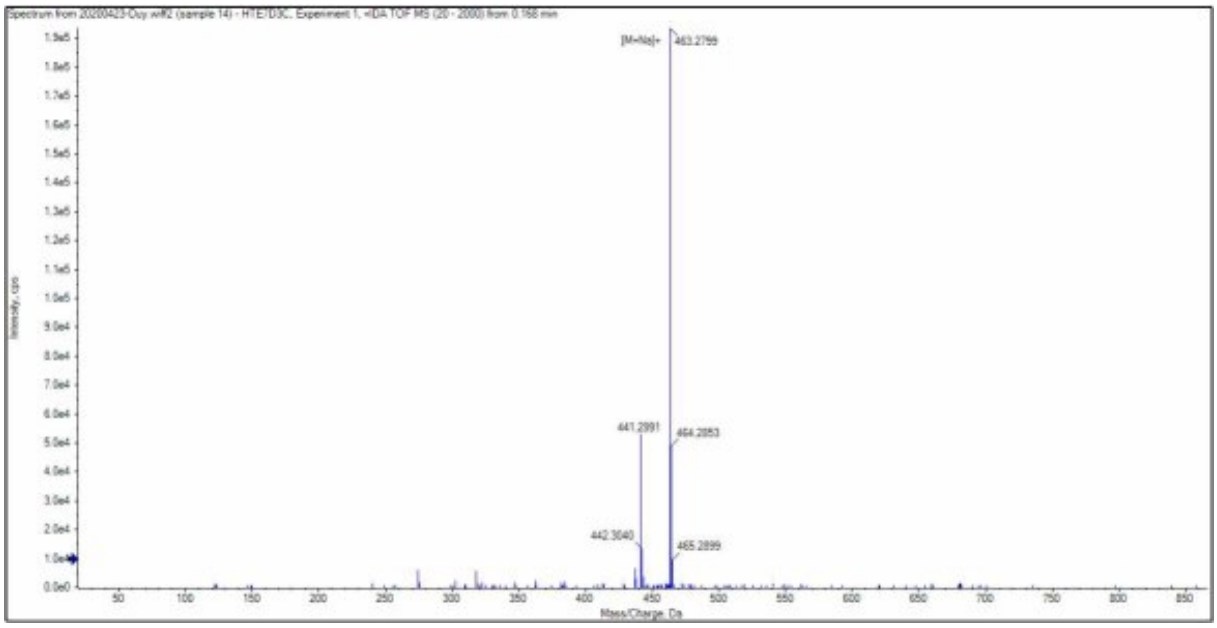
3/C-4/C-7 (δ_C 199,3) giúp gắn chính xác các vị trí của vòng thơm. Tương tác HMBC giữa H-9 với C-7, giữa H-8 với C-7, giữa H-1′ với C-9 giúp xác định vị trí C-7, C-8, C-9, Giá trị hằng số tương tác khá lớn của proton anome tại δ_H 4,36 (1H, d, J = 7,5) chứng tỏ cấu hình của phân tử đường là β-glucopyranose.

Ngoài ra, Trên phổ khối lượng phân giải cao HR-MS của hợp chất **HL14** xuất hiện pic ion giả phân tử tại *m/z* 387,1283 $[M-H]^-$ (tính toán lí thuyết cho công thức phân tử $[C_{17}H_{23}O_{10}]^-$ là 387,1291) cho phép xác định công thức phân tử của hợp chất **HL14** là $C_{17}H_{24}O_{10}$ với với sai số là Δ = -2,1 ppm.

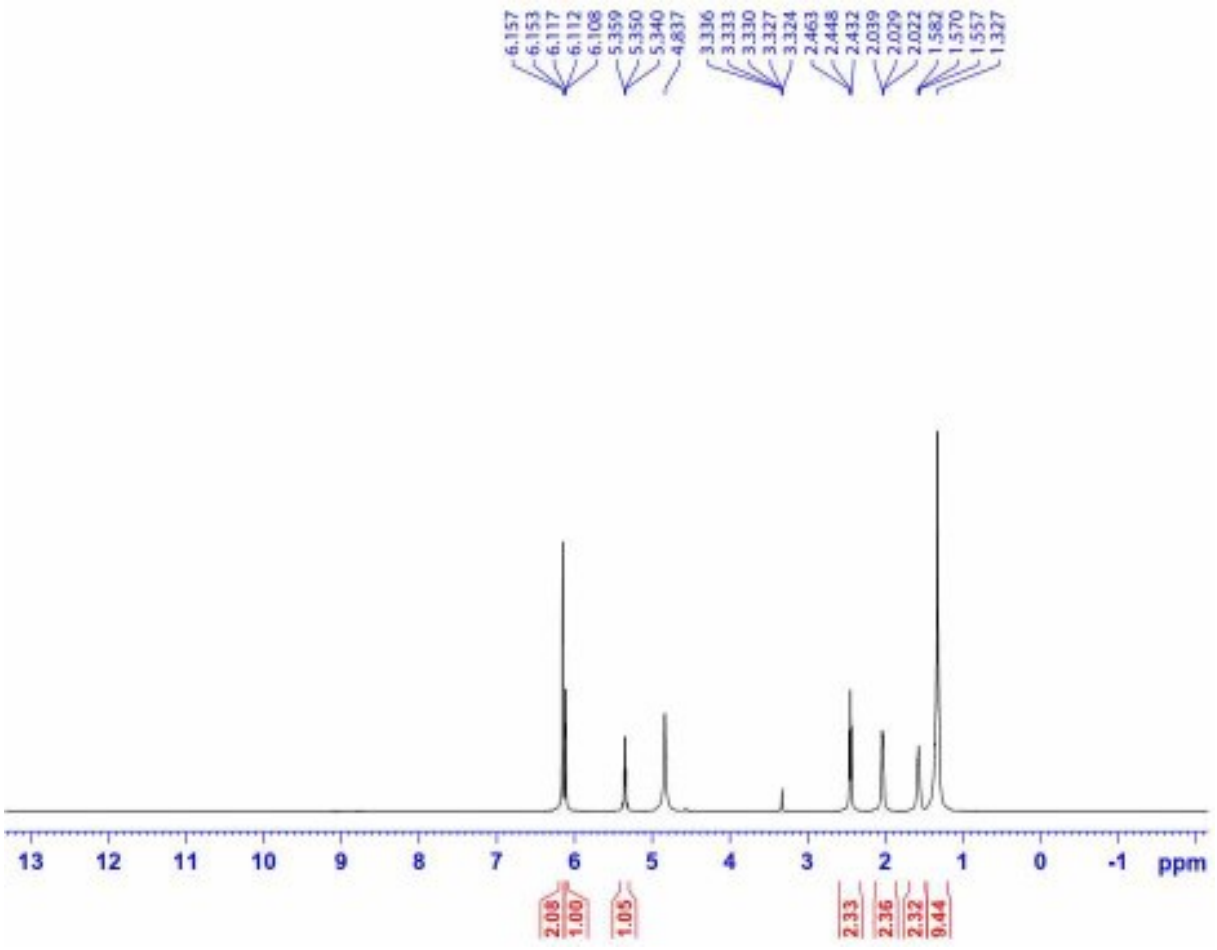
Từ các dữ kiện phổ và phân tích nêu trên, có thể khẳng định được cấu trúc hóa học của hợp chất **HL14** là 3′,5′-dimethoxy-3,4′-dihydroxypropiophenone 3-*O*-β-D-glucoside.

PHỤ LỤC 3. DỮ LIỆU PHÂN TÍCH TRONG LUẬN ÁN

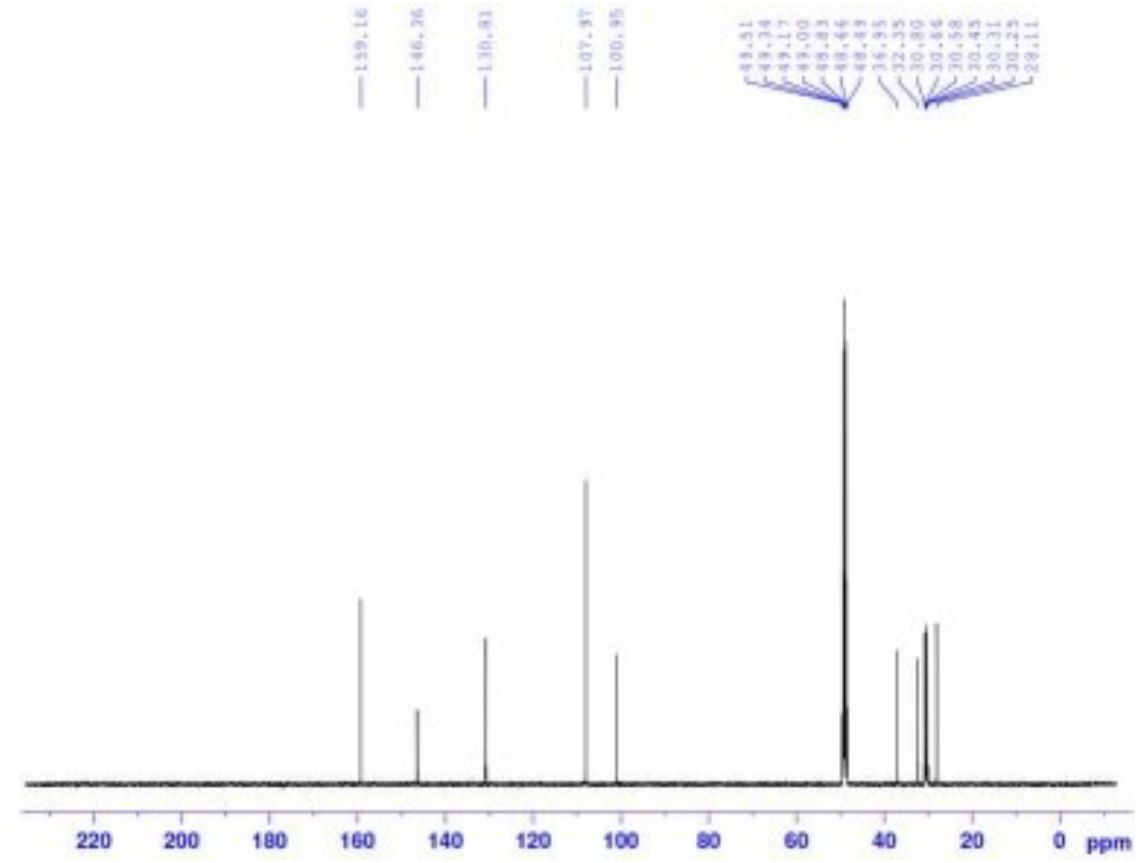
Phụ lục 3.1. Phổ HR-MS và NMR của hợp chất HT1 & HL6: *(Z)*-5,5'-(hexadec-8-ene-1,16-diyl)bis(benzene-1,3-diol)



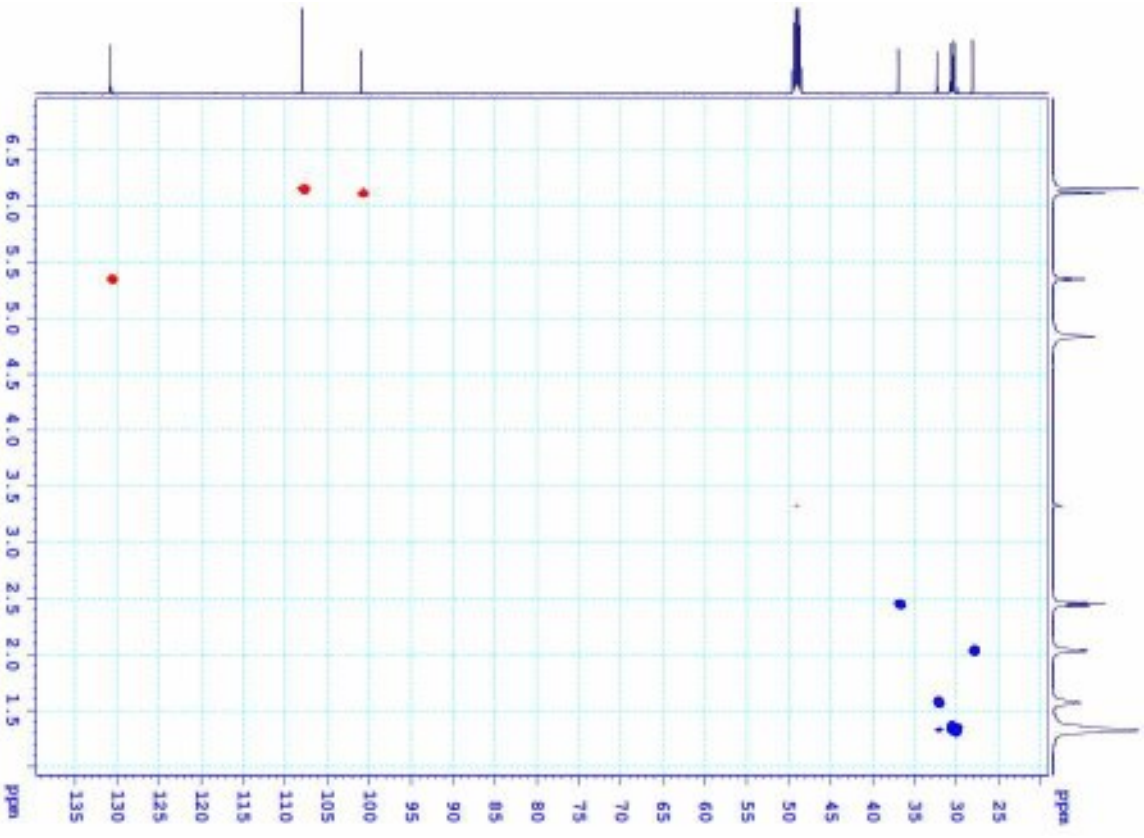
Phụ lục 3.1.1. Phổ HR-MS của hợp chất HT1 & HL6



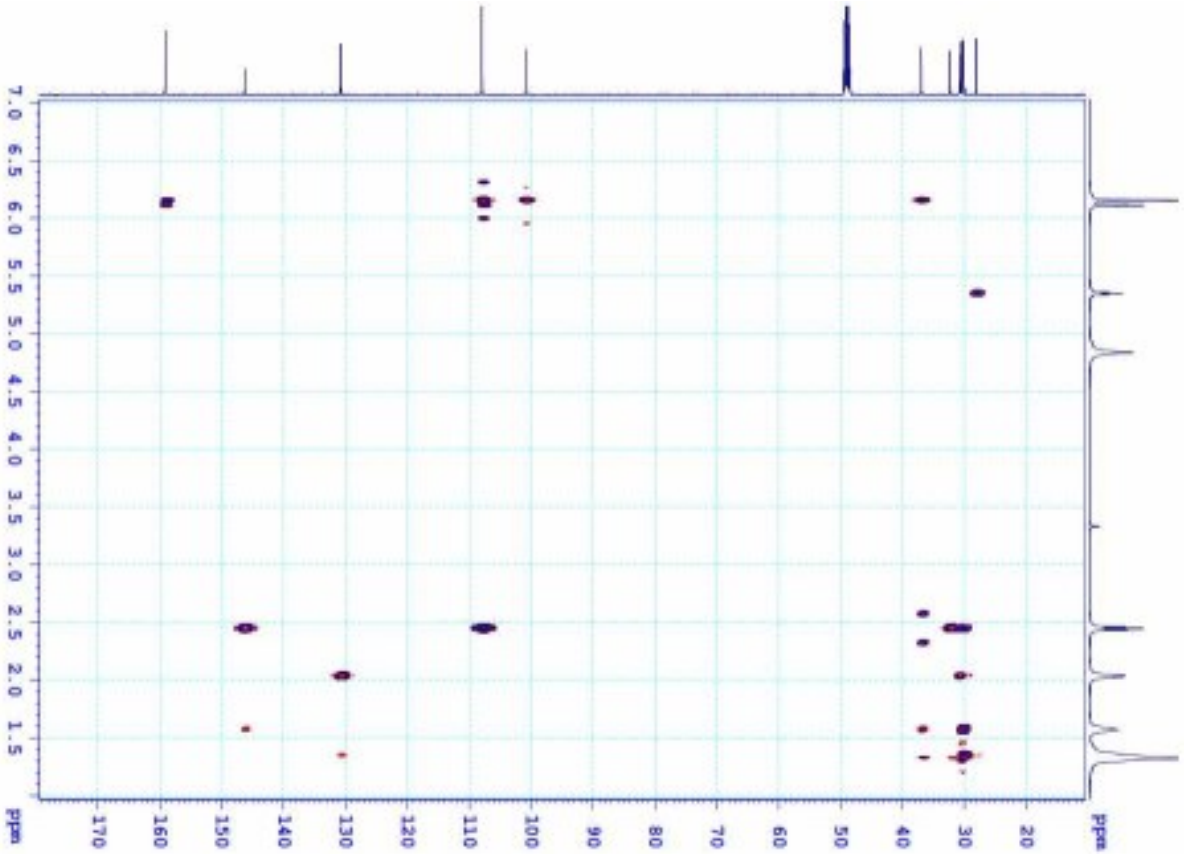
Phụ lục 3.1.2. Phổ ^{1}H-NMR của hợp chất HT1 & HL6



Phụ lục 3.1.3. Phổ ^{13}C-NMR của hợp chất HT1 & HL6

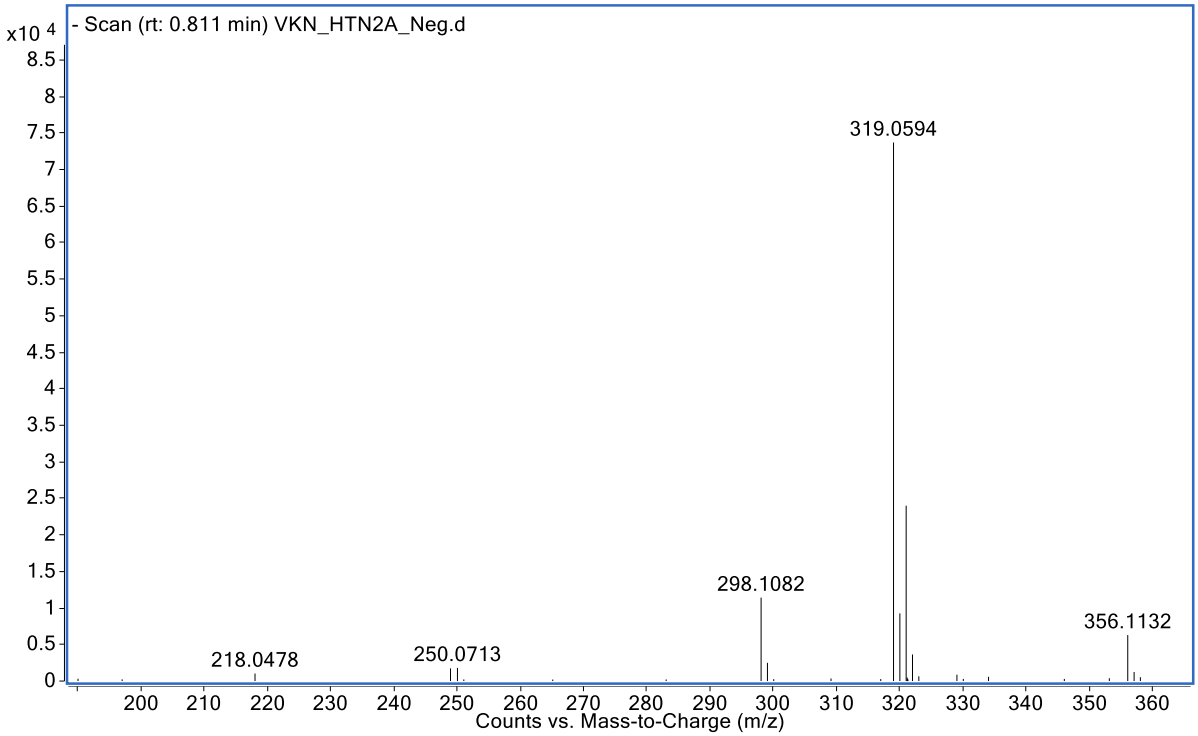


Phụ lục 3.1.4. Phổ HSQC của hợp chất HT1 & HL6

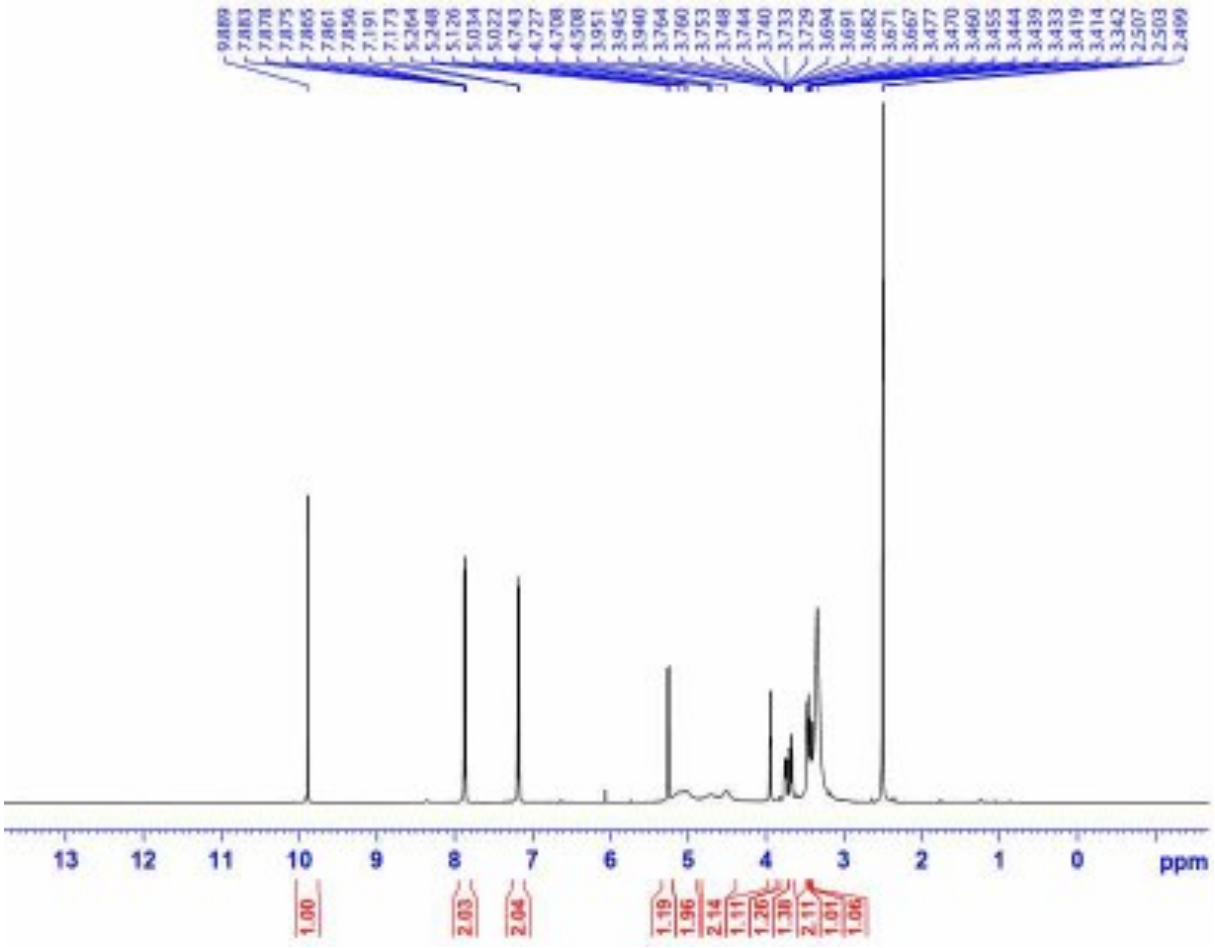


Phụ lục 3.1.5. Phụ lục Phổ HMBC của hợp chất HT1 & HL6

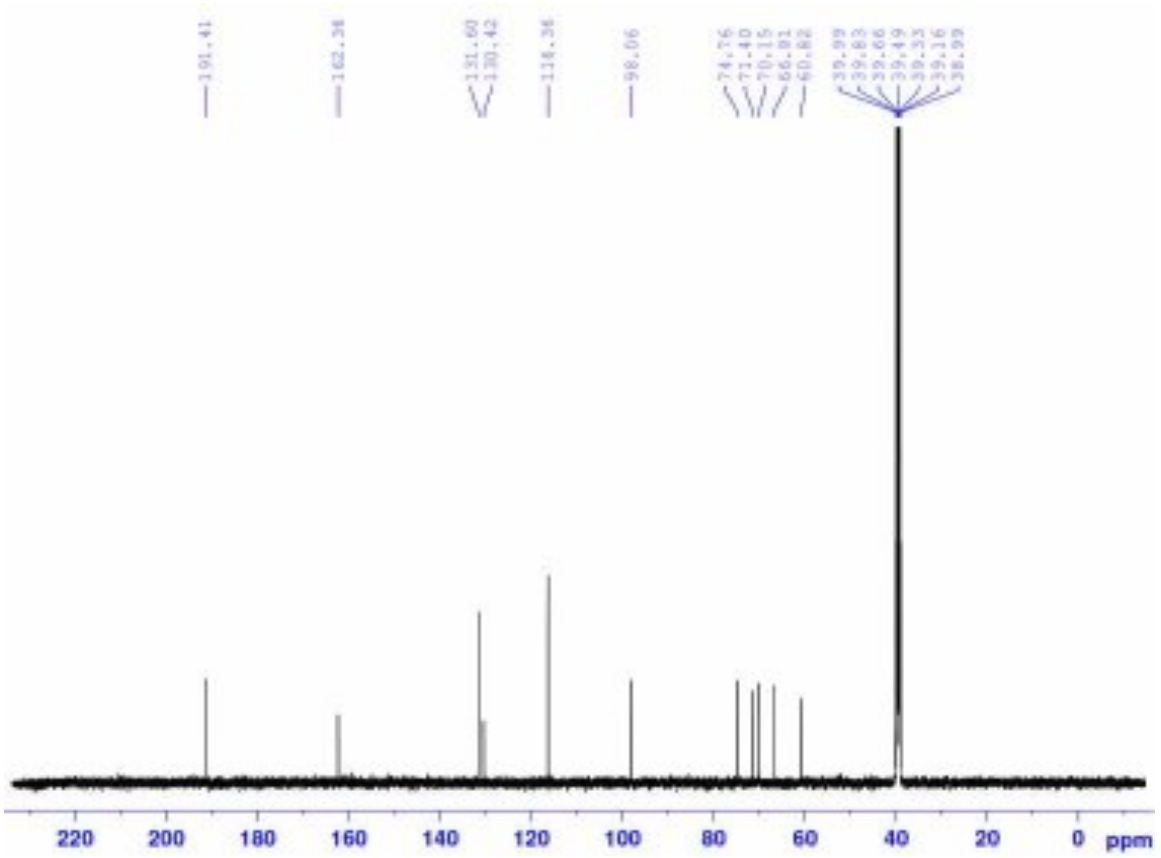
Phụ lục 3.2. Phổ HR-MS và NMR của hợp chất HT2: Helicide



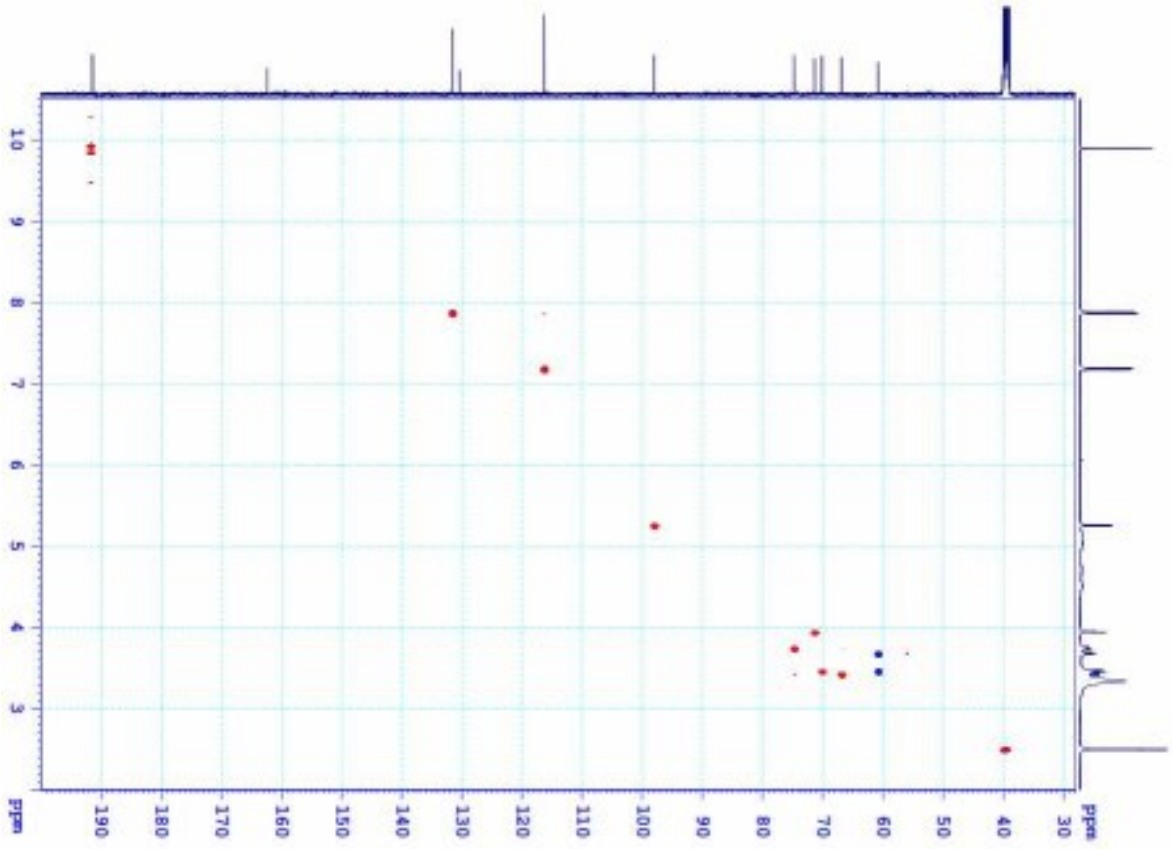
Phụ lục 3.2.1. Phổ HR-MS của hợp chất HT2



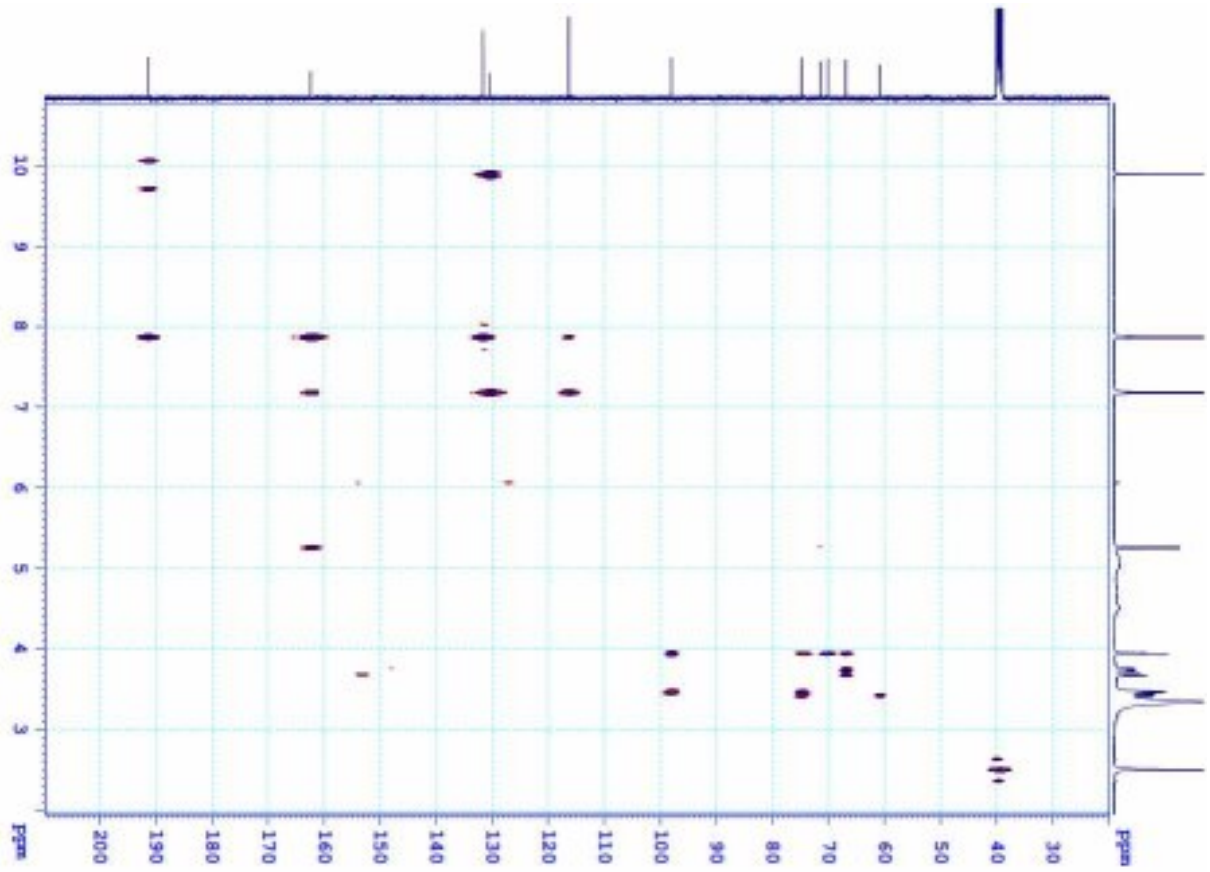
Phụ lục 3.2.2. Phổ ^{1}H-NMR của hợp chất HT2



Phụ lục 3.2.3. Phổ ^{13}C-NMR của hợp chất HT2

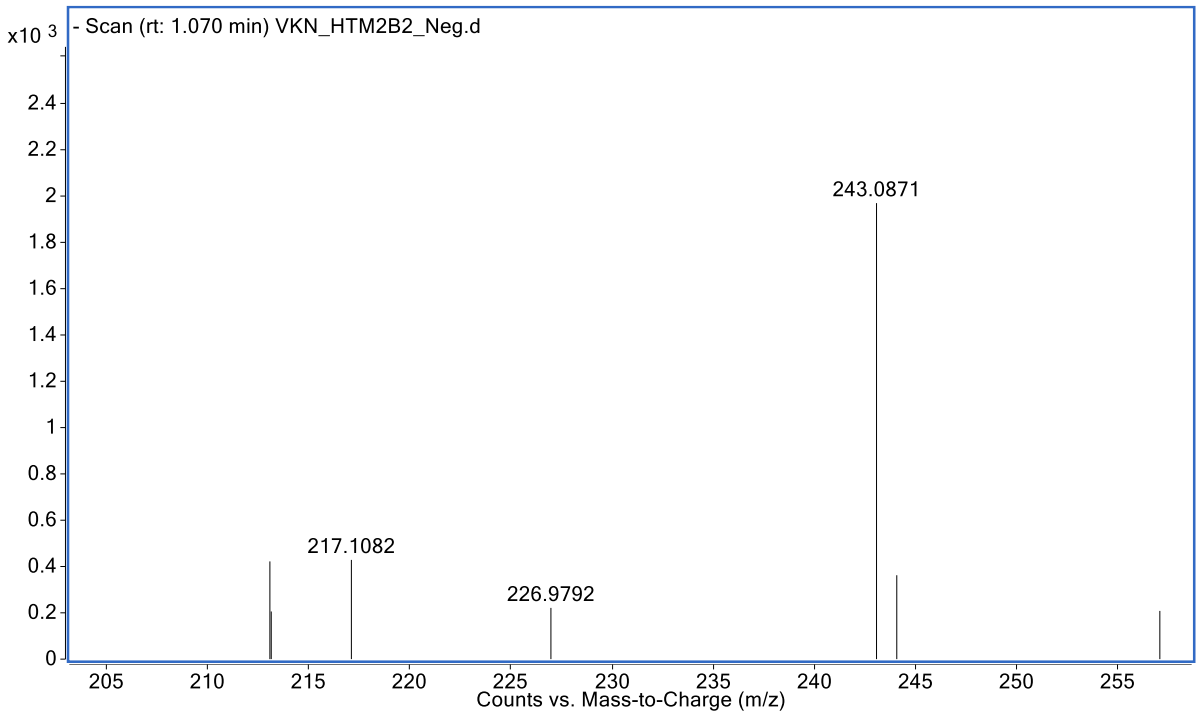


Phụ lục 3.2.4. Phổ HSQC của hợp chất HT2

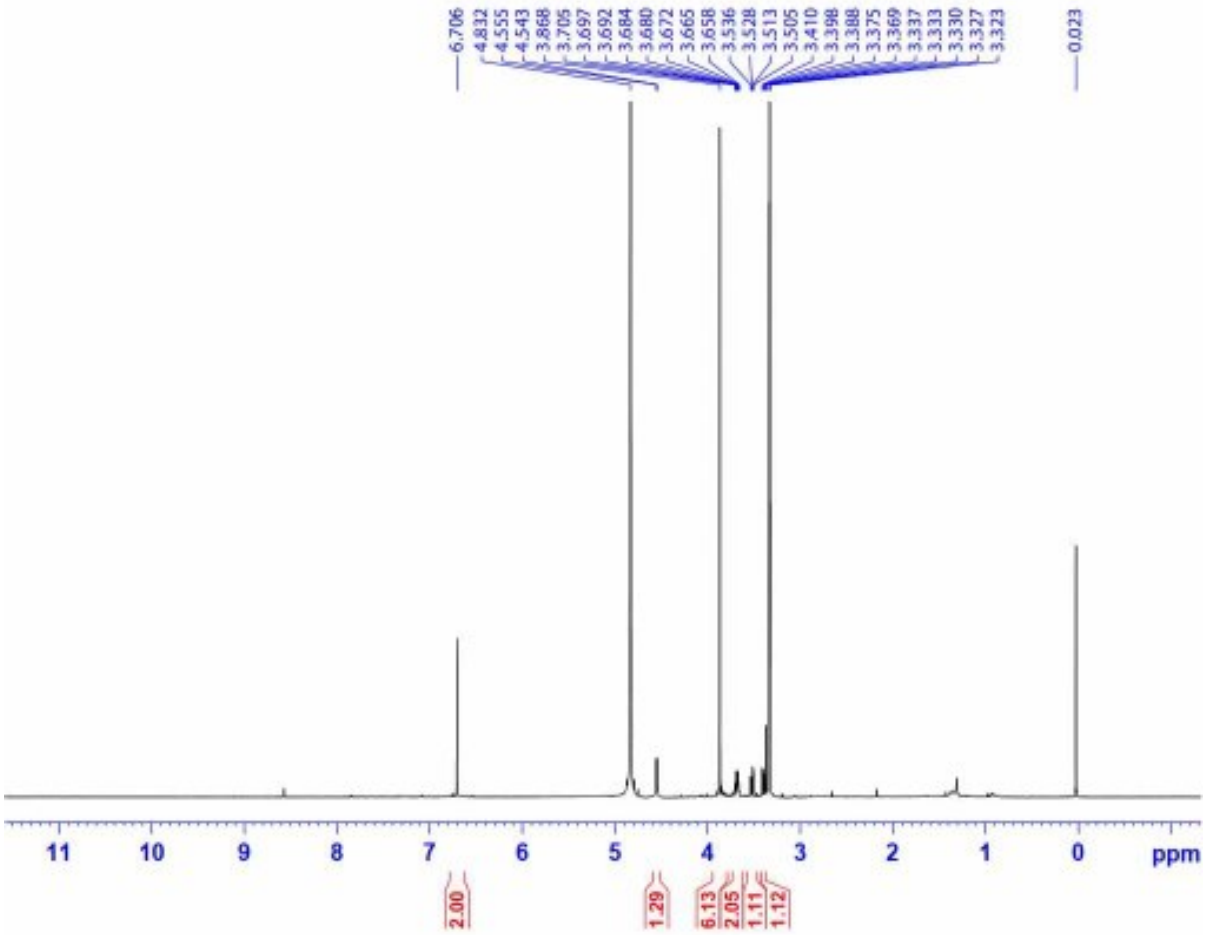


Phụ lục 3.2.5. Phổ HMBC của hợp chất HT2

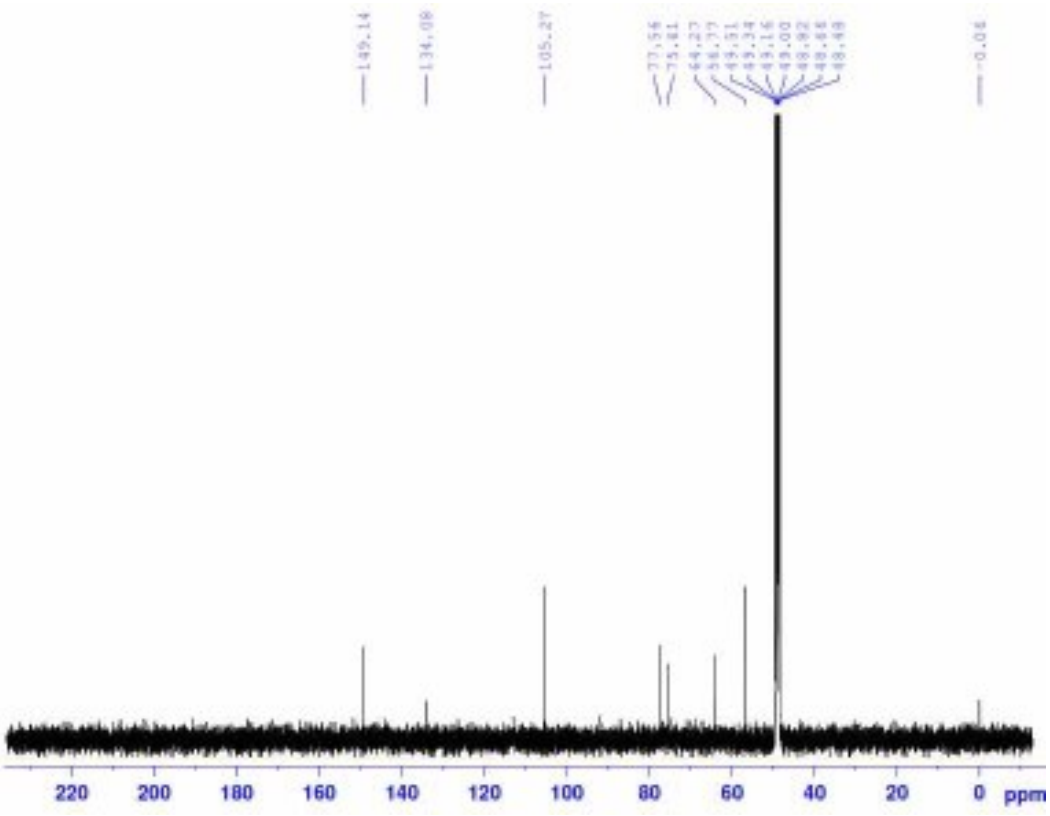
Phụ lục 3.3. Phổ HR-MS và NMR của hợp chất HT3: *Threo*-syringylglycerol



Phụ lục 3.3.1. Phổ HR-MS của hợp chất HT3

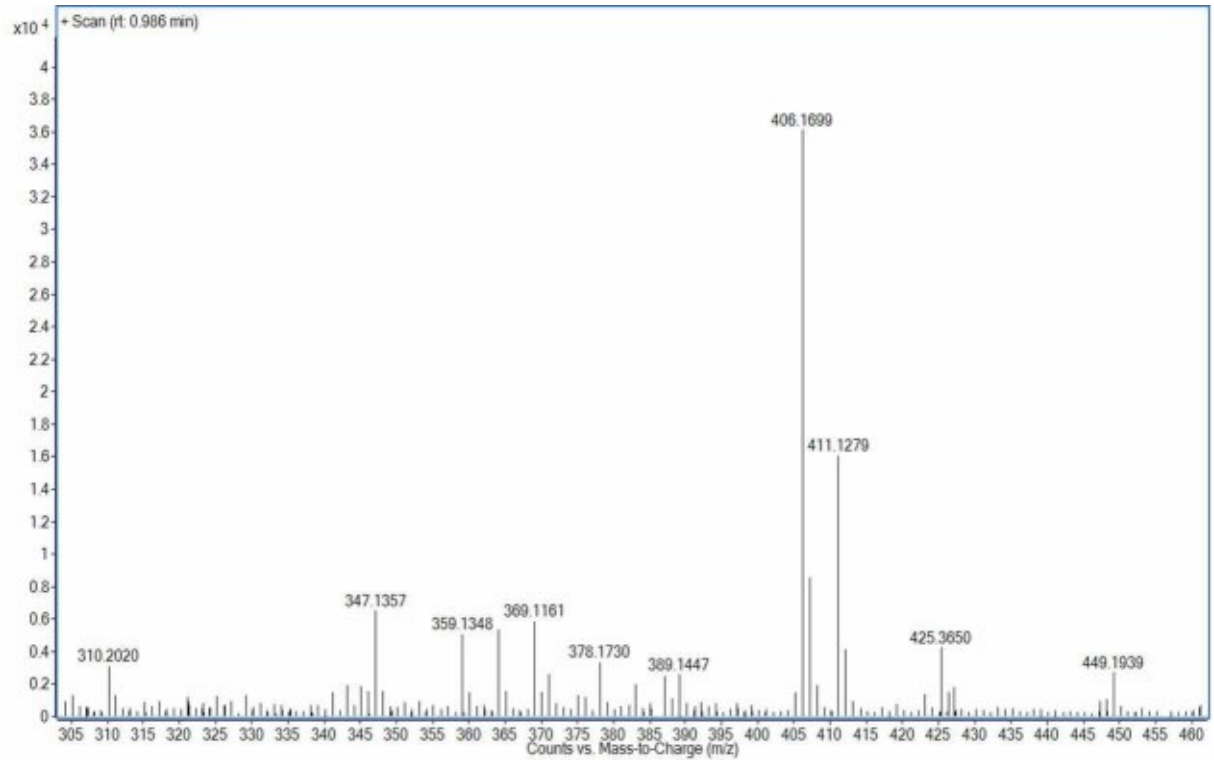


Phụ lục 3.3.2. Phổ ^{1}H-NMR của hợp chất HT3

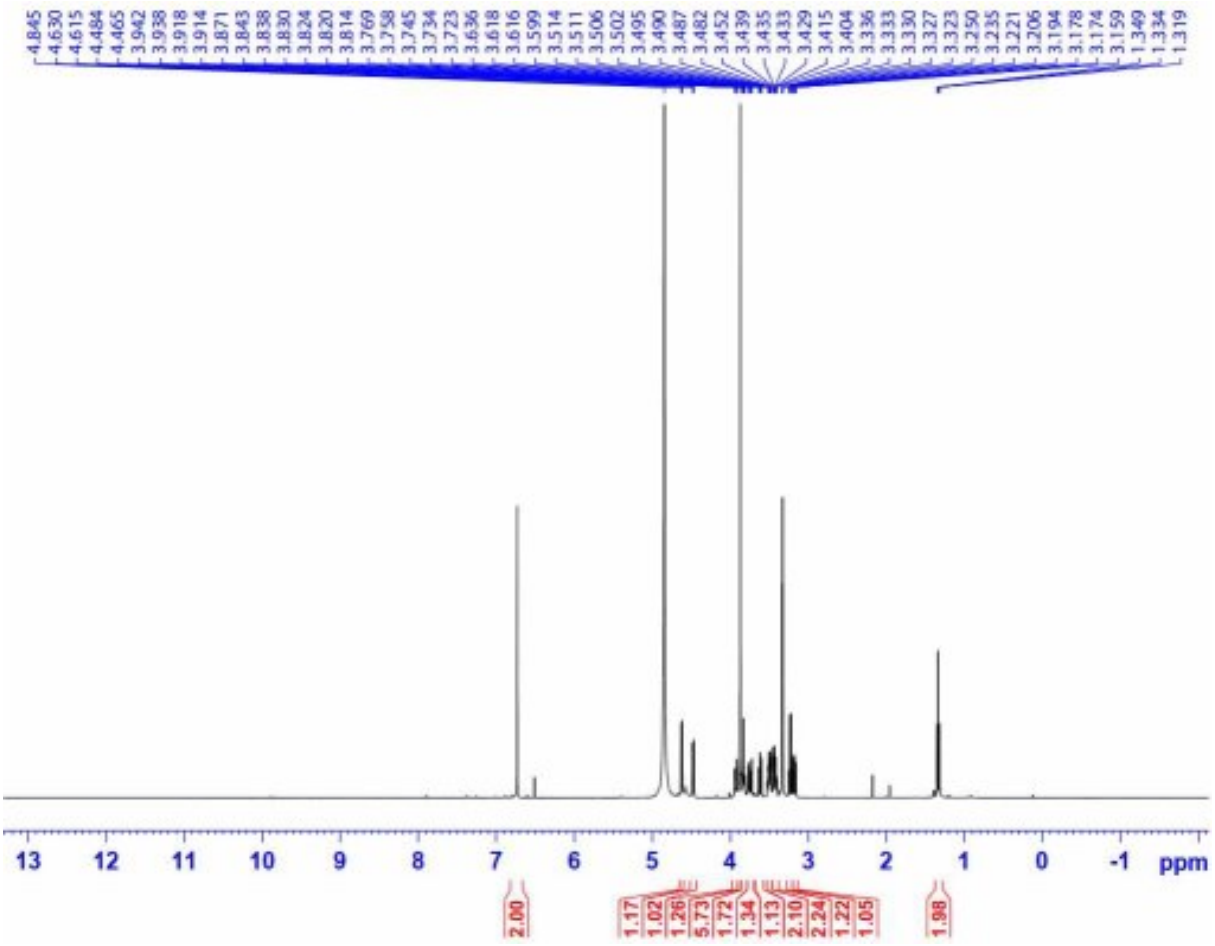


Phụ lục 3.3.3. Phổ 13C-NMR của hợp chất HT3

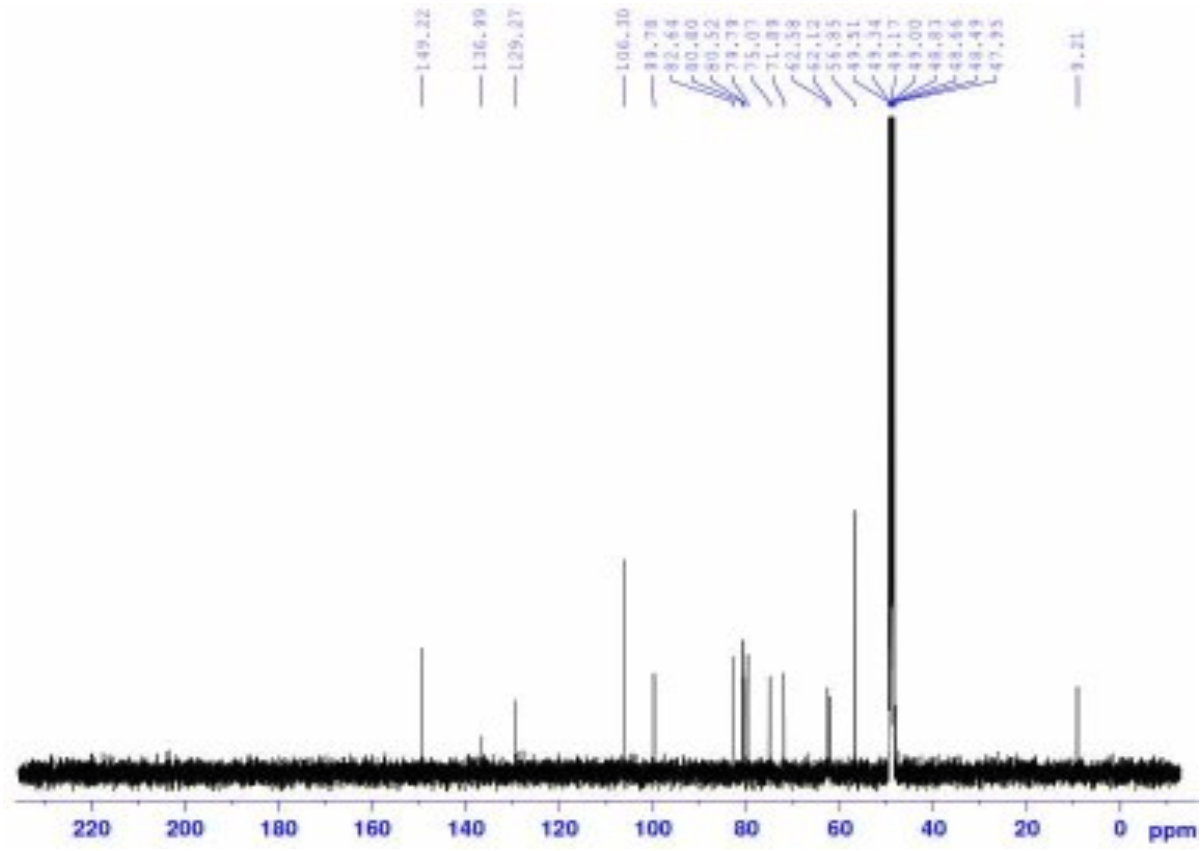
Phụ lục 3.4. Phổ HR-MS và NMR của hợp chất HT4: Ficuscarpanoside B



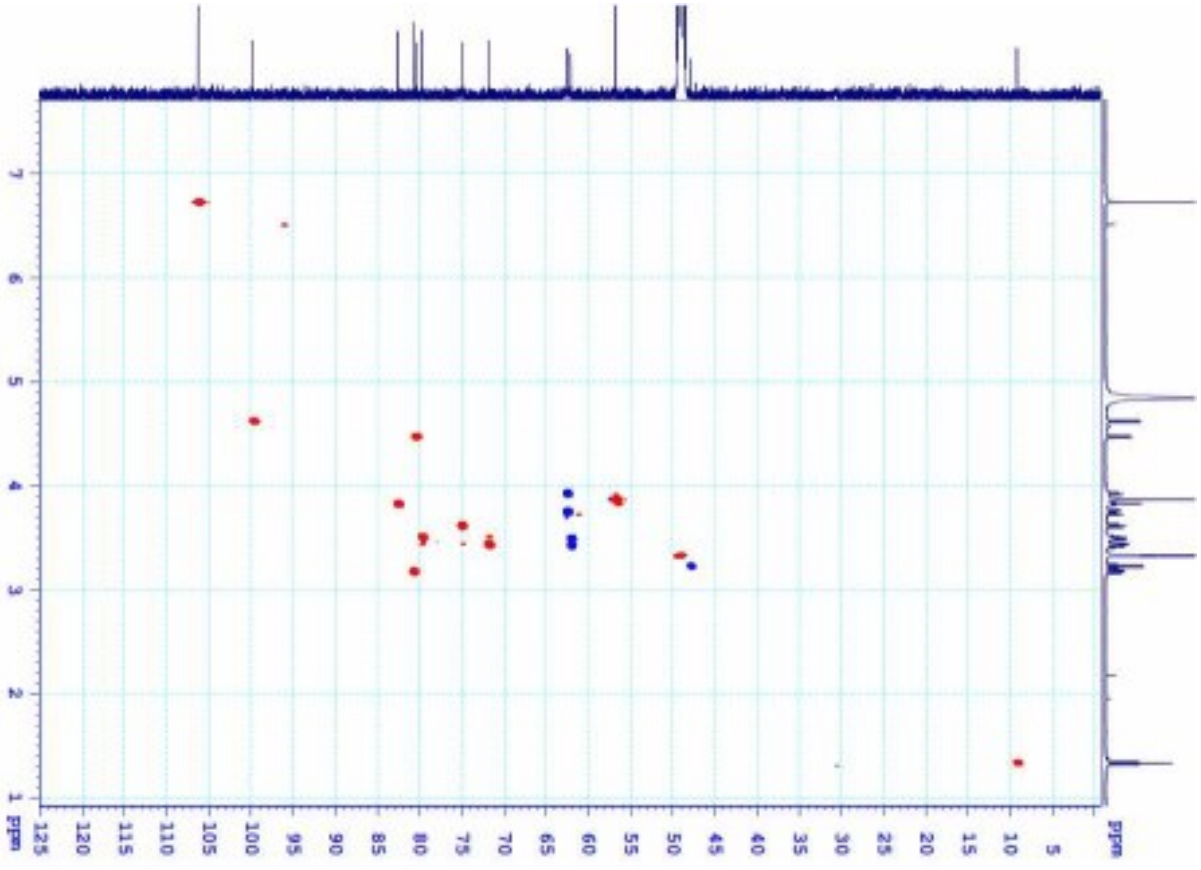
Phụ lục 3.4.1. Phổ HR-MS của hợp chất HT4



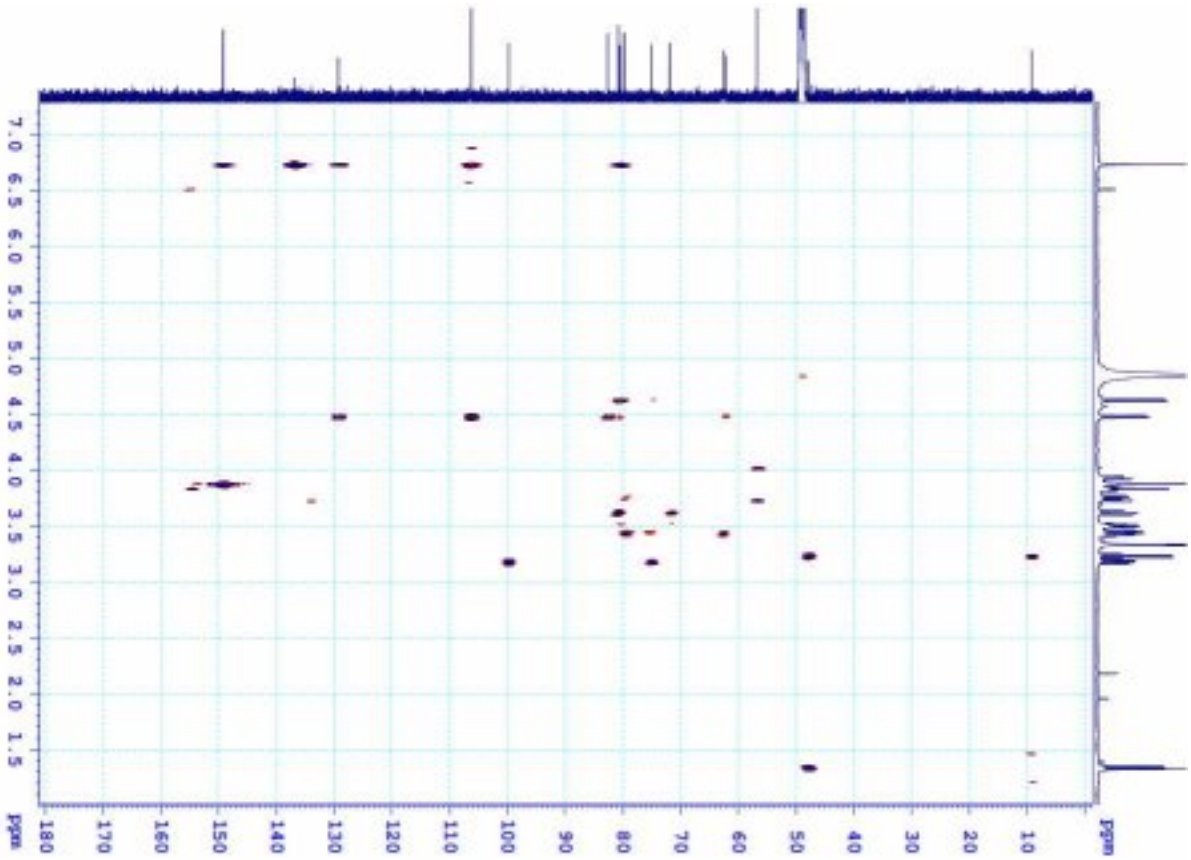
Phụ lục 3.4.2. Phổ ^{1}H-NMR của hợp chất HT4



Phụ lục 3.4.3. Phổ ^{13}C-NMR của hợp chất HT4

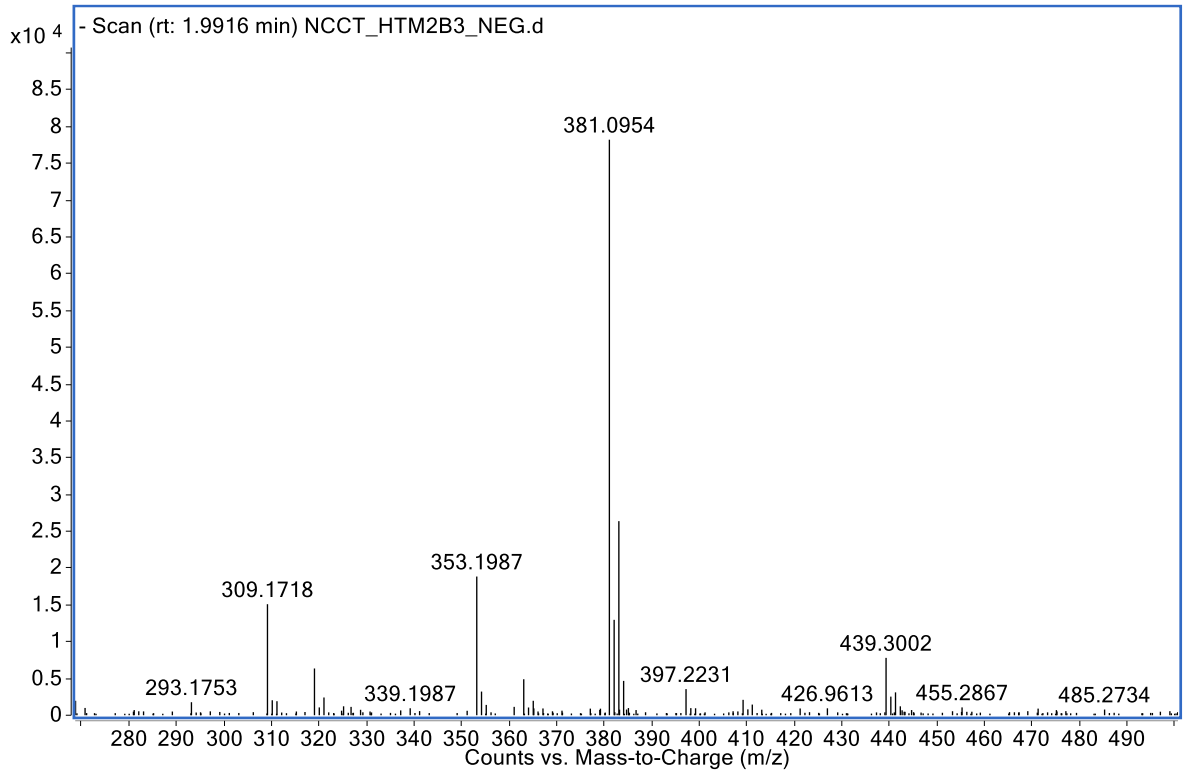


Phụ lục 3.4.4. Phổ HSQC của hợp chất HT4

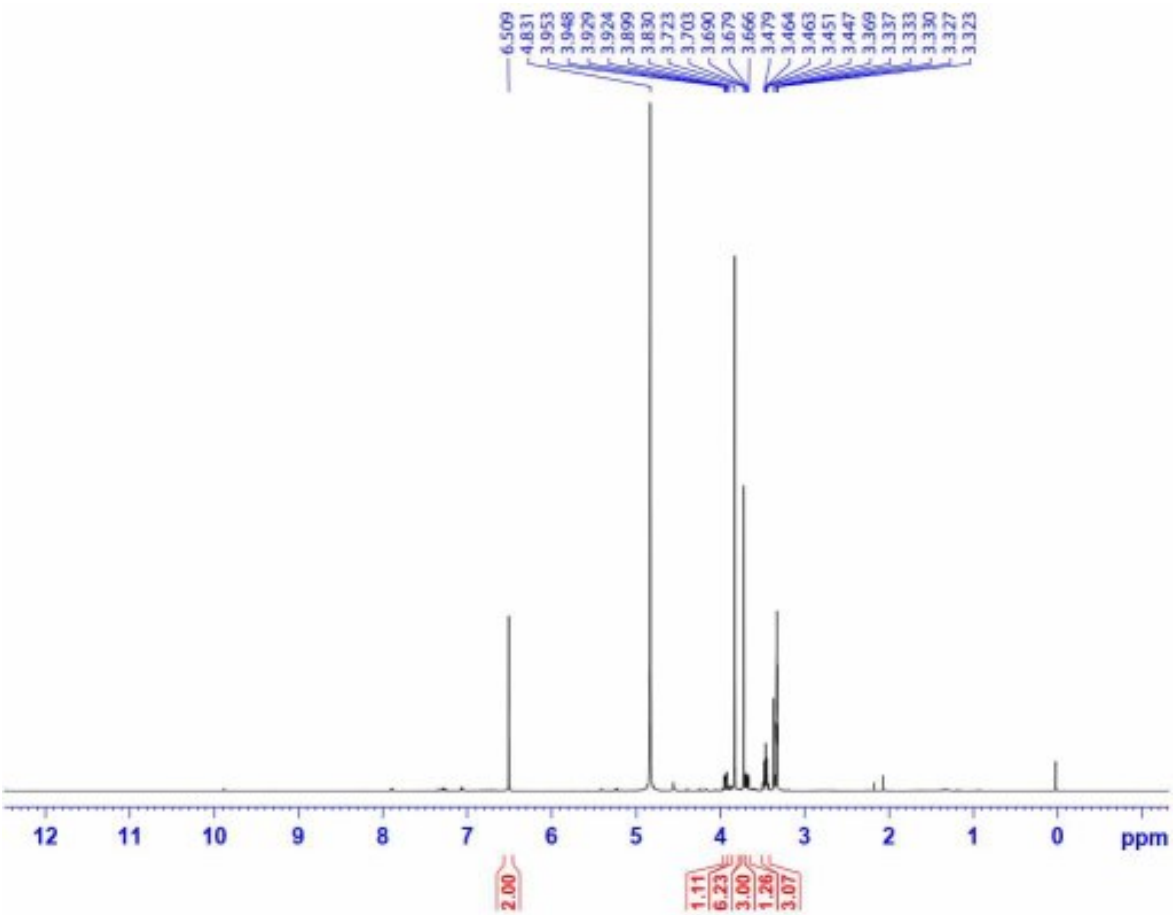


Phụ lục 3.4.5. Phổ HMBC của hợp chất HT4

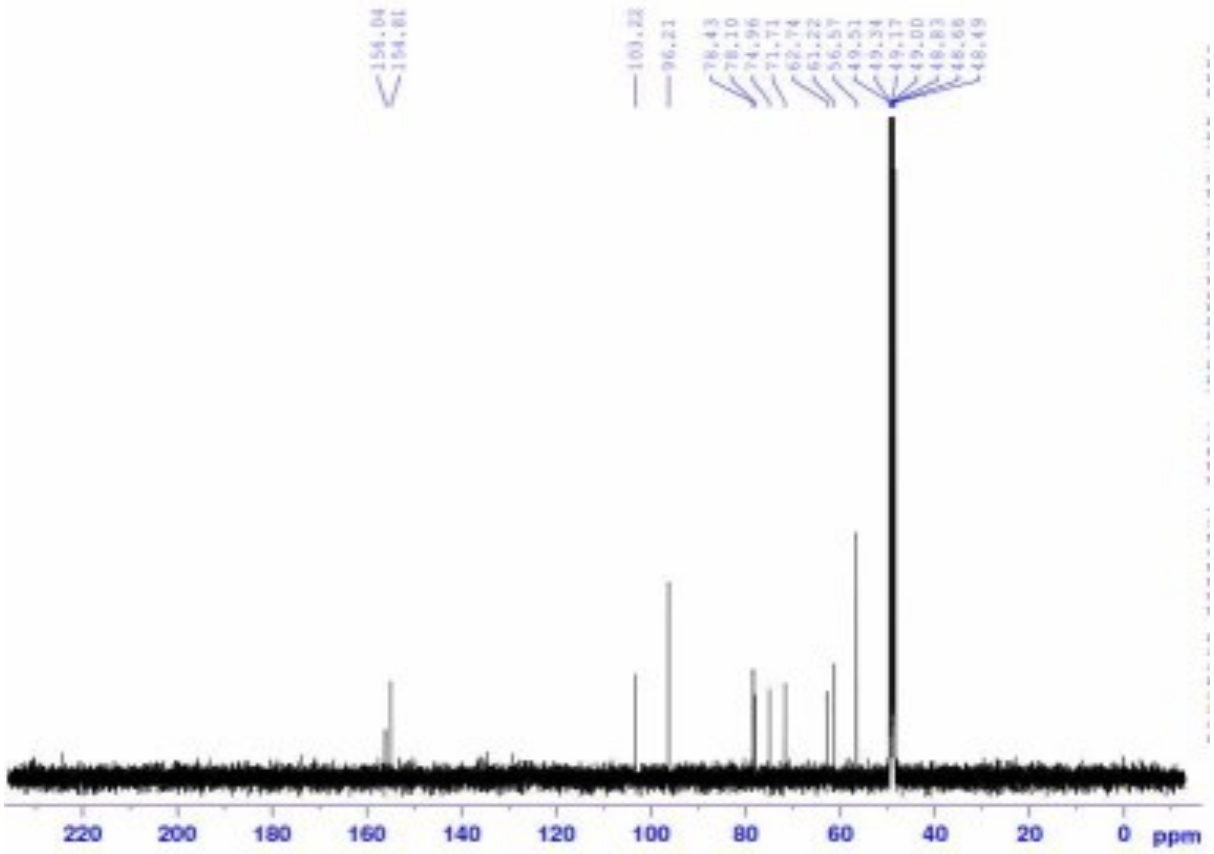
Phụ lục 3.5. Phổ HR-MS và NMR của hợp chất HT5: 3,4,5-Trimethoxyphenyl-β-D-glucopyranoside



Phụ lục 3.5.1. Phổ HR-MS của hợp chất HT5

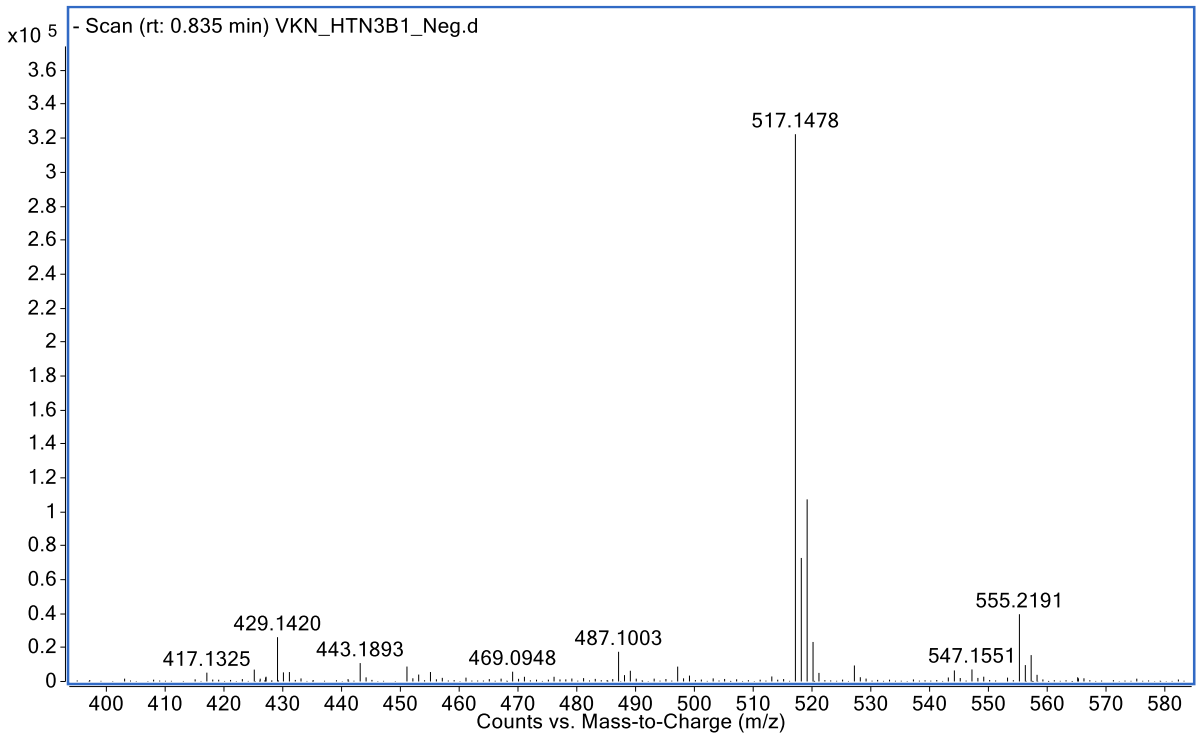


Phụ lục 3.5.2. Phổ ^{1}H-NMR của hợp chất HT5

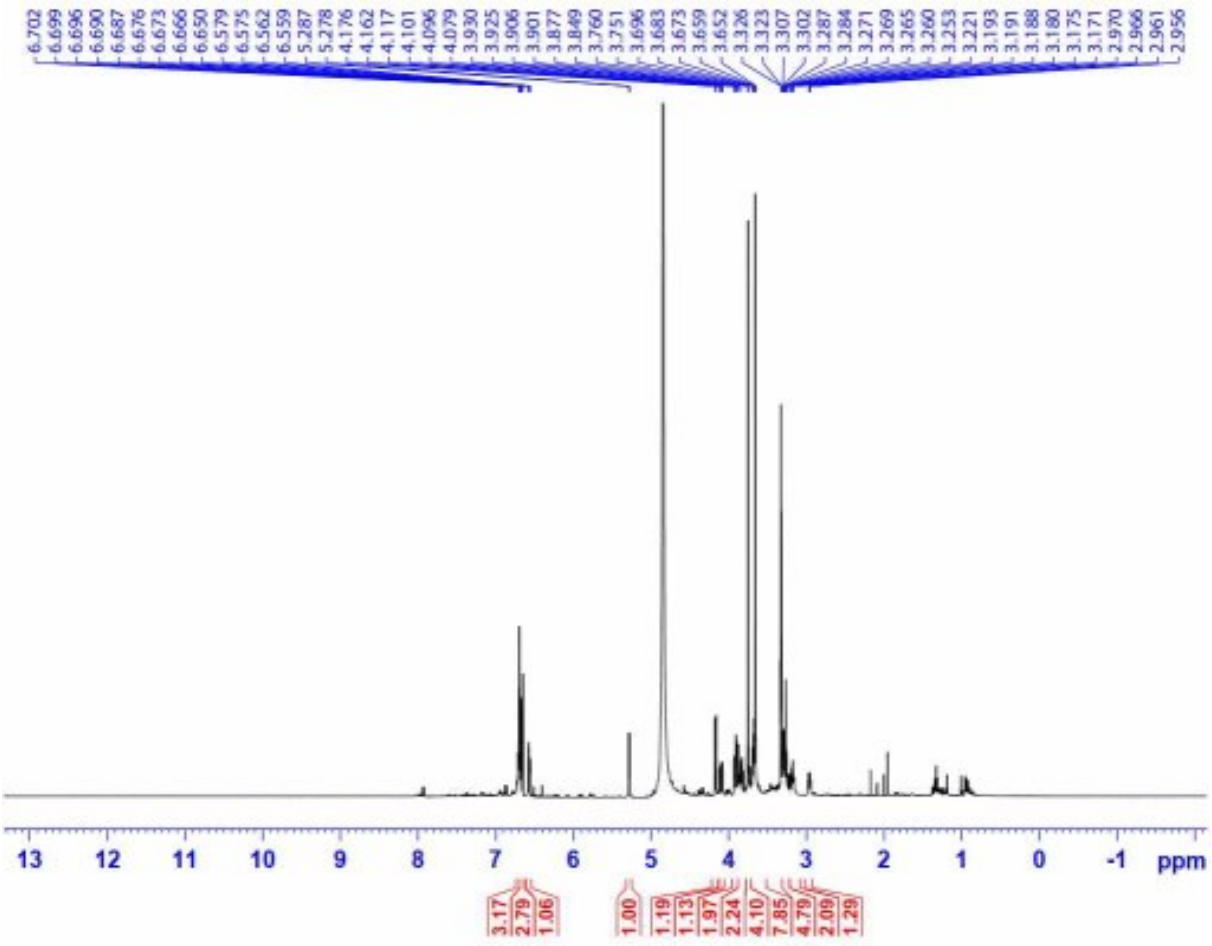


Phụ lục 3.5.3. Phổ ^{13}C-NMR của hợp chất HT5

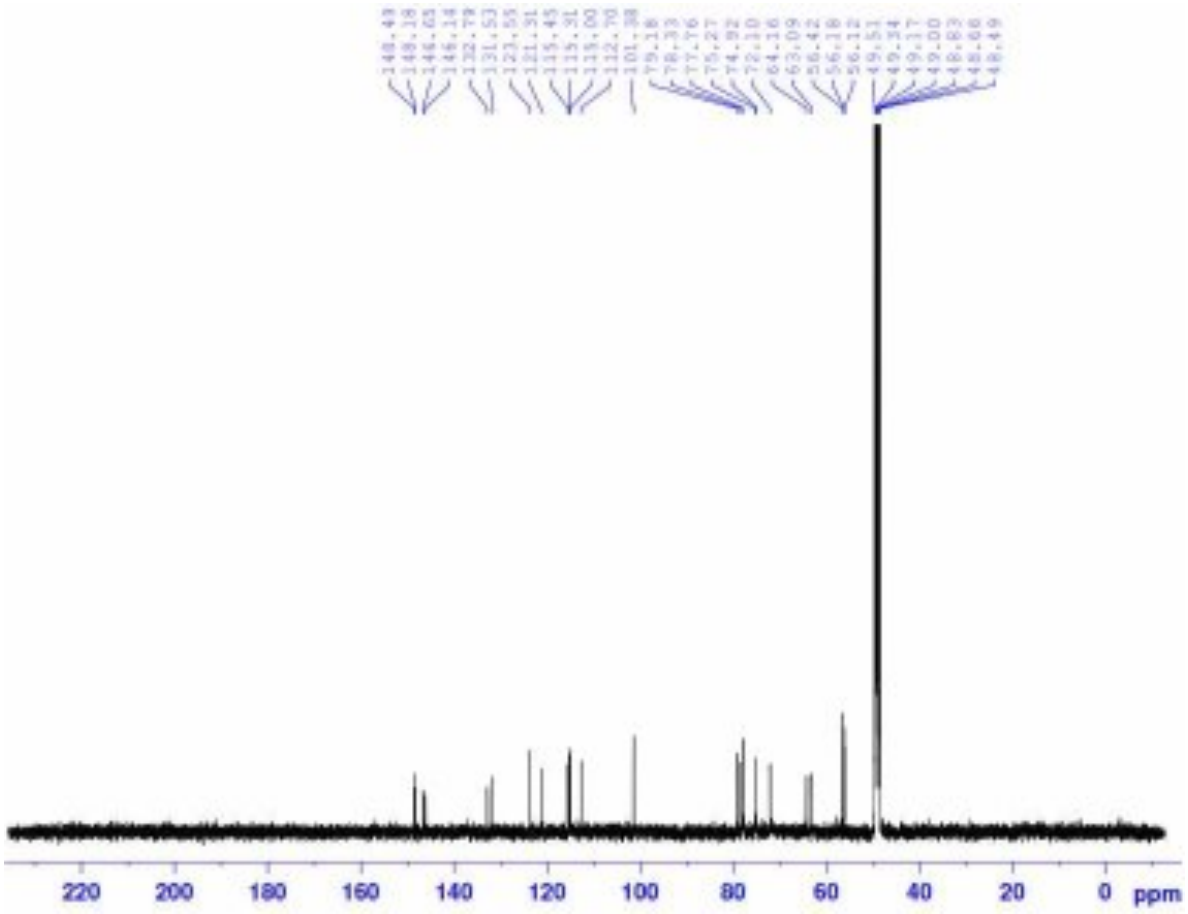
Phụ lục 3.6. Phổ HR-MS và NMR của hợp chất HT6: Hovetrichoside A



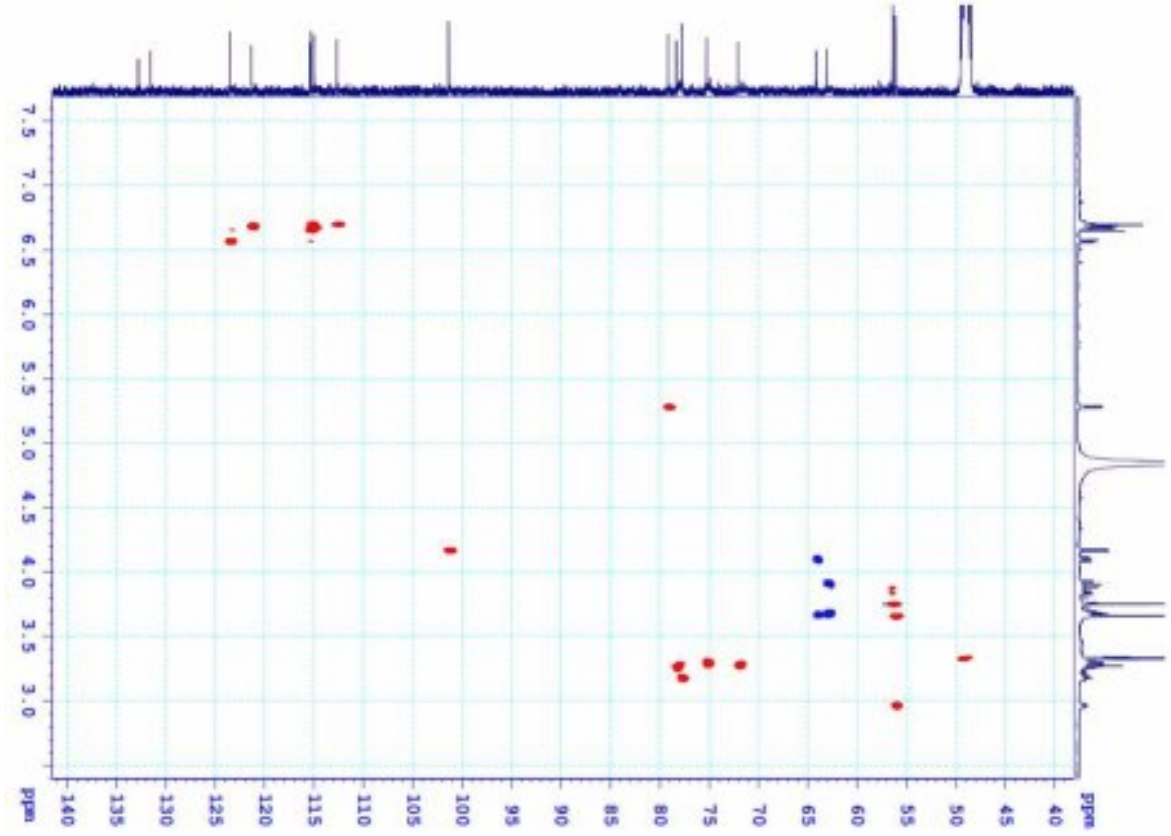
Phụ lục 3.6.1. Phổ HR-MS của hợp chất HT6



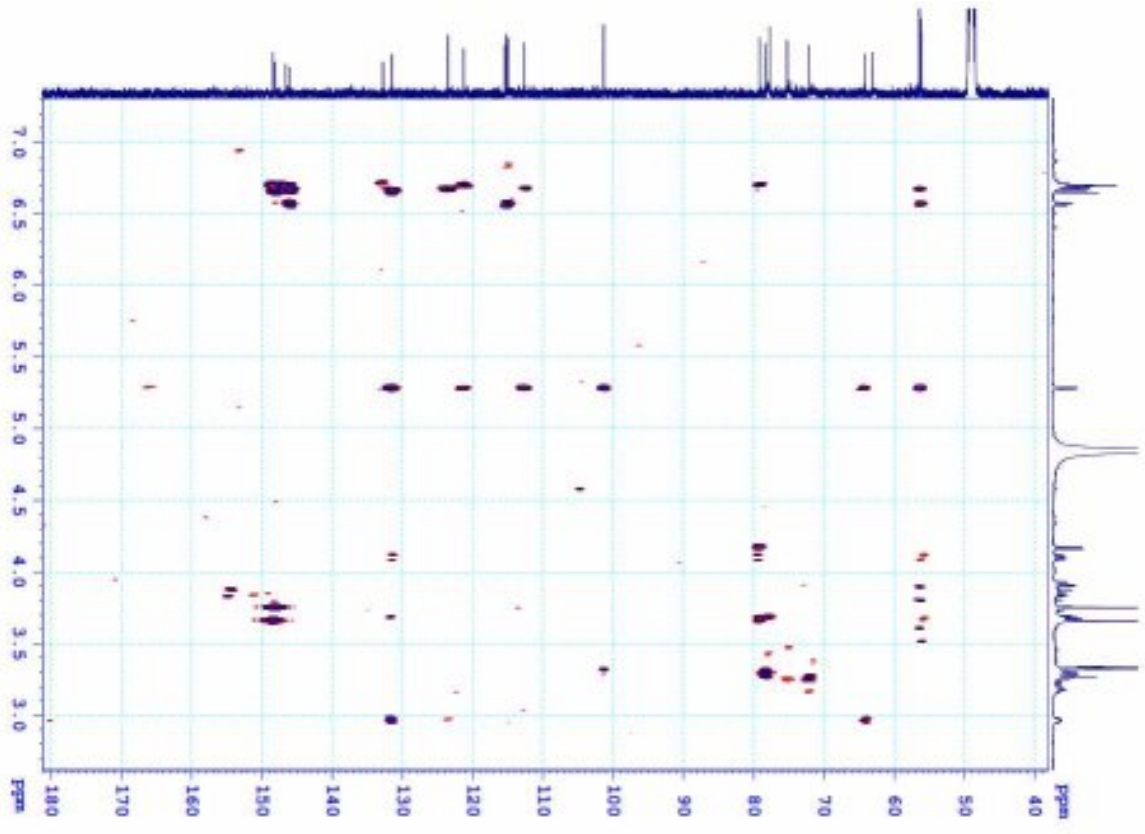
Phụ lục 3.6.2. Phổ ^{1}H-NMR của hợp chất HT6



Phụ lục 3.6.3. Phổ ^{13}C-NMR của hợp chất HT6

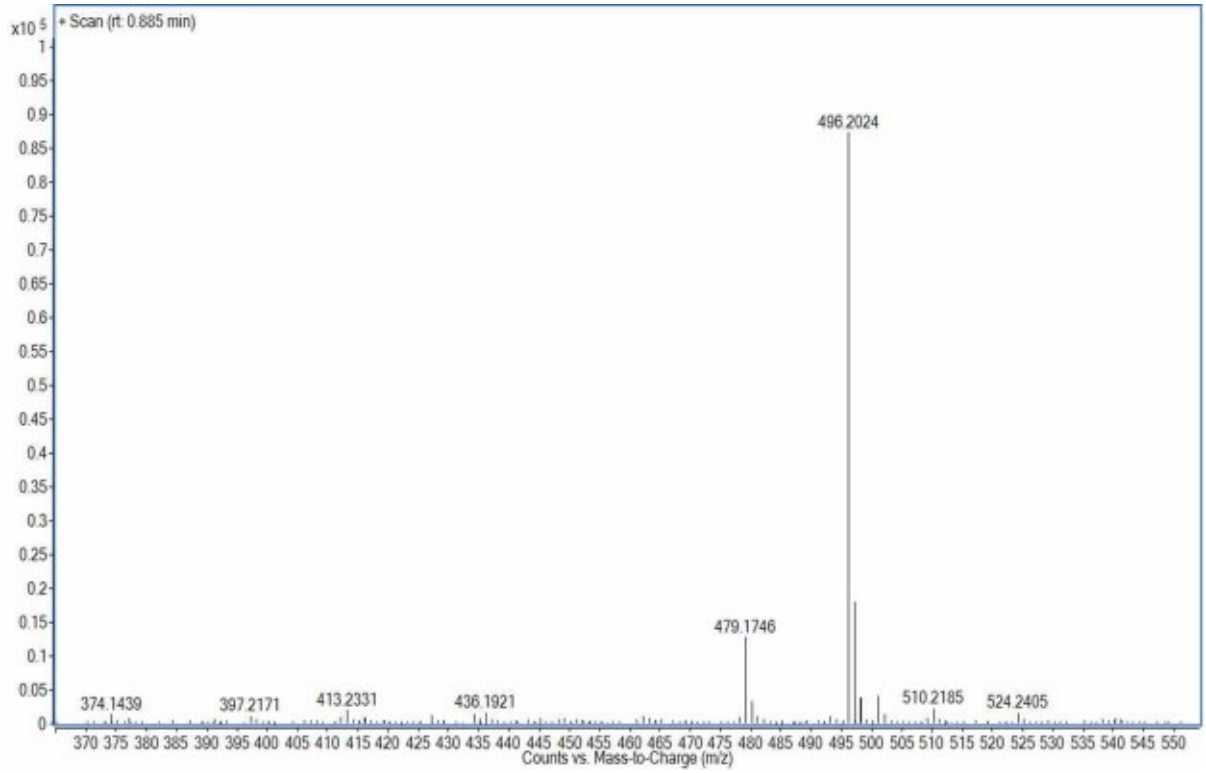


Phụ lục 3.6.4. Phổ HSQC của hợp chất HT6

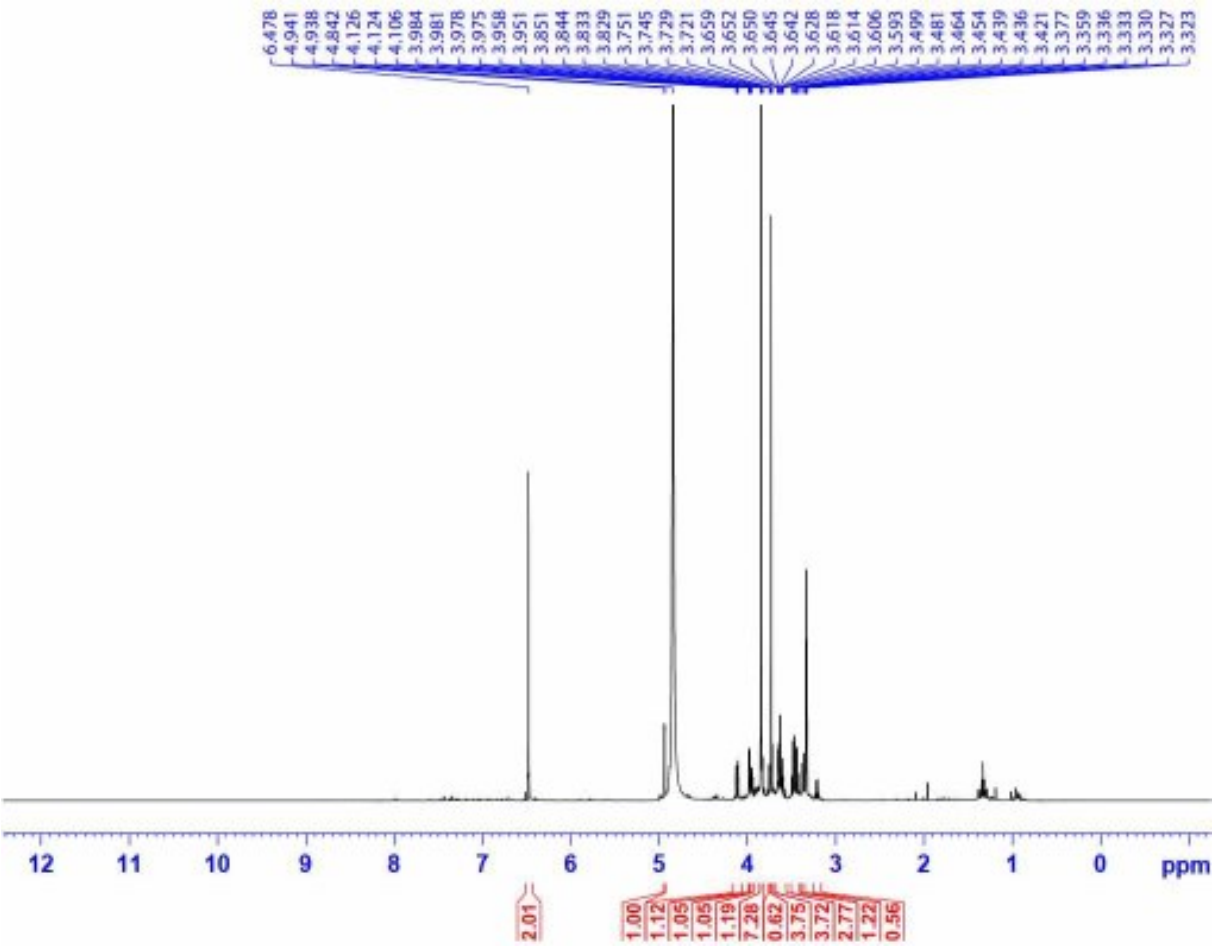


Phụ lục 3.6.5. Phổ HMBC của hợp chất HT6

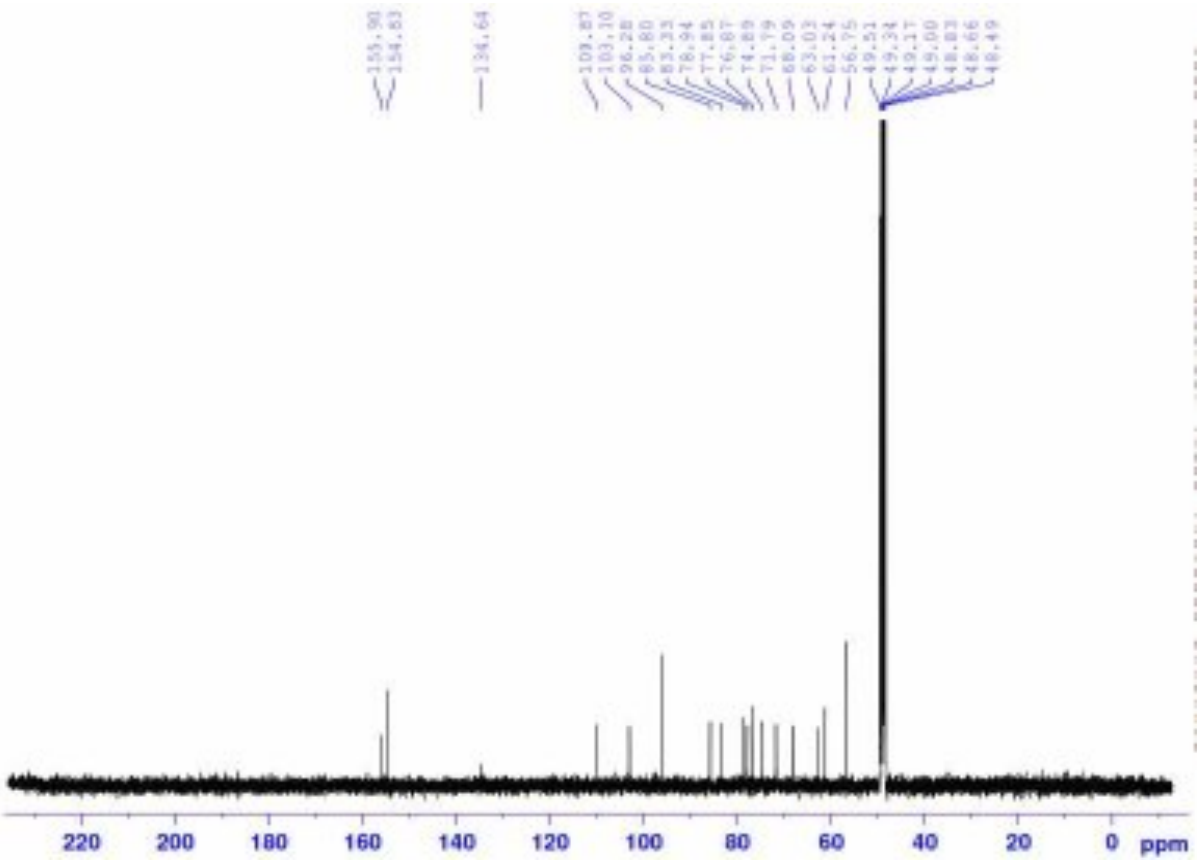
Phụ lục 3.7. Phổ HR-MS và NMR của hợp chất HT7: Rhyncosede C



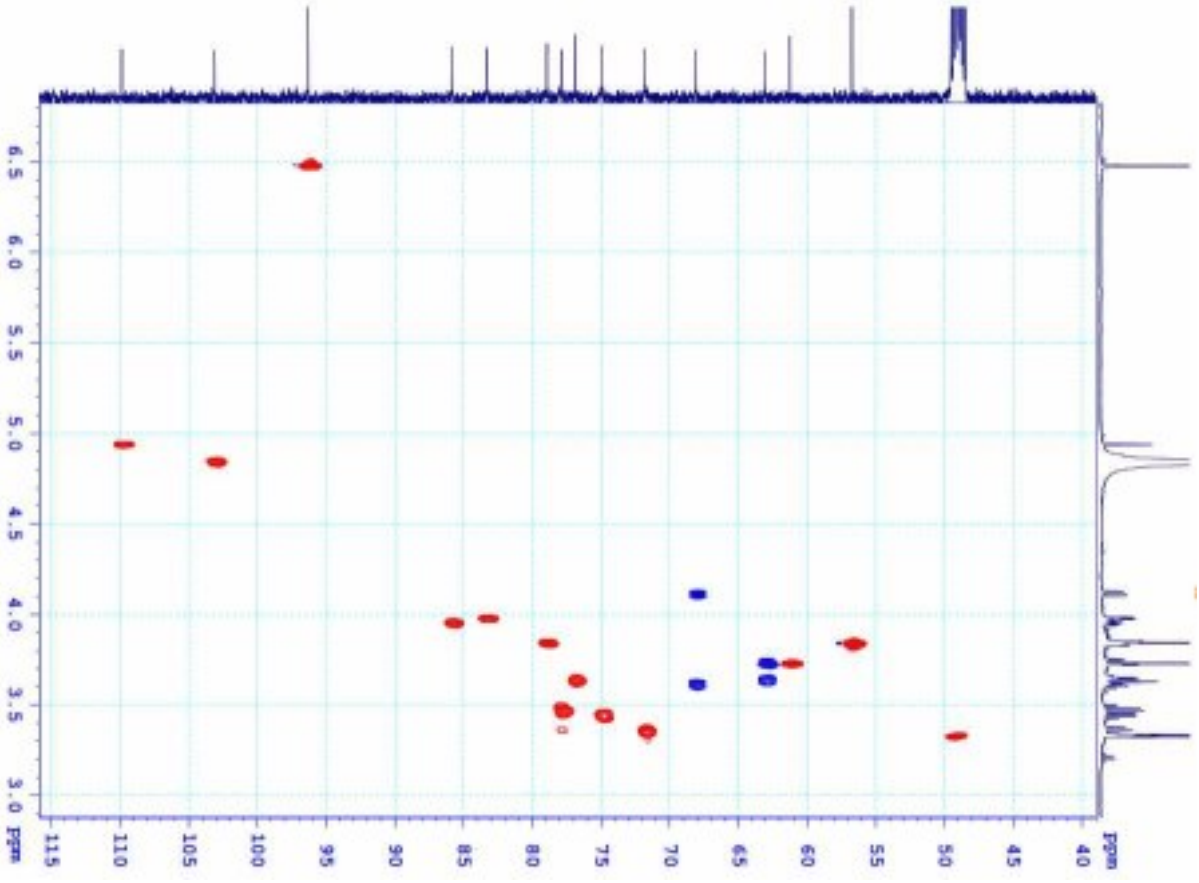
Phụ lục 3.7.1. Phổ HR-MS của hợp chất HT7



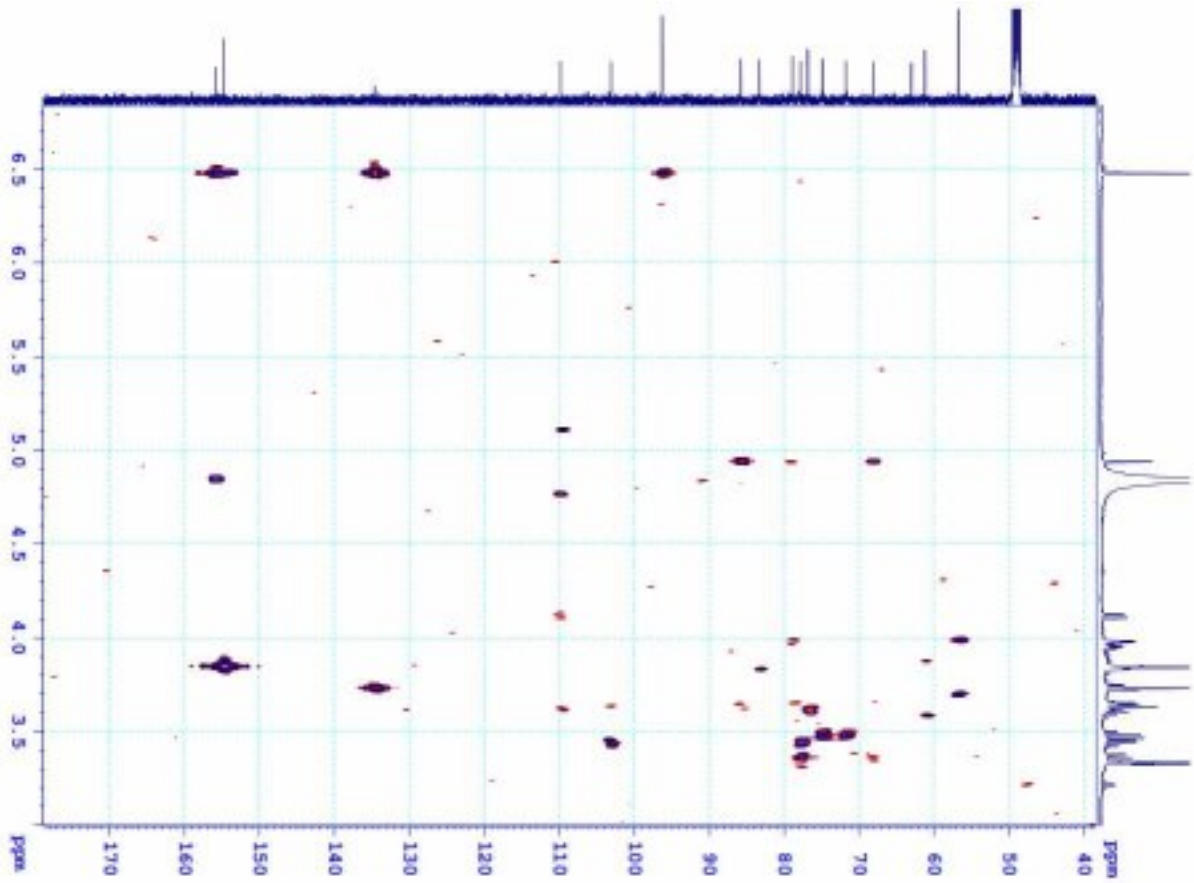
Phụ lục 3.7.2. Phổ ^{1}H-NMR của hợp chất HT7



Phụ lục 3.7.3. Phổ ^{13}C-NMR của hợp chất HT7

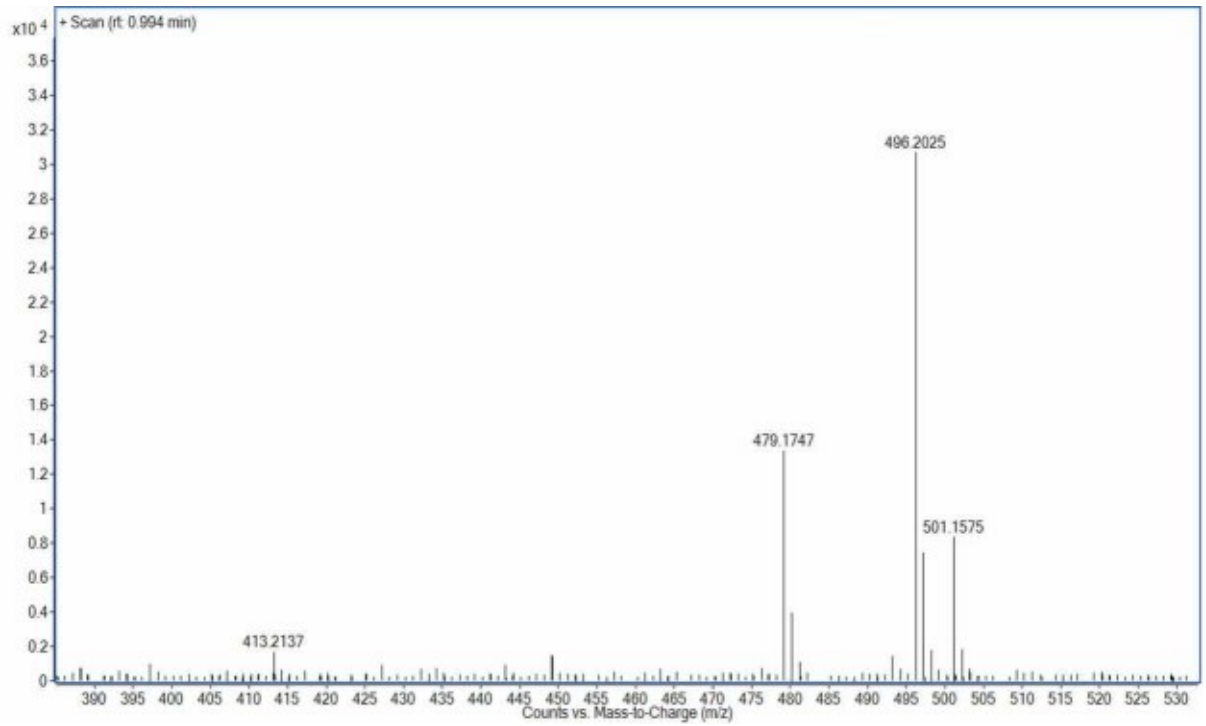


Phụ lục 3.7.4. Phổ HSQC của hợp chất HT7

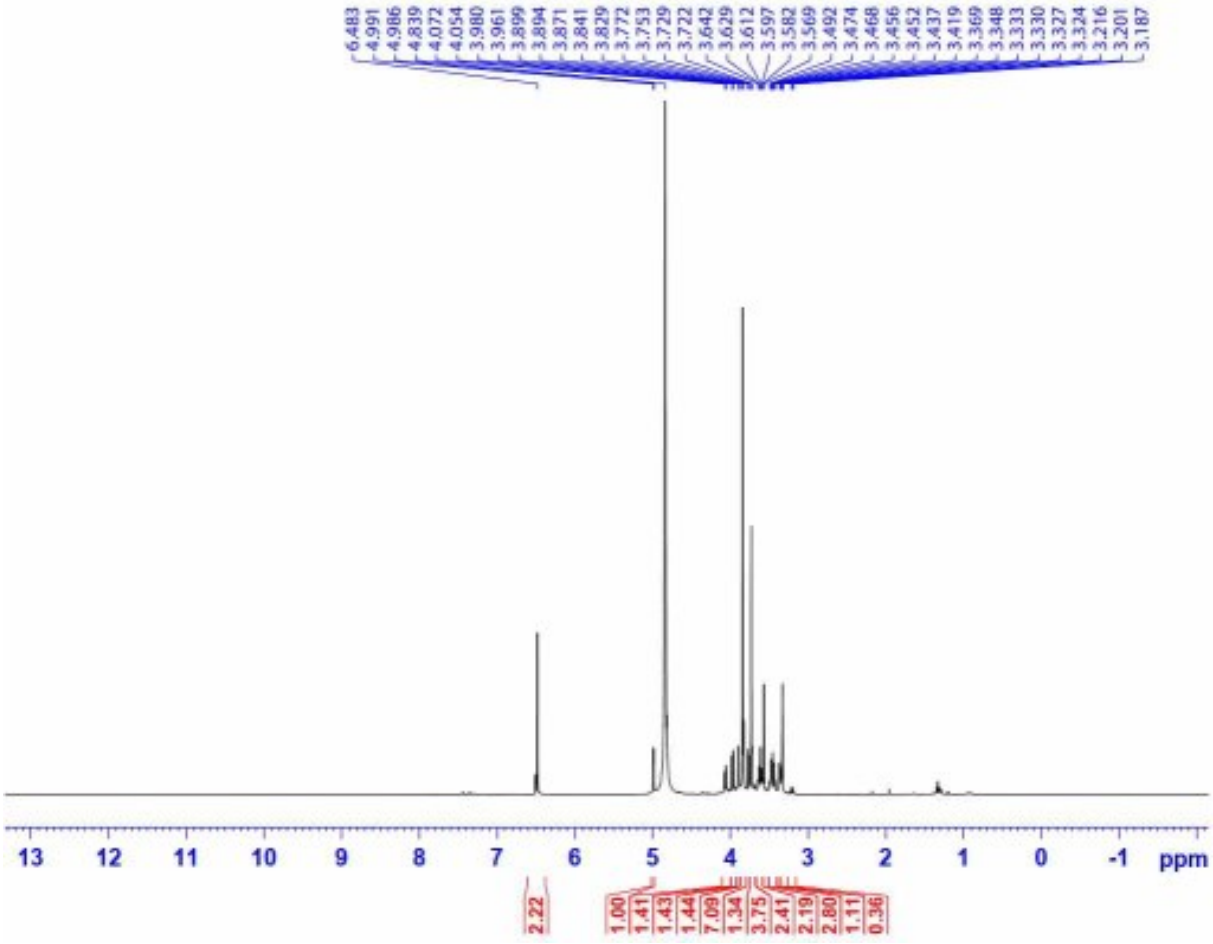


Phụ lục 3.7.5. Phổ HMBC của hợp chất HT7

Phụ lục 3.8. Phổ HR-MS và NMR của hợp chất HTN8: 3,4,5-Trimethoxyphenyl β-D-apiofuranosyl-(1′′-6′)-β-D-glucopyranoside

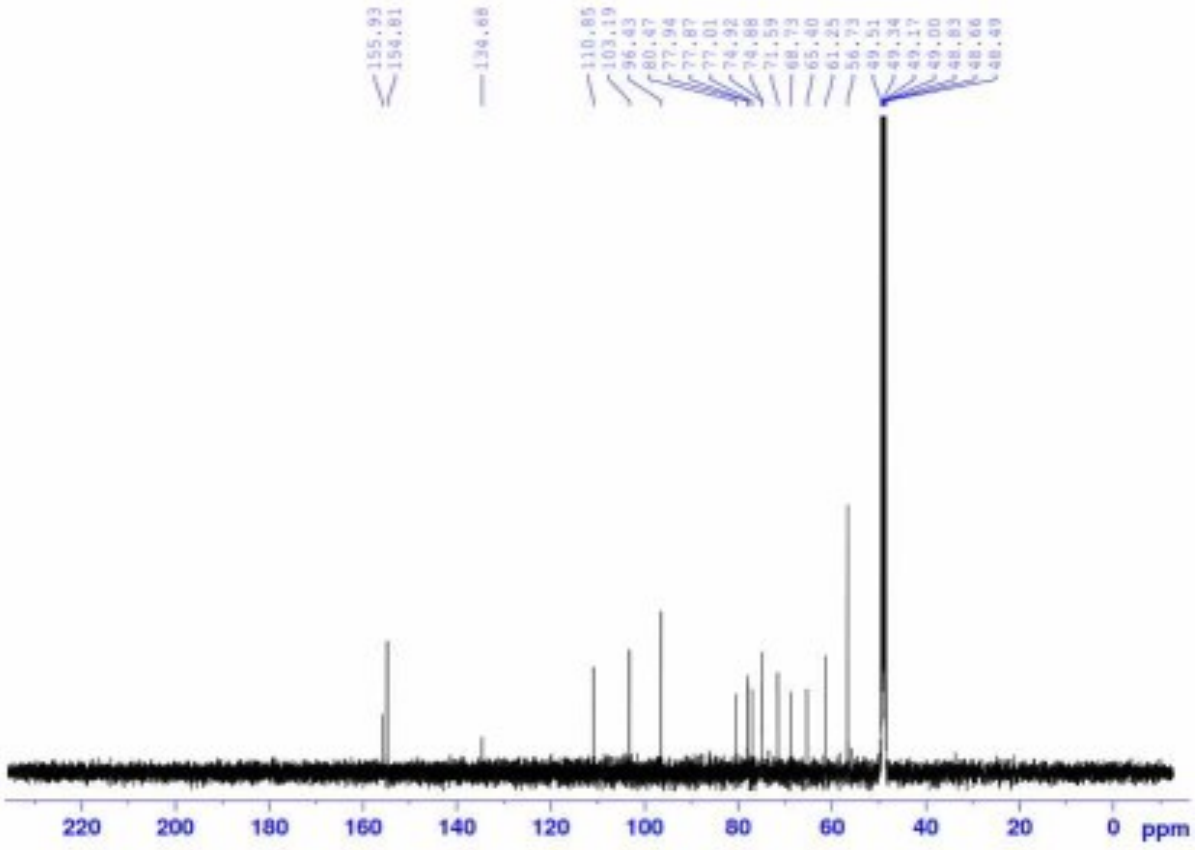


Phụ lục 3.8.1. Phổ HR-MS của hợp chất HT8

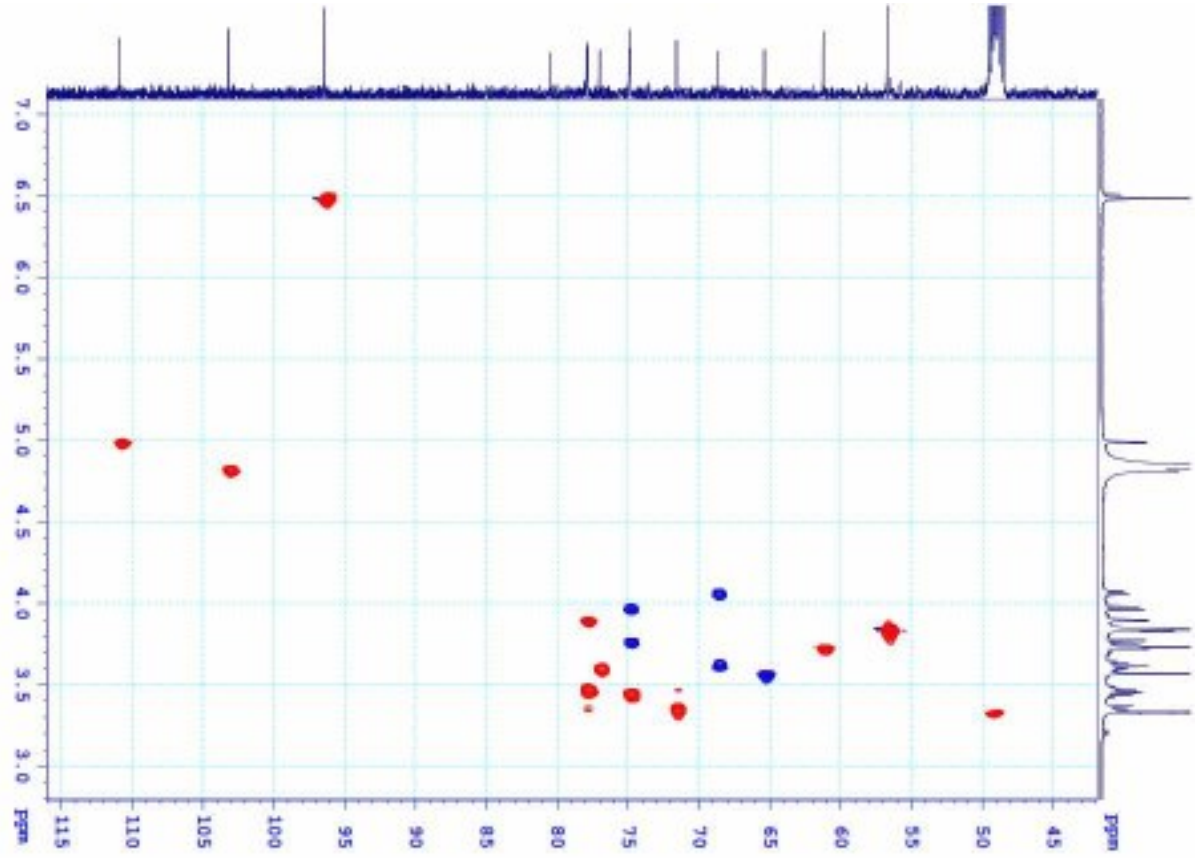


Phụ lục 3.8.2. Phổ ^{1}H-NMR của hợp chất HT8

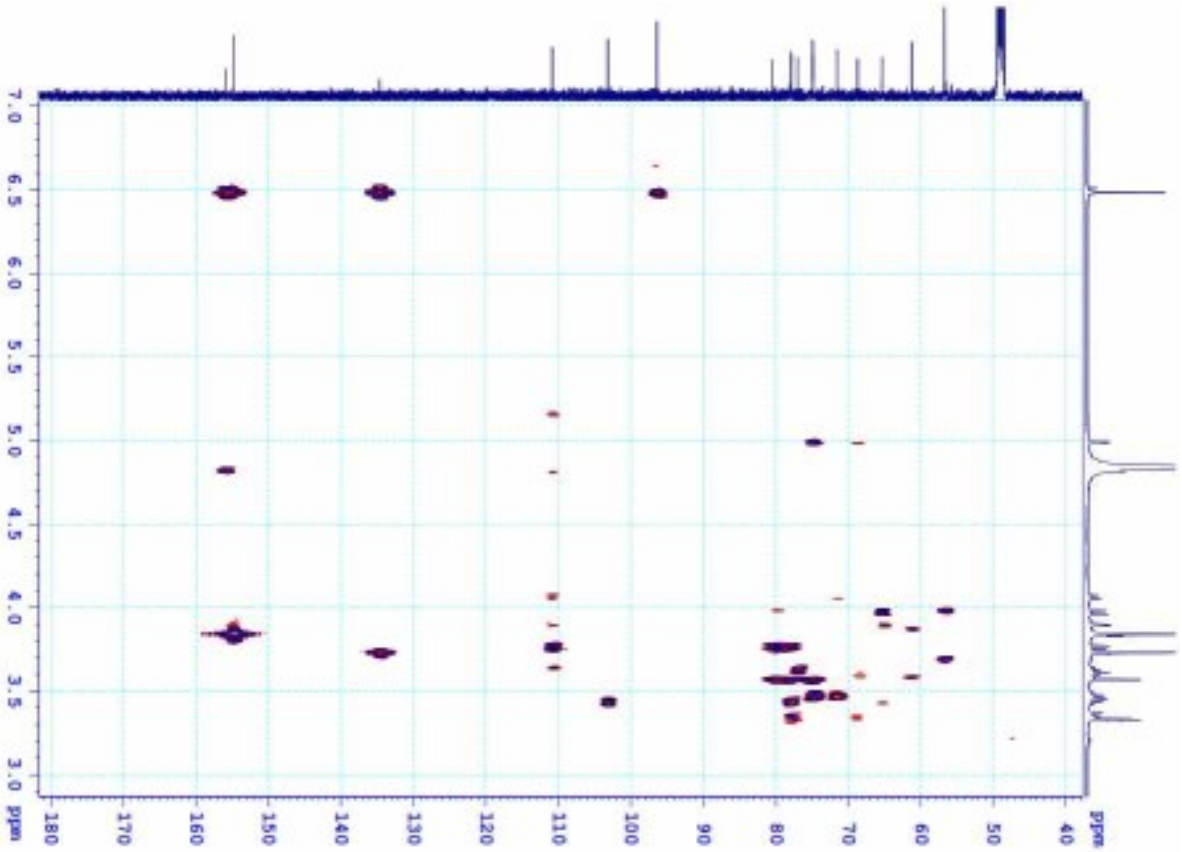
PL81



Phụ lục 3.8.3. Phổ ^{13}C-NMR của hợp chất HT8

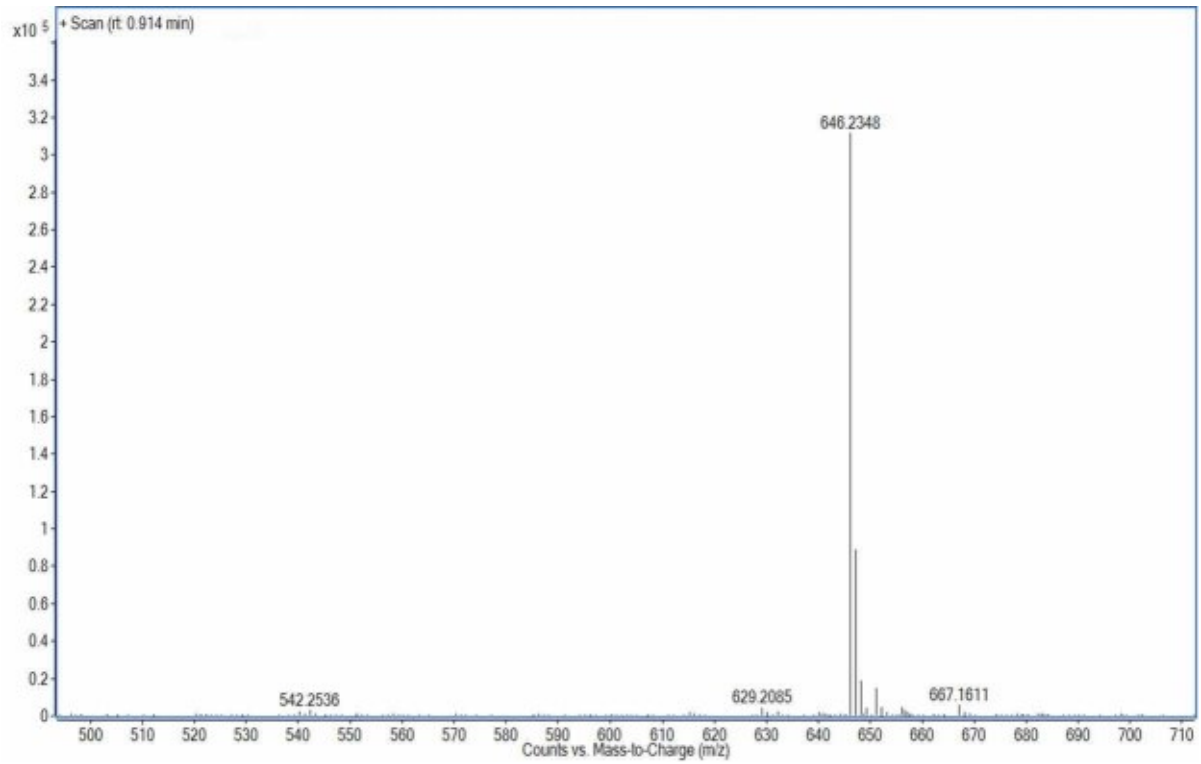


Phụ lục 3.8.4. Phổ HSQC của hợp chất HT8

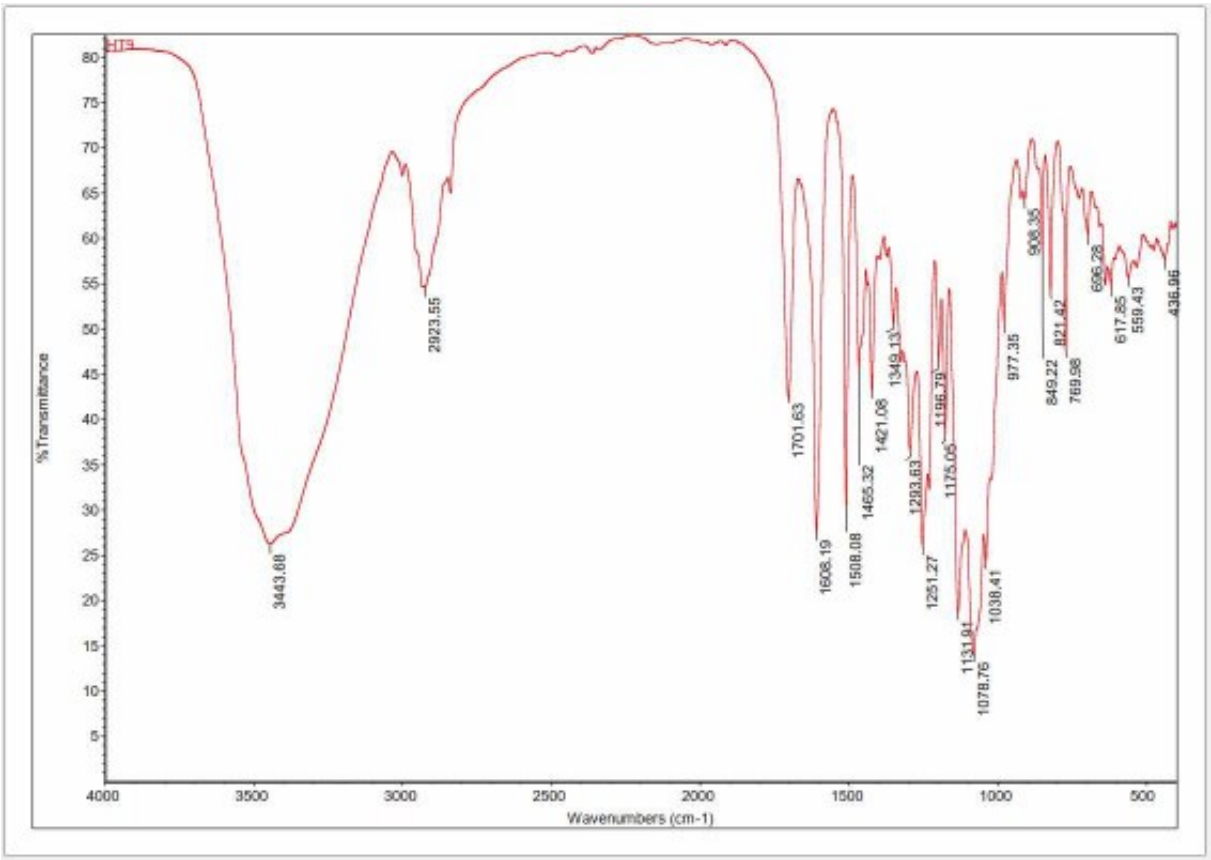


Phụ lục 3.8.5. Phổ HMBC của hợp chất HT8

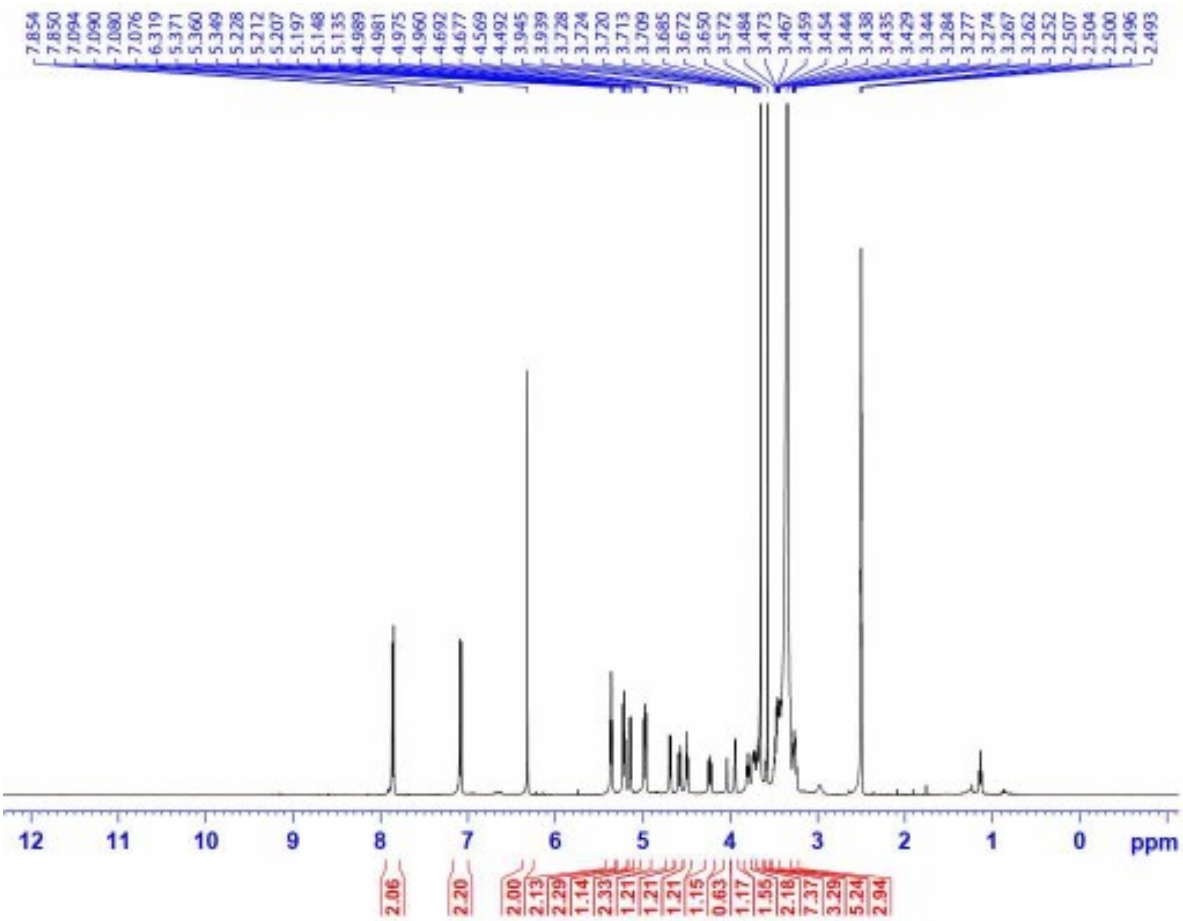
Phụ lục 3.9. Phổ HR-MS, IR và NMR của hợp chất HT9 – Heliterminozide A



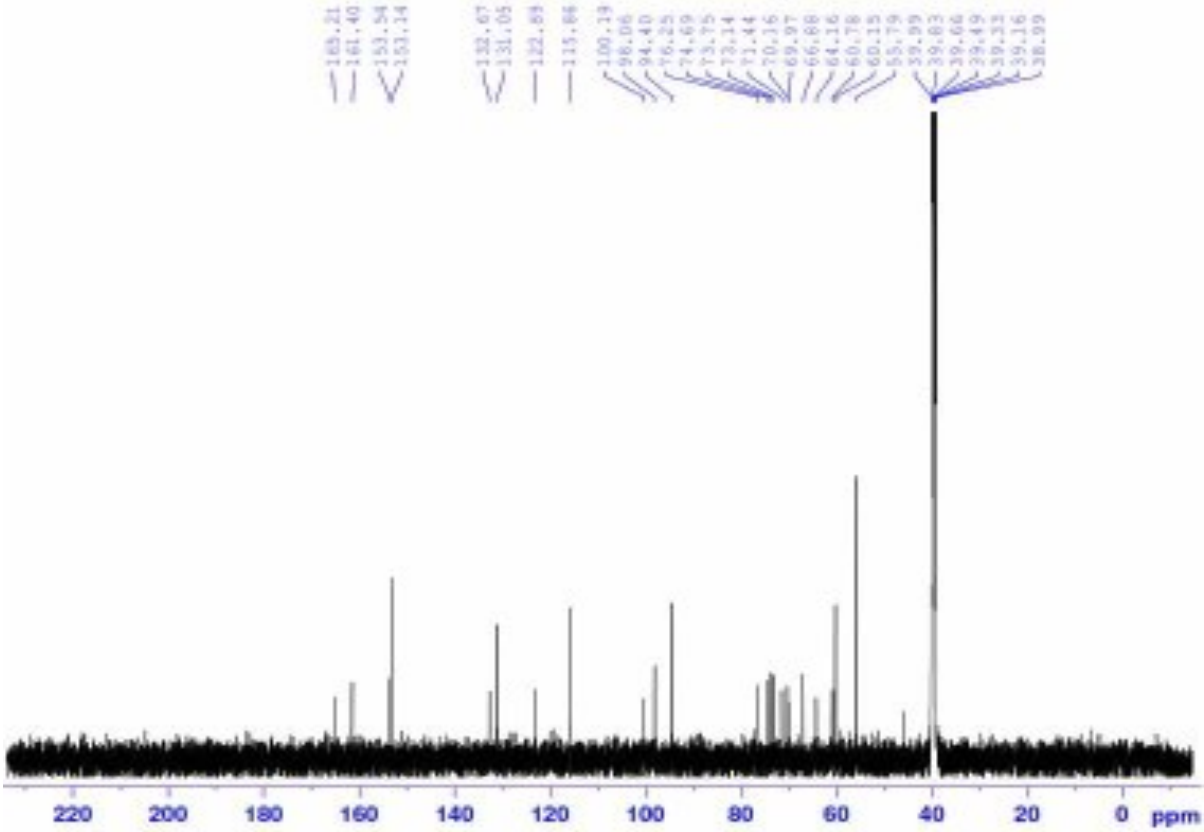
Phụ lục 3.9.1. Phổ HR-MS của hợp chất HT9



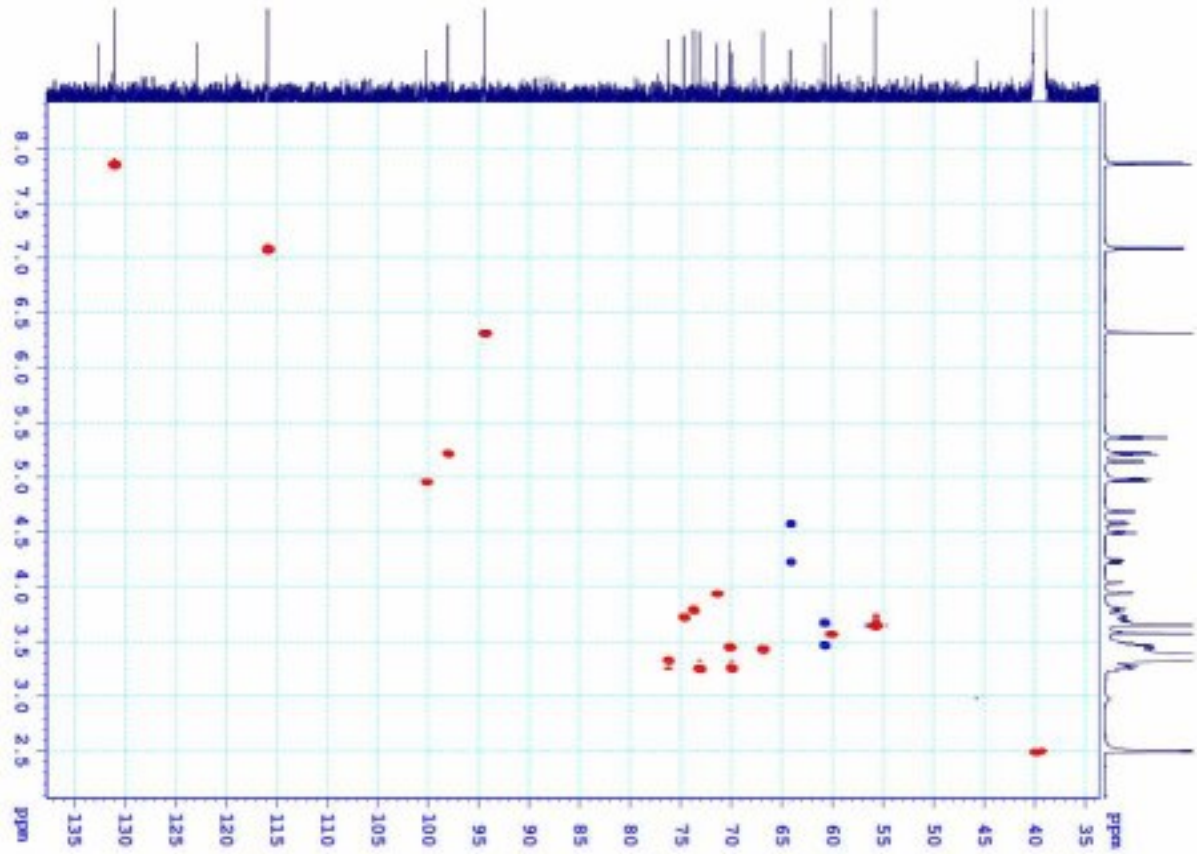
Phụ lục 3.9.2. Phổ IR của hợp chất HT9



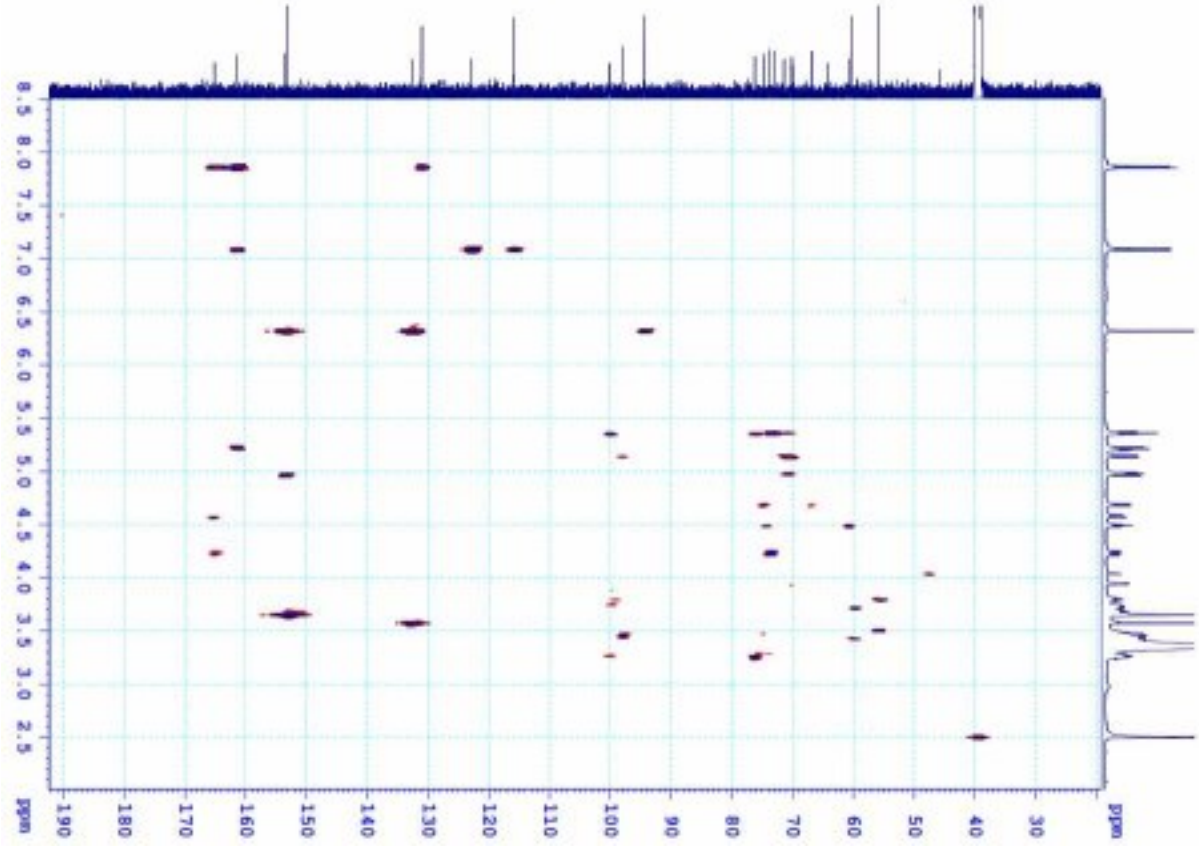
Phụ lục 3.9.3. Phổ ^{1}H-NMR của hợp chất HT9



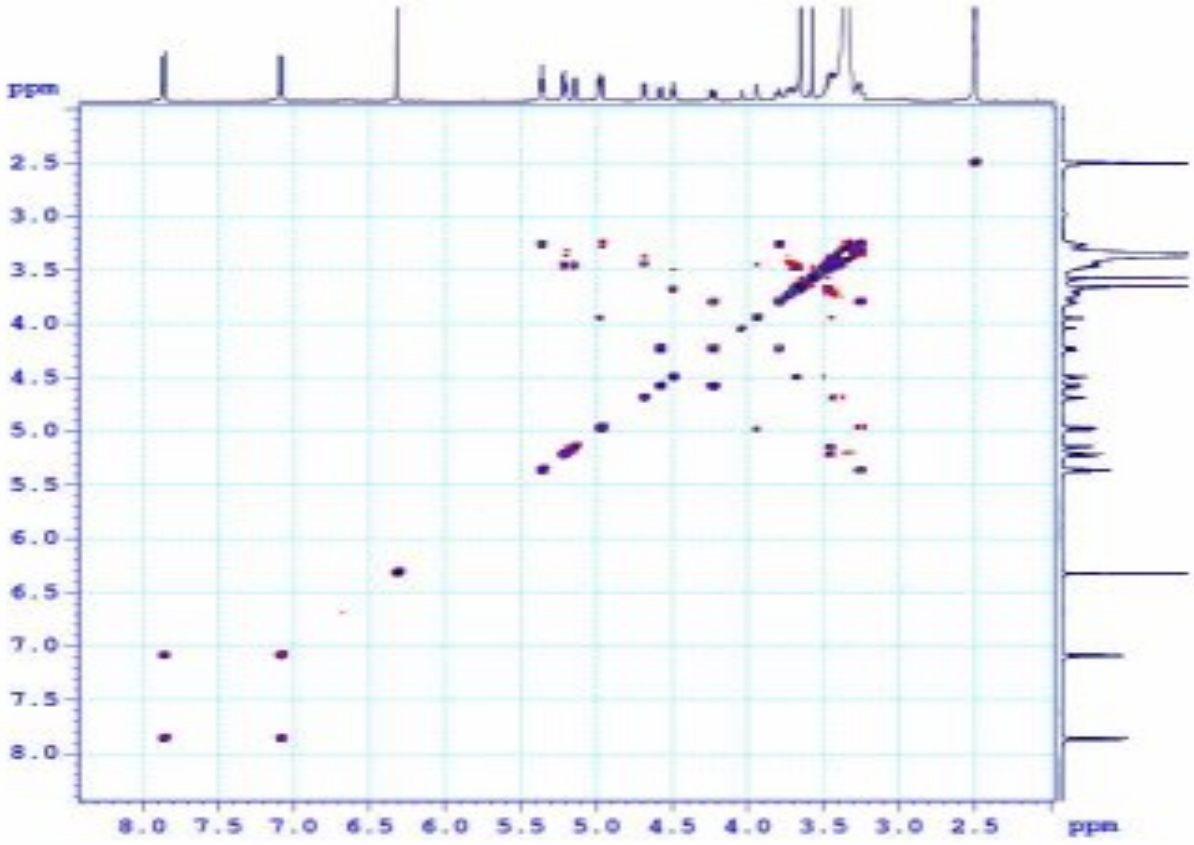
Phụ lục 3.9.4. Phổ ^{13}C-NMR của hợp chất HT9



Phụ lục 3.9.5. Phổ HSQC của hợp chất HT9

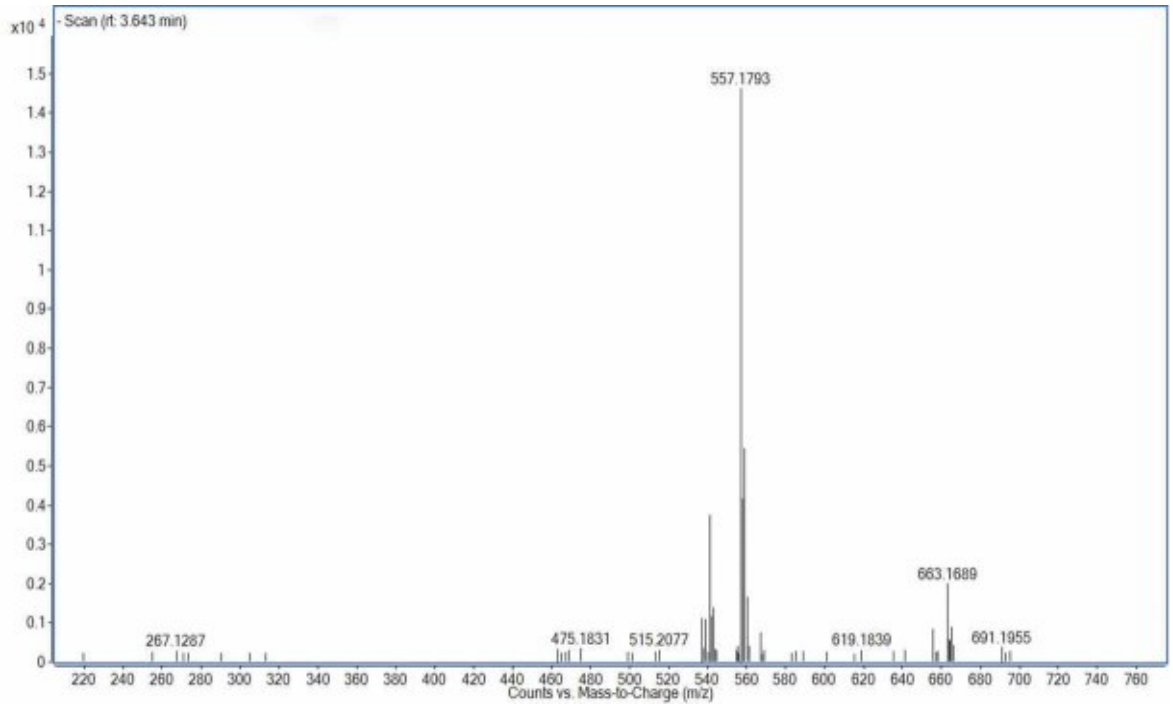


Phụ lục 3.9.6. Phổ HMBC của hợp chất HT9

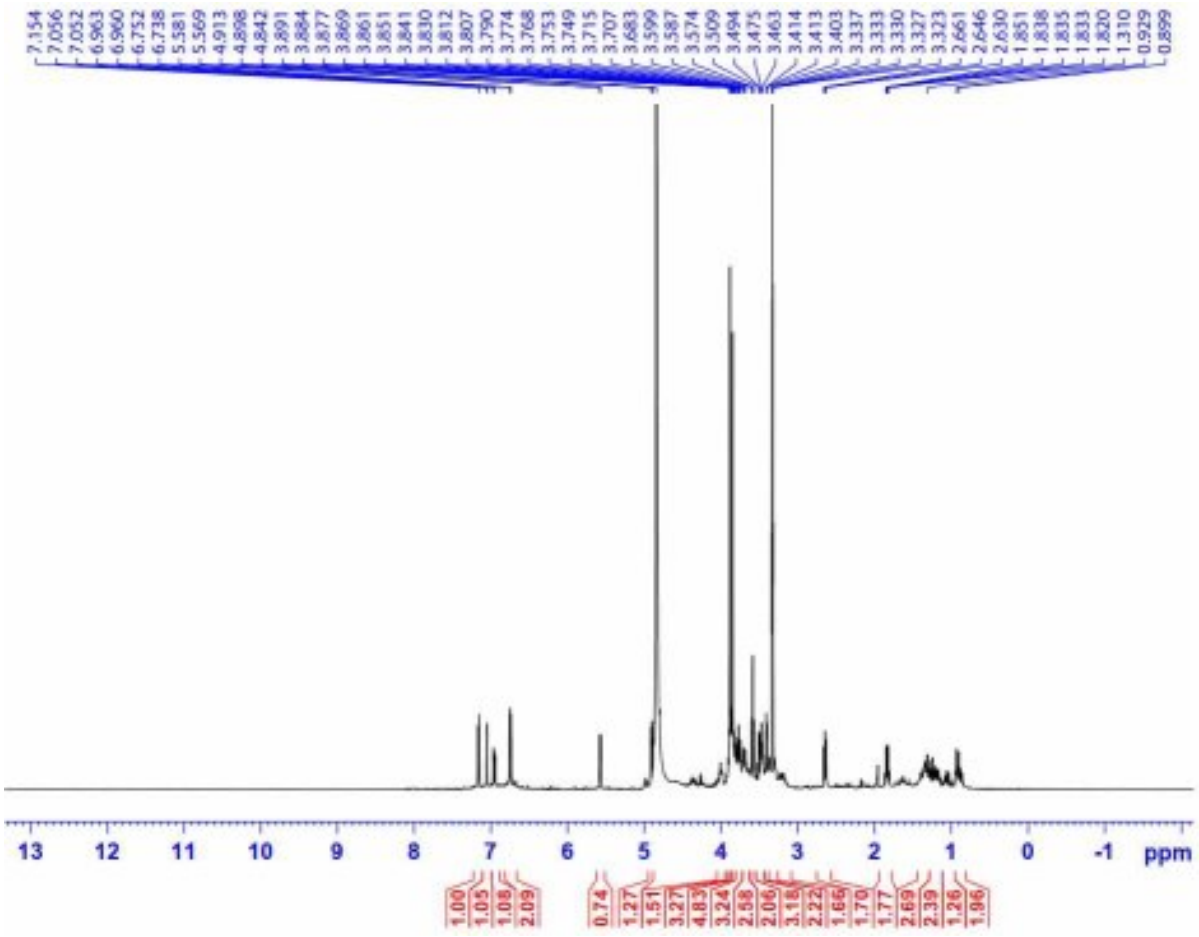


Phụ lục 3.9.7. Phổ COSY của hợp chất HT9

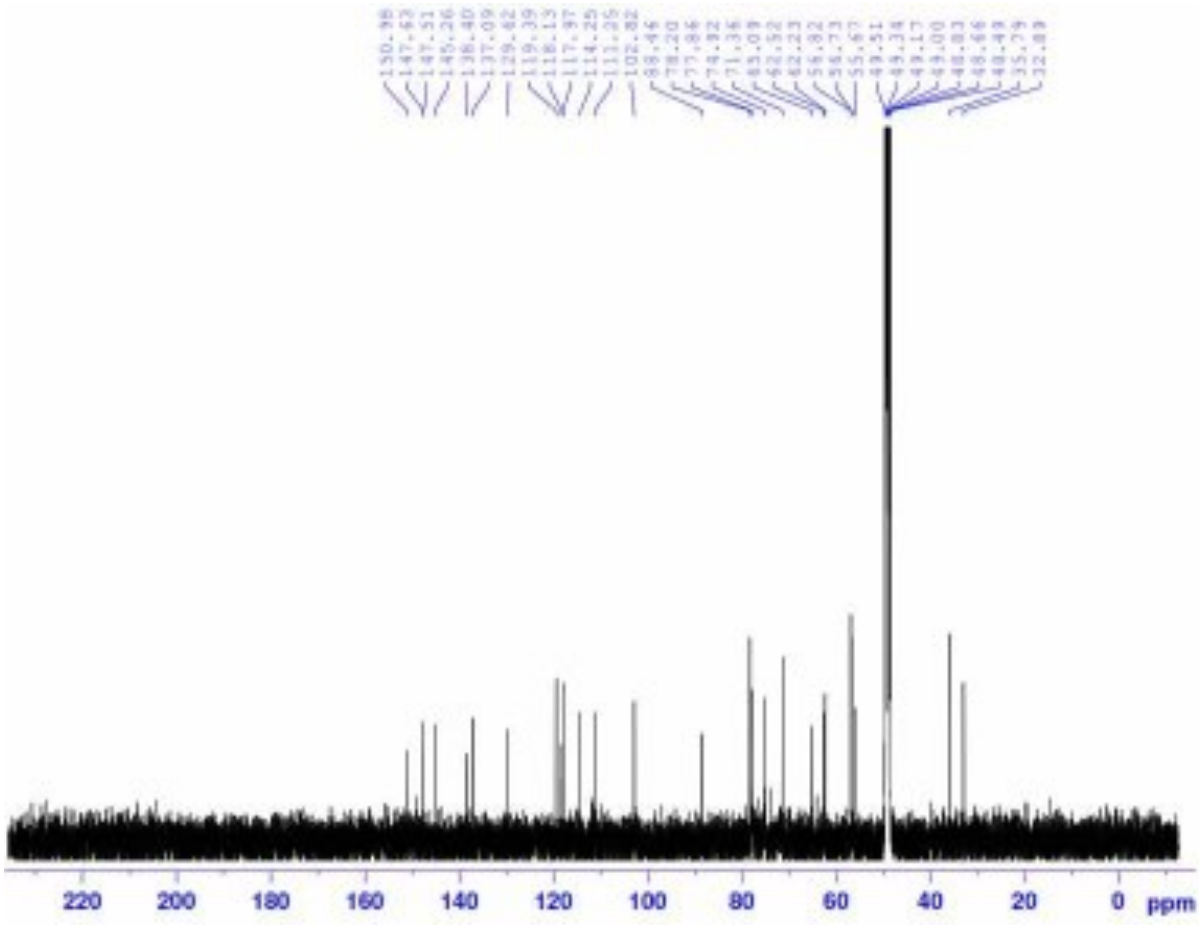
Phụ lục 3.10. Phổ HR-MS, NMR và ECD của hợp chất HT10: 7R,8S-dihydrodehydrodiconeferyl alcohol 4-*O*-*β*-D-glucopyranoside



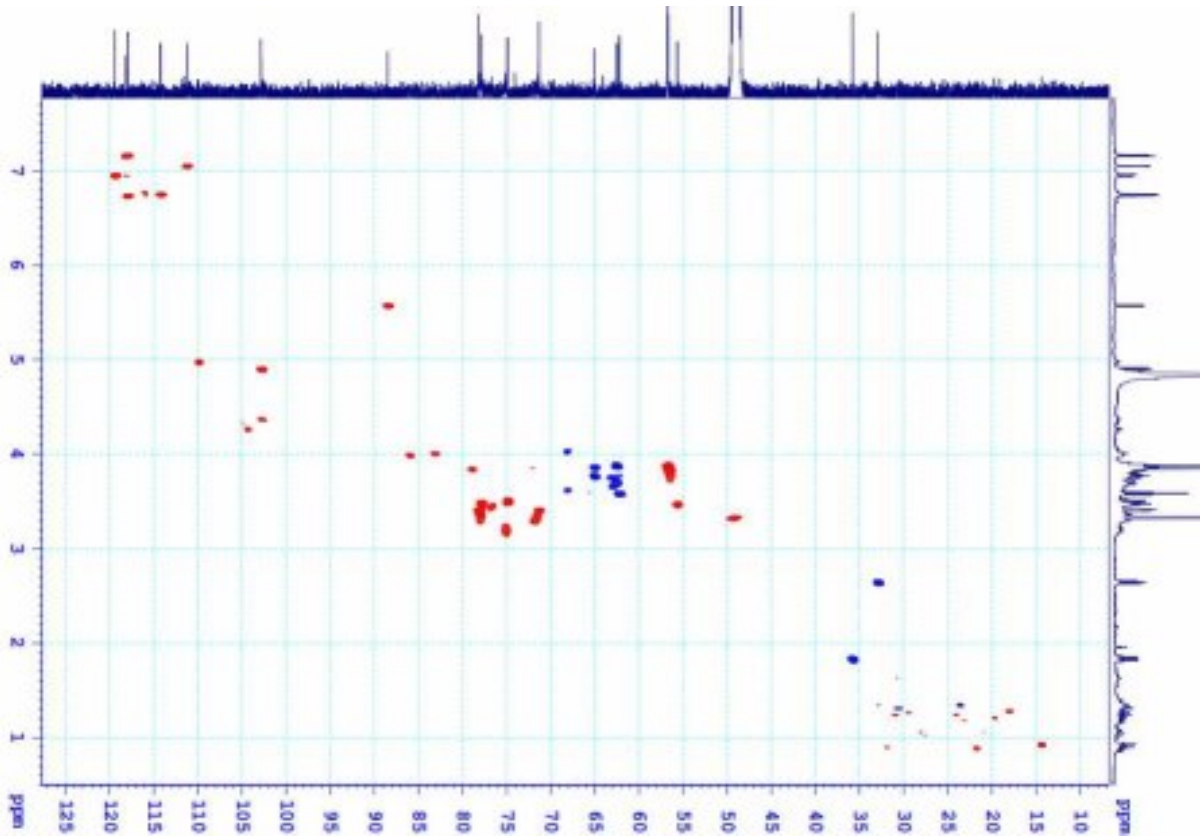
Phụ lục 3.10.1. Phổ HR-MS của hợp chất HT10



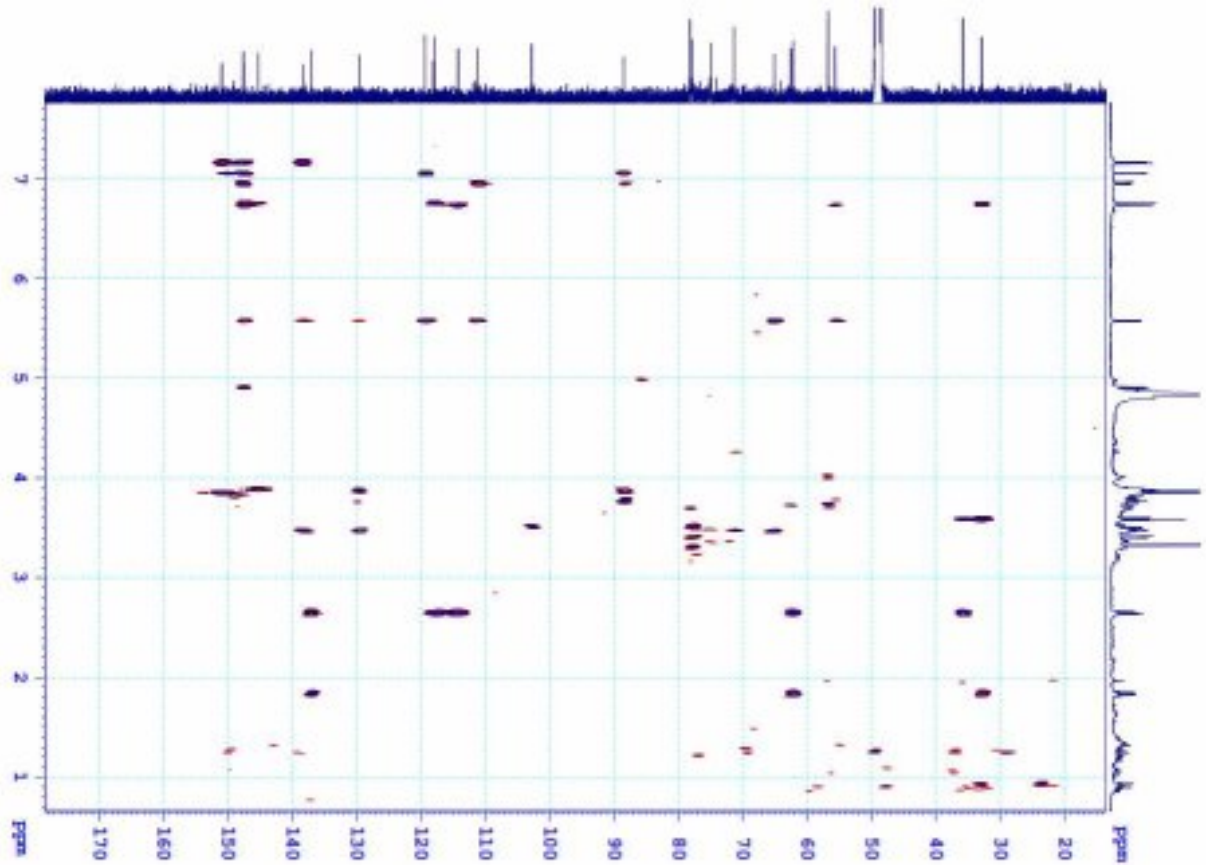
Phụ lục 3.10.2. Phổ ^{1}H-NMR của hợp chất HT10



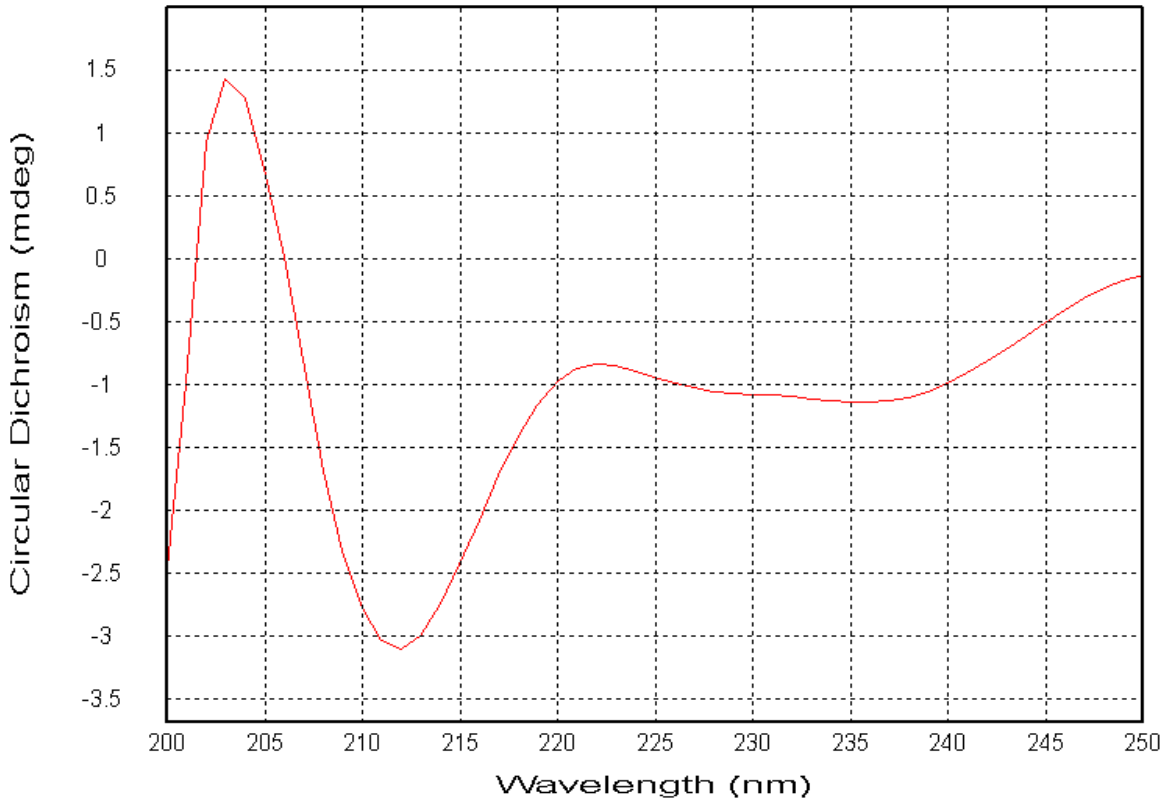
Phụ lục 3.10.3. Phổ ^{13}C-NMR của hợp chất HT10



Phụ lục 3.10.4. Phổ HSQC của hợp chất HT10

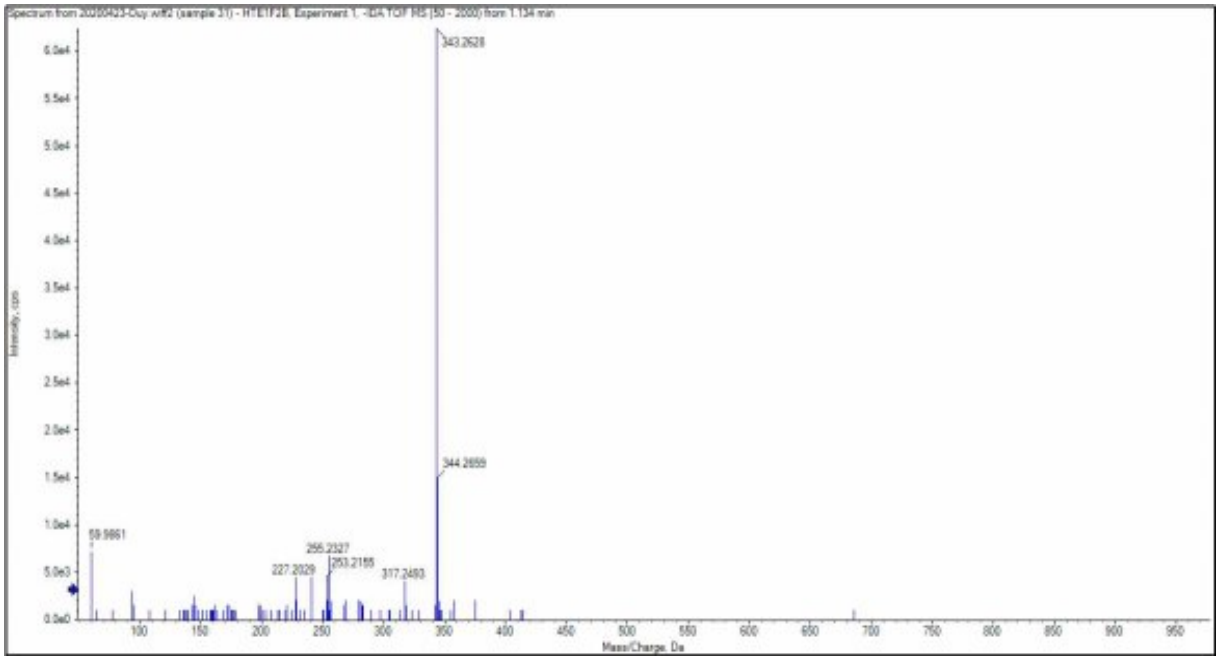


Phụ lục 3.10.5. Phổ HMBC của hợp chất HTN10

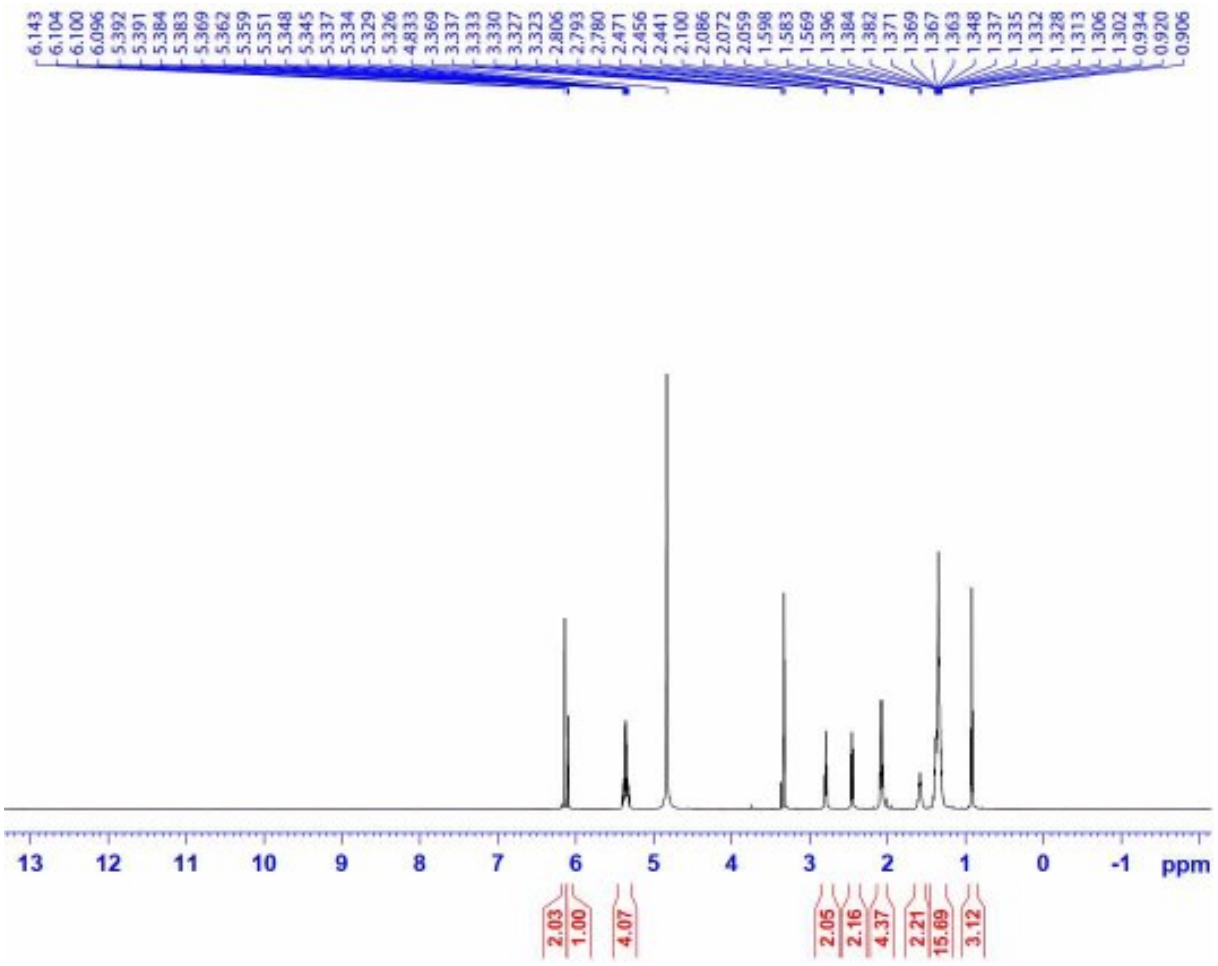


Phụ lục 3.10.6. Phổ ECD của hợp chất HTN10

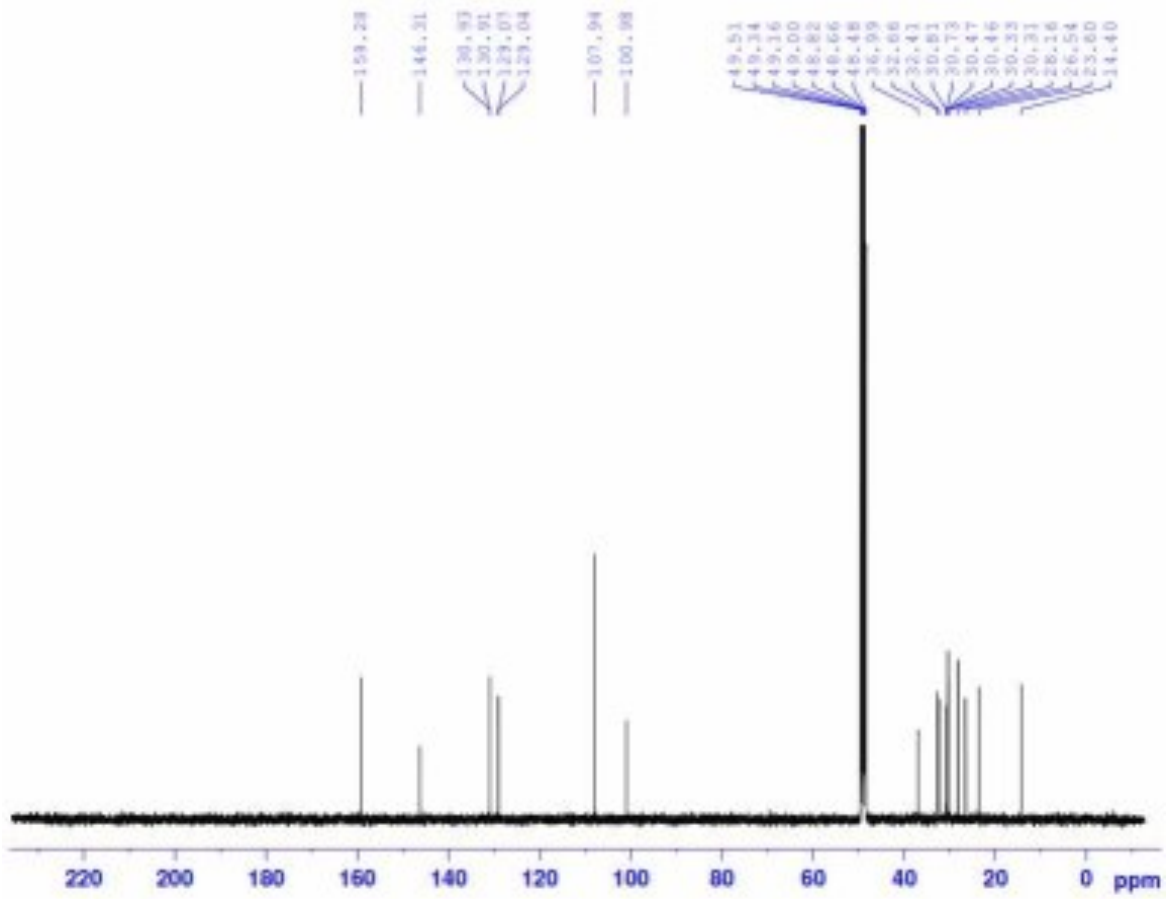
Phụ lục 3.11. Phổ HR-MS và NMR của hợp chất HL1: (8'Z,11'Z)-5-(heptadeca-8',11'-dienyl)benzene-l,3-diol



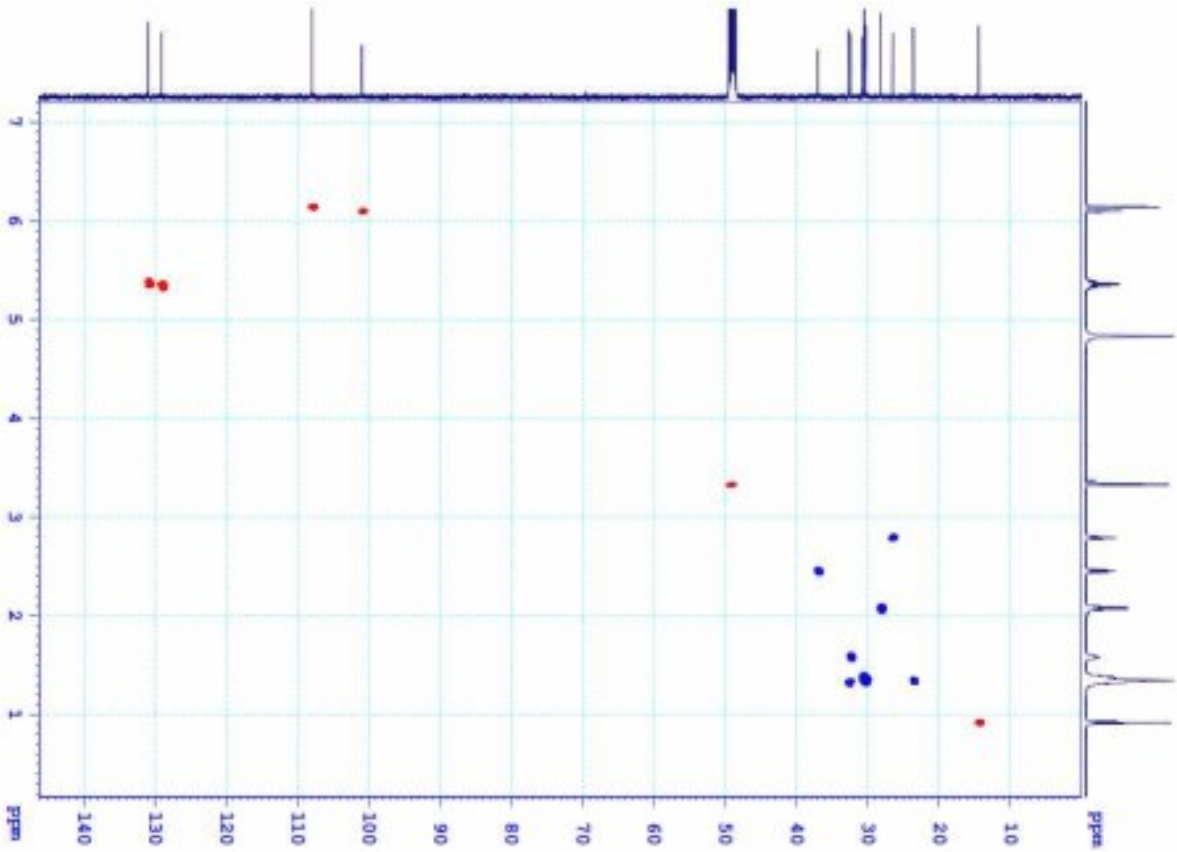
Phụ lục 3.11.1. Phổ HR-MS của hợp chất HL1



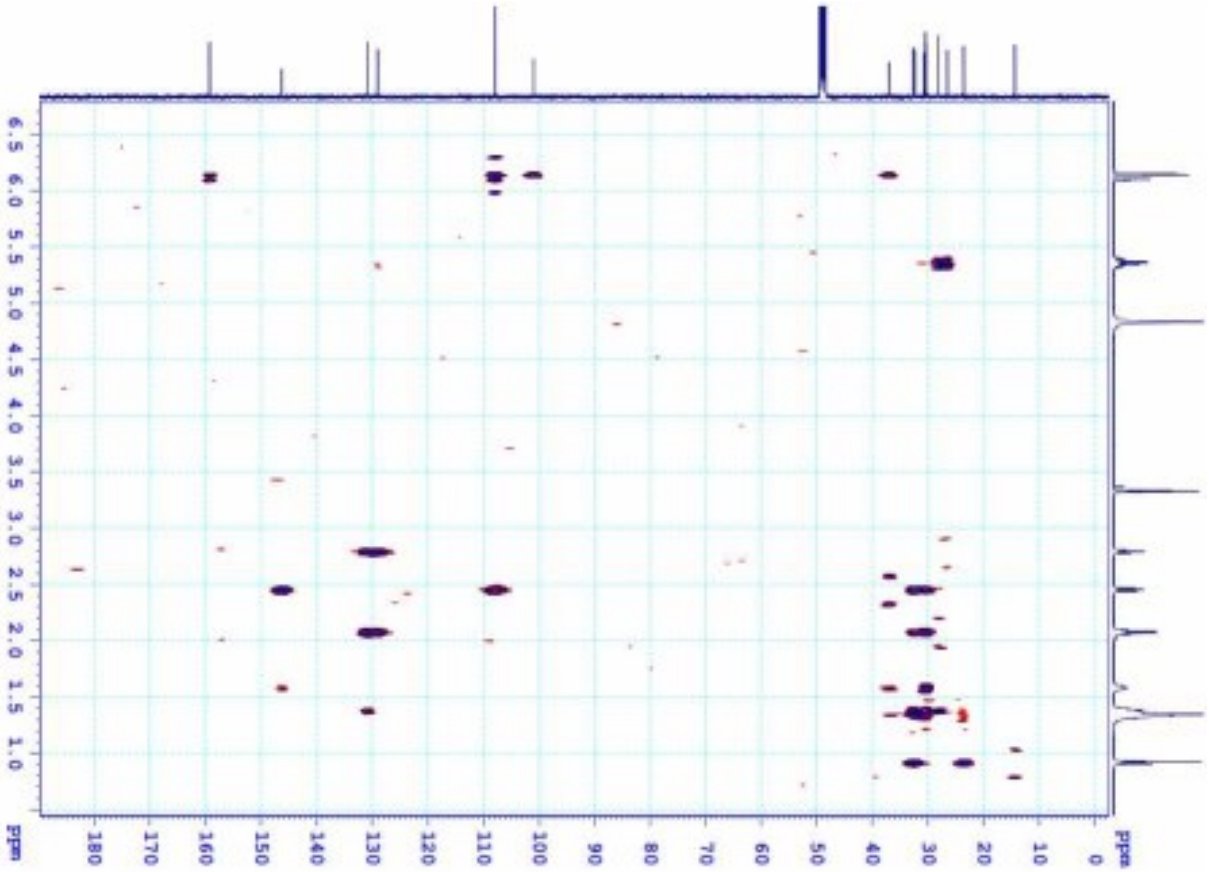
Phụ lục 3.11.2. Phổ ^{1}H-NMR của hợp chất HL1



Phụ lục 3.11.3. Phổ ^{13}C-NMR của hợp chất HL1

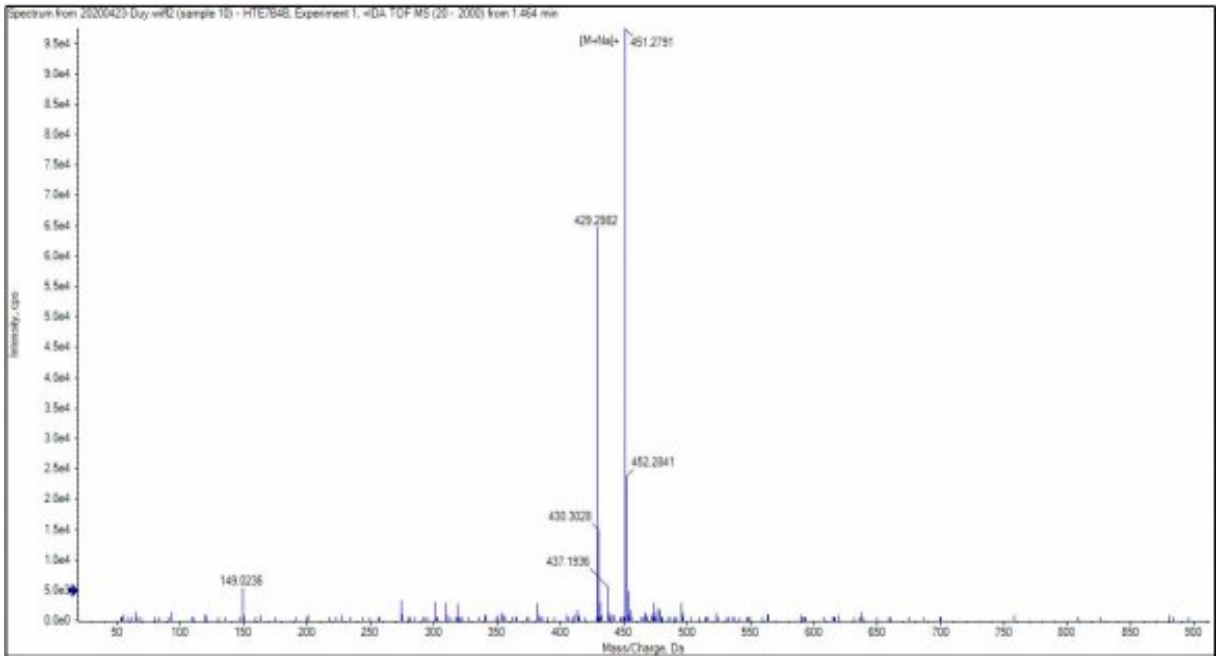


Phụ lục 3.11.4. Phổ HSQC của hợp chất HL1

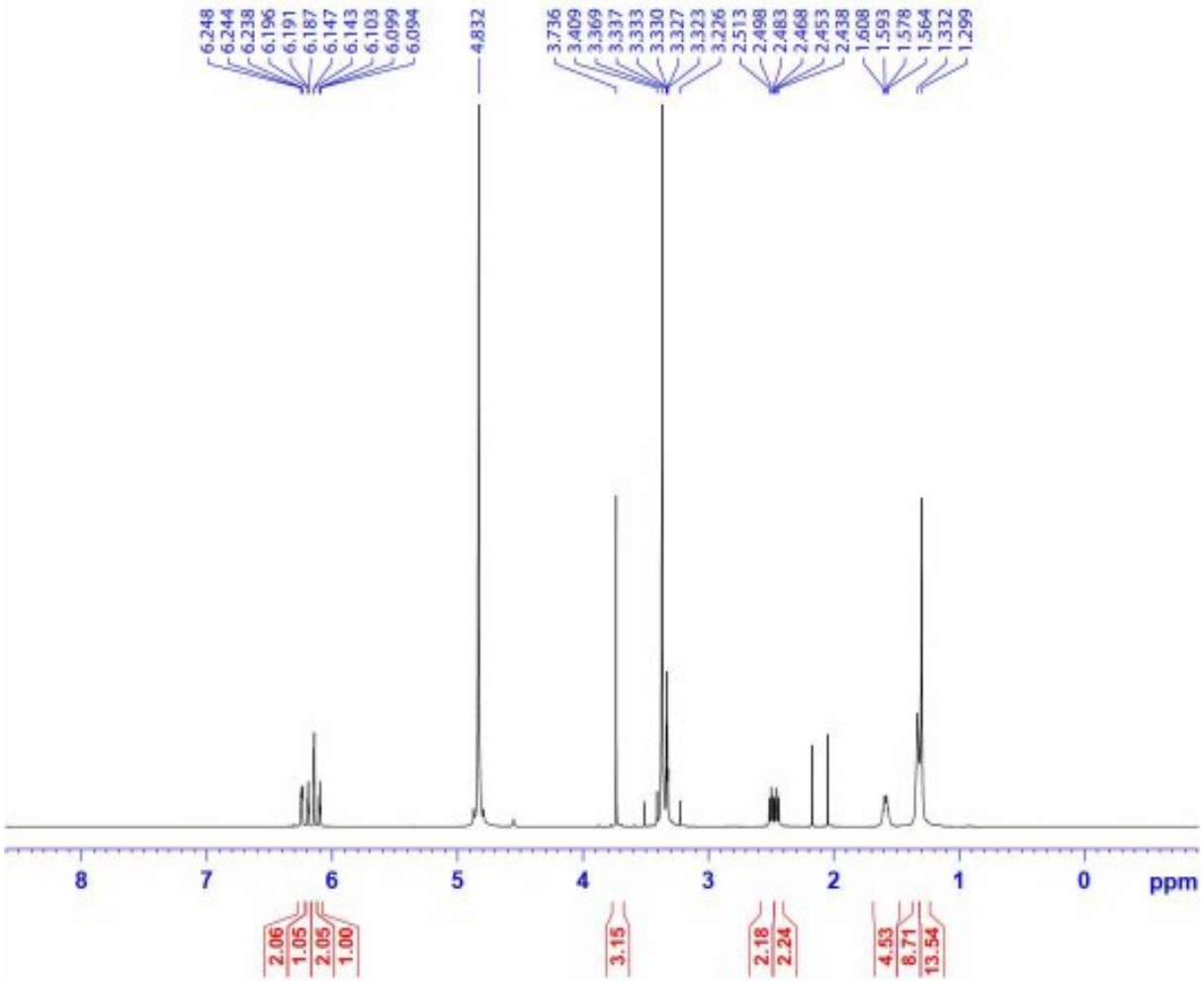


Phụ lục 3.11.5. Phổ HMBC của hợp chất HL1

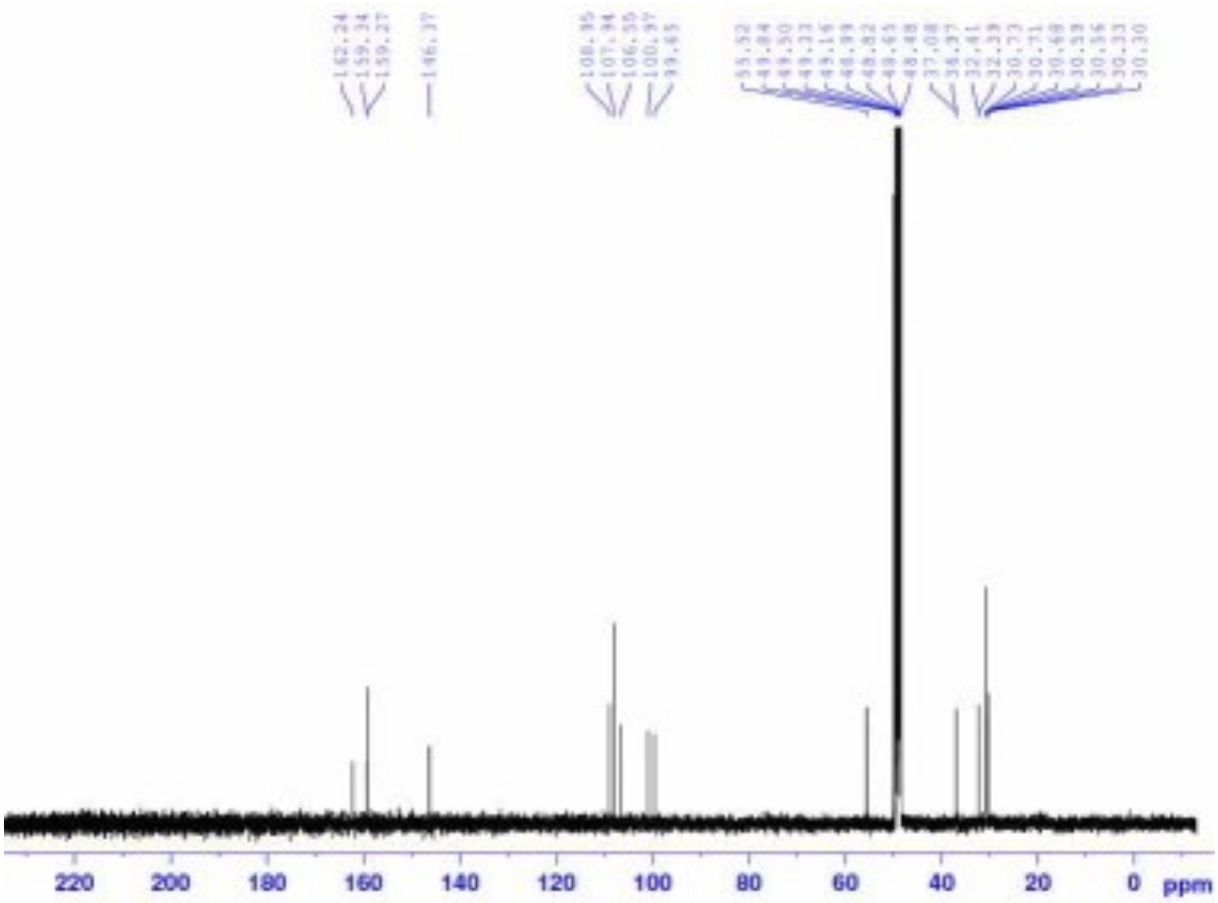
Phụ lục 3.12. Phổ HR-MS và NMR của hợp chất HL2: Bisgravillol



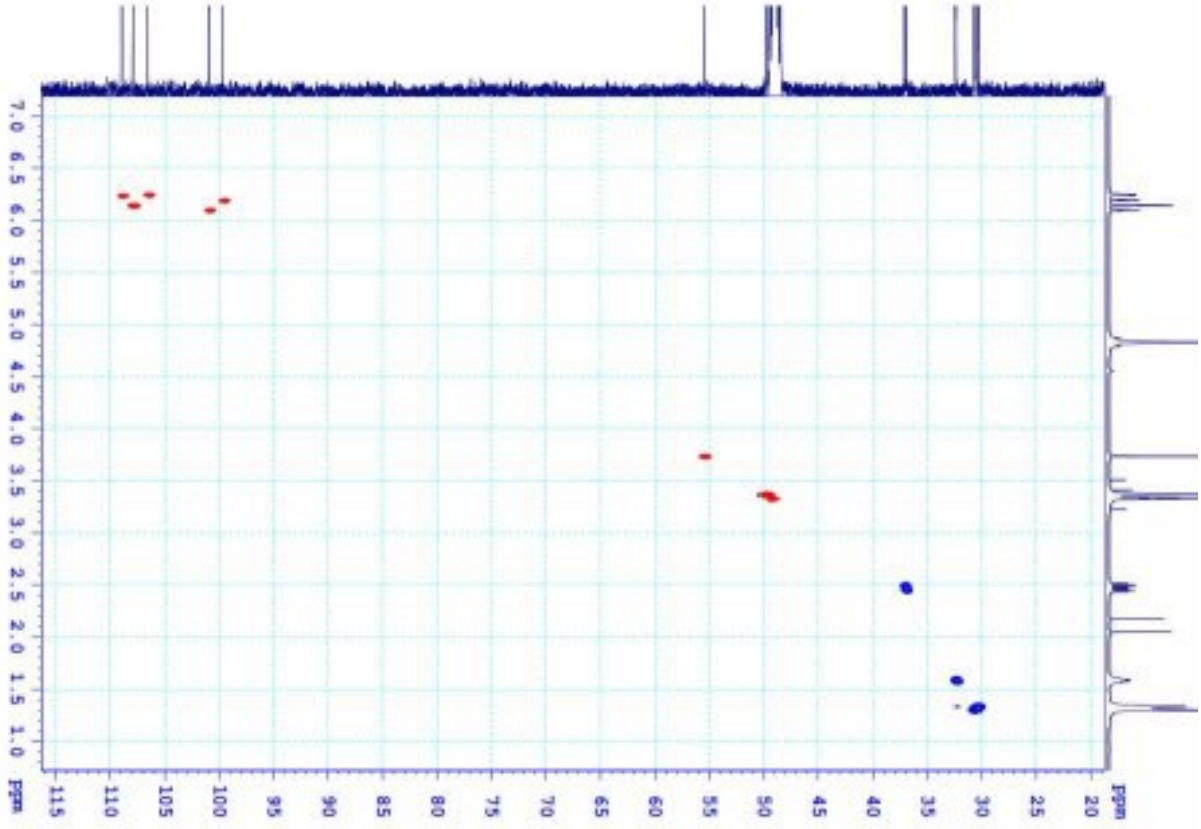
Phụ lục 3.12.1. Phổ HR-MS của hợp chất HL2



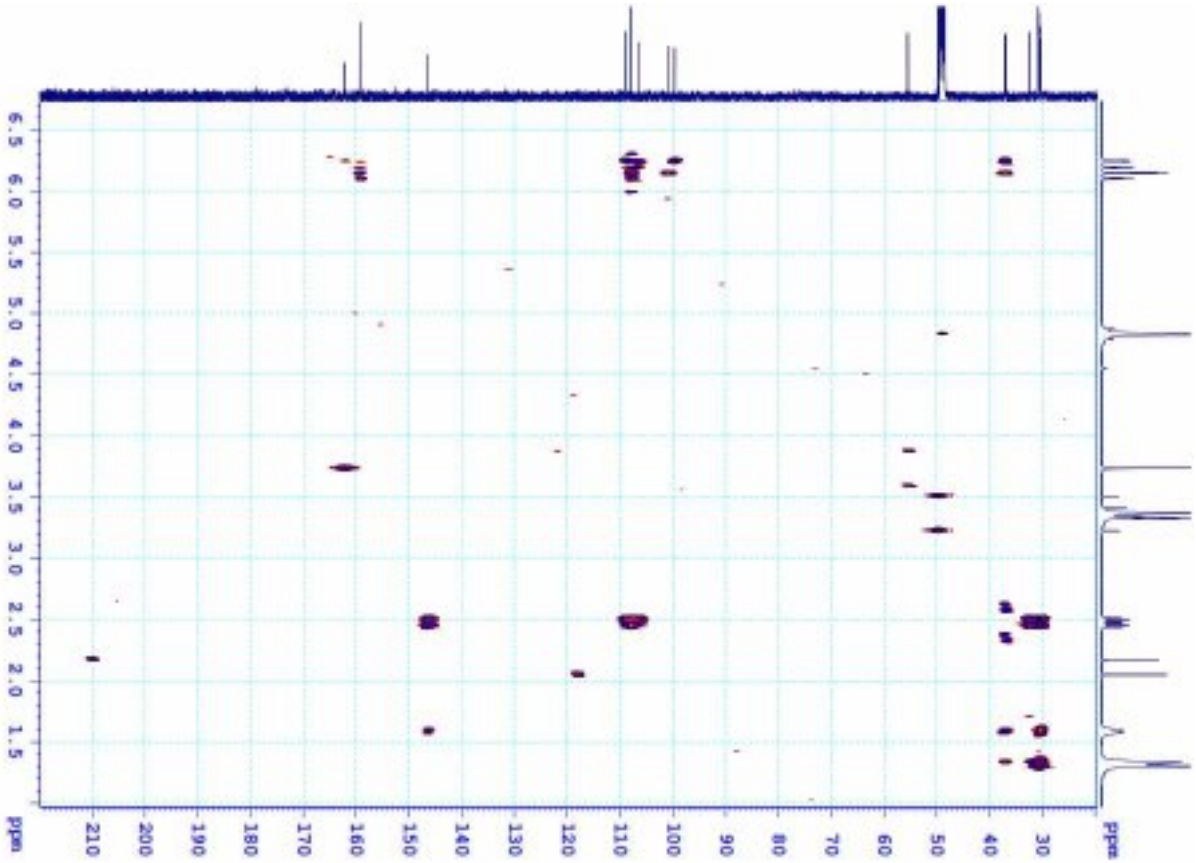
Phụ lục 3.12.2. Phổ ^{1}H-NMR của hợp chất HL2



Phụ lục 3.12.3. Phổ ^{13}C-NMR của hợp chất HL2

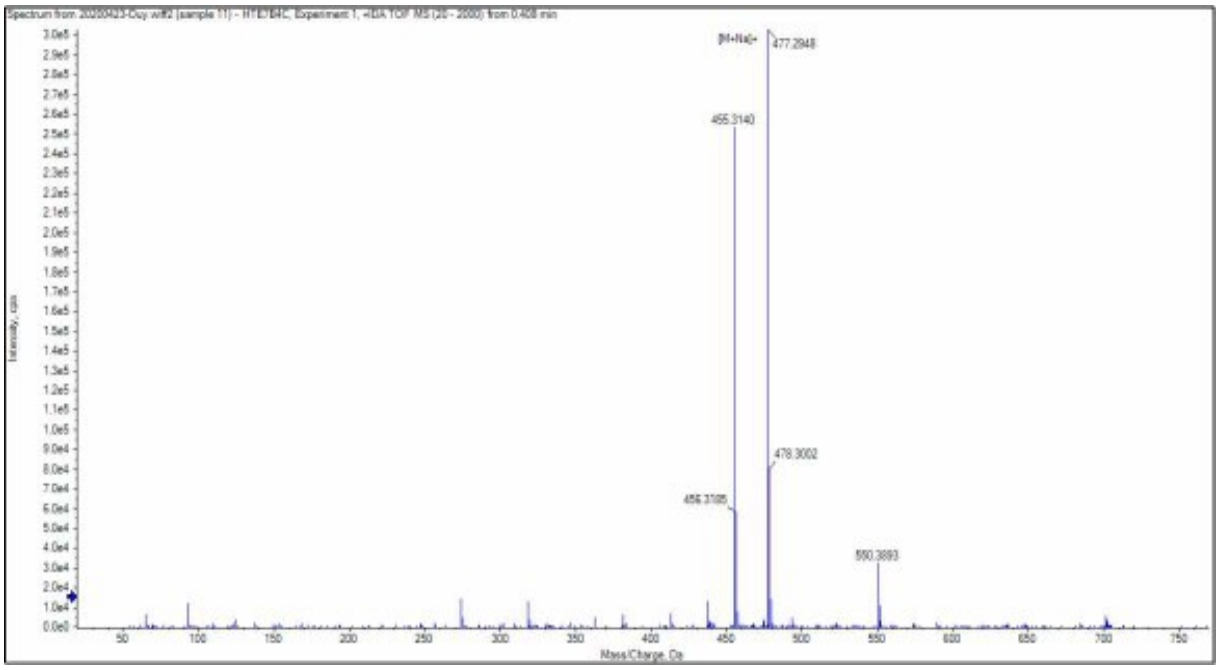


Phụ lục 3.12.4. Phổ HSQC của hợp chất HL2

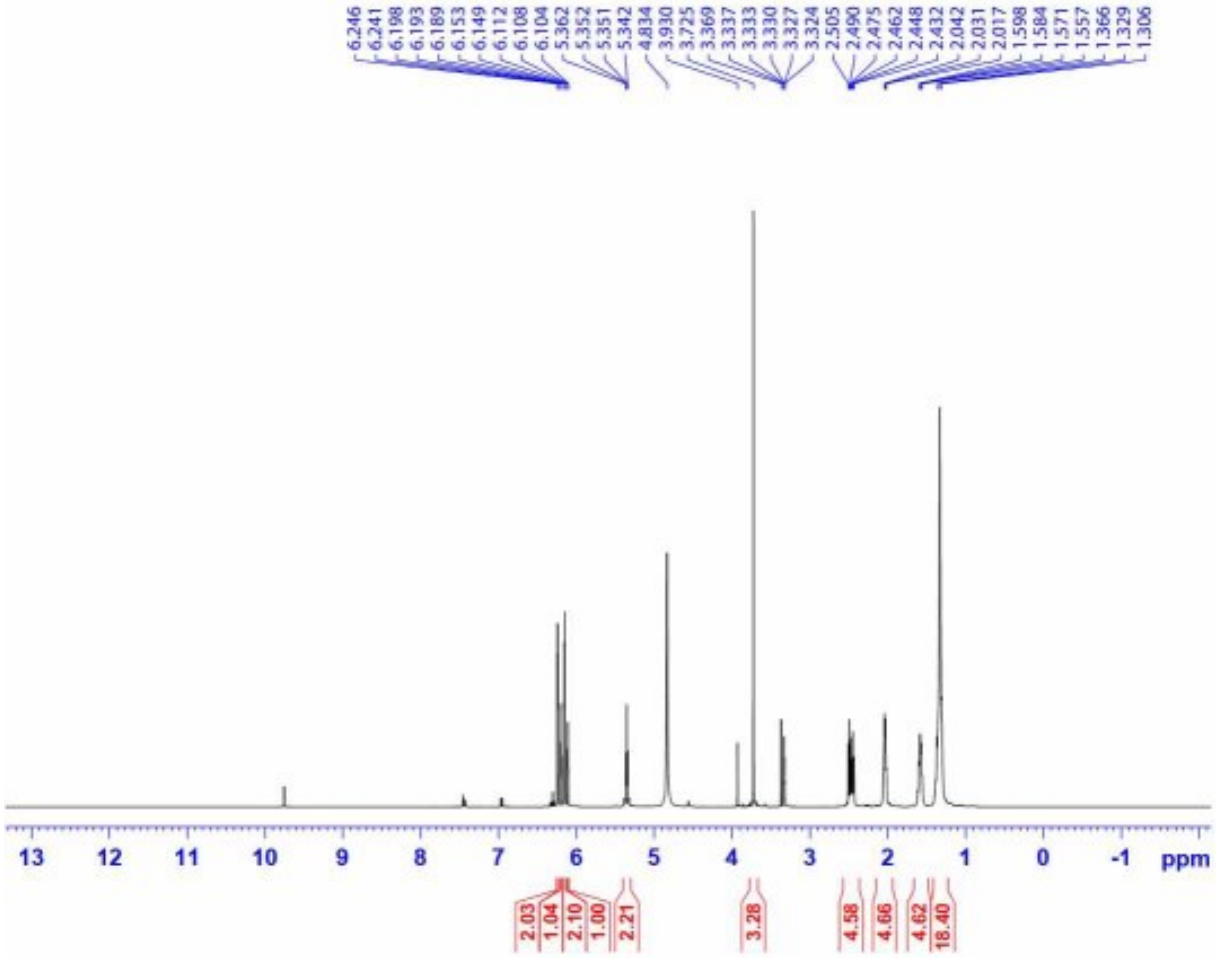


Phụ lục 3.12.5. Phổ HMBC của hợp chất HL2

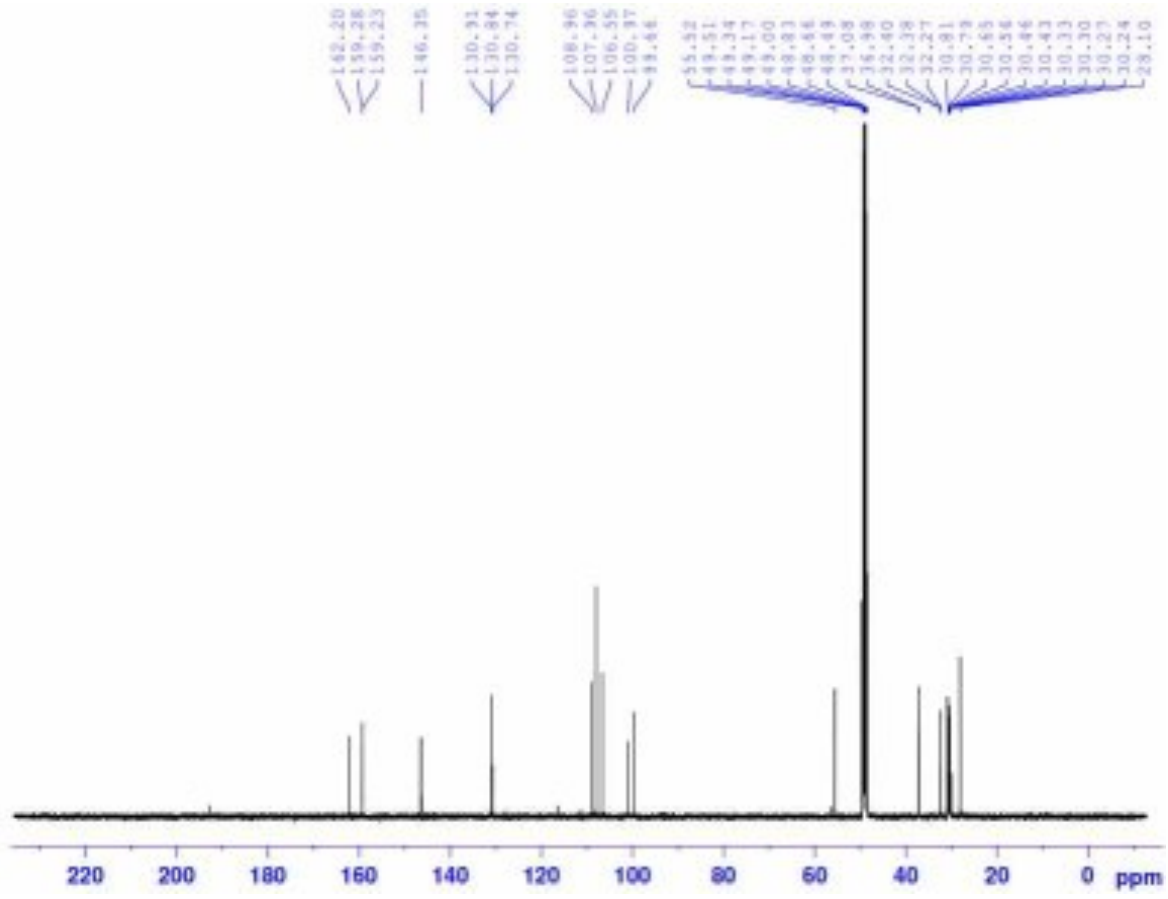
Phụ lục 3.13. Phổ HR-MS và NMR của hợp chất HL3: Oncostemonol D



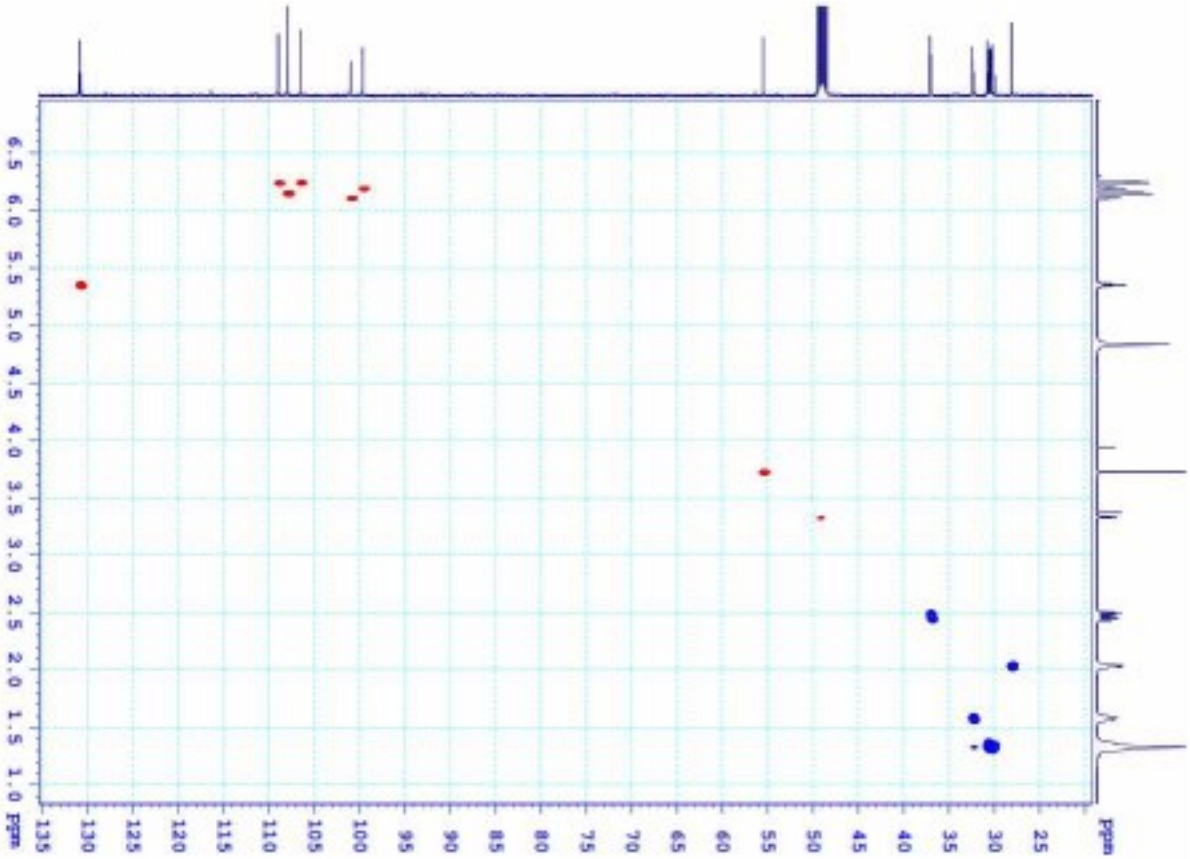
Phụ lục 3.13.1. Phổ HR-MS của hợp chất HL3



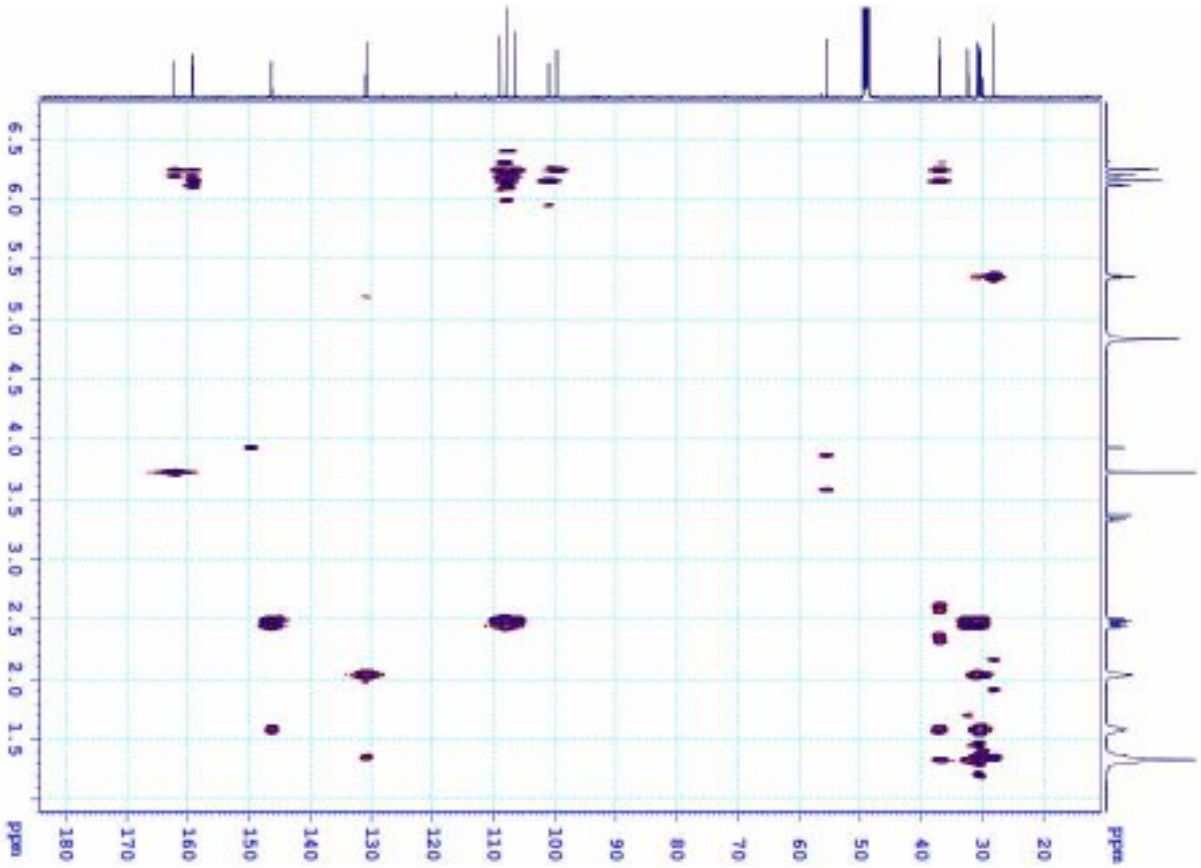
Phụ lục 3.13.2. Phổ ^{1}H-NMR của hợp chất HL3



Phụ lục 3.13.3. Phổ ^{13}C-NMR của hợp chất HL3

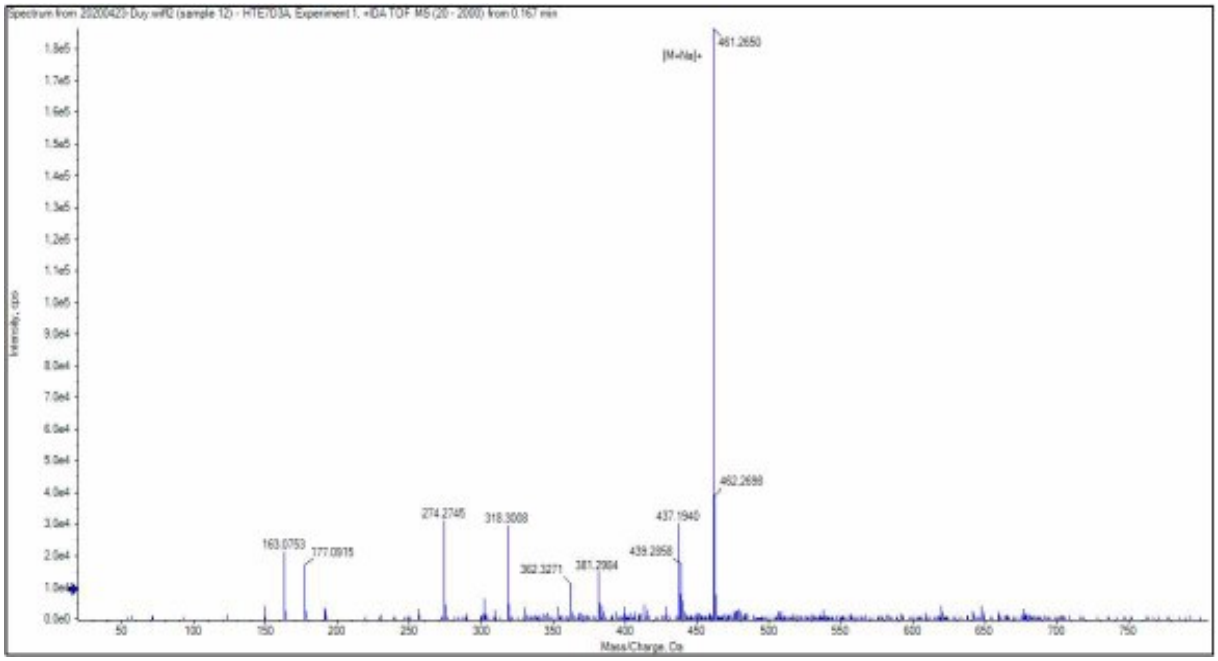


Phụ lục 3.13.4. Phổ HSQC của hợp chất HL3

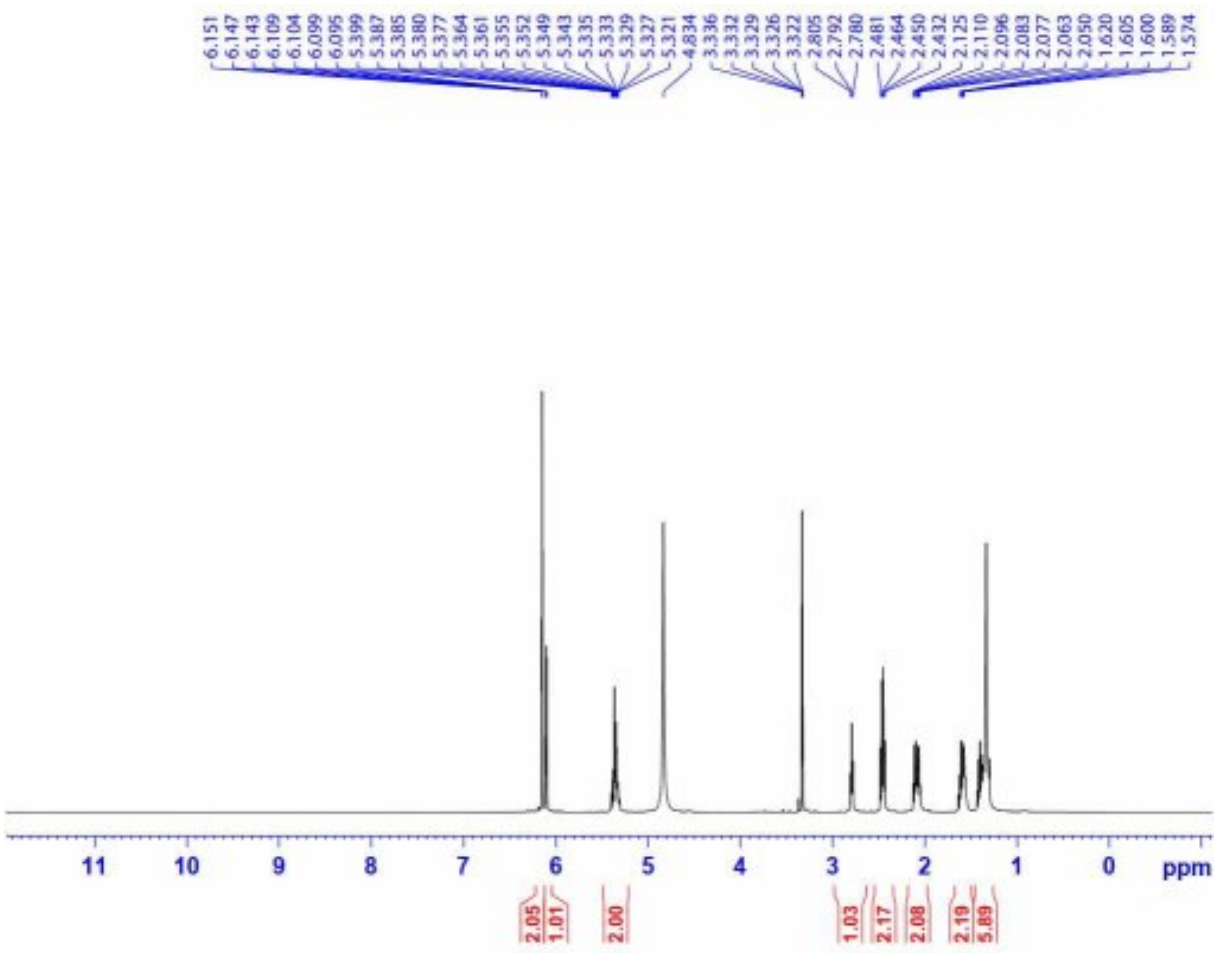


Phụ lục 3.13.5. Phổ HMBC của hợp chất HL3

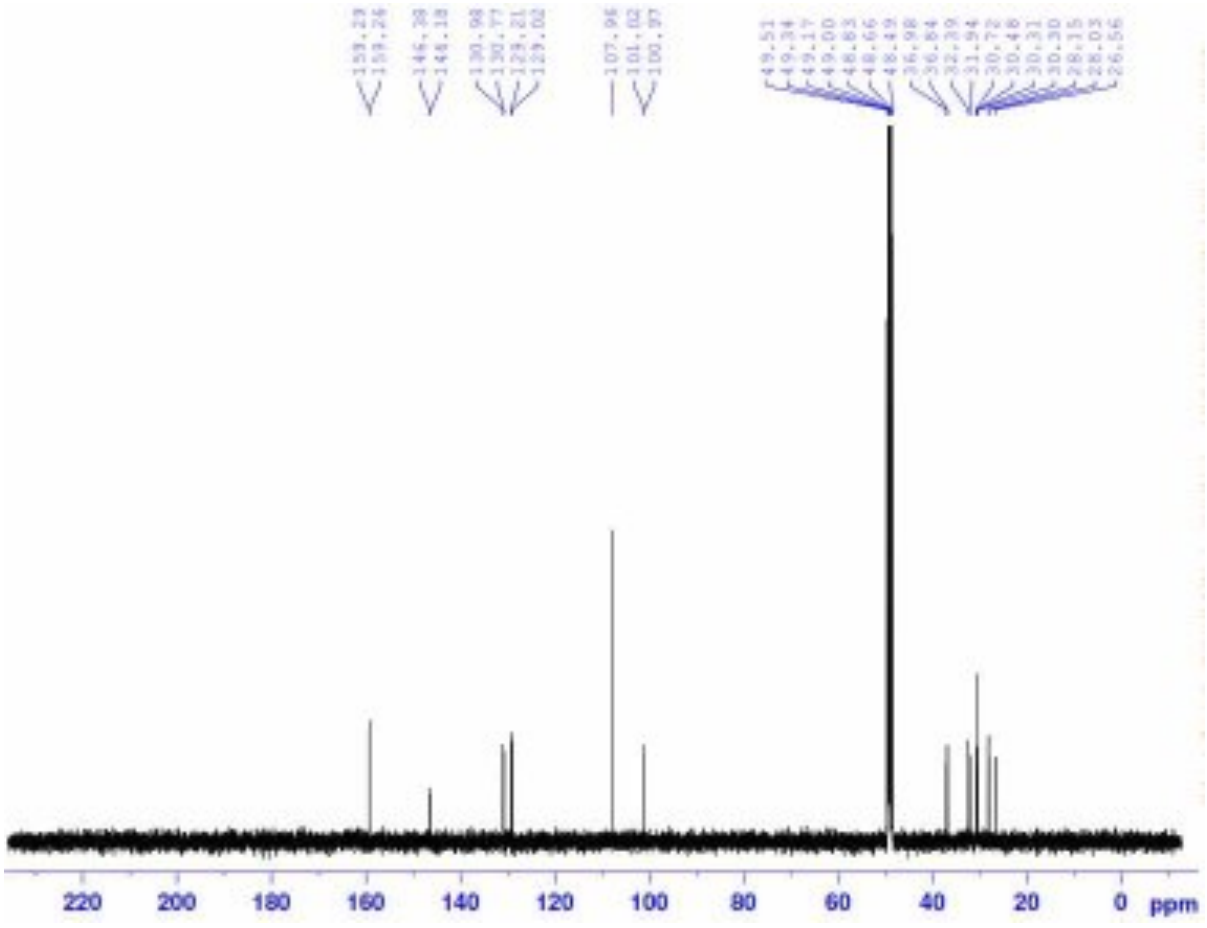
Phụ lục 3.14. Phổ HR-MS và NMR của hợp chất HL4: Grevirobstol A



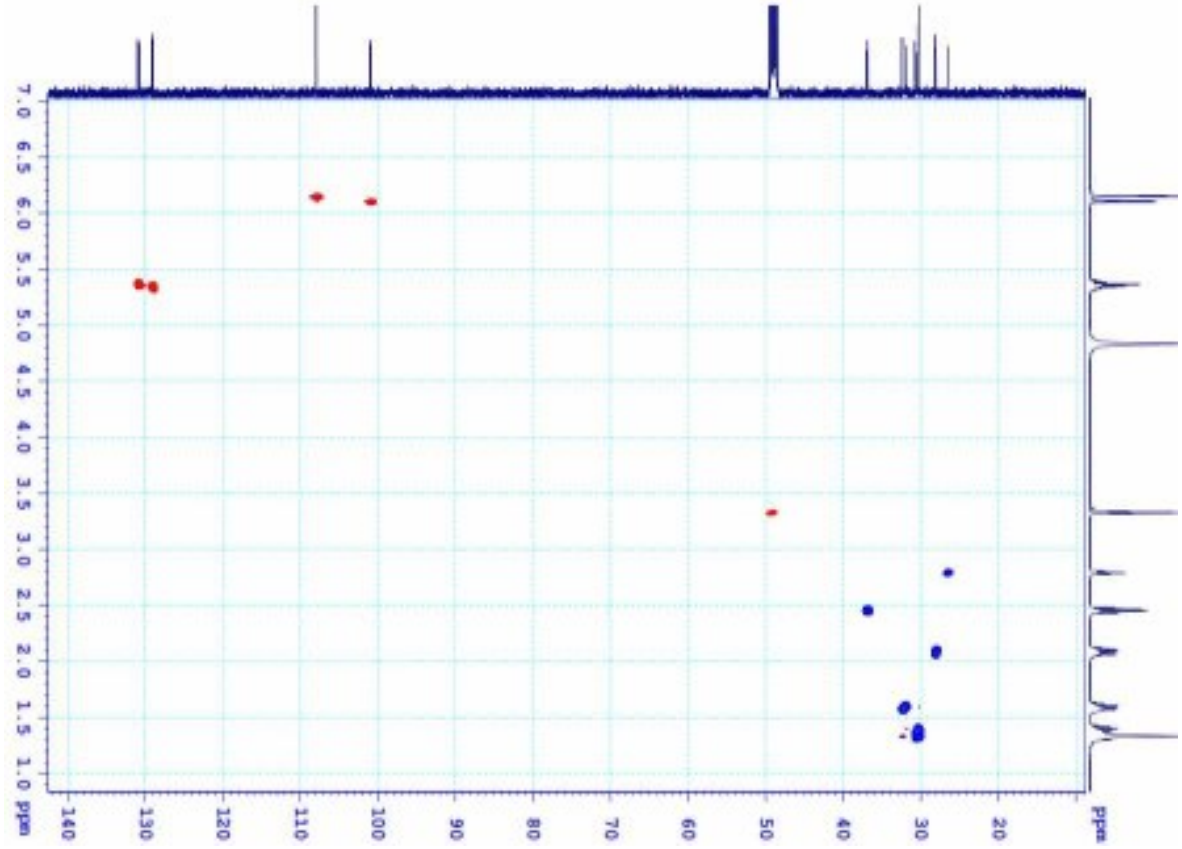
Phụ lục 3.14.1. Phổ HR- -MS của hợp chất HL4



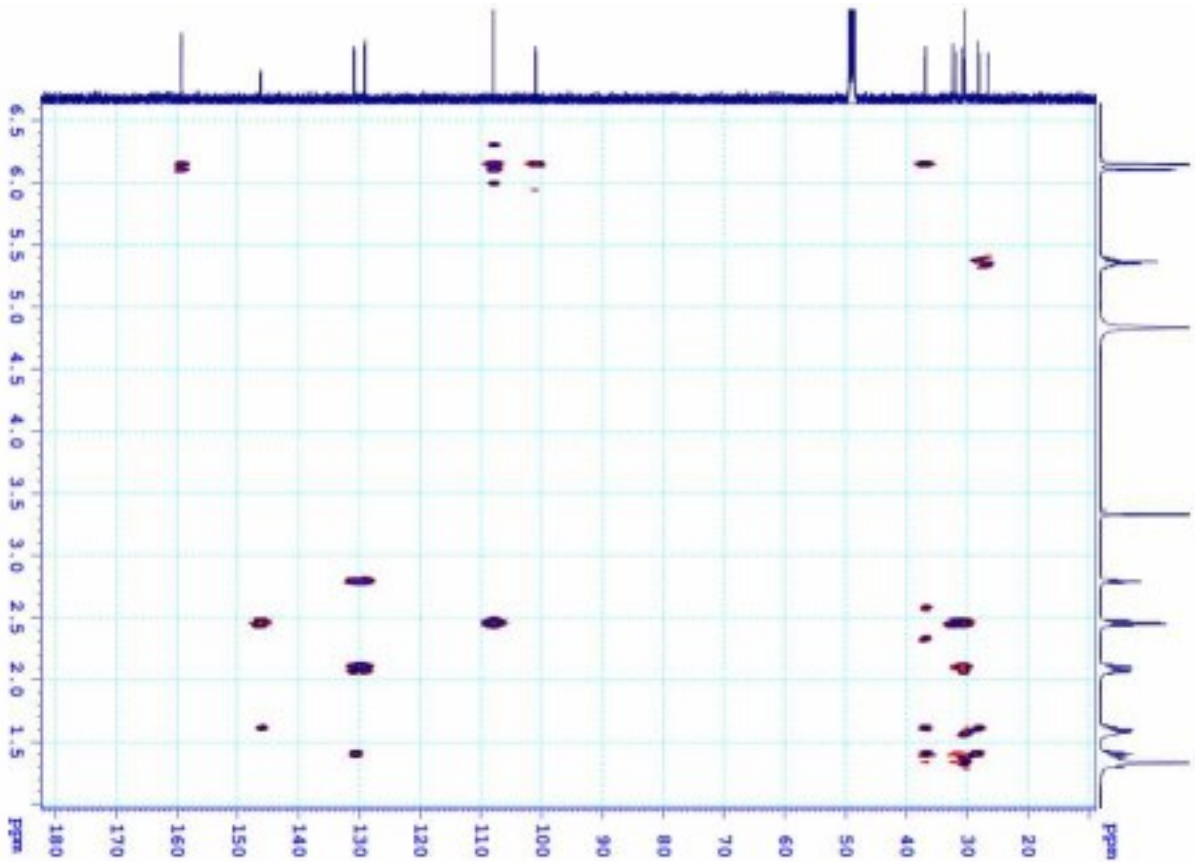
Phụ lục 3.14.2. Phổ ^{1}H-NMR của hợp chất HL4



Phụ lục 3.14.3 Phổ ^{13}C-NMR của hợp chất HL4

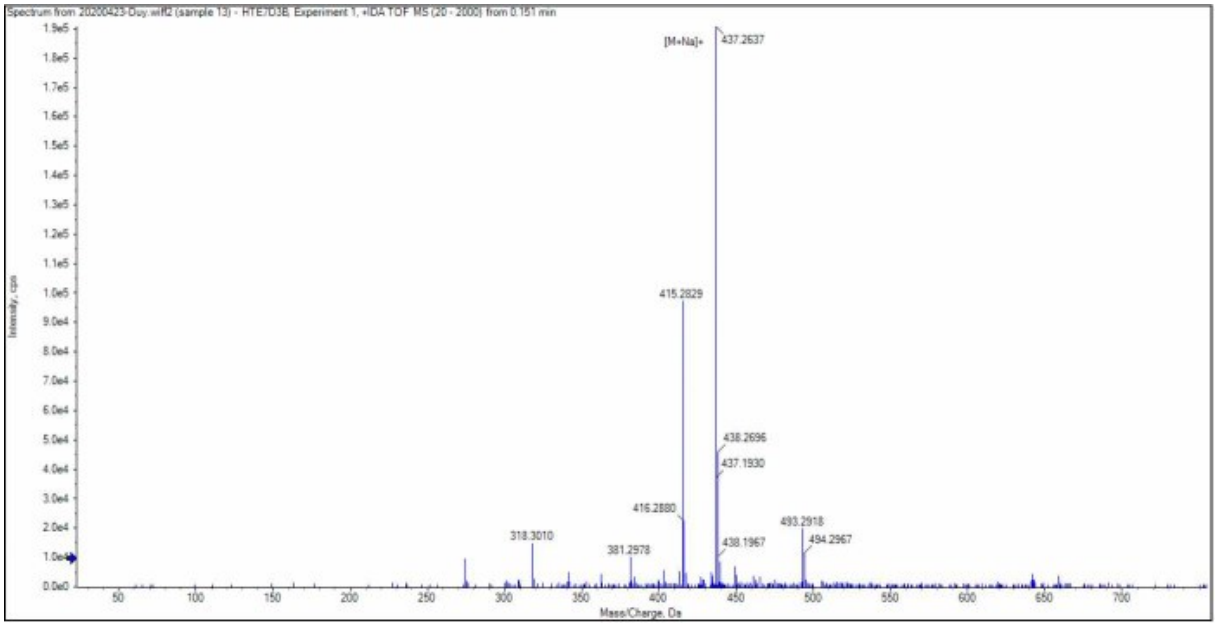


Phụ lục 3.14.4. Phổ HSQC của hợp chất HL4

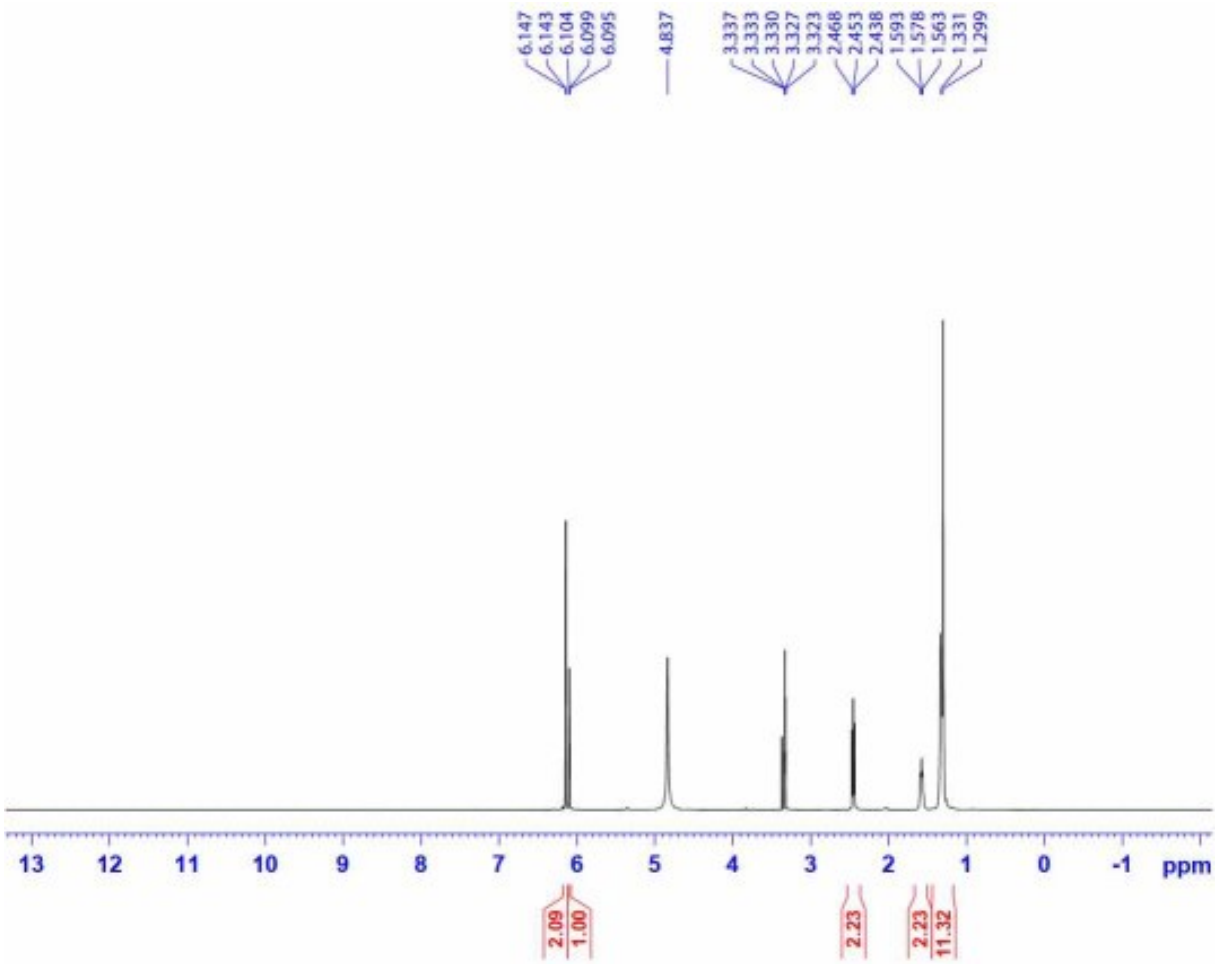


Phụ lục 3.14.5. Phổ HMBC của hợp chất HL4

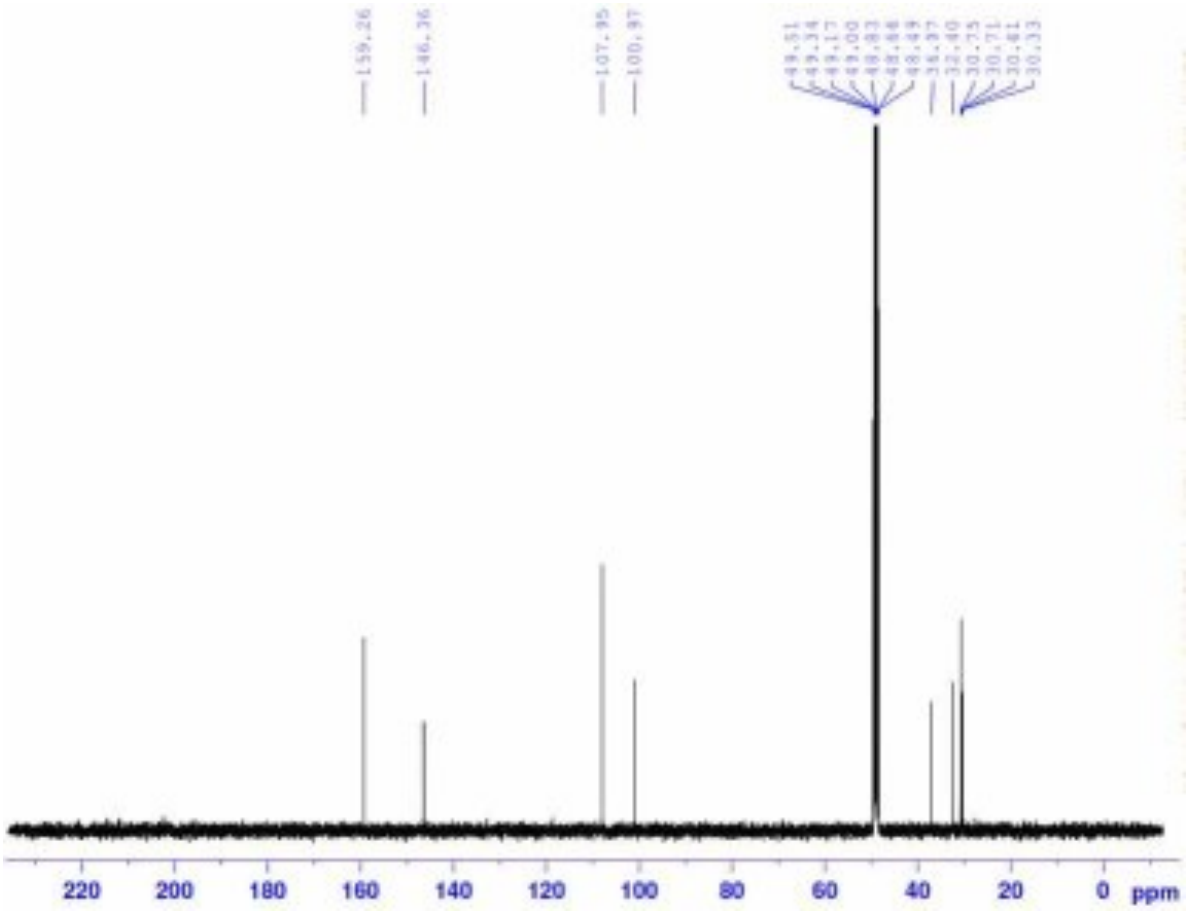
Phụ lục 3.15. Phổ HR-MS và NMR của hợp chất HL5: 5,5'-(hexadecane-1,16-diyl)bis(benzene-1,3-diol)



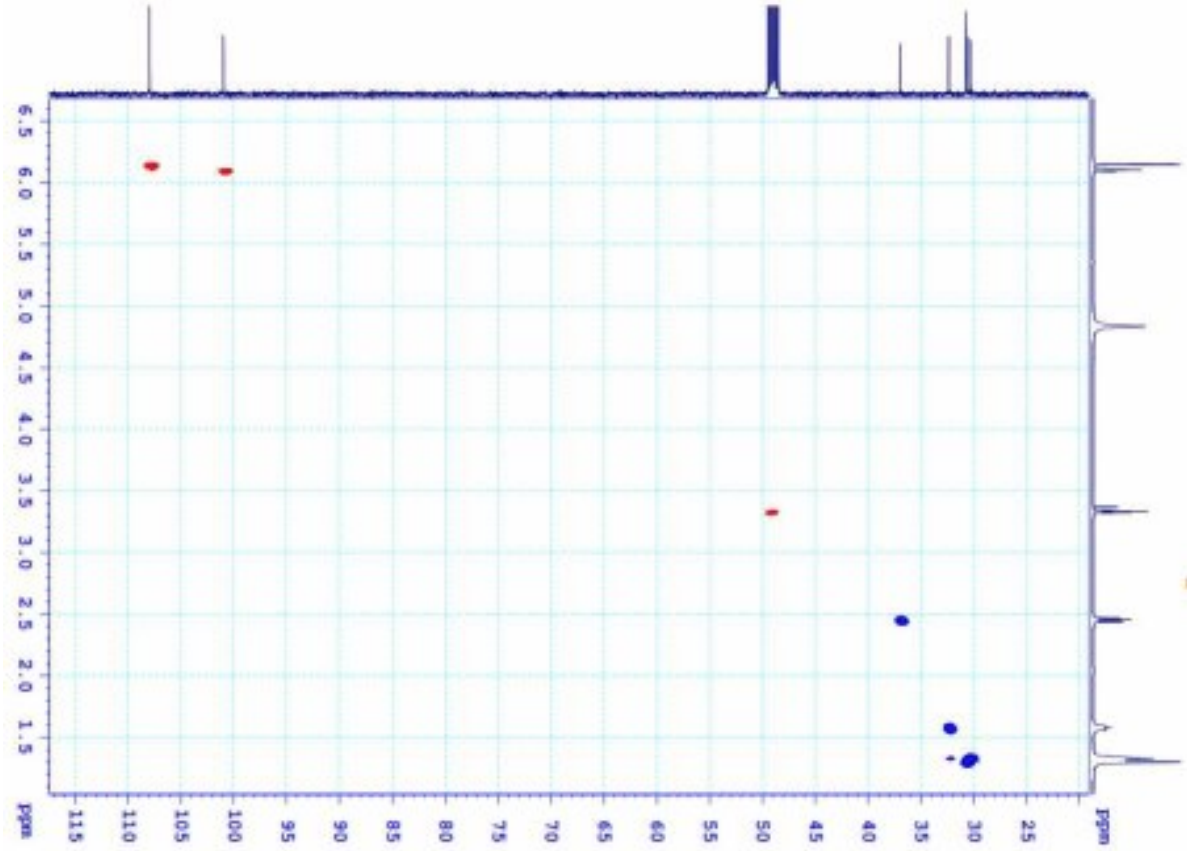
Phụ lục 3.15.1. Phổ HR- -MS của hợp chất HL5



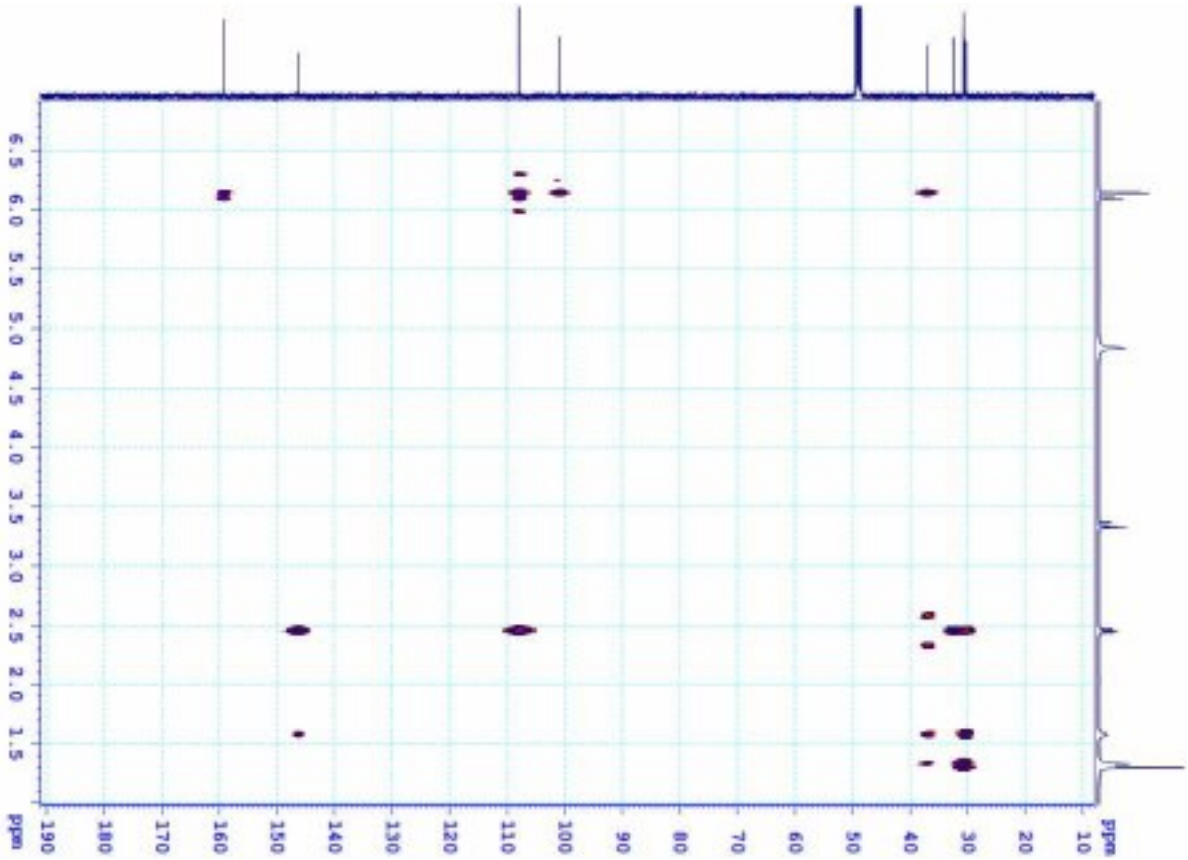
Phụ lục 3.15.2. Phổ ^{1}H-NMR của hợp chất HL5



Phụ lục 3.15.3. Phổ ^{13}C-NMR của hợp chất HL5

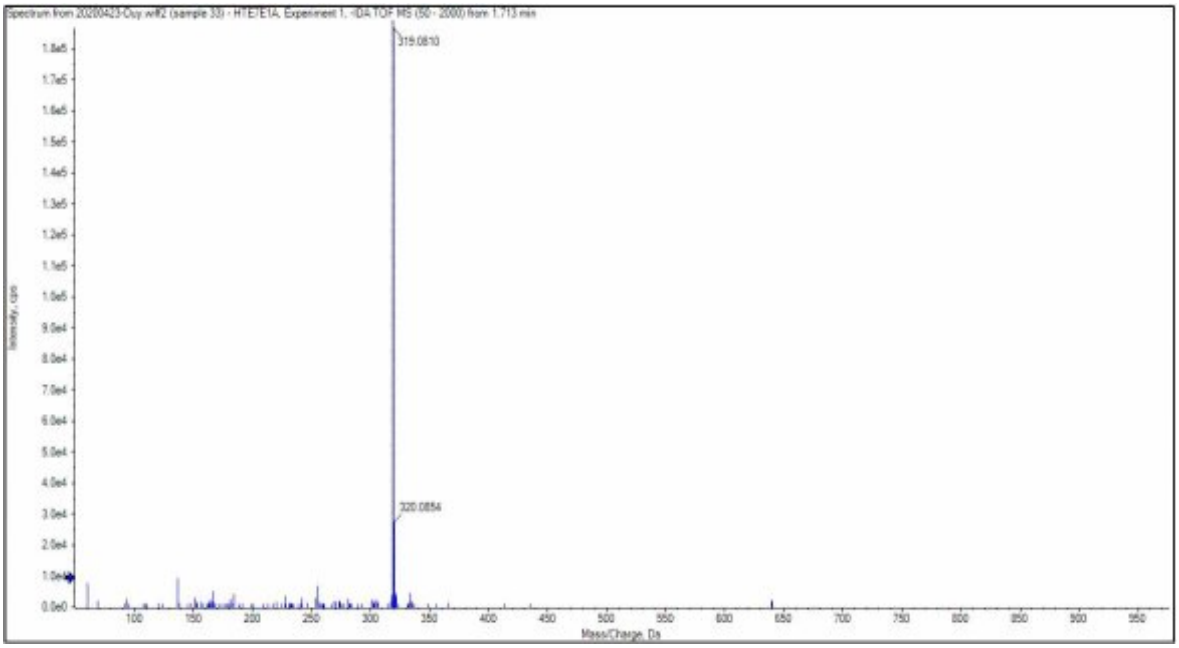


Phụ lục 3.15.4. Phổ HSQC của hợp chất HL5

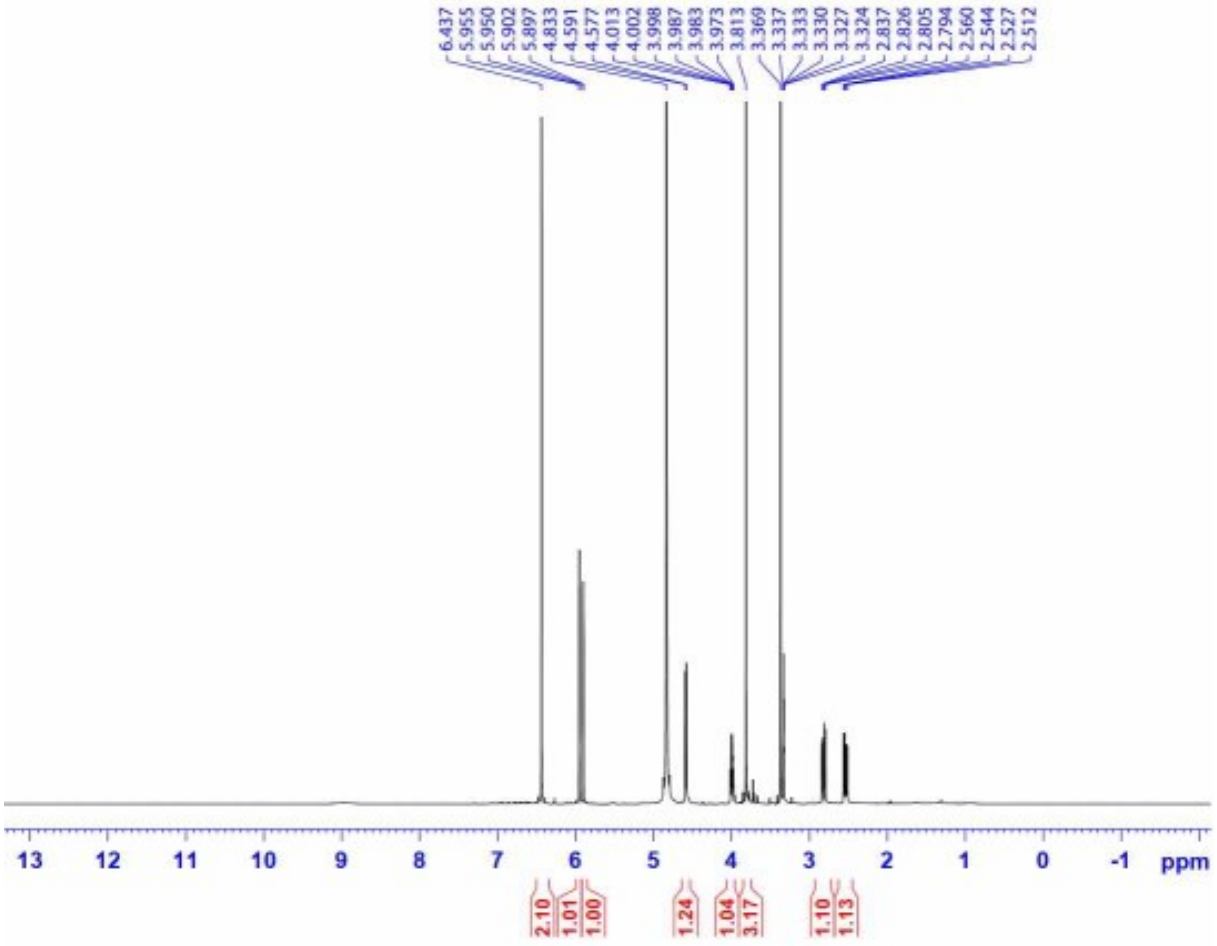


Phụ lục 3.15.5. Phổ HMBC của hợp chất HL5

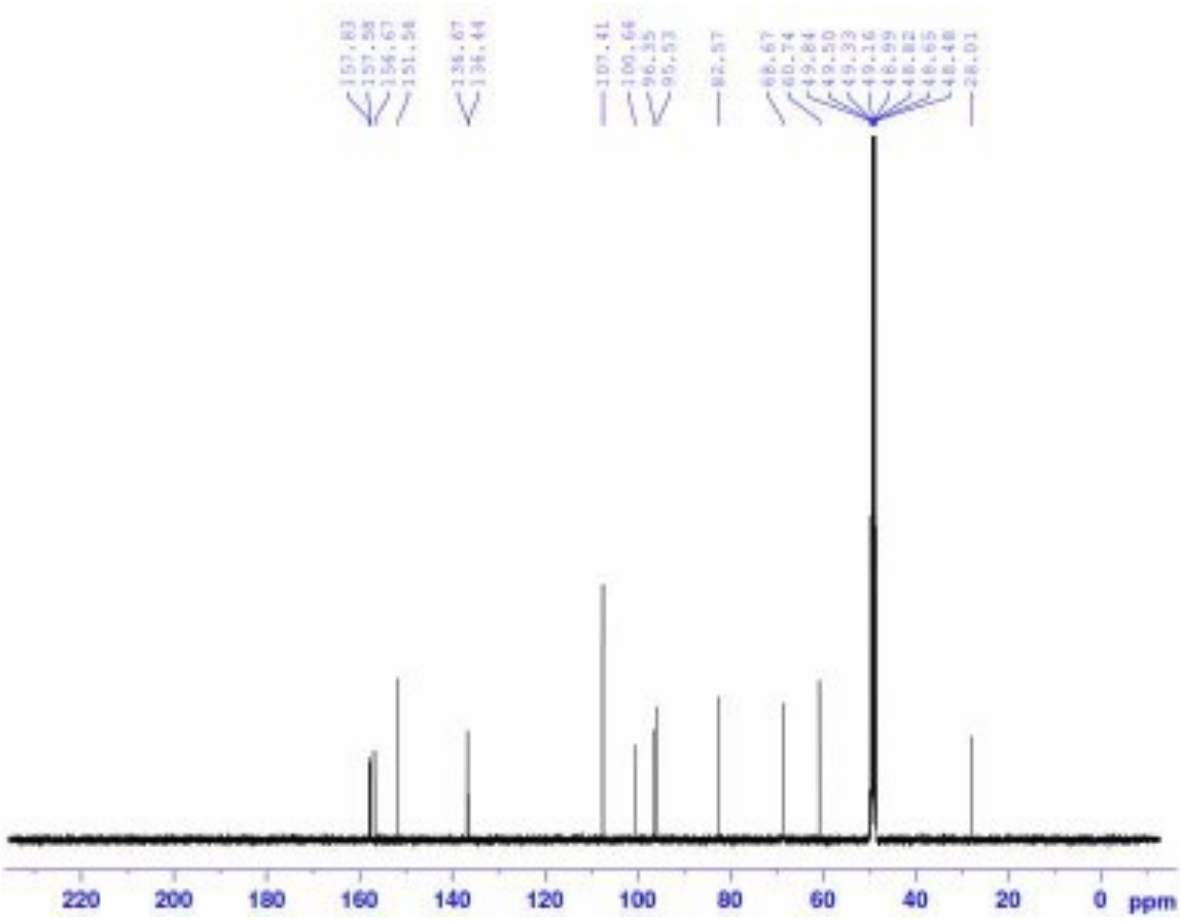
Phụ lục 3.16. Phổ HR-MS và NMR của hợp chất HL7: *4'-O*-methyl-ent-gallocatechin



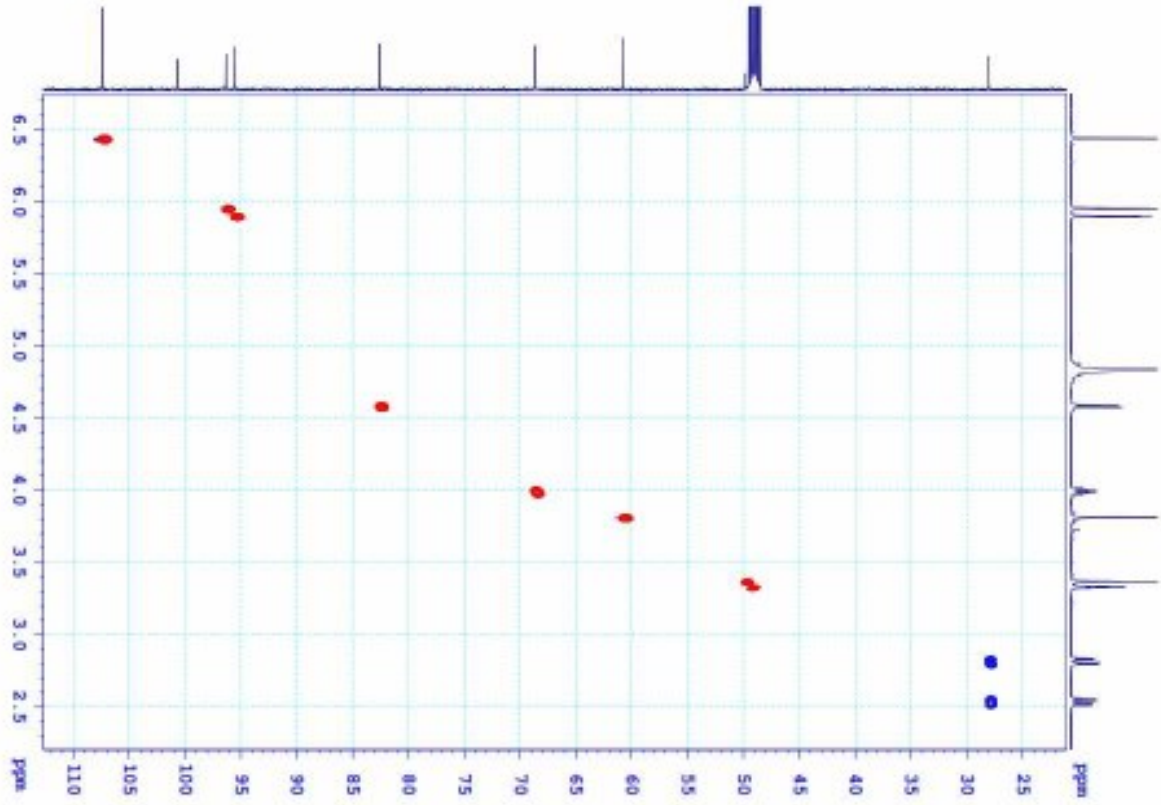
Phụ lục 3.16.1. Phổ HR-MS của hợp chất HL7



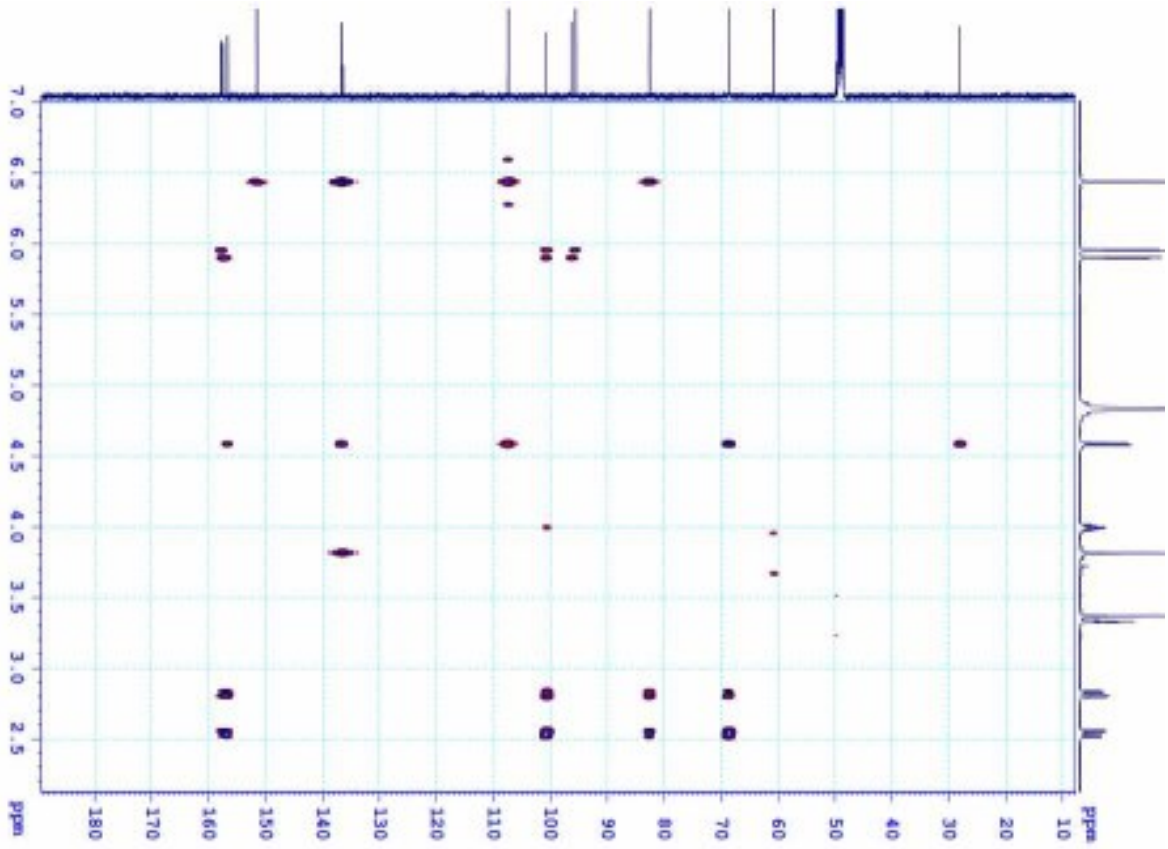
Phụ lục 3.16.2. Phổ ^{1}H-NMR của hợp chất HL7



Phụ lục 3.16.3. Phổ ^{13}C-NMR của hợp chất HL7

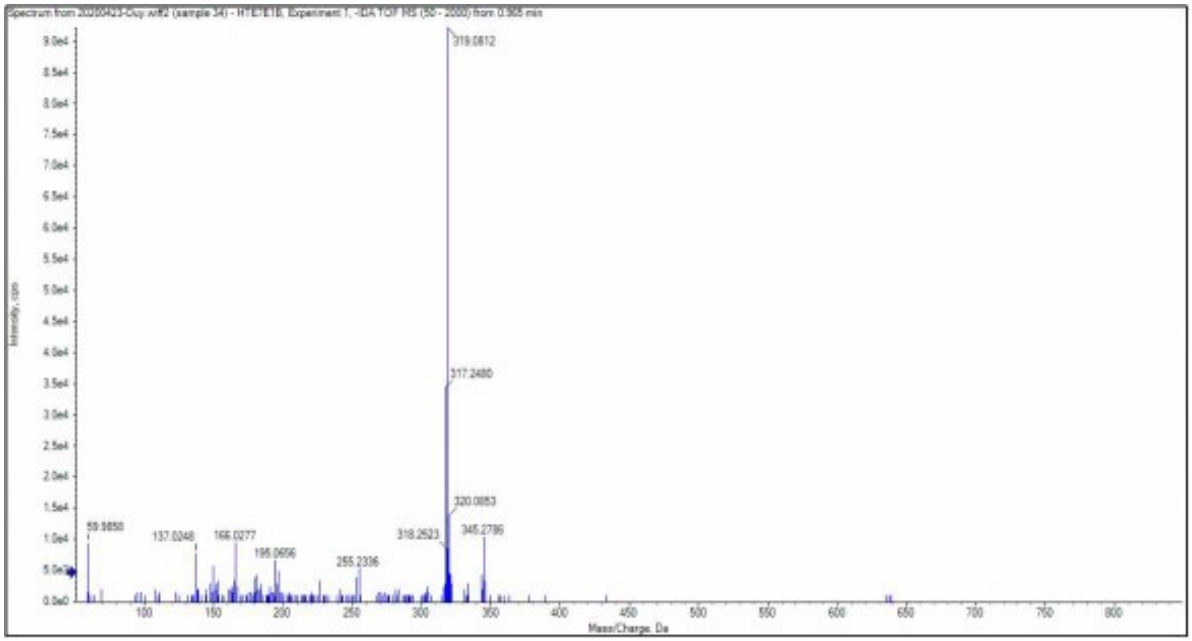


Phụ lục 3.16.4. Phổ HSQC của hợp chất HL7

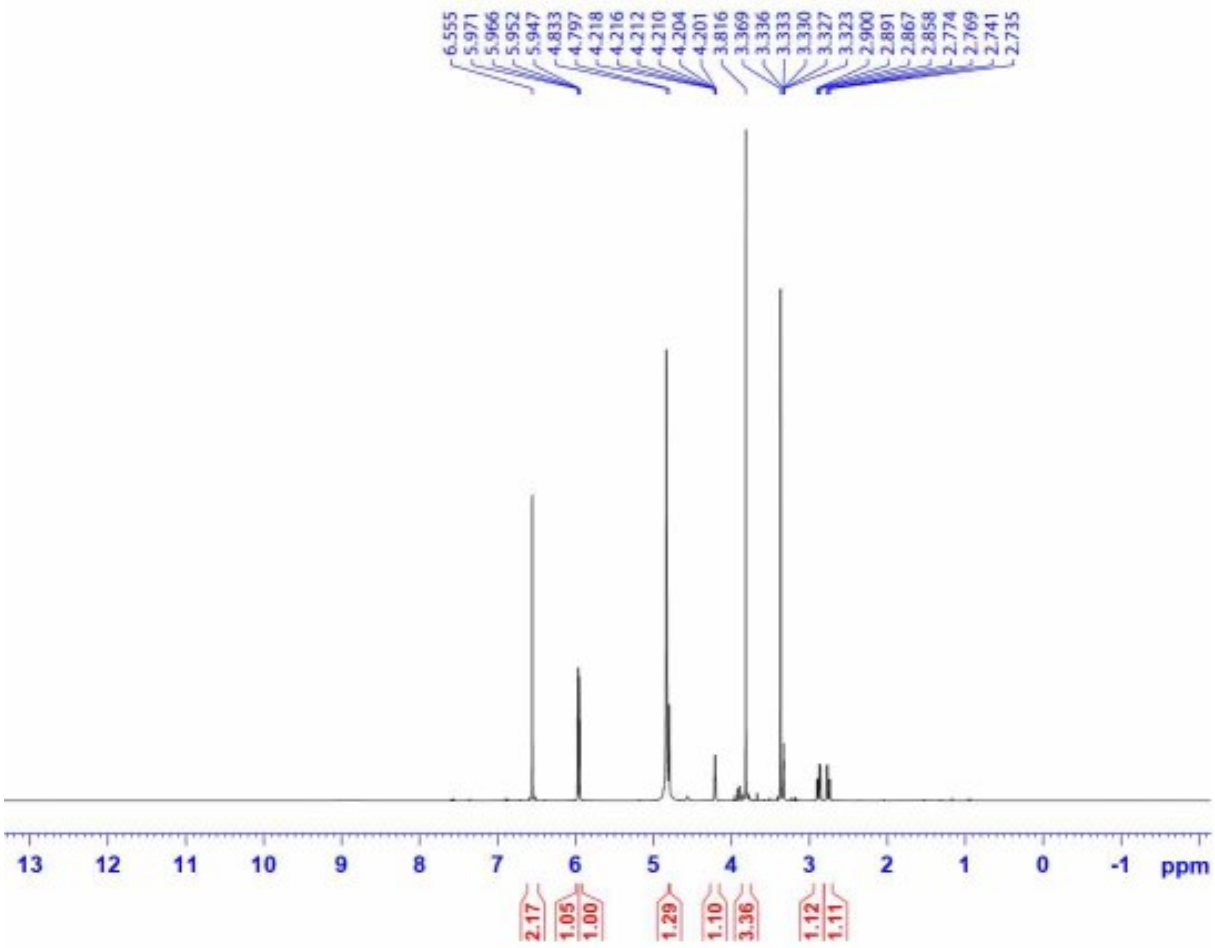


Phụ lục 3.16.5. Phổ HMBC của hợp chất HL7

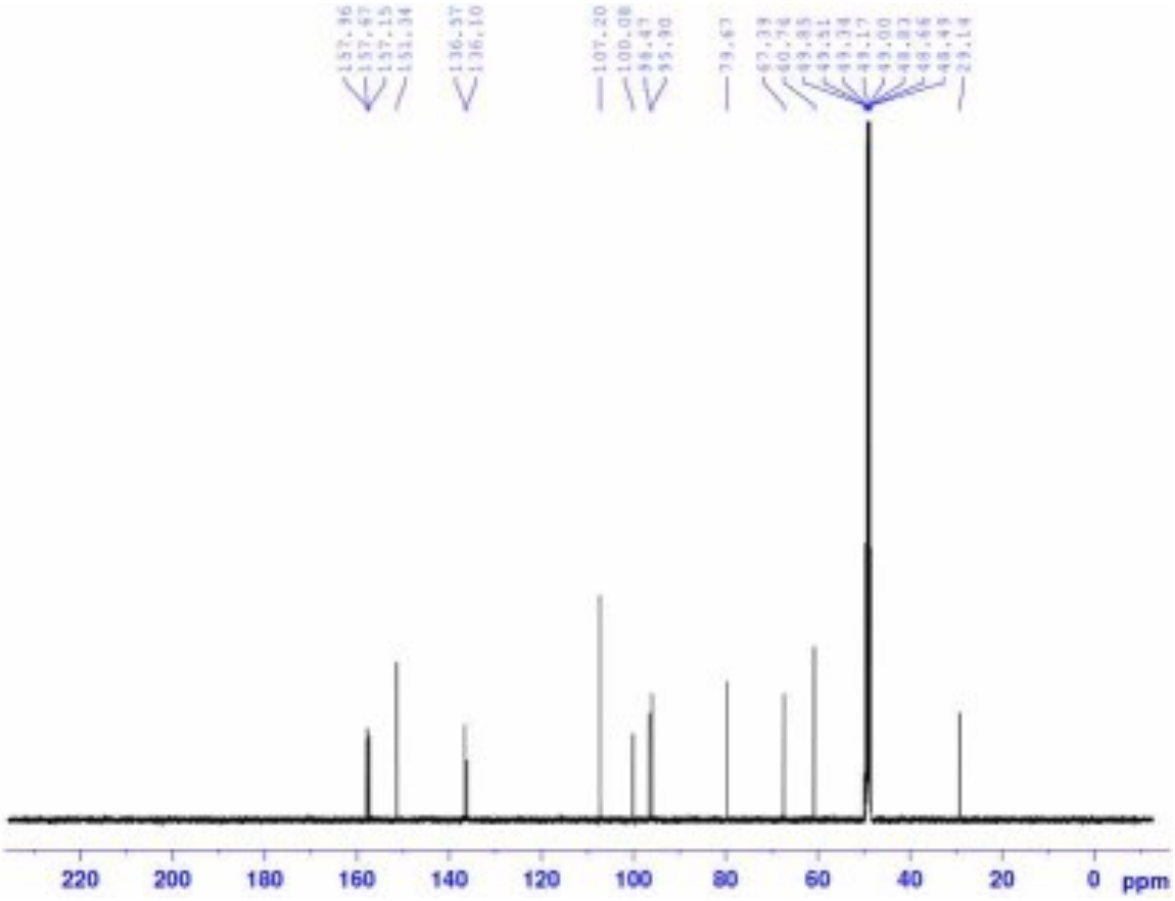
Phụ lục 3.17. Phổ HR-MS và NMR của hợp chất HL8: (-)-4'-*O*-methoxy-epi-gallocatechin



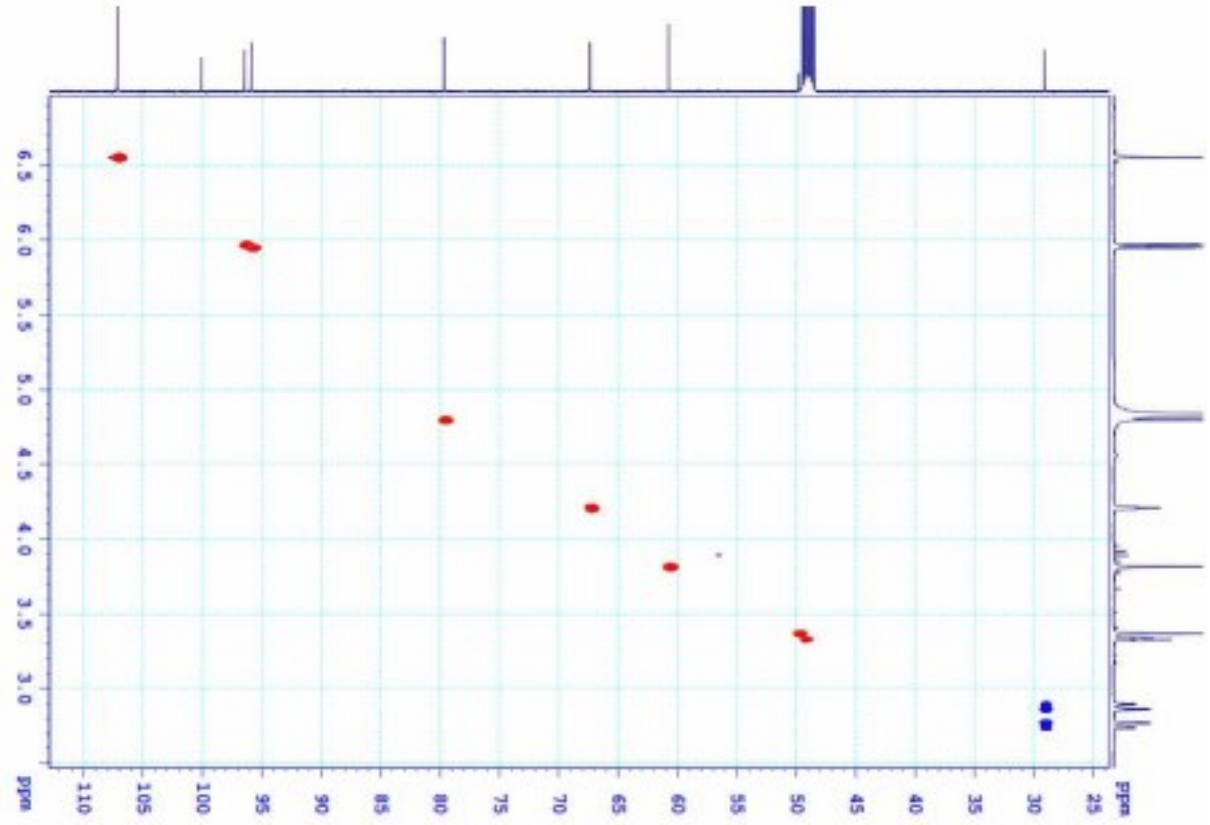
Phụ lục 3.17.1. Phổ HR-MS của hợp chất HL8



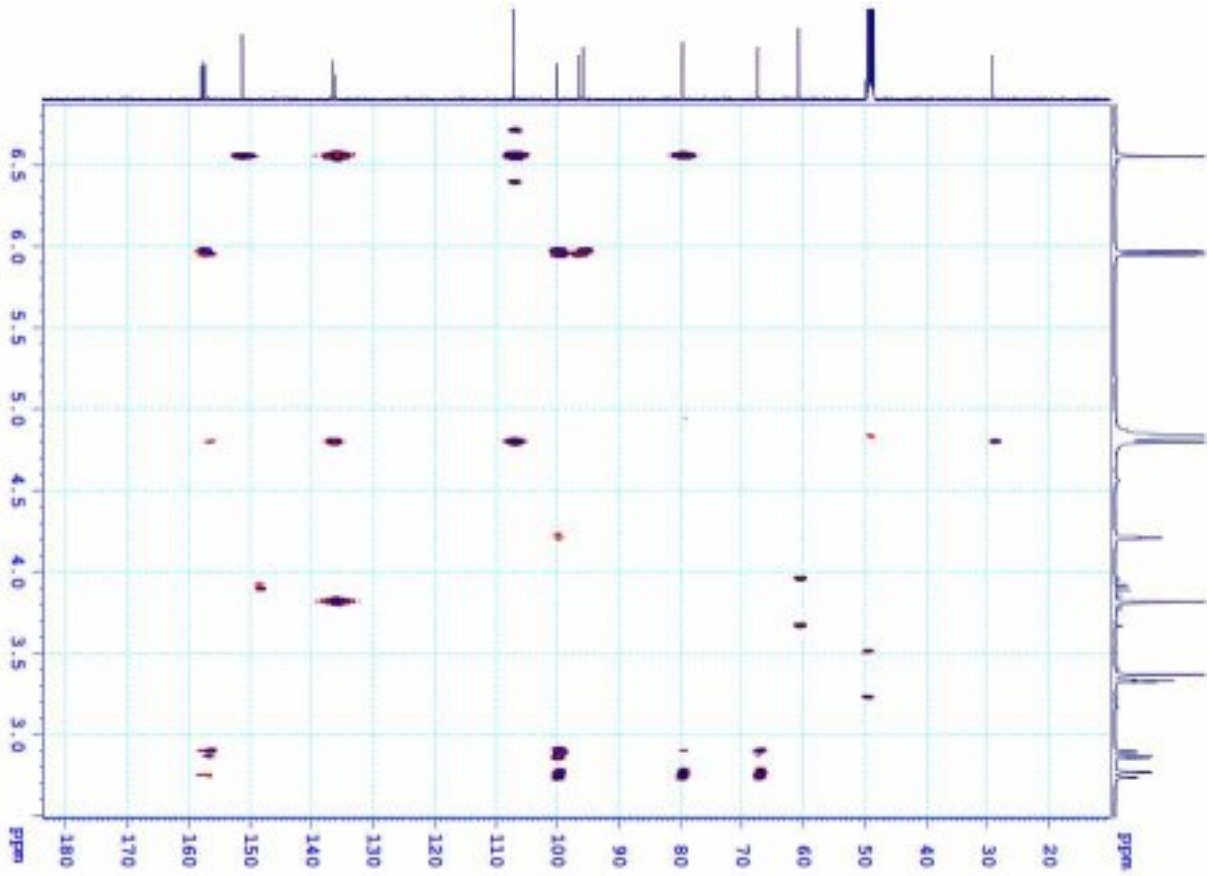
Phụ lục 3.17.2. Phổ ^{1}H-NMR của hợp chất HL8



Phụ lục 3.17.3. Phổ ^{13}C-NMR của hợp chất HL8

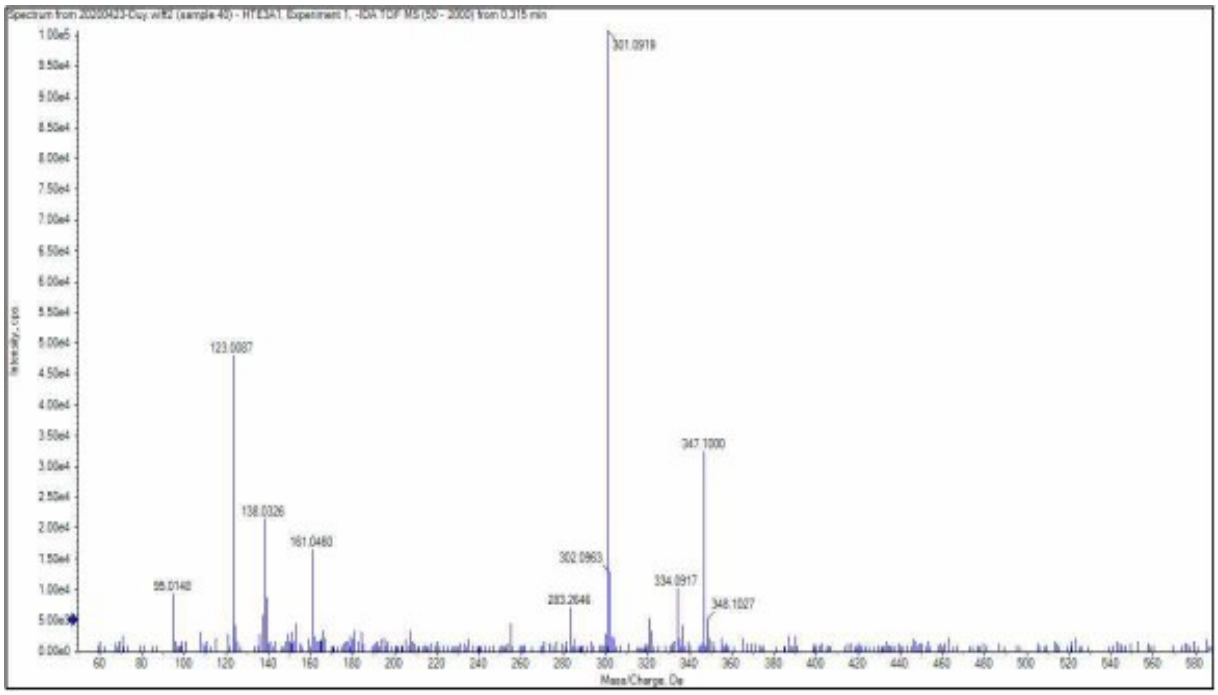


Phụ lục 3.17.4. Phổ HSQC của hợp chất HL8

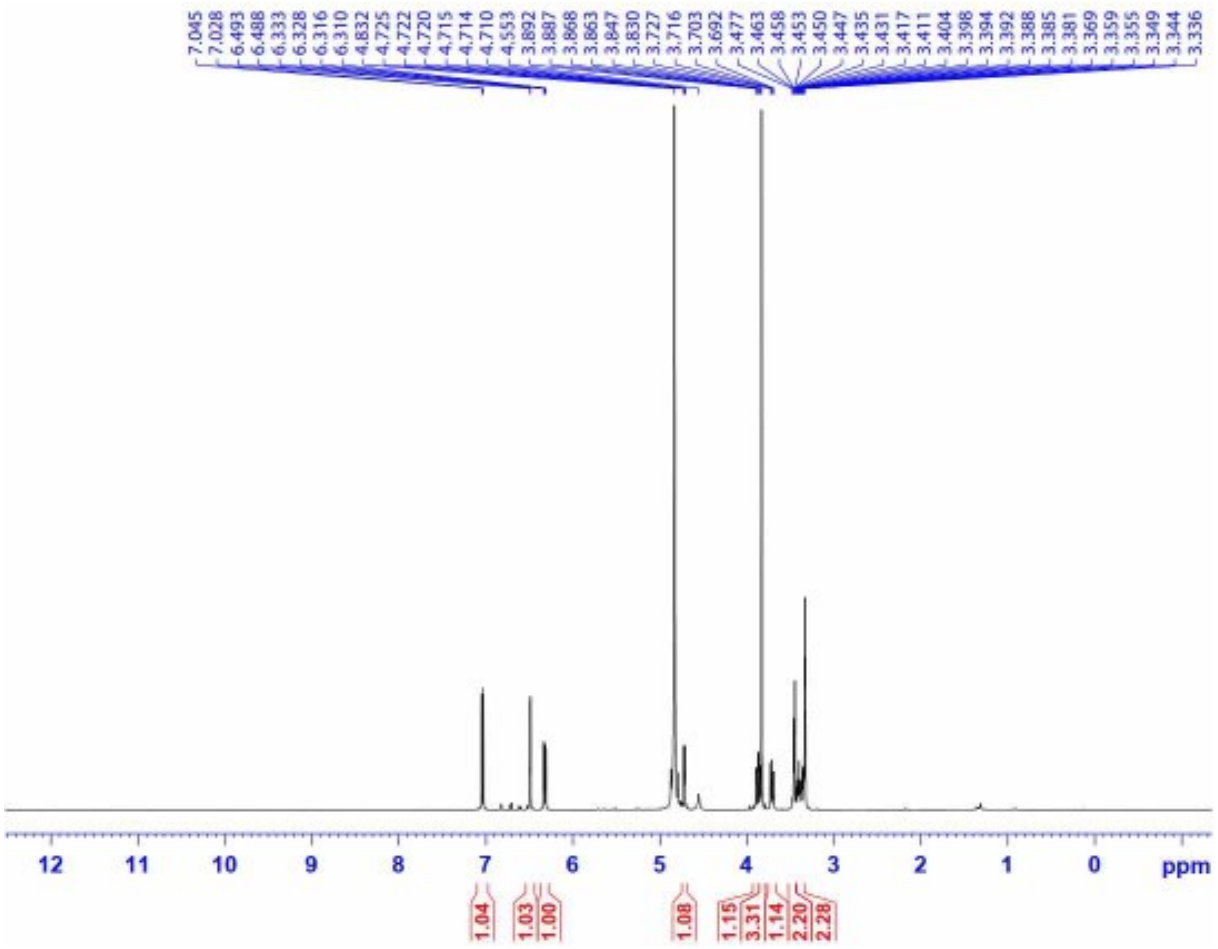


Phụ lục 3.17.5. Phổ HMBC của hợp chất HL8

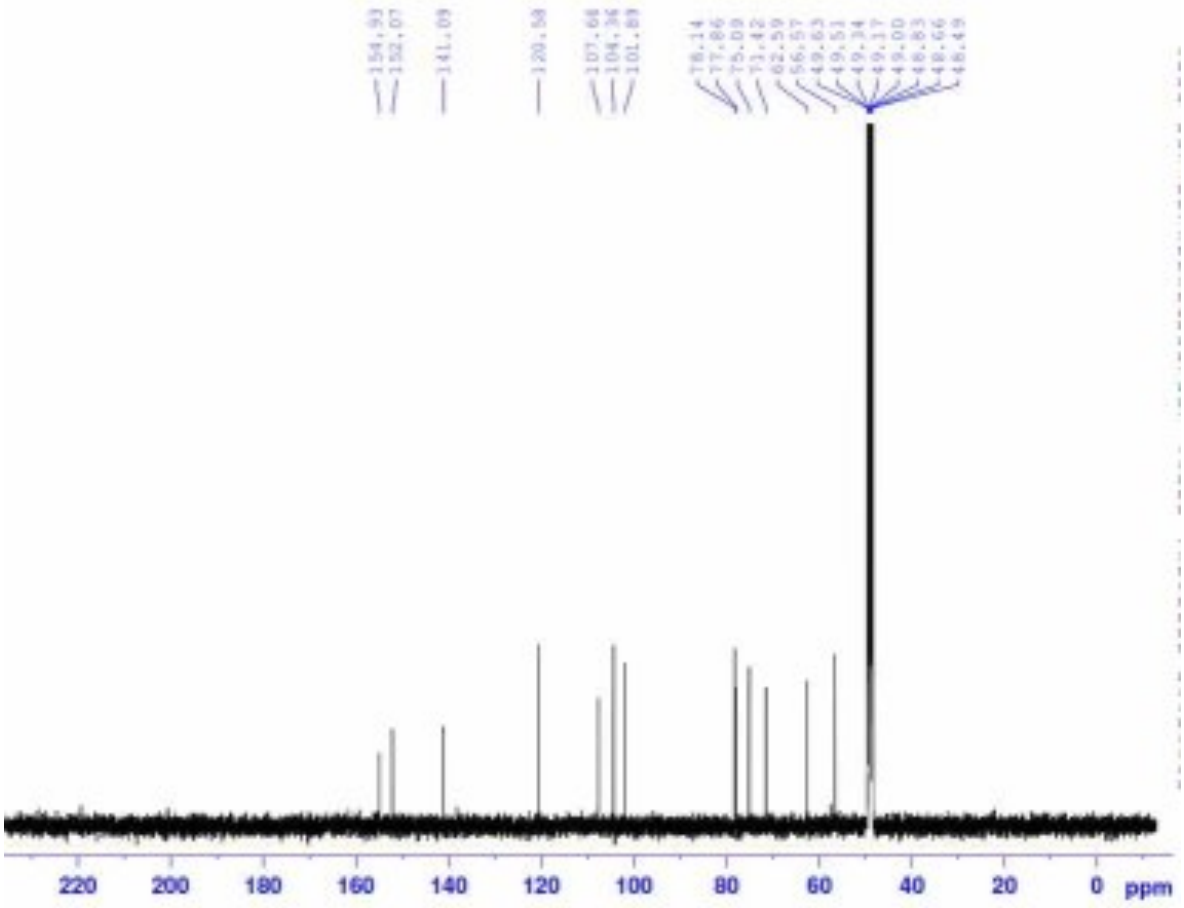
Phụ lục 3.18. Phổ HR-MS và NMR của hợp chất HL9: Isotachioside



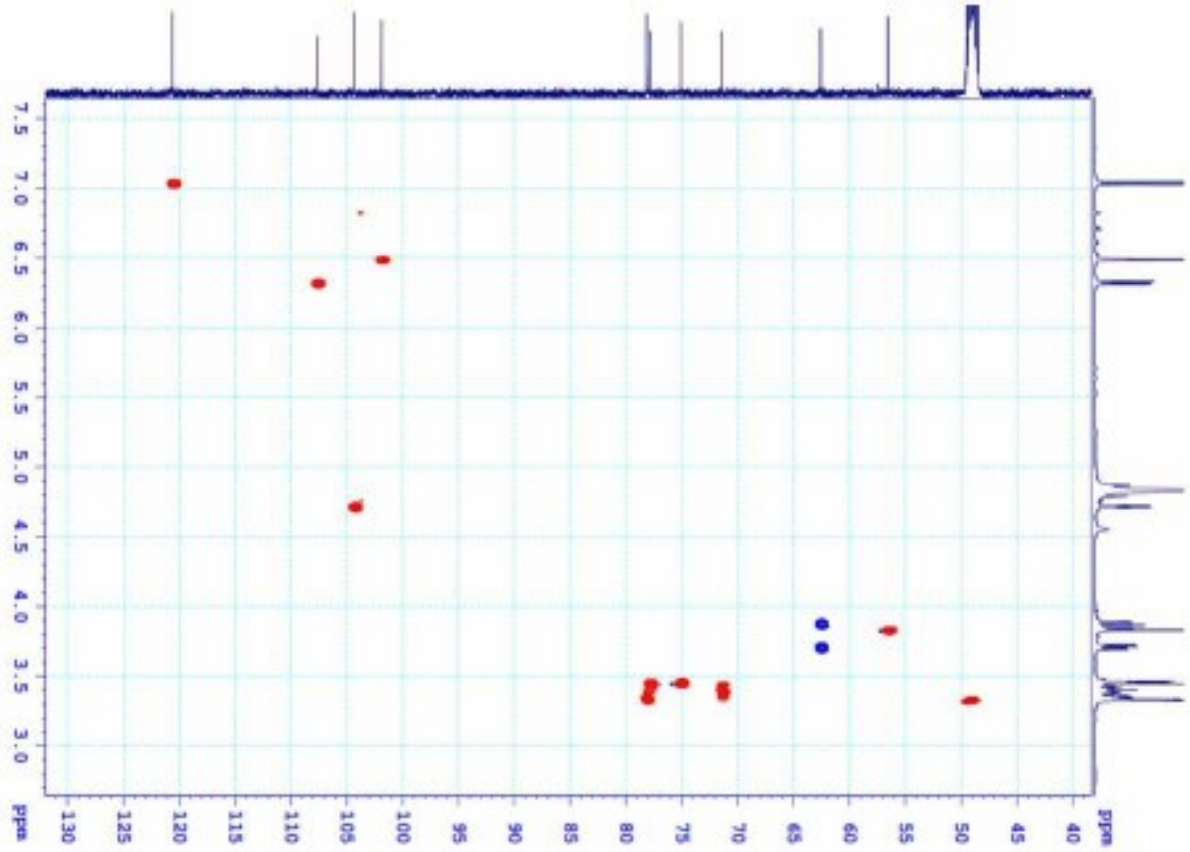
Phụ lục 3.18.1. Phổ HR-MS của hợp chất HL9



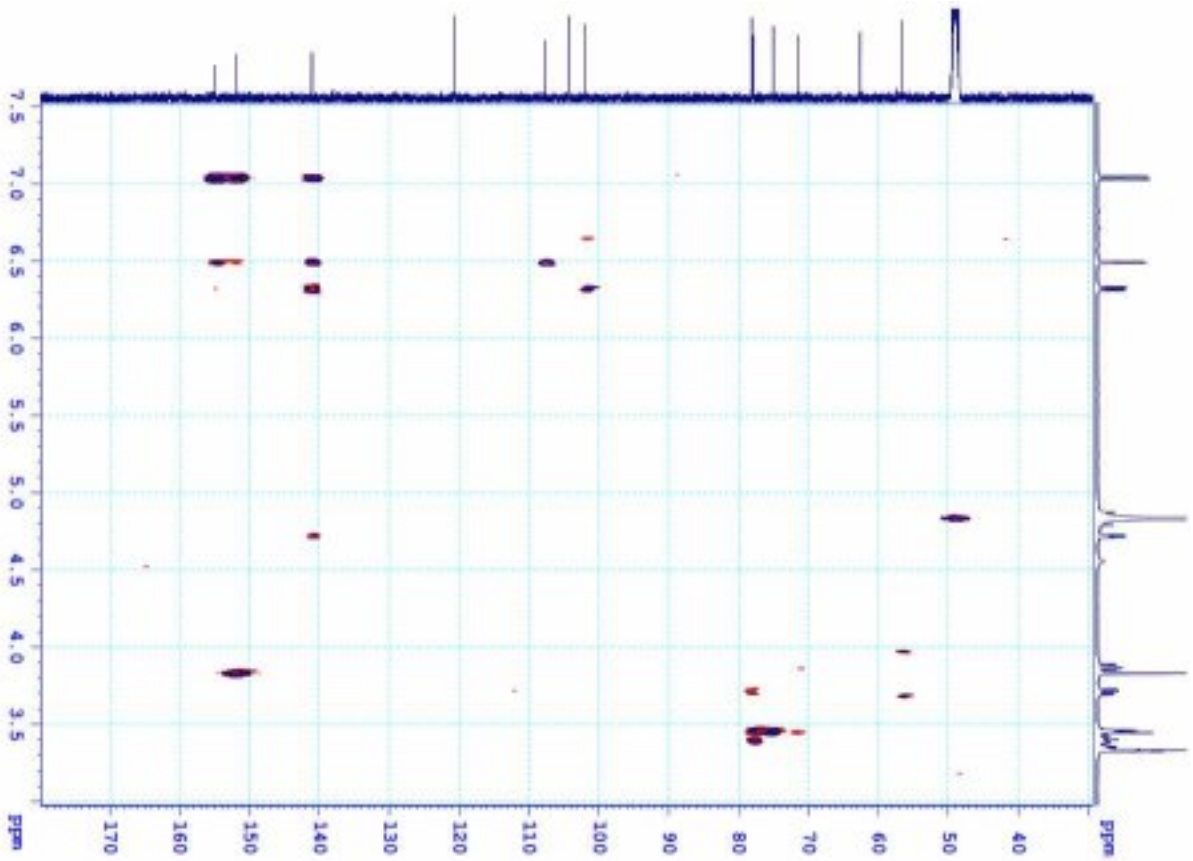
Phụ lục 3.18.2. Phổ ^{1}H-NMR của hợp chất HL9



Phụ lục 3.18.3. Phổ ^{13}C-NMR của hợp chất HL9

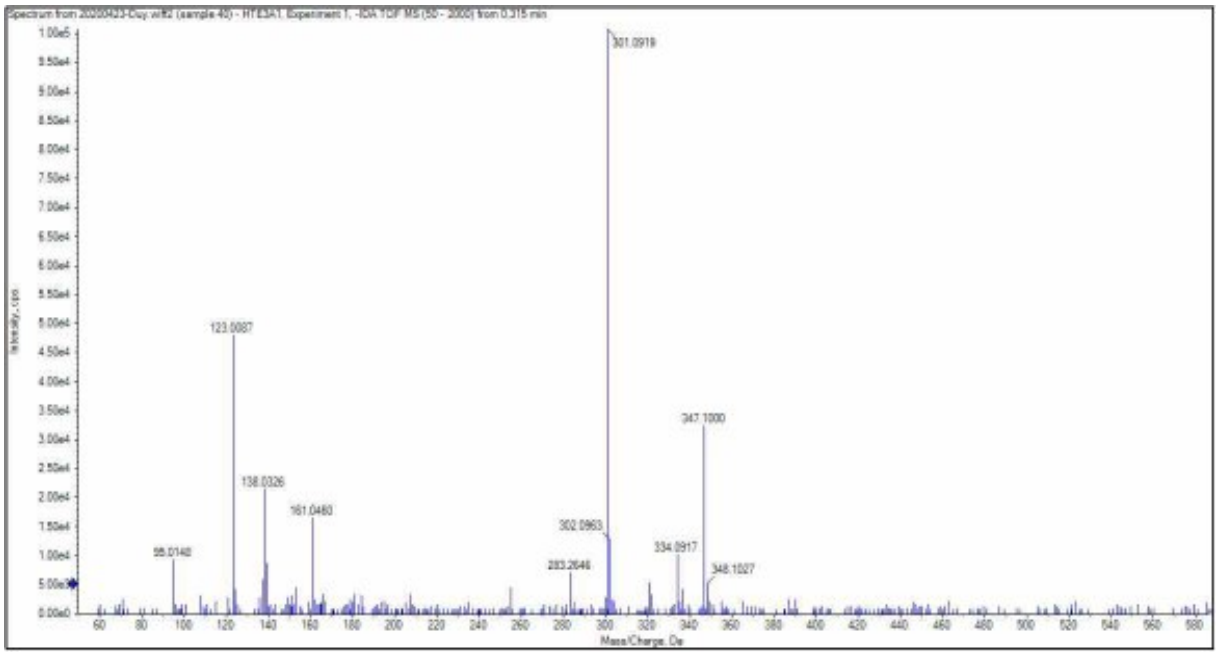


Phụ lục 3.18.4. Phổ HSQC của hợp chất HL9

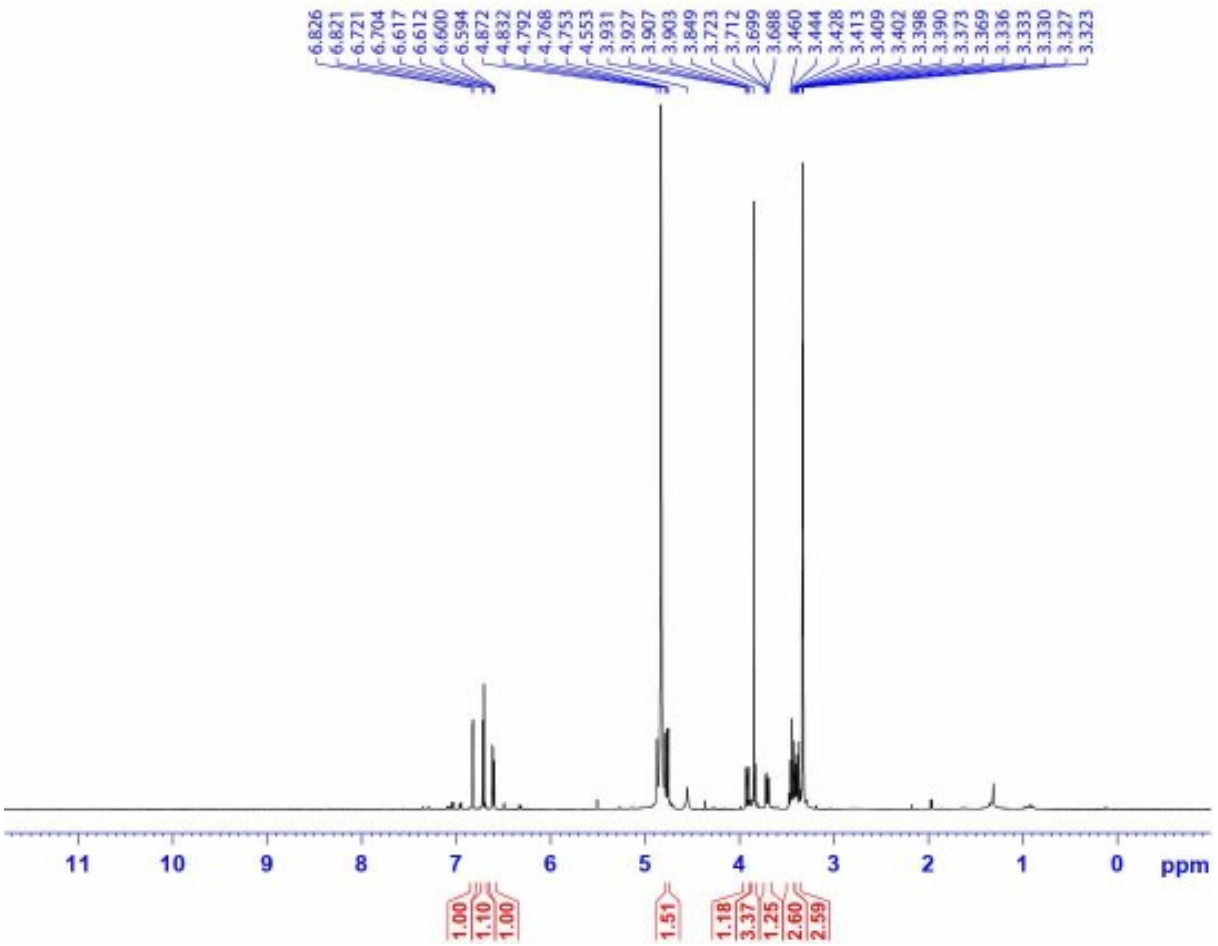


Phụ lục 3.18.5. Phổ HMBC của hợp chất HL9

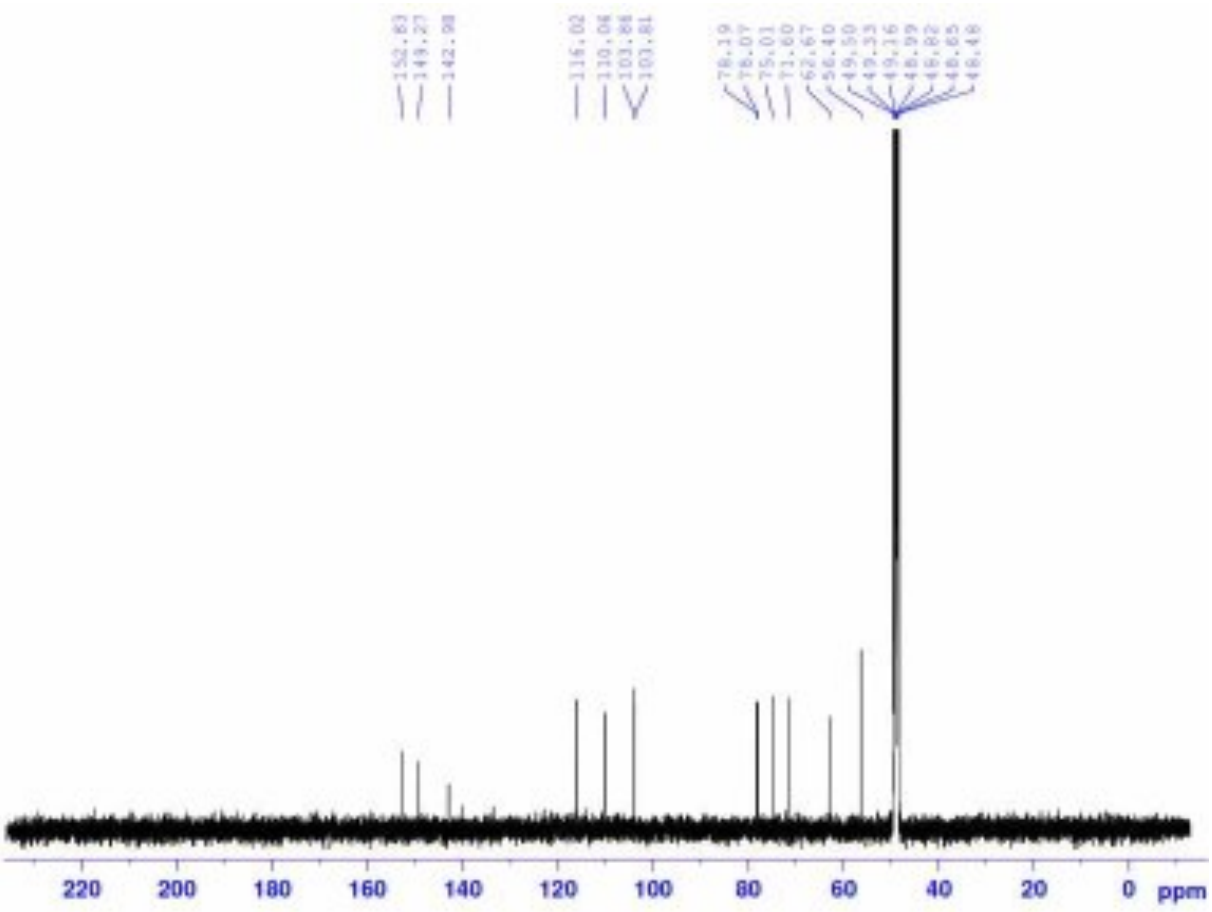
Phụ lục 3.19. Phổ HR-MS và NMR của hợp chất HL10: Tachioside



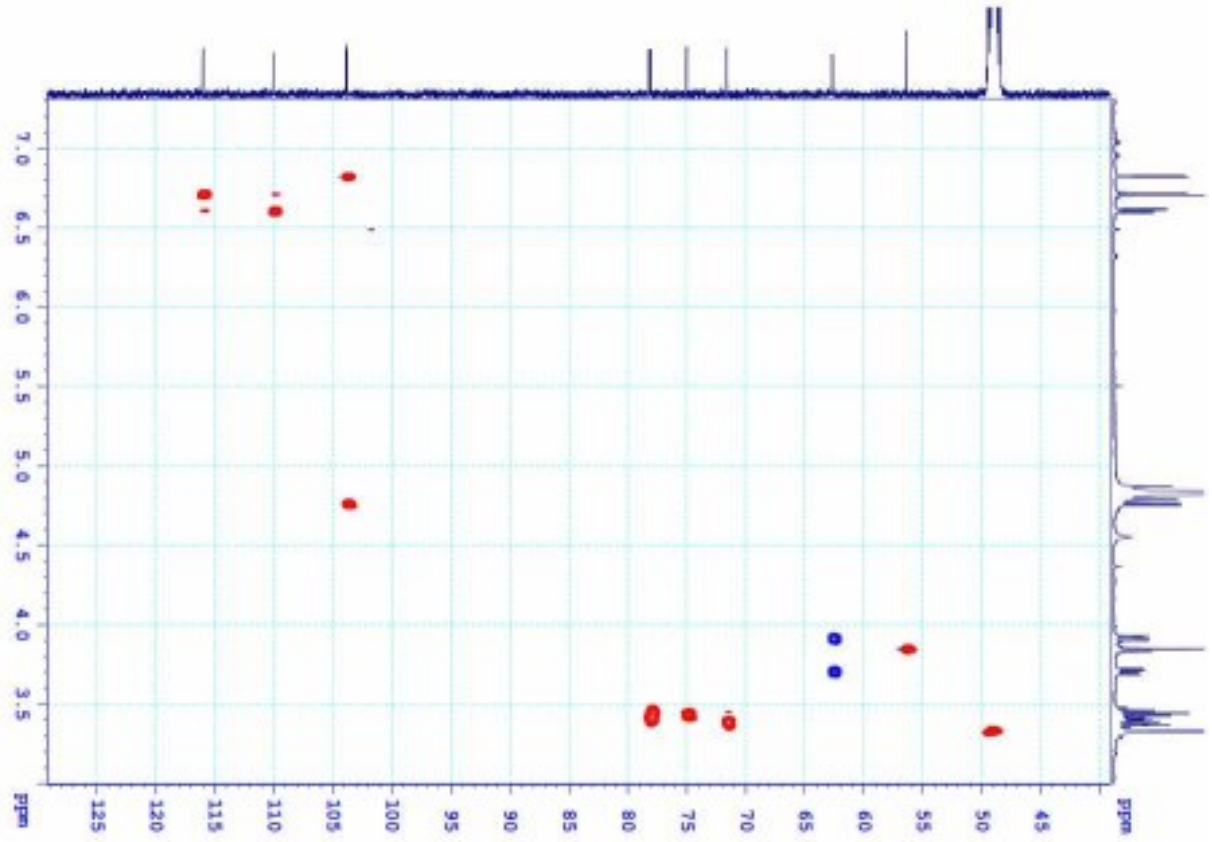
Phụ lục 3.19.1. Phổ HR-MS của hợp chất HL10



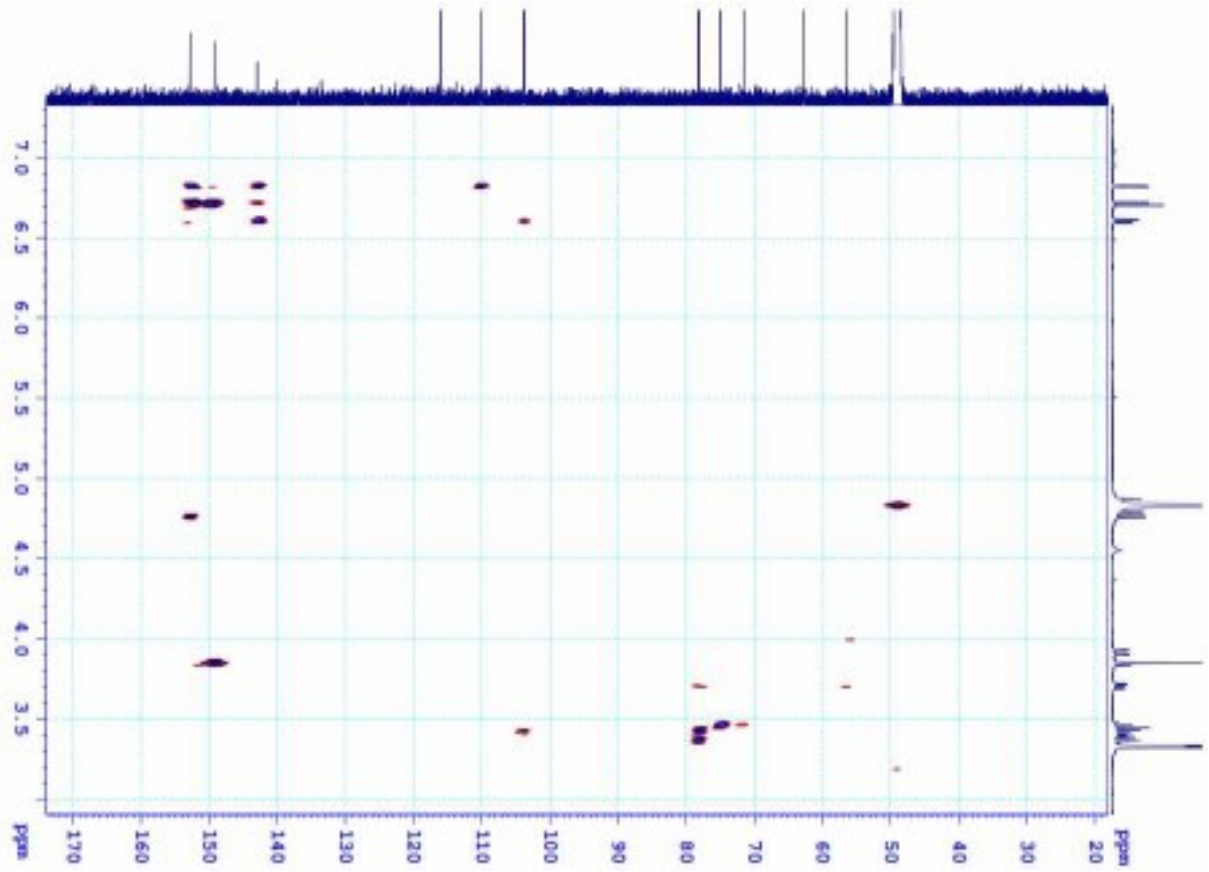
Phụ lục 3.19.2. Phổ ^{1}H-NMR của hợp chất HL10



Phụ lục 3.19.3. Phổ ^{13}C-NMR của hợp chất HL10

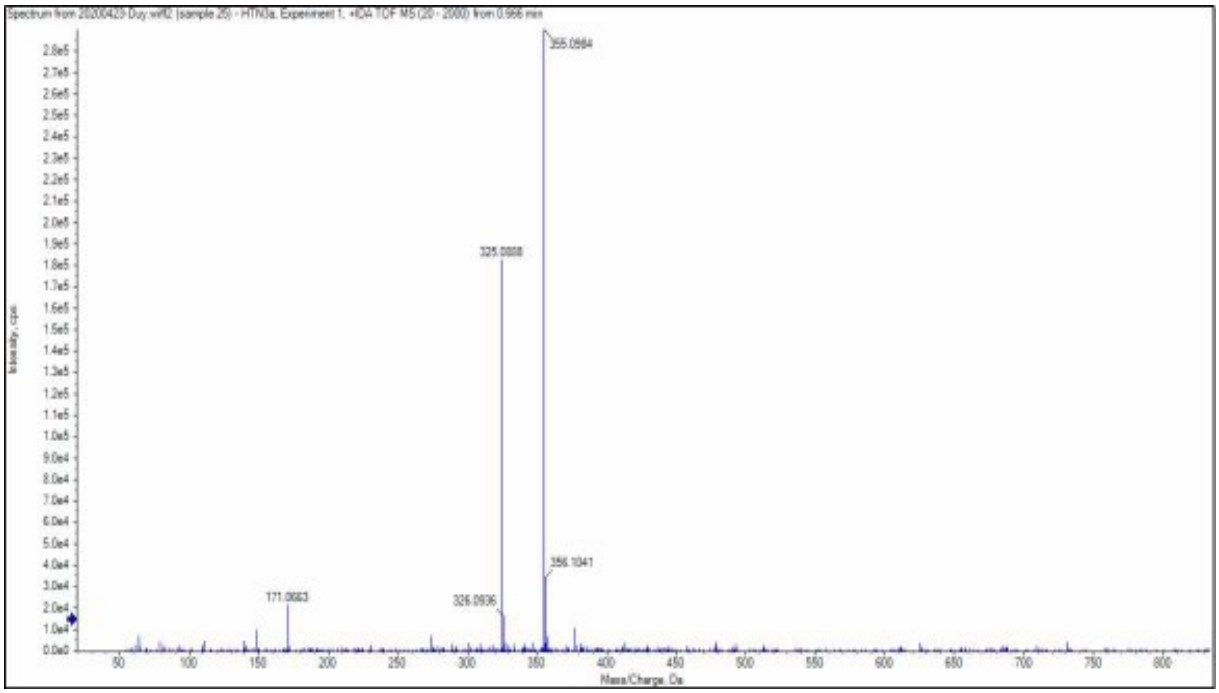


Phụ lục 3.19.4. Phổ HSQC của hợp chất HL10

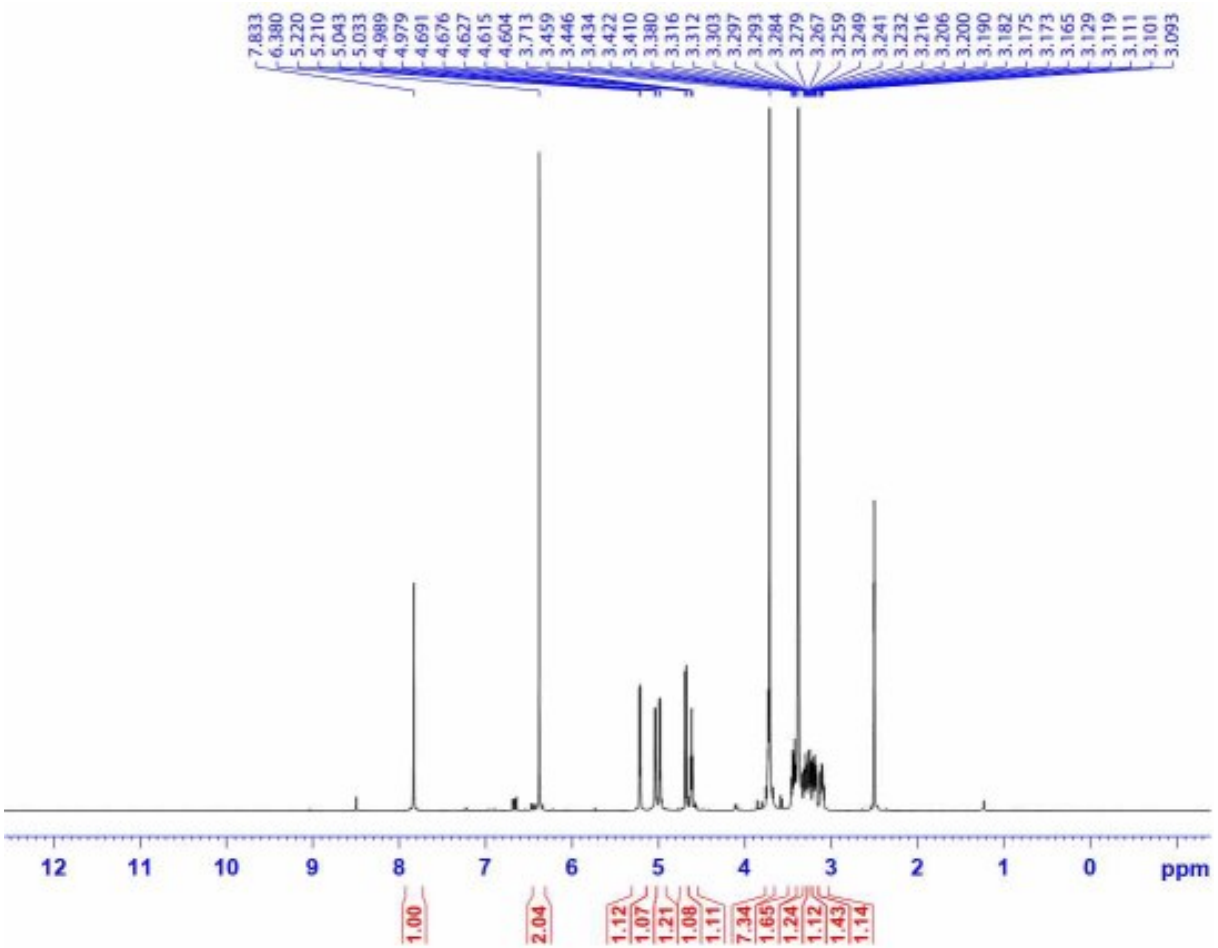


Phụ lục 3.19.5. Phổ HMBC của hợp chất HL10

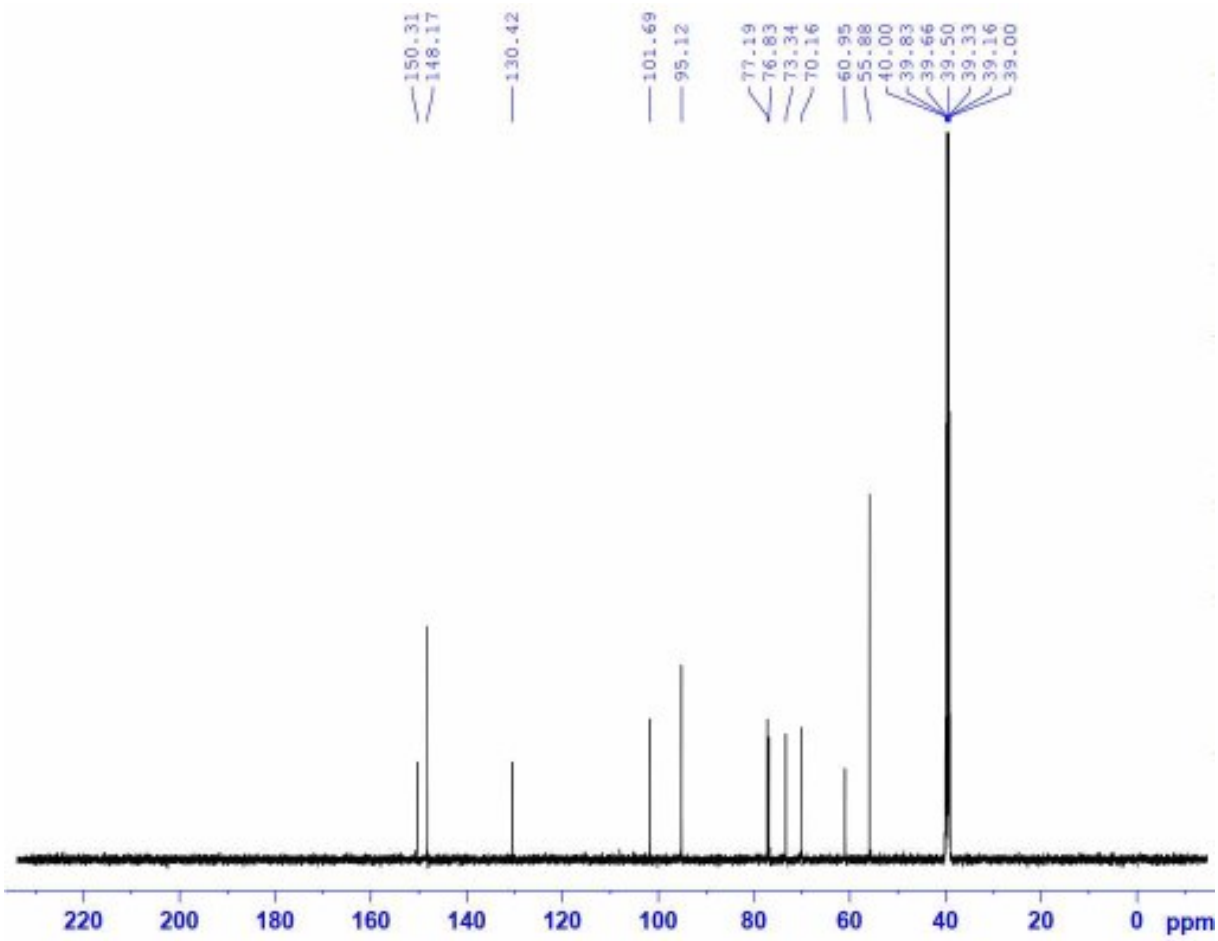
Phụ lục 3.20. Phổ HR-MS và NMR của hợp chất HL11: 3,5-Dimethoxy-4-hydroxy-1-*β*-D-glucopyranoside.



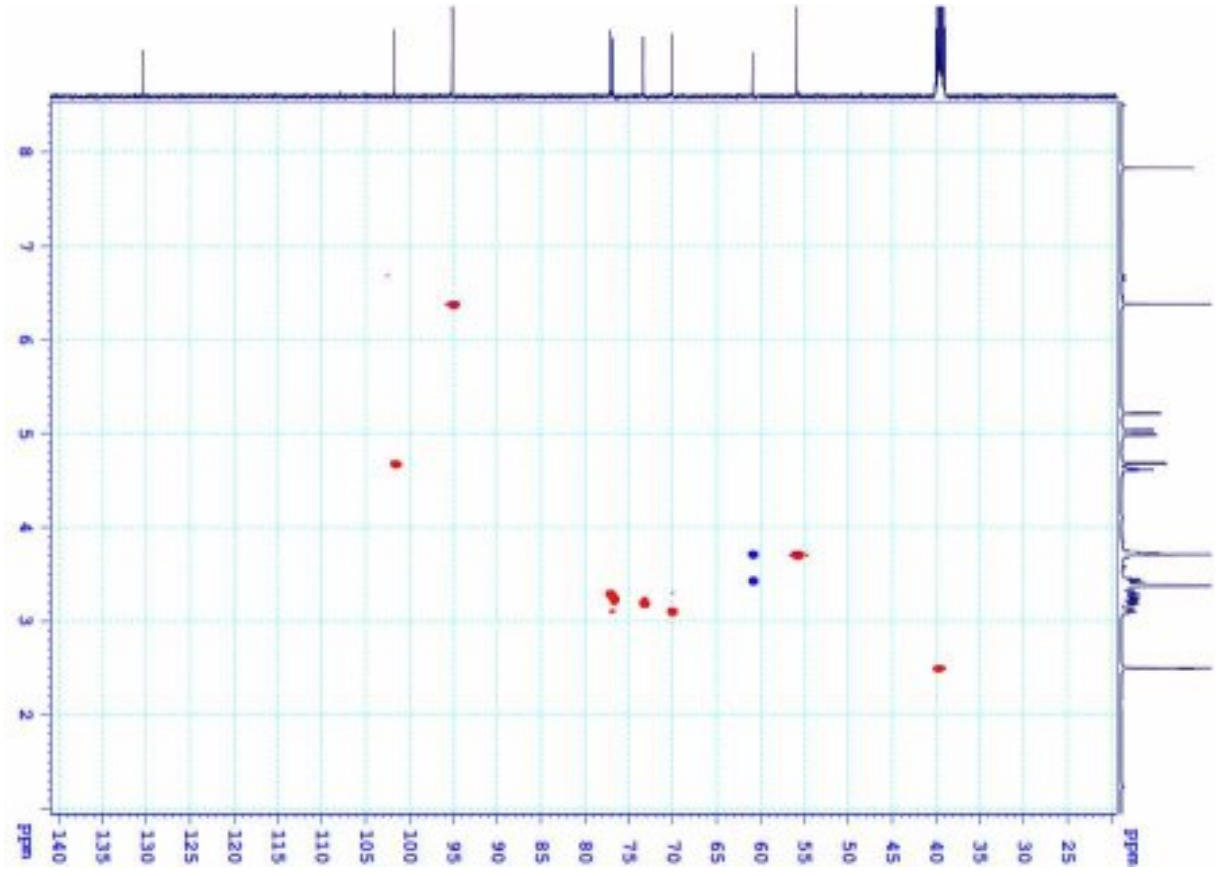
Phụ lục 3.20.1. Phổ HR-MS của hợp chất HL11



Phụ lục 3.20.2. Phổ ^{1}H-NMR của hợp chất HL11

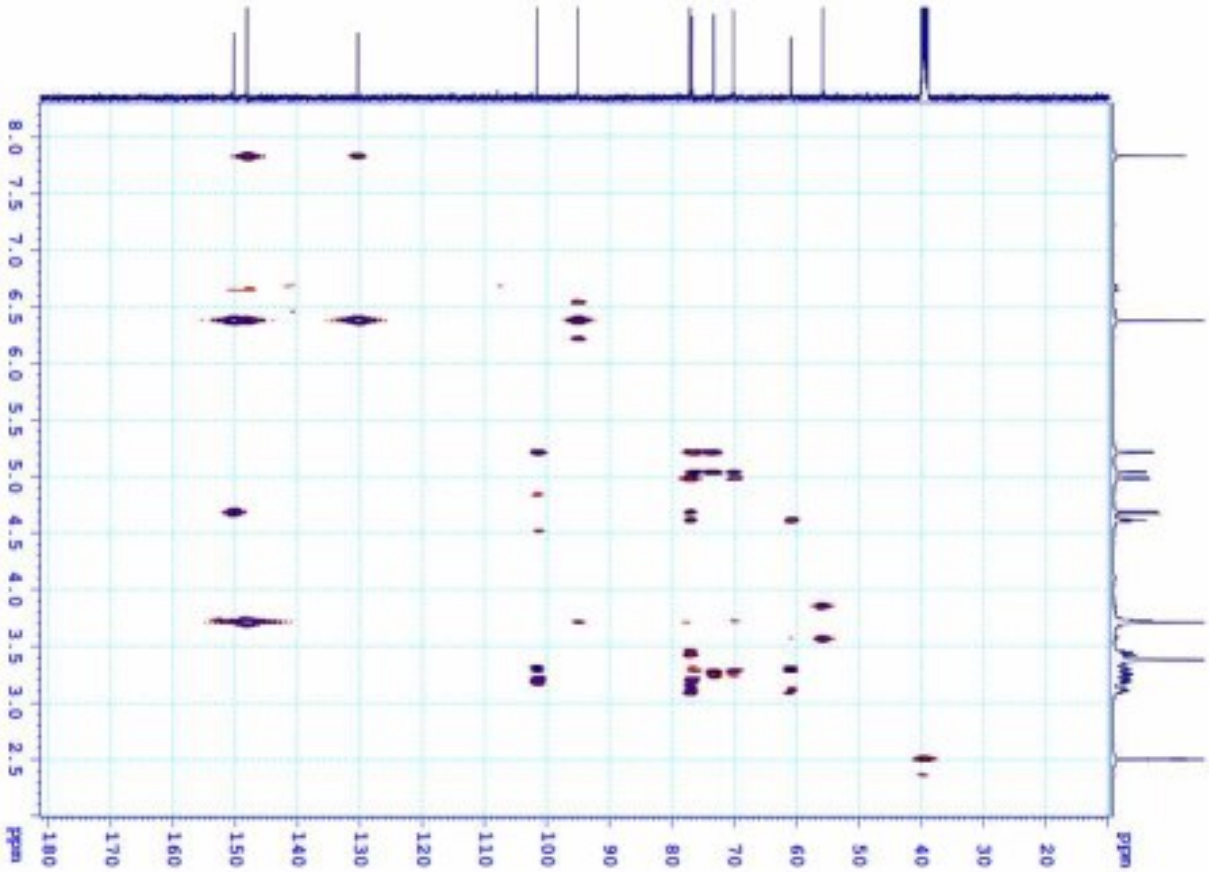


Phụ lục 3.20.3. Phổ ^{13}C-NMR của hợp chất HL11



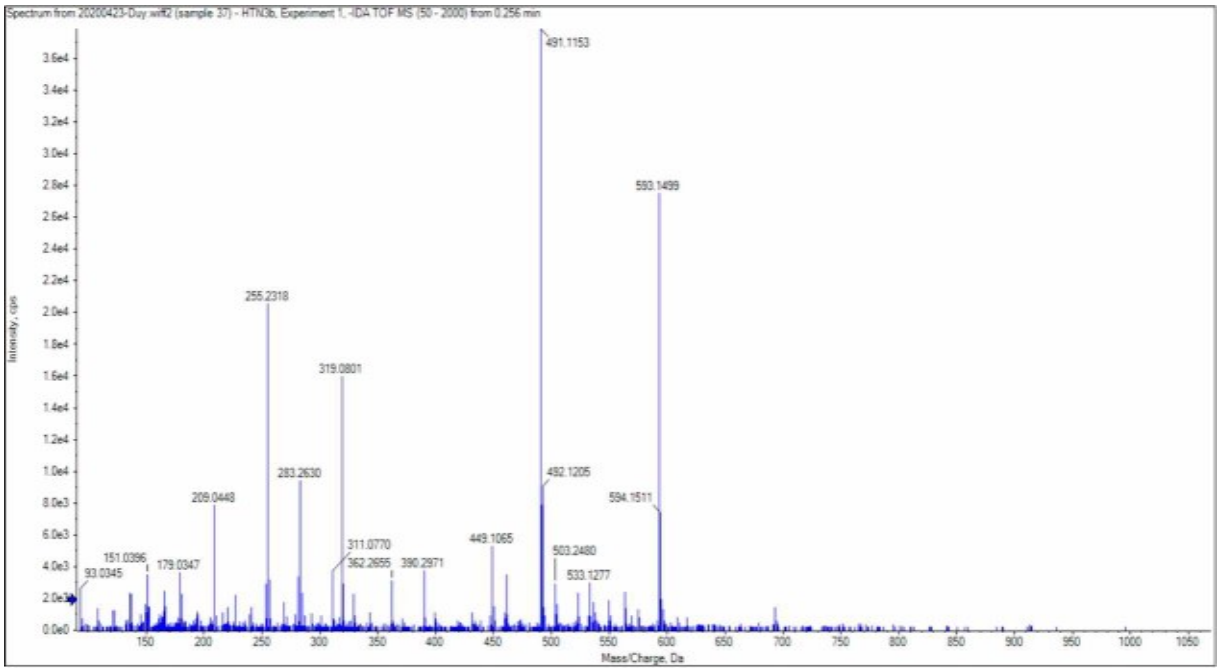
PL119

Phụ lục 3.20.4. Phổ HSQC của hợp chất HL11

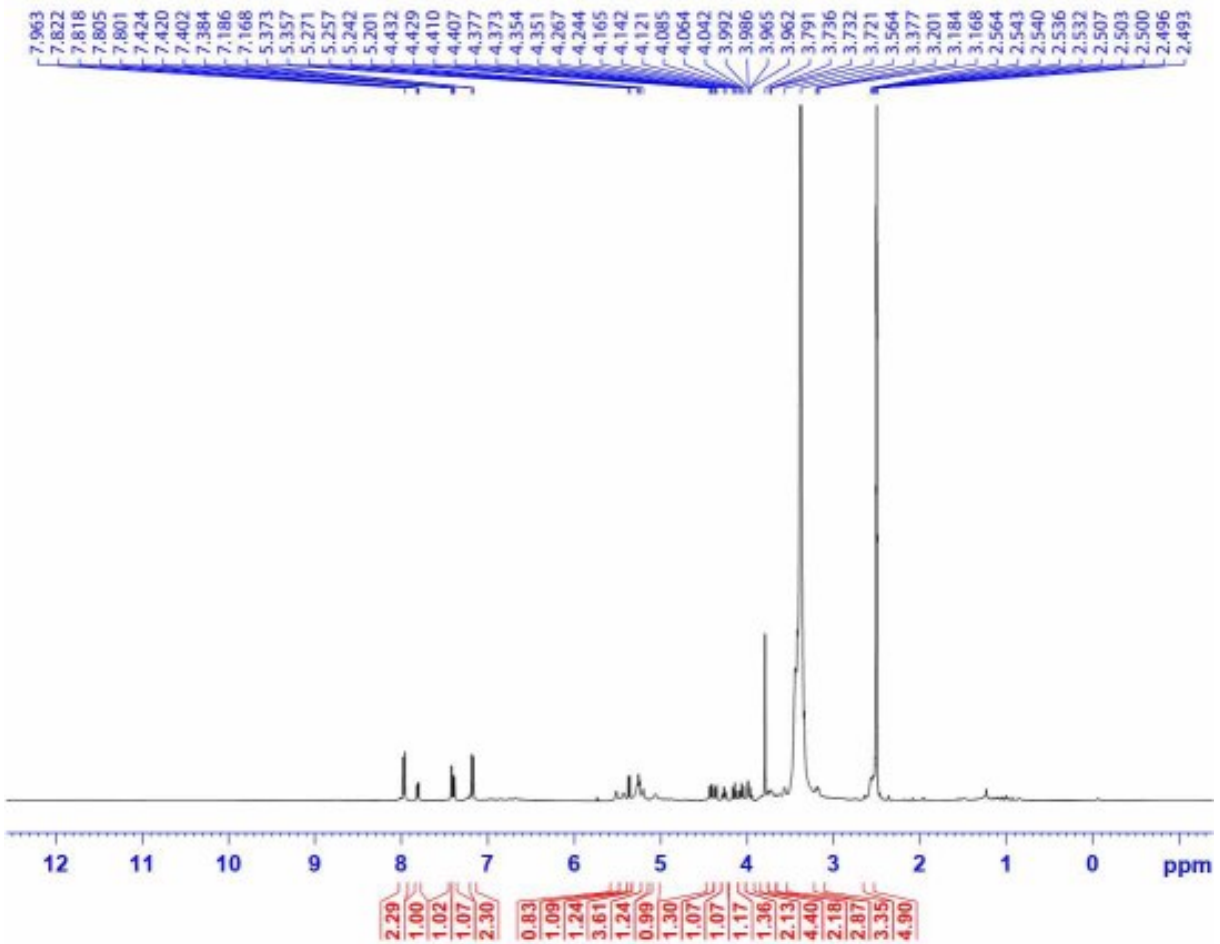


Phụ lục 3.20.5. Phổ HMBC của hợp chất HL11

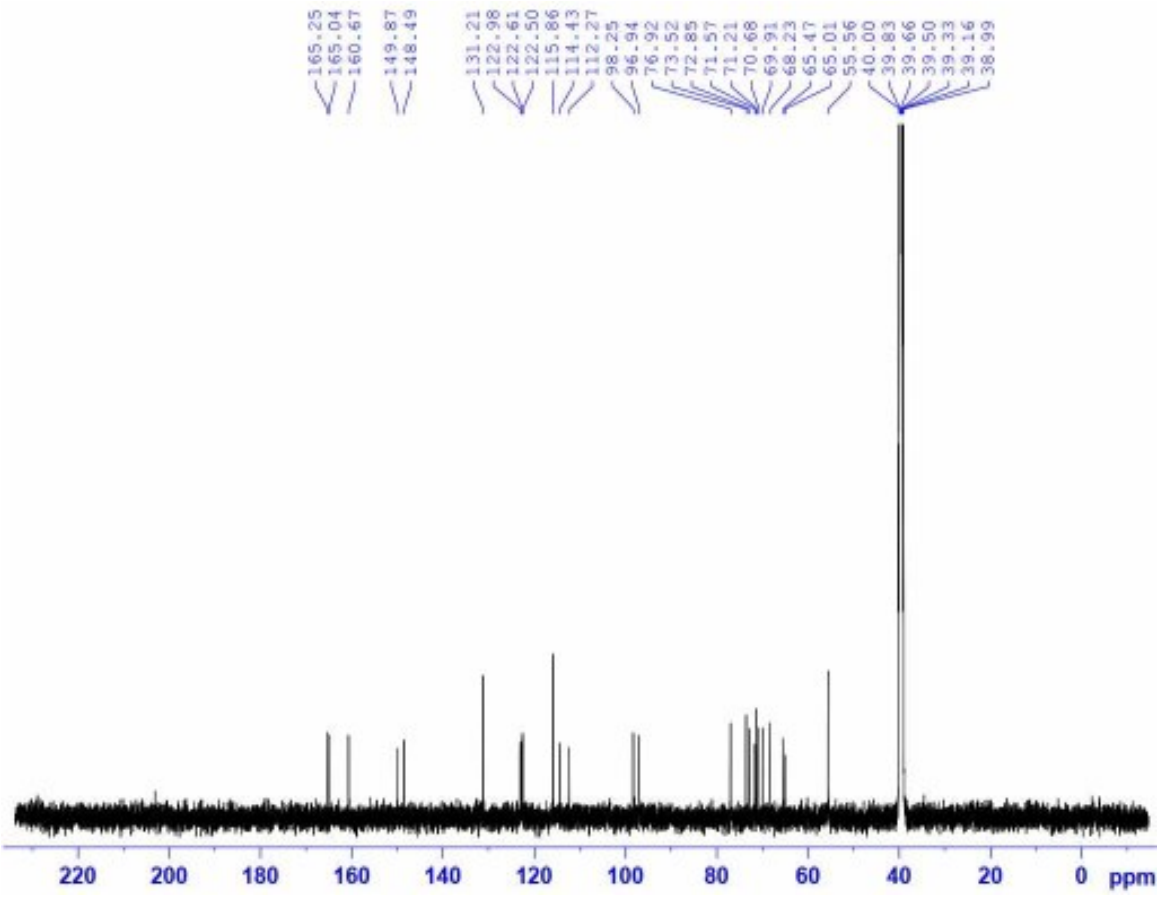
Phụ lục 3.21. Phổ HR-MS và NMR của hợp chất HL12: Helilobatoside A



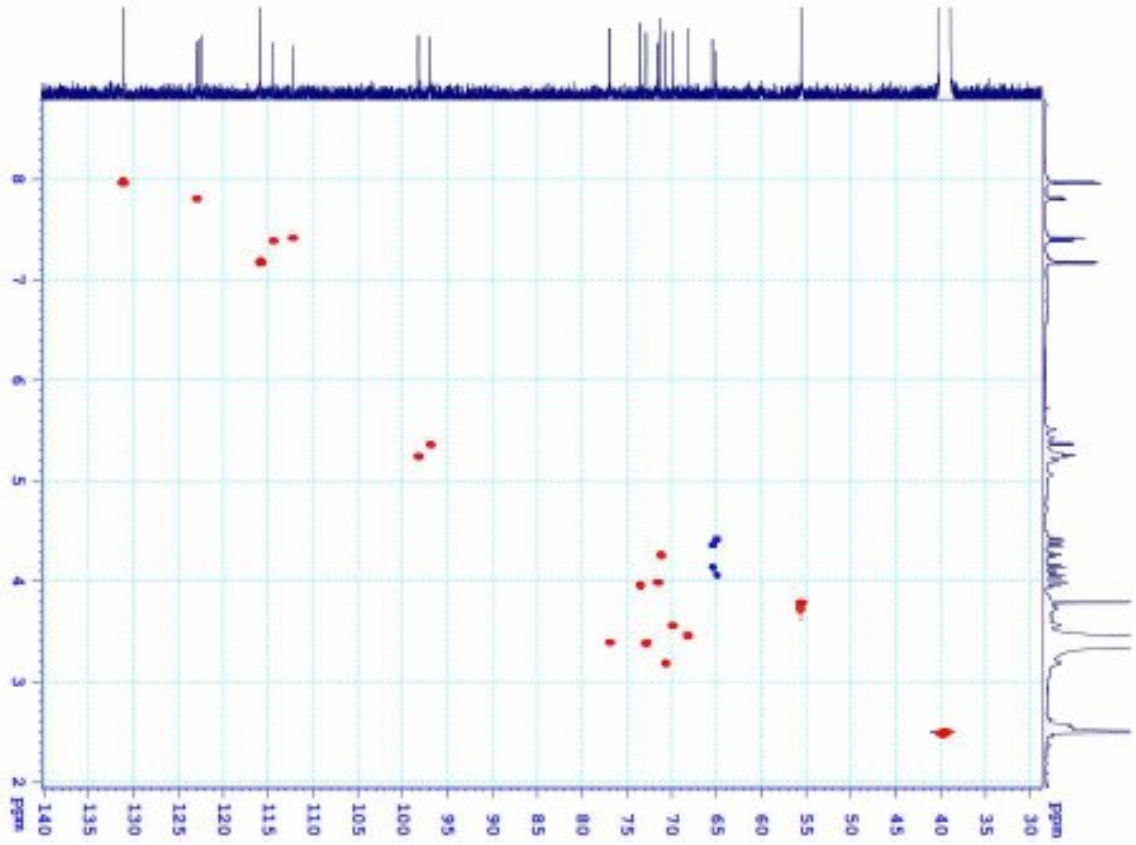
Phụ lục 3.21.1. Phổ HR- -MS của hợp chất HL12



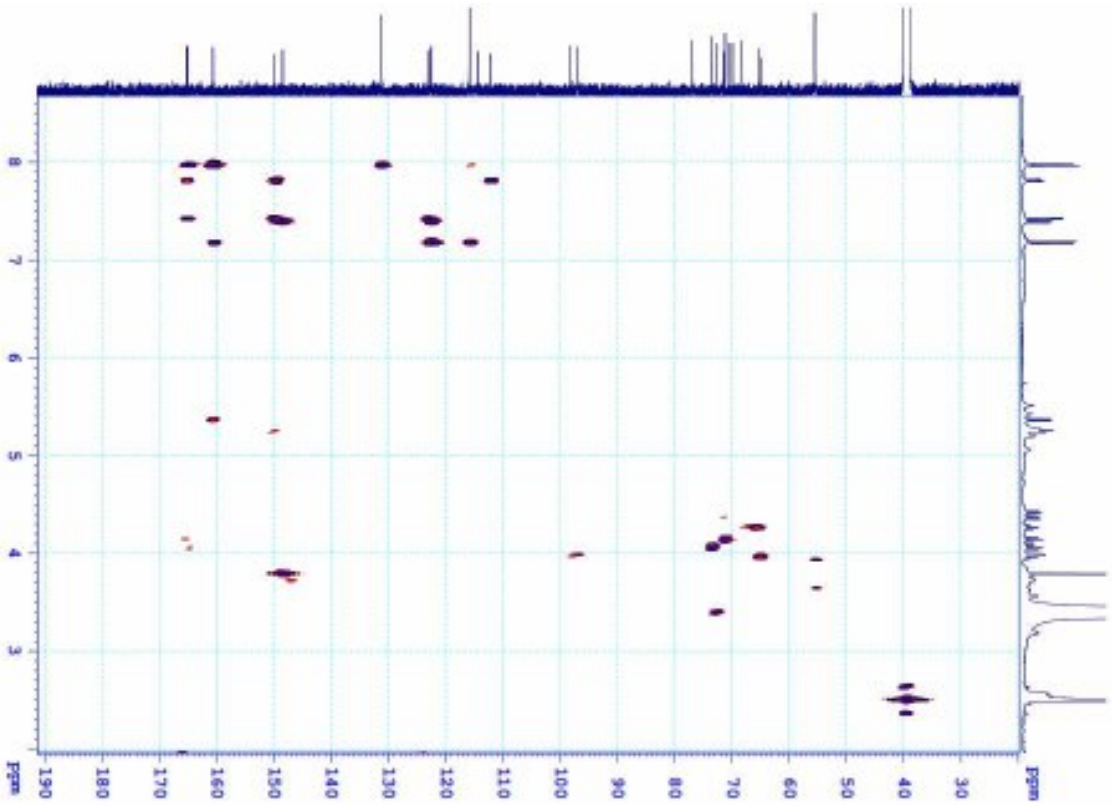
Phụ lục 3.21.2. Phổ ^{1}H-NMR của hợp chất HL12



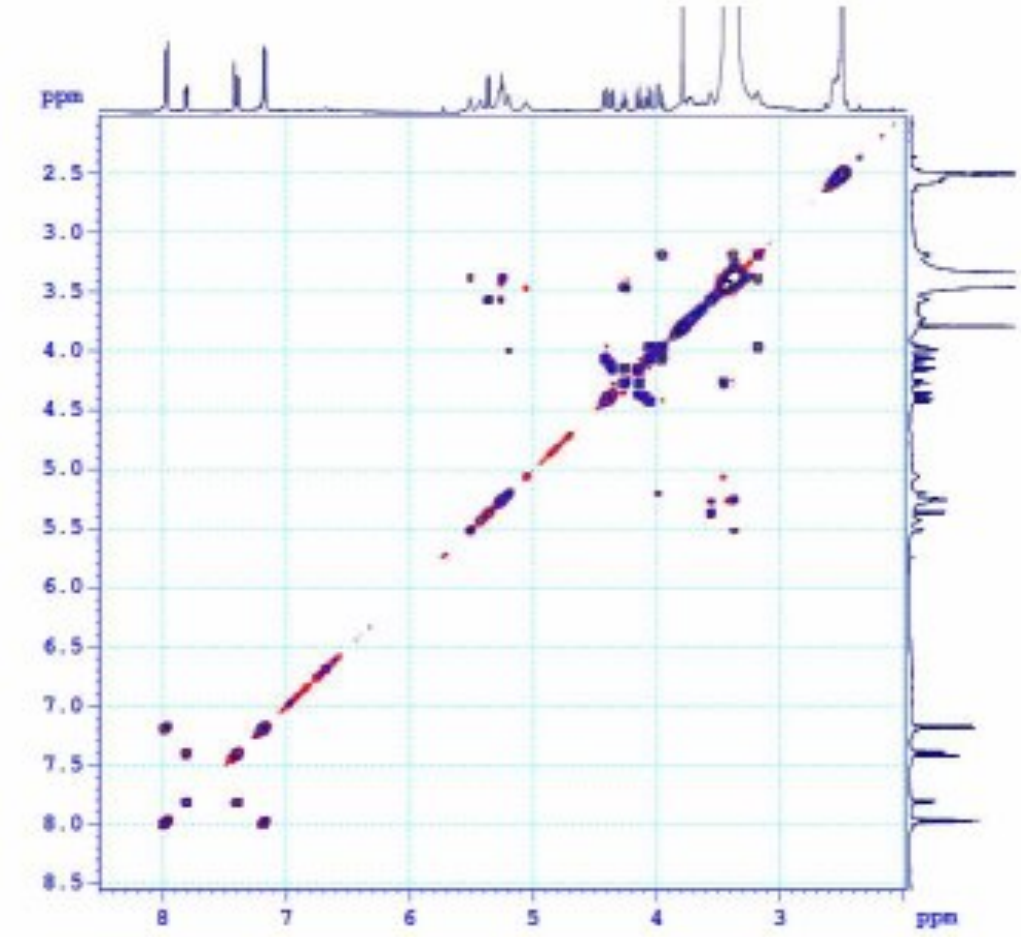
Phụ lục 3.21.3. Phổ ^{13}C-NMR của hợp chất HL12



Phụ lục 3.21.4. Phổ HSQC của hợp chất HL12

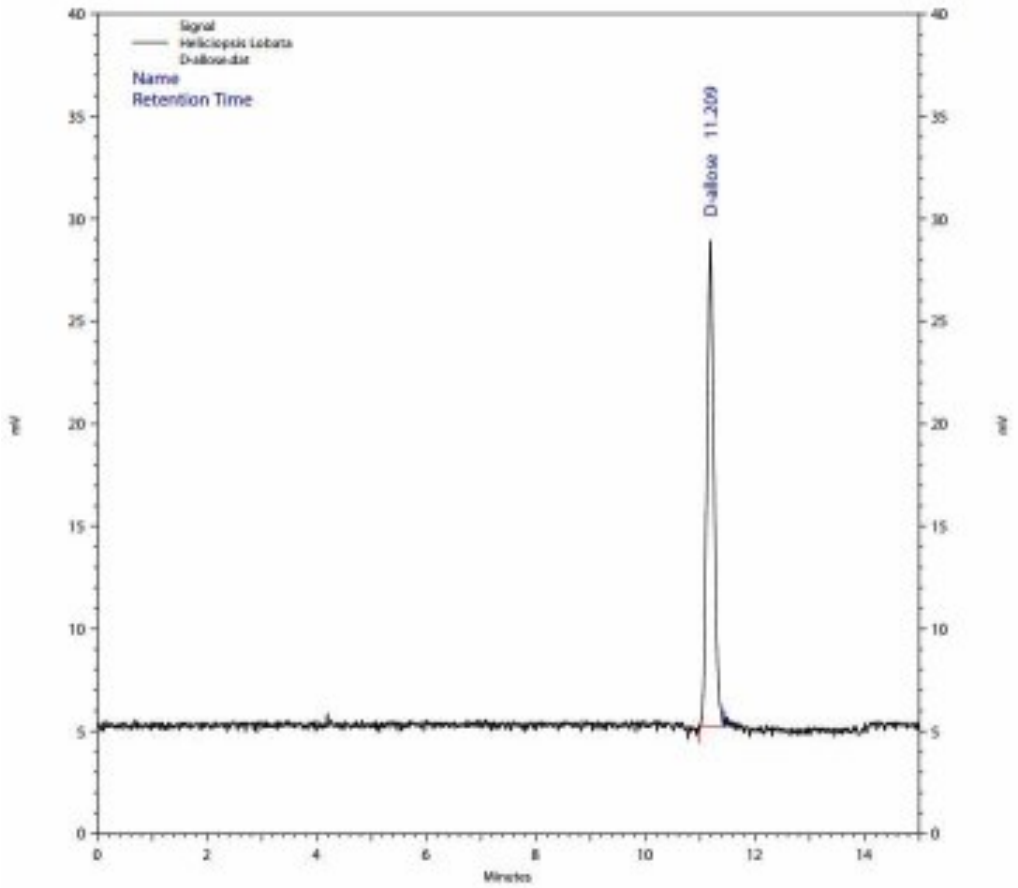


Phụ lục 3.21.5. Phổ HMBC của hợp chất HL12

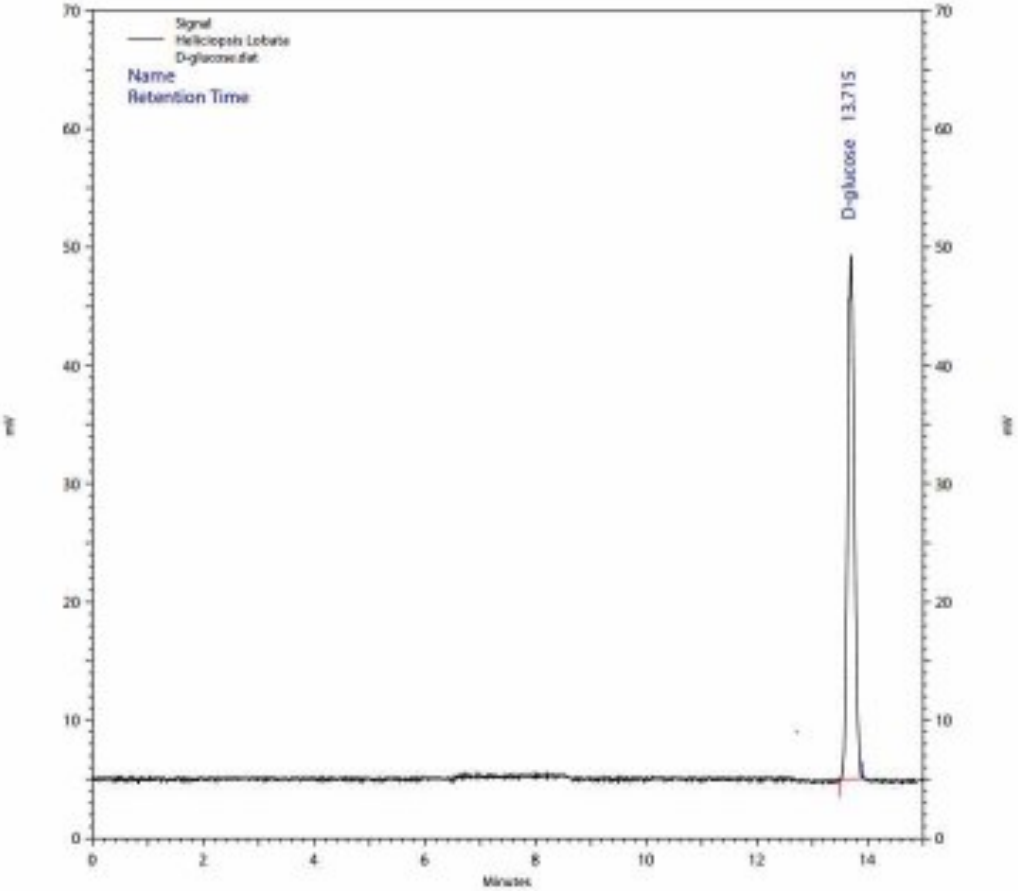


Phụ lục 3.21.6. Phổ COSY của hợp chất HL12

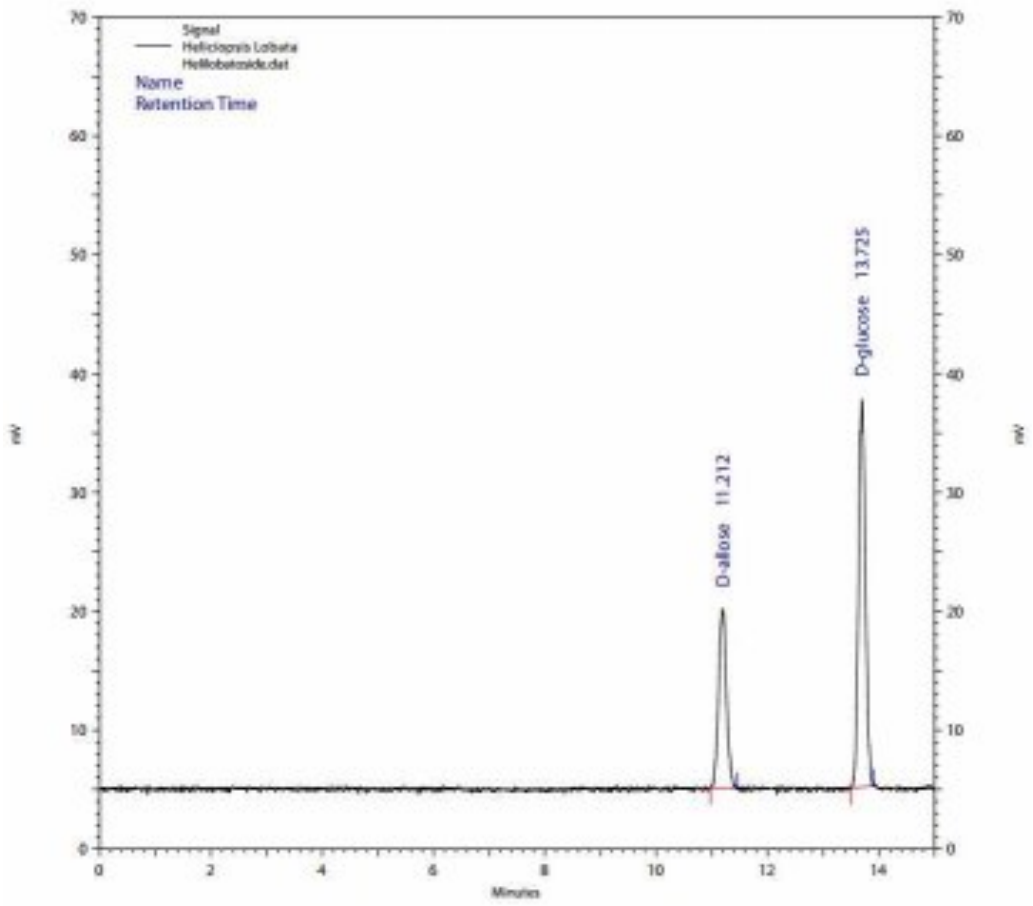
PL123



Phụ lục 3.21.7. Sắc ký đồ của đường D-allose phân tích bằng HPLC

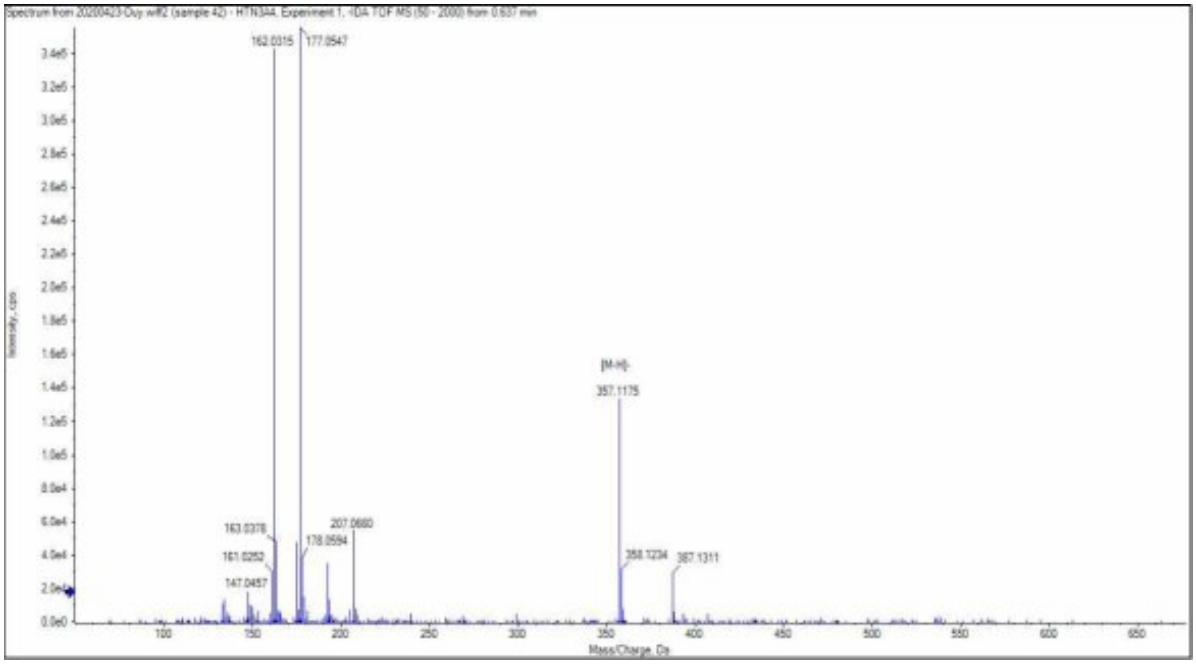


Phụ lục 3.21.8. Sắc ký đồ của đường D-glucose phân tích bằng HPLC

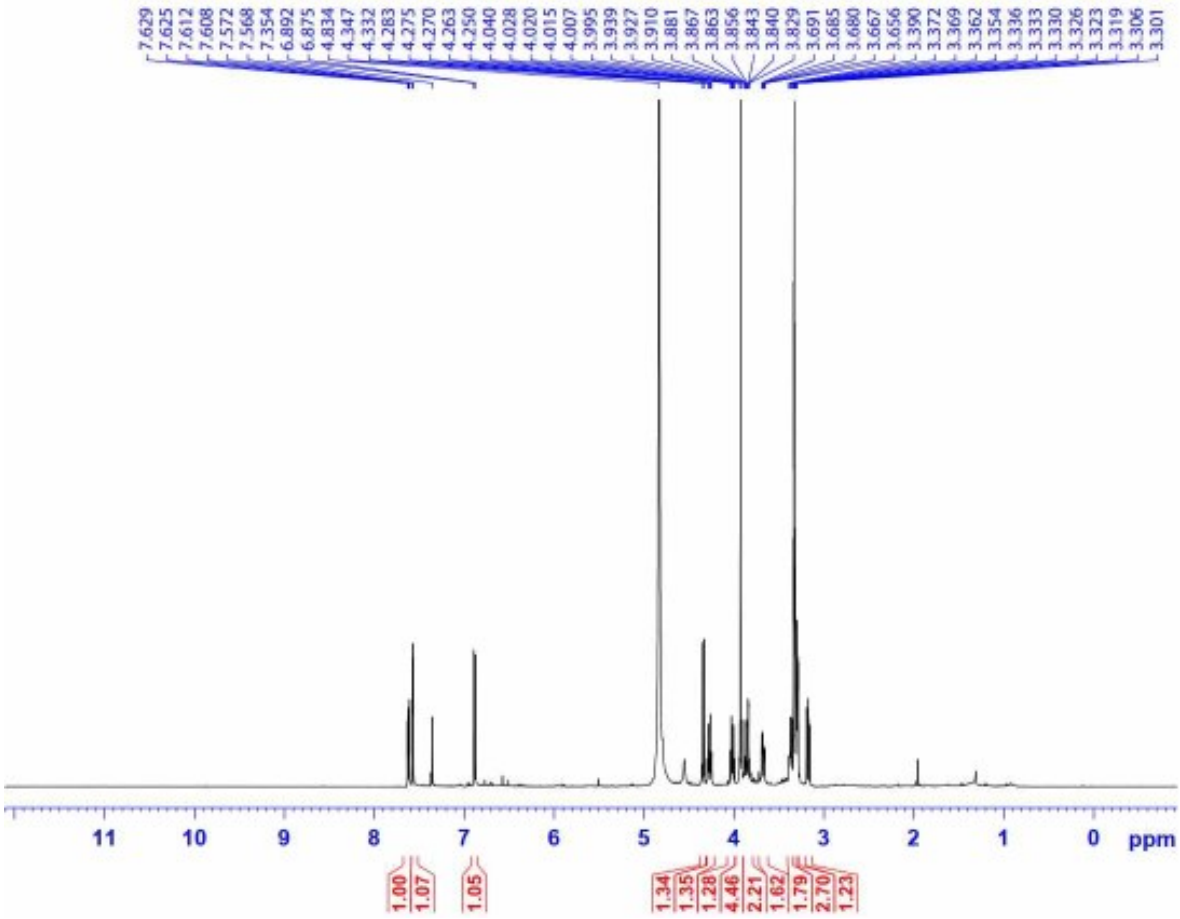


Phụ lục 3.21.9. Sắc ký đồ của hợp chất HL12 phân tích bằng HPLC

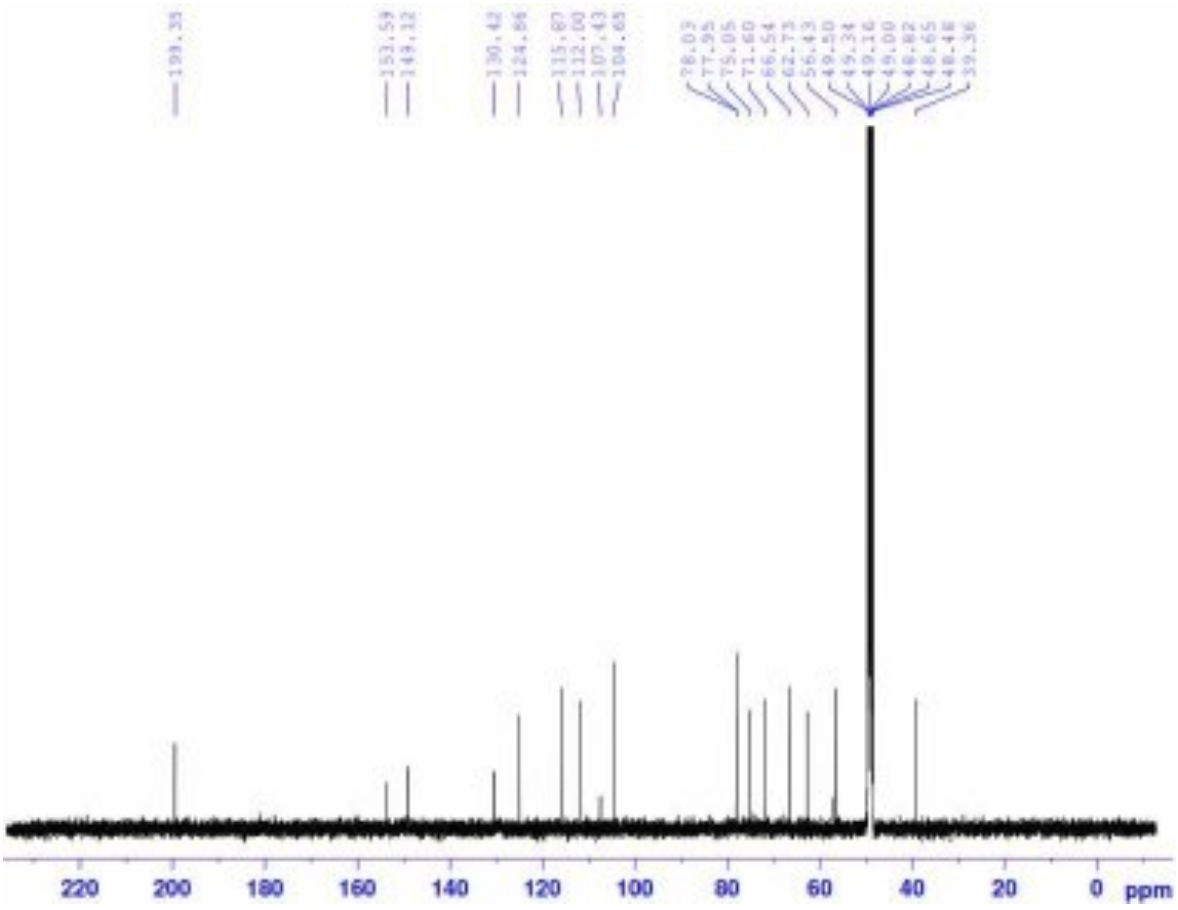
Phụ lục 3.22. Phổ HR-MS và NMR của hợp chất HL13: *β*-Hydroxypropiovanillone 3-*O*-*β*-D-glucopyranoside



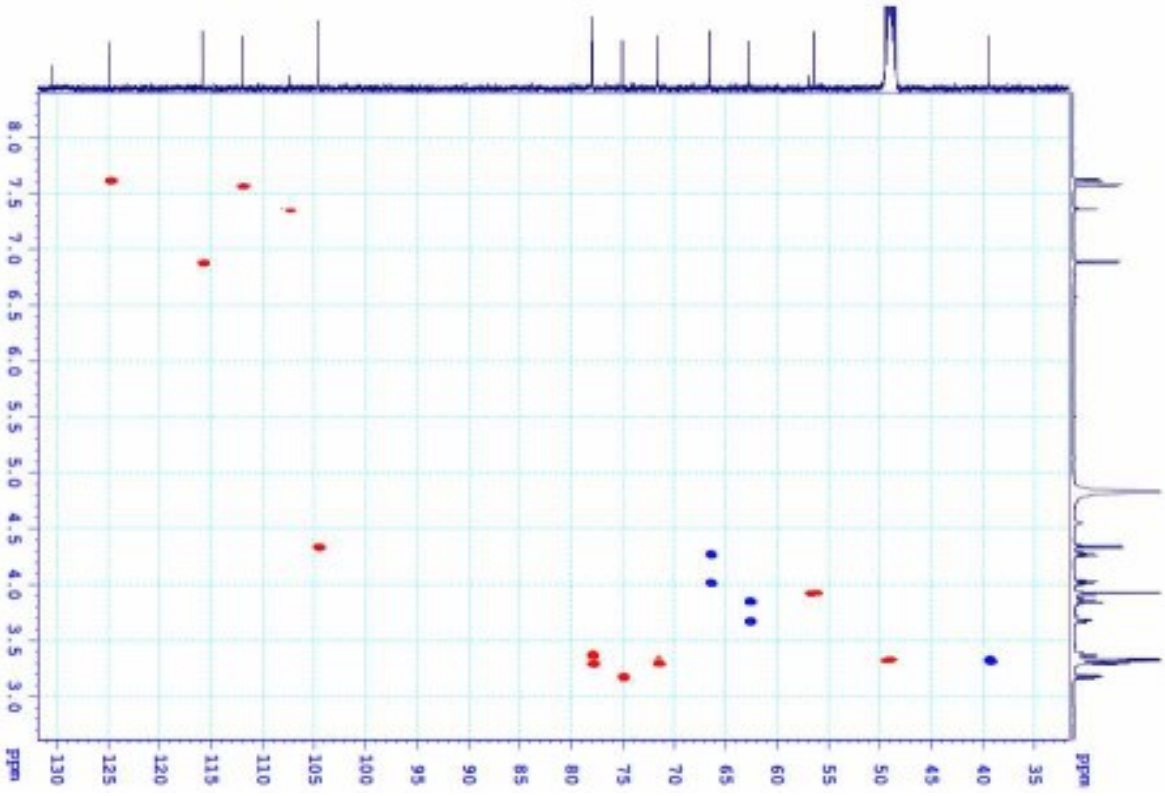
Phụ lục 3.22.1. Phổ HR-MS của hợp chất HL13



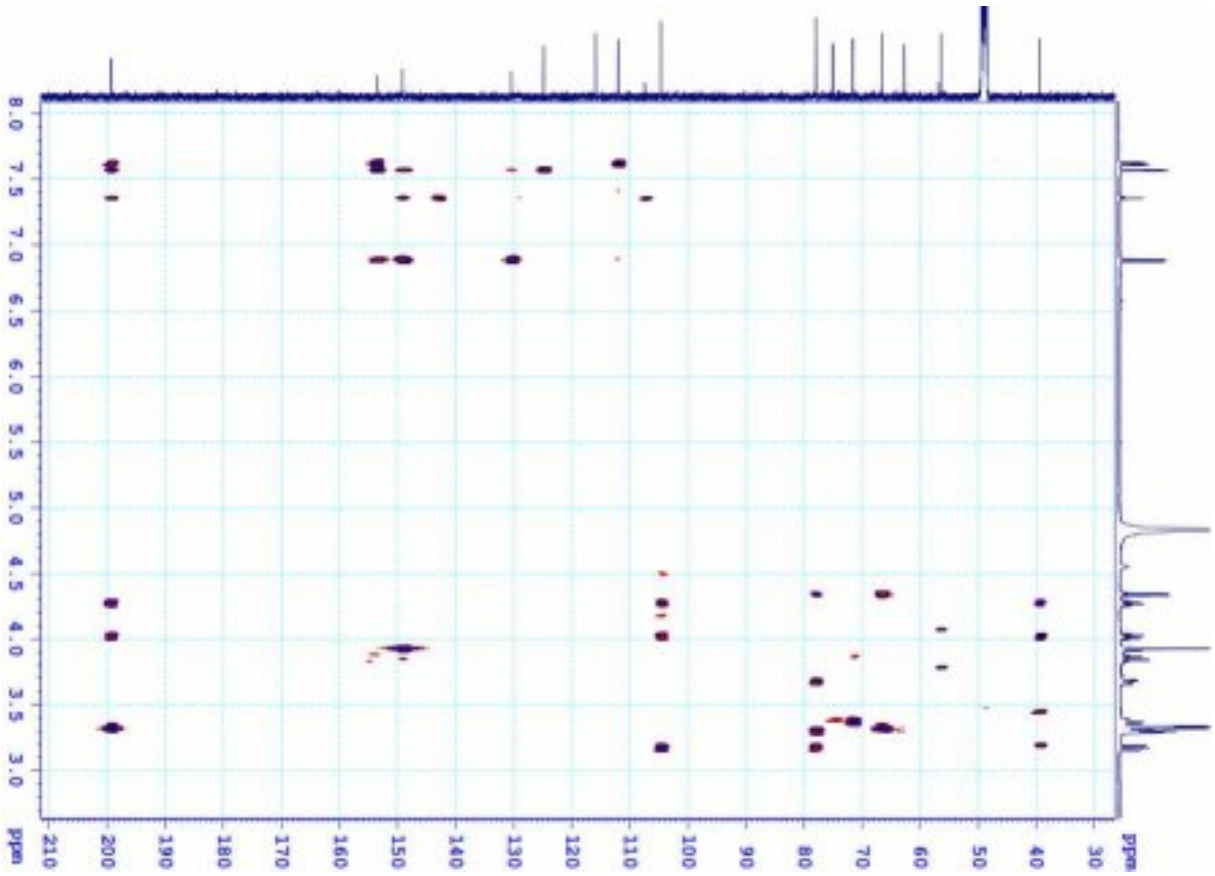
Phụ lục 3.22.3. Phổ ^{1}H-NMR của hợp chất HL13



Phụ lục 3.22.3. Phổ ^{13}C-NMR của hợp chất HL13

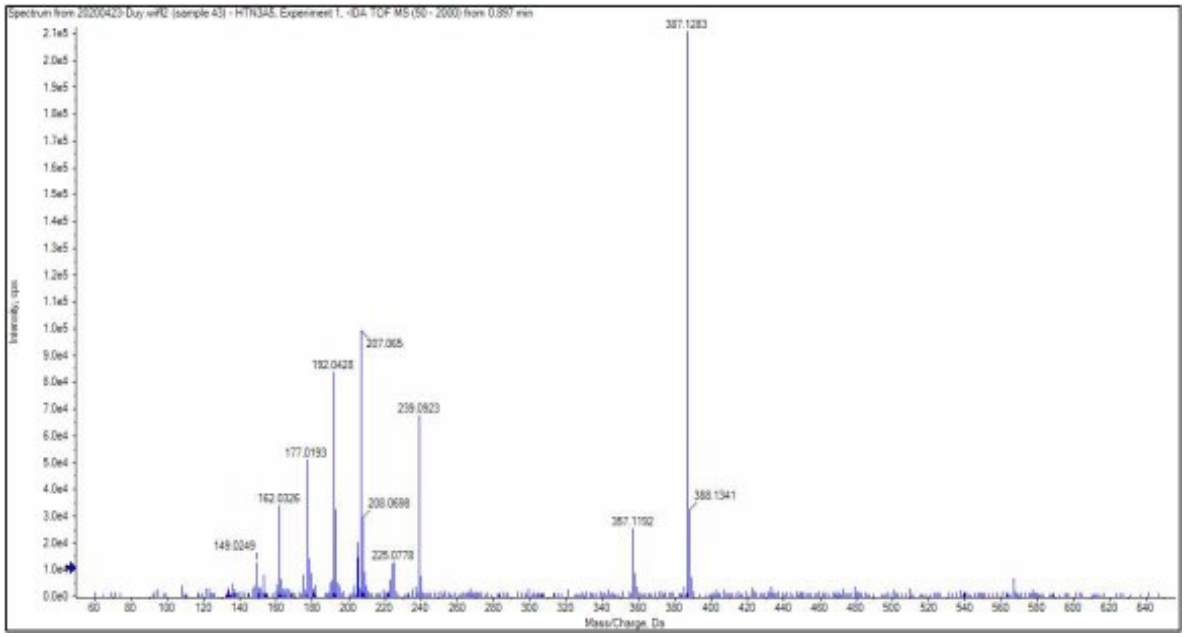


Phụ lục 3.22.4. Phổ HSQC của hợp chất HL13

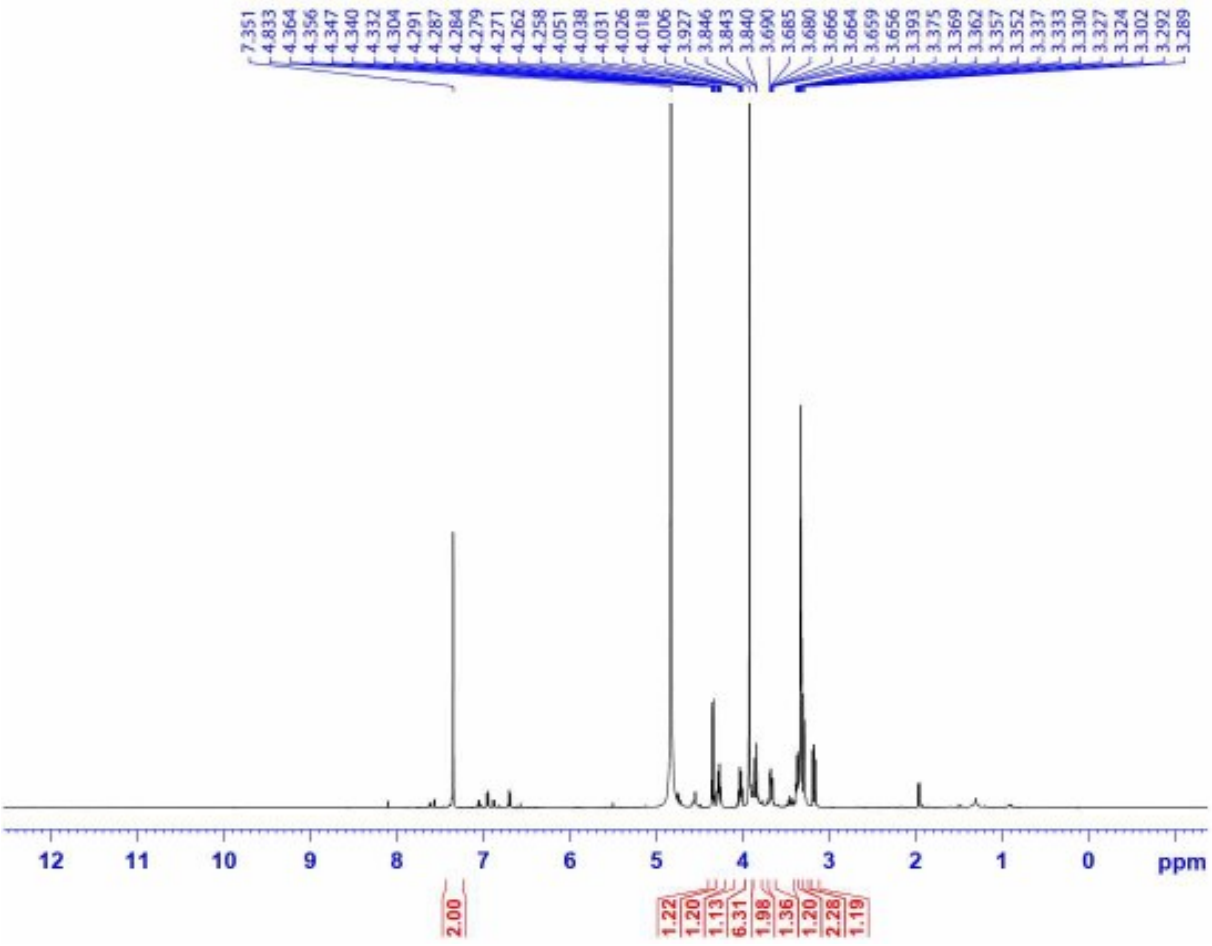


Phụ lục 3.22.5. Phổ HMBC của hợp chất HL13

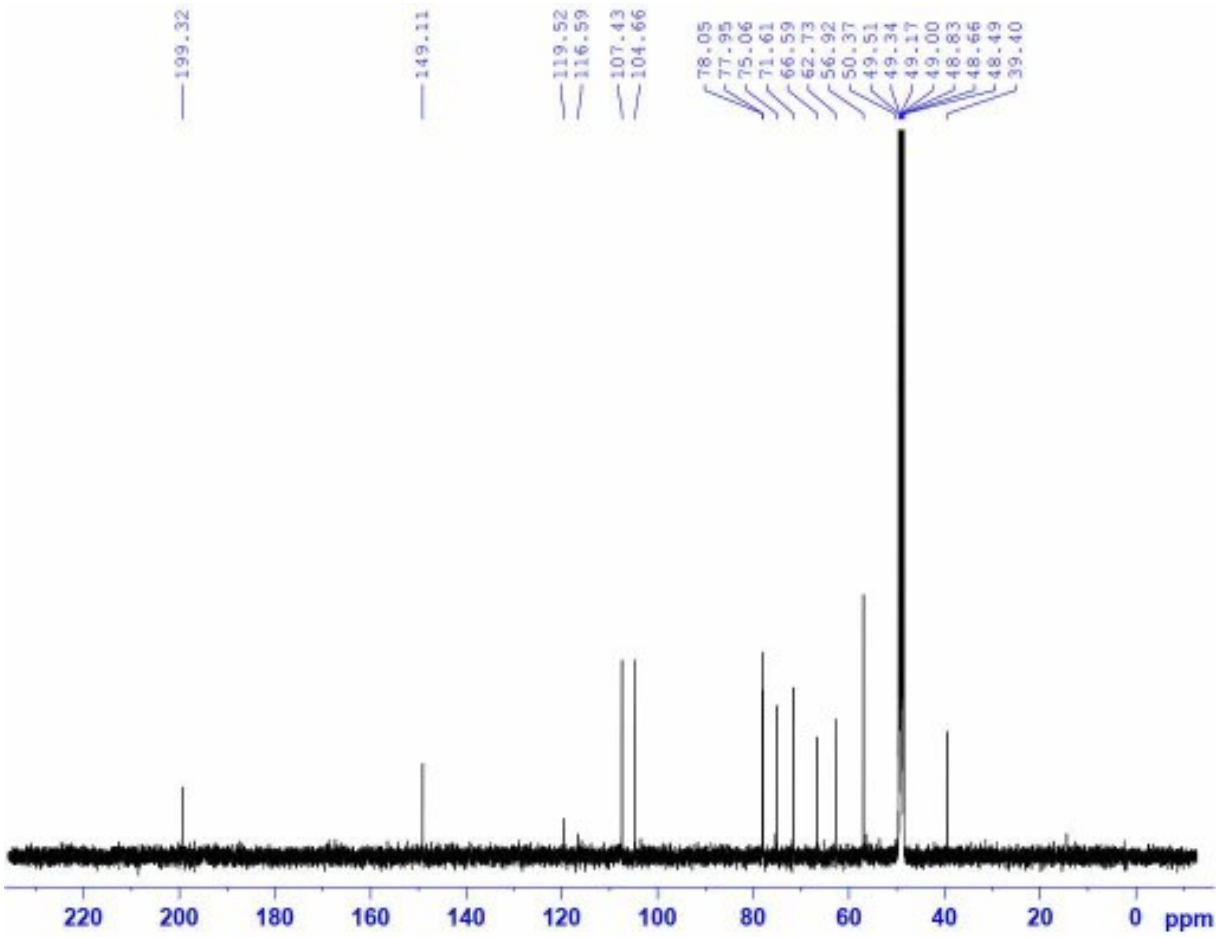
Phụ lục 3.23. Phổ HR-MS và NMR của hợp chất HL14: 3′,5′-Dimethoxy-3,4′-dihydroxypropiophenone 3-*O*-*β*-D-glucoside



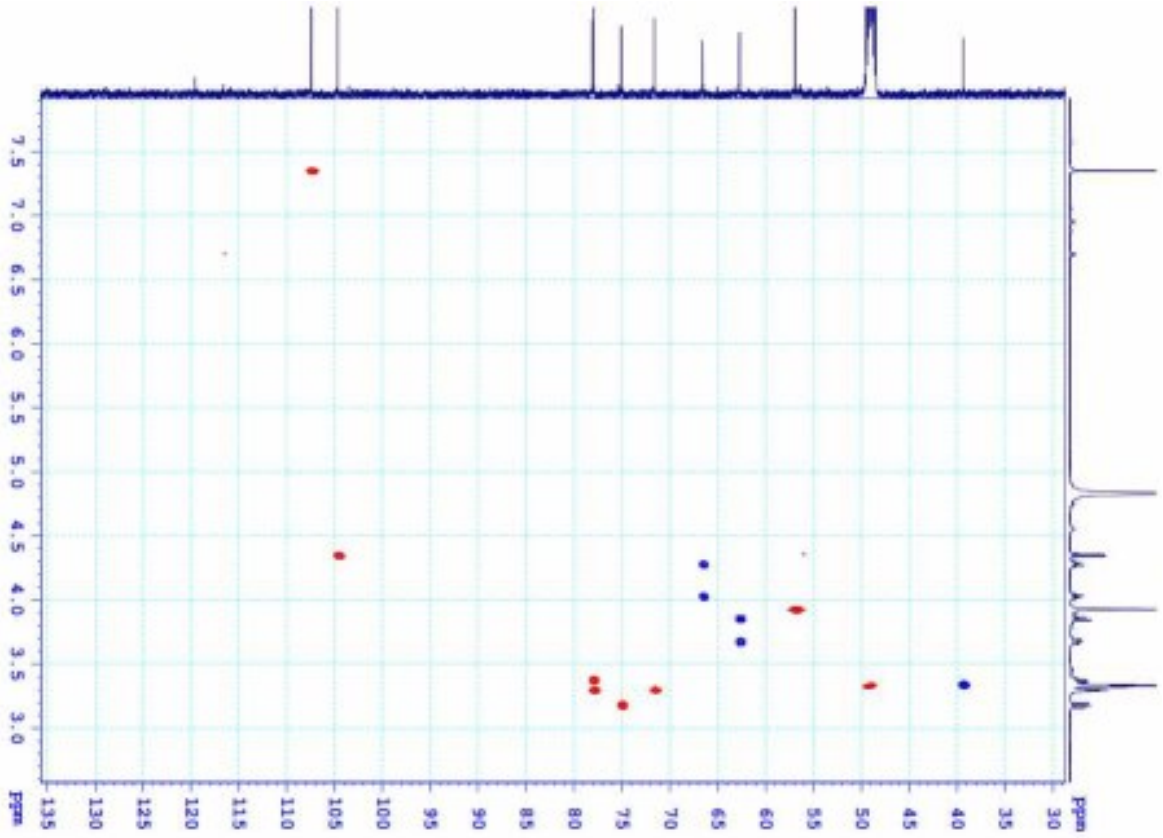
Phụ lục 3.23.1. Phổ HR-MS của hợp chất HL14



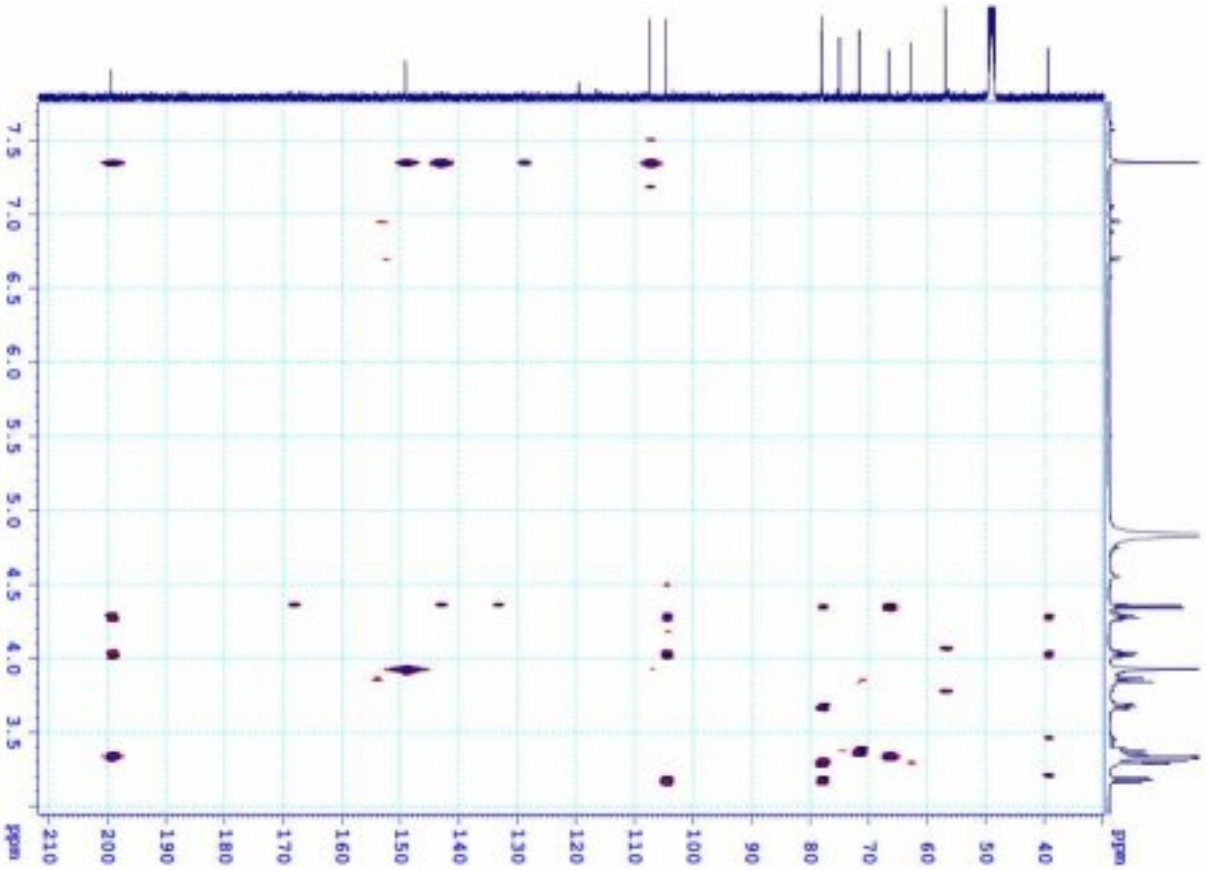
Phụ lục 3.23.2. Phổ ^{1}H-NMR của hợp chất HL14



Phụ lục 3.23.3. Phổ ^{13}C-NMR của hợp chất HL14



Phụ lục 3.23.4. Phổ HSQC của hợp chất HL14



Phụ lục 3.23.5. Phổ HMBC của hợp chất HL14

PHỤ LỤC 4. MỘT SỐ KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Phụ lục 4.1. Kết quả chống oxy hóa của hợp chất 3,5-Dimethoxy-4-hydroxy-1-*β*-D-glucopyranoside trên mô hình *in vitro*

Mẫu thử nghiệm	IC_{50} (µg/ml)	
	Quét gốc tự do DPPH	Định lượng TBARs
HL11	6,07 ± 0,17	89,55 ± 8,26
Acid ascorbic	6,97 ± 0,45	-
Trolox	-	8,05 ± 0,62

Phụ lục 4.2. Đánh giá tác dụng ức chế yếu tố NO của hợp chất 3,5-Dimethoxy-4-hydroxy-1-*β*-D-glucopyranoside trên mô hình *in vitro*

Phương trình tương quan tuyến tính xác định hàm lượng nitrit như sau:

$$y = 0,0077x + 0,0477$$

Trong đó, x là nồng độ NO trong mẫu, y là mật độ quang đo được từ mẫu chuẩn.

Từ các giá trị độ hấp thụ của các giếng chứa mẫu nghiên cứu, tính toán được kết quả % ức chế NO của mẫu HL11 tại các nồng độ tương ứng như sau:.

Nồng độ thử (µg/ml)	HL11		L-NMMA	
	% tế bào sống	*% ức chế NO*	*% tế bào sống*	*% ức chế NO*
100	106,91	63,07	85,30	93,56
20	98,11	20,02	98,14	77,29
4	-	8,69	-	30,66
0,8	-	11,32	-	17,84
IC_{50} (µg/ml)	**-**	**76,49 ± 2,46**	**-**	**7,10 ± 0,68**

PHỤ LỤC 5: KẾT QUẢ GIÁM ĐỊNH THỰC VẬT CÁC MẪU NGHIÊN CỨU

TRƯỜNG ĐẠI HỌC DƯỢC HÀ NỘI
BỘ MÔN THỰC VẬT
*****

PHIẾU GIÁM ĐỊNH TÊN KHOA HỌC

Số: 48/2019

Người thu mẫu: Bùi Văn Trung
Người gửi mẫu: Bùi Văn Trung
Đơn vị: Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung Ương
Địa chỉ : 48 Hai Bà Trưng, Hoàn Kiếm, Hà Nội.
Ngày thu mẫu: 04/12/2019
Nơi thu mẫu: Bạch Thông, Bắc Kạn
Tên địa phương: Mừ phi (Tày), Bàn tay ma "trắng"
Mô tả mẫu: Mẫu gồm thân mang lá (mẫu Bàn tay ma trắng M1)

Kết quả giám định: *Căn cứ vào các tài liệu thực vật hiện có tại Trường Đại học Dược Hà Nội với các đặc điểm của các bộ phận mẫu cây, đã xác định mẫu trên có:*

- Tên khoa học: *Heliciopsis terminalis* (Kurz) Sleumer
- Họ: Proteaceae
- Tên thường gọi: Song quần chót. Đìa chụn dính, Bàn tay ma trắng

Hà Nội, ngày 06 tháng 12 năm 2019

Trưởng bộ môn	**Người giám định**
TS. Hoàng Quỳnh Hoa	**ThS. Nghiêm Đức Trọng**

Tài liệu tham khảo

1. Phạm Hoàng Hộ (2003), *Cây cỏ Việt Nam*, NXB Trẻ, Tập 2
2. Busban Na Songkhla (1987) Proteaceae, In: Thawatchai Santisuk, Kai Larsen (eds), *Flora of Thailand, Volume Five, Part One*, The Forest Herbarium, National Park, Wildlife and Plant Conservation Deparment, Bangkok
3. Huaxing Qiu, Peter H. Weston (2003), Proteaceae, In: Wu, Z. Y., P. H. Raven & D. Y. Hong (eds), *Flora of China, Vol. 5 (Ulmaceae through Basellaceae)*, Science Press, Beijing, and Missouri Botanical Garden Press, St. Louis
4. Pham Hoang Hô (1992), Proteaceae, In: Ph. Morat (eds), *Flore du Cambodge, Laos et du Viêt-Nam. Volume 26, Rhoipteleaceae, Juglandaceae, Thymelaeaceae, Proteaceae*, Museum National D'Histoire Naturelle

TRƯỜNG ĐẠI HỌC DƯỢC HÀ NỘI
Xác nhận: Ts. Hoàng Quỳnh Hoa
Là: Trưởng Bộ Thực Vật của Trường
Có chữ ký đúng như ở Tên
Ngày 06 tháng 12 năm 2019
TL.HIỆU TRƯỞNG
TRƯỞNG PHÒNG TỔ CHỨC - HÀNH CHÍNH

TRƯỜNG ĐẠI HỌC DƯỢC HÀ NỘI

Lê Phan Tuấn

TRƯỜNG ĐẠI HỌC DƯỢC HÀ NỘI
BỘ MÔN THỰC VẬT

PHIẾU GIÁM ĐỊNH TÊN KHOA HỌC

Số: 49/2019

Người thu mẫu: Bùi Văn Trung
Người gửi mẫu: Bùi Văn Trung
Đơn vị: Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung Ương
Địa chỉ : 48 Hai Bà Trưng, Hoàn Kiếm, Hà Nội.
Ngày thu mẫu: 04/12/2019
Nơi thu mẫu: Bạch Thông, Bắc Kạn
Tên địa phương: Mừ phi (Tày), Bàn tay ma "đỏ"
Mô tả mẫu: Mẫu gồm thân mang lá (mẫu Bàn tay ma đỏ M1)

Kết quả giám định: *Căn cứ vào các tài liệu thực vật hiện có tại Trường Đại học Dược Hà Nội với các đặc điểm của các bộ phận mẫu cây, đã xác định mẫu trên có:*

- Tên khoa học: *Heliciopsis lobata* (Merr.) Sleumer
- Họ: Proteaceae
- Tên thường gọi: Song quản thùy, Địa chụn, Bàn tay ma đỏ

Hà Nội, ngày 06 tháng 12 năm 2019

Trưởng bộ môn	Người giám định
TS. Hoàng Quỳnh Hoa	ThS. Nghiêm Đức Trọng

Tài liệu tham khảo

1. Phạm Hoàng Hộ (2003), *Cây cỏ Việt Nam*, NXB Trẻ, Tập 2
2. Busban Na Songkhla (1987) Proteaceae, In: Thawatchai Santisuk, Kai Larsen (eds), *Flora of Thailand, Volume Five, Part One*, The Forest Herbarium, National Park, Wildlife and Plant Conservation Department, Bangkok
3. Huaxing Qiu, Peter H. Weston (2003), Proteaceae, In: Wu, Z. Y., P. H. Raven & D. Y. Hong (eds), *Flora of China, Vol. 5 (Ulmaceae through Basellaceae)*, Science Press, Beijing, and Missouri Botanical Garden Press, St. Louis
4. Pham Hoang Hô (1992), Proteaceae, In: Ph. Morat (eds), *Flore du Cambodge, Laos et du Viêt-Nam, Volume 26, Rhoipteleaceae, Juglandaceae, Thymelaeaceae, Proteaceae*, Muséum National D'Histoire Naturelle

TRƯỜNG ĐẠI HỌC DƯỢC HÀ NỘI
Xác nhận: T.S. Hoàng Quỳnh Hoa
Là: Trưởng Bộ môn Dược Liệu
Ngày 16 tháng 12 năm 2019
TL.HIỆU TRƯỞNG
TRƯỞNG PHÒNG TỔ CHỨC - HÀNH CHÍNH
TRƯỜNG ĐẠI HỌC DƯỢC HÀ NỘI
Lê Phan Tuấn

TRƯỜNG ĐẠI HỌC DƯỢC HÀ NỘI
BỘ MÔN THỰC VẬT

PHIẾU GIÁM ĐỊNH TÊN KHOA HỌC

Số: 79/2021

Người thu mẫu: Bùi Văn Trung
Người gửi mẫu: Bùi Văn Trung
Đơn vị: Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung Ương
Địa chỉ : 48 Hai Bà Trưng, Hoàn Kiếm, Hà Nội.
Ngày thu mẫu: 09/8/2021
Nơi thu mẫu: Bạch Thông, Bắc Kạn
Tên địa phương: Mừ phi (Tày), Bàn tay ma "trắng"
Mô tả mẫu: Mẫu gồm thân mang lá (mẫu Bàn tay ma trắng M2)

Kết quả giám định: *Căn cứ vào các tài liệu thực vật hiện có tại Trường Đại học Dược Hà Nội với các đặc điểm của các bộ phận mẫu cây, đã xác định mẫu trên có:*

- Tên khoa học: *Heliciopsis terminalis* (Kurz) Steumer
- Họ: Proteaceae
- Tên thường gọi: Song quản chót. Đia chụn đinh, Bàn tay ma trắng

Hà Nội, ngày 01 tháng 12 năm 2021

Trưởng bộ môn | **Người giám định**

TS. Hoàng Quỳnh Hoa | **ThS. Nghiêm Đức Trọng**

Tài liệu tham khảo

1. Phạm Hoàng Hộ (2003), *Cây cỏ Việt Nam*, NXB Trẻ, Tập 2
2. Busban Na Songkhla (1987) Proteaceae, In: Thawatchai Santisuk, Kai Larsen (eds), *Flora of Thailand, Volume Five, Part One*, The Forest Herbarium, National Park, Wildlife and Plant Conservation Deparment, Bangkok
3. Huaxing Qiu, Peter H. Weston (2003), Proteaceae, In: Wu. Z. Y., P. H. Raven & D. Y. Hong (eds), *Flora of China, Vol. 5 (Ulmaceae through Basellaceae)*, Science Press, Beijing, and Missouri Botanical Garden Press, St. Louis
4. Phạm Hoàng Hộ (1992), Proteaceae, In: Ph. Morat (eds), *Flore du Cambodge, Laos et du Viêt-Nam, Volume 26*, Proteaceae, Muséum National D'Histoire Naturelle

TRƯỜNG ĐẠI HỌC DƯỢC HÀ NỘI
Xác nhận TS. Hoàng Quỳnh Hoa
Là: Phó trưởng khoa DL - ĐHCT của Trường
có chữ ký đúng như ở trên
Ngày 1 tháng 12 năm 2021
TL.HIỆU TRƯỞNG
TRƯỞNG PHÒNG TỔ CHỨC - HÀNH CHÍNH

TRƯỜNG ĐẠI HỌC DƯỢC HÀ NỘI

Lê Phan Tuấn

TRƯỜNG ĐẠI HỌC DƯỢC HÀ NỘI
BỘ MÔN THỰC VẬT
*****

PHIẾU GIÁM ĐỊNH TÊN KHOA HỌC

Số: 80/2021

Người thu mẫu: Bùi Văn Trung
Người gửi mẫu: Bùi Văn Trung
Đơn vị: Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung Ương
Địa chỉ : 48 Hai Bà Trưng, Hoàn Kiếm, Hà Nội.
Ngày thu mẫu: 09/8/2021
Nơi thu mẫu: Bạch Thông, Bắc Kạn
Tên địa phương: Mừ phi (Tày), Bàn tay ma "đỏ"
Mô tả mẫu: Mẫu gồm thân mang lá (mẫu Bàn tay ma đỏ M2)

Kết quả giám định: *Căn cứ vào các tài liệu thực vật hiện có tại Trường Đại học Dược Hà Nội với các đặc điểm của các bộ phận mẫu cây, đã xác định mẫu trên có:*

- Tên khoa học: *Heliciopsis lobata* (Merr.) Sleumer
- Họ: Proteaceae
- Tên thường gọi: Song quắn thùy, Đìa chụn, Bàn tay ma đỏ

Hà Nội, ngày 01 tháng 12 năm 2021

Trưởng bộ môn	**Người giám định**
TS. Hoàng Quỳnh Hoa	**ThS. Nghiêm Đức Trọng**

Tài liệu tham khảo

1. Phạm Hoàng Hộ (2003), *Cây cỏ Việt Nam*, NXB Trẻ, Tập 2
2. Busban Na Songkhla (1987) Proteaceae, In: Thawatchai Santisuk, Kai Larsen (eds), *Flora of Thailand, Volume Five, Part One*, The Forest Herbarium, National Park, Wildlife and Plant Conservation Deparment, Bangkok
3. Huaxing Qiu, Peter H. Weston (2003), Proteaceae, In: Wu, Z. Y., P. H. Raven & D. Y. Hong (eds), *Flora of China, Vol. 5 (Ulmaceae through Basellaceae)*, Science Press, Beijing, and Missouri Botanical Garden Press, St. Louis
4. Pham Hoang Hô (1992), Proteaceae, In: Ph. Morat (eds), *Flore du Cambodge, Laos et du Viêt-Nam, Volume 26, Rhoipteleaceae, Juglandaceae, [illegible]* National D'Histoire Naturelle

TRƯỜNG ĐẠI HỌC DƯỢC HÀ NỘI
Xác nhận: TS. Hoàng Quỳnh Hoa
Là: Phó trưởng khoa Dr. DHQ I của Trường có chữ ký đúng nhìn ở trên.....
Ngày 01 tháng 12 năm 2021
TL.HIỆU TRƯỞNG
TRƯỞNG PHÒNG TỔ CHỨC - HÀNH CHÍNH

TRƯỜNG ĐẠI HỌC DƯỢC HÀ NỘI

Phan Tuấn