

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC  
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



PHẠM QUANG DƯƠNG

NGHIÊN CỨU QUÁ TRÌNH TÁCH CHIẾT MỘT SỐ  
HỢP CHẤT PHENOLIC TỪ BA LOÀI ĐẠI HOÀNG (*RHEUM  
TANGUTICUM* MAXIM. EX BALF), LƯỖI BÒ (*RUMEX  
TRISÉTIFER* STOKES), MUÔNG TRÂU (*SENNÁ ALATA* (L.)  
ROXB.), HOẠT TÍNH KHÁNG VI SINH VẬT GÂY BỆNH  
THỰC VẬT.

LUẬN ÁN TIẾN SĨ KỸ THUẬT HÓA HỌC

Hà Nội – 2024

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC  
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ

PHẠM QUANG DƯƠNG

NGHIÊN CỨU QUÁ TRÌNH TÁCH CHIẾT MỘT SỐ  
HỢP CHẤT PHENOLIC TỪ BA LOÀI ĐẠI HOÀNG (*RHEUM  
TANGUTICUM* MAXIM. EX BALF), LƯỖI BÒ (*RUMEX  
TRISÉTIFER* STOKES), MUÔNG TRÂU (*SENNÁ ALATA* (L.)  
ROXB.), HOẠT TÍNH KHÁNG VI SINH VẬT GÂY BỆNH  
THỰC VẬT.

LUẬN ÁN TIẾN SĨ KỸ THUẬT HÓA HỌC

Chuyên ngành: Kỹ thuật Hóa học

Mã số: 9.52.03.01

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:

- PGS.TS. Vũ Đình Hoàng
- PGS.TS. Lê Đăng Quang

Hà Nội – 2024

## **LỜI CAM ĐOAN**

Tôi xin cam đoan:

Đây là công trình nghiên cứu của riêng tôi dưới sự hướng dẫn khoa học của PGS. TS Vũ Đình Hoàng và PGS. TS Lê Đăng Quang. Các số liệu và kết quả thu được trong luận án là hoàn toàn trung thực và chưa được công bố trong bất kỳ công trình nào khác.

Tác giả luận án

Phạm Quang Dương

**LỜI CẢM ƠN**

*Luận án này được hoàn thành tại Viện Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.*

*Tôi xin bày tỏ lời cảm ơn chân thành và sâu sắc, sự cảm phục và kính trọng tới PGS.TS. Vũ Đình Hoàng và PGS.TS. Lê Đăng Quang là những người thầy đã hướng dẫn tận tình và tạo mọi điều kiện giúp đỡ tôi trong thời gian thực hiện luận án.*

*Tôi xin trân trọng cảm ơn sự quan tâm giúp đỡ của Ban lãnh đạo Viện Hóa học, Học viện Khoa học và Công nghệ - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã tạo điều kiện để tôi hoàn thành luận án.*

*Tôi cũng xin bày tỏ lòng biết ơn tới tập thể cán bộ Phòng Công nghệ các chất có hoạt tính sinh học-Viện Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, Trung tâm Nghiên cứu Triển khai các Hoạt chất Sinh học-Viện Hóa học công nghiệp Việt Nam đã giúp đỡ tôi nhiệt tình trong suốt thời gian thực hiện luận án.*

*Cuối cùng, tôi cũng bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc đến gia đình, bạn bè, và người thân đã giúp đỡ, động viên tôi trong suốt thời gian học tập và thời gian làm luận án.*

*Tôi xin trân trọng cảm ơn!*

Hà nội, ngày tháng năm

Tác giả luận án

Phạm Quang Dương

## MỤC LỤC

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ VIẾT TẮT .....	x
DANH MỤC CÁC PHỤ LỤC .....	xix
MỞ ĐẦU.....	xxi
CHƯƠNG 1.TỔNG QUAN .....	1
1.1. Các nghiên cứu về cây đại hoàng <i>Rheum tanguticum</i> Maxim. ex Balf. ....	1
1.1.1. Giới thiệu về chi <i>Rheum</i> và cây đại hoàng <i>Rheum tanguticum</i> Maxim. ex Balf .....	1
1.1.2.1. Nghiên cứu về thành phần hóa học của cây đại hoàng trên thế giới.....	1
1.1.2.2. Hoạt tính sinh học cây đại hoàng ( <i>R. tanguticum</i> ) trên thế giới.....	8
1.1.2.2.1 Hoạt tính kháng vi sinh vật của các chất phân lập được và cao chiết từ cây đại hoàng. ....	8
1.1.2.2.2. Hoạt tính sinh học khác.....	9
1.2. Các nghiên cứu về chi <i>Rumex</i> .....	9
1.2.1 Giới thiệu về chi <i>Rumex</i> và cây <i>Rumex trisetifer</i> Stokes .....	9
1.2.2. Nghiên cứu về thành phần hóa học, hoạt tính sinh học của chi <i>Rumex</i> trên thế giới .....	10
1.2.2.1. Một số kết quả nghiên cứu về thành phần hóa học của các loài thuộc chi <i>Rumex</i> .....	10
1.2.2.2. Hoạt tính kháng vi sinh vật của các chất phân lập được và cao chiết từ cây lười bò trên thế giới.....	18
1.2.2.2.1. Hoạt tính kháng nấm.....	18
1.2.2.2.2. Hoạt tính kháng vi khuẩn.....	19
1.3. Các nghiên cứu về cây muồng trâu <i>Senna alata</i> (L.) Roxb.....	20
1.3.1. Giới thiệu về chi <i>Cassia</i> và cây muồng trâu <i>Senna alata</i> (L.) Roxb .....	20
1.3.2. Nghiên cứu về thành phần hóa học, hoạt tính sinh học cây muồng trâu trên thế giới .....	21
1.3.2.1. Nghiên cứu về thành phần hóa học của cây muồng trâu trên thế giới .....	21

1.3.2.2. Hoạt tính kháng vi sinh vật của các chất phân lập được và cao chiết từ cây muồng trâu trên thế giới.....	22
1.3.2.2.1. Hoạt tính kháng nấm.....	22
1.3.2.2.2. Hoạt tính kháng vi khuẩn.....	23
<b>1.4. Phương pháp bề mặt đáp ứng .....</b>	<b>27</b>
<b>1.5. Thuốc bảo vệ thực vật nguồn gốc thảo mộc .....</b>	<b>29</b>
<b>CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU .....</b>	<b>33</b>
<b>2.1 Đối tượng nghiên cứu .....</b>	<b>33</b>
2.1.1. Cây đại hoàng - <i>R. tanguticum</i> .....	33
2.1.2. Cây lưỡi bò – <i>R. trisetifer</i> .....	33
2.1.3. Cây muồng trâu – <i>S. alata</i> .....	33
<b>2.2. Phương pháp nghiên cứu .....</b>	<b>34</b>
2.2.1. Phương pháp xử lý, chiết xuất và phân lập các thành phần hóa học .....	34
2.2.2. Phương pháp xác định tính chất hóa lý và cấu trúc hóa học.....	34
2.2.3. Phương pháp đánh giá hoạt tính sinh học .....	34
2.2.3.1. Phương pháp đánh giá hoạt tính kháng nấm hại cây trồng.....	34
2.2.3.1.a. Phương pháp đánh giá hoạt tính in vivo kháng nấm hại cây trồng trong nhà lưới.....	34
2.2.3.1.b. Phương pháp đánh giá hoạt tính in vitro kháng nấm hại cây trồng trong phòng thí nghiệm.....	36
2.2.3.2. Phương pháp đánh giá hoạt tính kháng vi khuẩn hại cây trồng.....	37
2.2.3.2.a. Phương pháp đánh giá hoạt tính in vivo kháng vi khuẩn hại cây trồng trong phòng nhà kính.....	37
2.2.3.2.b. Phương pháp đánh giá hoạt tính in vitro kháng vi khuẩn hại cây trồng trong phòng thí nghiệm .....	38
2.2.4. Phương pháp quy hoạch thực nghiệm và tối ưu hóa quy trình công nghệ...	39
<b>CHƯƠNG 3. THỰC NGHIỆM.....</b>	<b>42</b>
<b>3.1. Phân lập các chất từ cây đại hoàng – <i>R. tanguticum</i>. .....</b>	<b>42</b>

3.1.1. Ngâm chiết và làm giàu cao chiết để phân lập các hoạt chất có trong cao chiết từ cây đại hoàng – <i>R. tanguticum</i> .....	42
3.1.2. Phân lập các chất từ cây đại hoàng – <i>R. tanguticum</i> .....	43
3.1.2.1. Phân lập các chất từ cặn dichloromethane của cây đại hoàng – <i>R. tanguticum</i> .....	43
3.1.2.2. Phân lập các chất từ cặn ethyl acetate của cây đại hoàng – <i>R. tanguticum</i> .....	44
3.2. Phân lập các chất từ cây lười bò <i>R. trisetifer</i> .....	45
3.2.1. Ngâm chiết thu cao chất để phân lập các hoạt chất từ cây lười bò <i>R. trisetifer</i> .....	45
3.2.2. Phân lập các chất từ cây lười bò <i>R. trisetifer</i> .....	45
3.2.2.1. Phân lập các chất từ cặn n-hexane của cây lười bò <i>R. trisetifer</i> .....	45
3.2.2.2. Phân lập các chất từ cặn ethyl acetate của cây lười bò <i>R. trisetifer</i> .....	46
3.3. Phân lập các chất từ cây muồng trâu <i>S. alata</i> .....	46
3.3.1. Ngâm chiết và làm giàu cao chiết .....	46
3.3.2. Phân lập các chất .....	47
3.3.2.1. Phân lập chất SA1 .....	47
3.3.2.2. Phân lập chất SA5 và SA2 .....	48
3.3.2.3. Phân lập chất SA3 .....	48
3.3.2.4. Phân lập chất SA4 .....	48
3.3.2.5. Phân lập chất SA7, SA6 và SA8 .....	49
<b>CHƯƠNG 4. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN</b> .....	<b>53</b>
4.1. Cấu trúc các chất phân lập được từ cây đại hoàng – <i>R. tanguticum</i> .....	53
4.1.1. Hợp chất DH1 ( <i>chrysophanol</i> ) .....	53
4.1.2. Hợp chất DH2 ( <i>physcion</i> ) .....	54
4.1.3. Hợp chất DH3 ( <i>emodin</i> ) .....	56
4.1.4. Hợp chất DH4 ( <i>alo-emodin</i> ) .....	57
4.1.5. Hợp chất DH5 ( <i>rhapotigenin</i> ) .....	58
4.1.6. Hợp chất DH6 ( <i>deoxyrhapotigenin</i> ) .....	59

4.1.7. Hợp chất DH7 ( <i>rhaponticin</i> và <i>isorhapontin</i> ) .....	61
<b>4.2. Cấu trúc các chất phân lập được từ cây lười bò <i>R. trisetifer</i> .....</b>	<b>65</b>
4.2.1. Hợp chất RT1 ( <i>chrysophanol</i> ) .....	65
4.2.2. Hợp chất RT2 ( <i>physcion</i> ) .....	65
4.2.3. Hợp chất RT3 ( <i>emodin</i> ) .....	65
4.2.4. Hợp chất RT4 ( <i>emodin-8-O-<math>\beta</math>-D-glucoside</i> ) .....	66
4.2.5. Hợp chất RT5 ( <i>chrysophanol -8-O-<math>\beta</math>-D-glucoside</i> và <i>physcion -8-O-<math>\beta</math>-D-glucoside</i> ) .....	67
4.2.6. Hợp chất RT6 ( <i><math>\beta</math>-sitosterol</i> ) .....	70
4.2.7. Hợp chất RT7 ( <i>daucosterol</i> ) .....	70
<b>4.3. Cấu trúc các chất phân lập được từ cây muồng trâu <i>Senna alata</i> .....</b>	<b>71</b>
4.3.1. Hợp chất SA1 ( <i>methyl 2,4,6-trihydroxybenzoate</i> ) .....	71
4.3.2. Hợp chất SA2 ( <i>kaempferol</i> ) .....	72
4.3.3. Hợp chất SA3 ( <i>(-)-epiafzelechin</i> ) .....	73
4.3.4. Hợp chất SA4 ( <i>rhein</i> ) .....	75
4.3.5. Hợp chất SA5 ( <i>aloe-emodin</i> ) .....	76
4.3.6. Hợp chất SA6 ( <i>aloe-emodin-8-O-glucoside</i> ) .....	76
4.3.7. Hợp chất SA7 ( <i>kaempferol-3-O-glucoside</i> ) .....	78
4.3.8. Hợp chất SA8 ( <i>kaempferol-3-O-gentiobioside</i> ) .....	80
<b>4.4. Đánh giá hoạt tính kháng vi sinh vật của cao chiết và các hợp chất phân lập ...</b>	<b>83</b>
4.4.1. <b>Đánh giá hoạt tính sinh học của cao chiết và các hợp chất phân lập được từ nguyên liệu đại hoàng– <i>R. tanguticum</i> .....</b>	<b>83</b>
4.4.1.1. <b>Hoạt tính kháng nấm hại cây trồng trong nhà lưới của các cao chiết và các hợp chất từ nguyên liệu đại hoàng– <i>R. tanguticum</i> .....</b>	<b>83</b>
4.4.1.1.a. <b>Hoạt tính <i>in vivo</i> kháng nấm của các cao chiết từ nguyên liệu đại hoàng– <i>R. tanguticum</i> .....</b>	<b>83</b>
4.4.1.1.b. <b>Hoạt tính <i>in vivo</i> kháng nấm của các hợp chất anthraquinone từ nguyên liệu đại hoàng– <i>R. tanguticum</i> .....</b>	<b>85</b>



4.4.1.1.c. Hoạt tính <i>in vitro</i> kháng nấm của các hợp chất anthraquinone từ nguyên liệu đại hoàng– <i>R. tanguticum</i> .....	86
4.4.1.2. Hoạt tính <i>in vitro</i> kháng vi khuẩn hại cây trồng trong phòng thí nghiệm của các cao chiết và các hợp chất được phân lập từ nguyên liệu đại hoàng– <i>R. tanguticum</i> .....	87
<b>4.4.2. Đánh giá hoạt tính của các cao chiết và các hợp chất từ nguyên liệu lõi bò - <i>R. trisetifer</i>.....</b>	<b>89</b>
4.4.2.1. Hoạt tính kháng nấm hại cây trồng trong nhà lưới của các cao chiết và các hợp chất từ nguyên liệu lõi bò - <i>R. trisetifer</i> .....	89
4.4.2.2. Hoạt tính kháng vi khuẩn hại cây trồng của các cao chiết và các hợp chất được phân lập từ nguyên liệu lõi bò - <i>R. trisetifer</i> .....	92
4.4.2.2.a. Hoạt tính <i>in vitro</i> kháng vi khuẩn hại cây trồng trong phòng thí nghiệm của các cao chiết từ nguyên liệu lõi bò - <i>R. trisetifer</i> .....	93
4.4.2.2.b. Hoạt tính <i>in vitro</i> kháng vi khuẩn hại cây trồng trong phòng thí nghiệm của các hợp chất được phân lập từ nguyên liệu lõi bò - <i>R. trisetifer</i> .....	93
4.4.2.2.c. Hoạt tính <i>in vivo</i> kháng vi khuẩn hại cây trồng trong nhà kính của cặn n-hexane từ nguyên liệu lõi bò - <i>R. trisetifer</i> .....	93
<b>4.4.3. Đánh giá hoạt tính của các cao chiết và các hợp chất từ nguyên liệu muồng trâu- <i>S. alata</i>.....</b>	<b>95</b>
4.4.3.1. Hoạt tính kháng nấm hại cây trồng trong nhà lưới của các cao chiết và các hợp chất từ nguyên liệu muồng trâu- <i>S. alata</i> .....	95
4.4.3.1.a. Hoạt tính <i>in vivo</i> kháng nấm hại cây trồng trong nhà lưới của các cao chiết từ nguyên liệu muồng trâu- <i>S. alata</i> .....	95
4.4.3.1.b. Hoạt tính <i>in vivo</i> kháng nấm hại cây trồng trong nhà lưới của các hợp chất từ nguyên liệu muồng trâu- <i>S. alata</i> .....	98
4.4.3.1.c. Hoạt tính <i>in vitro</i> kháng nấm hại cây trồng trong nhà lưới của ethyl acetate và các hợp chất từ nguyên liệu muồng trâu- <i>S. alata</i> .....	98

4.4.3.2. Hoạt tính <i>in vitro</i> kháng vi khuẩn hại cây trồng trong phòng thí nghiệm của các cao chiết và các hợp chất được phân lập từ nguyên liệu muồng trâu- <i>S. alata</i> .....	100
<b>4.5. Phân tích định lượng các hoạt chất bằng phương pháp HPLC.....</b>	<b>104</b>
4.5.1. Phân tích định lượng các hoạt chất trong cao chiết cây đại hoàng – <i>R. tanguticum</i> bằng phương pháp HPLC .....	104
4.5.2. Phân tích định lượng các hoạt chất trong cao chiết cây lười bò <i>R. trisetifer</i> bằng phương pháp HPLC .....	107
4.5.3. Phân tích định lượng các hoạt chất trong cao chiết muồng trâu <i>S. alata</i> bằng phương pháp HPLC .....	110
<b>4. 6. Nghiên cứu quy trình công nghệ tạo cao chiết từ mẫu thực vật .....</b>	<b>112</b>
4.6.1. Nghiên cứu quy trình công nghệ tạo cao chiết dichloromethane từ cây đại hoàng – <i>R. tanguticum</i> . .....	112
4.6.1.1. Khảo sát dung môi chiết.....	112
4.6.1.2. Khảo sát nhiệt độ chiết.....	113
4.6.1.3. Khảo sát thời gian chiết .....	114
4.6.1.4. Khảo sát tỉ lệ dung môi/nguyên liệu (mL/g).....	115
4.6.1.5. Tối ưu hóa các điều kiện công nghệ tạo cao chiết dichloromethane đại hoàng theo quy hoạch thực nghiệm.....	116
4.6.1.6. Tối ưu hóa thực nghiệm.....	119
4.6.1.7. Kiểm tra lại mô hình tối ưu hóa ứng với các giá trị của thông số tại điểm tối ưu.....	120
4.6.1.8. Thuyết minh quy trình công nghệ tạo cao chiết dichloromethane cây đại hoàng – <i>R. tanguticum</i> .....	120
4.6.2. Quy trình công nghệ tạo cao chiết dichloromethane cây đại hoàng – <i>R. tanguticum</i> .....	122
4.6.3. Nghiên cứu quy trình công nghệ tạo cao chiết ethyl acetate từ cây muồng trâu <i>S. alata</i> .....	123
4.6.3.1. Khảo sát dung môi chiết.....	123

4.6.3.2. Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ chiết.....	123
4.6.3.3. Khảo sát ảnh hưởng của thời gian chiết .....	124
4.6.3.4. Khảo sát ảnh hưởng của tỉ lệ dung môi/ nguyên liệu.....	125
4.6.3.5. Tối ưu hóa các điều kiện công nghệ tạo cao chiết MeOH muông trâu theo quy hoạch thực nghiệm.....	126
4.6.3.6. Tối ưu hóa thực nghiệm.....	130
4.6.3.7. Kiểm tra lại mô hình tối ưu hóa ứng với các giá trị của thông số tại điểm tối ưu.....	131
4.6.3.8. Thuyết minh quy trình công nghệ tạo cao chiết ethyl acetate cây muông trâu <i>S.alata</i> .....	131
<b>4.6.4. Quy trình công nghệ tạo cao chiết ethyl acetate cây muông trâu <i>S.alata</i>...</b>	<b>132</b>
<b>KẾT LUẬN .....</b>	<b>132</b>
- Đề xuất quy trình công nghệ tạo cao chiết dichloromethane cây đại hoàng <i>R.tanguticum</i> .....	137
<b>KIẾN NGHỊ .....</b>	<b>137</b>
<b>I. PHỤ LỤC PHỔ .....</b>	<b>1</b>
<b>II. PHỤ LỤC HPLC .....</b>	<b>57</b>

### DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ VIẾT TẮT

AS	Anisaldehyde	Thuốc thử anisaldehyde
BPM	Barlery powdery mildew	Bệnh héo vàng trên lúa và khoai tây
BVTV		Bảo vệ thực vật
CAM	Ceric Ammonium Molybdate	Thuốc thử Ceric Ammonium Molybdate
CC	Column chromatography	Sắc kí cột thường
CFU/ml	Colony forming units/ml	Số đơn vị khuẩn lạc trong 1 ml mẫu
CSB		Chỉ số bệnh
DCM	Dichloromethane	
DHH		Độ hữu hiệu
DMSO	Dimethyl sulfoxide	
EA	Ethylacetate	
ESI-MS	Electrospray ionization mass spectrometry	Phổ khối lượng ion hóa phun mù điện tử
FC	Flash chromatography	Sắc kí cột nhanh
HSSC		

HPLC	High performance liquid chromatography	Sắc kí lỏng hiệu năng cao
LAS	Linear Alkylbenzene Sulfonate	
UPLC- Triple- TOF/MS		
LH20	Sephadex LH20	
MeOH	Methanol	
MIC	Minimum inhibitory concentration	Nồng độ ức chế tối thiểu
NMR	Nuclear magnetic resonance	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân
PAN	Red pepper anthracnose	Bệnh thán thư trên cây ớt
PG	Propylene glycol	
RCB	Rice blast	Bệnh đạo ôn trên lúa
RSB	Rice sheath blight	Bệnh đốm vằn trên lúa
SLS	Sodium lauryl sunfat	
TGM	Tomato grey mould	Bệnh thối xám trên cà chua
TLB	Tomato late blight	Bệnh mốc sương trên cà chua
TMS	Tetramethylsilane	
WLR	Wheat leaf rust	Bệnh gỉ sắt trên lúa mì

## DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 1.1. Cơ cấu các loại thuốc BVTV trên thế giới và Việt Nam .....	31
Bảng 3.1. Hệ dung môi rửa giải trong tách cặn dichloromethane của cây đại hoàng .....	43
Bảng 3.2. Hệ dung môi rửa giải trong tách cặn n-hexane của cây lưỡi bò .....	45
Bảng 4.1. Dữ liệu phổ của hợp chất DH1 và chrysophanol .....	53
Bảng 4.2. Dữ liệu phổ của hợp chất DH2 và physcion .....	54
Bảng 4.3. Dữ liệu phổ của hợp chất DH3 và emodin.....	56
Bảng 4.4. Dữ liệu phổ của hợp chất DH4 và alo-emodin .....	57
Bảng 4.5. Dữ liệu phổ của hợp chất DH5 và rhapotigenin .....	58
Bảng 4.6. Dữ liệu phổ của hợp chất DH6 và deoxyrhapotigenin.....	60
Bảng 4.7. Dữ liệu phổ của hợp chất DH7 và chất tham khảo .....	62
Bảng 4.8. Dữ liệu phổ của hợp chất RT4 và emodin-8- <i>O</i> - $\beta$ -D-glucoside .....	66
Bảng 4.9. Dữ liệu phổ của hợp chất RT5 và chrysophanol -8- <i>O</i> - $\beta$ -D-glucoside và physcion -8- <i>O</i> - $\beta$ -D-glucoside .....	68
Bảng 4.10. Dữ liệu phổ của hợp chất SA1 và methyl 2,4,6-trihydroxybenzoate.....	71
Bảng 4.11. Dữ liệu phổ của hợp chất SA2 và kaempferol .....	72
Bảng 4.12. Dữ liệu phổ của hợp chất SA3 và (-)epiafzelechin .....	73
Bảng 4.13. Dữ liệu phổ của hợp chất SA4 và rhein .....	75
Bảng 4.14. Dữ liệu phổ của hợp chất SA6 và aloe-emodin-8- <i>O</i> -glucoside .....	77
Bảng 4.15. Dữ liệu phổ của hợp chất SA7 và kaempferol-3- <i>O</i> -glucoside.....	78
Bảng 4.16. Dữ liệu phổ của hợp chất SA8 và kaempferol-3- <i>O</i> -gentiobioside .....	80
Bảng 4.17. Hoạt tính sinh học của cao chiết dichloromethane và cao chiết ethyl acetate kháng lại 7 loại nấm gây hại cây trồng.....	84
Bảng 4.18. Hiệu quả các chế phẩm đối với một số loại nấm gây hại cây trồng trong điều kiện phòng thí nghiệm. ....	86

Bảng 4.19. Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC, $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) của các hợp chất có trong cây đại hoàng– <i>R. tanguticum</i> .....	87
Bảng 4.20. Khả năng ức chế của hợp chất DH3 (emodin) và cao chiết dichloromethane và ethyl acetate đối với chủng vi khuẩn Aac.....	88
Bảng 4.21. Hoạt tính sinh học <i>in vivo</i> của cao chiết methanol <i>R. trisetifer</i> , cao chiết n-hexane và cao chiết ethyl acetate kháng lại 7 loại nấm gây hại cây trồng .....	90
Bảng 4.22. Hiệu quả kiểm soát <i>in vivo</i> của căn n-hexane từ cây <i>R.chinesis</i> đối với vi khuẩn gây bệnh héo xanh. ....	93
Bảng 4.23. Kết quả thử hoạt tính kháng nấm của cao chiết ethyl acetate và cao n-hexane ở nồng độ 3000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ đối với 7 loại nấm .....	95
Bảng 4.24. Hoạt tính <i>in vitro</i> của dịch chiết ethyl acetate và các hợp chất phân lập từ cây muồng trâu- <i>S.alata</i> .....	99
Bảng 4.25. Nồng độ ức chế tối thiểu MIC ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) của cao dịch chiết và hợp chất kháng vi khuẩn .....	101
Bảng 4.26. Kết quả đánh giá khả năng kháng vi khuẩn <i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>cattlyae</i> gây bệnh đốm lá trên dưa hấu của cao chiết EA ở các nồng độ khác nhau. ....	102
Bảng 4.27. Kết quả đánh giá khả năng kháng vi khuẩn <i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>cattlyae</i> gây bệnh đốm lá trên dưa hấu của hợp chất SA4- rhein ở các nồng độ khác nhau.....	103
Bảng 4.28. Một số thông số về DH3, DH5, DH02, DH1, DH6.....	106
Bảng 4.29. Một số thông số về RT1, RT2, RT3, RT4, RT5a, RT5b .....	109
Bảng 4.30. Một số thông số về SA4 (rhein), SA5 (aloe emodin) và SA6 (aloe-emodin glucoside).....	111
Bảng 4.31. Ảnh hưởng của dung môi tới hiệu suất chiết .....	112
Bảng 4.32. Ảnh hưởng của nhiệt độ tới hiệu suất chiết .....	113
Bảng 4.33. Ảnh hưởng của thời gian tới hiệu suất chiết .....	114
Bảng 4.34. Ảnh hưởng của tỉ lệ dung môi/nguyên liệu ( $\text{mL}/\text{g}$ ) tới hiệu suất chiết.....	115
Bảng 4.35. Kết quả thí nghiệm theo ma trận của quy hoạch thực nghiệm kế hoạch bậc hai Box-Behnken .....	116

Bảng 4.36. Sự tương thích của mô hình đối với các điều kiện khảo sát tạo cao chiết đại hoàng .....	118
Bảng 4.37. Các hệ số có nghĩa trong phương trình biến thực .....	118
Bảng 4.38. Bảng kết quả tối ưu .....	120
Bảng 4.39. Ảnh hưởng của loại dung môi chiết.....	123
Bảng 4.40. Khảo sát nhiệt độ chiết tới hiệu suất chiết cao muông trâu .....	124
Bảng 4.41. Ảnh hưởng của thời gian chiết tới hiệu suất chiết cao tổng.....	124
Bảng 4.42. Ảnh hưởng của tỉ lệ dung môi/nguyên liệu.....	125
Bảng 4.43. Kết quả thí nghiệm theo ma trận của quy hoạch thực nghiệm kế hoạch bậc hai Box-Behnken .....	126
Bảng 4.44. Sự tương thích của mô hình đối với các điều kiện khảo sát tạo cao chiết muông trâu.....	127
Bảng 4.45. Các hệ số có nghĩa trong phương trình biến thực .....	128
Bảng 4.46. Bảng kết quả tối ưu .....	130



## DANH MỤC CÁC HÌNH

Hình 1.1. Các hợp chất anthraquinone và các dẫn xuất từ cây đại hoàng <i>R. tanguticum</i> ....	5
Hình 1.2. Các hợp chất phenylbutanone glucopyranoside từ cây đại hoàng <i>R. tanguticum</i> .....	6
Hình 1.3. Các hợp chất stilbene từ cây đại hoàng <i>R. tanguticum</i> .....	6
Hình 1.4. Các hợp chất flavol và tannin từ cây đại hoàng <i>R. tanguticum</i> .....	7
Hình 1.5. Các hợp chất dẫn xuất naphthalene từ cây đại hoàng <i>R. tanguticum</i> .....	7
Hình 1.6. Các hợp chất acyl glycoside và hợp chất phenolic khác từ cây đại hoàng <i>R. tanguticum</i> .....	8
Hình 1.7. Các hợp chất anthraquinone và các dẫn xuất từ chi <i>Rumex</i> .....	13
Hình 1.8. Các hợp chất stilbene từ chi <i>Rumex</i> .....	14
Hình 1.9. Các hợp chất flavol từ chi <i>Rumex</i> .....	15
Hình 1.10. Hợp chất chrome từ chi <i>Rumex</i> .....	15
Hình 1.11. Các hợp chất naphthalene từ chi <i>Rumex</i> .....	16
Hình 1.12. Các hợp chất terpene từ chi <i>Rumex</i> .....	16
Hình 1.13. Các hợp chất sterol từ chi <i>Rumex</i> .....	17
Hình 1.14. Các hợp chất phenolic khác từ chi <i>Rumex</i> .....	17
Hình 1.15. Hợp chất creamide từ chi <i>Rumex</i> .....	18
Hình 1.16. Các hợp chất anthraquinone và các dẫn xuất từ cây muồng trâu <i>S. alata</i> .....	25
Hình 1.17. Các hợp chất flavol từ cây muồng trâu <i>S. alata</i> .....	25
Hình 1.18. Các hợp chất diterpene từ cây muồng trâu <i>S. alata</i> .....	26
Hình 1.19. Các hợp chất sterol và terpene từ cây muồng trâu <i>S. alata</i> .....	26
Hình 1.20. Các hợp chất indol alkaloid và chrome từ cây muồng trâu <i>S. alata</i> .....	27
Hình 1.21. Phân loại của thuốc BVTV sinh học .....	30
Hình 1.22. Thị trường thuốc sâu sinh học trên thế giới.....	31
Hình 1.23. Tỷ lệ các loại thuốc BVTV nhập vào Việt Nam năm 2012 .....	32
Hình 1.24. Tỷ lệ số nghiên cứu (đề tài/nhiệm vụ nghiên cứu khoa học) về thuốc BVTV ở Việt Nam từ 2009-2019.....	32

Hình 2.1. Mẫu tiêu bản của cây đại hoàng - <i>R. tanguticum</i> , cây lưỡi bò – <i>R. trisetifer</i> , cây muồng trâu – <i>S. alata</i> .....	33
Hình 2.2. Quy trình quy hoạch hoá thực nghiệm .....	39
Hình 3.1. Sơ đồ phân lập chất từ cây đại hoàng - <i>R. tanguticum</i> .....	50
Hình 3.2. Sơ đồ phân lập chất từ cây lưỡi bò - <i>R. trisetifer</i> .....	51
Hình 3.3. Sơ đồ phân lập chất từ cây muồng trâu <i>S. alata</i> .....	52
Hình 4.1. Cấu trúc hợp chất DH1 (chrysophanol).....	53
Hình 4.2. Cấu trúc hợp chất DH2 (physcion).....	54
Hình 4.3. Cấu trúc hợp chất DH3 (emodin) .....	56
Hình 4.4. Cấu trúc hợp chất DH4 (alo-emodin).....	57
Hình 4.5. Cấu trúc hợp chất DH5 (rhapotigenin).....	58
Hình 4.6. Cấu trúc hợp chất DH6 (deoxyrhapotigenin) .....	59
Hình 4.7. Cấu trúc hợp chất DH7 (rhaponticin và isorhapontin) .....	61
Hình 4.8. Cấu trúc hợp chất RT1 (chrysophanol) .....	65
Hình 4.9. Cấu trúc hợp chất RT2 (physcion) .....	65
Hình 4.10. Cấu trúc hợp chất RT3 (emodin).....	65
Hình 4.11. Cấu trúc hợp chất RT4 (emodin-8- <i>O</i> - $\beta$ -D-glucoside).....	66
Hình 4.12. Cấu trúc hợp chất RT5 (chrysophanol -8- <i>O</i> - $\beta$ -D-glucoside và physcion -8- <i>O</i> - $\beta$ -D-glucoside).....	67
Hình 4.13. Cấu trúc hợp chất RT6 ( $\beta$ -sitosterol).....	70
Hình 4.14. Cấu trúc hợp chất RT7 (daucosterol) .....	70
Hình 4.15. Cấu trúc hợp chất SA1 (methyl 2,4,6-trihydroxybenzoate).....	71
Hình 4.16. Cấu trúc hợp chất SA2 (kaempferol).....	72
Hình 4.17. Cấu trúc hợp chất SA3 ((-)-epiafzelechin) .....	73
Hình 4.18. Cấu trúc hợp chất SA4 (rhein).....	75
Hình 4.19. Cấu trúc hợp chất SA5 (aloe-emodin).....	76
Hình 4.20. Cấu trúc hợp chất SA6 (aloe-emodin-8- <i>O</i> -glucoside).....	76

Hình 4.21. Cấu trúc hợp chất SA7 (kaempferol-3- <i>O</i> -glucoside) .....	78
Hình 4.22. Cấu trúc hợp chất SA8 (kaempferol-3- <i>O</i> -gentiobioside) .....	80
Hình 4.23. Hiệu quả kháng nấm của cao chiết DCM và cao chiết EA đối với các loại nấm: <i>M.oryzae</i> (RCB), <i>B.graminis</i> f.sp. <i>hordei</i> (BPM), <i>C.coccodes</i> (PAN) và <i>P.recondita</i> (WLR) tại các nồng độ 500 và 1000 µg/mL, C (mẫu chưa xử lý), PC (mẫu đối chứng dương).....	85
Hình 4.24. Hiệu quả kháng nấm của cao chiết n-hexane và cao chiết ethyl acetate đối với các loại nấm: <i>B.graminis</i> f.sp. <i>hordei</i> (BPM), <i>C.coccodes</i> (PAN) và <i>P.recondita</i> (WLR) tại các nồng độ 1000 và 3000 µg/mL, C(mẫu chưa xử lý), PC (mẫu đối chứng dương). .....	91
Hình 4.25. Hoạt tính kháng vi khuẩn của các cao chiết và các hợp chất được phân lập từ nguyên liệu <i>R. trisetifer</i> .....	92
Hình 4.26. Hiệu quả kiểm soát bệnh héo rũ gây bởi vi khuẩn <i>R solanacearum</i> do cặn n-hexane của <i>R.trisetifer</i> trên cây cà chua. ....	94
Hình 4.27. Thử nghiệm <i>in vivo</i> của dịch chiết n-hexane ở nồng độ 3000 µg/mL và dịch chiết ethyl acetate ở nồng độ 500, 1000, 3000 µg/mL trên một số nấm gây bệnh.....	96
Hình 4.28. Hình ảnh thử nghiệm cao chiết ethyl acetate từ lá muồng trâu trên 1 số nấm <i>M.grisea</i> (gây bệnh bệnh đạo ôn RCB); nấm <i>P.recondita</i> (gây bệnh gi lá lúa mì WLR ) và nấm <i>C.gloeosporioides</i> (gây bệnh thán thư trên cây ớt đỏ PAN). ....	97
Hình 4.29. Thử nghiệm <i>in vivo</i> hiệu quả kiểm soát của hợp chất SA4 (rhein) (B) và SA5 (aloe-emodin) (A) đối với các bệnh TGM, TLB, WLR gây bởi nấm <i>B.cinerea</i> , <i>P.infestans</i> , <i>P.recondita</i> .....	98
Hình 4.30. Hiệu quả kháng vi khuẩn <i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>cattlyae</i> của hợp chất SA4 ở các nồng độ khác nhau .....	103
Hình 4.31. Đường chuẩn của các chất được tách ra từ rễ đại hoàng.....	105
Hình 4.32. Đường chuẩn của các chất được tách ra từ cây lười bò .....	108
Hình 4.33.Đường chuẩn của các chất được tách ra từ cây muồng trâu.....	110
Hình 4.34. Ảnh hưởng của dung môi tới hiệu suất chiết.....	113
Hình 4.35. Ảnh hưởng của nhiệt độ tới hiệu suất chiết.....	114
Hình 4.36. Ảnh hưởng của thời gian tới hiệu suất chiết.....	115

Hình 4.37. Ảnh hưởng của tỉ lệ dung môi/nguyên liệu (mL/g) tới hiệu suất chiết .....	116
Hình 4.38. Các bề mặt đáp ứng biểu diễn tương quan các thông số công nghệ với quá trình chiết cây đại hoàng.....	119
Hình 4.39. Biểu đồ ảnh hưởng của các dung môi chiết .....	123
Hình 4.40. Biểu đồ ảnh hưởng của nhiệt độ chiết .....	124
Hình 4.41. Đồ thị ảnh hưởng của thời gian chiết tới hiệu suất chiết.....	125
Hình 4.42. Đồ thị ảnh hưởng của lượng dung môi đến quá trình chiết.....	125
Hình 4.43. Các bề mặt đáp ứng biểu diễn tương quan các thông số công nghệ với quá trình chiết muồng trâu .....	129

## DANH MỤC CÁC PHỤ LỤC

PHỤ LỤC 1.1. Hợp chất DH1 .....	1
PHỤ LỤC 1.2. Hợp chất DH2.....	4
PHỤ LỤC 1.3. Hợp chất DH3.....	7
PHỤ LỤC 1.4. Hợp chất DH4.....	10
PHỤ LỤC 1.5. Hợp chất DH5.....	12
PHỤ LỤC 1.6. Hợp chất DH6.....	15
PHỤ LỤC 1.7. Hợp chất DH7.....	18
PHỤ LỤC 1.8. Hợp chất RT1 .....	22
PHỤ LỤC 1.9. Hợp chất RT2 .....	22
PHỤ LỤC 1.10. Hợp chất RT3 .....	22
PHỤ LỤC 1.11. Hợp chất RT4 .....	23
PHỤ LỤC 1.12 Hợp chất RT5 .....	27
PHỤ LỤC 1.13. Hợp chất RT6 .....	29
PHỤ LỤC 1.14. Hợp chất RT7 .....	32
PHỤ LỤC 1.15. Hợp chất SA1 .....	36
PHỤ LỤC 1.16. Hợp chất SA2 .....	38
PHỤ LỤC 1.17. Hợp chất SA3 .....	40
PHỤ LỤC 1.18. Hợp chất SA4 .....	43
PHỤ LỤC 1.19. Hợp chất SA5 .....	45
PHỤ LỤC 1.20. Hợp chất SA6 .....	46
PHỤ LỤC 1.21. Hợp chất SA7 .....	50
PHỤ LỤC II.1. Sắc kí đồ HPLC của các hợp chất DH3 (emodin), DH5 (rhapontigenin), DH2 (physcion), DH1 (chrysophanol), DH6 (desoxyrhaponticin) trong cao chiết dichloromethane từ cây đại hoàng – <i>R. tanguticum</i> .....	57
PHỤ LỤC II.2. Sắc kí đồ HPLC của các hợp chất RT1 (chrysophanol), RT2(physcion), RT3(emodin), RT4(emodin -8- <i>O</i> - $\beta$ - <i>D</i> -glucopyranoside) , RT5a (chrysophanol -8- <i>O</i> - $\beta$ - <i>D</i> -	

glucopyranoside), RT5b( physcion -8- <i>O</i> - $\beta$ - <i>D</i> -glucopyranoside) và các thành phần trong cao chiết methanol (A), n-hexane (B), ethyl acetate(C) cây lưỡi bò <i>R.trisetifer</i> . ....	59
PHỤ LỤC II.3. Sắc kí đồ HPLC của các hợp chất SA4 (rhein), SA5 (aloe-emodin), SA6 (aloe-emodin-8- <i>O</i> -glucoside) trong cao chiết cao chiết dichloromethane, cao chiết ethyl acetatevà cao chiết methanol từ cây muồng trâu – <i>C. alata</i> .....	60

## MỞ ĐẦU

### 1. Lý do chọn đề tài

Việt Nam là một nước nông nghiệp, khí hậu nhiệt đới, có tổng diện tích đất nông nghiệp và lâm nghiệp vào khoảng 20 triệu ha, trong đó diện tích gieo trồng khoảng 14 triệu ha. Thời tiết nóng ẩm quanh năm, mưa nhiều là điều kiện thuận lợi để cây trồng phát triển, nhưng đồng thời cũng là điều kiện để côn trùng gây hại, nấm bệnh và cỏ dại nảy nở sinh sôi.

Trong các dịch hại gây hại cây trồng thì bệnh hại do nấm gây ra chiếm tới 80%. Phổ biến là các loại bệnh nấm đa thực gây hại mạnh trên nhiều loại cây trồng khác nhau như *Botrytis cineria*, *Erysiphe graminis*, *Phytophthora infestans* và *Rhizoctonia solani*.

Trước tình hình đó, người dân đã dùng thuốc bảo vệ thực vật tổng hợp để phòng trừ dịch hại. Tuy nhiên, hiện tượng sử dụng tràn lan, sai mục đích, không tuân thủ các quy trình sử dụng an toàn và gây nên tình trạng ô nhiễm môi trường đất, nước, không khí với thời gian tồn dư lâu dài, ảnh hưởng đến hệ sinh thái nông nghiệp và sức khỏe cộng đồng. Nhiều thuốc BVTV nguồn gốc tổng hợp hóa học có khả năng gây ung thư, biến đột gen, ảnh hưởng đến sức khỏe con người và môi trường. Một số loại thuốc BVTV bị cấm sử dụng như carbendazim, diifenoconazole, tubeconazole, cabofuran, azodrin,.... Vì vậy phải chú trọng sử dụng hoạt chất mới, ít độc hại, thân thiện môi trường, có nguồn gốc vi sinh và được chiết tách từ thảo mộc.

Xuất phát từ tính cấp thiết trong thực tiễn cuộc sống cần phải tạo ra các thuốc BVTV có nguồn gốc sinh học, chúng tôi lựa chọn đề tài nghiên cứu: “**Nghiên cứu quá trình tách chiết một số hợp chất phenolic từ ba loài đại hoàng (*Rheum tanguticum* Maxim. ex Balf), lưỡi bò (*Rumex trisetifer* Stokes), muồng trâu (*Senna alata* (L.) Roxb.), hoạt tính kháng vi sinh vật gây bệnh thực vật**”.

### 2. Mục tiêu của luận án gồm:

- Nghiên cứu một số thành phần hóa học từ cây đại hoàng (*Rheum tanguticum* Maxim. ex Balf), cây lưỡi bò (*Rumex trisetifer* Stokes), cây muồng trâu (*Senna alata* (L.) Roxb).

- Đánh giá hoạt tính kháng một số nấm gây bệnh cho cây trồng của cao chiết và chất tách được từ cây đại hoàng (*Rheum tanguticum* Maxim. ex Balf), cây lưỡi bò (*Rumex trisetifer* Stokes), cây muồng trâu (*Senna alata* (L.) Roxb).
- Đánh giá hoạt tính kháng một số vi khuẩn gây bệnh cho cây trồng của cao chiết và chất tách được từ cây đại hoàng (*Rheum tanguticum* Maxim. ex Balf), cây lưỡi bò (*Rumex trisetifer* Stokes), cây muồng trâu (*Senna alata* (L.) Roxb).
- Xây dựng tối ưu hóa các quy trình công nghệ chiết xuất tạo cao MeOH từ cây đại hoàng (*Rheum tanguticum* Maxim. ex Balf), cây muồng trâu (*Senna alata* (L.) Roxb).

### **3. Đối tượng nghiên cứu**

- Cây đại hoàng (*Rheum tanguticum* Maxim. ex Balf), cây lưỡi bò (*Rumex trisetifer* Stokes), cây muồng trâu (*Senna alata* (L.) Roxb)

### **4. Nội dung của luận án gồm:**

- Nghiên cứu phân lập và xác định cấu trúc một số thành phần hóa học từ cây đại hoàng (*Rheum tanguticum* Maxim. ex Balf), cây lưỡi bò (*Rumex trisetifer* Stokes), cây muồng trâu (*Senna alata* (L.) Roxb): Điều chế cặn chiết, tách các hợp chất bằng phương pháp sắc ký, xác định cấu trúc hóa học bằng các phương pháp hóa lý hiện đại
- Thử nghiệm hoạt tính kháng một số nấm gây bệnh cho cây trồng của cao chiết và chất tách được từ cây đại hoàng (*Rheum tanguticum* Maxim. ex Balf), cây lưỡi bò (*Rumex trisetifer* Stokes), cây muồng trâu (*Senna alata* (L.) Roxb).
- Thử nghiệm hoạt tính kháng một số vi khuẩn gây bệnh cho cây trồng của cao chiết và chất tách được từ cây đại hoàng (*Rheum tanguticum* Maxim. ex Balf) cây lưỡi bò (*Rumex trisetifer* Stokes), cây muồng trâu (*Senna alata* (L.) Roxb).
- Phân tích định lượng thành phần một số hoạt chất trong cao chiết từ mẫu nghiên cứu bằng phương pháp HPLC.
- Nghiên cứu, tối ưu hóa các quy trình công nghệ chiết xuất tạo cao MeOH từ cây đại hoàng (*Rheum tanguticum* Maxim. ex Balf), cây muồng trâu (*Senna alata* (L.) Roxb).



## CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN

### 1.1. Các nghiên cứu về cây đại hoàng *Rheum tanguticum* Maxim. ex Balf.

#### 1.1.1. Giới thiệu về chi *Rheum* và cây đại hoàng *Rheum tanguticum* Maxim. ex Balf

Chi *Rheum* L. thuộc phân họ Polygonoideae với khoảng 60 loài, trong đó có ba nhóm chính là đại hoàng Trung Quốc, đại hoàng Ấn Độ hay Himalaya và đại hoàng Rhapontic.

Chi đại hoàng gồm các loài thân thảo sống lâu năm. Rễ cây dài thường phình to dạng củ. Thân thường rỗng, có rãnh, nhẵn hoặc có lông. Lá đơn, có mép lá dạng lượn sóng, răng cưa hay xẻ thùy chân vịt. Lá cây phía dưới thưa, dày, hoặc xếp hình hoa thị, lớn hơn những lá phía trên, bẹ lá thường lớn; dạng màng mép thường nguyên. Hoa mọc thành chùm đơn hoặc chùm kép, thường hình chùy, hình cầu hoặc hình bông. Cuống hoa có đốt. Hoa lưỡng tính hoặc đơn tính cùng gốc. Bao hoa sống dai, lá đài 6. Nhị thường 9 (6 + 3), hiếm khi 7 hoặc 8. Nhụy ngắn, 3 ô nằm ngang; đầu nhụy phình to, mép uốn ngược xuống. Quả bé ba cạnh, có cánh.

Giới thiệu về cây đại hoàng *Rheum tanguticum* Maxim. ex Balf.

Cây thảo mọc sống lâu năm nhờ thân rễ to, khỏe. Thân có rãnh, giữa rỗng, có lông trắng hoặc có gai ở các mấu và phía trên. Lá cây mọc thành cụm từ thân rễ, có kích thước lớn, có cuống dài, có bẹ chia, phiến lá hình tim rộng 30-40 cm, phân thành 5 đến 7 thùy chính, các thùy này cũng có thể phân lần thứ hai hoặc đôi khi lần thứ ba. Gân lá nổi mặt dưới, thường màu đỏ nhạt. Từ năm thứ 3-4 thì xuất hiện 1 thân mọc lên cao 1-2 m mang một số lá nhỏ. Phần ngọn thân là chùm hoa hình chùy mang nhiều hoa. Bao hoa gồm 6 bộ phận màu trắng, xanh nhạt, hoặc đỏ nhạt, 9 nhị. Quả đóng 3 góc. Cây ra hoa tháng 5-6, quả tháng 9-10.

#### 1.1.2. Nghiên cứu về thành phần hóa học, hoạt tính sinh học cây đại hoàng (*Rheum tanguticum* Maxim. ex Balf.) trên thế giới

##### 1.1.2.1. Nghiên cứu về thành phần hóa học của cây đại hoàng trên thế giới.

Năm 2005, Peng Tei Tu và cộng sự sử dụng HSSC để tách được *trans*-3,5,4'-trihydroxystilbene-4'-O- $\beta$ -D-glucopyranoside (**1**) và catechin (**2**) từ rễ cây đại hoàng [1].

Năm 2006, Peng Tei Tu và cộng sự sử dụng HPLC-DAD đã xác định được 21 hợp chất trong cây đại hoàng gồm 9 hợp chất anthraquinone và dẫn xuất là

chrysophanol (**3**), physcion (**4**), emodin (**5**), rhein (**6**), aloe-emodin (**7**), chrysophanol-8-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside (**8**), aloe-emodin-8-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside (**9**), sennoside A (**10**), sennoside B (**11**), 5 hợp chất phenylbutanone glucopyranoside gồm: 4-(4'-hydroxyphenyl)-2-butanone (**12**), lindleyin (**13**), isolindleyin (**14**), 4-(4'-hydroxyphenyl)-2-butanone-4'-*O*- $\beta$ -D-(2''-*O*-galloyl-6''-*O*-p-coumaroyl)glucopyranoside (**15**), 4-(4'-hydroxyphenyl)-2-butanone-4'-*O*- $\beta$ -D-(2''-*O*-cinnamoyl-6''-*O*-galloyl) glucopyranoside (**16**), 4 hợp chất stilbene: *trans*-3,5,4'-trihydroxystilbene-4'-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside (**1**), *trans*-3,5,4'-trihydroxystilbene (resveratrol) (**17**), *trans*-3,5,4'-trihydroxystilbene-4'-*O*- $\beta$ -D-(2''-*O*-galloyl)-glucopyranoside (**18**), *trans*-3,5,4'-trihydroxystilbene-4'-*O*- $\beta$ -D-(6''-*O*-galloyl)-glucopyranoside (**19**), 2 hợp chất tannin gồm (-)-epicatechin-3-*O*-gallate (**20**), (+)-catechin (**2**), 1 naphthalene: torachryssone-8-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside (**21**).

Năm 2007, Peng Tei Tu cộng sự dùng HPLC kết hợp ESI-MS xác định được 41 hợp chất hóa học trong cây đại hoàng là 16 hợp chất anthraquinone và các dẫn xuất gồm chrysophanol (**3**), physcion (**4**), emodin (**5**), rhein (**6**), aloe-emodin (**7**), chrysophanol-8-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside (**8**), physcion-8-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside (**22**), emodin-8-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside (**23**), rehin-8-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside (**24**), aloe-emodin-8-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside (**9**), aloe-emodin-8-*O*- $\beta$ -D-(6'-galloyl)glucopyranoside (**25**), chrysophanol-8-*O*- $\beta$ -D-(6'-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl)glucopyranoside (**26**), sennoside A (**10**), sennoside B (**11**), sennoside C (**27**), sennoside D (**28**), 7 hợp chất phenylbutanone glucopyranoside gồm 4-(4'-hydroxyphenyl)-2-butanone-4'-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside (**29**), isolindleyin (**14**), lindleyin (**13**), 4-(4'-hydroxyphenyl)-2-butanone-4'-*O*- $\beta$ -D-(2'-*O*-galloyl-6'-*O*-galloyl)glucopyranoside (**30**), 4-(4'-hydroxyphenyl)-2-butanone-4'-*O*- $\beta$ -D-(6''-*O*-p-coumaroyl)glucopyranoside (**31**), 4-(4'-hydroxyphenyl)-2-butanone-4'-*O*- $\beta$ -D-(2''-*O*-galloyl-6''-*O*-p-coumaroyl)glucopyranoside (**15**), 4-(4'-hydroxyphenyl)-2-butanone-4'-*O*- $\beta$ -D-(2''-*O*-cinnamoyl-6''-*O*-galloyl) glucopyranoside (**16**), 4 hợp chất stilbene: *trans*-3,5,4'-trihydroxystilbene-4'-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside (**1**), *trans*-3,5,4'-trihydroxystilbene (**17**), *trans*-3,5,4'-trihydroxystilbene-4'-*O*- $\beta$ -D-(2'-*O*-galloyl) glucopyranoside (**18**), *trans*-3,5,4'-trihydroxystilbene-4'-*O*- $\beta$ -D-(6'-*O*-galloyl) glucopyranoside (**19**) và 12 hợp chất tannin: gallic acid (**32**), 1-*O*-galloylglucose (**33**), gallic acid 4-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside

(**34**), gallic acid 3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside (**35**), gallic acid 3-*O*- $\beta$ -D-(2'-*O*-galloyl)glucopyranoside (**36**), gallic acid 4-*O*- $\beta$ -D-(6'-*O*-galloyl)glucopyranoside (**37**), 1,2,6-tri-*O*-galloyl-glucose (**38**), 2-*O*-cinnamoyl-1,3-di-*O*-galloyl-glucose (**39**), 2-*O*-cinnamoyl-1-*O*-galloyl--glucose (**40**), (+)-catechin (**2**), (-)-epicatechin-3-*O*-gallate (**20**), procyanidin B (**41**), 2 hợp chất naphthalene: torachryssone-8-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside (**21**), 6-hydroxymusizin-8-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside (**42**) [2].

Năm 2012, Xiao-Hui Zhao và các cộng sự đã sử dụng HSCCC để tách ra được 3 hợp chất stilbene là *trans*-rhapontin (**43**), *cis*-rhapontin (**44**) and *trans*-desoxyrhaponticin (**45**) [3]

Năm 2012, Xudong Xu và các cộng sự đã tách ra từ rễ cây đại hoàng đoàn 8 hợp chất gồm 2 hợp chất naphthalene glycoside là 6-hydroxymusizin-8-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside (**42**), torachryssone-8-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside (**21**), 3 hợp chất phenylbutanone glucopyranoside: 4-(4'-hydroxyphenyl)-2-butanone-4'-*O*- $\beta$ -D-(2''-*O*-galloyl)-glucopyranoside (isolindleyin ) (**14**), 4-(4'-hydroxyphenyl)-2-butanone 4'-*O*- $\beta$ -D-(6''-*O*-cinnamoyl)-glucopyranoside (**31**), 4-(4'-hydroxyphenyl)-2-butanone-4'-*O*- $\beta$ -D-(2''-*O*-galloyl-6''-*O*-cinnamoyl)-glucopyranoside (**15**) và 3 dẫn xuất cinnamic acid là *trans*-cinnamic acid (**46**), *p*-coumaric acid glucoside (**47**), 4-hydroxybenzenepropanoic acid methyl ester (**48**) [4].

Năm 2014, Seng Li Wei và các cộng sự sử dụng kỹ thuật RP-HPLC đã xác định được các thành phần anthraquinones tự do (rhein (**6**), emodin (**5**), aloe-emodin (**7**), chrysophanol (**3**), physcion (**4**)), anthraquinone glycosides, dianthrones (sennoside A (**10**), sennoside B (**11**), flavan-3-ols ((+)-catechin (**2**)) và gallic acid (**32**) trong rễ cây đại hoàng. [5]

Năm 2014, Xudong Xu và các cộng sự đã tách ra từ rễ cây đại hoàng đoàn được 1 chất mới phenylbutanone glucopyranoside là 4-(4'-hydroxyphenyl)-2-butanone-4'-*O*- $\beta$ -D-(6''-*O*-*cis*-*p*-coumaroyl)-glucopyranoside (**49**) và 12 chất đã biết gồm 4 hợp chất anthraquinone glucoside là rhein-8-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside (**24**), aloe-emodin-1-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside (**50**), aloe-emodin-8-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside (**9**), chrysophanol-8-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside (**8**), 3 hợp chất phenylbutanone glucopyranoside: 4-(4'-hydroxyphenyl)-2-butanone-4'-*O*- $\beta$ -D-(6''-*O*-*trans*-*p*-coumaroyl)-glucopyranoside (**31**), 4-(4'-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl-3',5'

dimethoxyphenyl)-2-butanone (**51**), 4-[4-( $\beta$ -D-glucopyranosyloxy)-3-methoxyphenyl]-2-butanone (**52**), 5 hợp chất phenolic và các dẫn xuất naphthalene: phlorizin (**53**), 4-O- $\beta$ -D-glucopyranoside-3,5-methoxybenzoic acid (**54**), 2,5-dimethyl-7-hydroxychromone-7-O- $\beta$ -D-glucopyranoside (**55**), 6-methoxy-2-acetyl-3-methyl-1,4-naphthoquinone-8-O- $\beta$ -D-glucopyranoside (**56**), 2,5-dimethyl-8-hydroxynaphthopyrone-10-O- $\beta$ -D-glucopyranoside (**57**) [6].

Năm 2016, Yulin Li và các cộng sự đã tách ra được 3 hợp chất anthraquinone glycoside gồm chrysophanol 1-O- $\beta$ -D-glucoside (**58**), chrysophanol 8-O- $\beta$ -D-glucoside (**8**) và physion 8-O- $\beta$ -D-glucoside (**22**) từ cây đại hoàng [7].

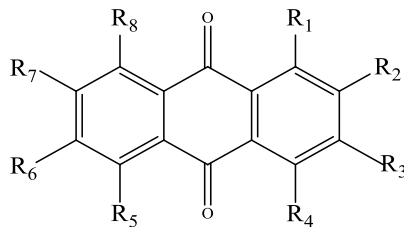
Năm 2017, Yulin Li và các cộng sự đã sử dụng HSCCC và HPLC tách được 6 hợp chất là lindleyin (**13**), isolindleyin (**14**), resveratrol-4'-O-(2''-O-galloyl)-glucopyranoside (**18**), resveratrol-4'-O-(6''-O-galloyl)-glucopyranoside (**19**), emodin 1-O- $\beta$ -D-glucoside (**59**) và 3,5-dihydroxy-4'-methoxy stilbene-3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside (*trans*-desoxyrhaponticin (**45**) từ cây đại hoàng [8].

Năm 2021, Wenhua Xu và các cộng sự đã tách ra từ rễ cây đại hoàng được 5 hợp chất anthraquinone bao gồm aloe-emodin (**7**), rhein (**6**), emodin (**5**), chrysophanol (**3**) và physiol (**4**) cùng với 5 hợp chất flavonoid bao gồm tricetin (**60**), quercetin-3-O- $\beta$ -D-glucoside (**61**), kaempferol-3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside (**62**), rhamnazin (**63**) và tricetin-7-O- $\beta$ -D-glucopyranoside (**64**) [9].

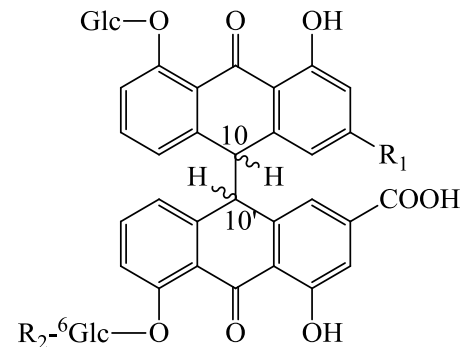
Năm 2022, Huilan Yue và các cộng sự đã xác định được từ phần dịch chiết từ rễ cây đại hoàng không chứa poly sarcharide và protein 48 chất gồm 10 hợp chất anthraquinone: emodin (**5**), rhein (**6**), aloe emodin 8-O-glucoside (**9**), aloe emodin 1-O-glucoside (**50**), emodin 1-O-glucoside (**59**), emodin 8-O-glucoside (**23**), chrysophanol 8-O-glucoside (**8**), emodin (6-acetyl) glucoside (**65**), physcion 8-O-glucoside (**22**), rhein 8-O-glucoside (**24**), 4 hợp chất bianthrone: sennoside A (**10**), sennoside B (**11**), sennoside C (**27**), sennoside G (**66**); 8 hợp chất flavan: (+)-catechin (**2**), (-)-epicatechin-3-O-gallate (**20**), procyanidin B1(**67**), procyanidin B2 (**68**), procyanidin B 3-O-gallate I (**69**), procyanidin B 3-O-gallate II (**70**), procyanidin B 3,3'-di-O-gallate (**71**), 3 hợp chất stilbene: resveratrol 4-O-(2'-O-galloyl) glucoside (**18**), resveratrol 4-O-(6'-O-galloyl) glucoside (**19**), resveratrol glucoside (**1**), 5 hợp chất phenylbutanone: lindleyin (**13**), isolindleyin (**14**), hydroxyphenyl butanone (2-

galloyl-6-p-coumaroyl) glucoside (**15**), hydroxyphenyl butanone (2-galloyl-6-feruloyl) glucoside (**72**), hydroxyphenyl butanone (2-galloyl-6-cinnamoyl) glucoside (**73**), 2 hợp chất naphthoside là aloesone-7-O-glucoside (**74**), torachryson 8-O-glucoside (**21**), 1 hợp chất chromone là chromone-7-O-(2'-O-galloyl) glucoside (**75**), 7 hợp chất glucose gallate: gallic acid glucoside (**33**), gallic acid (2-O-galloyl) glucoside (**76**), gallic acid (6-O-galloyl) glucoside (**37**), 1,2-digalloyl-6-O-p-coumaroyl-glucoside (**77**), 1,6-digalloyl-2-O-p-coumaroyl-glucoside (**78**), digalloyl glucose (**79**), trigalloyl glucose (**38**) và 3 hợp chất axit phenolic: protocatechaic acid (**80**), coumaric acid (**81**), coumaric acid glucoside (**82**) bằng phân tích UPLC-Triple-TOF/MS. [10]

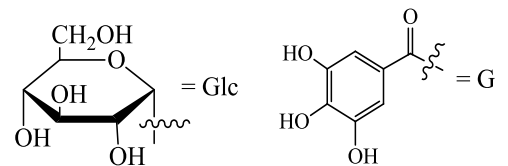
Hình 1.1. Các hợp chất anthraquinone và các dẫn xuất từ cây đại hoàng *R. tanguticum*



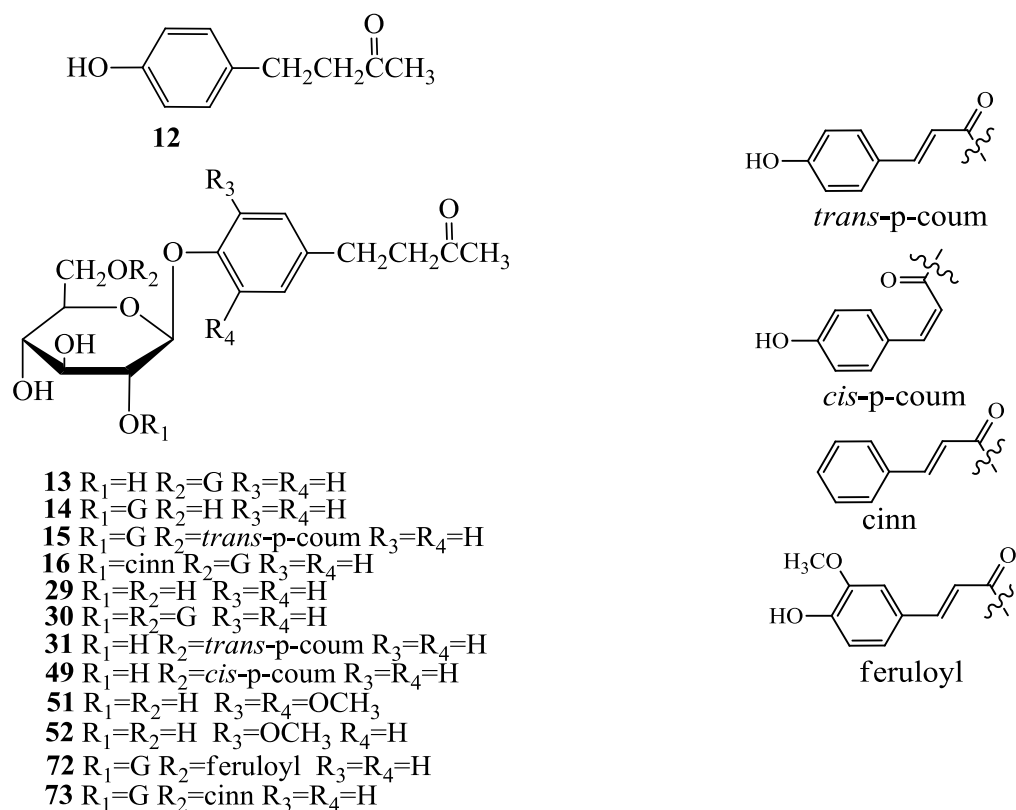
- 3** R<sub>1</sub>=R<sub>8</sub>=OH R<sub>2</sub>=R<sub>4</sub>=R<sub>5</sub>=R<sub>6</sub>=R<sub>7</sub>=H R<sub>3</sub>=CH<sub>3</sub>  
**4** R<sub>1</sub>=R<sub>8</sub>=OH R<sub>2</sub>=R<sub>4</sub>=R<sub>5</sub>=R<sub>7</sub>=H R<sub>6</sub>=OCH<sub>3</sub> R<sub>3</sub>=CH<sub>3</sub>  
**5** R<sub>1</sub>=R<sub>6</sub>=R<sub>8</sub>=OH R<sub>2</sub>=R<sub>4</sub>=R<sub>5</sub>=R<sub>7</sub>=H R<sub>3</sub>=CH<sub>3</sub>  
**6** R<sub>1</sub>=R<sub>8</sub>=OH R<sub>2</sub>=R<sub>4</sub>=R<sub>5</sub>=R<sub>6</sub>=R<sub>7</sub>=H R<sub>3</sub>=COOH  
**7** R<sub>1</sub>=R<sub>8</sub>=OH R<sub>2</sub>=R<sub>4</sub>=R<sub>5</sub>=R<sub>6</sub>=R<sub>7</sub>=H R<sub>3</sub>=CH<sub>2</sub>OH  
**8** R<sub>1</sub>=OH R<sub>2</sub>=R<sub>4</sub>=R<sub>5</sub>=R<sub>6</sub>=R<sub>7</sub>=H R<sub>3</sub>=CH<sub>3</sub> R<sub>8</sub>=OGlc  
**9** R<sub>1</sub>=OH R<sub>2</sub>=R<sub>4</sub>=R<sub>5</sub>=R<sub>6</sub>=R<sub>7</sub>=H R<sub>3</sub>=CH<sub>2</sub>OH R<sub>8</sub>=OGlc  
**22** R<sub>1</sub>=OH R<sub>2</sub>=R<sub>4</sub>=R<sub>5</sub>=R<sub>7</sub>=H R<sub>6</sub>=OCH<sub>3</sub> R<sub>3</sub>=CH<sub>3</sub> R<sub>8</sub>=OGlc  
**23** R<sub>1</sub>=R<sub>6</sub>=OH R<sub>2</sub>=R<sub>4</sub>=R<sub>5</sub>=R<sub>7</sub>=H R<sub>3</sub>=CH<sub>3</sub> R<sub>8</sub>=OGlc  
**24** R<sub>1</sub>=OH R<sub>2</sub>=R<sub>4</sub>=R<sub>5</sub>=R<sub>6</sub>=R<sub>7</sub>=H R<sub>3</sub>=COOH R<sub>8</sub>=OGlc  
**25** R<sub>1</sub>=OH R<sub>2</sub>=R<sub>4</sub>=R<sub>5</sub>=R<sub>6</sub>=R<sub>7</sub>=H R<sub>3</sub>=CH<sub>2</sub>OH R<sub>8</sub>=OGlc<sup>6</sup>-G  
**26** R<sub>1</sub>=OH R<sub>2</sub>=R<sub>4</sub>=R<sub>5</sub>=R<sub>6</sub>=R<sub>7</sub>=H R<sub>3</sub>=CH<sub>3</sub> R<sub>8</sub>=OGlc<sup>6</sup>-Glc  
**50** R<sub>1</sub>=OGlc R<sub>8</sub>=OH R<sub>2</sub>=R<sub>4</sub>=R<sub>5</sub>=R<sub>6</sub>=R<sub>7</sub>=H R<sub>3</sub>=CH<sub>2</sub>OH  
**58** R<sub>1</sub>=OGlc R<sub>8</sub>=OH R<sub>2</sub>=R<sub>4</sub>=R<sub>5</sub>=R<sub>6</sub>=R<sub>7</sub>=H R<sub>3</sub>=CH<sub>3</sub>  
**59** R<sub>1</sub>=OGlc R<sub>6</sub>=R<sub>8</sub>=OH R<sub>2</sub>=R<sub>4</sub>=R<sub>5</sub>=R<sub>7</sub>=H R<sub>3</sub>=CH<sub>3</sub>  
**65** R<sub>1</sub>=OGlc R<sub>6</sub>=CH<sub>3</sub>CO R<sub>8</sub>=OH R<sub>2</sub>=R<sub>4</sub>=R<sub>5</sub>=R<sub>7</sub>=H R<sub>3</sub>=CH<sub>3</sub>



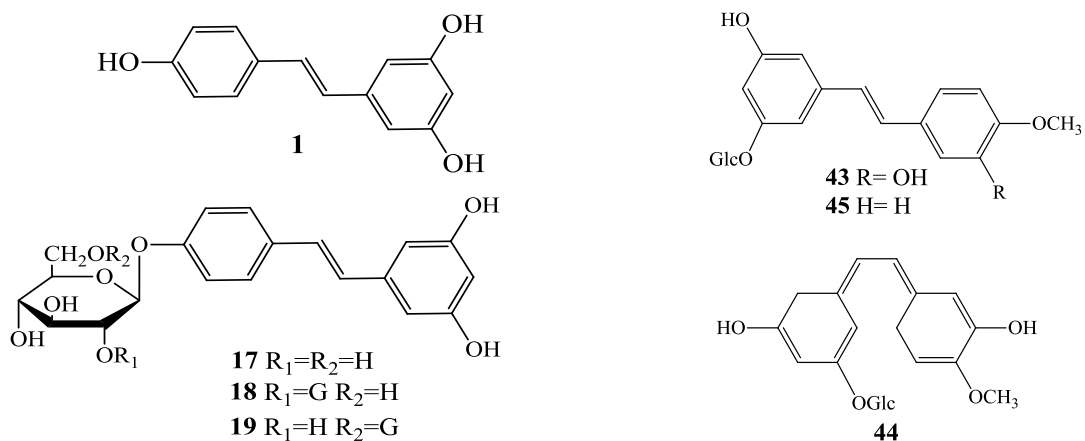
- 10** R<sub>1</sub>=COOH R<sub>2</sub>=H 10-10' trans  
**11** R<sub>1</sub>=COOH R<sub>2</sub>=H 10-10' meso  
**27** R<sub>1</sub>=CH<sub>2</sub>OH R<sub>2</sub>=H 10-10' trans  
**28** R<sub>1</sub>=CH<sub>2</sub>OH R<sub>2</sub>=H 10-10' meso  
**66** R<sub>1</sub>=CH<sub>3</sub> R<sub>2</sub>=H 10-10' trans



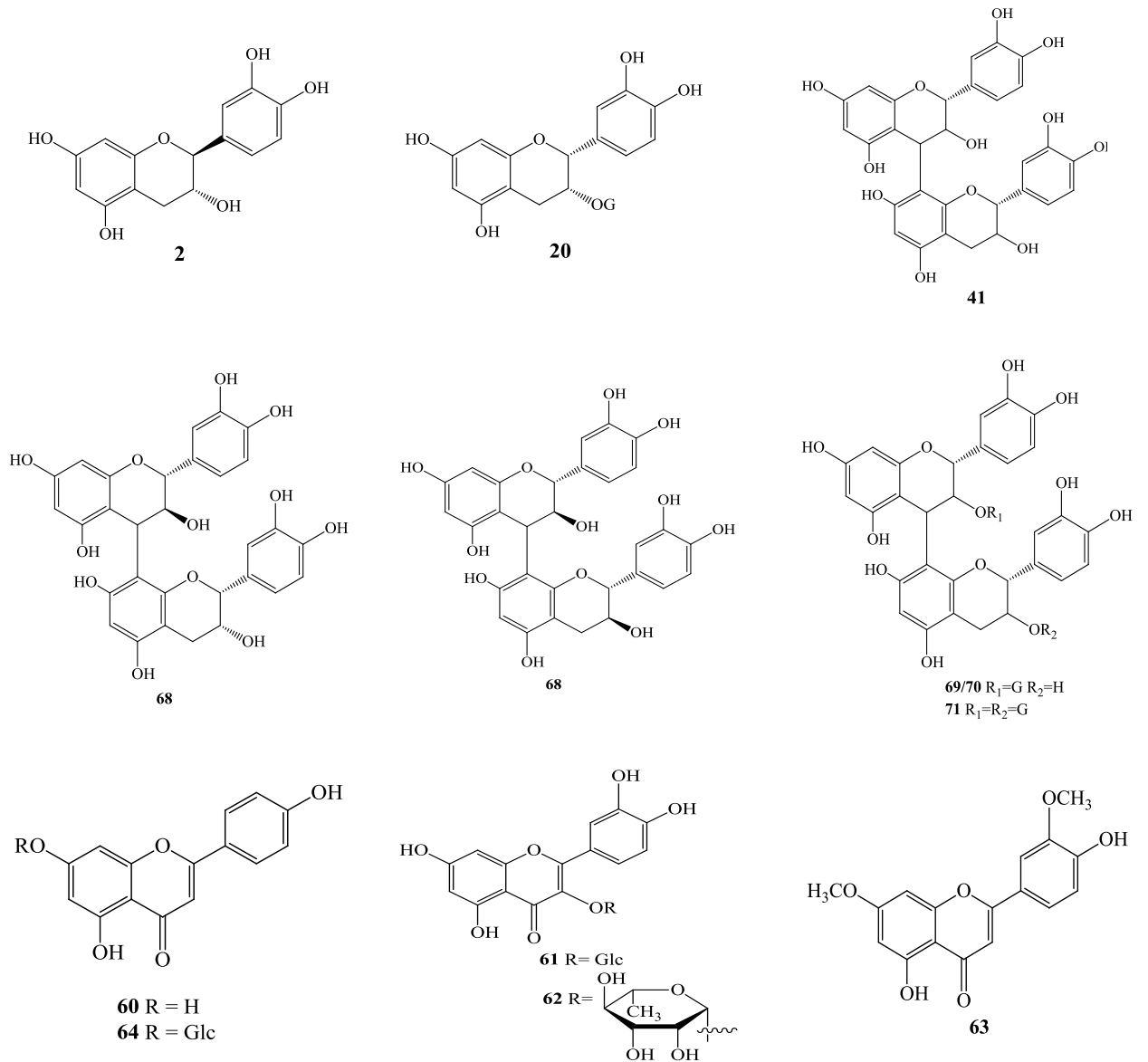
Hình 1.2. Các hợp chất phenylbutanone glucopyranoside từ cây đại hoàng *R. tanguticum*



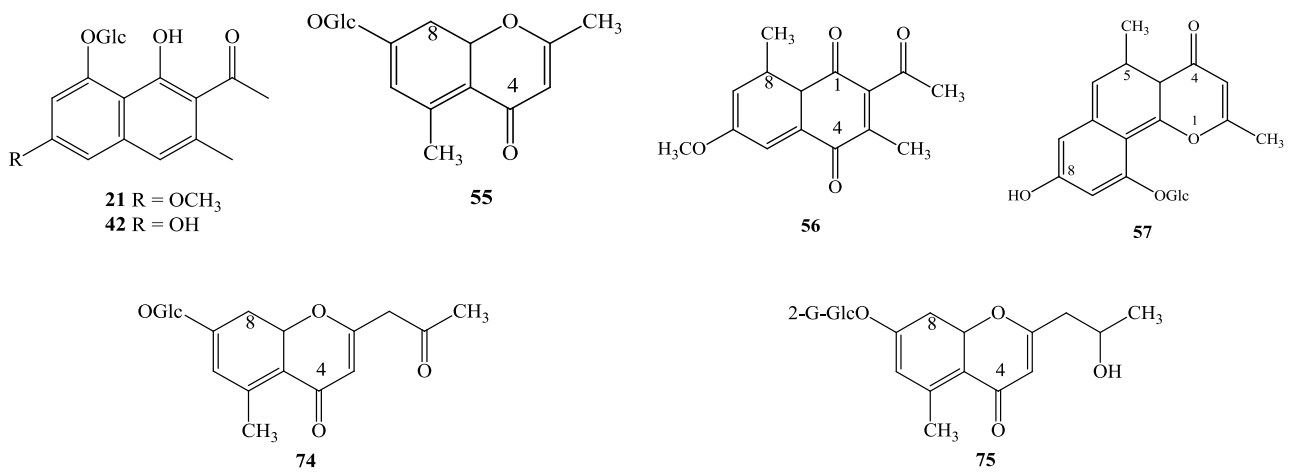
Hình 1.3. Các hợp chất stilbene từ cây đại hoàng *R. tanguticum*



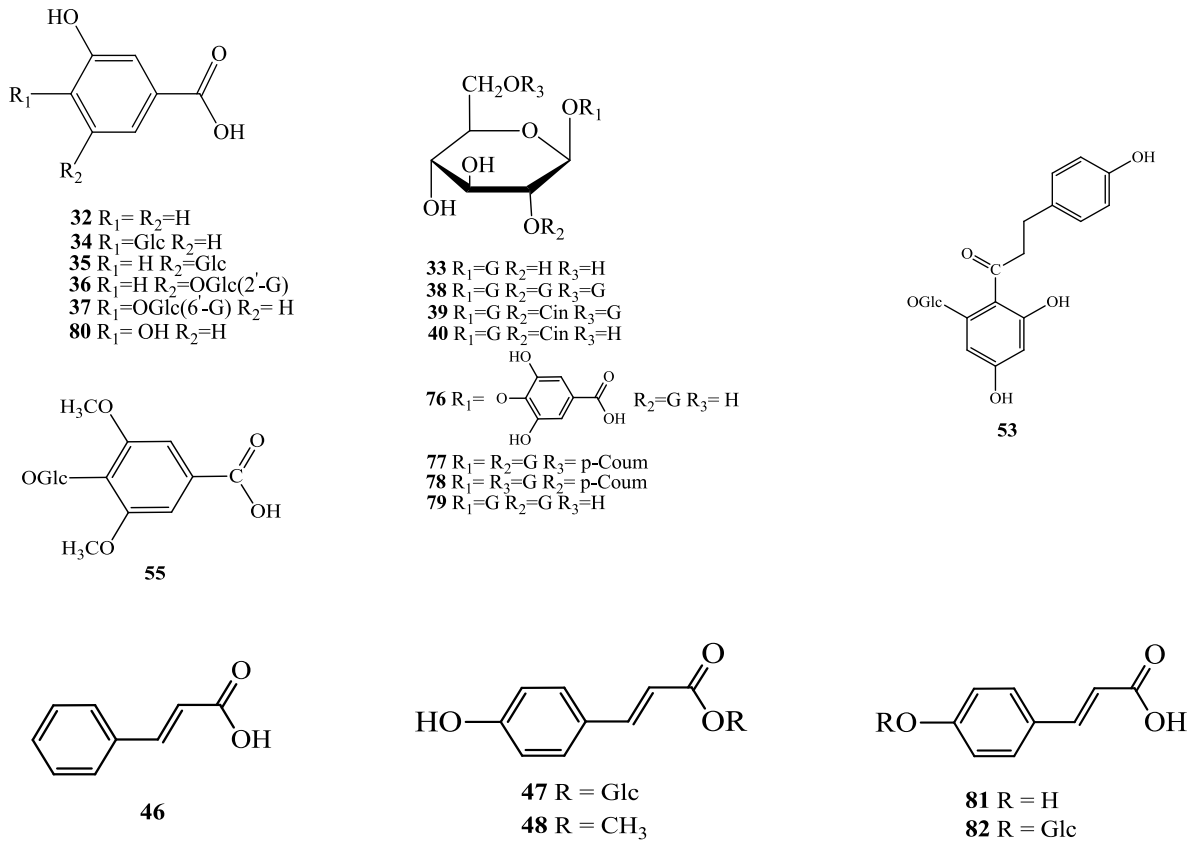
Hình 1.4. Các hợp chất flavol và tannin từ cây đại hoàng *R. tanguticum*



Hình 1.5. Các hợp chất dẫn xuất naphthalene từ cây đại hoàng *R. tanguticum*



Hình 1.6. Các hợp chất acyl glycoside và hợp chất phenolic khác từ cây đại hoàng *R. tanguticum*



### 1.1.2.2. Hoạt tính sinh học cây đại hoàng (*R. tanguticum*) trên thế giới

1.1.2.2.1 Hoạt tính kháng vi sinh vật của các chất phân lập được và cao chiết từ cây đại hoàng.

Năm 2003, Lim và các cộng sự có tiến hành thử hoạt tính của dịch chiết MeOH của cây *R. tanguticum* đối với các vi sinh vật gây bệnh trên thực phẩm. Kết quả cho thấy, dịch chiết MeOH có hoạt tính kháng vi khuẩn đối với chủng *P. aeruginosa*, giá trị MIC đối với các chủng vi khuẩn *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *S. typhimurium* là 250, 300, 300 mg/mL. [11]

Năm 2022, Zang và các cộng sự đã chứng minh hoạt tính của dịch chiết cây *R. tanguticum* đối với thành tế bào của vi khuẩn *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (*PccS1*) kháng kháng sinh rifampicin, streptomycin và streptomycin. [12]



#### 1.1.2.2.2. Hoạt tính sinh học khác

Năm 2011, Kim và các cộng sự đã thể hiện dịch chiết cồn 70 của rễ cây thể hiện hoạt tính trên mô hình động vật (chuột) bị viêm da dị ứng (animal model of atopic dermatitis). [13]

Năm 2014, Lee và các cộng sự đã thể hiện hoạt tính chống tăng sinh (anti-proliferative activity) của phycion được tách từ rễ cây *R. tanguticum* đối với dòng tế bào MDA-MB-231 gây ung thư vú ở người. [14]

Các nghiên cứu về thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của các loài thuộc chi *Rheum* qua các tài liệu tổng quan [15], [16], [17], [18] giúp ta hình dung sự đa dạng về thành phần và các hoạt tính của cây đại hoàng *R. tanguticum*.

### 1.2. Các nghiên cứu về chi *Rumex*

#### 1.2.1 Giới thiệu về chi *Rumex* và cây *Rumex trisetifer* Stokes

Chi *Rumex* là chi lớn thứ 2 trong họ Rau răm Polygonaceae với khoảng 200 loài phân bố khắp từ Châu Âu, châu Á, châu Phi, Nam Mỹ. Trong đó có 49 loài được liệt kê trong bài viết.

Cây thuộc chi *Rumex* là cây thảo mộc, mọc lâu năm. Chúng thường có rễ to, mập mạp, đôi khi ở dạng thân rễ. Các lá mọc xen kẽ đôi khi gấp khúc hoặc mọc lệch. Hoa lưỡng tính hoặc đơn tính có thể sắp xếp thành các vòng xoắn trên các nhánh đơn giản hoặc phân nhánh. Trong nhiều loài, hoa có màu xanh lục tuy nhiên trong một số loài (như *R. acetosella*) hoa và thân có thể có màu đỏ gạch.

Giới thiệu về cây lưỡi bò (*Rumex trisetifer* Stokes)

Cây lưỡi bò (có lá giống như lưỡi trâu bò nên gọi là ngư thiệt) ngoài ra còn có tên gọi khác là chút chút, thổ đại hoàng, dương đề.

Phân bố: Cây mọc hoang ở khắp nơi, ở bờ ruộng ẩm, hoặc ở trong các ruộng rau muống, nương mạ đã hết nước.

Đặc điểm thực vật: Cây cỏ, chiều cao 30-50cm. Rễ mập, màu nâu. Thân cây có khía dọc. Lá mọc so le, mép uốn lượn. Lá gốc to và rộng, cuống dài. Lá giữa và lá ngọn hẹp, gần như không cuống. Hoa màu vàng lục mọc thành xim ở ngọn cành. Quả nhỏ, nhọn đầu, có 3 cạnh bao bọc bởi 3 lá đài, dày.

### 1.2.2. Nghiên cứu về thành phần hóa học, hoạt tính sinh học của chi *Rumex* trên thế giới

Hiện nay nghiên cứu về thành phần hóa học, hoạt tính sinh học cây luối bò là chưa có. Trong nước hiện này mới chỉ nghiên cứu về thành phần hóa học, hoạt tính sinh học cây chút chít nhẵn *Rumex crispus*, một loài cùng chi *Rumex* [19]. Những kết quả nghiên cứu đã chỉ ra thành phần hóa học trong cây trong chi *Rumex* chứa các hợp chất anthraquinone, stilbene, flavol, tannin, dẫn xuất naphthalene, terpene.

#### 1.2.2.1. Một số kết quả nghiên cứu về thành phần hóa học của các loài thuộc chi *Rumex*

Năm 2001, Demirezer và các cộng sự đã tách ra được 2 chất mới là anthraquinone glycoside, emodin-6-O- $\beta$ -D-glucopyranoside (**83**) và flavan-3-ol có chứa Cl, 6-chlorocatechin (**84**) cùng 7 chất đã biết là chrysophanol (**3**), physcion (**4**), emodin (**5**), chrysophanol-8-O- $\beta$ -D-glucopyranoside (**8**), emodin-8-O- $\beta$ -D-glucopyranoside (**23**), catechin (**2**) và orcinol (**85**) từ rễ cây *Rumex patientia* L. [20]

Năm 2001, Demirezer và các cộng sự đã tách ra 3 chất mới là 2-acetyl-3-methyl-6-carboxy-1,8-dihydroxynaphthalene-8-O- $\beta$ -D-glucopyranoside (**86**), 4,4''-binaphthalene-8,8''-O,O-di- $\beta$ -D-glucopyranoside (**87**) và 2-acetyl-3-methyl-1,8-dihydroxynaphthalene-8-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucopyranoside (**88**) cùng 2 naphthalenes đã biết là nepodin-8-O- $\beta$ -D-glucopyranoside (**89**) và torachryson-8-O- $\beta$ -D-glucopyranoside (**21**) từ rễ cây *Rumex patientia* L. [21]

Năm 2002, Gunaydin và các cộng sự đã tách ra 2 hợp chất mới là 1,3,5-trihydroxy-6-hydroxymethylanthraquinone (**90**) và rumexone (**91**) cùng 2 chất đã biết là przewalsquinone B (1,5-dihydroxy-3-methoxy-7-methylanthraquinone) (**92**), ziganein (1,5-dihydroxy-3-methylanthraquinone) (**93**) từ rễ cây *Rumex crispus*. [22]

Năm 2003, Kerem và các cộng sự đã tách ra được 3 hợp chất stilbene gồm 1 chất mới là rumexoid (5,4'-dihydroxystilbene-3-O- $\alpha$ -arabinopyranoside) (**94**) và 2 chất đã biết là resveratrol (**17**), piceid ((5,4'-dihydroxystilbene-3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside) (**95**) từ rễ cây *Rumex bucephalophorus*. [23]

Năm 2005, Jang và các cộng sự đã tách ra được 2 hợp chất mới là 24-norursane type triterpenoids, 2 $\alpha$ ,3 $\alpha$ ,19 $\alpha$ -trihydroxy-24-norurs-4(23),12-dien-28-oic acid (**96**), 4(R),23-epoxy-2 $\alpha$ ,3 $\alpha$ ,19 $\alpha$ -trihydroxy-24-norurs-12-en-28-oic acid (**97**), cùng 3 chất đã

biết là emodin (**5**), tormentic acid (**98**), myrianthic acid (**99**) từ thân cây *Rumex japonicus*. [24]

Năm 2007, Jiang và các cộng sự đã tách ra được 6 hợp chất mới gồm 5 hợp chất oxanthrone C-glycosides là rumejaposide A–E (**100-104**) và 1 hợp chất epoxynaphthoquinol (**105**) cùng 8 hợp chất đã biết là 2,6-dihydroxy benzoic acid (**106**), 4-hydroxy benzoic acid (**107**), 4-hydroxy-3-methoxy benzoic acid (**108**), 2,6-dimethoxy-4-hydroxylbenzoic acid (**109**), epicatechin (**110**), rutin (quercetin-3-rutinoside) (**111**), emodin (**5**), 2-acetyl-1,8-dihydroxy-3-methyl-6-methoxynaphthalene (torachryson) (**112**) từ rễ cây *Rumex japonicus*. [25]

Năm 2009, Zhao và các cộng sự đã tách ra được 1 chất chromone glucoside mới là 2,5-dimethyl-7-hydroxychromone-7-O- $\beta$ -glucopyranoside (**113**) và 5 hợp chất đã biết là nepodin-8-O- $\beta$ -D-glucopyranoside (**89**), 10-hydroxyaloin B (**114**), 10-hydroxyaloin A (**115**), 5-methoxyl-1 (3H) -benzofuranone-7-O- $\beta$ -D-glucopyranoside (**116**), phenylethyl-O- $\alpha$ -L-arabinopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-O- $\beta$ -D-glucopyranoside (**117**) từ rễ cây *Rumex gmelini* Turcz. [26]

Năm 2009, Mei và các cộng sự đã tách ra được 2 hợp chất seco-anthraquinone glucosides mới là nepalensides A (**118**), B (**119**) cùng 9 hợp chất đã biết là torachryson (**112**), rumexoside (**120**), orientaloid (**121**), orcinol glucoside (**122**), aloesin (**123**), lyoniresinol 3 $\alpha$ -O- $\beta$ -D-glucopyranoside (**124**), (3,5-dimethoxy-4-hydroxyphenol)-1-O- $\beta$ -D-(6-O-galloyl)- glucose (**125**), (-)-epicatechin (**110**), (-)-epicatechin-3-O-gallate (**126**), từ cặn chiết butanol của rễ cây *Rumex nepalensis*. [27]

Năm 2010, Liang và các cộng sự đã tác được ra 2 chất mới naphthalene acylglucosides, rumexneposides A (**127**) và B (**128**) cùng 12 hợp chất đã biết là torachryson-8-O- $\beta$ -D-glucopyranoside (**21**), torachryson (**112**), chrysophanol (**3**), physcion (**4**), emodin (**5**), citreorosein (**129**), resveratrol (**17**), nepodin-8-O- $\beta$ -D-glucopyranoside (**89**), chrysophanol-8-O- $\beta$ -D-glucopyranoside (**8**), emodin-8-O- $\beta$ -D-glucopyranoside (**23**), chrysophanol-8-O- $\beta$ -D-(6'-O-acetyl)glucopyranoside (**130**), emodin-8-O- $\beta$ -D-(6'-O-acetyl)glucopyranoside (**131**) từ rễ cây *Rumex nepalensis*. [28]

Năm 2012, Zhang và các cộng sự đã tách ra được 3 hợp chất đã biết là chrysophanol (**3**), 6-methyl-7-acetyl-1,8-dihydroxy-3-methoxynaphthalene-1-O- $\beta$ -

D(L)-glucoside (**21**) và 6-methyl-7-acetyl-1,8-dihydroxynaphthalene-1-O- $\beta$ -D (L)-glucoside (**132**) từ cặn ethyl acetate của rễ cây *Rumex dentatus* L. [29]

Năm 2017, El-Kashak và các cộng sự đã tách được ra được 1 anthraquinones mới ở dạng ion – là rumpictuside A (**133**) và 5 hợp chất flavonoid đã biết là apigenin 7-O- $\beta$ -D-glucoside (**134**), vitexin (apigenin-8-C-glucoside) (**135**), quercetin 3-O- $\beta$ -D-glucouronide (**61**), orientin (**136**), và isorientin (**137**) từ loài *Rumex pictus*. [30]

Năm 2017, Orbán-Gyapai và các cộng sự đã tách ra được 19 chất gồm 4 hợp chất naphthalenes là musizin (**138**), musizin 8-O- glucoside (**132**), torachryson-glucoside (**21**), 2-methoxystypandrone (**139**), 5 hợp chất anthraquinones là chrysophanol (**3**), physcion (**4**), emodin (**5**), citreorosein (**129**), chrysophanol-8-O-glucoside (**8**), 6 hợp chất flavonoid là quercetin (**140**), quercetin-3,3'-dimethylether (**141**), isokaempferide (**142**), quercetin 3-O-arabinoside (**143**), quercetin 3-O-galactoside (**144**), catechin (**2**), 2 hợp chất stilbenes là resveratrol (**17**), piceid (**95**) và 1-stearoylglycerol (**145**) từ cây *Rumex aquaticus*. [31]

Năm 2021, Kengne và các cộng sự đã tách ra được 7 hợp chất đã biết là chrysophanol (**3**), physcion (**4**), emodin (**5**), 6-hydroxyemodin (citreorosein) (**129**), chrysophanein (**8**), physcionin (**22**) ergosta-6,22-diene-3,5,8-triol (**146**) từ phần dịch chiết ethyl acetate của cây *R. abyssinicus*. [32]

Năm 2020, Shafiq và các cộng sự tách ra được 4 hợp chất đã biết là chrysophanol (1,8-dihydroxy-3-methyl-anthraquinone) (**3**), 3-methoxy-7-methyl-1,5-dihydroxy-anthraquinone (**147**), 6-methyl-1,3,7-trihydroxy-anthraquinone (**148**) và 4-hydroxycinnamic acid (**81**) từ cây *Rumex hastatus*. [33]

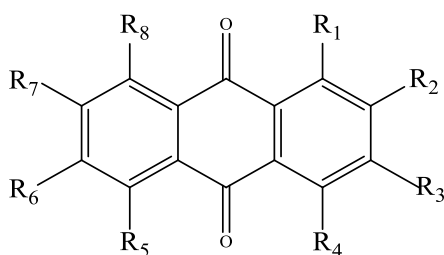
Năm 2021, Tsamo và các cộng sự đã tách ra được 1 creamide mới, rumexamide (**149**) cùng 16 chất đã biết là bis-(2-ethylhexyl) phthalate (**150**), chrysophanol (**3**), physcion (**4**), citreorosein (**129**), emodin (**5**), chrysophanein (**8**), physcionin (**22**), lupeol (**151**), 3 $\beta$ ,28-dihydroxylup-20(29)-ene (**152**), 3 $\beta$ -dihydroxylup-20(29)-en-28-oic acid (**153**), oleanolic acid (**154**), ergosta-6,22-diene-3,5,8-triol (**146**), stigmastane-3,6-dione (**155**), 1 hỗn hợp  $\beta$ -sitosterol (**156**) và stigmasterol (**157**) cùng stigmasterol 3-O- $\beta$ -D-glucoside (**158**) từ cây *Rumex abyssinicus* Jacq. [34]

Năm 2022, Li và các cộng sự đã tách được 14 chất trong đó có 4 chất mới gồm 1 hợp chất seco-anthraquinone glucoside, crispuside A (**159**), 3 hợp chất 3,4-

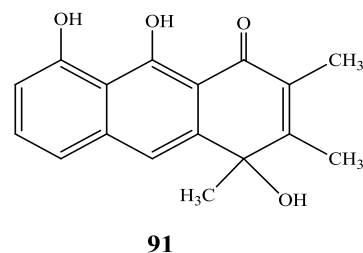
dihydronaphthalen-1(2*H*)-ones, naphthalenones A-C (**160-162**) và 10 chất đã biết là 3-acetyl-2-methyl-1,4,5-trihydroxy-2,3-epoxynaphthoquinol (**105**), nepalensides A (**118**), B (**119**), polyanthraquinoside A (**163**), chrysophanol (**3**), physcion (**4**), emodin (**5**), emodin-1-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside (**59**), 6-methoxyl-10-hydroxyaloin B (**164**), (10*R*)-3-methyl-1,8,10-trihydroxy-10-*D*-glucopyranosyl-9(10*H*)-anthracenone (**165**) từ rễ cây *Rumex crispus* L. [35]

Năm 2022, Aierken và các cộng sự đã tách được 19 chất trong đó có 3 chất mới là rumexs A – C (**166-168**) và 16 chất đã biết là rumejaposide E (**169**), rumejaposide F (**170**) patientoside A (**171**), chrysophanol-8-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside (**8**), chrysophanol (**3**), chrysophanol-8-me ether (**172**), emodin (**5**), alo-emodin (**7**), isorhodoptilometrins (**173**), fallacinal (**174**), citreorosein (**129**), 2-methoxy-6-acetyl-7-methyljuglone (**175**), nepodin (**138**), naringenin (**176**), 2,5-dimethyl-7-hydroxychromone (**177**) và grossamide (**178**) từ phần rễ cây *Rumex dentatus* L bằng HPLC. [36]

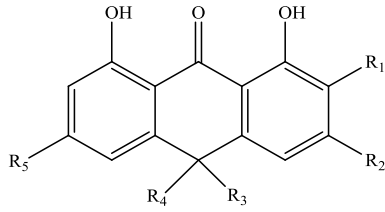
Hình 1.7. Các hợp chất anthraquinone và các dẫn xuất từ chi *Rumex*



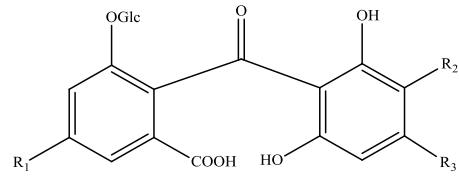
- 83**  $R_1=R_8=OH$   $R_2=R_4=R_5=R_7=H$   $R_3=CH_3$   $R_6=OGlc$   
**90**  $R_1=R_3=R_5=OH$   $R_2=R_4=R_7=R_8=H$   $R_6=CH_2OH$   
**92**  $R_1=OH$   $R_2=R_4=R_6=R_8=H$   $R_3=OCH_3$   $R_5=OH$   $R_7=CH_3$   
**93**  $R_1=OH$   $R_2=R_4=R_6=R_7=R_8=H$   $R_3=CH_3$   $R_5=OH$   
**129**  $R_1=R_3=R_8=OH$   $R_2=R_4=R_5=R_7=H$   $R_6=CH_2OH$   
**130**  $R_1=OH$   $R_7=R_4=R_5=R_6=R_7=H$   $R_3=CH_3$   $R_8=OGlc^6-OAc$   
**131**  $R_1=R_6=OH$   $R_2=R_4=R_5=R_7=H$   $R_3=CH_3$   $R_8=OGlc^6-OAc$   
**133**  $R_1=OH$   $R_2=R_4=R_5=R_7=H$   $R_3=CH_3$   $R_6=Glc$   $R_8=O^-$   
**147**  $R_1=R_5=OH$   $R_3=OCH_3$   $R_7=CH_3$   $R_2=R_4=R_6=R_8=H$   
**148**  $R_1=R_3=R_7=OH$   $R_6=CH_3$   $R_2=R_4=R_5=R_8=H$   
**172**  $R_1=OH$   $R_2=R_4=R_5=R_6=R_7=H$   $R_3=CH_3$   $R_8=OCH_3$   
**173**  $R_1=R_6=R_8=OH$   $R_2=R_4=R_5=R_7=H$   $R_3=CH_2CH(CH_3)OH$   
**174**  $R_1=R_8=OH$   $R_2=R_4=R_5=R_7=H$   $R_3=CHO$   $R_6=OCH_3$



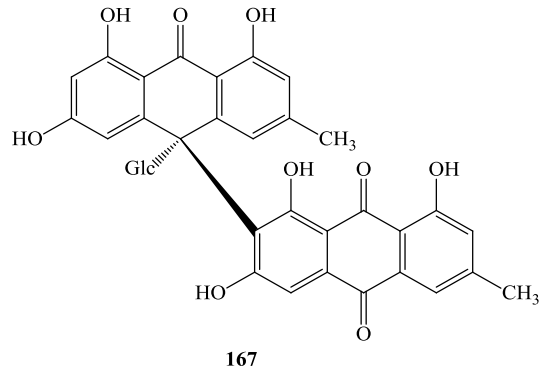
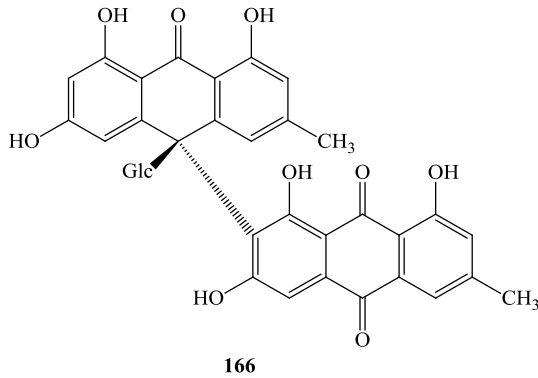
**91**



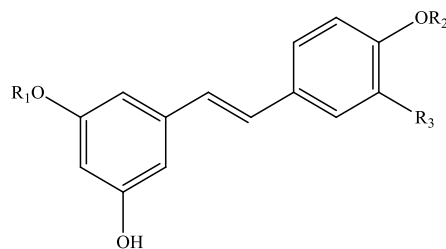
- 100**  $R_1 = \text{COOH}$   $R_2 = \text{CH}_3$   $R_3 = \text{OH}$   $R_4 = \text{Glc}$   $R_5 = \text{H}$  (10R)  
**101**  $R_1 = \text{COOH}$   $R_2 = \text{CH}_3$   $R_3 = \text{OH}$   $R_4 = \text{Glc}$   $R_5 = \text{H}$  (10S)  
**102**  $R_1 = \text{COOH}$   $R_2 = \text{CH}_3$   $R_3 = \text{OH}$   $R_4 = \text{Glc}$   $R_5 = \text{OH}$  (10R)  
**103**  $R_1 = \text{H}$   $R_2 = \text{CH}_2\text{OH}$   $R_3 = \text{OH}$   $R_4 = \text{Glc}$   $R_5 = \text{OH}$  (10R)  
**104**  $R_1 = \text{H}$   $R_2 = \text{CH}_3$   $R_3 = \text{OH}$   $R_4 = \text{Glc}$   $R_5 = \text{OH}$   
**114**  $R_1 = \text{H}$   $R_2 = \text{H}$   $R_3 = \text{OH}$   $R_4 = \text{Glc}$   $R_5 = \text{CH}_2\text{OH}$   
**115**  $R_1 = \text{H}$   $R_2 = \text{H}$   $R_3 = \text{Glc}$   $R_4 = \text{OH}$   $R_5 = \text{CH}_2\text{OH}$   
**164**  $R_1 = \text{H}$   $R_2 = \text{CH}_2\text{OH}$   $R_3 = \text{OH}$   $R_4 = \text{Glc}$   $R_5 = \text{OCH}_3$   
**165**  $R_1 = \text{H}$   $R_2 = \text{CH}_3$   $R_3 = \text{OH}$   $R_4 = \text{Glc}$   $R_5 = \text{H}$   
**169**  $R_1 = \text{H}$   $R_2 = \text{CH}_3$   $R_3 = \text{OH}$   $R_4 = \text{Glc}$   $R_5 = \text{OH}$   
**170**  $R_1 = \text{H}$   $R_2 = \text{CH}_3$   $R_3 = \text{OH}$   $R_4 = \text{Glc}$   $R_5 = \text{OH}$   
**171**  $R_1 = \text{H}$   $R_2 = \text{CH}_3$   $R_3 = \text{OH}$   $R_4 = \text{Glc}$   $R_5 = \text{OCH}_3$  10R patientoside A



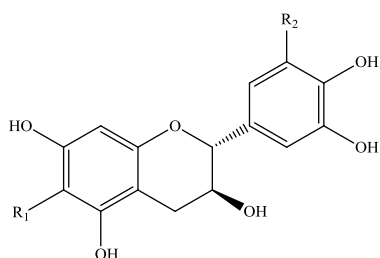
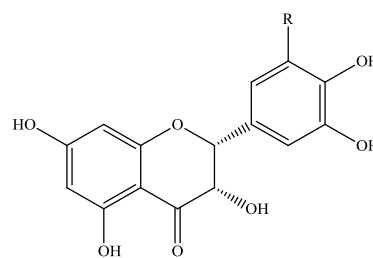
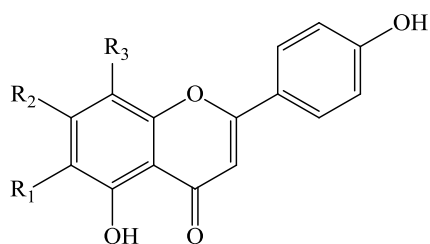
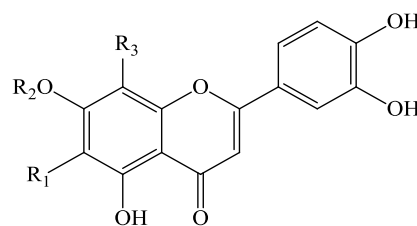
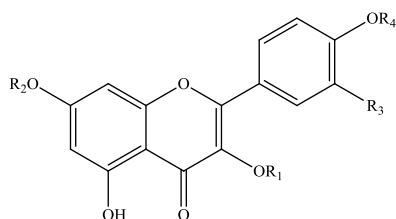
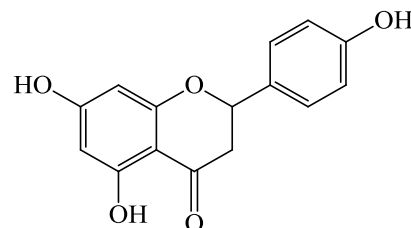
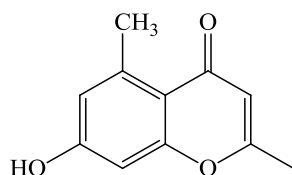
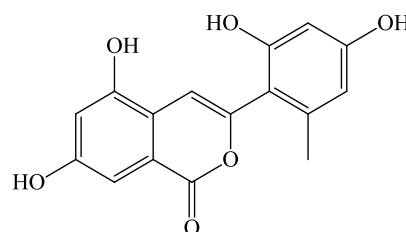
- 118**  $R_1 = \text{CH}_3$ ,  $R_2 = R_3 = \text{H}$ , nepalenside A  
**119**  $R_1 = \text{H}$ ,  $R_2 = \text{H}$   $R_3 = \text{CH}_3$ , nepalenside B  
**159**  $R_1 = \text{CH}_3$ ,  $R_2 = \text{OH}$ ,  $R_3 = \text{H}$  crispuside A  
**163**  $R_1 = \text{OCH}_3$ ,  $R_2 = R_3 = \text{H}$  polyanthraquinoside A

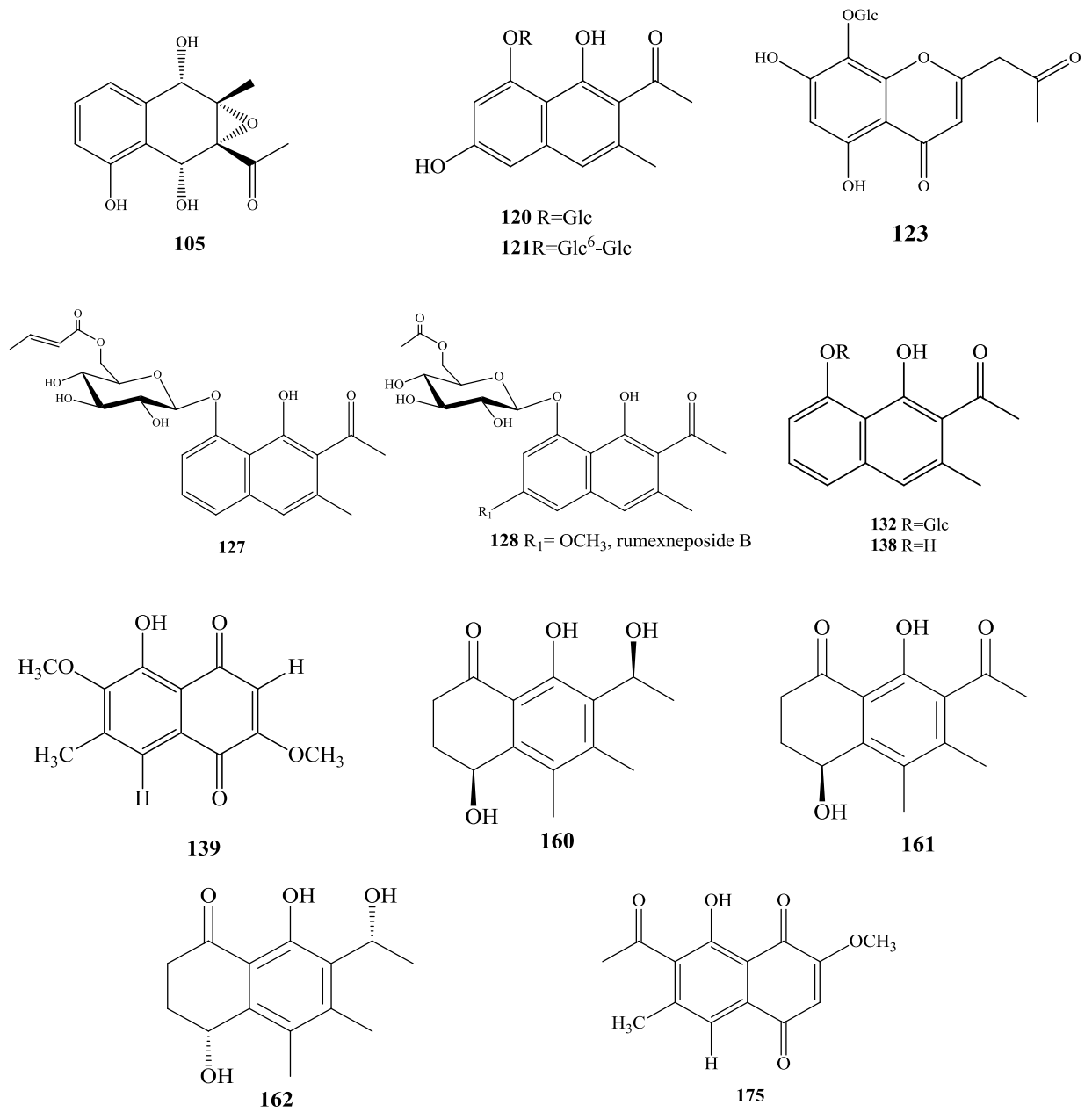
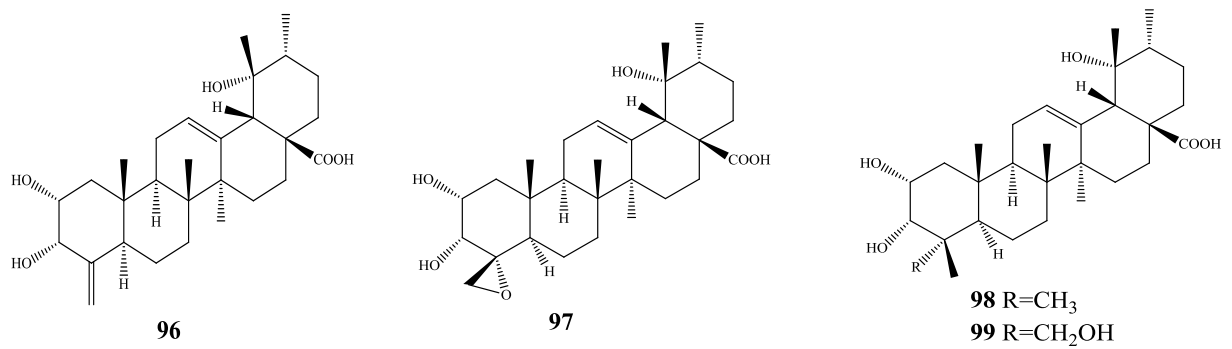


Hình 1 8. Các hợp chất stilbene từ chi *Rumex*



- 94**  $R_1 = \text{Ara}$   $R_2 = \text{H}$   $R_3 = \text{H}$  rumexoid  
**95**  $R_1 = \text{Glc}$   $R_2 = \text{H}$   $R_3 = \text{H}$

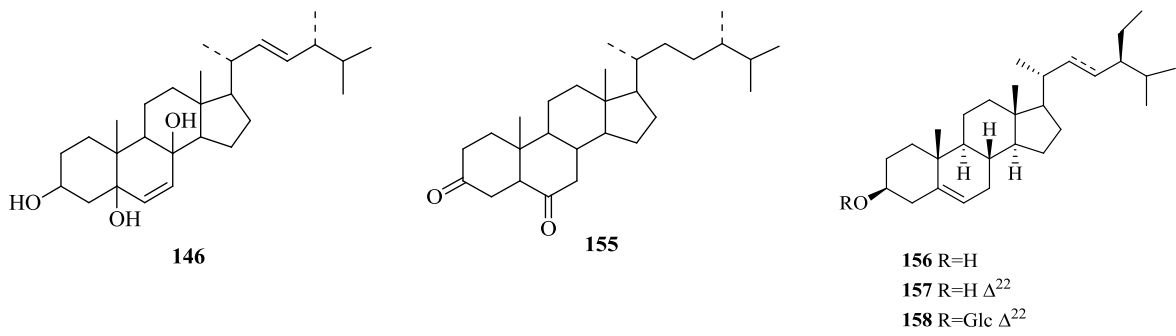
Hình 1.9. Các hợp chất flavol từ chi *Rumex***84** R<sub>1</sub>= Cl R<sub>2</sub>= H 6-chlorocatechin**110** R= H epicatechin**126** R= OH epigallocatechin**134** R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>= OGlc R<sub>3</sub>= H**135** R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>= OH R<sub>3</sub>= Glc vitexin**136** R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>=H R<sub>3</sub>= Glc orientin**137** R<sub>1</sub>= Glc R<sub>2</sub>=R<sub>3</sub>=H isoorientin**140** R<sub>1</sub>= H R<sub>2</sub>= H R<sub>3</sub>= OH R<sub>4</sub>=H quercetin**141** R<sub>1</sub>= CH<sub>3</sub> R<sub>2</sub>= H R<sub>3</sub>= OCH<sub>3</sub> R<sub>4</sub>=H**142** R<sub>1</sub>= CH<sub>3</sub> R<sub>2</sub>= H R<sub>3</sub>= R<sub>4</sub>=H**143** R<sub>1</sub>= Ara R<sub>2</sub>= H R<sub>3</sub>= OH R<sub>4</sub>=H**144** R<sub>1</sub>= Gal R<sub>2</sub>= H R<sub>3</sub>= OH R<sub>4</sub>=H**176**Hình 1.10. Hợp chất chrome từ chi *Rumex***113** R=Glc**177** R=H**168**

Hình 1.11. Các hợp chất naphthalene từ chi *Rumex*Hình 1.12. Các hợp chất terpene từ chi *Rumex*

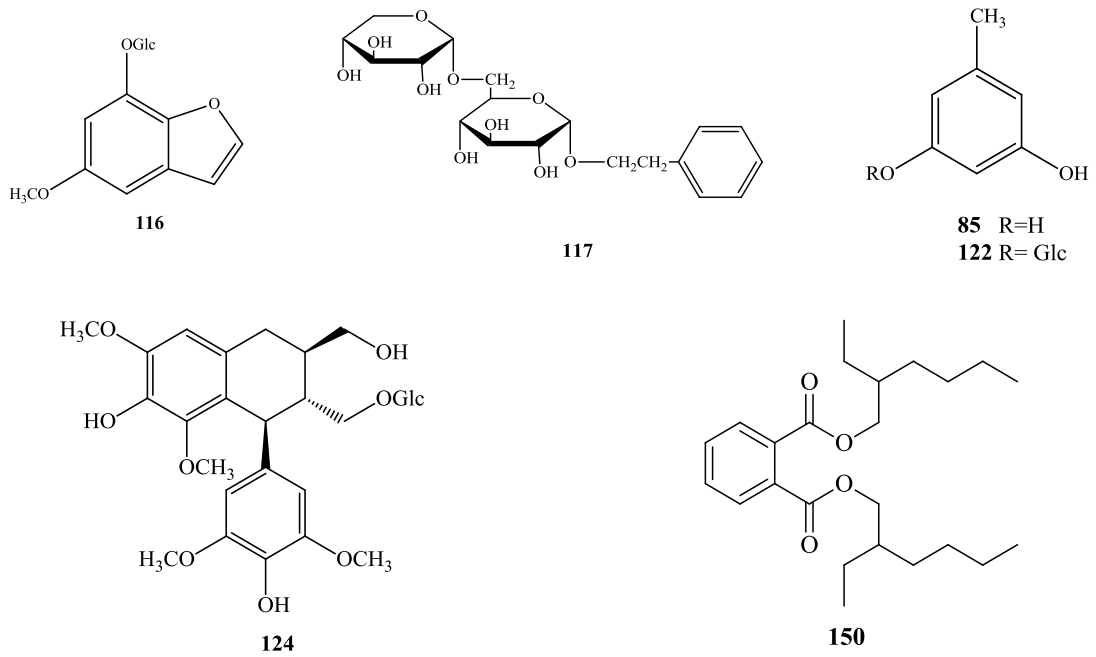


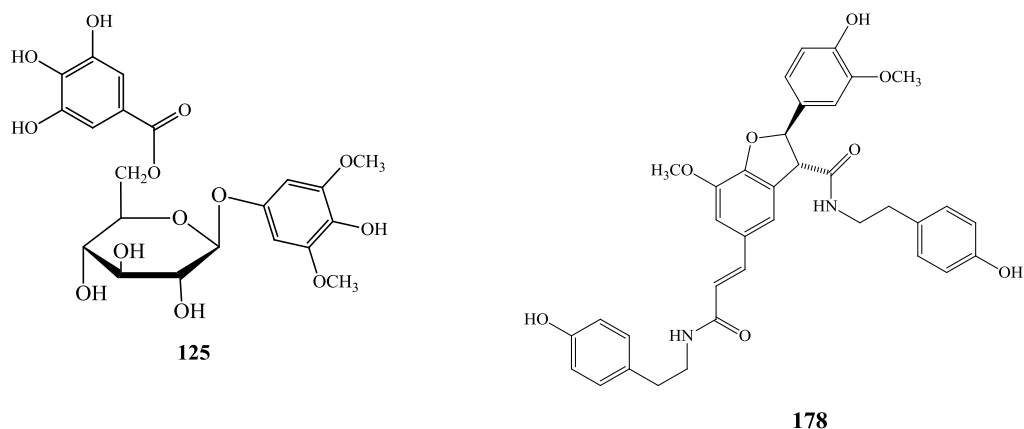


Hình 1.13. Các hợp chất sterol từ chi *Rumex*

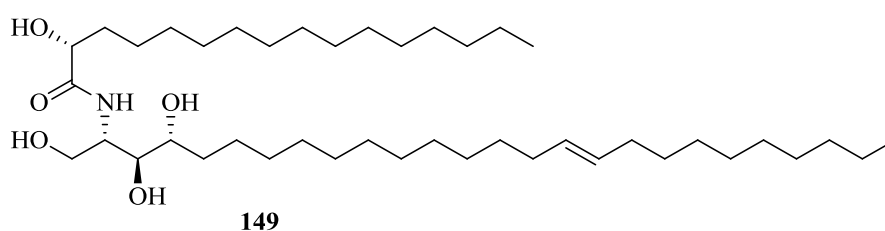


Hình 1.14. Các hợp chất phenolic khác từ chi *Rumex*





Hình 1.15. Hợp chất creamide từ chi *Rumex*



1.2.2.2. Hoạt tính kháng vi sinh vật của các chất phân lập được và cao chiết từ cây lười bò trên thế giới

#### 1.2.2.2.1. Hoạt tính kháng nấm

Năm 2009, Kisangau và các cộng sự đã tiến hành thử hoạt tính của dịch chiết nước và dịch chiết  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  của 9 loài cây dược liệu ở Tanzania. Kết quả thể hiện dịch chiết  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  từ lá của cây *R. usambarensis* thể hiện hoạt tính ức chế sự phát triển của nấm *A. niger* (đường kính vùng kìm hãm = 17 mm với phương pháp giếng agar và = 12 mm với phương pháp khuếch tán đĩa thạch với nồng độ thử là 130 mg/mL) với fluconazole được sử dụng là chất đối chứng dương (đường kính vùng kìm hãm 32.5 và 27 mm ở nồng độ 2  $\mu\text{g/mL}$ ). [37]

Năm 2013, Humeera và các cộng sự cũng tiến hành đánh giá hoạt tính của dịch chiết chiết cồn của cây *R. dentatus* đối với các chủng nấm *A. versicolor*, *A. flavus*, *Acremonium spp.*, *Penicillium dimorphosporum*, *Candida albicans*, *C. kruesie* và *C. parapsilosis*. Kết quả cho thấy hoạt tính mạnh nhất được thể hiện đối với chủng nấm *C. albicans* (14 $\pm$ 2.0 mm ở nồng độ 500  $\mu\text{g/mL}$ ). [38]

#### 1.2.2.2.2. Hoạt tính kháng vi khuẩn

Năm 2005, Elzaawely và các cộng sự đã tiến hành thử hoạt tính kháng vi khuẩn của các phân đoạn khác nhau của cây *R. japonicus* đối với các chủng vi khuẩn *B. subtilis*, *B. cereus* và *E. coli*, với ampicillin như là chất đối chứng dương [đường kính kìm hãm =  $35 \pm 0.50$  mm (*B. subtilis*);  $22 \pm 0.88$  mm (*B. cereus*);  $33 \pm 1.45$  mm (*E. coli*)]. Kết quả thử nghiệm cho thấy phần dịch chiết ethyl acetate thể hiện hoạt tính kìm hãm mạnh [đường kính kìm hãm =  $15 \pm 0.33$  mm (*B. subtilis*);  $17 \pm 0.33$  mm (*B. cereus*); and  $20 \pm 0.88$  mm (*E. coli*)]. [39]

Năm 2010, Harshaw và các cộng sự đã tiến hành thử các dịch chiết của cây *R. obtusifolius* (n-hexane,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  và MeOH) đối với các chủng vi khuẩn khác nhau bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch với ciprofloxacin được sử dụng như chất đối chứng dương. Kết quả thử nghiệm cho thấy dịch chiết n-hexane không thể hiện hoạt tính ở các nồng độ thử, dịch chiết  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  chỉ thể hiện hoạt tính với chủng *E. coli* (đường kính vùng kìm hãm = 10 mm) và dịch chiết MeOH thể hiện hoạt tính với tất cả các chủng thử nghiệm *B. cereus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *E. coli* kháng ampicillin, *S. aureus* và *S. typhi*. [40]

Năm 2013, Humeera và các cộng sự đã tiến hành thử đánh giá ảnh hưởng của dịch chiết cùi của cây *R. dentatus* đối với các chủng vi khuẩn *Shigella flexneri*, *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* và *S. aureus* theo phương pháp khuếch tán bề mặt thạch agar với gentamycin được sử dụng như chất đối chứng dương. Dịch chiết cùi thể hiện hoạt tính kìm hãm đối với tất cả các chủng thử nghiệm ngoại trừ chủng *S. flexneri* và *S. typhimurium*. Đường kính vùng kìm hãm cao nhất ( $24 \pm 0.57$  mm) được xác định đối với chủng *P. aeruginosa* ở nồng độ 500  $\mu\text{g/mL}$ . [38]

Năm 2014, Akeel và các cộng sự tiến hành thử hoạt tính của dịch chiết protenin từ 6 loài cây dược liệu với dung dịch đệm sodiumphosphate–citrate và sodium acetate ở các giá trị pH khác nhau. Kết quả thử cho thấy *R. vesicarius* (ở giá trị pH=7.6) có hoạt tính đối với các chủng thử với đường kính kìm hãm = 16 mm (*S. aureus*), 7.5 mm (*P. aeruginosa*) và 15 mm (*Proteus vulgaris*) ở nồng độ 2.73  $\mu\text{g/mL}$ . [41]

Năm 2022, Aierken và các cộng sự đã tiến hành thử hoạt tính của 19 chất phân lập được từ cây *R. dentatus* L đối với các chủng vi khuẩn *S. aureus*, *C. albicans*, và *E.*

*coli* ở nồng độ 50 mM. Kết quả cho thấy hợp chất 14 thể hiện hoạt tính đối với cả 3 chủng vi khuẩn. Các hợp chất thể hiện hoạt tính kìm hãm với chủng *S. aureus* với đường kính kìm hãm thay đổi từ 9-28 mm. [36]

Tổng quan về thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của chi *Rumex* được thể hiện trong các tài liệu [42], [43].

### **1.3. Các nghiên cứu về cây muồng trâu *Senna alata* (L.) Roxb**

#### **1.3.1. Giới thiệu về chi *Cassia* và cây muồng trâu *Senna alata* (L.) Roxb**

Chi *Cassia* là nhóm các loài thực vật có hoa, quả và hạt kín, là một trong khoảng 20 chi thuộc tông Cassieae, một trong bốn tông thuộc phân họ Vang (Caesalpinioideae). Phân họ Vang là một trong ba phân họ lớn của họ đậu (Fabaceae). Chi *Cassia* với xấp xỉ 500 loài, là chi lớn trong họ đậu (Fabaceae). Theo bộ cơ sở dữ liệu về danh sách thực vật “The plant list” thì hiện nay chi này có đến 1854 tên loài, trong số đó chỉ có 86 tên loài được chấp nhận chính thức như *Cassia abbreviata* Oliv., *C. aciphylla* A. Gray., *C. fistula* L., *C. javanica* L., *C. phyllodinea* R.Br., *C. renigera* Benth., *C. stowardii* S. Moore số còn lại được cho là đồng danh.

#### **Giới thiệu về cây muồng trâu**

Muồng trâu, hay còn gọi là Muồng lác, cây Lác có tên khoa học là *Senna alata* (L.) Roxb. (*Cassia alata* L là tên đồng danh của *Senna alata* (L.) Roxb được sử dụng khá phổ biến), là một cây thuộc phân họ Vang Caesalpinioideae (Fabaceae), cây nhiệt đới có nguồn gốc bản địa của Mehicô, ngày nay trở thành loại cây liên nhiệt đới, mọc hoang ở nhiều nơi có độ cao trên 1000m.

Muồng trâu là thực vật thân nhỡ, chiều cao trong khoảng 1.5 – 3 m. Thân cây dạng gỗ mềm, đường kính từ 10 – 18cm. Lá kép lông chim, có khoảng 8 – 14 đôi lá chét và dài từ 30 – 40cm. Lá chét có hình trứng, đầu và gốc lá đều tròn. Cặp lá chét đầu tiên (tính từ phía cuống) có kích thước nhỏ nhất và cách cặp lá chét thứ 2 xa hơn so với khoảng cách giữa các cặp lá chét tiếp theo.

Lá chét càng xa thì kích thước càng lớn, có thể rộng 5 – 6 cm và dài 12 – 14 cm. Hoa mọc thành cụm có nhiều bông, dài khoảng 30 – 40 cm và có màu vàng sẫm hoặc vàng nâu nhạt. Quả hình hạt đậu, rộng 15 – 17 mm và dài 8 – 16 cm, bên trong có khoảng 60 hạt nhỏ.

Hiện nay cây được trồng ở một số vùng ở Việt Nam như Bắc Giang, Đắc Lắc, Khánh Hòa, Lâm Đồng, Bình Phước...

### ***1.3.2. Nghiên cứu về thành phần hóa học, hoạt tính sinh học cây muồng trâu trên thế giới***

#### ***1.3.2.1. Nghiên cứu về thành phần hóa học của cây muồng trâu trên thế giới***

Năm 1991, Gupta và các cộng sự đã tách ra được 2 flavonoid glycoside là chrysoeriol-7-O-(2''-O- $\beta$ -D-mannopyranosyl)- $\beta$ -D-allopyranoside (**179**) và rhamnetin-3-O-(2''-O- $\beta$ -D-mannopyranosyl)- $\beta$ -D-allopyranoside (**180**) từ hạt cây *C.alata*. [44]

Năm 1993, Hemlata và các cộng sự đã tách ra được 1,5,7-trihydroxy-3-methylantraquinone (alatinone) (**181**) từ thân cây *C.alata*. [45]

Năm 2008, Hazni và các cộng sự đã tách được 4 chất đã biết từ cặn chiết butanol của lá cây *Cassia alata* là aloe emodin (**7**) và 3 hợp chất flavol là kaempferol (**182**), kaempferol 3-O- $\beta$ -glucopyranoside (**183**), kaempferol 3-O-gentiobioside (**184**). [46]

Năm 2009, An và các cộng sự đã tách được 12 hợp chất đã biết từ lá cây *Cassia alata* là chrysoeriol (**185**), 5,7,4'-trihydroflavanone (**186**), quercetin (**140**), kaempferol (**182**), kaempferol-3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside (**183**), kaempferol-3-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopyranoside (**184**), 17-hydrotetatriacontane (**187**), n-dotriacontanol ( $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{30}\text{CH}_2\text{OH}$ ) (**188**), n-triacontanol ( $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{28}\text{CH}_2\text{OH}$ ) (**189**), palmitic acid ceryl ester ( $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOCH}_2(\text{CH}_2)_{24}\text{CH}_3$ ) (**190**), stearic acid ( $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$ ) (**191**), palmitic acid ( $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$ ) (**192**). [47]

Năm 2013, Yadav đã tách ra được 3 hợp chất đã biết là alanonal (**193**), stearic acid (**191**), và  $\beta$ -sitosterol- $\beta$ -D-glucoside (**194**) từ hoa của cây *C.alata*. [48]

Năm 2014, Promgool và các cộng sự đã tách ra được 6 hợp chất anthraquinones đã biết: physcion (**4**), emodin (**5**), aloe-emodin (**7**), ziganein (**93**),  $\omega$ -hydroxyemodin (**129**), lunatin (**195**), 6 hợp chất flavonoids: kaempferol (**182**), apigenin (**196**), 7,4'-dihydroxy-5-methoxyflavone (**197**), diosmetin (**198**), luteolin (**199**), trans-dihydrokaempferol (**200**) cùng stilbene, trans-resveratrol (**17**) từ *Cassia alata* Linn. [49]

Năm 2020, Zhou và các cộng sự đã tách được 2 hetero-dimeric polyphenol với liên kết C-14-C-5' là alatains A (**201**), B (**202**) từ thân cây *Cassia alata*. [50]

Năm 2021, Fotso và các cộng sự đã tách ra được 20 chất đã biết gồm 1 hợp chất acid béo là cerotic acid ( $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{24}\text{COOH}$ ) (**203**), 1 hợp chất monoglycol ester là glyceryl-1-hexacosanoate ( $\text{CH}_2\text{OHCHOHCH}_2\text{OOC}(\text{CH}_2)_{23}\text{CH}_3$ ) (**204**), 3 hợp chất diterpene là copalic acid (**205**), 3- $\beta$ -acetoxycopalic acid (**206**) ent-15-oxo-kaur-16-en-19-oic acid (**207**), 4 hợp chất steroid gồm 1 hỗn hợp  $\beta$ -sitosterol (**156**) và stigmasterol (**157**),  $\beta$ -sitosterol-3-*O*-glucoside (**194**), campesterol (**208**) 4 hợp chất triterpenes là lupeol (**151**), betulin (**152**), betulinic acid (**153**), taraxerol (**209**), 3 hợp chất flavonoid là apigenin (**196**), luteolin (**199**), kaempferol (**182**), 3 hợp chất anthraquinone là chrysophanol (**3**), emodin (**5**) alatinone (**181**) và 1 hợp chất benzoquinone là 2,6-dimethoxybenzoquinone (**210**) từ lá và thân cây *Senna alata*. [51]

Năm 2022, Zhou và các cộng sự đã tách được 5 chất mới gồm 3 indole alkaloids là alataindoleins A–C (**211–213**); 1 hợp chất chromone là alatachromone A (**214**) và 1 hợp chất dimeric chromone-indole alkaloid là alataindolein D (**215**) cùng 4 chất đã biết **216-219** là từ thân cây *C. alata*. [52]

Năm 2022, Shi và các cộng sự sử dụng pre-HPLC đã tách được 2 hợp chất anthraquinone mới là 2,6-dimethyl-3-hydroxy-5-methoxyanthraquinone (**220**) và 2,5-dimethyl-6-hydroxy-3-methoxyanthraquinone (**221**) từ cặn chiết ethanol 95% của mẫu lá cây muồng trâu *C. alata*. [53]

1.3.2.2. Hoạt tính kháng vi sinh vật của các chất phân lập được và cao chiết từ cây muồng trâu trên thế giới

1.3.2.2.1. Hoạt tính kháng nấm

Năm 2004, Phongpaichit và các cộng sự đã tiến hành thử hoạt tính của dịch chiết MeOH từ lá cây *Cassia alata* đối với các chủng nấm *Microsporium gypseum*, *Trichophyton rubrum*, *Penicillium marneffe*. Kết quả thử cho thấy dịch chiết từ lá có hiệu quả đối với các chủng *T. rubrum* và *M. gypseum* với giá trị  $\text{IC}_{50}$  lần lượt là 0.5 và 0.8 mg/ml. [54]

Năm 2008, Abubacker và các cộng sự đã tiến hành thử hoạt tính của dịch chiết nước từ hoa của cây *C. alata* đối với ba nhóm nấm gây khác nhau gồm nấm tạo độc tố aflatoxin *Aspergillus flavus* (NCBT 101) và *A. parasiticus* (NCBT 128), nấm gây bệnh trên cây trồng *Fusarium oxysporum* (NCBT 156) và *Helminthosporium oryzae* (NCBT 165), nấm gây bệnh trên người *Candida albicans* (NCBT 140)

và *Microsporium audouinii* (NCBT 173). Kết quả thử cho thấy chủng nấm tạo aflatoxin bị kìm hãm hoàn toàn sự phát triển ở các nồng độ 10 và 15 mg/ml của dịch chiết, trong khi các chủng nấm khác chỉ bị kìm hãm ở nồng độ 15 mg/ml. Giá trị nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của dịch chiết thay đổi từ 5.75 đến 8.00 mg/ml đối với các loại nấm tạo aflatoxin. [55]

Năm 2010, Wuthi-Udomlert và các cộng sự đã tiến hành thử hoạt tính của dịch chiết và các hợp chất phân lập được từ cây đối với các chủng nấm *Trichophyton rubrum*, *T. mentagrophytes*, *Epidermophyton floccosum*, *Microsporium gypseum*. Kết quả thử cho thấy phần dịch chiết có anthraquinone aglycone từ phần dịch chiết glycosidic có hoạt tính mạnh hơn cả đối với các chủng nấm thử. [56]

Năm 2020, Legaspi và các cộng sự đã tiến hành thử hoạt tính của đối với một số chủng nấm của các dịch chiết khác nhau của cây *S. alata*. Kết quả cho thấy, dịch chiết ethanol thể hiện hoạt tính tốt hơn so với dịch chiết methanol, hexane và dịch chiết nước. Hoạt tính kháng nấm tốt thể hiện trên một số chủng *Aspergillus spp*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Epidermophyton floccosum*, *Microsporium spp.*, *Trichophyton spp*, *Penicillium marneffe* với giá trị MIC thay đổi từ 3.5 mg/mL đến 125 mg/mL. [57]

#### 1.3.2.2.2. Hoạt tính kháng vi khuẩn

Năm 2001, Khan và các cộng sự đã tiến hành thử hoạt tính vi khuẩn đối với một số chủng vi khuẩn gram + và gram – các dịch chiết MeOH của các bộ phận hoa, lá, rễ và thân cây *Cassia alata*. Kết quả thử nghiệm cho thấy hoạt tính kháng khuẩn tăng dần theo độ phân cực của các phân đoạn petrol, dichloromethane, ethyl acetate. Phân đoạn dichloromethane của phần hoa thể hiện hoạt tính mạnh hơn cả. [58]

Năm 2003, Somchit và các cộng sự đã tiến hành thử hoạt tính *in vitro* đối với các vi khuẩn *Staphylococcus aureus* và *Escherichia coli* dịch chiết cồn và dịch chiết nước của phần lá và thân cây *Cassia alata*. Kết quả thử nghiệm cho thấy phần dịch chiết từ lá cây thể hiện hoạt tính đối với vi khuẩn *S.aureus*. [59]

Năm 2008, Adedayo và các cộng sự đã tiến hành thử hoạt tính của phần dịch chiết tổng và các phân đoạn từ hoa của cây *Senna alata* đối với 22 chủng vi khuẩn. Kết quả thử cho thấy, phần dịch chiết tổng có các thành phần steroid, anthraquinone glycoside, chất dầu và tannin thể hiện hoạt tính với MIC 500 µg/mL đối với các chủng

*S.aureus*, *S.faecalis*, *M.luteus*, *B.subtilis*, *P.putida*. Dịch chiết từ mẫu hoa của cây cũng thể hiện hoạt tính yếu đối với các chủng *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *P.aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *P.fluoroscens*. [60]

Năm 2012, Saito và các cộng sự đã tiến hành thử hoạt tính của dịch chiết nước của lá cây *C. alata*. Kết quả thử cho thấy hoạt tính kháng khuẩn đối với các chủng *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, *S. aureus*, *Bacillus subtilis*. Phần dịch chiết từ lá kìm hãm sự hình thành màng sinh học ở chủng *S. epidermis*, *P. aeruginosa*. [61]

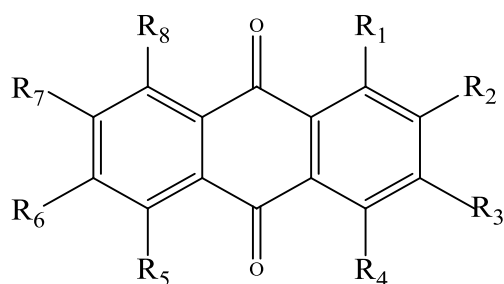
Năm 2013, Ogunjobi và các cộng sự đã tiến hành thử hoạt tính của dịch chiết ethanol và dịch chiết nước của cây *Senna alata* đối với các chủng vi sinh vật *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Candida albicans*. Kết quả thử cho thấy các dịch chiết từ cây có hoạt tính kháng vi khuẩn, với hoạt tính kháng khuẩn mạnh nhất của dịch chiết nước đối với chủng *S. typhimurium* với đường kính vùng kìm hãm 10.1 mm. [62]

Năm 2015, Igwe các cộng sự đã tiến hành thử hoạt tính kháng vi khuẩn của dầu từ lá của cây *Senna alata* Linn theo phương pháp khuếch tán trên đĩa. Kết quả thử cho thấy hoạt tính kháng khuẩn đối với các chủng *S. aureus*, *S. faecalis*, *E. coli*, *P. mirabilis* của phần dầu này. [63]

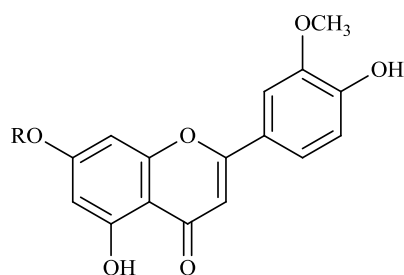
Năm 2022, Shi và các cộng sự đã tiến hành thử hoạt tính kháng vi khuẩn với 11 chủng khác nhau được phân lập từ nước bọt của những người hút thuốc đối với 2 chất mới là 2,6-dimethyl-3-hydroxy-5-methoxyanthraquinone (**220**) và 2,5-dimethyl-6-hydroxy-3-methoxyanthraquinone (**221**). Kết quả thử hoạt tính thể hiện hoạt tính kháng vi khuẩn mạnh với đường kính kìm hãm thay đổi từ  $8.3 \pm 0.29$  và  $35.2 \pm 0.08$  mm. [53]

Tổng quan về thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của các loài trong chi *Cassia* được thể hiện trong các tài liệu [64], [65], [66], [67]. Giúp cho so sánh thành phần và hoạt tính sinh học của cây muồng trâu *S. alata* (*C. alata*).



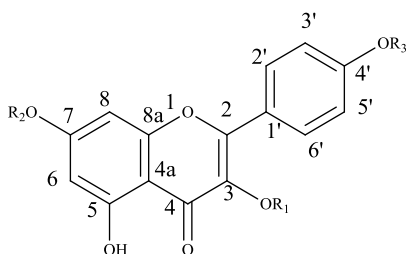
Hình 1.16. Các hợp chất anthraquinone và các dẫn xuất từ cây muồng trâu *S.alata*.

- 181**  $R_1=R_5=R_7=OH$   $R_2=R_4=R_6=R_8=H$   $R_3=CH_3$   
**193**  $R_1=R_3=R_8=OH$   $R_4=R_5=R_6=R_7=H$   $R_2=CHO$  alanonal  
**195**  $R_1=R_3=R_8=OH$   $R_2=R_4=R_5=R_7=H$   $R_6=CH_3$  lunatin  
**220**  $R_1=R_4=R_7=R_8=H$   $R_2=R_6=CH_3$   $R_3=OH$   $R_5=OCH_3$   
**221**  $R_1=R_4=R_7=R_8=H$   $R_2=R_5=CH_3$   $R_3=OCH_3$   $R_6=OH$

Hình 1.17. Các hợp chất flavol từ cây muồng trâu *S.alata*.

**179**  $R = Alo^2-Man$

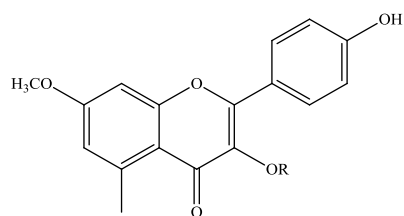
**185**  $R = H$  chrysoeriol



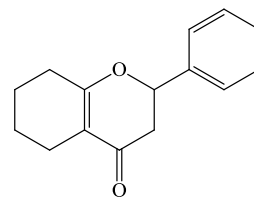
**182**  $R_1=R_2=R_3=H$  kaempferol

**183**  $R_1=CH_3$   $R_2=R_3=H$

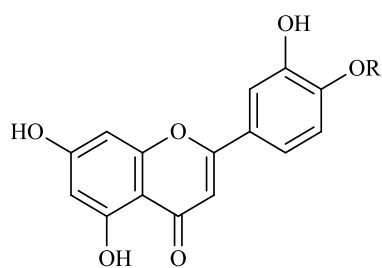
**184**  $R_1=Glc^6-Glc$   $R_2=R_3=H$



**180**  $R=Alo^2-Man$

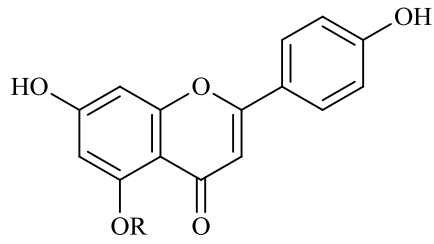


**186**

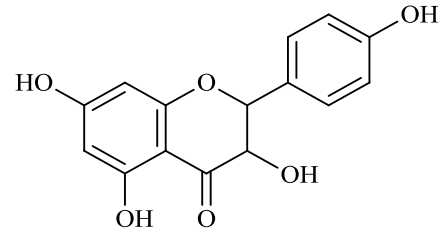


**198**  $R=CH_3$

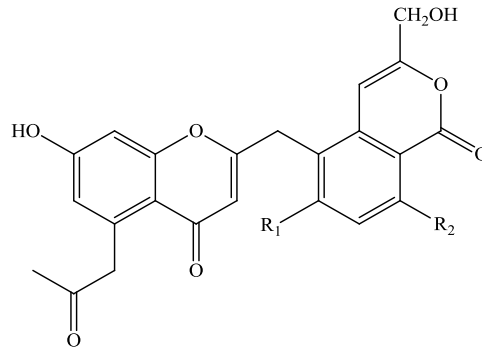
**199**  $R=H$



**196** R=H  
**197** R=CH<sub>3</sub>

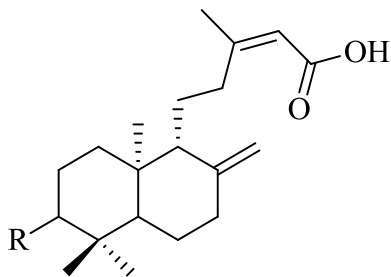


**200**

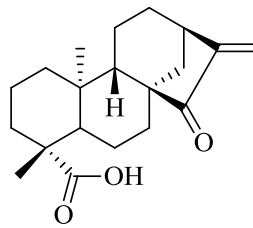


**201** R<sub>1</sub>=OCH<sub>3</sub> R<sub>2</sub>=H Alatains A  
**202** R<sub>1</sub>=H R<sub>2</sub>=OCH<sub>3</sub> Alatains B

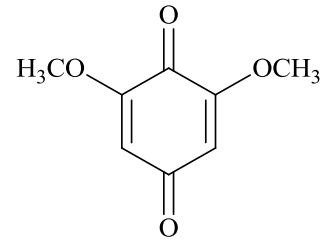
Hình 1.18. Các hợp chất diterpene từ cây muồng trâu *S. alata*.



**205** R=H  
**206** R=OCOCH<sub>3</sub>

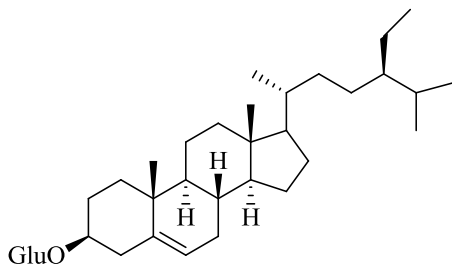


**207**

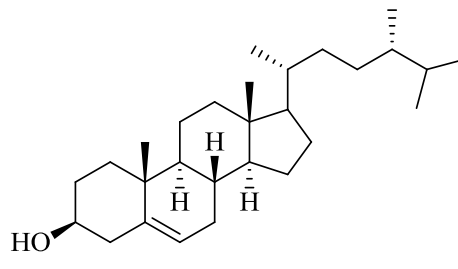


**210**

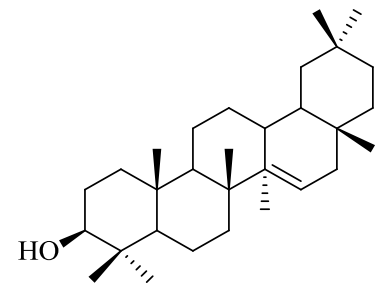
Hình 1.19. Các hợp chất sterol và terpene từ cây muồng trâu *S. alata*.



**194**

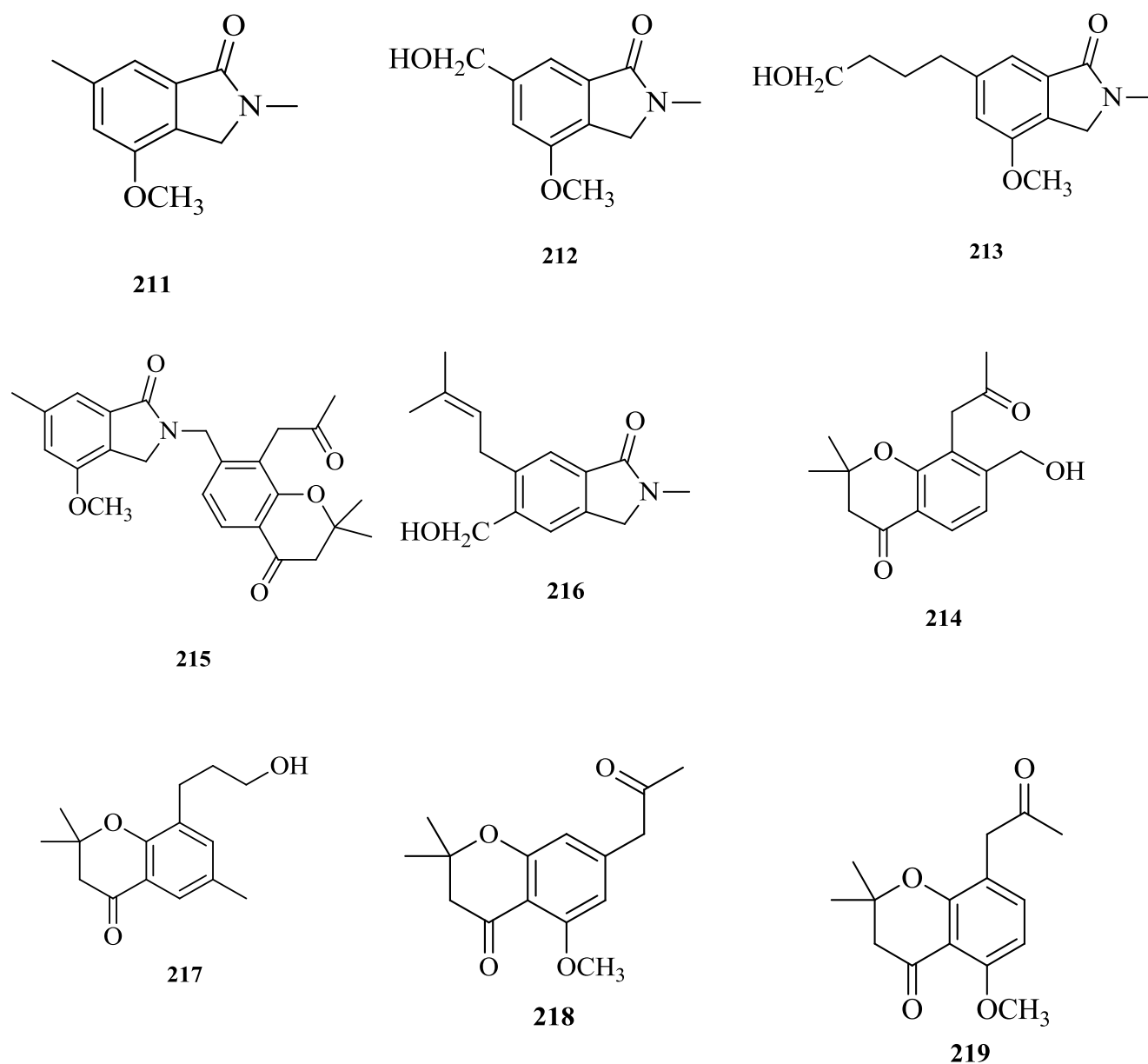


**208**



**209**

Hình 1.20. Các hợp chất indol alkaloid và chrome từ cây muồng trâu *S. alata*.



#### 1.4. Phương pháp bề mặt đáp ứng

Phương pháp bề mặt đáp ứng (Response surface methodology) hay còn gọi là quy hoạch thực nghiệm là tổng hợp các kỹ thuật toán học và thống kê để xây dựng mô hình thực nghiệm. Bằng cách thiết kế một cách cẩn thận, có hệ thống các thí nghiệm, giúp cho đánh giá kết quả đầu ra (hàm mục tiêu) thông qua ảnh hưởng của các thông số đầu vào (yếu tố công nghệ của quá trình). Mô hình thí nghiệm được đánh giá thông qua việc phân tích phương sai ANOVA dựa trên các kết quả thực nghiệm thu được.

Cuối cùng, từ dữ liệu được phân tích, sẽ tìm được phương trình hồi quy tổng quát thể hiện mối liên hệ tương quan giữa hàm đầu ra và các biến đầu vào. Tiếp đó, tiến tới việc tối ưu hóa hàm mục tiêu, xác định điều kiện tối ưu thông qua công cụ toán học.

Việc áp dụng phương pháp bề mặt đáp ứng (RSM) để tối ưu hóa quy trình công nghệ giúp giảm đáng kể số thí nghiệm cần thiết, hàm lượng thông tin nhiều hơn rõ rệt nhờ đánh giá được sai số của quá trình thực nghiệm theo các tiêu chuẩn thống kê, đánh giá được vai trò qua lại giữa các yếu tố công nghệ đầu vào và ảnh hưởng của chúng đến hàm mục tiêu, cho phép xem xét ảnh hưởng của các yếu tố với mức độ tin cậy cần thiết. Một số kế hoạch thực nghiệm được áp dụng cho phương pháp bề mặt đáp ứng như:

- + Kế hoạch trực giao bậc 2 của Box-Willson
- + Kế hoạch tâm xoay bậc 2 của Box – Hunter
- + Kế hoạch bậc 2 của Box-Behnken

Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng phần mềm Moddle 5.0 để xây dựng mô hình và tối ưu hóa các thông số công nghệ quá trình.

Tối ưu hóa là quá trình tìm kiếm điều kiện tốt nhất (điều kiện tối ưu) của hàm số được nghiên cứu, hay nói cách khác chính là bài toán tìm cực trị của hàm mục tiêu với các biến là các thông số công nghệ của quá trình.

Một số nghiên cứu đã áp dụng phương pháp RSM trên thế giới như:

Geng-Liang Yang và các cộng sự năm 2011 đã sử dụng phương pháp bề mặt đáp ứng để tối ưu hóa quá trình chiết anthraquinone có kết hợp với siêu âm của 5 anthraquinone từ cây *Rheum palmatum* L. Các thông số tối ưu của quá trình là dung môi sử dụng methanol 84%, thời gian chiết là 33 phút, nhiệt độ chiết là 67°C. [68] .

Jolius Gimbut và các cộng sự năm 2021 đã sử dụng phương pháp RSM để tối ưu hóa quá trình chiết có kết hợp với vi sóng từ cây *Senna alata* (L.) Roxb [69]. Các thông số tối ưu của quá trình là dung môi sử dụng ethanol 90.5%, năng lượng vi sóng 18.6W/mL. Hàm mục tiêu thu được hàm lượng flavonoid (kaempferol-3-O-gentiobioside (4.27mg/g), kaempferol (8.54mg/g) và anthraquinone (aloe emodin) (0.86 mg/g).

Ở Việt Nam năm 2019, nhóm tác giả Lê Xuân Duy và các cộng sự đã sử dụng phương pháp RSM tối ưu hóa quá trình chiết phenolic tổng số và flavonid tổng số của

cây táo mèo có sử dụng chiết vi sóng. Điều kiện tối ưu thực hiện quá trình là thời gian chiết 50 phút, nồng độ ethanol là 65%, công suất siêu âm: 440 W và pH =5.4. Kết quả hàm lượng phenolic tổng, flavonoid tổng, hiệu suất thu được tương ứng là  $33.57 \pm 0.12$  (mg GAE/g),  $25.01 \pm 0.11$  (mg QE/g),  $33.44 \pm 0.14$  (%). [70]

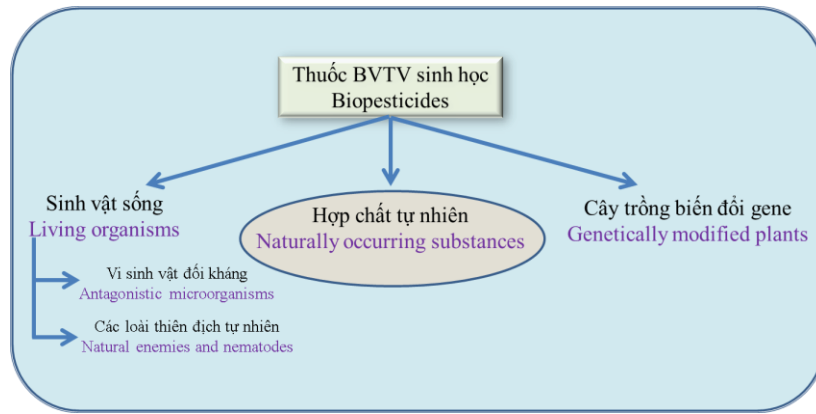
### **1.5. Thuốc bảo vệ thực vật nguồn gốc thảo mộc**

Trên thế giới, cùng với sự phát triển của ngành nông nghiệp, tình hình sâu, bệnh phá hoại mùa màng và các côn trùng gây bệnh cho người, gia súc ngày càng trở lên trầm trọng, gây tổn thất lớn về người và vật chất. Những tác nhân gây bệnh cho cây trồng do vi sinh vật gây bệnh gồm: nấm, virus, vi khuẩn, động vật nguyên sinh và ấu trùng. Trong đó, trung bình có 36,5% năng suất mùa màng bị mất gồm có 14% do dịch bệnh gây ra, 10,2% do côn trùng phá hoại và 12,2% do cỏ dại lấn át. Hàng năm tổng lượng mất mùa trên thế giới do dịch bệnh cây trồng gây ra chiếm 220 triệu đô la [71]. Sử dụng các hóa chất phòng trừ dịch hại nhằm hạn chế các tổn thất trên là biện pháp không thể thiếu, đặc biệt vào những thời điểm dịch hại xảy ra. Nhu cầu các thuốc BVTV trên thế giới hàng năm không ngừng tăng lên.

Cùng với việc gia tăng sử dụng các hóa chất BVTV, nguy cơ ô nhiễm môi trường, nguy cơ nhờn thuốc của dịch hại và ảnh hưởng tới sức khỏe con người cũng tăng theo. Khi ô nhiễm môi trường và tác hại tới sức khỏe con người do thuốc BVTV hóa học gây ra trở lên trầm trọng, các sản phẩm BVTV sinh học (biopesticide), trong đó các thuốc BVTV nguồn gốc thảo mộc (botanical pesticide) được cho là giải pháp để thay thế dần việc sử dụng thuốc BVTV hóa học trong nông nghiệp [72], [73], [74].

Ưu điểm của các thuốc BVTV sinh học là ít độc đối với người và động vật máu nóng, có khả năng phân hủy sinh học, ít để lại dư lượng trong nông sản và môi trường, ít gây hiện tượng nhờn thuốc nên được dùng nhiều trong lĩnh vực trồng rau quả, bảo quản nông sản và sát trùng gia dụng, đặc biệt trong qui trình sản xuất rau quả sạch [75], [76].

Thuốc trừ sâu sinh học (biopesticide) theo định nghĩa của EPA (cục bảo vệ môi trường Mỹ -Environmental Protection Agency) hiện nay bao gồm các hợp chất tự nhiên có khả năng kiểm soát dịch hại và các vi sinh vật sử dụng kiểm soát dịch hại và cây trồng biến đổi gene (sản sinh các hoạt chất trừ dịch bệnh) [77].



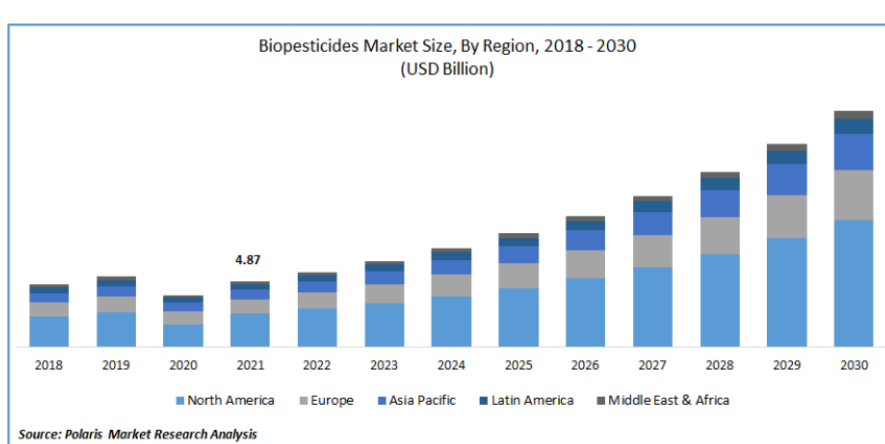
Hình 1.21. Phân loại của thuốc BVTV sinh học

Các hợp chất tự nhiên có thể được sản sinh từ vi sinh vật và thực vật, có tác dụng xua đuổi, dẫn dụ, điều hòa sinh trưởng của thực vật và côn trùng (semiochemicals, pheromones, alleochemicals), các hoạt chất này có các tính chất sinh hóa ảnh hưởng tới sinh lý của côn trùng như quá trình lột xác, dẫn dụ côn trùng tới bẫy, hoặc ảnh hưởng tới sinh trưởng của sinh vật gây bệnh. Chúng có khả năng kiểm soát dịch bệnh mà không thông qua cơ chế gây độc như các hoạt chất trong thuốc trừ sâu truyền thống. Như vậy, các hoạt chất tự nhiên sử dụng trong BVTV truyền thống như pyrethrin, abamectin, spinosad có cơ chế tác dụng gây độc lên thần kinh côn trùng như đã biết và sử dụng từ lâu, không đăng ký vào chủng loại biopesticide theo như EPA. Một số hoạt chất nguồn gốc tự nhiên được biết có tác dụng độc thần kinh được đăng ký vào chủng loại thuốc trừ sâu hóa học (chemical pesticides). Thuốc BVTV nguồn gốc thảo mộc được bào chế từ các dịch chiết hoặc đơn hoạt chất chiết ra từ nguồn thực vật, nói chung đều được hiểu có nguồn gốc sinh học, ít gây tác động sức khỏe con người và thân thiện môi trường. Các thuốc BVTV nguồn gốc thảo mộc thuộc vào Nhóm thuốc BVTV chứa các hoạt chất trong tự nhiên, là một trong 3 nhóm chính cấu thành của thuốc BVTV sinh học (hình 1.15). Ngoài ra BVTV nguồn gốc thảo mộc còn có một phần thuộc vào chủng loại thuốc BVTV hóa học như đã đề cập ở trên. Yêu cầu bảo vệ sức khỏe con người và giảm ô nhiễm của môi trường ngày càng trở lên cấp thiết, các thuốc BVTV hóa học được hạn chế sử dụng và dần dần thay vào đó là các thuốc BVTV sinh học. Các thể hệ thuốc BVTV nguồn gốc thảo mộc mới và đặc hiệu ngày càng được ưu tiên sử dụng trong nông nghiệp.

Tuy nhiên, cùng với việc gia tăng sử dụng các hóa chất BVTV, nguy cơ ô nhiễm môi trường, ảnh hưởng tới sức khỏe con người cũng tăng theo.. Theo FAO, trong kỳ 2006 - 2010, xu hướng sử dụng thuốc BVTV hóa học của thế giới đã dần

giảm xuống, cụ thể đã giảm từ 1480,6 nghìn tấn năm 2006 xuống mức 678,1 nghìn tấn năm 2010; trung bình mỗi năm giảm 17,1%/năm. Trong những năm trở lại đây, xu hướng sử dụng thuốc BVTV nguồn gốc hóa học trên thế giới đã giảm xuống rõ rệt trong khi tỷ lệ sử dụng thuốc BVTV nguồn gốc sinh học gia tăng. Châu Mỹ có xu hướng giảm mạnh nhu cầu sử dụng mặt hàng này hơn hẳn so với các châu lục khác [72], [73], [74].

Thị trường thuốc trừ sâu sinh học trên thế giới được định giá 4,87 tỷ USD vào năm 2021 và dự kiến sẽ tăng trưởng với tốc độ là 15,37% trong giai đoạn 2022 – 2030. [78]



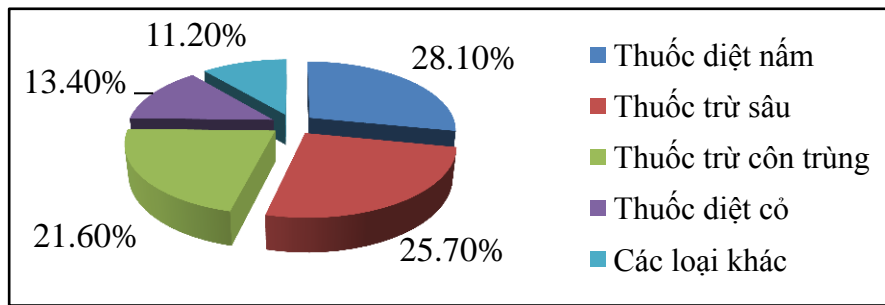
Hình 1.22. Thị trường thuốc trừ sâu sinh học trên thế giới.

Bảng 1.1. Cơ cấu các loại thuốc BVTV trên thế giới và Việt Nam

Đơn vị : 1.000 USD

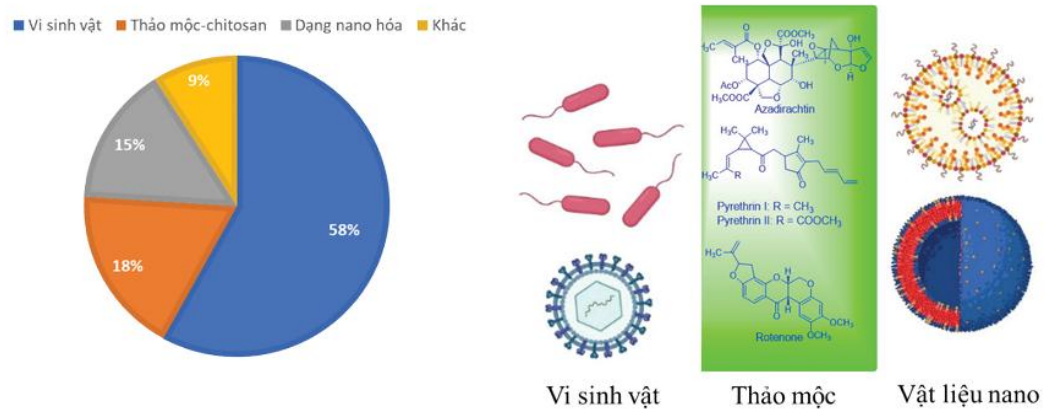
	Năm 2008		Năm 2009		Năm 2010	
	TG	VN	TG	VN	TG	VN
Thuốc bảo vệ thực vật	46.7	389	43.00	410	45.00	500
Nhóm thuốc nguồn gốc hóa	45.9	368	41.40	40.18	43.33	489
Nhóm thuốc gốc sinh học	762	2	1.600	8.2	1.665	11
Tỷ lệ thuốc sinh học/hóa học	1.66	0.54	3%	2.04	3.84%	2.25

Năm 2012 kim ngạch nhập khẩu thuốc trừ sâu và nguyên liệu của Việt Nam đạt khoảng 704 triệu USD, tăng 10% so với năm 2011. Trước đó tăng trung bình 25% mỗi năm. Cơ cấu tỷ lệ các loại thuốc BVTV nhập vào Việt Nam cũng phản ánh rõ nhu cầu sử dụng các thuốc BVTV trừ nấm (28.1%), trừ sâu (25.7%) và diệt cỏ (13.4) chiếm một tỷ trọng lớn trong tổng số thuốc BVTV sử dụng (hình 1.16) Nếu tính chung cả thuốc trừ sâu và côn trùng, tỷ lệ các thuốc BVTV dạng này tăng lên tới 47.3% [73].



Hình 1.23. Tỷ lệ các loại thuốc BVTV nhập vào Việt Nam năm 2012

Năm 2021, nhóm tác giả Đào Huy Toàn và các cộng sự đã tổng hợp những ưu điểm, nhược điểm của thuốc trừ sâu sinh học ứng dụng trong nông nghiệp tại Việt Nam, xu hướng nghiên cứu phát triển, cơ hội và những thách thức đặt ra. [79]



Hình 1.24. Tỷ lệ số nghiên cứu (đề tài/nhiệm vụ nghiên cứu khoa học) về thuốc BVTV ở Việt Nam từ 2009-2019

Tại Việt Nam, từ năm 2009-2019 số lượng nghiên cứu ứng dụng các thuốc BVTV sinh học đã tăng đáng kể. Trong đó có khoảng 58% là các nghiên cứu về vi sinh vật đối kháng (*Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis*, *Trichoderma sp.*), 18% là các nghiên cứu thuốc BVTV nguồn gốc thảo mộc và chitosan, 15% ứng dụng công nghệ mới để tạo dạng nano cho các thuốc BVTV. [80]



## CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1 Đối tượng nghiên cứu

#### 2.1.1. Cây đại hoàng - *R. tanguticum*

Rễ đại hoàng được thu mua tại chợ cây thuốc Ninh Hiệp được giám định bởi Th.S Nghiêm Đức Trọng-Bộ môn Thực Vật học-Đại Học Dược Hà Nội.Rễ đại hoàng sau khi được thu gom, hong khô ở nơi thoáng mát, phơi khô dưới ánh nắng mặt trời và sấy tới khi có độ ẩm từ 5-10%. Tiền hành nghiền nhỏ hạt với kích thước 0,2-1cm trước khi tiến hành ngâm chiết.

#### 2.1.2. Cây lưỡi bò – *R. trisetifer*

Mẫu cây lưỡi bò khô, cung cấp và giám định bởi Viện dược liệu số 3 Quang Trung, Tràng Tiền, Hoàn Kiếm, Hà Nội, vào tháng 5/2015.

TS. Trần Thế Bách, Viện Sinh thái và Tài Nguyên Sinh vật- Viện HLKH&CN Việt Nam

#### 2.1.3. Cây muồng trâu – *S. alata*

Lá cây muồng trâu được thu hái tại 2 địa điểm, trên địa bàn xã Quang Thịnh, huyện Lạng Giang, tỉnh Bắc Giang từ tháng 10-11/2015 và vào tháng 8 năm 2016 tại Trung tâm nghiên cứu trồng và chế biến cây thuốc Hà Nội ở Ngọc Hồi, Thanh Trì, Hà Nội. Nguyên liệu được xác định tên khoa học bởi ThS. Nguyễn Anh Đức, Đại học Quốc gia Hà Nội và ThS. Phạm Hồng Minh, Viện Dược Liệu.



Mẫu tiêu bản rễ cây đại hoàng    Mẫu tiêu bản lá cây lưỡi bò    Mẫu tiêu bản lá cây muồng trâu

Hình 2.1. Mẫu tiêu bản của cây đại hoàng - *R. tanguticum*, cây lưỡi bò – *R. trisetifer*, cây muồng trâu – *S. alata*

## 2.2. Phương pháp nghiên cứu

### 2.2.1. Phương pháp xử lý, chiết xuất và phân lập các thành phần hóa học

Xử lý nguyên liệu: Nguyên liệu thu mua được phân loại, rửa sạch, phơi khô. Sau đó được xay nhỏ. Bột nguyên liệu thu được cho bảo quản trong tủ hút chân không.

Chiết xuất nguyên liệu: Nguyên liệu xay được ngâm chiết với dung môi là methanol 3 lần trong 24h. Dịch chiết sau đó cô quay đuổi dung môi để thu cao tổng.

Sắc ký lớp mỏng

Sắc ký lớp mỏng được thực hiện trên bản mỏng tráng sẵn DC-Alufolien 60 F254 (Merck 1.05715). Phát hiện chất bằng đèn tử ngoại ở 2 bước sóng 254 nm và 365 nm. Sử dụng thuốc thử để hiện màu như dung dịch H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5% dung dịch vanilin/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1%), Ce(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>.

Sắc ký cột

Sắc ký cột được tiến hành với chất hấp phụ là silica gel pha thường. Silica gel pha thường có cỡ hạt 0,04 – 0,063 mm (240 – 430 mesh). Sephadex LH-20 (Merck).

### 2.2.2. Phương pháp xác định tính chất hóa lý và cấu trúc hóa học

Phổ khối lượng (MS)

Phổ khối lượng phun mù điện tử ESI-MS được đo trên máy Agilent 1100 LC-MSD Trap, phổ khối lượng phân giải cao HR-ESI-MS được đo trên máy FT-ICR-Mass, Viện Hóa học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR)

Phổ cộng hưởng từ hạt nhân được đo trên máy: Bruker AM500 FT-NMR của Viện Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

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

#### 2.2.3.1. Phương pháp đánh giá hoạt tính kháng nấm hại cây trồng.

2.2.3.1.a. Phương pháp đánh giá hoạt tính *in vivo* kháng nấm hại cây trồng trong nhà lưới.

Các dịch chiết được tiến hành thử nghiệm hoạt tính sinh học kháng 7 loại nấm: *Magnaporthe grisea* gây bệnh đạo ôn trên lúa (Rice blast- RCB), *Rhizoctonia solani* gây bệnh đốm vằn trên lúa (Rice sheath blight- RSB), *Botrytis cinerea* gây bệnh thối xám trên cà chua (Tomato grey mould- TGM), *Phytophthora infestans* gây bệnh mốc sương trên cà chua (Tomato late blight –TLB), *Puccinia recondita* gây bệnh gỉ sắt trên

lúa mì (wheat leaf rust-WLR), *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* gây bệnh héo vàng trên lúa và khoai tây (barlery powdery mildew –BPM), *Colletotrichum cocodes* gây bệnh thán thư trên ớt (red pepper anthracnose-PAN).. Các loại nấm này được giữ giống tại phòng thí nghiệm của GS. Choi ở Trung tâm nghiên cứu Eco-friendly New Material, Viện Hóa học Công nghiệp Hàn Quốc (KRICT).

Phương pháp thử nghiệm hoạt tính của các cao chiết ở quy mô *in vivo* trên các đối tượng gây bệnh cây trồng được tiến hành dựa theo nghiên cứu trước đó của các nhóm tác giả: Jin-Cheol Kim và cộng sự [81]; Young-Mi Kim và cộng sự [82].

Sau khi đã phân lập được chất sạch (đối với thử nghiệm **trong nghiên cứu** này là cao chiết, chất), chúng tôi khảo sát và lựa chọn đối tượng cây trồng thích hợp để tiến hành thử nghiệm hoạt tính *in vivo*. Đối tượng cây trồng sau khi xác định đúng tên thực vật được trồng trong các chậu nhựa (đường kính 4,5 cm) ở nhà kính được duy trì nhiệt độ 25°C (±5°C) trong vòng 4 tuần. Ở giai đoạn lá thích hợp, chậu cây trồng được phun đều hỗn hợp Tween 20 (250 µg/ml) có chứa các phân đoạn chiết hoặc các chất cần thử hoạt tính. Cây đối chứng sau khi được phun dung dịch Tween 20 chứa 10% acetone thì tiếp tục được xử lý với một đối chứng dương thích hợp (khoảng 10-50 µg/ml). Sau 24 giờ, các cây con đã qua xử lý được cấy bào tử ( $5 \times 10^5$  spores/ml) của chủng nấm đã chọn. Sau khi ủ trong 2 ngày ở 25°C (±2°C), các cây bị nhiễm bệnh được giữ trong buồng tăng trưởng trong 2 ngày ở nhiệt độ trên với 8 giờ ánh sáng mặt trời mỗi ngày. Mức độ nghiêm trọng của bệnh được đánh giá 4 ngày sau khi cấy chủng nấm. Các chậu được bố trí thành một khối hoàn toàn ngẫu nhiên với ba lần lặp lại cho mỗi chủng nấm. Thử nghiệm được tiến hành hai lần trong phòng tăng trưởng và sáu lần ước lượng cho mỗi cây được xử lý bằng hoạt chất/cao chiết và được chuyển thành tỷ lệ phần trăm kiểm soát nấm để so sánh với cây đối chứng.

Để đánh giá khả năng kháng nấm của các cao chiết, chúng tôi dựa vào tỷ lệ kiểm soát bệnh được xác định theo phương trình sau:

$$\% \text{ Kiểm soát bệnh} = 100 [(A - B) / A],$$

Trong đó, A là diện tích nhiễm trùng (%) trên lá hoặc vỏ của cây được xử lý với Tween 20. B là diện tích nhiễm trùng (%) trên lá hoặc vỏ của cây được xử lý với hoạt chất.

2.2.3.1.b. Phương pháp đánh giá hoạt tính *in vitro* kháng nấm hại cây trồng trong phòng thí nghiệm.

- Thử hoạt tính *in vitro* kháng nấm *Botrytis cineria*, *Colletotrichum gloesporioides*, *Phytophthora infestans*, *Rhizoctonia solani* gây bệnh cây trồng trong phòng thí nghiệm của các anthraquinon từ củ đại hoàng (*R. tanguticum*).

Các chất tách được gồm chrysophanol, emodin và physcion được trộn với môi trường thạch theo nồng độ tính toán và đổ trên mỗi đĩa petri. Nấm được cấy tại tâm đĩa và vòng bán kính khuẩn lạc được đo sau 5 ngày. Hiệu lực (độ hữu hiệu) đo so sánh với vòng bán kính khuẩn lạc trên đĩa đối chứng. Các chất được test với *B.cinerea*, *C.gloesporioides*, *P.infestans*, *R.solani*, gây bệnh cây trồng trong phòng thí nghiệm của các anthraquinon từ củ đại hoàng (*R. tanguticum*) trên môi trường PDA và V8-Juice cho *P.infestans* đã khử trùng để nguội 50°C. Mỗi công thức tiến hành nhắc lại 5 lần.

Chỉ tiêu theo dõi:

- Sự phát triển của tản nấm sau 1,3,5 và 7 ngày. Tính hiệu lực của từng loại chế phẩm.

- Tiến hành đo đường kính tản nấm sau 1,3,5,7 ngày. Tính hiệu quả chế phẩm theo công thức Abottle

- Xác định độ hữu hiệu của thuốc hóa học trong phòng thí nghiệm theo công thức Abottle:

$$DHH(\%) = \frac{C - T}{C} \times 100\%$$

DHH (%): Độ hữu hiệu của thuốc

C: Mức độ bệnh của các công thức đối chứng sau xử lý

T: Mức độ bệnh ở các công thức thí nghiệm sau xử lý

Công thức thí nghiệm: Đối với 4 nấm *B.cinerea*, *C.gloesporioides*, *P.infestans*, *R.solani* đều được kiểm tra tại các nồng độ từ 100-300 ppm với các nồng độ sau:

- +Chrysophanol: 100 ppm, 200 ppm.

- +Emodin: 200 ppm, 300 ppm

- +Physcion: 100 ppm, 200 ppm

- + Đối chứng: Không trộn chất vào môi trường

- Thử hoạt tính *in vitro* kháng nấm *M. oryzae*, *Phytophthora sp.* SK5 (được phân lập từ rễ bị nhiễm bệnh của cây sâm *Panax vietnamensis* Ha et Crushv.) và *P. capsici* TVH (được phân lập từ lá bị nhiễm bệnh của cây hồ tiêu *Piper nigrum*) theo phương pháp poisoned-food technique trong phòng thí nghiệm của các anthraquinone và các cặn chiết từ lá cây muồng trâu (*S. alata*).

Dịch chiết và các chất phân lập được hòa trong DMSO, sau thêm vào môi trường PDA đã được hấp và thanh trùng đến nồng độ DMSO 2% trong đĩa Petri 4-cm. Đĩa được để lạnh ở nhiệt độ phòng. Các chất phân lập xử lý ở khoảng nồng độ 37.5– 600 µg/mL ngoài trừ hợp chất 8 mà nồng độ được đánh giá từ 25 - 200 µg/mL. Đĩa Petri được ủ với nấm ở tâm và tiếp tục được phát triển ở 25-28°C trong 2-7 ngày. Đĩa Petri được xử lý với DMSO 2% dùng là đối chứng âm. Thử hoạt tính kháng nấm được thực hiện 2 lần với 2 đĩa lặp lại, đường kính phát triển của nấm được ghi và hiệu quả kiểm soát bệnh của thí nghiệm được tính dựa theo công thức Abolte

$$\% \text{ Kiểm soát bệnh} = 100 [(Dc - Dt)/(Dc - 4)]$$

Dc: đường kính tản nấm trên đĩa petri đối chứng;

4: đường kính khoan agar-nấm, mm;

Dt: đường kính tản nấm trên đĩa petri trộn mẫu thí nghiệm, mm

Giá trị IC<sub>90</sub> và giá trị IC<sub>50</sub> (các nồng độ ức chế sự tăng trưởng 90% và 50%) được tính toán theo phần mềm WINPEPI version 11.65 dựa trên phân tích Probit.

Các thí nghiệm được thực hiện tại phòng thí nghiệm, Bộ môn Miễn Dịch thực vật-Viện Bảo vệ thực vật.

### 2.2.3.2. Phương pháp đánh giá hoạt tính kháng vi khuẩn hại cây trồng.

#### 2.2.3.2.a. Phương pháp đánh giá hoạt tính *in vivo* kháng vi khuẩn hại cây trồng trong phòng nhà kính.

Thử hoạt tính *in vivo* của cặn n-hexane từ cây *R. chinensis* được thực hiện trong điều kiện nhà kính bằng cách sử dụng cây giống cà chua bốn tuần tuổi (*Lycopersium esculentum*) chủng Tre Việt ở giai đoạn 5-7 lá, được trồng trên đất vô trùng Vinatap và cấy vi khuẩn gây bệnh *R. solanacearum*. Chủng vi khuẩn được nuôi cấy trên môi trường TSA trong hai ngày ở 28±2 °C, rồi hòa trong nước cất vô trùng và điều chỉnh đến khoảng 10<sup>8</sup> CFU/mL. Cặn n-hexane từ cây *R. chinensis* (1,5 g) được hòa tan vào 300 mL nước chứa metanol (2%) và Tween 80 (250 mg/mL) để thu được dung dịch xử

lý ở nồng độ 5000 mg/mL. Một phần dung dịch (100 mL) được pha loãng 2 lần với 100 mL nước để có dung dịch nồng độ 2500 mg/mL. Hai dung dịch này được bón vào đất với tỷ lệ 20 mL cho mỗi chậu. Cây vi sinh vật vào đất được thực hiện bằng cách thấm ướt 10 mL dung dịch vi sinh với nồng độ  $10^8$  CFU/mL), thân rễ cây được gây thương bằng kim trước khi trồng vào đất đã cấy khuẩn. Cây con được cấy bằng nước vô trùng được dùng làm đối chứng âm. Probiocol 200WP (bismertiazol 190 g/kg + kasugamycin 10 g/kg; Nong Phat Co. Ltd.) với tỷ lệ pha loãng 500 lần được sử dụng làm đối chứng dương. Cây giống được giữ ở buồng khí hậu trong 30 ngày ở nhiệt độ  $27^\circ\text{C}$ , độ ẩm tương đối 85%. Chín cây cà chua được sử dụng cho mỗi thí nghiệm. Thí nghiệm được thực hiện theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên và lặp lại 2 lần.

Chỉ số bệnh (DI) được tính qua 7 ngày và 14 ngày theo công thức của Winstead and Kelman, 1952

$$DI = \left[ \sum (n_i \times v_i) : (V \times N) \right] \times 100$$

$n_i$  số cây có mức độ bệnh tương ứng,  $v_i$  cấp độ bệnh. V: cấp độ bệnh cao nhất (4), N: tổng số cây quan sát. Cấp độ bệnh được đánh giá theo thang đánh giá gồm các cấp bệnh như sau: cấp 1- có 1 lá héo, cấp 2- có 2-3 lá héo, cấp 3-tất cả các lá của cây bị héo ngoại trừ 2-3 lá trên, cấp 4-có tất cả các lá cây bị héo.

Kiểm soát bệnh (%) =  $100 \times (DI \text{ của đối chứng} - DI \text{ xử lý}) / DI \text{ của đối chứng}$ .

2.2.3.2.b. Phương pháp đánh giá hoạt tính *in vitro* kháng vi khuẩn hại cây trồng trong phòng thí nghiệm.

Thử nghiệm kháng vi khuẩn *in vitro* của các hợp chất phân lập từ nguyên liệu và cao chiết được thực hiện trên 96 giếng bằng phương pháp pha loãng nồng độ trên các chủng vi khuẩn: *Acidovorax avenae* subsp. *cattlyae* (Aac) gây ra bệnh nhiễm khuẩn, *Agrobacterium tumefaciens* gây ra bệnh sùi cành, *Burkholderia glumae* gây ra bệnh thối rễ lúa; *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* gây ra bệnh vàng héo và loét trên cà chua; *Pectobacterium carotovora* subsp. *carotovora* và *Pectobacterium chrysanthemi* gây ra bệnh thối rữa trên rễ; *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* và *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* KW11 (Psa) gây ra bệnh đốm lá trên dưa chuột, *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* (Xap) gây ra bệnh đốm lá trên cây tiêu và *R. solanacearum* gây ra bệnh héo rũ vi khuẩn trên cà chua. Các cao chiết được thử nghiệm trên chủng vi khuẩn (Aac) gây ra bệnh nhiễm khuẩn. Chủng vi khuẩn

*R.solanacearum* được ủ trong môi trường TSB (Tryptone Soya Broth), còn các chủng nấm khác được ủ trong môi trường NB (Nutrient Broth). Tất cả các chủng được ủ trong 48 h ở nhiệt độ 30°C, ngoại trừ chủng vi khuẩn *X.arboricolapruni* và *P.syringae*pv. được ủ ở nhiệt độ 25°C. Các hợp chất được hòa tan trong MeOH và được pha loãng 100 lần với môi trường tăng trưởng thích hợp cho mỗi chủng và thử nghiệm ở nồng độ dao động từ 0,39 đến 100 µg/ mL. Mỗi chủng có chứa  $2 \times 10^6$  tế bào/ µL đã được thêm vào các giếng có chứa 50 µL của mỗi hợp chất. Các chất được tiến hành pha loãng theo thứ tự trong môi trường tăng trưởng thích hợp để đạt được thể tích 100 µL của mỗi giếng. Đối chứng dương được sử dụng là streptomycin sulfate có nồng độ từ 0,039 đến 10 µg/ mL. Đối chứng âm là 1% MeOH. Các đĩa được cấy ủ ở 30°C và 25 °C trong 48h sau khi tiến hành lắc được thực hiện trong máy lắc ở tốc độ 300 vòng/phút trong 20 phút. Mật độ quang học (OD) của mỗi giếng sau 24h khi ủ được đo bằng một đầu đọc microplate ở 600 nm. Sự ức chế tăng trưởng được tính bằng công thức sau:

$$\% \text{ Ức chế} = \frac{1 - OD_a}{OD_b} \times 100\%$$

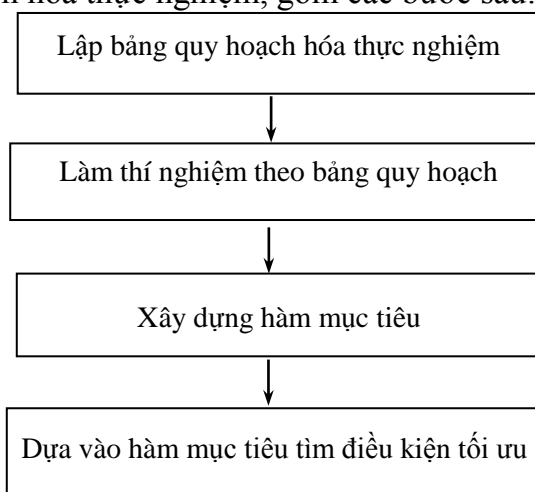
Trong đó  $OD_a$  là mật độ quang học của chất sau khi xử lý

$OD_b$  là mật độ quang học của chất đối chứng âm sau khi xử lý

Giá trị  $IC_{90}$  và giá trị  $IC_{50}$  (các nồng độ ức chế sự tăng trưởng 90% và 50%) được tính toán theo phần mềm WINPEPI version 11.65 dựa trên phân tích Probit. [83]

#### 2.2.4. Phương pháp quy hoạch thực nghiệm và tối ưu hóa quy trình công nghệ

Phương pháp quy hoạch hóa thực nghiệm, gồm các bước sau:



Hình 2.2. Quy trình quy hoạch hoá thực nghiệm

Trong nghiên cứu này đã sử dụng phương pháp quy hoạch hóa thực nghiệm bậc hai tâm Box-Behnken, khảo sát với 3 yếu tố ảnh hưởng: thời gian chiết (time, h), tỷ lệ dung môi/ nguyên liệu (ratio) và nhiệt độ chiết (temp, °C).

- Xây dựng bảng quy hoạch hóa thực nghiệm.
- Sử dụng kết quả thực nghiệm thu được từ việc làm thí nghiệm theo bảng quy hoạch xây dựng hàm mục tiêu.

$$Y(g) = f(X_1, X_2, X_3)$$

- Tìm điều kiện cực trị để hàm lượng cao chiết, lượng cao chiết từ nguyên liệu chiết được tối ưu:  $Y_{max}(g) = f(X_{1opt}, X_{2opt}, X_{3opt})$

Trong đó: Y: hiệu suất chiết (%)

$X_{1opt}$ : thời gian chiết (h)

$X_{2opt}$ : tỷ lệ dung môi /nguyên liệu (ml /g)

$X_{3opt}$ : nhiệt độ chiết (°C)

Kế hoạch hóa bậc hai Box-Behnken cần số thí nghiệm được xác định bằng công thức:

$$N = 2^2 \cdot C_k^2 + n_o$$

Trong đó: N: Số thí nghiệm

$n_o$ : số thí nghiệm tại tâm

k: số yếu tố công nghệ

- Xác định các hệ số trong phương trình hồi quy (hàm mục tiêu)
- Đánh giá tính có nghĩa của các hệ số trong hàm mục tiêu tìm được dựa vào tiêu chuẩn Student

$$t_b = \frac{|b|}{S_b}; t_b > t_{bảng}(p, f_2)$$

Trong đó:  $t_{bảng}(p, f_2)$  tiêu chuẩn Student tra bảng ở mức có nghĩa p và bậc tự do  $f_2$  ( $f_2 = n_o - 1$ )

Đánh giá sự phù hợp của hàm mục tiêu (hiệu suất thu cao chiết methanol) dựa vào tiêu chuẩn Fisher khi đó loại bỏ các hệ số không có nghĩa, chỉ giữ lại các hệ số có nghĩa trong hàm mục tiêu

$$F = \frac{S_d^2}{S_1^2}; F \leq F(p, f_2, f_1)$$



Trong đó:  $F(p, f_2, f_1)$ : tiêu chuẩn Fisher tra bảng ở mức có nghĩa  $p$  với bậc tự do  $f_2$  và  $f_1(f_2 = n_0 - 1; f_1 = N - a)$

$a$ : số hệ số có nghĩa còn lại trong hàm mục tiêu

$S_d^2$ : phương sai dư

$S_l^2$ : phương sai lặp

Hàm mục tiêu thu được có dạng như sau: Phương trình biến mã:

$$Y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{33}x_3^2$$

Mô hình được đánh giá là tương thích dựa trên các cơ sở các giá trị  $F$ ,  $R^2$ ,  $Q^2$  và lack of fit

### CHƯƠNG 3. THỰC NGHIỆM

#### 3.1. Phân lập các chất từ cây đại hoàng – *R. tanguticum*.

##### 3.1.1. Ngâm chiết và làm giàu cao chiết để phân lập các hoạt chất có trong cao chiết từ cây đại hoàng – *R. tanguticum*.

3 kg rễ đại hoàng (độ ẩm 8%) sau khi thu mua, được phơi khô, nghiền nhỏ và được ngâm chiết với 7200 mL dung môi methanol, ở nhiệt độ 65°C trong 8h. Sau đó, tiến hành lọc tách bã chiết với dịch chiết. Bã nguyên liệu được giữ nguyên và tiến hành ngâm chiết 2 lần tiếp theo với dung môi methanol trong cùng điều kiện. Tổng thời gian 3 lần chiết kéo dài 24h. Dịch chiết 3 lần được gộp lại, cô quay đuổi dung môi methanol thu được 811 g cao chiết tổng methanol.

Hòa tan 811 g cặn chiết tổng methanol vào trong 4 L nước. Nhận thấy, một phần cặn chiết tổng methanol tan hoàn toàn vào trong nước. Tiến hành tách cặn tủa không tan trong nước với dịch tan trong nước.

Phần dịch tan trong nước (4 L) được đổ vào trong phễu chiết 10 L. Sau đó, cho thêm 4L dichloromethane vào phễu chiết và tiến hành lắc đều. Sau một thời gian ngừng lắc, hỗn hợp chia thành 2 lớp: lớp trên là các hợp chất trong nước, lớp dưới là các hợp chất trong dung môi dichloromethane. Tiến hành tách riêng 2 lớp thu được phân đoạn dichloromethane và phân đoạn nước. Phân đoạn nước được giữ lại và tiến hành chiết phân bố với dung môi dichloromethane thêm 2 lần tiếp theo. Phân đoạn dichloromethane được gộp lại, cô quay thu được cao chiết dichloromethane (C1'). Phân đoạn nước được axit hóa với HCl 9N để tạo ra dung dịch có chứa 0,5% HCl. Sau đó, tiến hành chiết phân bố với dung môi ethyl acetate. Quá trình chiết được thực hiện như sau: Cho 4 L ethyl acetate vào phễu chiết và tiến hành lắc đều. Sau một thời gian, hỗn hợp chia thành 2 lớp. Lớp trên là các hợp chất trong dung môi ethyl acetate, lớp dưới là các hợp chất trong nước. Tách riêng 2 lớp, phân lớp nước được chiết phân bố với ethyl acetate thêm 2 lần nữa. Phân đoạn ethyl acetate được gộp lại, rửa axit và cô quay, đuổi dung môi thu được cao chiết ethyl acetate (C2). Phân đoạn nước được cô quay lại thu được cao chiết nước. Quá trình axit hóa phần nước nhằm lấy được phần anthraquinone chuyển từ dạng muối sang dạng tự do hoặc phần anthraquinone ở dạng glucoside và chiết phân bố với dung môi ethyl acetate để thu được anthraquinone dạng glucoside.

Phần cặn tủa không tan trong nước ( $m = 165,7$  g) được sấy khô, hòa tan trong 2 L dichloromethane. Sau một thời gian nhận thấy một phần cặn tủa tan trong dichloromethane. Lọc bỏ cặn rắn và thu lớp dichloromethane (3 lần) được gộp lại, cô quay thu được cao chiết dichloromethane (C 1'') và gộp với C1' tạo ra cặn dichloromethane (C1). Mục đích của quá trình là nếu còn anthraquinone ở dạng tự do sẽ nằm trong dung môi dichloromethane.

Cặn dichloromethane (C1) sau khi được gộp lại và cặn ethyl acetate (C2) được tiến hành tách ra các hợp chất có chứa khung anthraquinone bằng phương pháp sắc kí.

### 3.1.2. Phân lập các chất từ cây đại hoàng – *R. tanguticum*

#### 3.1.2.1. Phân lập các chất từ cặn dichloromethane của cây đại hoàng – *R. tanguticum*.

Tiến hành lấy 20 g cặn dichloromethane (C1) tẩm với 40 g silica gel. Cho lên cột, chọn cột  $\phi$  45 mm, dài 70 cm chứa 400 g silica gel (đã được hoạt hóa). Dùng hệ dung môi n-Hexane/Ethyl acetate và Ethyl acetate/Methanol (E/M) theo độ tăng dần của hệ dung môi phân cực để rửa giải.

Bảng 3.1. Hệ dung môi rửa giải trong tách cặn dichloromethane của cây đại hoàng

STT	Hệ dung môi	Lượng dung môi dùng	Dịch rửa giải thu được	Phân đoạn
1	n-Hexan 100%	3000 ml	Ống nghiệm 1 – 7	F1
2	H:E = 99:1	4000 ml	Ống nghiệm 8 – 17	F2
3	H:E = 98:2	4000 ml	Ống nghiệm 18 - 28	F3
4	H:E = 96:4	4000 ml	Ống nghiệm 29 – 36	F4
5	H:E = 92:8	4000 ml	Ống nghiệm 37 – 47	F5
6	H:E = 85:15	4000 ml	Ống nghiệm 48 – 58	F6
7	H:E = 70:30	4000 ml	Ống nghiệm 59 – 66	F7
8	H:E = 30:70	4000 ml	Ống nghiệm 67 – 79	F8
9	H:E = 0:100	1000 ml	Ống nghiệm 80 – 82	F9
10	E:M = 90:10	2000 ml	Ống nghiệm 83 – 86	F10

11	E:M = 50:50	2000 ml	Ống nghiệm 87 – 90	F11
12	Methanol 100%	2000 ml		F12

- Từ ống nghiệm 38-39 trong phân đoạn F5 (F5.1) tiến hành rửa rửa, sau đó đem kết tinh lại bằng hệ dung môi n-hexane/ethyl acetate= 95:5 thu được 30 mg hợp chất **DH1** vàng cam.
- Từ ống nghiệm 44-45 trong phân đoạn F5 (F5.2) tiến hành rửa rửa, sau đó đem kết tinh lại bằng hệ dung môi n-hexane/ ethyl acetate = 90:10 thu được 20 mg hợp chất **DH2** màu vàng cam.
- Từ ống nghiệm 51-53 trong phân đoạn F6 tiến hành rửa rửa, sau đó đem kết tinh lại bằng hệ dung môi n-hexane/ethyl acetate= 85:15 thu được 15 mg hợp chất **DH3** màu vàng đậm.
- Từ phân đoạn F7 (953.2 mg) tiến hành chạy cột sắc ký silica gel với hệ dung môi dichloromethane/methanol= 100/0 -95/5 thu được 5 mg hợp chất **DH4** màu vàng (kết tinh lại trong dung môi dichloromethane/methanol= 98/2) và 7 mg tinh thể màu nâu nhạt hợp chất **DH6** (kết tinh lại trong dung môi dichloromethane/methanol= 95/5).
- Từ phân đoạn F8 tiến hành rửa rửa, sau đó đem kết tinh lại với với hệ dung môi dichloromethane/methanol= 90/10 thu được 0.9427 g hợp chất **DH5** tinh thể màu nâu nhạt.

### 3.1.2.2. Phân lập các chất từ cặn ethyl acetate của cây đại hoàng – *R. tanguticum*.

- Tiến hành lấy 20 g cặn ethyl acetate (**C2**) tẩm với 40 g silica gel. Dùng hệ dung môi dichloromethane/methanol=100/0-70/30) theo độ tăng dần của hệ dung môi phân cực để rửa giải. Cho lên cột  $\phi$  45 mm, dài 70 cm chứa 400 g silica gel (đã được hoạt hóa). Thu được 6 phân đoạn. Phân đoạn F6 (1.5 g) được chạy trên cột  $\phi$  45 mm, dài 70 cm chứa 120 g silica gel (đã được hoạt hóa). Thu được 8 phân đoạn. Phân đoạn F6.8 được tiến hành sắc ký điều chế với hệ dung môi dichloromethane/methanol=84/16 cho 5 mg hỗn hợp 2 chất **DH7** màu nâu nhạt.

### 3.2. Phân lập các chất từ cây lười bò *R. trisetifer*

#### 3.2.1. Ngâm chiết thu cao chất để phân lập các hoạt chất từ cây lười bò *R. trisetifer*

5 kg lá cây (được phơi khô) lười bò *R. trisetifer* được cắt nhỏ được ngâm với 7.5 lít methanol trong 24h ở nhiệt độ thường. Quá trình ngâm được tiến hành 3 lần. Dịch chiết methanol thu được đem cô quay thu được 892.2 g cao chiết methanol. Phần cao chiết này được hòa trong 4.5 lít nước và được chiết phân bố với dung môi n-hexane và ethyl acetate thu được lần lượt 112.9 g cao chiết n-hexane và 123.4 g cao chiết ethyl acetate.

#### 3.2.2. Phân lập các chất từ cây lười bò *R. trisetifer*

##### 3.2.2.1. Phân lập các chất từ cặn n-hexane của cây lười bò *R. trisetifer*

Tiến hành lấy 25 g cặn n-hexane tẩm với 35 g silica gel. Cho lên cột Chọn cột  $\phi$  70 mm, dài 400 cm chứa 500 g silica gel (đã được hoạt hóa). Dùng hệ dung môi n-hexane/ethyl acetate theo độ tăng dần của hệ dung môi phân cực để rửa giải.

Bảng 3.2. Hệ dung môi rửa giải trong tách cặn n-hexane của cây lười bò

STT	Hệ dung môi	Lượng dung môi dùng	Dịch rửa giải thu được	Phân đoạn
1	n-Hexane 100%	3000 ml	Ống nghiệm 1 – 3	F1
2	H:E = 99.5 : 0.5	1000 ml	Ống nghiệm 4 – 6	F2
3	H:E = 99 : 1	3000 ml	Ống nghiệm 7 - 9	F3
4	H:E = 98 : 2	3000 ml	Ống nghiệm 11 – 20	F4
5	H:E = 96 : 4	3000 ml	Ống nghiệm 21– 34	F5
6	H:E = 92 : 8	4000 ml	Ống nghiệm 35 – 46	F6
7	H:E = 84 : 16	3000 ml	Ống nghiệm 47 – 48	F7
8		Ống nghiệm 49 – 53	F8	
9		Ống nghiệm 54 – 55	F9	
10	H:E = 68 : 32	3000 ml	Ống nghiệm 56 – 68	F10

- Các ống nghiệm 13-15 được gộp thu được phân đoạn F4, sau đó tiến hành rửa rửa, kết tinh lại bằng hệ dung môi n-hexane/ethyl acetate= 95:5 thu được 10 mg hợp chất **RT1** vàng cam.

- Các ống nghiệm 23-25 được gộp thu được phân đoạn F5, sau đó tiến hành rửa rửa, kết tinh lại bằng hệ dung môi n-hexane/ethyl acetate= 90:10 thu được 7 mg hợp chất **RT2** vàng cam.
- Các ống nghiệm 37-42 được gộp thu được phân đoạn F6, sau đó tiến hành rửa rửa, đem kết tinh lại bằng hệ dung môi n-hexane/ethyl acetate= 90:10 thu được 50 mg hợp chất **RT6** màu trắng.
- Các ống nghiệm 47-48 được gộp thu được phân đoạn F7, sau đó tiến hành rửa rửa, đem kết tinh lại bằng hệ dung môi n-hexane/ethyl acetate= 85:15 thu được 5 mg hợp chất **RT3** vàng cam
- Các ống nghiệm 60-62 được gộp thu được phân đoạn F10, sau đó tiến hành rửa rửa, đem kết tinh lại bằng hệ dung môi dichloromethane/methanol= 95/5 thu được 30 mg hợp chất **RT7** màu trắng.

#### 3.2.2.2. *Phân lập các chất từ căn ethyl acetate của cây lười bò R. trisetifer*

Tiến hành lấy 20 g căn ethyl acetate tẩm với 35 g silica gel. Dùng hệ dung môi dichloromethane/methanol=100/0-60/40) theo độ tăng dần của hệ dung môi phân cực để rửa giải. Cho lên cột  $\phi$  50 mm, dài 80 cm chứa 460 g silica gel (đã được hoạt hóa). Thu được 6 phân đoạn. Phân đoạn E2(2.6 g) được chạy cột sắc ký  $\phi$  40 mm, dài 80 cm chứa 320 g silica gel hệ dung môi dichloromethane/methanol=100:0, 99:1, 98:2, 96:4, 92:8, 90:10, 80:20 và 70:30 thu được 6 phân đoạn(E2.1-E2.6). Phân đoạn E2.2 được chạy với cột Sephadex LH-20 thu được 25 mg hỗn hợp **RT5**. Phân đoạn E2.4 được chạy với cột Sephadex LH-20 thu được 15 mg hỗn hợp **RT4**.

### 3.3. *Phân lập các chất từ cây muồng trâu S. alata*

#### 3.3.1. *Ngâm chiết và làm giàu cao chiết*

Nguyên liệu lá muồng trâu sau khi thu hái được sơ chế làm sạch. Sau đó tiến hành sấy khô ở nhiệt độ 50°C tới độ ẩm 8%. Nghiền nhỏ nguyên liệu thành các mảnh có kích thước 3-5mm.

11 kg nguyên liệu lá muồng trâu được ngâm chiết với 47 lít dung môi methanol tại nhiệt độ sôi của dung môi trong 8 giờ. Dịch chiết methanol được lọc tách khỏi phần bã và cô quay tách loại dung môi để thu cao chiết methanol thô (lặp lại 3 lần).

Phân tán hoàn toàn 2,3 kg cao chiết thô trong 4 L H<sub>2</sub>O và 5 L methanol và đổ vào thiết bị chiết, cho thêm 5 L dung môi n-hexane và lắc đều. Sau 1 giờ, hai phân lớp này phân

tách hoàn toàn, tiến hành tách riêng 2 lớp thu được hai phân đoạn n-hexane và phân đoạn methanol- nước. Phân đoạn methanol- nước được chiết tương tự quy trình trên thêm 2 lần nữa với dung môi n-hexane. Gộp 3 lần phân lớp n-hexane lại, tiến hành cô quay loại hết dung môi để thu được cặn chiết n-hexane.

Phân đoạn methanol - nước được cô cạn hết methanol và thêm 2 L nước, sau đó tiếp tục được chiết với 5 L ethyl acetate, cho vào phễu chiết lắc đều. Sau một thời gian hỗn hợp phân thành 2 lớp, lớp phía trên là phân lớp ethyl acetate, lớp phía dưới là phân lớp nước. Tách riêng 2 lớp được phân đoạn ethyl acetate và phân đoạn nước. Quá trình chiết được lặp lại 3 lần. Cô quay phân đoạn ethyl acetate để thu hồi dung môi và thu cặn chiết ethyl acetate, kí hiệu là cặn chiết EA1.

### ***3.3.2. Phân lập các chất***

- Tiến hành chạy 50 g phân đoạn cao chiết EA1 bằng cột sắc kí silica gel với hệ dung môi rửa giải có độ phân cực tăng dần từ 100% n-hexane tới 100% ethyl acetate và từ 100% ethyl acetate tới 100% methanol, sau quá trình chạy thu được 17 phân đoạn dựa trên cơ sở sắc kí TLC.

Tiến hành sắc kí cột các phân đoạn con từ cột tổng bằng phương pháp khác nhau để thu được các chất sạch.

#### ***3.3.2.1. Phân lập chất SA1***

Tách **SA1**: Phân đoạn EA1.5 bao gồm (EA1.5 +EA1.6) được tách trên cột silica gel, tiến hành như sau: Hòa tan hoàn toàn 276 mg pđ EA1.5 với 5ml dung môi methanol, trộn đều với 0,5g silica gel, sau đó tiến hành cô quay hút dung môi đến khi loại hết dung môi và thu được một hỗn hợp silica gel trộn với phân đoạn cần tách, hỗn hợp sau khi trộn và loại hết dung môi có độ tơi và không kết dính vào nhau. Chạy cột silica gel có đường kính 2cm, lượng silica gel nhồi cột là 20g. Ổn định và chạy cột bằng hệ dung môi H/E 20/1, sau đó tăng dần độ phân cực của các hệ dung môi rửa giải đến H/E 5/5 và rửa cột bằng 100% methanol. Thu được 6 phân đoạn từ EA1.5.1 đến EA1.5.6. Tiếp tục chạy cột với phân đoạn EA1.5.2 với hệ dung môi rửa giải H/E 85/15 đẳng hệ thu được 2 phân đoạn. EA1.5.2.1– EA1.5.2.2, trong đó phân đoạn EA1.5.2.2 chứa **SA1**.

Tiếp tục chạy cột phân đoạn EA1.5.3 với hệ dung môi rửa giải H/E 85/15 đẳng hệ thu được 3 phân đoạn EA1.5.3.1- EA1.5.3.3 , trong đó EA1.5.3.3 có chứa **SA1**. Gộp

EA1.5.2.2 + EA1.5.3.3 thu được phân đoạn EA1.5.3.3 , chạy cột phân đoạn EA1.5.3.3 với hệ dung môi rửa giải H/A 85/15 đẳng hệ thu được **SA1** (bản). Tinh chế SA1 bằng cột sephadex với 100% methanol thu được **SA1** sạch. Kiểm tra sắc kí bản mỏng TLC nhận thấy phân đoạn này chứa 13 mg chất sạch, kí hiệu là **SA1**.

#### 3.3.2.2. *Phân lập chất SA5 và SA2*

Tách **SA5**: Phân đoạn EA1.10 được tiếp tục tách trên cột silica gel, tiến hành như sau: Hòa tan hoàn toàn 5 g pđ EA1.10 với 50 ml dung môi methanol, trộn đều với 10g silica gel, sau đó tiến hành cô quay hút dung môi đến khi loại hết dung môi và thu được một hỗn hợp silica gel trộn với phân đoạn cần tách, có độ tơi và không kết dính vào nhau. Chạy cột silica gel có đường kính 5cm, lượng silica gel nhồi cột là 200g. Ổn định và chạy cột bằng hệ dung môi H/E 95/5, sau đó tăng dần độ phân cực của các hệ dung môi rửa giải đến 100% ethyl acetate, và từ 100% ethyl acetate tới 100% methanol. Thu được 10 phân đoạn từ EA1.10.1 đến EA1.10.10. Kết tinh và rửa kết tinh phân đoạn EA1.10.2 thu được 1 chất sạch, kí hiệu là **SA5**.

Tách **SA2**: Tiếp tục chạy cột với phân đoạn EA1.10.4 với hệ dung môi rửa giải từ H/E 8/2 tăng dần độ phân cực tới H/E 3/7 thu được 4 phân đoạn. EA1.10.4.1 – EA1.10.4.4, trong đó phân đoạn EA1.10.4.2 chứa các tinh thể có màu vàng. Kiểm tra sắc kí bản mỏng TLC nhận thấy phân đoạn này chứa 56 mg chất sạch, kí hiệu là **SA2**.

#### 3.3.2.3. *Phân lập chất SA3*

Tách **SA3**: Từ phân đoạn EA1.11 (6,3 g) tiến hành chạy trên cột sắc kí silica gel đường kính 2 cm, chiều cao silica gel 18 cm bằng hệ dung môi H/ E 9/1 đến ethyl acetate 100% thu được 6 phân đoạn EA1.11.1- EA1.11.6 Tiếp tục chạy sắc kí silica gel với phân đoạn EA1.11.2 với điều kiện như chạy cột EA1.11, kết quả thu được 2 phân đoạn EA1.11.2.1-2. Sắc kí sephadex phân đoạn EA1.11.2.2 với hệ dung môi methanol, thu được chất sạch kí hiệu là **SA3**.

#### 3.3.2.4. *Phân lập chất SA4*

Tách **SA4**: Tách trên cột silica gel phân đoạn EA1.14 với các hệ dung môi rửa giải có độ phân cực tăng dần từ 100% ethyl acetate tới E/M 8/2 và từ E/M 8/2 tới E/M/W 8/1/1/ thu được 4 phân EA1.14.1-EA1.14.4. Tiếp tục tách phân đoạn EA1.14.2 với các hệ dung môi rửa giải với các hệ dung môi có độ phân cực tăng dần 100% ethyl acetate



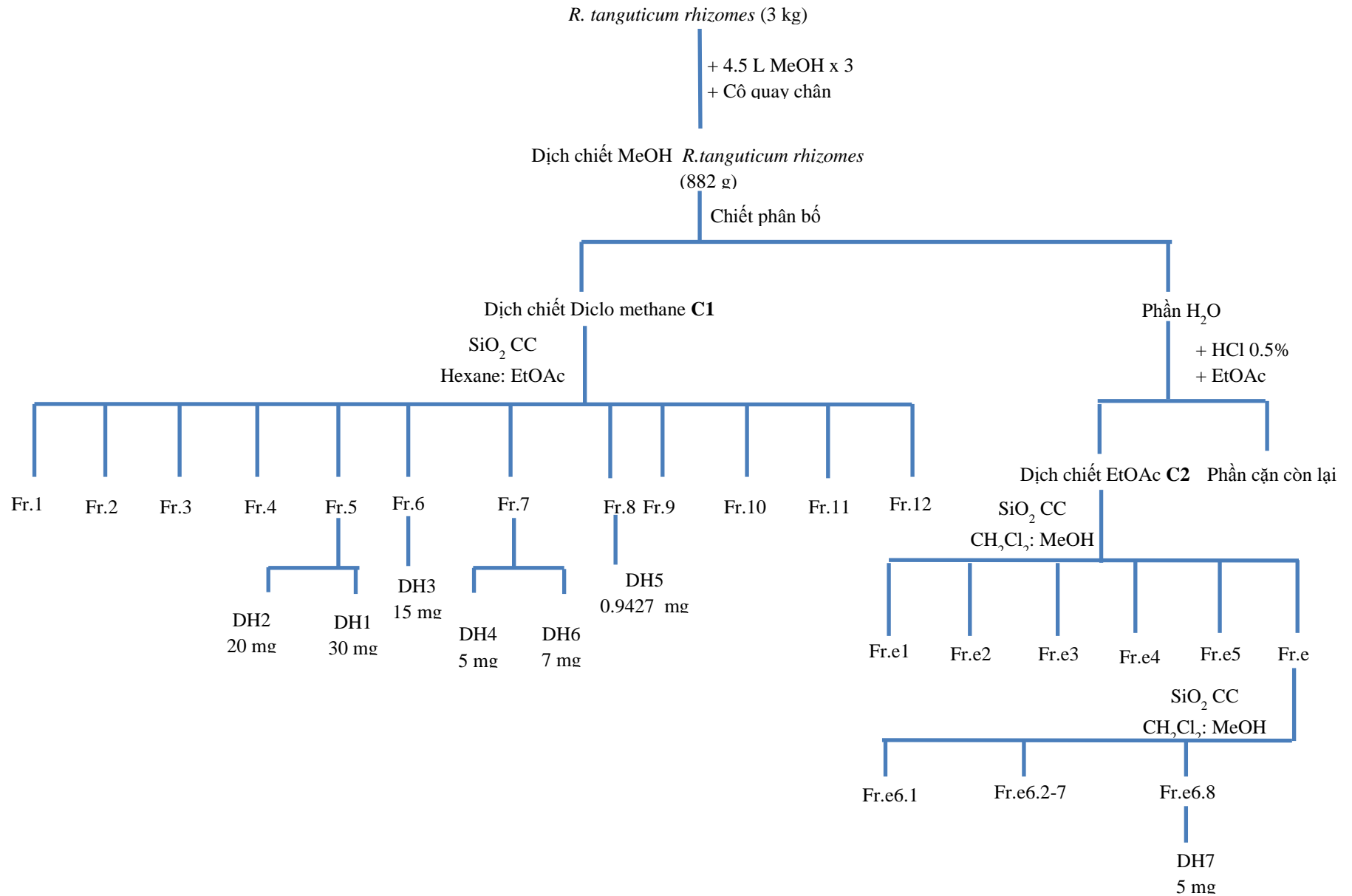
tới hệ E/M 8/1 thu được 3 phân đoạn EA1.14.2.1-EA1.14.2.3. Trong đó phân đoạn EA1.14.2.2 chứa 19 mg chất sạch, kí hiệu là **SA4**.

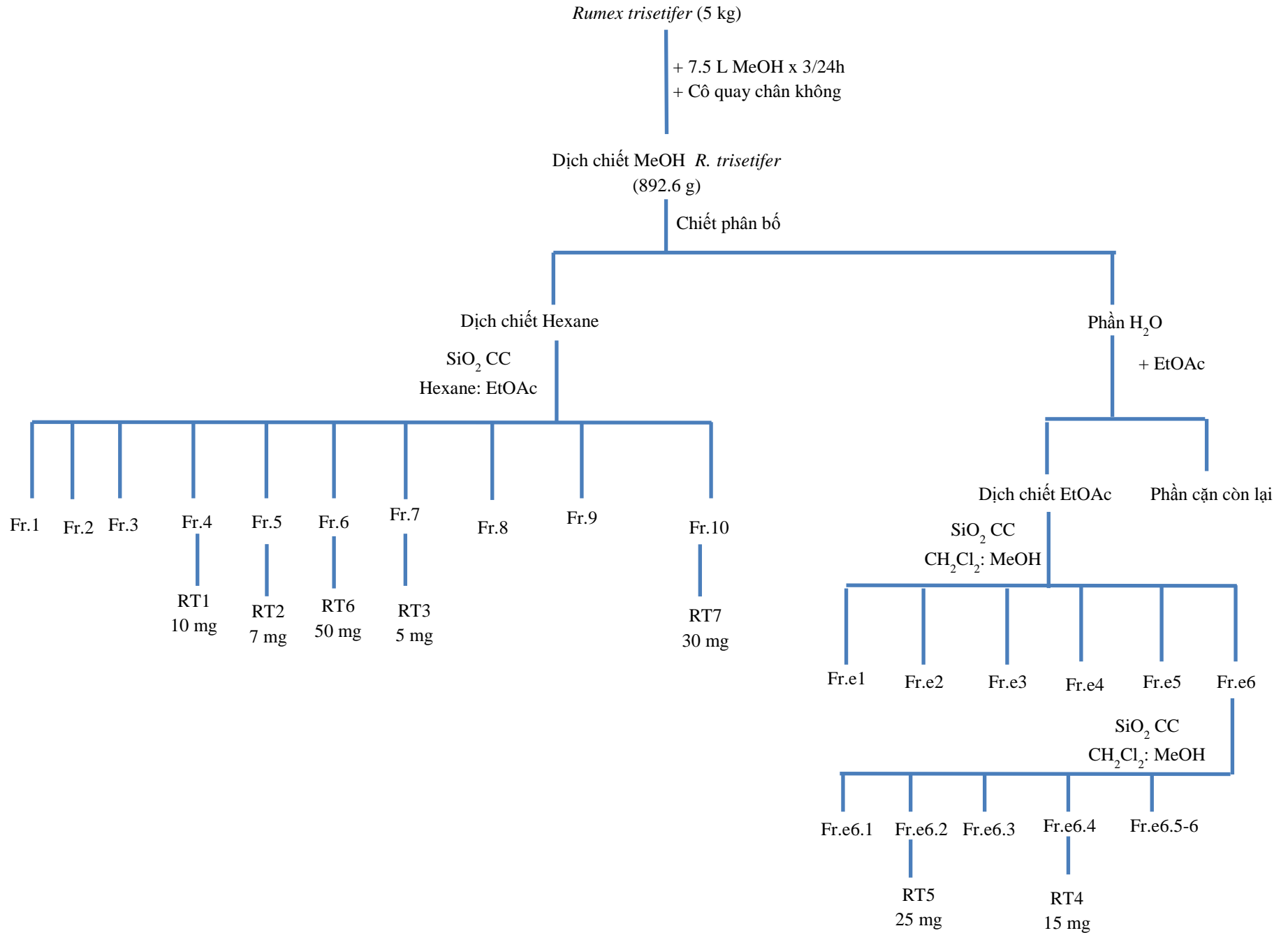
#### 3.3.2.5. Phân lập chất SA7, SA6 và SA8

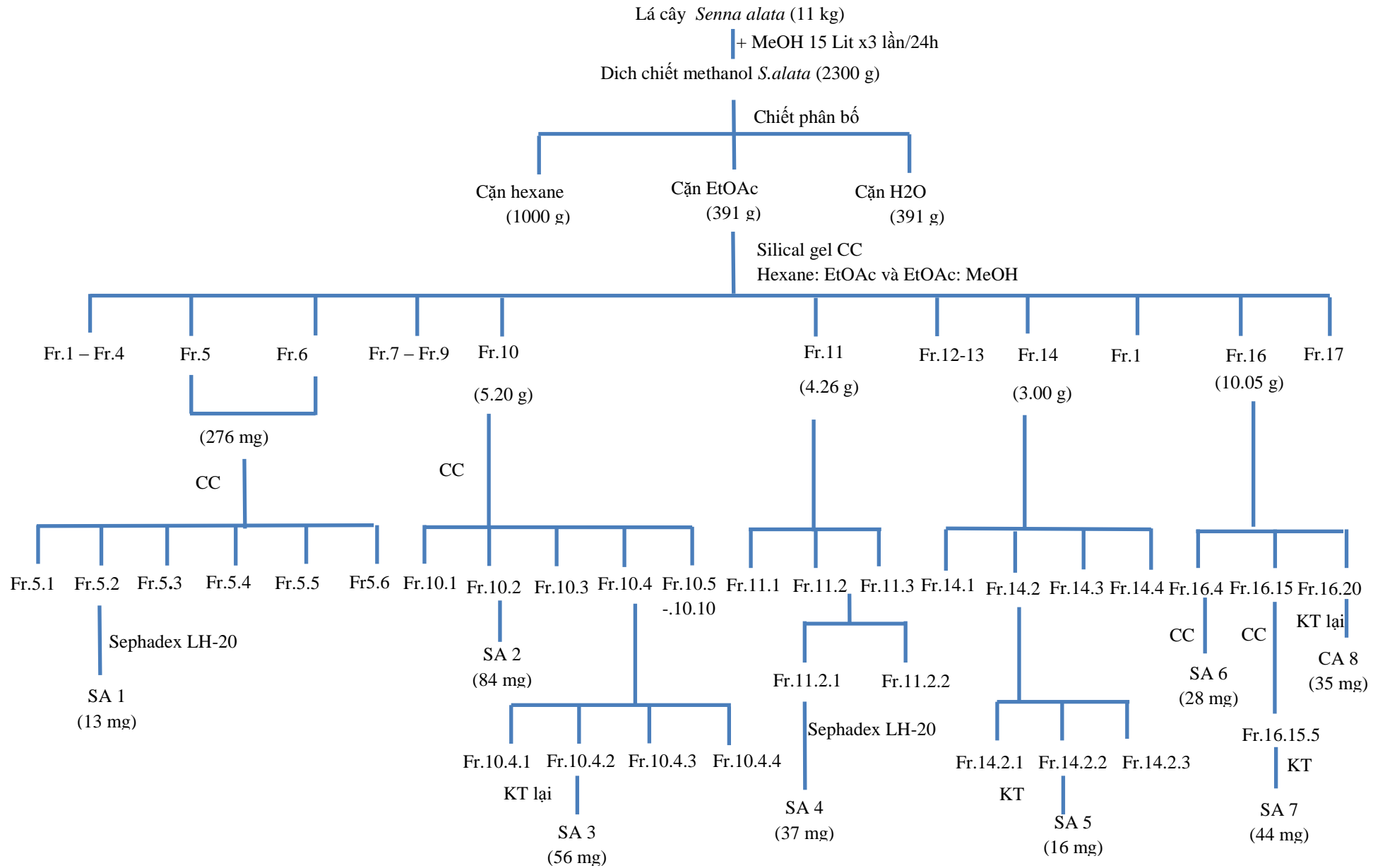
Tách **SA7**: Chạy cột sắc kí silica gel phân đoạn EA1.16 (12,1 g) trên cột đường kính 5 cm, chiều cao silica gel 32 cm, kích thước silica gel 40-63 $\mu$ m với dung môi rửa giải theo phương pháp gradient nồng độ từ n-hexane 80% đến ethyl acetate 100% và từ ethyl acetate 100% tới methanol 100%. Thu được 27 phân đoạn con từ EA1.16.1-EA1.16.27. Tiếp tục chạy cột sắc kí silica gel phân đoạn EA.1.16.4 (0,36 g) trên cột thủy tinh đường kính 2 cm, chiều cao silica gel 14 cm, kích thước silica gel 40-63 $\mu$ m thu được 4 phân đoạn EA1.16.4.1-4. Phân đoạn EA1.16.4.3 chứa một chất sạch, kí hiệu là **SA7**.

Tách **SA6**: Tiến hành kết tinh và rửa kết tinh sơ bộ phân đoạn EA1.16.20 thu được 35 mg chất sạch màu vàng, kí hiệu là **SA6**.

Tách **SA8**: Trong phân đoạn EA1.16.15 có một chất chính có hàm lượng lớn, sắc kí cột silica gel phân đoạn này trên cột đường kính 2 cm, chiều cao silica gel 21 cm, kích thước silica gel 40-63 $\mu$ m với dung môi rửa giải theo phương pháp gradient nồng độ từ n-hexane 80% đến ethyl acetate 100% và từ ethyl acetate 100% tới methanol 100%, thu được 8 phân đoạn từ EA1.16.15.1- EA1.16.15.8. Phân đoạn EA1.16.15.5 tiếp tục được chạy trên cột sắc kí sephadex LH20 đường kính 2 cm, chiều cao cột 30 cm, dung môi chạy cột là dung môi methanol. Kết quả thu được một chất sạch, kí hiệu là **SA8**.

Hình 3.1. Sơ đồ phân lập chất từ cây đại hoàng - *R. tanguticum*

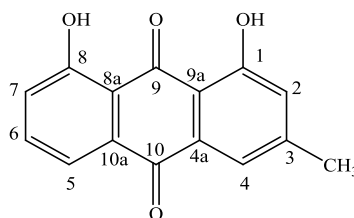
Hình 3.2. Sơ đồ phân lập chất từ cây luối bò - *R. trisetifer*

Hình 3.3. Sơ đồ phân lập chất từ cây muồng trâu *S.alata*

## CHƯƠNG 4. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 4.1. Cấu trúc các chất phân lập được từ cây đại hoàng – *R. tanguticum*

#### 4.1.1. Hợp chất DH1 (*chrysophanol*)



Hình 4.1. Cấu trúc hợp chất **DH1** (*chrysophanol*)

Bảng 4.1. Dữ liệu phổ của hợp chất **DH1** và *chrysophanol*

Vị trí	DH1		Chrysophanol [84]	
	$\delta_H^{a,c}$ (độ bội, $J = \text{Hz}$ )	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ (độ bội, $J = \text{Hz}$ )	$\delta_C^{a,b}$
1		162.7		161.6
2	7.09 (1H, brs)	124.3	7.22(1H, m)	124.1
3		149.3		149.2
4	7.64(1H, brs)	121.3	7.55(1H, m)	120.6
5	7.82 (1H, d, $J= 7.0 \text{ Hz}$ )	119.9	7.71 (1H, d, $J= 7.0 \text{ Hz}$ )	119.4
6	7.68 (1H, m)	136.9	7.80 (1H, m)	137.4
7	7.29 (1H, d, $J=8.5 \text{ Hz}$ )	124.5	7.38 (1H, d, $J= 8.3 \text{ Hz}$ )	124.4
8		162.4		161.4
9		192.5		191.7
10		182.0		181.5
4a		133.1		133.1
8a		115.9		115.9
9a		113.7		113.8
10a		133.6		133.4
OH-1	12.00	-	11.87	-
OH-8	12.11	-	11.97	-
3-CH <sub>3</sub>	2.47	22.2	2.44 (3H, s)	21.7

<sup>a</sup>Đo trong dung môi CDCl<sub>3</sub>, <sup>b</sup>125 MHz, <sup>c</sup>500 MHz.

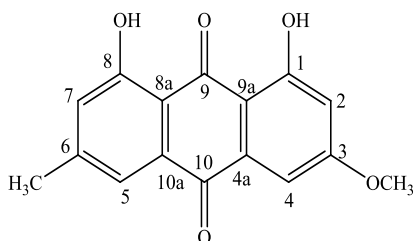
Trên phổ <sup>1</sup>H-NMR: Năm tín hiệu của proton thơm có độ dịch chuyển hóa học trong vùng 6-8 ppm. Trong đó có 1 doublet đặc trưng cho tín hiệu cộng hưởng của hydro ở carbon vị trí số 5 có độ dịch chuyển hóa học là  $\delta = 7.82 \text{ ppm}$  (1H, d,  $J = 7.0 \text{ Hz}$ ) chịu sự ảnh hưởng của tương tác spin-spin của hydro ở carbon ở vị trí số 7; tín hiệu cộng hưởng của hydro ở

carbon vị trí số 7 có độ chuyển dịch hóa học là 7.29 ppm (1H, d,  $J=8.5$  Hz). Tín hiệu cộng hưởng của hydro ở carbon vị trí số 2, số 4 và số 6 có độ chuyển dịch hóa học tương ứng là 7.09 ppm (1H, brs) 7.64 (1H, m) và 7.68 (1H, m).

Phổ  $^{13}\text{C}$ -NMR của **DH1** cho tín hiệu 15 C, trong đó có 2 tín hiệu cộng hưởng ở  $\delta_{\text{C}}$  192.5 (C-9) và 182.0 (C-10) đặc trưng của carbon ketone (quinon) và 2 tín hiệu  $\delta_{\text{C}}$  162.7 (C-1) và 162.4 (C-8) ppm đặc trưng của carbon trên nhân thơm mang nhóm thế oxy, 10 tín hiệu gồm năm tín hiệu carbon bậc IV cộng hưởng ở  $\delta_{\text{C}}$  149.3 (C-3), 133.6 (C-10a), 133.1 (C-4a), 115.9 (C-8a), 113.7 (C-9a) và năm tín hiệu carbon III là 5 tín hiệu của carbon thơm không nhóm thế cộng hưởng ở  $\delta_{\text{C}}$  136.9 (C-6), 124.5 (C-7), 124.3 (C-2), 121.3(C-4), 119.9(C-5). Nhóm methyl cộng hưởng ở vùng trường cao  $\delta_{\text{C}}$  22.2  $\delta_{\text{H}}$  2.27 ppm đặc trưng của nhóm methyl thế trên nhân.

So sánh với tài liệu tham khảo [84] xác định được **DH1** là chrysophanol.

#### 4.1.2. Hợp chất **DH2** (physcion)



Hình 4.2. Cấu trúc hợp chất **DH2** (physcion)

Bảng 4.2. Dữ liệu phổ của hợp chất **DH2** và physcion

Vị trí	<b>DH2</b>		<b>Physcion</b> [84]	
	$\delta_{\text{H}}^{a,c}$ (độ bội, $J = \text{Hz}$ )	$\delta_{\text{C}}^{a,b}$	$\delta_{\text{H}}^{a,e}$ (độ bội, $J = \text{Hz}$ )	$\delta_{\text{C}}^{a,d}$
1		165.20		165.20
2	6.67 (1H, d, $J= 1.5$ Hz)	106.78	6.68 (1H, d, $J= 2.57$ Hz)	106.78
3		166.56		166.56
4	7.35 (1H, d, $J= 1.5$ Hz)	108.22	7.36 (1H, d, $J= 2.57$ Hz)	108.22
5	7.61(1H, brs)	121.29	7.62 (1H, d, $J= 0.92$ Hz)	121.29
6		148.45		148.44
7	7.07 (1H, brs)	124.51	7.07 (1H, d, $J= 0.92$ Hz)	124.51
8		162.52		162.51
9		190.80		190.82
10		182.01		182.05

4a		133.23		133.23
8a		110.27		110.27
9a		113.69		113.69
10a		135.27		135.27
OH-1	12.10	-	12.11	-
OH-8	12.30	-	12.30	-
OCH <sub>3</sub> -	3.93 (3H, s)	56.09	3.93	56.07
3-CH <sub>3</sub>	2.44 (3H, s)	22.17	2.44	22.15

<sup>a</sup>Đo trong dung môi CDCl<sub>3</sub>, <sup>b</sup>125 MHz, <sup>c</sup>500 MHz, <sup>d</sup>100 MHz, <sup>e</sup>400 MHz.

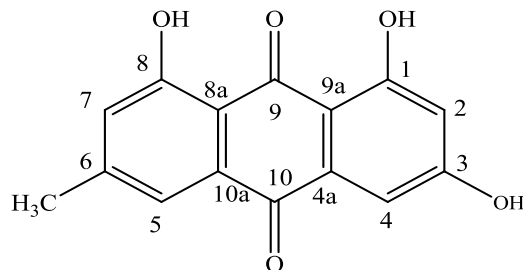
Trên phổ <sup>1</sup>H-NMR:

Bốn tín hiệu của proton thơm có độ chuyển dịch hóa học trong vùng 6-8 ppm. Trong đó có 1 doublet đặc trưng cho tín hiệu cộng hưởng của hydro ở cacbon vị trí số 2 có độ dịch chuyển hóa học là  $\delta = 7.35$  ppm (1H, d,  $J = 1.5$  Hz) chịu sự ảnh hưởng của tương tác spin-spin của hydro ở cacbon ở vị trí số 4; tín hiệu cộng hưởng của hydro ở cacbon vị trí số 4 có độ chuyển dịch hóa học là 6.67 ppm (1H, d,  $J=1.5$  Hz). Tín hiệu cộng hưởng của hydro ở cacbon vị trí số 5 và số 7 có độ chuyển dịch hóa học tương ứng là 7.61 ppm (1H, brs) và 7.07 ppm (1H, brs).

Phổ <sup>13</sup>C-NMR của **DH2** cho tín hiệu 16 C, trong đó có 2 tín hiệu cộng hưởng ở  $\delta_C$  190.8 (C-9) và 182.0 (C-10) đặc trưng của carbon ketone (quinon) và 3 tín hiệu  $\delta_C$  166.56 (C-3), 165.20 (C-1) và 162.52 (C-8) ppm đặc trưng của carbon trên nhân thơm mang nhóm thế oxy. Chín tín hiệu gồm năm tín hiệu carbon bậc IV cộng hưởng ở  $\delta_C$  148.45 (C-6), 135.2 (C-10a), 133.2 (C-4a), 113.6 (C-9a), 110.2 (C-8a) và bốn tín hiệu carbon III là 5 tín hiệu của carbon thơm không nhóm thế cộng hưởng ở  $\delta_C$  124.5 (C-7), 121.2 (C-5), 108.2 (C-4), 106.7 (C-2) ppm. Nhóm methyl cộng hưởng ở vùng trường cao  $\delta_C$  22.1  $\delta_H$  2.44 ppm đặc trưng của nhóm methyl thế trên nhân thơm. Khác với hợp chất **DH1**, **DH2** còn có tín hiệu với  $\delta_C$  56.09  $\delta_H$  3.93 đặc trưng của nhóm methoxyl thế trên nhân thơm

So sánh với tài liệu tham khảo [84] xác định được **DH2** là physcion.

### 4.1.3. Hợp chất DH3 (emodin)



Hình 4.3. Cấu trúc hợp chất **DH3** (emodin)

Bảng 4.3. Dữ liệu phổ của hợp chất **DH3** và emodin

Vị trí	<b>DH3</b>		<b>Emodin [84]</b>	
	$\delta_H^{a,c}$ (độ bội, $J = \text{Hz}$ )	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,e}$ (độ bội, $J = \text{Hz}$ )	$\delta_C^{a,d}$
1		164.93		164.54
2	6.59 (1H, d, $J= 2.0 \text{ Hz}$ )	108.41	6.59 (1H, d, $J= 2.46 \text{ Hz}$ )	108.02
3		166.08		165.54
4	7.12 (1H, d, $J= 2.0 \text{ Hz}$ )	109.27	7.12 (1H, d, $J= 2.28 \text{ Hz}$ )	108.84
5	7.49 (1H, brs)	120.95	7.49 (1H, d, $J= 0.35 \text{ Hz}$ )	120.58
6		148.72		148.35
7	7.17 (1H, brs)	124.61	7.16 (1H, d, $J= 0.35 \text{ Hz}$ )	124.23
8		161.89		161.54
9		190.18		189.83
10		181.88		181.48
4a		133.31		132.91
8a		109.42		109.06
9a		113.86		113.46
10a		135.60		135.21
OH-1	12.09	-	12.08	-
OH-8	12.02	-	12.01	-
OH-6	-	-	11.37	-
3-CH <sub>3</sub>	2.47 (3H, s)	21.99	2.41	21.60

<sup>a</sup>Đo trong dung môi DMSO-*d*<sub>6</sub>, <sup>b</sup>125 MHz, <sup>c</sup>500 MHz, <sup>d</sup>100 MHz, <sup>e</sup>400 MHz.

Trên phổ <sup>1</sup>H-NMR: Năm tín hiệu của proton thơm có độ chuyển dịch hóa học trong vùng 6-8 ppm. Trong đó có 1 doublet đặc trưng cho tín hiệu cộng hưởng của hydro ở carbon vị trí số 2 có độ dịch chuyển hóa học là  $\delta = 6.59 \text{ ppm}$  (1H, d,  $J = 2.0 \text{ Hz}$ ) chịu sự ảnh hưởng của tương tác spin-spin của hydro ở carbon ở vị trí số 4; tín hiệu cộng hưởng của hydro ở carbon vị trí số 4 có độ chuyển dịch hóa học là  $7.12 \text{ ppm}$  (1H, d,  $J = 2.0 \text{ Hz}$ ).

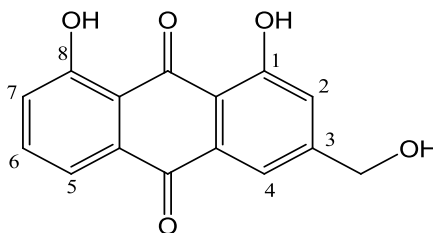


Tín hiệu cộng hưởng của hydro ở carbon vị trí số 5, số 7 có độ chuyển dịch hóa học tương ứng là 7.49 ppm (1H, brs) 7.17 (1H, brs).

Phổ  $^{13}\text{C}$ -NMR của **DH3** cho tín hiệu 15 C, trong đó có 2 tín hiệu cộng hưởng ở  $\delta_{\text{C}}$  190.18 (C-9) và 181.88 (C-10) đặc trưng của carbon keton (quinon) và 3 tín hiệu  $\delta_{\text{C}}$  166.08 (C-3), 164.93 (C-1) và 161.89 (C-8) ppm đặc trưng của carbon trên nhân thơm mang nhóm thế oxy. 10 tín hiệu gồm năm tín hiệu carbon bậc IV cộng hưởng ở  $\delta_{\text{C}}$  148.7 (C-6), 135.6 (C-10a), 133.3 (C-4a), 113.8 (C-9a), 109.2 (C-4) và bốn tín hiệu carbon bậc III là 4 tín hiệu của carbon thơm không nhóm thế cộng hưởng ở  $\delta_{\text{C}}$  124.6 (C-7), 120.9 (C-5), 109.4 (C-8a), 108.4 (C-2). Nhóm methyl cộng hưởng ở vùng trường cao  $\delta_{\text{C}}$  21.9  $\delta_{\text{H}}$  2.47 ppm đặc trưng của nhóm methyl thế trên nhân.

So sánh với tài liệu tham khảo [84] xác định được **DH3** là emodin.

#### 4.1.4. Hợp chất **DH4** (alo-emodin)



Hình 4.4. Cấu trúc hợp chất **DH4** (alo-emodin)

Bảng 4.4. Dữ liệu phổ của hợp chất **DH4** và alo-emodin

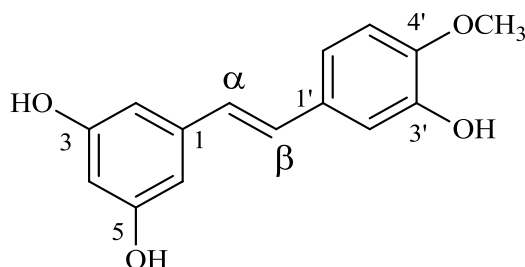
	<b>DH4</b>	<b>Aloe-emodin</b> [85]
	$\delta_{\text{H}}^{a,c}$ (độ bội, $J = \text{Hz}$ )	$\delta_{\text{H}}^{\#e}$ (độ bội, $J = \text{Hz}$ )
H-2	7.33 (1H, s, C2-H)	7.33 (1H, s, C2-H)
-CH <sub>2</sub> -	4.75 (2H, s, -CH <sub>2</sub> -)	4.66 (2H, s, -CH <sub>2</sub> -)
H-4	7.76 (1H, s, C4-H)	7.73 (1H, s, C4-H)
H-5	7.77 (1H, d, $J = 6$ br Hz)	7.75 (1H, d, $J = 8,0$ Hz)
H-6	7.81 (1H, t-like, $J = 8.0, 7.5$ Hz)	7.84 (1H, t-like $J = 8.4, 7.2$ Hz)
H-7	7.34 (1H, d, $J = 7.5$ Hz)	7.42 (1H, d, $J = 8.0$ Hz)

<sup>a</sup>Đo trong dung môi acetone- $d_6$ , <sup>c</sup>500 MHz, <sup>#</sup>đo trong dung môi DMSO- $d_6$ , <sup>e</sup>300 MHz.

Chất **DH4** được phân lập dưới dạng tinh thể có màu vàng tươi và tan tốt trong axeton. Trên phổ khối ESI-MS negative mode xuất hiện peak ion giả phân tử  $m/z$  269  $[M-H]^-$  phù hợp với công thức  $C_{15}H_{10}O_5$ . Trên phổ  $^1H$ -NMR có xuất hiện tín hiệu của 6H được phân chia thành 2 nhóm. Một tín hiệu singlet  $\delta$  4.80 ppm (2H) ứng với tín hiệu cộng hưởng của nhóm  $-CH_2$  liên kết với nhân thơm. Vùng proton vòng thơm xuất hiện 2 singlet tại  $\delta$  7.33 (1H) và  $\delta$  7.76 (1H) đặc trưng cho 2 proton ở vị trí số 2 và số 4. Tín hiệu triplet  $\delta$  7.81 (1H, t-like,  $J= 8.0, 7.5$  Hz) đặc trưng cho proton ở vị trí số 6 trên vòng anthraquinone. Hai tín hiệu doublet  $\delta$  7.34 (1H, d,  $J= 7.5$  Hz) và  $\delta$  7.77 (1H, d,  $J= 6.0$  Hz) tương ứng các nhóm  $=CH-$  tại vị trí số 7 và 5 trong vòng anthraquinone.

Kết hợp phân tích dữ liệu phổ ESI-MS và  $^1H$ -NMR có thể xác nhận **DH4** là aloemodin (1,8-dihydroxy-3(hydroxymethyl)-9,10-anthracenedione).

#### 4.1.5. Hợp chất DH5 (rhapotigenin)



Hình 4.5. Cấu trúc hợp chất **DH5** (rhapotigenin)

Bảng 4.5. Dữ liệu phổ của hợp chất **DH5** và rhapotigenin

Vị trí	<b>DH5</b>		<b>Rhapotigenin</b> [86]	
	$\delta_H^{a,c}$ (độ bội, $J = \text{Hz}$ )	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ (độ bội, $J = \text{Hz}$ )	$\delta_C^{a,b}$
1		139.73		141.3
2	6.44 (1H, d, $J= 2.0$ Hz)	104.47	6.44 (1H, d, $J= 2.44$ Hz)	106.0
3		158.27		159.8
4	6.16 (1H, t, $J= 2.0$ Hz)	101.41	6.16 (1H, t, $J= 1.7$ Hz)	102.9
5		158.27		159.8
6	6.44 (1H, d, $J= 2.0$ Hz)	104.47	6.44(1H, d, $J= 2.44$ Hz)	106.0
1'		130.82		132.4
2'	6.99 (1H, d, $J=1.5$ Hz)	118.64	7.00 (1H, d, $J=1.9$ Hz)	120.2
3'	-	146.31	-	147.9
4'	-	147.57	-	149.1
5'	6.87 (1H, d, $J=8.5$ Hz)	111.34	6.91(1H, m)	113.8

6'	6.93 (1H, d, <i>m</i> )	112.20	6.91(1H, <i>m</i> )	112.9
$\alpha$	6.90 (1H, d, $J=14.5$ Hz)	127.97		129.5
$\beta$	6.78 (1H, d, $J=16.0$ Hz)	126.47	6.79 (1H, d, $J=16.6$ Hz)	128.0
O-CH <sub>3</sub>	3.83 (3H, s)	55.02	3.85 (3H, s)	56.5

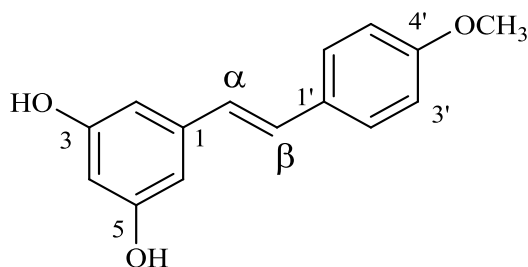
<sup>a</sup>Đo trong dung môi CD<sub>3</sub>OD, <sup>b</sup>125 MHz, <sup>c</sup>500 MHz, <sup>d</sup>100 MHz, <sup>e</sup>400 MHz.

Phổ <sup>1</sup>H-NMR của **DH5**, cho thấy sự hiện diện của một nhóm methoxy ( $\delta = 3.84$ ; 3H; s), một nhóm *trans*-olefin ( $\delta = 6.79$ ; H- $\alpha$ ; d;  $J = 16,0$  Hz và  $6.90$ ; H- $\beta$ ; d;  $J = 14.5$  Hz) và hai vòng thơm độc lập. Tại  $\delta = 6.16$  (1H; t;  $J = 2.0$  Hz; H-4) và  $6.44$  (2H; d;  $J = 2.5$  Hz; H-2, H-6), cho thấy ba tín hiệu proton của vòng thơm thế ở vị trí meta 1,3,5 và tại  $\delta = 6.87$  (1H; d;  $J = 8.5$  Hz; H-5');  $6.93$  (1H; m; H-6');  $6.99$  (1H; d;  $J = 1.5$  Hz; H-2') cho thấy ba tín hiệu proton của vòng thơm còn lại thế ở vị trí 1,3,4.

Phổ <sup>13</sup>C-NMR kết hợp với phổ DEPT-135, cho thấy 13 tín hiệu của 15 carbon, trong đó có 6 carbon bậc IV, 8 carbon bậc III và 1 nhóm methoxyl ( $\delta = 55.0$ ; O-CH<sub>3</sub>). Sự xuất hiện của hai tín hiệu ở trường thấp, tại  $\delta = 158.3$  (C-3, 5) và  $146.3$  (C-3') đặc trưng cho ba carbon thơm mang nhóm thế hydroxyl. Hai tín hiệu carbon của nhóm *trans*-olefin cũng xuất hiện tại  $\delta = 127.97$  và  $126.7$ . Các tín hiệu carbon bậc III còn lại đều thuộc về carbon trên nhân thơm không có nhóm thế:  $\delta = 104.5$  (C-2,6);  $101.4$  (C-4);  $111.3$  (C-2');  $118.6$  (C-5') và  $112.2$  (C-6').

Từ các đặc điểm phổ như trên, chứng tỏ hợp chất **DH5** có cấu trúc của stilbene với một nhóm thế methoxy (ở C-4') và ba nhóm thế hydroxyl (ở C-3, C-5 và C-3'). So sánh dữ liệu phổ <sup>1</sup>H-NMR và <sup>13</sup>C-NMR của **DH5** với tư liệu [86], cho thấy sự trùng khớp (Bảng 4.5). Vậy, cấu trúc của DH5 được xác định là rhapontigenin với tên IUPAC là (E)-5-(3-hydroxy-4-methoxystyryl)benzene-1,3-diol.

#### 4.1.6. Hợp chất DH6 (deoxyrhapotigenin)



Hình 4.6. Cấu trúc hợp chất **DH6** (deoxyrhapotigenin)

Bảng 4.6. Dữ liệu phổ của hợp chất **DH6** và deoxyrhapontigenin

Vị trí	<b>DH6</b>		<b>Desoxyrhapontigenin</b> [86]	
	$\delta_H^{a,c}$ (độ bội, $J = \text{Hz}$ )	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ (độ bội, $J = \text{Hz}$ )	$\delta_C^{a,b}$
1		141.15		141.3
2	6.45 (1H, d, $J = 2.5 \text{ Hz}$ )	105.84	6.46 (1H, d, $J = 2.0 \text{ Hz}$ )	105.9
3		159.69		159.8
4	6.16 (1H, t, $J = 2.0 \text{ Hz}$ )	102.80	6.18 (1H, t, $J = 2.0 \text{ Hz}$ )	102.9
5		159.69		159.8
6	6.45 (1H, d, $J = 2.5 \text{ Hz}$ )	105.84	6.46 (1H, d, $J = 2.0 \text{ Hz}$ )	105.9
1'		131.53		131.6
2'	7.43 (1H, d, $J = 8.5 \text{ Hz}$ )	128.69	7.42 (1H, d, $J = 8.8 \text{ Hz}$ )	128.8
3'	6.89 (1H, d, $J = 9.0 \text{ Hz}$ )	115.12	6.88 (1H, d, $J = 8.8 \text{ Hz}$ )	115.2
4'		160.84		160.9
5'	6.89 (1H, d, $J = 9.0 \text{ Hz}$ )	115.12	6.88 (1H, d, $J = 8.8 \text{ Hz}$ )	115.2
6'	7.43 (1H, d, $J = 8.5 \text{ Hz}$ )	128.80	7.42 (1H, d, $J = 8.8 \text{ Hz}$ )	128.8
$\alpha$	6.98 (1H, d, $J = 16.0 \text{ Hz}$ )	129.07	6.97 (1H, d, $J = 16.4 \text{ Hz}$ )	129.2
$\beta$	6.83 (1H, d, $J = 16.5 \text{ Hz}$ )	127.79	6.83 (1H, d, $J = 16.4 \text{ Hz}$ )	127.9
O-CH <sub>3</sub>	3.80 (3H, s)	55.72	3.78 (3H, s)	55.8

<sup>a</sup>Đo trong dung môi CD<sub>3</sub>OD, <sup>b</sup>125 MHz, <sup>c</sup>500 MHz, <sup>d</sup>100 MHz, <sup>e</sup>400 MHz.

Phổ <sup>1</sup>H-NMR của **DH6** cho thấy 9 tín hiệu proton trong khoảng  $\delta_H = 6-8$  ppm bao gồm 2 tín hiệu thuộc về một nhóm trans-olefin ( $\delta_H = 6.98$ ; H- $\alpha$ ; d;  $J = 16.0 \text{ Hz}$  và  $6.83$ ; H- $\beta$ ; d;  $J = 16.5 \text{ Hz}$ ) và 7 tín hiệu thuộc hai vòng thơm độc lập.

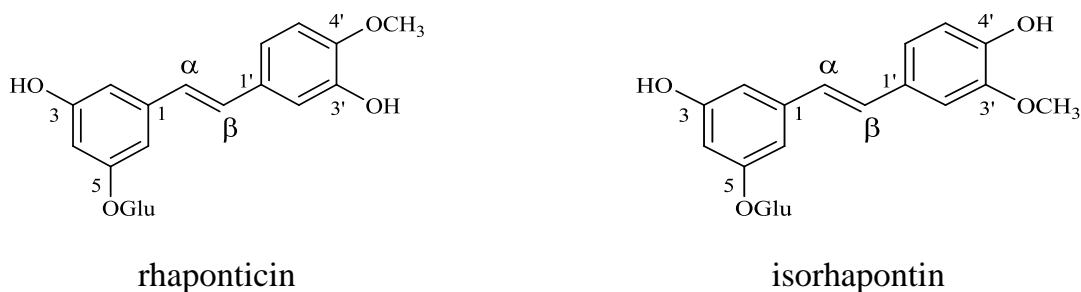
Tại  $\delta_H = 6.16$  (1H; t;  $J = 2.0 \text{ Hz}$ ; H-4) và  $6.44$  (2H; d;  $J = 2.5 \text{ Hz}$ ; H-2, H-6), cho thấy ba tín hiệu proton của vòng thơm thế ở vị trí meta 1,3,5 và tại  $\delta = 6.89$  (2H; d;  $J = 9.0 \text{ Hz}$ ; H-5', H-3');  $7.43$  (2H; d;  $J = 8.5 \text{ Hz}$ ; H-2', H-6') cho thấy bốn tín hiệu proton của vòng thơm còn lại thế ở vị trí para 1,4. Ngoài ra ở trường cao, có sự hiện diện của một nhóm methoxy tại  $\delta = 3.84$  (3H; s).

Phổ jmod của **DH6** cho thấy 11 tín hiệu của 15 carbon, trong đó có 5 tín hiệu carbon bậc IV, 9 tín hiệu carbon bậc III và 1 nhóm methoxyl ( $\delta_C = 55.72$ ; O-CH<sub>3</sub>). Trong 5 tín hiệu carbon bậc IV có xuất hiện của ba tín hiệu ở trường thấp, tại  $\delta_C = 160.84$  và  $159.69$  (C-3, C-5) đặc trưng cho carbon thơm mang nhóm thế oxy, hai tín hiệu còn lại cộng hưởng tại  $\delta_C$  141.15 (C-1), 131.53 (C-1'). Chín tín hiệu carbon bậc III gồm 7 tín hiệu carbon đều thuộc về carbon trên nhân thơm không có nhóm thế:  $\delta_C = 128.69$  (C-2', C-6'),  $115.12$  (C-3', C-5'),  $105.84$  (C-2, C-6);  $102.80$  (C-4); và hai tín

hiệu carbon của nhóm *trans*-olefin (=CH) cũng xuất hiện tại  $\delta_C = 129.07$  và  $127.79$  (trên phổ HSQC).

Từ các đặc điểm phổ như trên, chứng tỏ hợp chất **DH6** có cấu trúc của stilbene với một nhóm thế methoxy (ở C-4') và hai nhóm thế hydroxyl (C-3, C-5). So sánh dữ liệu phổ  $^1\text{H-NMR}$  và jmod của **DH6** với tư liệu [86], cho thấy sự trùng khớp. Vậy, cấu trúc của **DH6** được xác định là desoxyrhapontigenin với tên IUPAC là (E)-5-(4-methoxystyryl)benzene-1,3-diol.

#### 4.1.7. Hợp chất **DH7** (rhaponticin và isorhapontin)



Hình 4.7. Cấu trúc hợp chất **DH7** (rhaponticin và isorhapontin)

Phổ  $^{13}\text{C-NMR}$  và phổ DEPT-135 của hỗn hợp **DH7** cho thấy 42 tín hiệu carbon của hỗn hợp hai hợp chất. Các tín hiệu này xếp thành 21 cặp tương tự nhau (Theo tỉ lệ 1:1). Trong số 21 tín hiệu carbon của chất 1, có sự xuất hiện của bốn tín hiệu ở trường thấp, tại  $\delta_C$  160.47 (C-3), 159.60 (C-5), 149.07 (C-4', O-CH<sub>3</sub>) và 147.71 (C-3') đặc trưng cho carbon thơm liên kết với oxy. Ngoài ra, còn xuất hiện tín hiệu carbon của nhóm *trans*-olefin tại  $\delta = 129.94$  và  $127.50$ ; một vòng thơm thế ở các vị trí 1,3,5; một vòng thơm khác thế ở các vị trí 1,3,4 và một gốc đường ( $\delta = 62 - 102$  ppm). Các đặc điểm này cho thấy cấu trúc stilbene của chất 1. Các tín hiệu của chất 2 cũng tương tự như chất 1. So sánh với tư liệu [86] và [87], dự đoán **DH7** là hỗn hợp đồng phân hình học của 2 chất rhaponticin và isorhapontin, có cấu trúc như Hình 4.7. Tên IUPAC của 2 chất lần lượt là (2S,3R,4S,5S,6R)-2-[3-hydroxy-5-[(E)-2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)ethenyl]phenoxy]-6-(hydroxymethyl)oxane-3,4,5-triol và 5-[(E)-2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)ethenyl]benzene-1,3-diol. Phổ proton của hỗn hợp **DH7** cũng phù hợp với các cấu trúc nêu trên

Bảng 4.7. Dữ liệu phổ của hợp chất DH7 và chất tham khảo

Vị trí	DH7		Rhaponticin		Isorhapontin	
	$\delta_H^{a,c}$ (độ bội, $J = \text{Hz}$ )	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,e}$ (độ bội, $J = \text{Hz}$ )	$\delta_C^{a,d}$	$\delta_H^{\#,c}$ (độ bội, $J = \text{Hz}$ )	$\delta_C^{\#,b}$
1		141.22		141.3		
2	6.79 1H, brs	107.09	6.79 1H, brs	107.2		
3		160.47		160.6		
4	6.44 1H, brs	104.23	6.46 1H, brs	104.3		
5		159.60		159.8		
6	6.60 1H, brs	108.41	6.61 1H, brs	108.5		
1'		132.10		132.2		
2'	7.01 1H, m	113.64	-	113.8		
3'		147.71		147.8		
4'		149.07		149.2		
5'	6.88 1H, m	112.67	6.89 1H, d, $J=8.4 \text{ Hz}$	112.8		
6'	6.94 1H, m	120.17	6.95 1H, dd, $J=6.4, 1.6 \text{ Hz}$	120.3		
$\alpha$	6.88 1H, m	129.94	6.97 1H, d, $J=16.4$	130.1		
$\beta$	6.94 1H, m	127.50	6.84 1H, d, $J=16.4$	127.6		
O-CH <sub>3</sub>	3.84 3H, s	56.40	3.86 3H, s	56.5		
Glu						
1	4.63 1H, m	102.40	4.89 1H, d, $J=7.2 \text{ Hz}$	102.5		

2	3.39 1H, m	74.95	3.36 1H, m	75.1	
3	3.81 1H, m	78.03	3.80 1H, m	-	
4	3.48 1H, m	71.47	3.48 1H, m	71.6	
5	3.72 1H, m	78.23	3.71 1H, m	78.2	
6	3.93 2H, m	62.57	3.93 2H dd $J=12.0, 2.4$	62.7	
1		140.75			140.5
2	6.71 1H, brs	109.15			6.72 1H, brs 106.2
3		159.27			159.7
4	6.36 1H, brs	104.15			6.34 1H, t, $J=4.1\text{Hz}$ 104.2
5		160.06			160.2
6	6.52 1H, brs	111.32			6.57 1H, brs 108.6
1'		131.73			131.3
2'	7.01 1H, brs	116.87			7.02 1H, d, $J=2.1$ 114.3
3'		147.40			147.9
4'		148.36			149.1
5'	6.86 1H, m	112.40			6.90 1H, d, $J=8.2$ 13.4
6'	6.93 1H, m	121.98			6.95 1H, d, $J=8.2, 2.1$ 119.9
$\alpha$	6.93 1H, m	127.50			7.0 1H, d, $J=16.5$ 127.4
$\beta$	6.81 1H, m	129.76			6.8 1H, d, $J=16.5$ 129.9
O-CH <sub>3</sub>	3.78 3H, s	57.7			3.77 3H, s 57.7

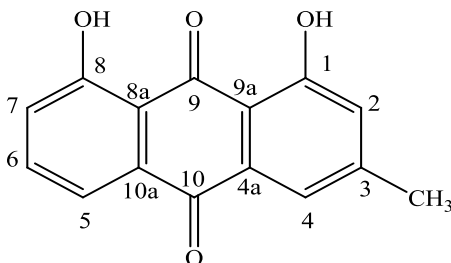
Glu					
1	4.62 1H, m	102.45		4.8 1H, d, $J=7.6$	102.0
2	3.29 1H, m	74.78		3.16 1H, m	74.6
3	3.37 1H, m	77.70		3.32 1H, m	78.4
4	3.29 1H, m	70.92		3.21 1H, m	71.0
5	3.35 1H, m	77.95		3.27 1H, m	78.0
6	3.92 2H, m	62.10		-	62.0

<sup>a</sup>Đo trong dung môi  $CD_3OD$ , <sup>b</sup>125 MHz, <sup>c</sup>500 MHz, <sup>#</sup> đo trong dung môi  $DMSO-d_6$ , <sup>d</sup>100 MHz, <sup>e</sup>400 MHz.



## 4.2. Cấu trúc các chất phân lập được từ cây lười bò *R. trisetifer*

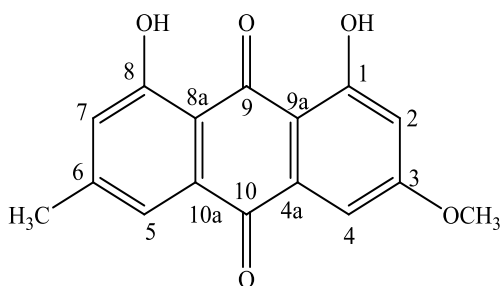
### 4.2.1. Hợp chất RT1 (*chrysophanol*)



Hình 4.8. Cấu trúc hợp chất **RT1** (*chrysophanol*)

Xem biện luận **DH1**

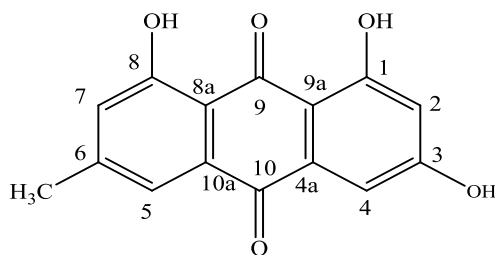
### 4.2.2. Hợp chất RT2 (*physcion*)



Hình 4.9. Cấu trúc hợp chất **RT2** (*physcion*)

Xem biện luận **DH2**

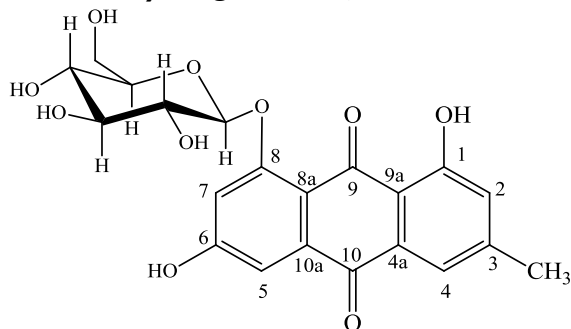
### 4.2.3. Hợp chất RT3 (*emodin*)



Hình 4.10. Cấu trúc hợp chất **RT3** (*emodin*)

Xem biện luận **DH3**

#### 4.2.4. Hợp chất RT4 (emodin-8-O- $\beta$ -D-glucoside)



Hình 4.11. Cấu trúc hợp chất **RT4** (emodin-8-O- $\beta$ -D-glucoside)

Bảng 4.8. Dữ liệu phổ của hợp chất **RT4** và emodin-8-O- $\beta$ -D-glucoside

Vị trí	<b>RT4</b>		<b>Emodin-8-O-<math>\beta</math>-D-glucoside</b> [88]	
	$\delta_H^{a,c}$ (độ bội, $J = \text{Hz}$ )	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,e}$ (độ bội, $J = \text{Hz}$ )	$\delta_C^{a,d}$
1		161.03		161.66
2	7.00 (1H, br s)	124.14	7.02 (1H, d, $J = 2.4 \text{ Hz}$ , H-2)	124.06
3		146.86		146.70
4	7.46 (1H, brs)	119.21	7.45 (1H, brs, H-4)	119.13
5	7.28 (1H, d, $J = 1.5 \text{ Hz}$ )	108.29	7.29 (1H, d, $J = 2.7 \text{ Hz}$ , H-5)	108.46
6		164.15		164.15
7	7.16 (1H, brs)	108.29	7.16 (1H, brs, H-7)	101.14
8		161.54		160.95
9		186.39		186.36
10		182.08		181.86
4a		132.06		131.97
8a		113.31		113.39
9a		114.43		114.36
10a		136.47		136.36
3-CH <sub>3</sub>	2.41 (3H, s)	21.35	2.40 (3H, s)	22.3
Glu				
1'	5.10 (1H, d, $J = 7.5 \text{ Hz}$ )	100.81	5.05 (1H, d, $J = 7.0 \text{ Hz}$ )	101.14
2'	3.17-3.75 (6H, m)	73.24	3.20-3.80 (6H, m)	73.29
3'		76.36		76.27
4'		69.45		69.56
5'		77.27		77.30
6'		60.57		60.72

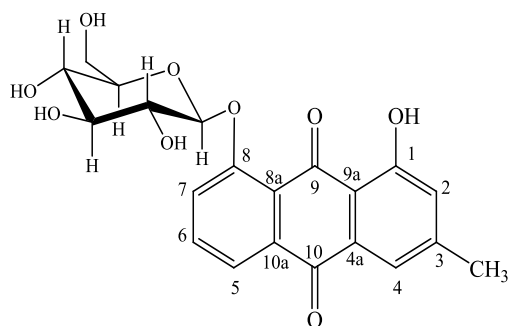
<sup>a</sup>Đo trong dung môi DMSO- $d_6$ , <sup>b</sup>125 MHz, <sup>c</sup>500 MHz, <sup>d</sup>100 MHz, <sup>e</sup>400 MHz.

Trên phổ  $^1\text{H-NMR}$ : Năm tín hiệu của proton thơm có độ chuyển dịch hóa học trong vùng 6-8 ppm. Trong đó có 1 doublet đặc trưng cho tín hiệu cộng hưởng của hydro ở carbon vị trí số 5 có độ dịch chuyển hóa học là  $\delta = 7.28$  ppm (1H, d,  $J = 1.5$  Hz) chịu sự ảnh hưởng của tương tác spin-spin của hydro ở carbon ở vị trí số 7; tín hiệu cộng hưởng của hydro ở carbon vị trí số 7 có độ chuyển dịch hóa học là 7.16 ppm (1H, brs). Tín hiệu cộng hưởng của hydro ở carbon vị trí số 2, số 4 có độ chuyển dịch hóa học tương ứng là 7.00 ppm (1H, brs) 7.46 (1H, brs). Tín hiệu proton anomeric 5.10 (1H, d,  $J = 7.5$  Hz) thể hiện đặc trưng cho phân tử đường  $\beta$ -D-glucoside

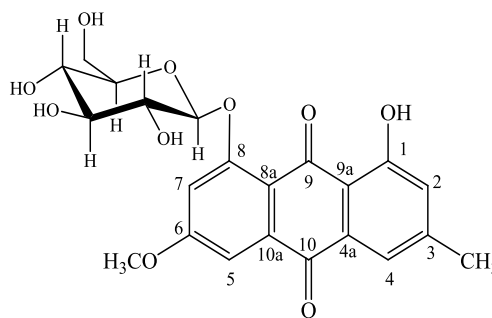
Phổ  $^{13}\text{C-NMR}$  của **RT4** cho tín hiệu 21 C, trong đó có 2 tín hiệu cộng hưởng ở  $\delta_{\text{C}}$  186.39 (C-9) và 182.08 (C-10) đặc trưng của carbon ketone (quinon) và 3 tín hiệu  $\delta_{\text{C}}$  164.15 (C-6), 161.54 (C-8) và 161.03 (C-1) ppm đặc trưng của carbon trên nhân thơm mang nhóm thế oxy. 10 tín hiệu gồm năm tín hiệu carbon bậc IV cộng hưởng ở  $\delta_{\text{C}}$  146.86 (C-4), 136.47 (C-10a), 132.06 (C-4a), 114.43 (C-9a), 113.31 (C-8a) và bốn tín hiệu carbon III là 4 tín hiệu của carbon thơm không nhóm thế cộng hưởng ở  $\delta_{\text{C}}$  124.14 (C-2), 119.21 (C-4), 108.29 (C-7,5). 6 tín hiệu trong vùng từ 100 – 60 ppm đặc trưng cho phân tử đường  $\beta$ -D-glucoside. Nhóm methyl cộng hưởng ở vùng trường cao  $\delta_{\text{C}}$  21.35  $\delta_{\text{H}}$  2.41 ppm đặc trưng của nhóm methyl thế trên nhân thơm.

So sánh với tài liệu tham khảo [88] khẳng định **RT4** là emodin-8-*O*- $\beta$ -D-glucoside.

#### 4.2.5. Hợp chất **RT5** (*chrysophanol* -8-*O*- $\beta$ -D-glucoside và *physcion* -8-*O*- $\beta$ -D-glucoside)



chrysophanol-8-*O*- $\beta$ -D-glucoside



physcion-8-*O*- $\beta$ -D-glucoside

Hình 4.12. Cấu trúc hợp chất **RT5** (*chrysophanol* -8-*O*- $\beta$ -D-glucoside và *physcion* -8-*O*- $\beta$ -D-glucoside)

Bảng 4.9. Dữ liệu phổ của hợp chất **RT5** và chrysophanol -8-*O*- $\beta$ -D-glucoside và physcion -8-*O*- $\beta$ -D-glucoside

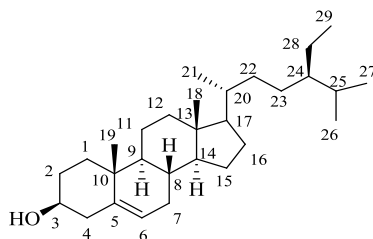
Vị trí	<b>RT5</b>		<b>Chrysophanol-8-<i>O</i>-<math>\beta</math>-D-glucoside [89]</b>		<b>Physcion -8-<i>O</i>-<math>\beta</math>-D-glucoside [90]</b>	
	$\delta_H^{a,c}$ (độ bội, $J = \text{Hz}$ )	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,e}$ (độ bội, $J = \text{Hz}$ )	$\delta_C^{a,d}$	$\delta_H^{a,c}$ (độ bội, $J = \text{Hz}$ )	$\delta_C^{a,b}$
1		161.62		161.5		
2	7.50 (1H, brs)	119.30	7.46 (1H, brs, H-2)	118.9		
3		147.10		147.2		
4	7.19 (1H, brs)	124.04	7.16 (1H, brs, H-4)	123.6		
5	7.71 (1H, d, $J = 8.0 \text{ Hz}$ )	122.49	7.69 (1H, d, $J = 8.4 \text{ Hz}$ )	122.1		
6	7.87 (1H, dd, $J = 7.5, 8.0 \text{ Hz}$ )	135.89	7.73 (1H, dd, $J = 7.8, 8.4 \text{ Hz}$ )	135.5		
7	7.89 (1H, d, $J = 7.5 \text{ Hz}$ )	120.57	7.82 (1H, d, $J = 7.8 \text{ Hz}$ )	120.1		
8		158.19		157.8		
9		187.49		187.4		
10		182.07		181.6		
4a		132.04		131.7		
8a		114.75		116.3		
9a		114.45		114.3		
10a		134.73		134.3		
CH <sub>3</sub>	2.41 (3H, s, CH <sub>3</sub> )	21.38	2.40 (3H, s, CH <sub>3</sub> )	21.1		
Glu						
1	5.16 (1H, d, $J = 7.5 \text{ Hz}$ )	100.57	5.12 (1H, d, $J = 7.4 \text{ Hz}$ )	100.2		
2		73.23	3.36 (1H, m)	72.9		
3		77.26	3.80 (1H, m)	76.9		
4		69.64	3.48 (1H, m)	69.1		
5		76.50	3.71(1H, m)	76.1		
6		60.02	3.93 (2H, dd, $J = 2.4, 12.0 \text{ Hz}$ , H-6")	60.2		
1		160.67				160.66
2	7.18 (1H, d, $J = 2.5 \text{ Hz}$ )	124.22			7.17 (1H, d, $J = 2.5 \text{ Hz}$ )	124.20
3		147.59				147.10

4	7.47 (1H, d, $J = 2.5$ Hz)	119.30		7.47 (1H, d, $J = 2.5$ Hz)	119.33
5	7.37 (1H, d, $J = 2.5$ Hz)	107.35		7.35 (1H, d, $J = 2.5$ Hz)	107.36
6		164.7			164.70
7	7.18 (1H, d, $J = 2.5$ Hz)	106.50		7.17 (1H, d, $J = 2.5$ Hz)	106.51
8		161.68			161.66
9		186.43			186.43
10		181.87			181.85
4a		132.13			132.03
8a		114.45			114.44
9a		114.45			114.44
10a		136.32			136.31
O-CH <sub>3</sub>	3.96 (3H, s, OCH <sub>3</sub> )	56.07		3.96 (3H, s, OCH <sub>3</sub> )	56.06
CH <sub>3</sub>	2.42 (3H, s, CH <sub>3</sub> )	21.45		2.41 (3H, s, CH <sub>3</sub> )	21.35
Glu					
1	5.17 (1H, d, $J = 7.5$ Hz)	100.69		5.17 (1H, d, $J = 7.5$ Hz)	100.71
2		73.29		3.17-3.77 (5H, m)	73.23
3		76.56			76.55
4		69.80			69.80
5		77.43			77.43
6		60.72			60.78

<sup>a</sup>Đo trong dung môi DMSO-d<sub>6</sub>, <sup>b</sup>125 MHz, <sup>c</sup>500 MHz, <sup>d</sup>100 MHz, <sup>e</sup>400 MHz.

Phổ  $^{13}\text{C}$ -NMR của hỗn hợp **RT5** cho thấy 43 tín hiệu carbon của hỗn hợp hai hợp chất. Các tín hiệu này xếp thành cặp tương tự nhau (Theo tỉ lệ 1:1). Trong số 21 tín hiệu carbon của chất 1, có tín hiệu 15 C thể hiện là phần aglycon anthraquinone, trong đó 2 tín hiệu cộng hưởng ở  $\delta_{\text{C}}$  187.49 và 182.07 đặc trưng của carbon ketone (quinon) và 2 tín hiệu  $\delta_{\text{C}}$  161.62 và 158.19 ppm đặc trưng của carbon trên nhân thơm mang nhóm thế oxy. Mười tín hiệu gồm năm tín hiệu carbon bậc IV cộng hưởng ở  $\delta_{\text{C}}$  147.10, 134.73, 132.04, 114.75, 114.75 và năm tín hiệu carbon III là 5 tín hiệu của carbon thơm không nhóm thế cộng hưởng ở  $\delta_{\text{C}}$  135.89, 124.04, 122.49, 120.57, 119.03. Nhóm methyl cộng hưởng ở vùng trường cao  $\delta_{\text{C}}$  21.38  $\delta_{\text{H}}$  2.41 ppm đặc trưng của nhóm methyl thế trên nhân thơm. Và một gốc đường ( $\delta = 60 - 101$  ppm). Các tín hiệu của chất 2 cũng tương tự như chất 1. Gồm có 22 tín hiệu carbon của chất 2, có tín hiệu 16 C thể hiện là phần aglycon anthraquinone và một gốc đường ( $\delta = 60 - 101$  ppm). So sánh với tư liệu [89] và [90], dự đoán **RT5** là hỗn hợp 2 chất chrysophanol -8-O- $\beta$ -D-glucoside và physcion -8-O- $\beta$ -D-glucoside).

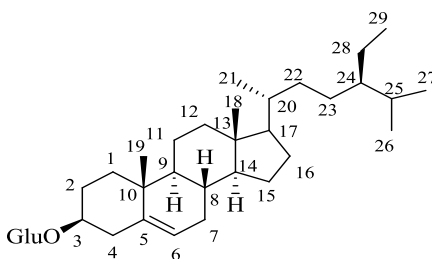
#### 4.2.6. Hợp chất **RT6** ( $\beta$ -sitosterol)



Hình 4.13. Cấu trúc hợp chất **RT6** ( $\beta$ -sitosterol)

So sánh với tài liệu tham khảo [91] khẳng định **RT6** là  $\beta$ -sitosterol

#### 4.2.7. Hợp chất **RT7** (daucosterol)

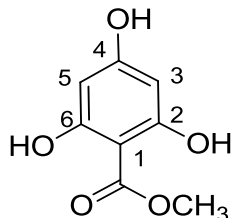


Hình 4.14. Cấu trúc hợp chất **RT7** (daucosterol)

So sánh với tài liệu tham khảo [91] khẳng định **RT7** là daucosterol

### 4.3. Cấu trúc các chất phân lập được từ cây muồng trâu *Senna alata*

#### 4.3.1. Hợp chất SA1 (methyl 2,4,6-trihydroxybenzoate)



Hình 4.15. Cấu trúc hợp chất **SA1** (methyl 2,4,6-trihydroxybenzoate)

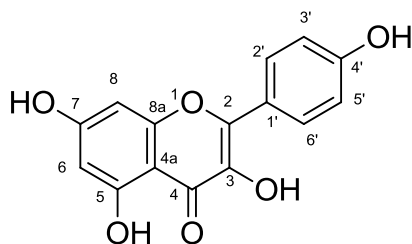
Bảng 4.10. Dữ liệu phổ của hợp chất **SA1** và methyl 2,4,6-trihydroxybenzoate

Vị trí	SA1		Methyl 2,4,6-trihydroxybenzoate [92]	
	$\delta_H^{a,c}$ (độ bội, $J = \text{Hz}$ )	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{\#,e}$ (độ bội, $J = \text{Hz}$ )	$\delta_C^{\#,d}$
1	-	93.23	-	92.3
2	-	164.75	-	164.4
3	5.93 (1H, s)	95.42	5.95	95.3
4	-	162.90	-	162.1
5	5.93 (1H, s)	95.42	5.95	95.3
6	-	164.75	-	164.4
-COO-	-	170.22	-	169.3
-OCH <sub>3</sub>	4.04(3H, brs)	52.05	4.02	51.8
2-OH	9.99 (1H, s)			
4-OH	9.93 (1H, s)			
6-OH	9.99 (1H, s)			

<sup>a</sup>Đo trong dung môi CD<sub>3</sub>OD, <sup>b</sup>125 MHz, <sup>c</sup>500 MHz, <sup>#</sup> đo trong dung môi CDCl<sub>3</sub>+ DMSO-d<sub>6</sub>, <sup>d</sup>75 MHz, <sup>e</sup>300 MHz.

So sánh với tài liệu tham khảo [92] khẳng định **SA1** là methyl 2,4,6-trihydroxy benzoate

### 4.3.2. Hợp chất SA2 (kaempferol)



Hình 4.16. Cấu trúc hợp chất SA2 (kaempferol)

Bảng 4.11. Dữ liệu phổ của hợp chất SA2 và kaempferol

Vị trí	SA2		Kaempferol [93]	
	$\delta_H^{a,c}$ (độ bội, $J = \text{Hz}$ )	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ (độ bội, $J = \text{Hz}$ )	$\delta_C^{a,b}$
2		148.06		148.07
3		137.14		137.12
4		177.39		177.67
5		162.53		162.50
6	6.18 (1H, d, $J=2.0$ Hz)	99.26	6.18 (1H, d, $J=1.9$ Hz)	99.29
7		165.58		165.57
8	6.40 (1H, d, $J=2.5$ Hz)	94.46	6.38(1H, d, $J=1.9$ Hz)	94.59
4a		104.56		104.56
8a		158.28		157.27
1'		123.74		123.75
2'	8.08 (1H, d, $J=7.0$ Hz)	130.68	8.07 (1H, d, $J=9.0$ Hz)	130.67
3'	6.91 (1H, d, $J=7.0$ Hz)	116.31	6.90 (1H, d, $J=9.0$ Hz)	116.31
4'		160.57		160.54
5'	6.91 (1H, d, $J=7.0$ Hz)	116.31	6.90 (1H, d, $J=9.0$ Hz)	116.31
6'	8.07 (1H, d, $J=7.0$ Hz)	130.68	8.07 (1H, d, $J=9.0$ Hz)	130.67

<sup>a</sup>Đo trong dung môi  $CD_3OD$ , <sup>b</sup>125 MHz, <sup>c</sup>500 MHz.

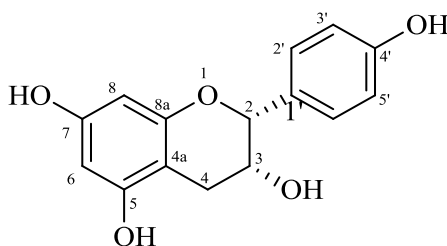
Trên phổ  $^1H$ -NMR cho các tín hiệu đặc trưng của 6 proton vòng thơm xuất hiện trong khoảng từ 8.0-5.9 ppm trong đó có 1 doublet đặc trưng cho tín hiệu cộng hưởng của hydro ở carbon vị trí số 6 có độ dịch chuyển hóa học là  $\delta = 6.40$  ppm (1H, d,  $J = 2.0$ Hz) chịu sự ảnh hưởng của tương tác spin-spin của hydro ở carbon ở vị trí số 8; tín hiệu cộng hưởng của hydro ở carbon vị trí số 8 có độ dịch chuyển hóa học là 6.18 ppm (1H, d,  $J = 2.0$  Hz). Đây là 2 proton ghép cặp với nhau ở vị trí meta trên cùng một vòng thơm. 2 tín hiệu doublet có độ dịch chuyển hóa học là 8.08 (2H, d,  $J = 7.0$  Hz) và 6.91 (2H, d,  $J = 7.0$



Hz) là hai cặp proton tương đương ghép cặp với nhau ở vị trí ortho trên cùng một vòng thơm.

Trên phổ  $^{13}\text{C-NMR}$  thể hiện 13 tín hiệu đặc trưng cho bộ khung flavone 15 carbon có vòng B đối xứng gồm 1 carbon carbonyl ở  $\delta_{\text{C}}$  177.39, sáu carbon bậc IV của vòng thơm gắn oxy ở  $\delta_{\text{C}}$  165.58 (C-7), 160.57 (C-4'), 162.53 (C-5), 158.28 (C-8a), 148.06 (C-2), 137.14 (C-3). Hai carbon bậc 4 vòng thơm k gắn oxy ở  $\delta_{\text{C}}$ : 123.74, 104.56. Sáu carbon methine vòng thơm ở  $\delta_{\text{C}}$  130.68 (C-2', C-6'), 116.31 (C-3', C-5'), 99.26 (C-6), 94.46 (C-8). So sánh với tài liệu tham khảo [93] khẳng định **SA2** là kaempferol

### 4.3.3. Hợp chất SA3 ((-)-epiafzelechin)



Hình 4.17. Cấu trúc hợp chất **SA3** ((-)-epiafzelechin)

Bảng 4.12. Dữ liệu phổ của hợp chất **SA3** và (-)-epiafzelechin

Vị trí	<b>SA3</b>		<b>(-) Epiafzelechin [94]</b>	
	$\delta_{\text{H}}^{a,c}$ (độ bội, $J = \text{Hz}$ )	$\delta_{\text{C}}^{a,b}$	$\delta_{\text{H}}^{a,c}$ (độ bội, $J = \text{Hz}$ )	$\delta_{\text{C}}^{a,b}$
2	4.95 (1H, s, H-2)	79.47	4.933	79.53
3	4.24 (1H, m, H-3)	66.85	4.221	66.90
4	2.89 (1H, dd, $J= 16.5, 4.5 \text{ Hz}$ , H-4 $\beta$ ) 2.76 (1H, dd, $J= 16.5, 3.0 \text{ Hz}$ , H-4 $\alpha$ )	29.13	2.880 (1H, dd, $J= 16.7, 4.5 \text{ Hz}$ , H-4 $\beta$ ) 2.749 (1H, dd, $J= 16.7, 3.2 \text{ Hz}$ , H-4 $\alpha$ )	29.16
5		157.57		157.63
6	6.04 (1H, d, $J= 2.5 \text{ Hz}$ )	96.19	6.027 (1H, d, $J= 2.3 \text{ Hz}$ )	96.25
7		157.62		157.66
8	5.94 (1H, d, $J= 2.5 \text{ Hz}$ )	95.72	5.927 (1H, d, $J= 2.3 \text{ Hz}$ )	95.78
4a		99.74		99.79
8a		157.19		157.24
1'		131.49		131.55
2'	7.38 (1H, d, $J= 8.5 \text{ Hz}$ )	129.13	7.362	129.17
3'	6.83 (1H, d, $J= 8.5 \text{ Hz}$ )	115.46	6.816	115.50
4'		157.63		157.69

5'	6.83 (1H, d, $J=8.5$ Hz)	115.46	6.816	115.50
6'	7.38 (1H, d, $J= 8.5$ Hz)	129.13	7.362	129.17
3-OH	3.65 (1H, d, $J=5.5$ Hz)			
5-OH	8.16 (1H, brs)			
7-OH	7.99 (1H, brs)			
4'-OH	8.28 (1H, brs)			

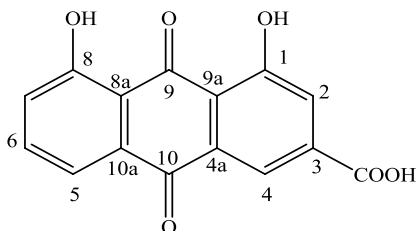
<sup>a</sup>Đo trong dung môi acetone- $d_6$ , <sup>b</sup>125 MHz, <sup>c</sup>500 MHz.

Trên phổ  $^1\text{H-NMR}$  cho các tín hiệu đặc trưng của 6 proton vòng thơm xuất hiện trong khoảng từ 8.0-5.9 ppm trong đó có 1 doublet đặc trưng cho tín hiệu cộng hưởng của hydro ở carbon vị trí số 6 có độ dịch chuyển hóa học là  $\delta = 6.04$  ppm (1H, d,  $J= 2.5$  Hz) chịu sự ảnh hưởng của tương tác spin-spin của hydro ở carbon ở vị trí số 8; tín hiệu cộng hưởng của hydro ở carbon vị trí số 8 có độ dịch chuyển hóa học là 5.94 ppm (1H, d,  $J= 2.5$  Hz). Đây là 2 proton ghép cặp với nhau ở vị trí meta trên cùng một vòng thơm. 2 tín hiệu doublet có độ dịch chuyển hóa học là 7.38 (2H, d,  $J= 8.5$  Hz) và 6.83 (2H, d,  $J=8.5$  Hz) là hai cặp proton tương đương ghép cặp với nhau ở vị trí ortho trên cùng một vòng thơm. Hai proton của nhóm methine có gắn oxy có  $\delta_{\text{H}}$  4.95 (1H, s, H-2) và 4.24 (1H, m, H-3) cùng hai proton của nhóm methylene có  $\delta_{\text{H}}$  2.89 (1H, dd,  $J= 16.5, 4.5$  Hz, H-4 $\beta$ ) và 2.76 (1H, dd,  $J= 16.5, 3.0$  Hz, H-4 $\alpha$ ). Bốn proton của 4 nhóm OH có  $\delta_{\text{H}}$  8.28 (1H, brs), 8.16 (1H, brs), 7.99 (1H, brs), 3.65 (1H, d,  $J=5.5$  Hz).

Trên phổ  $^{13}\text{C-NMR}$  thể hiện 13 tín hiệu đặc trưng cho bộ khung flavanol 15 carbon gồm bốn carbon bậc IV của vòng thơm gắn oxy ở  $\delta_{\text{C}}$  157.63 (C-4'), 157.62 (C-7), 157.57 (C-5), 157.19 (C-8a). Hai carbon bậc 4 vòng thơm không gắn oxy ở  $\delta_{\text{C}}$ : 131.49 (C-1'), 99.74 (C-4a) cùng sáu carbon methine vòng thơm ở  $\delta_{\text{C}}$  129.13 (C-2', C-6'), 115.46 (C-3', C-5'), 96.19 (C-6), 95.72 (C-8). Thể hiện hai vòng A và vòng B đối xứng trong khung flavanol. Hai carbon methine có gắn oxy ở  $\delta_{\text{C}}$  79.47 (C-2) và 66.85 (C-3) hợp với nhóm methylen  $\delta_{\text{C}}$  29.13 ở vùng trường cao tạo thành vòng C trong bộ khung flavanol.

So sánh với tài liệu tham khảo [94] khẳng định **SA3** là (-)epiafzelechin.

## 4.3.4. Hợp chất SA4 (rhein)



Hình 4.18. Cấu trúc hợp chất SA4 (rhein)

Bảng 4.13. Dữ liệu phổ của hợp chất SA4 và rhein

Vị trí	SA4		Rhein [84]	
	$\delta_H^{a,c}$ (độ bội, $J = \text{Hz}$ )	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,e}$ (độ bội, $J = \text{Hz}$ )	$\delta_C^{a,d}$
1		161.46		161.51
2	7.71 (1H, brs)	124.20	7.77 (1H, m)	124.21
3		137.33		138.20
4	8.11 (1H, brs)	119.23	8.14(1H, m)	119.05
5	7.69 (1H, d, $J=8.0\text{Hz}$ )	119.23	7.75 (1H, d, $J= 7.54 \text{ Hz}$ )	119.48
6	7.78 (1H, dd, $J=8.0,7.5\text{Hz}$ )	137.33	7.84 (1H, dd, $J= 8.22, 7.54 \text{ Hz}$ )	137.63
7	7.37 (1H, d, $J=8.0 \text{ Hz}$ )	124.20	7.41 (1H, d, $J= 8.22 \text{ Hz}$ )	124.64
8		161.46		161.27
9		191.23		191.49
10		181.27		181.25
4a		133.31		133.61
8a		116.14		116.33
9a		117.52		118.48
10a		133.31		133.41
OH-1	-	-	-	-
OH-8	-	-	-	-
3-COOH	-	166.27	-	165.52

<sup>a</sup>Đo trong dung môi DMSO- $d_6$ , <sup>b</sup>125 MHz, <sup>c</sup>500 MHz, <sup>d</sup>100 MHz, <sup>e</sup>400 MHz.

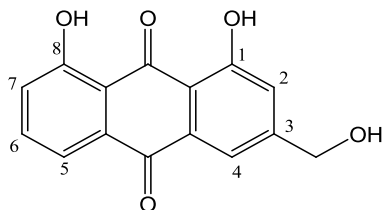
Trên phổ  $^1\text{H-NMR}$ : Năm tín hiệu của proton thơm có độ chuyển dịch hóa học trong vùng 6-8 ppm. Trong đó có 1 doublet doublet đặc trưng cho tín hiệu cộng hưởng của hydro ở carbon vị trí số 6 có độ dịch chuyển hóa học là  $\delta = 7.78$  ppm (1H, dd,  $J=8.0,7.5 \text{ Hz}$ ) chịu sự ảnh hưởng của tương tác spin-spin của hydro ở carbon ở vị trí số 5 và vị trí số 7; tín hiệu cộng hưởng của hydro ở carbon vị trí số 5 và 7 có độ chuyển dịch hóa học tương ứng là

7.69 (1H, d,  $J=8.0$  Hz) và 7.37 (1H, d,  $J=8.0$  Hz). Tín hiệu cộng hưởng của hydro ở carbon vị trí số 2, số 4 có độ chuyển dịch hóa học tương ứng là 7.71 ppm (1H, brs) 8.11 ppm (1H, brs).

Phổ  $^{13}\text{C}$ -NMR của **SA4** cho tín hiệu 21 C, trong đó có 2 tín hiệu cộng hưởng ở  $\delta_{\text{C}}$  191.23 (C-9) và 181.27 (C-10) đặc trưng của carbon keton (quinon) và 1 tín hiệu  $\delta_{\text{C}}$  161.46 (C-1,8) ppm đặc trưng của carbon trên nhân thơm mang nhóm thế oxy. Mười tín hiệu gồm bốn tín hiệu carbon bậc IV cộng hưởng ở  $\delta_{\text{C}}$  137.33(C-3,6), 133.31(C-4a, 10a), 117.52 (C-9a), 116.14 (C-8a) và năm tín hiệu carbon bậc III là ba tín hiệu của carbon thơm không nhóm thế cộng hưởng ở  $\delta_{\text{C}}$  137.33, 124.20 (C-2,7), 119.23. Nhóm carboxylic cộng hưởng ở vùng trường thấp  $\delta_{\text{C}}$  166.27 ppm thể hiện nhóm carboxylic gắn trên nhân thơm.

So sánh với tài liệu tham khảo [84] khẳng định **SA4** là rhein.

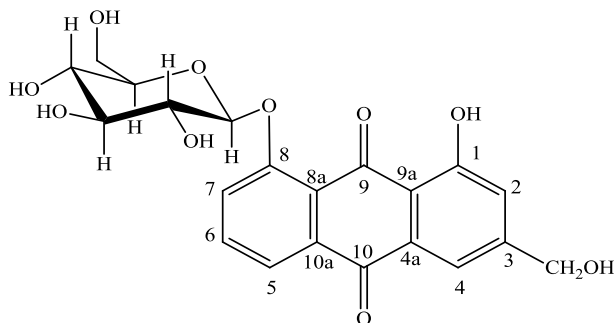
#### 4.3.5. Hợp chất **SA5** (*aloe-emodin*)



Hình 4.19. Cấu trúc hợp chất **SA5** (*aloe-emodin*)

Xem biện luận chất **DH4**

#### 4.3.6. Hợp chất **SA6** (*aloe-emodin-8-O-glucoside*)



Hình 4.20. Cấu trúc hợp chất **SA6** (*aloe-emodin-8-O-glucoside*)

Bảng 4.14. Dữ liệu phổ của hợp chất **SA6** và aloe-emodin-8-*O*-glucoside

Vị trí	SA6		aloe emodin 8- <i>O</i> - $\beta$ glucoside [89]	
	$\delta_H^{a,c}$ (độ bội, $J = \text{Hz}$ )	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,e}$ (độ bội, $J = \text{Hz}$ )	$\delta_C^{a,d}$
1		161.62		161.6
2	7.29 (1H, d, $J = 1.5 \text{ Hz}$ )	120.72	7.27 (1H, brs)	120.6
3		152.26		152.2
4	7.67 (1H, d, $J = 1.5 \text{ Hz}$ )	116.01	7.65 (1H, brs)	116.0
5	7.89 (1H, dd, $J = 8.5, 1.5 \text{ Hz}$ )	120.59	7.88 (1H, dd, $J = 8.0, 2.0 \text{ Hz}$ )	120.6
6	7.85 (1H, t, $J = 8.0 \text{ Hz}$ )	135.95	7.86 (1H, t, $J = 8.0$ )	135.9
7	7.71 (1H, dd, $J = 8.5, 1.5 \text{ Hz}$ )	122.44	7.70 (1H, dd, $J = 8.0, 2.0 \text{ Hz}$ )	122.4
8		158.23		158.2
9		187.58		187.5
10		182.11		182.1
4a		134.48		132.2
8a		115.47		115.4
9a		115.47		115.4
10a		132.26		131.5
OH-1	-	-	-	-
OH-8	-	-	-	-
3 CH <sub>2</sub> OH	4.60 (2H, m)	62.0	4.60 (2H, m)	62.0
Glu				
1'	5.56 (1H, d, $J = 6.0 \text{ Hz}$ )	100.49	5.15 (1H, d, $J = 7.7 \text{ Hz}$ )	100.5
2'	3.49-3.21 (6H, m)	73.28		73.3
3'		76.52		76.5
4'		69.51		69.5
5'		77.26		77.2
6'		60.06		60.6

<sup>a</sup>Đo trong dung môi DMSO-*d*<sub>6</sub>, <sup>b</sup>125 MHz, <sup>c</sup>500 MHz, <sup>d</sup>100 MHz, <sup>e</sup>400 MHz.

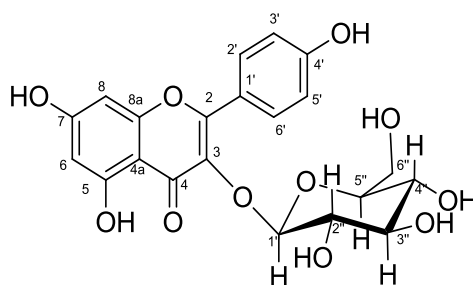
Trên phổ <sup>1</sup>H-NMR: Năm tín hiệu của proton thơm có độ chuyển dịch hóa học trong vùng 6-8 ppm. Trong đó có 1 doublet đặc trưng cho tín hiệu cộng hưởng của hydro ở carbon vị trí số 4 có độ dịch chuyển hóa học là  $\delta = 7.67 \text{ ppm}$  (1H, d,  $J = 1.5 \text{ Hz}$ ) chịu sự ảnh hưởng của tương tác spin-spin của hydro ở carbon ở vị trí số 2; tín hiệu cộng hưởng của hydro ở carbon vị trí số 2 có độ chuyển dịch hóa học là  $7.29 \text{ ppm}$  (1H, brs). 1 triplet đặc trưng cho tín hiệu cộng hưởng của hydro ở carbon vị trí số 6 chịu ảnh hưởng của tương

tác spin-spin của hydro ở carbon ở vị trí số 5 và vị trí số 7. Tín hiệu cộng hưởng của hydro ở carbon vị trí số 5, số 7 có độ chuyển dịch hóa học tương ứng là 7.89 ppm (1H, dd,  $J = 8.5, 1.5$  Hz) 7.71(1H, dd,  $J = 8.5, 1.5$  Hz). Một tín hiệu  $\delta$  4.60 ppm (2H) ứng với tín hiệu cộng hưởng của nhóm  $-\text{CH}_2$  liên kết với nhân thơm. Và tín hiệu proton anomeric 5.56 (1H, d,  $J = 6.0$  Hz) thể hiện đặc trưng cho phân tử đường  $\beta$ -D-glucoside.

Phổ  $^{13}\text{C}$ -NMR của **SA6** cho tín hiệu 21 C, trong đó có 2 tín hiệu cộng hưởng ở  $\delta_{\text{C}}$  187.58 (C-9) và 182.11 (C-10) đặc trưng của carbon ketone (quinon) và 2 tín hiệu  $\delta_{\text{C}}$  161.62 (C-1), 158.23(C-8) ppm đặc trưng của carbon trên nhân thơm mang nhóm thế oxy. 10 tín hiệu gồm năm tín hiệu carbon bậc IV cộng hưởng ở  $\delta_{\text{C}}$  152.26 (C-3), 135.95 (C-6), 134.48 (C-4a), 132.26 (C-10a), 115.47 (C -8a,9a) và bốn tín hiệu carbon III là 4 tín hiệu của carbon thơm không nhóm thế cộng hưởng ở  $\delta_{\text{C}}$  122.44 (C-7), 120.72 (C-2), 120.59 (C-5), 116.01 (C-4). Cùng 6 tín hiệu trong vùng từ 100 – 60 ppm (100.49, 77.26, 76.52, 73.28, 69.51, 60.06) đặc trưng cho phân tử đường  $\beta$ -D-glucoside. Và nhóm  $-\text{CH}_2\text{OH}$  cộng hưởng ở vùng trường cao  $\delta_{\text{C}}$  62.0  $\delta_{\text{H}}$  4.60 ppm thể hiện của nhóm methyl thế trên nhân thơm.

So sánh với tài liệu tham khảo [89] khẳng định **SA6** là aloe emodin 8-*O*- $\beta$  glucoside

#### 4.3.7. Hợp chất SA7 (kaempferol-3-*O*-glucoside)



Hình 4.21. Cấu trúc hợp chất **SA7** (kaempferol-3-*O*-glucoside)

Bảng 4.15. Dữ liệu phổ của hợp chất SA7 và kaempferol-3-*O*-glucoside

	<b>SA7</b>		<b>Kaempferol-3-<i>O</i>-glucoside [95]</b>	
<b>Vị trí</b>	$\delta_{\text{H}}^{a,c}$ (độ bội, $J = \text{Hz}$ )	$\delta_{\text{C}}^{a,b}$	$\delta_{\text{H}}^{a,e}$ (độ bội, $J = \text{Hz}$ )	$\delta_{\text{C}}^{a,d}$
2		158.56		158.51
3		135.47		135.46

4		179.53		179.53
5		163.11		163.09
6	6.26 (1H, d, $J=2.0$ Hz)	99.97	6.20 (1H, d, $J=2.0$ Hz)	99.87
7		166.26		165.97
8	6.42 (1H, d, $J=2.0$ Hz)	94.80	6.39 (1H, d, $J=2.0$ Hz)	94.74
4a		105.70		105.70
8a		159.07		159.09
1'		122.83		122.80
2'	8.07 (1H, d, $J=8.0$ Hz)	132.28	8.05 (1H, d, $J=9.0$ Hz)	132.27
3'	6.90 (1H, d, $J=8.0$ Hz)	116.32	6.88 (1H, d, $J=9.0$ Hz)	116.07
4'		161.59		161.56
5'	6.90 (1H, d, $J=8.0$ Hz)	116.32	6.88 (1H, d, $J=9.0$ Hz)	116.07
6'	8.07 (1H, d, $J=8.0$ Hz)	132.28	8.05 (1H, d, $J=9.0$ Hz)	132.27
Glu				
1''	5.27 (1H, d, $J=7.5$ Hz)	104.11	5.24 (1H, d, $J=7.3$ Hz)	104.07
2''	3.44(1H, m)	75.75	3.44(1H, dd, $J=9.1, 7.3$ Hz)	75.74
3''	3.41(1H, m)	78.07	3.41(1H, t, $J=9.1$ Hz)	78.05
4''		71.38	3.32 (1H, t, $J=9.1$ Hz)	71.37
5''	3.20 (1H, m)	78.44	3.19(1H, ddd, $J=9.1, 5.4, 2.3$ )	78.43
6''	3.70 (1H, dd, $J= 12.0, 2.0, H-6''_a$ )	62.65	3.68 (1H, dd, $J= 11.9, 2.3, H-6''_a$ )	62.64
	3.52 (1H, dd, $J= 12.0, 2.0, H-6''_b$ )		3.52 (1H, dd, $J= 11.9, 5.4, H-6''_b$ )	

<sup>a</sup>Đo trong dung môi  $CD_3OD$ , <sup>b</sup>125 MHz, <sup>c</sup>500 MHz, <sup>d</sup>100 MHz, <sup>e</sup>400 MHz.

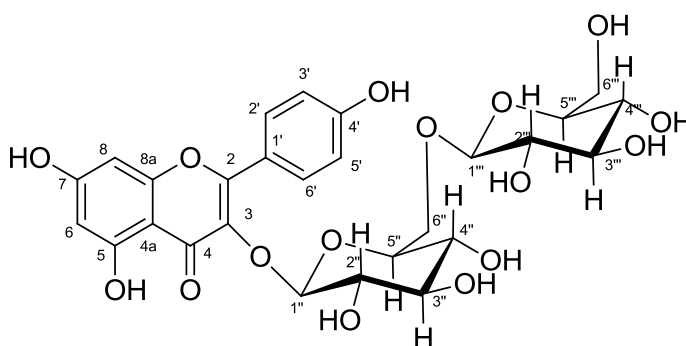
Trên phổ  $^1H$ -NMR cho các tín hiệu đặc trưng của 6 proton vòng thơm xuất hiện trong khoảng từ 8.0-6.0 ppm trong đó có 1 doublet đặc trưng cho tín hiệu cộng hưởng của hydro ở carbon vị trí số 6 có độ dịch chuyển hóa học là  $\delta= 6.42$  ppm (1H, d,  $J= 2.0$  Hz) chịu sự ảnh hưởng của tương tác spin-spin của hydro ở carbon ở vị trí số 8; tín hiệu cộng hưởng của hydro ở carbon vị trí số 8 có độ dịch chuyển hóa học là 6.26 ppm (1H, d,  $J= 2.0$  Hz). Đây là 2 proton ghép cặp với nhau ở vị trí meta trên cùng một vòng thơm. 2 tín hiệu doublet có độ dịch chuyển hóa học là 8.07 (2H, d,  $J= 8.0$  Hz) và 6.90 (2H, d,  $J= 8.0$  Hz) là hai cặp proton tương đương ghép cặp với nhau ở vị trí ortho trên cùng một vòng thơm. Tín hiệu proton anomeric ở độ dịch chuyển hóa học là 5.27 (1H, d,  $J=7.5$  Hz) thể hiện đặc trưng cho phân tử đường  $\beta$ -D-glucoside.

Trên phổ  $^{13}C$ -NMR thể hiện 19 bao gồm 13 tín hiệu đặc trưng cho bộ khung flavone 15 carbon có vòng B đối xứng gồm 1 carbon carbonyl ở  $\delta_C$  179.53 (C-4), sáu carbon bậc

IV của vòng thơm gắn oxy ở  $\delta_C$  166.26 (C-7), 163.11 (C-5), 161.59 (C-4'), 159.07 (C-8a), 158.56 (C-2), 135.47 (C-3). Hai carbon bậc 4 vòng thơm k gắn oxy ở  $\delta_C$ : 122.83 (C-1'), 105.70 (C-4a). Sáu carbon methine vòng thơm ở  $\delta_C$  132.28 (C-2', C-6'), 116.32 (C-3', C-5'), 99.97 (C-6), 94.80 (C-8). Cùng 6 tín hiệu đặc trưng cho 6 carbon trong đường đường  $\beta$ -D-glucoside trong khoảng 104-60 ppm  $\delta_C$  104.11 (C-1''), 78.44 (C-5''), 78.07 (C-3''), 75.75 (C-2''), 71.38 (C-4''), 62.65 (C-6'').

So sánh với tài liệu tham khảo [95] khẳng định **SA7** là kaempferol-3-O-glucoside

#### 4.3.8. Hợp chất SA8 (kaempferol-3-O-gentiobioside)



Hình 4.22. Cấu trúc hợp chất **SA8** (kaempferol-3-O-gentiobioside)

Bảng 4.16. Dữ liệu phổ của hợp chất **SA8** và kaempferol-3-O-gentiobioside

Vị trí	<b>SA8</b>		<b>Kaempferol-3-O-gentiobioside</b> [96]	
	$\delta_H^{a,c}$ (độ bội, $J = \text{Hz}$ )	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,e}$ (độ bội, $J = \text{Hz}$ )	$\delta_C^{a,d}$
2		158.99		157.34
3		135.52		134.36
4		179.41		178.25
5		161.56		161.82
6	6.21 (1H, d, $J=2.0$ Hz)	100.05	6.19 (1H, d, $J=0.7$ Hz)	98.78
7		166.20		164.80
8	6.42 (1H, d, $J=2.0$ Hz)	94.93	6.40 (1H, d, $J=1.1$ Hz)	93.73
4a		105.75		103.43
8a		158.55		157.79
1'		122.70		122.61
2'	8.11 (1H, d, $J=8.5$ Hz)	132.37	8.10 (1H, dd, $J=8.5, 2.2$ Hz)	131.17
3'	6.90 (1H, d, $J=8.5$ Hz)	116.23	6.89 (1H, dd, $J=9.1, 2.2$ Hz)	115.03
4'		161.56		160.36
5'	6.90	116.23	6.89	115.03



	(1H, d, $J=8.5$ Hz)		(1H, dd, $J=9.1, 2.2$ Hz)	
6'	8.11 (1H, d, $J=8.5$ Hz)	132.37	8.10, (1H, dd, $J=8.5, 2.2$ Hz)	131.17
Glu 1				
1''	5.25 (1H, d, $J=7.4$ )	104.08	5.23 (1H, d, $J=7.3$ )	103.31
2''	3.49 – 3.37 (4H, m)	75.08	3.46 – 3.03 (4H, m)	73.92
3''		77.78		76.77
4''		71.25		70.21
5''		77.64		76.66
6''	3.65 (dd $J=12.0, 7.0$ Hz) 3.96 (1H, dd, $J= 12, 1.5$ Hz)	69.53	3.65 (dd $J=12.0, 6.0$ Hz) 3.96 (1H, dd, $J= 12, 2.0$ Hz)	68.41
Glu 2				
1'''	4.16 (1H, d, $J= 7.5$ Hz)	104.56	4.16 (1H, d, $J= 7.7$ Hz)	102.93
2'''	3.09 (1H, dd, $J= 8.0, 8.5$ Hz)	75.74	3.46 – 3.03 (4H, m)	73.88
3'''	3.20 (1H, t, $J=9.0$ Hz)	77.81		76.62
4'''	3.25 (1H, dd, $J= 9.0, 9.0$ Hz)	71.35		70.14
5'''	3.04 (1H, ddd, $J= 3.5, 7.0, 9.5$ Hz)	77.64		76.47
6'''	3.58 (1H, dd $J=, 12.0, 5.5$ Hz) 3.74 (1H, dd $J= 12.0, 2.0$ Hz)	62.54	3.59 (1H, dd $J=, 12.0, 6.0$ Hz) 3.74 (1H, dd $J= 12.0, 2.0$ Hz)	61.42

<sup>a</sup>Đo trong dung môi  $CD_3OD$ , <sup>b</sup>125 MHz, <sup>c</sup>500 MHz, <sup>d</sup>100 MHz, <sup>e</sup>400 MHz.

Trên phổ  $^1H$ -NMR cho các tín hiệu đặc trưng của 6 proton vòng thơm xuất hiện trong khoảng từ 8.0-6.0 ppm trong đó có 1 doublet đặc trưng cho tín hiệu cộng hưởng của hydro ở carbon vị trí số 6 có độ dịch chuyển hóa học là  $\delta = 6.42$  ppm (1H, d,  $J= 2.0$  Hz) chịu sự ảnh hưởng của tương tác spin-spin của hydro ở vị trí số 8; tín hiệu cộng hưởng của hydro ở carbon vị trí số 8 có độ dịch chuyển hóa học là 6.21 ppm (1H, d,  $J= 2.0$  Hz). Đây là 2 proton ghép cặp với nhau ở vị trí meta trên cùng một vòng thơm. 2 tín hiệu doublet có độ dịch chuyển hóa học là 8.11 (2H, d,  $J= 8.5$  Hz) và 6.90 (2H, d,  $J= 8.5$  Hz) là hai cặp proton tương đương ghép cặp với nhau ở vị trí ortho trên cùng một vòng thơm. Hai tín hiệu proton anomeric ở độ dịch chuyển hóa học là 5.25 (1H, d,  $J=7.4$ ) 4.16 (1H, d,  $J= 7.5$  Hz) thể hiện đặc trưng cho 2 phân tử đường  $\beta$ -D-glucoside trong đường gentiobioside.

Trên phổ  $^{13}C$ -NMR thể hiện 25 tín hiệu bao gồm 13 tín hiệu đặc trưng cho bộ khung flavone 15 carbon có vòng B đối xứng gồm 1 carbon carbonyl ở  $\delta_C$  179.41(C-4), sáu carbon bậc IV của vòng thơm gắn oxy ở  $\delta_C$  166.20 (C-7), 161.56 (C-5), 161.56 (C-4'),

158.99 (C-2), 158.55 (C-8a), 135.52 (C-3). Hai carbon bậc 4 vòng thơm k gắn oxy ở  $\delta_C$ : 122.70 (C-1'), 105.75 (C-4a). Sáu carbon methine vòng thơm ở  $\delta_C$  132.37 (C-2', C-6'), 116.23 (C-3', C-5'), 100.05 (C-6), 94.93 (C-8). Cùng 12 tín hiệu đặc trưng cho gentiobioside gồm 2 phân tử đường  $\beta$ -D-glucoside gắn với nhau qua liên kết 1,6  $\beta$ -D-glycoside xuất hiện trong khoảng 104-60 ppm  $\delta_C$  104.56 (C-1'''), 104.08 (C-1''), 77.93 (C-5''), 77.81 (C-3'''), 77.78 (C-3''), 77.64 (C-5'''), 75.74 (C-2''), 75.08 (C-2'''), 71.25 (C-4''), 71.35 (C-4'''), 69.53 (C-6''), 62.54 (C-6''').

So sánh với tài liệu tham khảo [96] khẳng định **SA8** là kaempferol-3-O-gentiobioside

#### 4.4. Đánh giá hoạt tính kháng vi sinh vật của cao chiết và các hợp chất phân lập

##### 4.4.1. Đánh giá hoạt tính sinh học của cao chiết và các hợp chất phân lập được từ nguyên liệu đại hoàng– *R. tanguticum*

##### 4.4.1.1. Hoạt tính kháng nấm hại cây trồng trong nhà lưới của các cao chiết và các hợp chất từ nguyên liệu đại hoàng– *R. tanguticum*

##### 4.4.1.1.a. Hoạt tính *in vivo* kháng nấm của các cao chiết từ nguyên liệu đại hoàng– *R. tanguticum*

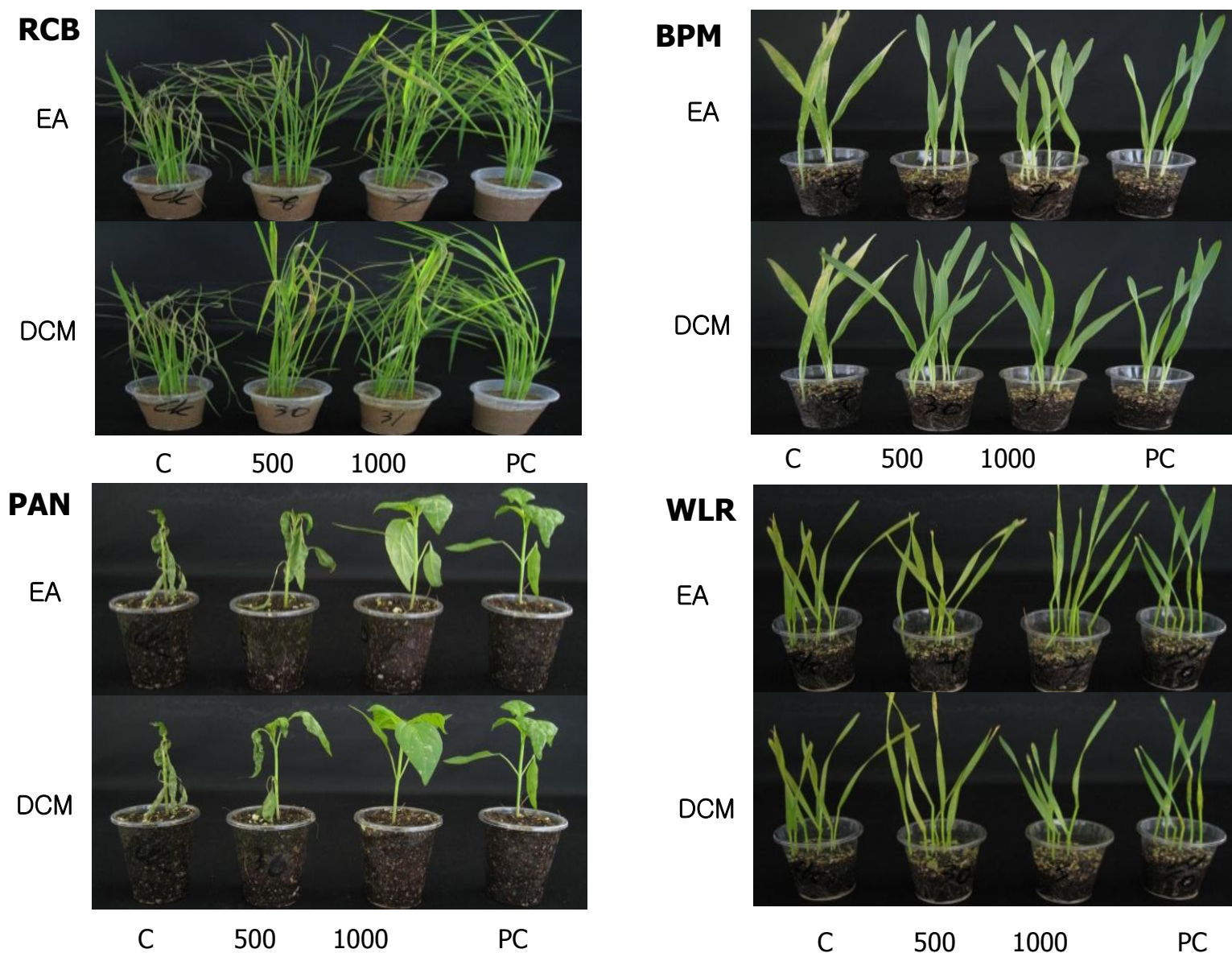
Các cao chiết dichloromethane và ethyl acetate được thử nghiệm *in vivo* kháng 7 loại nấm gây bệnh cây trồng, cụ thể: *Magnaporthe grisea* gây bệnh đạo ôn trên lúa (Rice blast-RCB), *Rhizoctonia solani* gây bệnh đốm vằn trên lúa (Rice sheath blight- RSB), *Botrytis cinerea* gây bệnh thối xám trên cà chua (Tomato grey mould- TGM), *Phytophthora infestans* gây bệnh mốc sương trên cà chua (Tomato late blight –TLB), *Puccinia recondita* gây bệnh gỉ sắt trên lúa mì (wheat leaf rust-WLR), *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* gây bệnh héo vàng trên lúa và khoai tây (barlery powdery mildew –BPM), *Colletotrichum cocodes* gây bệnh thán thư trên ớt (red pepper anthracnose-PAN).

Kết quả kháng nấm của các cao chiết dichloromethane và cao chiết ethyl acetate được thể hiện cụ thể trong bảng 4.17 và hình 4.23.

Chúng tôi nhận thấy rằng các cao chiết dichloromethane và cao chiết ethyl acetate có hoạt tính mạnh đối với các chủng nấm: *M. oryzae*, *P. infestans*, *P. recondita*, *B.graminis* f.sp.*hordei* và *C. coccodes*. ở nồng độ 3000 µg/mL. Đối với nấm *B.graminis* f.sp.*hordei* (BPM), 2 cao chiết dichloromethane và cao chiết ethyl acetate có hiệu quả 95-97% ngay cả ở nồng độ thấp 500 µg/mL.

Bảng 4.17. Hoạt tính sinh học của cao chiết dichloromethane và cao chiết ethyl acetate kháng lại 7 loại nấm gây hại cây trồng

Dịch chiết	Nồng độ ( $\mu\text{g/mL}$ )	Hiệu quả (%)						
		RCB <sup>c</sup>	RSB	TGM	TLB	WLR	BPM	PAN
Ethyl acetate <sup>a</sup>	500	25 $\pm$ 0	11 $\pm$ 10	0	7 $\pm$ 7.1	3 $\pm$ 3.3	95 $\pm$ 1.7	0
	1000	75 $\pm$ 0	16 $\pm$ 15	21 $\pm$ 7.1	21 $\pm$ 7.1	43 $\pm$ 10	100 $\pm$ 0	93 $\pm$ 2.5
	3000	91 $\pm$ 3.7	0	14 $\pm$ 0.7	96 $\pm$ 3.3	83 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	92 $\pm$ 0
Dichloromethane	500	50 $\pm$ 12.5	11 $\pm$ 0.5	7 $\pm$ 7.1	7 $\pm$ 7.1	3 $\pm$ 3.3	97 $\pm$ 0	64 $\pm$ 3.3
	1000	88 $\pm$ 0	16 $\pm$ 12.5	29 $\pm$ 0	64 $\pm$ 7.1	60 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	94 $\pm$ 3.3
	3000	93 $\pm$ 0	5 $\pm$ 5	21 $\pm$ 7.1	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	96 $\pm$ 0.8
Blasticidin-S	50	100 $\pm$ 0	-	-	-	-	-	-
Tricyclazole	1	90 $\pm$ 2.5	-	-	-	-	-	-
	10	100 $\pm$ 0	-	-	-	-	-	-
Validamycin	0.5	98 $\pm$ 0	-	-	-	-	-	-
	50	-	100 $\pm$ 0	-	-	-	-	-
Flutolanil	5	-	85 $\pm$ 5	-	-	-	-	-
	50	-	100 $\pm$ 0	-	-	-	-	-
Fludioxonil	20	-	100 $\pm$ 0	-	-	-	-	-
	50	-	-	100 $\pm$ 0	-	-	-	-
Fenheximide	5	-	-	88 $\pm$ 2.1	-	-	-	-
	100	-	-	100 $\pm$ 0	-	-	-	-
Dimethomorph	20	-	-	91 $\pm$ 1.4	-	-	-	-
	10	-	-	-	100 $\pm$ 0	-	-	-
Chlorothalonil	2	-	-	-	88 $\pm$ 2.1	-	-	-
	100	-	-	-	100 $\pm$ 0	-	-	-
Flusilazole	50	-	-	-	100 $\pm$ 0	-	-	-
	10	-	-	-	-	87 $\pm$ 0	-	-
Pyraclostrobin	2	-	-	-	-	43 $\pm$ 10	-	-
	0.3	-	-	-	-	93 $\pm$ 0	-	-
Flusilazole	0.1	-	-	-	-	87 $\pm$ 0	-	-
	10	-	-	-	-	-	100 $\pm$ 0	-
Benomyl	0.5	-	-	-	-	-	95 $\pm$ 1.7	-
	100	-	-	-	-	-	100 $\pm$ 0	-
Dithianon	1	-	-	-	-	-	87 $\pm$ 2.3	-
	50	-	-	-	-	-	-	83 $\pm$ 3
	10	-	-	-	-	-	-	20 $\pm$ 0



Hình 4.23. Hiệu quả kháng nấm của cao chiết DCM và cao chiết EA đối với các loại nấm: *M.oryzae* (RCB), *B.graminis* f.sp.*hordei* (BPM), *C.coccodes* (PAN) và *P.recondita* (WLR) tại các nồng độ 500 và 1000 µg/mL, C (mẫu chưa xử lý), PC (mẫu đối chứng dương).

#### 4.4.1.1.b. Hoạt tính *in vivo* kháng nấm của các hợp chất anthraquinone từ nguyên liệu đại hoàng– *R. tanguticum*

Hợp chất **DH1** (chrysophanol) có hiệu quả kìm hãm 92, 95, 95% sự phát triển của bệnh BPM gây bởi nấm *B.graminis* f.sp.*hordei*. Trong khi hợp chất **DH2** (physcion) có

hiệu quả kìm hãm 80, 92, 80 % ở các nồng độ 75, 150 và 300 µg/ml (tương ứng). Hợp chất **DH3** (emodin) và **DH5** (rhapontigenin) không thể hiện sự kìm hãm sự phát triển của bệnh ở nồng độ từ 75 đến 300 µg/ml.

4.4.1.1.c. Hoạt tính *in vitro* kháng nấm của các hợp chất anthraquinone từ nguyên liệu đại hoàng– *R. tanguticum*

Đánh giá hiệu quả với nấm *B.cinerea* (TGM), *C.gloesporioides* (PAN), *R.solani* (RSB), *P.infestans* (TLB). Hiệu lực đánh giá sau 5 ngày.

Bảng 4.18. Hiệu quả các chế phẩm đối với một số loại nấm gây hại cây trồng trong điều kiện phòng thí nghiệm.

Tên anthraquinone	Nồng độ (ppm)	<i>Rhizoctonia solani</i>		<i>Botrytis cinera</i>		<i>Phytophthora infestans</i>		<i>Colletotrichum gloesporioides</i>	
		ĐK	HL %	ĐK	HL %	ĐK	HL %	ĐK	HL %
<b>DH1</b> (chrysophanol)	100	5.7	34.5	5.3	19.7	6.3	14.9	5.7	16.2
	ĐC	8.7		6.6		7.4		6.8	
	200	5.1	37.8	4.6	31.3	5.8	24.7	4.6	27.0
	ĐC	8.2		6.7		7.7		6.3	
<b>DH2</b> (physcion)	100	4.1	53.9	5.8	15	6.7	11.8	5.7	13.0
	ĐC	8.9		6.8		7.6		6.5	
	200	3.4	63.4	5.5	17	6.3	18.2	5.0	26.5
	ĐC	9.3		6.6		7.7		6.8	
<b>DH3</b> (emodin)	200	2.6	71.1	2.2	65.1	4.6	42.5	4.1	37.9
	ĐC	9.0		6.3		8.0		6.6	
	300	1.7	79.5	0.7	88.5	2.2	71.8	2.4	67.1
	ĐC	8.3		6.1		7.8		7.3	

Ở nồng độ 100-300 ppm các chất thử nghiệm **DH1** (chrysophanol), **DH2** (physcion) và **DH3** (emodin) đều có hiệu quả ức chế lại các nấm *B.cinerea*, *C.gloesporioides*, *R.solani*, *P.infestans*. Đối với **DH3** (emodin), tùy nồng độ khác nhau mà hiệu quả tăng từ 65-88% so công thức đối chứng.

4.4.1.2. Hoạt tính *in vitro* kháng vi khuẩn hại cây trồng trong phòng thí nghiệm của các cao chiết và các hợp chất được phân lập từ nguyên liệu đại hoàng– *R. tanguticum*.

Kết quả thử hoạt tính kháng vi khuẩn của các cao chiết và các hợp chất phân lập được từ nguyên liệu đại hoàng được thể hiện cụ thể ở bảng 4.19.

Bảng 4.19. Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC,  $\mu\text{g/mL}$ ) của các hợp chất có trong cây đại hoàng– *R. tanguticum*

Chủng nấm	MIC <sup>a</sup> ( $\mu\text{g/mL}$ )									
	DH1 chrysophanol	DH2 physcion	DH3 <sup>b</sup> emodin	DH5 rhapontigenin	DH06 desoxyrhapontigenin	DH7	EA	DCM	SS	Chl
<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>cattlyae</i>	-	-	18	150	38	-	125	125	nt <sup>c</sup>	1.25
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	-	-	-	150	75	-	-	-	nt	20
<i>Burkholderia glumae</i>	600	600	300	75	38	-	-	500	nt	2.5
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	600	600	600	150	75	-	500	250	nt	2.5
<i>Pectobacterium carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i>	-	-	-	300	-	-	-	-	nt	2.5
<i>Pectobacterium chrysanthemi</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	nt	1.25
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lachrymans</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	nt	Inhibit
<i>Xanthomonas arboricola</i> pv <i>pruni</i>	-	-	-	75	-	-	500	250	nt	2.5
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>actinidiae</i> KW11	-	-	-	-	38	-	250	500	1.25	nt
<i>Ralstonia solanacearum</i>	-	-	-	150	-	600	500	500	5	nt

<sup>a</sup>: Hoạt tính kháng khuẩn được thể hiện bằng MIC- xác định bằng phương pháp pha loãng nồng độ

nt<sup>c</sup>: Không được kiểm tra; SS: Streptomycin sulfate; Chl: Chloramphenicol

Qua bảng 4.19. nhận thấy **DH3** (emodin) có hoạt tính ức chế mạnh vi khuẩn *Acidovorax avenae* subsp. *cattlyae* (Aac) với giá trị MIC là 18 µg / mL và có ảnh hưởng tới 2 chủng vi khuẩn *B. glumae* và *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* với MIC lần lượt là 300 và 600 µg / mL. Hai hợp chất **DH1** (chrysophanol) và **DH2** (physcion) ức chế sự phát triển của chủng vi khuẩn *B.glumae* và *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* ở cùng chỉ số MIC là 600µg/mL. **DH5** (rhapontigenin) và **DH6** (desoxyrhapontigenin) có hoạt tính ức chế mạnh các chủng vi khuẩn: **A. konjacii**, *B. glumae*, *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, *P. carotovora* subsp. *.carotovora*, *X. arboricola* pv.*pruni* (Xap), *P. syringae* pv. *actinidiae* KW11 (Psa) và *R. solanacearum*. Tất cả các hợp chất và cao chiết đều không thể hiện hoạt tính ức chế đối với hai chủng vi khuẩn *P. chrysanthemi* và *P. lachrymanswere*

Hợp chất **DH3** (emodin) và hai cao chiết dichloromethane và ethyl acetate có hoạt tính mạnh đối với chủng vi khuẩn Aac. Do đó, IC<sub>50</sub> và IC<sub>90</sub> (các nồng độ ức chế sự tăng trưởng 50% và 90%) được tính toán trên cơ sở phân tích về dữ liệu đáp ứng nồng độ và được liệt kê trong bảng 4.20.

Bảng 4.20. Khả năng ức chế của hợp chất **DH3** (emodin) và cao chiết dichloromethane và ethyl acetate đối với chủng vi khuẩn Aac

	Nồng độ ức chế (95% CI) <sup>c</sup>			
	<b>DH3</b> <sup>b</sup>	<b>EA</b>	<b>DCM</b>	<b>ChI</b>
<b>IC<sub>50</sub></b>	4.25 (3.29-5.48)	46.0 (12.3-79.7)	30.8(28.1-33.8)	0.775(0.682-0.881)
<b>IC<sub>90</sub></b>	17.86 (12.14 – 26.27)	118.6 (78.1-159.1)	63.4 (55.3-72.6)	1.013(0.826-1.242)

<sup>b</sup>. **DH3**: Emodin, EA: Ethyl acetate, DCM: Dichloromethane

<sup>c</sup>. 95%CI: khoảng tin cậy 95%.

Chúng tôi nhận thấy rằng các cao chiết dichloromethane và cao chiết ethyl acetate cả khả năng ức chế mạnh đối với chủng Aac với giá trị IC<sub>90</sub> lần lượt là 63.4 µg/mL và 118.6



$\mu\text{g/mL}$ ; giá trị  $\text{IC}_{50}$  lần lượt là  $30.8 \mu\text{g/mL}$  và  $46.0 \mu\text{g/mL}$ . So với cao chiết ethyl acetate, cao chiết dichloromethane thể hiện hoạt tính kháng khuẩn rộng hơn đối với 6 chủng vi khuẩn bệnh thực vật, trong khi cao chiết ethyl acetate chỉ kháng được 5 chủng vi khuẩn.

#### **4.4.2. Đánh giá hoạt tính của các cao chiết và các hợp chất từ nguyên liệu lõi bò - *R. trisetifer***

##### **4.4.2.1. Hoạt tính kháng nấm hại cây trồng trong nhà lưới của các cao chiết và các hợp chất từ nguyên liệu lõi bò - *R. trisetifer***

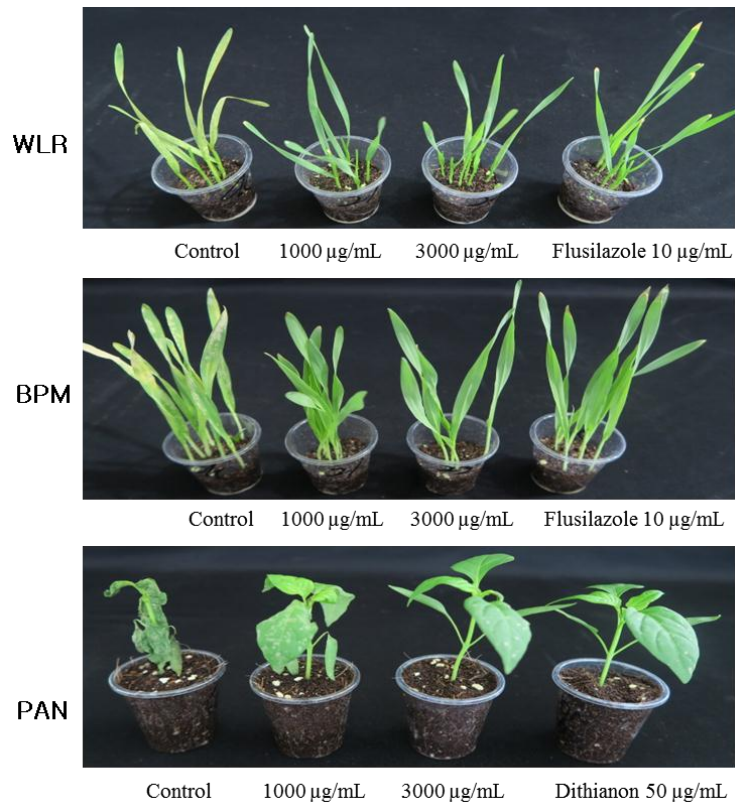
Hoạt tính *in vivo* kháng nấm của các cao chiết từ nguyên liệu lõi bò - *R. trisetifer*

Các cao chiết methanol, cao chiết ethyl acetate, cao chiết n-hexane của *R. trisetifer* được thử nghiệm *in vivo* kháng 7 loại nấm gây bệnh cây trồng, cụ thể: *M. grisea* gây bệnh đạo ôn trên lúa (Rice blast- RCB), *R. solani* gây bệnh đốm vằn trên lúa (Rice sheath blight- RSB), *B. cinerea* gây bệnh thối xám trên cà chua (Tomato grey mould- TGM), *P. infestans* gây bệnh mốc sương trên cà chua (Tomato late blight –TLB), *P. recondita* gây bệnh gỉ sắt trên lúa mì (wheat leaf rust-WLR), *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* gây bệnh héo vàng trên lúa và khoai tây (barlery powdery mildew –BPM), *C. cocodes* gây bệnh thán thư trên ớt (red pepper anthracnose-PAN).

Kết quả thử nghiệm chỉ ra rằng cao chiết cao chiết methanol, cao chiết ethyl acetate, cao chiết n-hexane của *R. trisetifer* ở nồng độ  $333.3 \mu\text{g/mL}$  đã có hiệu quả kiểm soát từ 93 đến 100% trên BPM do *B. graminis* f.sp. *hordei* gây bệnh héo vàng trên lúa và khoai tây (barlery powdery mildew –BPM). Các cao chiết cao chiết methanol, cao chiết ethyl acetate, cao chiết n-hexane của *R. trisetifer* ở nồng độ  $3000 \mu\text{g/mL}$  cũng có hiệu quả từ 83%, 85%, 89% tương ứng trên PAN do *C. cocodes* gây bệnh thán thư trên ớt (red pepper anthracnose-PAN). Cao chiết methanol, cao chiết ethyl acetate, cao chiết n-hexane của *R. trisetifer* không thể hiện hoạt tính do *M. grisea* gây bệnh đạo ôn trên lúa trên RCB và *R. solani* gây bệnh đốm vằn trên lúa RSB ở nồng độ thử nghiệm. Các cao chiết này ở nồng độ  $3000 \mu\text{g/mL}$  cũng có hiệu quả kiểm soát *B. cinera* gây bệnh thối xám trên cà chua TGM (90%), *P. infestans* gây bệnh mốc sương trên cà chua TLB (95%), *P. recondita* gây bệnh gỉ sắt trên lúa mì WLR (90%).

Bảng 4.21. Hoạt tính sinh học *in vivo* của cao chiết methanol *R. trisetifer*, cao chiết n-hexane và cao chiết ethyl acetate kháng lại 7 loại nấm gây hại cây trồng

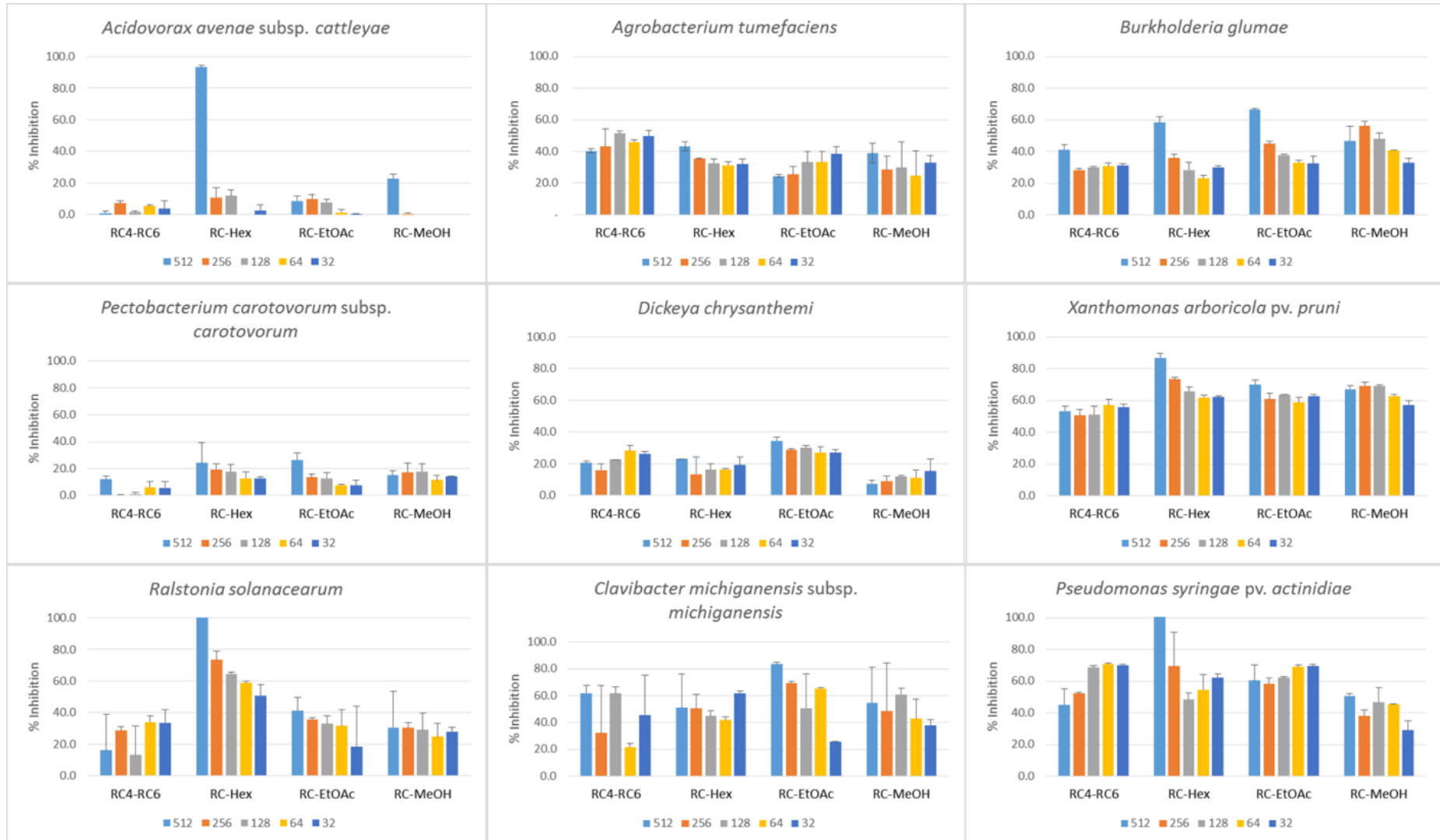
Dịch chiết	Nồng độ ( $\mu\text{g/mL}$ )	Hiệu quả (%) <sup>b</sup>						
		RCB <sup>c</sup>	RSB	TGM	TLB	WLR	BPM	PAN
RC-Hex <sup>a</sup>	3000	61.3	0.0 $\pm$ 0	89.6 $\pm$ 1.4	94.6	90.0	100.0	88.5
	1000	0.0 $\pm$ 0	0.0 $\pm$ 0	50.0	42.9	53.3	100.0	79.0
	333	0.0 $\pm$ 0	0.0 $\pm$ 0	7.1	7.1	3.3	95.0	10.0
RC-EtOAc	3000	40.0	0.0 $\pm$ 0	7.1	7.1	60.0	100.0	85.0
	1000	20.0	0.0 $\pm$ 0	0.0	0.0 $\pm$ 0	60.0	96.7	30.0
	333	0.0 $\pm$ 0	0.0 $\pm$ 0	0.0	0.0 $\pm$ 0	0.0	93.3	0.0
RC-MeOH	3000	0.0 $\pm$ 0	0.0 $\pm$ 0	14.3	0.0 $\pm$ 0	26.7	100.0	83.0
	1000	0.0 $\pm$ 0	0.0 $\pm$ 0	7.1	0.0 $\pm$ 0	3.3	96.7	10.0
	333	0.0 $\pm$ 0	0.0 $\pm$ 0	7.1	0.0 $\pm$ 0	3.3	93.3	0.0 $\pm$ 0
Blasticidin-S	50	100 $\pm$ 0	- <sup>d</sup>	-	-	-	-	-
	1	90 $\pm$ 2.5	-	-	-	-	-	-
Validamycin	50	-	100 $\pm$ 0	-	-	-	-	-
	5	-	85 $\pm$ 5	-	-	-	-	-
Fludioxonil	50	-	-	100 $\pm$ 0	-	-	-	-
	5	-	-	88 $\pm$ 2.1	-	-	-	-
Dimethomorph	10	-	-	-	100 $\pm$ 0	-	-	-
	2	-	-	-	88 $\pm$ 2.1	-	-	-
Flusilazole	10	-	-	-	-	87 $\pm$ 0	-	-
	2	-	-	-	-	43 $\pm$ 10	-	-
Benomyl	100	-	-	-	-	-	100 $\pm$ 0	-
	1	-	-	-	-	-	87 $\pm$ 2.3	-
Dithianon	50	-	-	-	-	-	-	83 $\pm$ 3
	10	-	-	-	-	-	-	20 $\pm$ 0



Hình 4.24. Hiệu quả kháng nấm của cao chiết n-hexane và cao chiết ethyl acetate đối với các loại nấm: *B.graminis* f.sp.*hordei* (BPM), *C.coccodes* (PAN) và *P.recondita* (WLR) tại các nồng độ 1000 và 3000 µg/mL, C(mẫu chưa xử lý), PC (mẫu đối chứng dương).

4.4.2.2. Hoạt tính kháng vi khuẩn hại cây trồng của các cao chiết và các hợp chất được phân lập từ nguyên liệu lõi bò - *R. trisetifer*

Hình 4.25. Hoạt tính kháng vi khuẩn của các cao chiết và các hợp chất được phân lập từ nguyên liệu *R. trisetifer*



4.4.2.2.a. Hoạt tính *in vitro* kháng vi khuẩn hại cây trồng trong phòng thí nghiệm của các cao chiết từ nguyên liệu lõi bò - *R. trisetifer*.

Hoạt tính *in vitro* chống vi khuẩn của các cao chiết được thử ở các nồng độ từ 32 đến 512  $\mu\text{g/mL}$ . Kết quả thử nghiệm thể hiện hoạt tính kìm hãm đối với nhiều loại vi khuẩn gây bệnh, trong đó cao chiết n-hexane của *R. trisetifer* là thể hiện hoạt tính mạnh nhất. Các cao chiết không thể hiện hoạt tính với các chủng vi khuẩn Aac, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, *D. chrysanthemi* và thể hiện hoạt tính trung bình đối với các chủng *A. tumefaciens*, *B. glumae*, *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, *R. solanacearum*, *P. syringae* pv. *actinidiae* (Psa). Ở nồng độ 512  $\mu\text{g/mL}$ , cao chiết n-hexane của *R. trisetifer* thể hiện sự kìm hãm Aac (92.0%) và Xap (86.0%) và thể hiện sự kìm hãm mạnh *R. solanacearum* (100%) và Psa (100%).

4.4.2.2.b. Hoạt tính *in vitro* kháng vi khuẩn hại cây trồng trong phòng thí nghiệm của các hợp chất được phân lập từ nguyên liệu lõi bò - *R. trisetifer*.

Hỗn hợp chất **RT5** (chrysophanol-8-*O*- $\beta$ -D-glucoside và physcion-8-*O*- $\beta$ -D-glucoside) cũng được thử với 9 loại vi khuẩn. Kết quả thử cho thấy, hỗn hợp này không thể hiện hoạt tính với 2 chủng vi khuẩn là Aac, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* và thể hiện hoạt tính trung bình với các chủng *B. glumae*, *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, *D. chrysanthemi*, *R. solanacearum*, *A. tumefaciens*, Psa. Hỗn hợp này thể hiện hoạt tính khá nhạy với chủng vi khuẩn Xap.

4.4.2.2.c. Hoạt tính *in vivo* kháng vi khuẩn hại cây trồng trong nhà kính của cặn n-hexane từ nguyên liệu lõi bò - *R. trisetifer*.

Bảng 4.22. Hiệu quả kiểm soát *in vivo* của cặn n-hexane từ cây *R. chinensis* đối với vi khuẩn gây bệnh héo xanh.

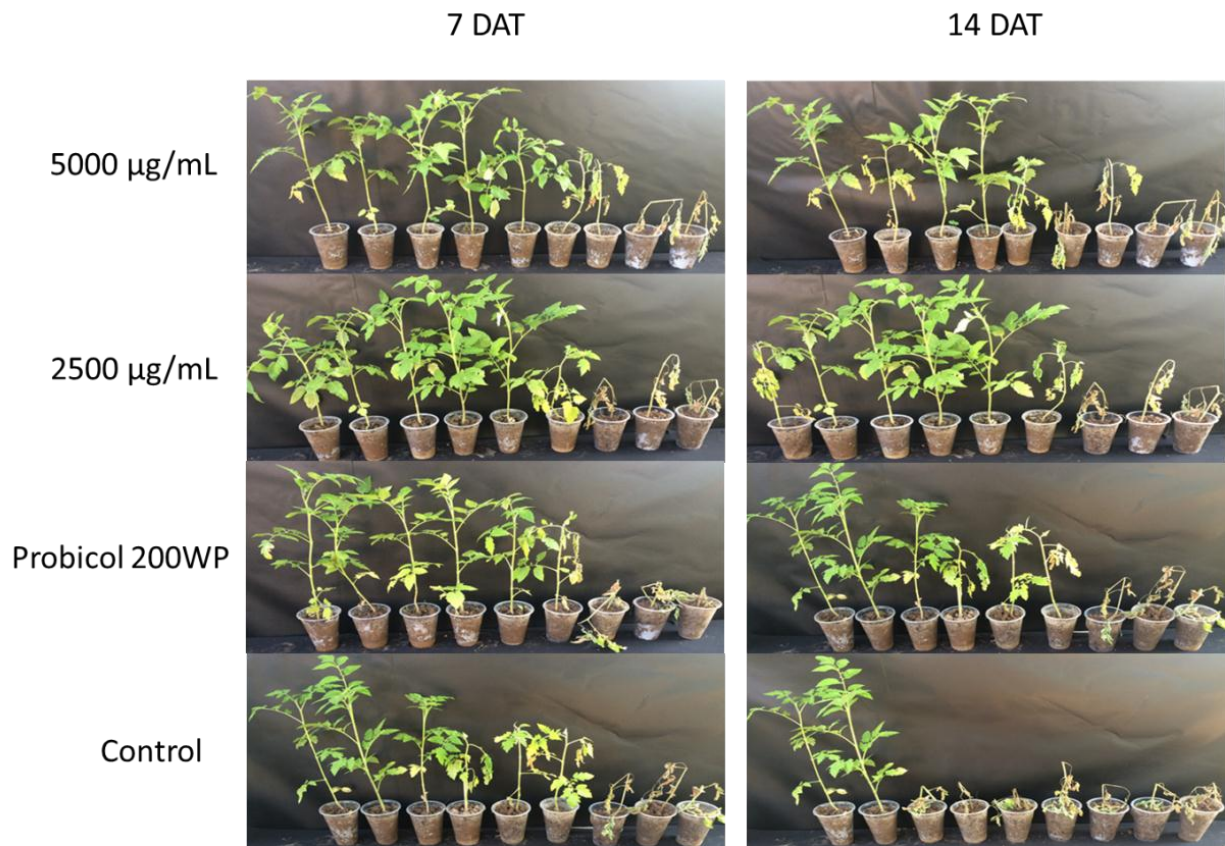
Vật liệu	Nồng độ	Chỉ số bệnh (%) <sup>b</sup>		Hiệu quả kiểm soát
		7DAT <sup>c</sup>	14DAT	
RT-Hex	5000 $\mu\text{g/mL}$	29.25b	47.25b	25.0b
	2500 $\mu\text{g/mL}$	31.5b	38.25c	39.3a
Probiocol 200WP	500-fold dilution	31.5b	40.5bc	35.7a
Control		45.0a	63.0a	

<sup>a</sup> Cây cà chua ở giai đoạn 4-5 lá được phun dịch 2 lần, thời gian cách nhau 7 ngày.

<sup>b</sup> Chỉ số bệnh được đánh giá sau 7 và 14 ngày ủ

<sup>c</sup>DAT: ngày sau ủ.

<sup>d</sup> Hiệu quả kiểm soát sau 14 ngày xử lý. Probiocol 200 WP (bismethiazol 190 g/kg + kasugamycin 10g/kg) được pha loãng 500 lần dùng làm đối chứng dương. Nước cất được dùng làm đối chứng âm.



Hình 4.26. Hiệu quả kiểm soát bệnh héo rũ gây bởi vi khuẩn *R. solanacearum* do cặn n-hexane của *R. trisetifer* trên cây cà chua.

Cặn n-hexane của *R. trisetifer* được thử nghiệm *in vivo* cho hiệu quả kiểm soát bệnh héo rũ gây bởi vi khuẩn *R. solanacearum* trên cây cà chua 4 tuần tuổi. Kết quả thể hiện khả năng kiểm soát bệnh của cặn n-hexane từ *R. trisetifer* tốt hơn mẫu đối chứng âm là nước. Ở các nồng độ 2500 µg/mL và 5000 µg/mL làm giảm chỉ số bệnh gây ra bởi vi khuẩn *R. solanacearum* trên cây cà chua 31.55 và 29.3% sau 7 ngày ủ. Thử nghiệm sử

dụng Probiocol 200 WP như là chất đối chứng dương thể hiện giá trị kiểm soát là 35.7%. So sánh với kết quả thử nghiệm cặn n-hexane từ *R.trisetifer* cho hiệu quả tương tự.

Khả năng kiểm soát bệnh của cặn n-hexane từ *R.trisetifer* ở nồng độ 2500 µg/mL là 39.3%, ở nồng độ 5000 µg/mL là 25% sau 14 ngày ủ

#### **4.4.3. Đánh giá hoạt tính của các cao chiết và các hợp chất từ nguyên liệu muồng trâu- *S. alata***

4.4.3.1. Hoạt tính kháng nấm hại cây trồng trong nhà lưới của các cao chiết và các hợp chất từ nguyên liệu muồng trâu- *S. alata*

4.4.3.1.a. Hoạt tính *in vivo* kháng nấm hại cây trồng trong nhà lưới của các cao chiết từ nguyên liệu muồng trâu- *S. alata*

Cao chiết n-hexan và cao ethyl acetate của lá cây *S.alata* được thử nghiệm *in vivo* kháng 7 loại nấm gây bệnh cây trồng, cụ thể: *M.grisea* gây bệnh đạo ôn trên lúa (Rice blast- RCB), *R.solani* gây bệnh đốm vằn trên lúa (Rice sheath blight- RSB), *B.cinerea* gây bệnh thối xám trên cà chua (Tomato grey mould- TGM), *P.infestans* gây bệnh mốc sương trên cà chua (Tomato late blight –TLB), *P.recondita* gây bệnh gỉ sắt trên lúa mì (wheat leaf rust-WLR), *B.graminis* f.sp. *hordei* gây bệnh héo vàng trên lúa và khoai tây (barlery powdery mildew –BPM), *C.cocodes* gây bệnh thán thư trên ớt (red pepper anthracnose-PAN).

Kết quả thử nghiệm hoạt tính kháng nấm của cao chiết n-hexane và cao chiết ethyl acetate đối với 7 loại nấm trên ở nồng độ 3000 µg/ml được thể hiện trong bảng 4.23.

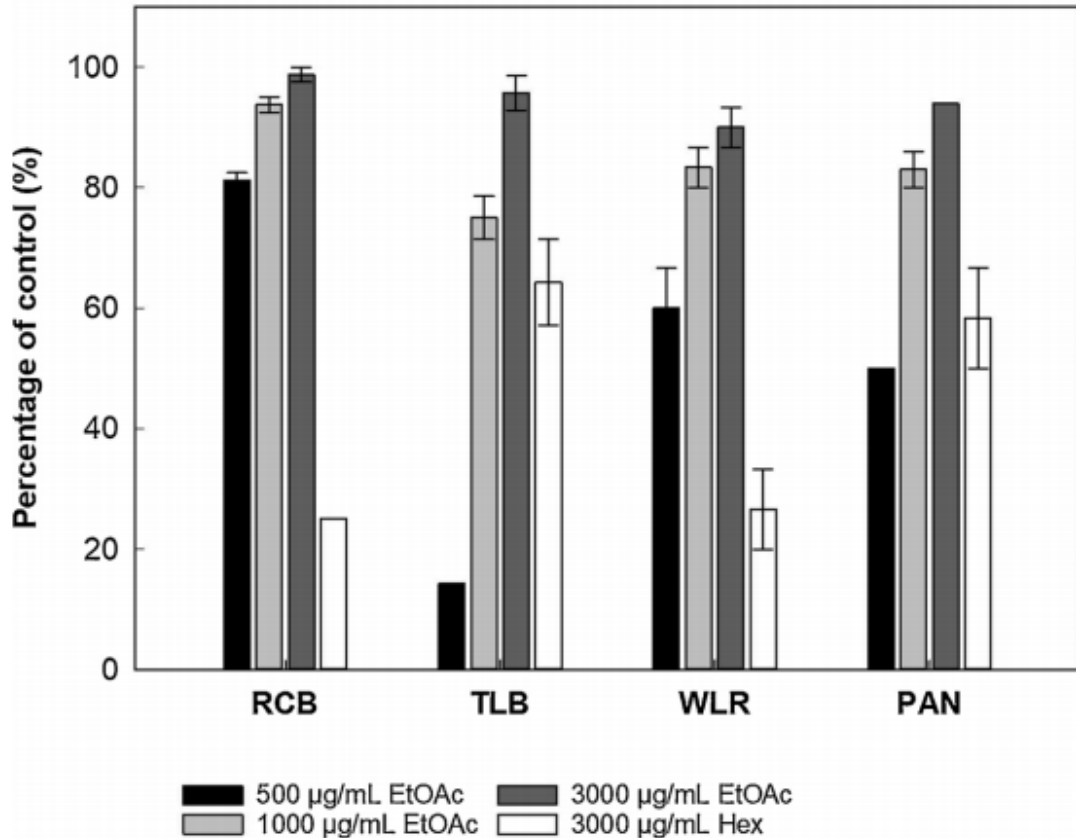
Bảng 4.23. Kết quả thử hoạt tính kháng nấm của cao chiết ethyl acetate và cao n-hexane ở nồng độ 3000 µg/ml đối với 7 loại nấm

<b>Mẫu thử</b>	<b>RCB</b>	<b>RSB</b>	<b>TGM</b>	<b>TLB</b>	<b>WLR</b>	<b>BPM</b>	<b>PAN</b>
Cao chiết n-hexane	25	0	0	64.29	26.67	0	58.33
Cao chiết ethyl acetate	93.75	0	28.57	95.71	90.00	0	93.33

Qua bảng 4.23, nhận thấy cao chiết ethyl acetate thể hiện hiệu quả kháng nấm cao (hơn 90%) ở nồng độ từ 1000 µg/ml đến 3000 µg/ml đối với nấm *M.grisea* (gây bệnh bệnh đạo ôn RCB); nấm *P.infestans* (gây bệnh cà chua mốc sương TLB); nấm *P.recondita* (gây bệnh gỉ lá lúa mì WLR) và nấm *C.gloeosporioides* (gây bệnh thán thư

trên cây ớt đỏ PAN). Cao chiết ethyl acetate thể hiện hoạt tính cao hơn so với cao chiết n-hexane đối với nấm *M.grisea* (gây bệnh bệnh đạo ôn RCB), nấm *B.cinerea* (gây bệnh thối xám trên cà chua TGM); nấm *P.infestans* (gây bệnh mốc sương trên cà chua TLB); nấm *P.recondita* (bệnh gỉ sắt trên lúa mì WLR) và nấm (*C.gloeosporioides* gây bệnh thán thư trên cây ớt đỏ PAN).

Cao chiết ethyl acetate và n-hexane đều không thể hiện hoạt tính đối với nấm *R.solani* (gây bệnh đốm vằn trên lúa RSB), nấm *B.graminis* f.sp. *hordei* (*Erysiphe graminis*) (gây bệnh héo vàng trên lúa và khoai tây BPM).



Hình 4.27. Thử nghiệm *in vivo* của dịch chiết n-hexane ở nồng độ 3000 µg/mL và dịch chiết ethyl acetate ở nồng độ 500, 1000, 3000 µg/mL trên một số nấm gây bệnh.



## RCB



Control

Muong BG 500  
ppmMuong BG  
1,000 ppmMuong BG  
3,000 ppmBlastidicin-s  
50ppm

## PAN



Control

Muong BG  
500 ppmMuong BG  
1,000 ppmMuong BG  
3,000 ppmDithianon  
50ppm

## WLR



Control

Muong BG  
500 ppmMuong BG  
1,000 ppmMuong BG  
3,000 ppmFlusilazole  
10ppm

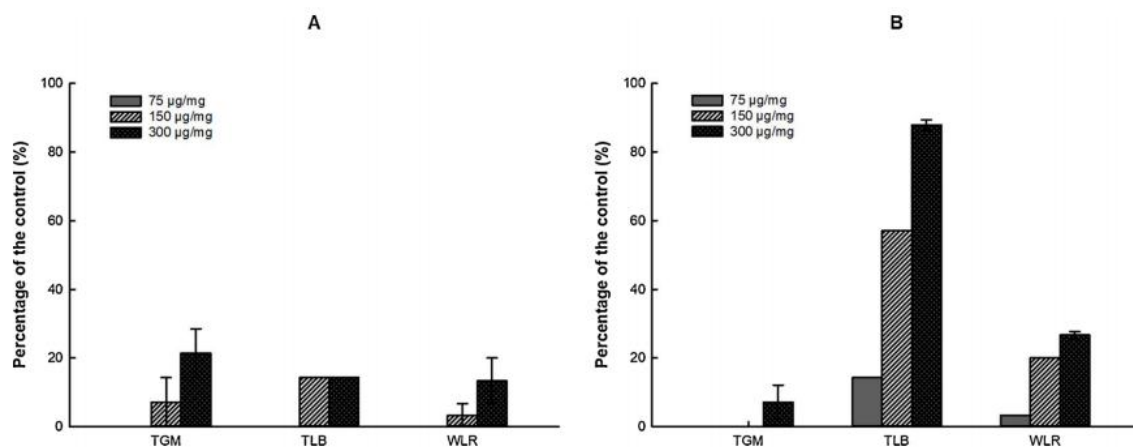
Hình 4.28. Hình ảnh thử nghiệm cao chiết ethyl acetate từ lá muồng trâu trên 1 số nấm *M.grisea* (gây bệnh đạo ôn RCB); nấm *P.recondita* (gây bệnh gỉ lá lúa mì WLR ) và nấm *C.gloeosporioides* (gây bệnh thán thư trên cây ớt đỏ PAN).

loại nấm gây bệnh RCB, bệnh đạo ôn do *Magnaporthe grisea*; WLR gi lá lúa mì do *Puccinia recondita* và PAN gây bệnh thán thư trên cây ớt đỏ *Colletotrichum gloeosporioides*.

4.4.3.1.b. Hoạt tính *in vivo* kháng nấm hại cây trồng trong nhà lưới của các hợp chất từ nguyên liệu muông trâu- *S. alata*

Thử nghiệm trên đối tượng cây trồng, hợp chất **SA4** (rhein) và **SA5** (aloe- emodin) được thử nghiệm ở khoảng nồng độ từ 75 đến 300 µg/ml đối với bệnh TLB - cà chua mốc sương gây bởi nấm *P.infestant*.

Hợp chất **SA4** (rhein) thể hiện sự kiểm soát tốt ở các nồng độ 150 và 300 µg/ml giảm 57.1% và 87.9%. trong khi hợp chất **SA5** (aloe- emodin) làm giảm nhẹ sự phát triển của bệnh TLB - cà chua mốc sương xuống 14.3 %



Hình 4.29. Thử nghiệm *in vivo* hiệu quả kiểm soát của hợp chất **SA4** (rhein) (B) và **SA5** (aloe-emodin) (A) đối với các bệnh TGM, TLB, WLR gây bởi nấm *B.cinerea*, *P.infestans*, *P.recondita*.

4.4.3.1.c. Hoạt tính *in vitro* kháng nấm hại cây trồng trong nhà lưới của ethyl acetate và các hợp chất từ nguyên liệu muông trâu- *S. alata*

Tiếp theo, tám hợp chất được tách ra từ cao chiết ethyl acetate muông trâu – *S. alata* và cao chiết ethyl acetate- *S. alata* được đánh giá hoạt tính kháng nấm *in vitro* đối với một số loài nấm *Phytophthora* sp và *M.oryzae*. Hợp chất flavonoid **SA3** ((-)-epiafzelechin) từ cặn ethyl acetate thể hiện sự kìm hãm sự phát triển của nấm *M.oryzae*.

Trong khi các hợp chất **SA1** (methyl 2,4,6-trihydroxybenzoate) - **SA4** (rhein), **SA6** (aloe-emodin-8-*O*- $\beta$ -D-glucoside) và **SA8** (kaempferol-3-*O*-gentiobiside) thể hiện tính kháng nấm *in vitro* đối với nấm *Phytophthora* sp.

Hợp chất **SA1** (methyl 2,4,6-trihydroxybenzoate) thể hiện sự kìm hãm phát triển của nấm *P. capsici* TVH ở nồng độ IC<sub>50</sub> 297.4  $\mu$ g/ml. Trong khi hợp chất **SA8** (kaempferol-3-*O*-gentiobiside) thể hiện hoạt tính trung bình với sự phát triển của nấm *Phytophthora* sp. SK5 ở nồng độ IC<sub>50</sub> 359.2  $\mu$ g/ml và không thể hiện hoạt tính với các loài nấm thử khác. Ngoài ra, các hợp chất **SA2** (kaempferol) và **SA3** ((-)-epiafzelechin) thể hiện hoạt tính yếu và dải phổ rộng đối với các loài nấm được thử hoạt tính khác. Giá trị IC<sub>50</sub> của các hợp chất flavonoid **SA2** (kaempferol), **SA3** ((-)-epiafzelechin), **SA5** (aloe-emodin) là đối với nấm *Phytophthora* sp. SK5 là 196.0, 189.5, 413.7  $\mu$ g/ml. Hợp chất **SA7** (kaempferol-3-*O*-glycoside) và **SA8** (kaempferol-3-*O*-gentiobiside) không thể hiện sự ảnh hưởng đến phát triển của các loài nấm *Phytophthora* sp. Hợp chất **SA3** ((-)-epiafzelechin) thể hiện sự ‘nhạy’ với nấm *Phytophthora* sp. SK5 với IC<sub>50</sub> là 189.5  $\mu$ g/ml so với nấm *P. capsici* TVH với IC<sub>50</sub> là 350.5  $\mu$ g/ml. Hợp chất **SA4** (rhein) kìm hãm mạnh sự phát triển đối với nấm *Phytophthora* sp. SK5 và *P. capsici* TVH với giá trị IC<sub>50</sub> lần lượt là 85.1 và 127.5  $\mu$ g/ml.

Bảng 4.24. Hoạt tính *in vitro* của dịch chiết ethyl acetate và các hợp chất phân lập từ cây muồng trâu- *S.alata*

Sample	<i>Phytophthora</i> sp. SK5		<i>Phytophthora capsici</i> TVH		<i>Magnaporthe oryzae</i>	
	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ g/mL)	IC <sub>90</sub> ( $\mu$ g/mL)	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ g/mL)	IC <sub>90</sub> ( $\mu$ g/mL)	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ g/mL)	IC <sub>90</sub> ( $\mu$ g/mL)
<b>EtOAc<sup>b</sup></b>	675.9 $\pm$ 56.3	1215 $\pm$ 56.1	< 250	> 2000	737.1 $\pm$ 94.0	1305.6 $\pm$ 255.2
<b>SA1</b> (methyl 2,4,6-trihydroxybenzoate)	nt	nt	297.4 $\pm$ 34.2	> 300	nt	nt
<b>SA2</b> (kaempferol)	196.0 $\pm$ 57.9	473.4 $\pm$ 64.1	341.8 $\pm$ 39.3	> 600	> 600	> 600
<b>SA3</b> ((-)-epiafzelechin)	189.5 $\pm$ 71.0	479.2 $\pm$ 79.9	350.5 $\pm$ 58.7	> 600	455.5 $\pm$ 50.9	> 600
<b>SA4</b> (rhein)	85.1 $\pm$ 17.4	233.1 $\pm$ 19.8	127.5 $\pm$ 21.3	329.2 $\pm$ 27.7	> 600	> 600
<b>SA5</b> (aloe-emodin)	413.7 $\pm$ 89.4	> 600	> 600	> 600	nt	nt
<b>SA6</b> (aloe-emodin-8- <i>O</i> - $\beta$ -D-glucoside).	77.0 $\pm$ 26.6	194.3 $\pm$ 33.8	137.7 $\pm$ 26.0	> 200	nt	nt

<b>SA7</b> (kaempferol-3 -O-glycoside)	> 600	> 600	> 600	> 600	nt	nt
<b>SA8</b> (kaempferol-3 -O-gentiobiside)	359.2 ± 38.3	> 600	> 600	> 600	nt	nt

4.4.3.2. Hoạt tính *in vitro* kháng vi khuẩn hại cây trồng trong phòng thí nghiệm của các cao chiết và các hợp chất được phân lập từ nguyên liệu muồng trâu- *S. alata*

Tiến hành thử hoạt tính kháng vi khuẩn đối với hai mẫu cao chiết và hai hợp chất. Gồm cao chiết n-hexan và cao chiết ethyl acetate đã được chiết phân bố từ cao tổng methanol và 8 hợp chất đã được phân lập từ cao chiết ethyl acetate. Đối chứng âm là DMSO, 2% và đối chứng dương là Streptomycin sulfate (SS) và Chloramphenicol (chl).

Các mẫu dịch chiết và hợp chất được kiểm tra hoạt tính kháng vi khuẩn đối với 10 loại vi khuẩn: *Acidovorax avenae* subsp. *cattlyae* (Aac), *Agrobacterium tumefaciens*, *Burkholderia glumae*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Pectobacterium carotovora* subsp. *carotorova*, *Pectobacterium chrysanthemi*, *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*, *Xanthomonas arboricola pruni*, *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* KW11, *Ralstonia solanacearum*. Kết quả được thể hiện ở bảng 4.25.

Hợp chất **SA4** (rhein), **SA5** (aloe- emodin) và cao dịch chiết ethyl acetate có hoạt tính mạnh đối với vi khuẩn Aac (gây bệnh cháy lá trên cây hoa Lan, trong đó hợp chất **SA4** (rhein) thể hiện hoạt tính mạnh nhất (MIC <19 µg/mL). Cả 2 hợp chất này đều có hàm lượng lớn trong cao chiết ethyl acetate đã chiết phân bố. Bên cạnh đó, cao ethyl acetate còn thể hiện hoạt tính trung bình với vi khuẩn *Xanthomonas arboricola pruni* gây bệnh đốm trên lá đào (MIC 250 µg/mL). Cao chiết n-hexane thể hiện hoạt tính trung bình với vi khuẩn *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* gây bệnh thối loét trái cà chua (MIC 500 µg/mL) và hoạt tính yếu đối với vi khuẩn gây đen lép hạt lúa *Burkholderia glumae* tại (MIC 2000 µg/mL). Hai cao chiết và hai hợp chất đều không thể hiện hoạt tính đối với vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* gây bệnh u sùi thân, *Pectobacterium carotovora* subsp. *carotorova*, *Pectobacterium chrysanthemi*, *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* ở các nồng độ tối đa được thử.

Bảng 4.25. Nồng độ ức chế tối thiểu MIC ( $\mu\text{g/mL}$ ) của cao dịch chiết và hợp chất kháng vi khuẩn

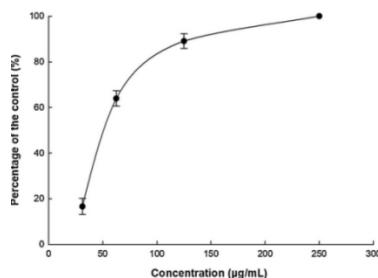
	Tên vi khuẩn	MIC <sup>a</sup> ( $\mu\text{g/mL}$ )											
		SA1 (methyl 2,4,6- trihydroxybenzoate)	SA2 (kaempferol)	SA3 (-) epiafzelechin	SA4 (rhein)	SA5 (aloe- emodin)	SA6 (aloe-emodin-8- O- $\beta$ -D-glucoside)	SA7 (kaempferol-3- O-glycoside)	SA8 (kaempferol- 3-O- gentiobiside)	Hex	EtOAc	SS	Chl
1	<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>cattlyae</i>	nt	> 512	nt	<19	150	> 512	> 512	> 512	-	125	nt	1.25
2	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	nt	> 512	nt	-	-	> 512	> 512	> 512	-	-	nt	20
3	<i>Burkholderia glumae</i>	nt	> 512	nt	-	> 512	> 512	> 512	> 512	2000	500	nt	2.5
4	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	nt	> 512	nt	> 512	> 512	> 512	512	> 512	500	500	nt	2.5
5	<i>Pectobacterium carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i>	nt	> 512	nt	-	-	> 512	> 512	> 512	-	-	nt	2.5
6	<i>Dickeya chrysanthemi</i>	nt	> 512	nt	nt	nt	> 512	> 512	> 512	nt	nt	nt	nt
7	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lachrymans</i>	nt	> 512	nt	-	-	> 512	> 512	> 512	-	-	nt	nt
8	<i>Xanthomonas arboricola pruni</i>	nt	> 512	nt	512	-	> 512	> 512	> 512	-	250	nt	2.5
9	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>actinidiae</i> KW11	nt	> 512	nt	-	-	> 512	> 512	> 512	-	500	1.25	nt
10	<i>Ralstonia solanacearum</i>	nt	> 512	nt	> 512	512	> 512	> 512	> 512	-	500	5	nt

-: không có hoạt tính ở nồng độ tối đa được thử (hợp chất: 600  $\mu\text{g/mL}$ , dịch chiết: 2000  $\mu\text{g/mL}$ , SS, Chl: 20  $\mu\text{g/mL}$ ); Nt: không được kiểm tra

Cao chiết ethyl acetate và hợp chất SA4 (rhein) đã được thử hoạt tính kháng vi khuẩn Aac với các nồng độ khác nhau, kết quả được thể hiện trong gây bệnh đốm lá trên dưa hấu bảng 4.26

Bảng 4.26. Kết quả đánh giá khả năng kháng vi khuẩn *Acidovorax avenae* subsp. *cattlyae* gây bệnh đốm lá trên dưa hấu của cao chiết EA ở các nồng độ khác nhau.

		Nồng độ ( $\mu\text{g/mL}$ )					Đối chứng âm		
			31.25	62.5	125	250	500	0 h	24 h
Cao EA	0 h		<b>15.63</b>	0.105	0.142	0.238	0.419	0.042	0.48
			0.058	0.116	0.134	0.232	0.401	0.042	0.495
	24 h		0.058	0.274	0.194	0.23	0.412	0.042	0.488
			0.442	0.254	0.175	0.237	0.405	0.045	0.425
	CV (%)		0.413	61.59	86.84	101.17	99.53	0.043	0.456
		9.79	66.29	91.31	99.53	101.17	AVG	0.042666667	0.468333
Hiệu quả kháng vi khuẩn	AVG		16.60	<b>63.94</b>	<b>89.08</b>	<b>100.35</b>	<b>100.35</b>		
	SD		<b>13.19</b>	3.32	3.16	1.16	1.16		
			4.82						



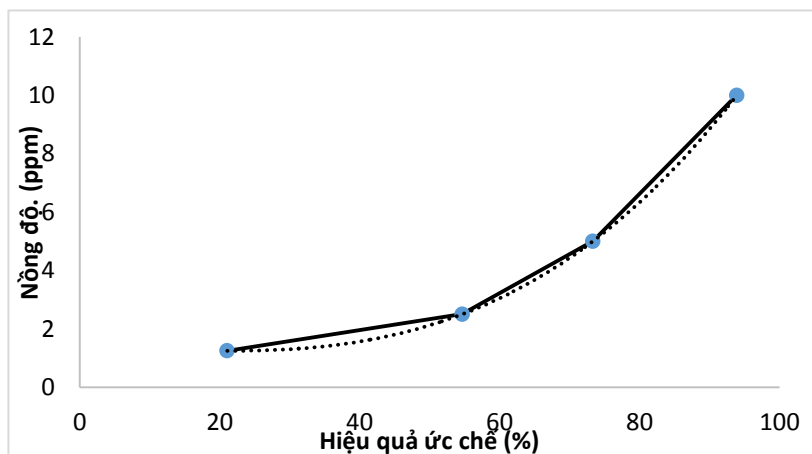
Sample	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )	IC <sub>90</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )
EtOAc-soluble extract	53.9 $\pm$ 5.5	117.1 $\pm$ 17.2

Từ bảng 4.26 nhận thấy cao chiết ethyl acetate có hoạt tính kháng vi khuẩn Aac tốt tại nồng độ >125  $\mu\text{g/mL}$ . Tại nồng độ 250  $\mu\text{g/mL}$ , hiệu quả kháng nấm đạt 100%.

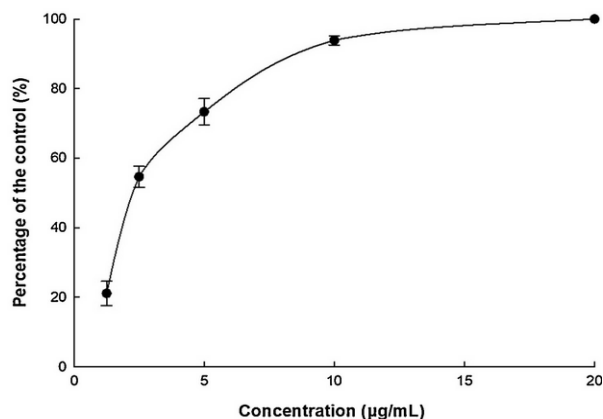
Thử nghiệm kháng vi khuẩn Aac gây bệnh đốm lá trên dưa hấu của hợp chất **SA4** - rhein tại các nồng độ khác nhau. Kết quả được thể hiện trong bảng 4.27

Bảng 4.27. Kết quả đánh giá khả năng kháng vi khuẩn *Acidovorax avenae* subsp. *cattlyae* gây bệnh đốm lá trên dưa hấu của hợp chất **SA4**- rhein ở các nồng độ khác nhau

	Nồng độ (ug/mL)					
	1.25	2.5	5	10	20	40
0 h	0.049	0.049	0.051	0.049	0.050	0.051
	0.048	0.049	0.049	0.051	0.050	0.049
24 h	0.395	0.251	0.152	0.08	0.049	0.050
	0.374	0.233	0.175	0.072	0.050	0.050
CV (%)	18.60	52.55	76.04	92.95	100.23	100.00
	23.53	56.77	70.63	94.83	100.00	100.00
<b>AVG</b>	<b>21.06</b>	<b>54.66</b>	<b>73.34</b>	<b>93.89</b>	<b>100.12</b>	<b>100.00</b>
SD	3.49	2.99	3.82	1.33	0.17	0.00



Hình 4.30. Hiệu quả kháng vi khuẩn *Acidovorax avenae* subsp. *cattlyae* của hợp chất **SA4** ở các nồng độ khác nhau



Sample	IC <sub>50</sub> (µg/mL)	IC <sub>90</sub> (µg/mL)
Compound 5	2.5 ± 0.2	8.0 ± 1.0

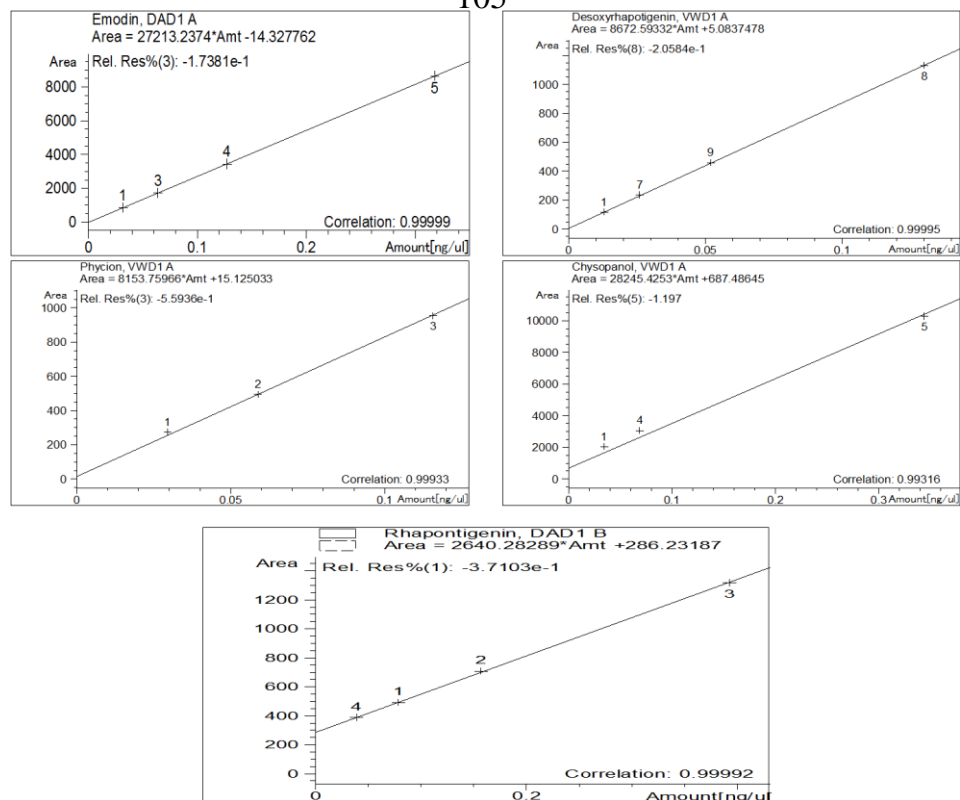
Từ bảng 4.27 nhận thấy, hợp chất **SA4** có hoạt tính kháng vi khuẩn Aac tại nồng độ 10 ppm (µg/mL) hiệu quả ức chế lên tới 93±1%.

#### 4.5. Phân tích định lượng các hoạt chất bằng phương pháp HPLC

##### 4.5.1. Phân tích định lượng các hoạt chất trong cao chiết cây đại hoàng – *R. tanguticum* bằng phương pháp HPLC

Các hợp chất **DH1**, **DH2**, **DH3**, **DH4**, **DH5** và các thành phần trong cao chiết methanol, dichloromethane, ethyl acetate được phân tích bằng phương pháp phổ HPLC. Kết quả phân tích HPLC được thể hiện trong phụ lục II.1. Dựa vào số liệu trên sắc kí đồ HPLC (tương quan diện tích pic và nồng độ của chất chuẩn), chúng tôi tiến hành xây dựng đường chuẩn của **DH3** (emodin), **DH5** (rhapontigenin), **DH2** (physcion), **DH1** (chrysophanol), **DH6** (desoxyrhaponticin) được phân lập từ rễ cây đại hoàng như sau:





Hình 4.31. Đường chuẩn của các chất được tách ra từ rễ đại hoàng

Các thông số của **DH3**, **DH5**, **DH2**, **DH1**, **DH6** được trình bày trong bảng 4.28

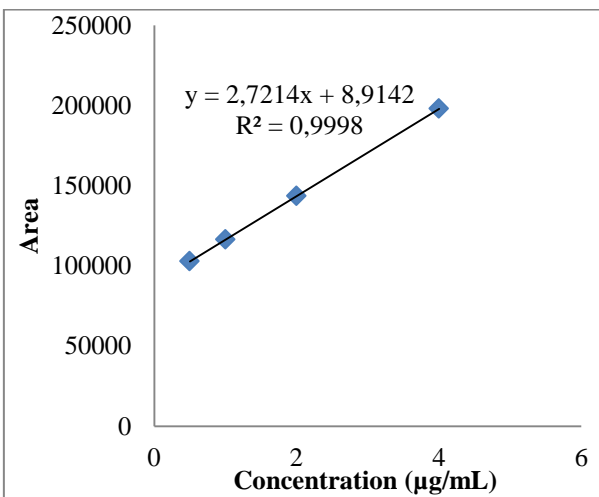
Kết quả phân tích thể hiện: Hệ số tương quan giữa các hợp chất **DH3**, **DH5**, **DH2**, **DH1**, **DH6** và các cao dịch chiết cao nên cao chiết dichloromethane đều chứa hàm lượng các chất có hoạt tính cao hơn so với dịch chiết tổng methanol. Do vậy, cao chiết dichloromethane được lựa chọn để làm thành phần hoạt tính chính cho quá trình phối trộn chế phẩm BVTV thảo mộc.

Bảng 4.28. Một số thông số về DH3, DH5, DH02, DH1, DH6

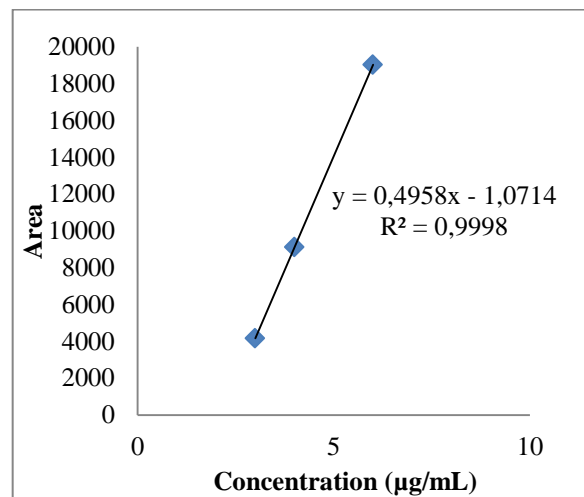
Tham số	<b>DH3</b> (emodin)	<b>DH5</b> (rhapontigeni)	<b>DH2</b> (physcion)	<b>DH1</b> (chrysophanol)	<b>DH6</b> (desoxyrhaponticin)	Tổng cộng
Thời gian lưu	16,554	3,350	27,504	18,965	4,246	
Nồng độ giới hạn (mg/mL)	0,0318-0,318	0,0266-0,26	0,0294-0,392	0,0344-0,344	0,013-0,13	
Phương trình hồi quy	27213,2374x- 14,327762	2640,28289x+ 286,23187	8153,75966x + 15,125033	28245,4253x+ 687,48645	8672,59332x+ 5,0837478	
Góc chắn	14,327762	286,23187	15,125033	687,48645	5,0837478	
Độ dốc	27213,2374	2640,28289	8153,75966	28245,4253	8672,59332	
Hệ số tương quan	0,99999	0,99992	0,99933	0,99316	0,99995	
Hàm lượng các chất trong cao chiết dichloromethane (mg/g)	27,92	12	260,06	386,039	36,7	
Hàm lượng các anthraquinone trong cao chiết diclometan (%)	2,792		26,006	38,6039		67,4019

#### 4.5.2. Phân tích định lượng các hoạt chất trong cao chiết cây lười bò *R. trisetifer* bằng phương pháp HPLC

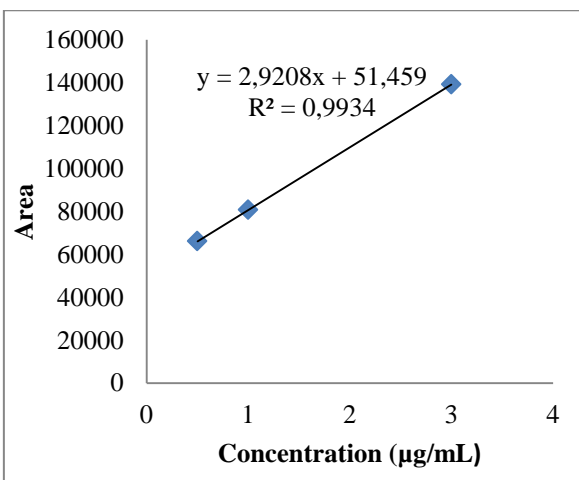
Các hợp chất **RT1** (chrysophanol), **RT2** (physcion), **RT3** (emodin), **RT4** (emodin-8-*O*- $\beta$ -D-glucoside), **RT5a** (chrysophanol -8-*O*- $\beta$ -D-glucoside), **RT5b** (physcion -8-*O*- $\beta$ -D-glucoside) các thành phần trong cao chiết methanol, n-hexane, ethyl acetate được phân tích bằng phương pháp phổ HPLC. Kết quả phân tích HPLC được thể hiện trong phụ lục II.2. Dựa vào số liệu trên sắc kí đồ HPLC (tương quan diện tích pic và nồng độ của chất chuẩn), chúng tôi tiến hành xây dựng đường chuẩn của **RT1**, **RT2**, **RT3**, **RT4**, **RT5a**, **RT5b** được phân lập từ cây lười bò *R. trisetifer* như sau:



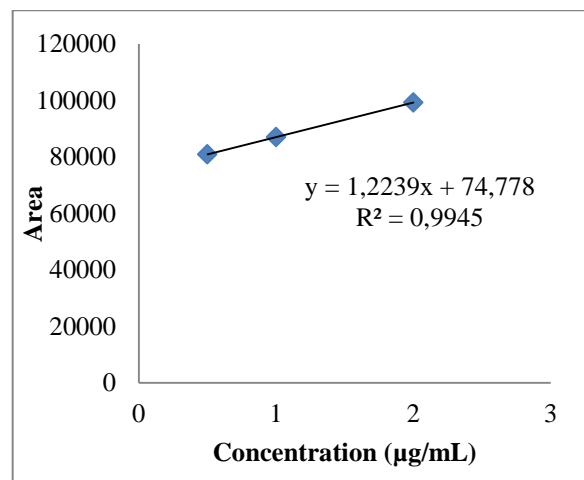
**RT1** (chrysophanol)



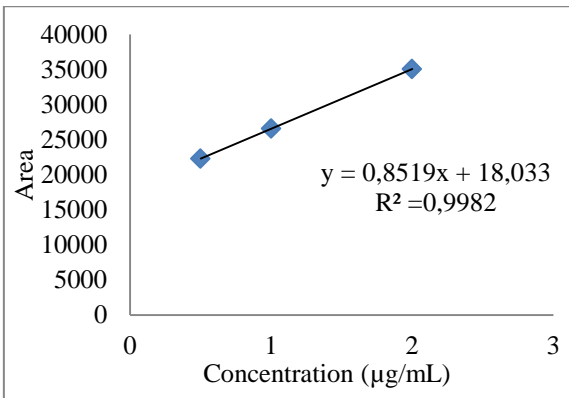
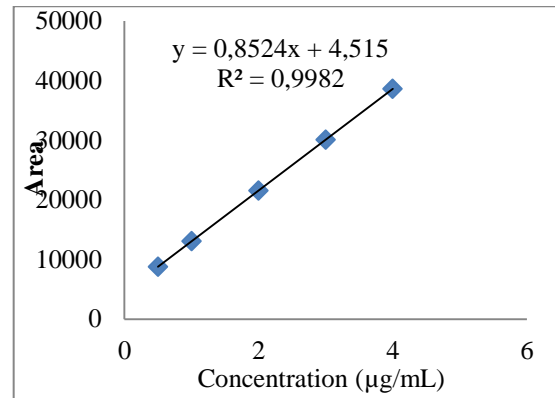
**RT2** (physcion)



**RT3**  
(emodin)



**RT4**  
(emodin-8-*O*- $\beta$ -D-glucoside)

**RT5a**(chrysophanol-8-*O*-β-D-glucoside)**RT5b**(physcion-8-*O*-β-D-glucoside)

Hình 4.32. Đường chuẩn của các chất được tách ra từ cây lưỡi bò

Các thông số của **RT1**, **RT2**, **RT3**, **RT4**, **RT5**, **RT6** được trình bày trong bảng 4.29

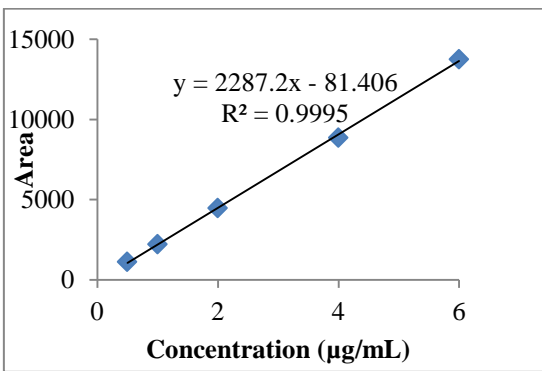
Kết quả phân tích thể hiện: Hệ số tương quan giữa các hợp chất **RT1** (chrysophanol), **RT2** (physcion), **RT3** (emodin), **RT4** (emodin-8-*O*-β-D-glucoside), **RT5a** (chrysophanol -8-*O*-β-D-glucoside), **RT5b** (physcion -8-*O*-β-D-glucoside) và các cao dịch chiết cao nên cao chiết ethyl acetate đều chứa hàm lượng các chất có hoạt tính cao hơn so với dịch chiết tổng methanol, n-hexane

Bảng 4.29. Một số thông số về **RT1, RT2, RT3, RT4, RT5a, RT5b**

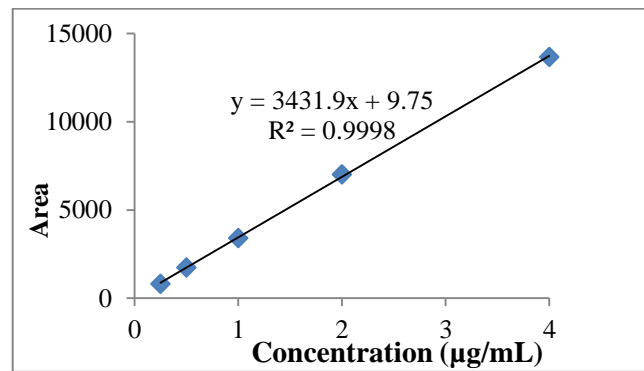
Tham số	<b>RT1</b> (chrysophanol)	<b>RT2</b> (physcion)	<b>RT3</b> (emodin)	<b>RT4</b> (emodin-8- <i>O</i> - $\beta$ -D-glucoside),	<b>RT5a</b> (chrysophanol-8- <i>O</i> - $\beta$ -D-glucoside)	<b>RT5b</b> (physcion-8- <i>O</i> - $\beta$ -D-glucoside)	Tổng cộng
Thời gian lưu	40,251 $\pm$ 0,003	41.827 $\pm$ 0,006	39,158 $\pm$ 0,018	27,244 $\pm$ 0,023	26,713 $\pm$ 0,018	29,239 $\pm$ 0,008	
Phương trình hồi quy	$y = 2,7214x + 8,9142$	$y = 0,4958x - 1,0714$	$y = 2,9208x + 51,459$	$y = 1,2239x + 74,778$	$y = 0,8519x + 18,033$	$y = 0,8524x + 4,515$	
Góc chắn	8,9142	1,0714	51,459	74,778	18,033	4,515	
Độ dốc	2,7214	0,4958	2,9208	1,2239	0,8519	0,8524	
Hệ số tương quan	0,9998	0,9998	0,9934	0,9945	0,9982	0,9982	
RT-Hex ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	66,86	119,62	11,72	-	-	-	
Hàm lượng các anthraquinone trong cao chiết RT-Hex (%)	6,68	11,96	1,72				20,36
RT-EA( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	32,61	111,36	81,57	125,789	168,23	93,989	
Hàm lượng các anthraquinone trong cao chiết RT-EA (%)	3,26	11,13	8,15	12,56	16,82	9,39	61,66
RT-MeOH( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	11,85	31,06	11,25	14,204	20,26	13,745	
Hàm lượng các anthraquinone trong cao chiết RT-MeOH (%)	1,18	3,10	1,12	1,42	2,20	1,37	10,39

### 4.5.3. Phân tích định lượng các hoạt chất trong cao chiết muồng trâu *S. alata* bằng phương pháp HPLC

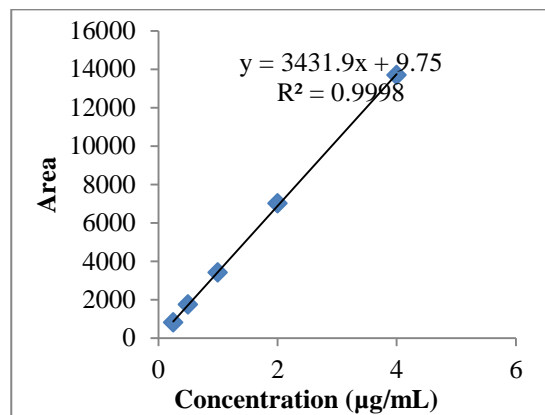
Các hợp chất **SA4** (rhein), **SA5** (aloe-emodin) và **SA6** (aloe-emodin glucoside) và các thành phần trong cao chiết tổng MeOH, cao tinh chế phân đoạn EA1 và cao tinh chế dịch chiết tổng bằng dichloromethane (DCM) được phân tích bằng phương pháp phổ HPLC. Kết quả phân tích HPLC được thể hiện trong phụ lục II.3. Dựa vào số liệu trên sắc kí đồ HPLC (tương quan diện tích pic và nồng độ của chất chuẩn), chúng tôi tiến hành xây dựng đường chuẩn của **SA4** (rhein), **SA5** (aloe-emodin) và **SA6** (aloe-emodin glucoside) được phân lập từ cây muồng trâu *S. alata* như sau:



Đường chuẩn của **SA4** (rhein)



Đường chuẩn của **SA5** (aloe-emodin)



Đường chuẩn của **SA6**

(aloe-emodin glucoside)

Hình 4.33. Đường chuẩn của các chất được tách ra từ cây muồng trâu

Các thông số của **SA4** và **SA5**, **SA6** được biểu diễn trong bảng 4.30.

Bảng 4.30. Một số thông số về **SA4** (rhein), **SA5** (aloe emodin) và **SA6** (aloe-emodin glucoside)

Tham số	<b>SA4</b> (rhein)	<b>SA5</b> (aloe-emodin)	<b>SA6</b> (aloe-emodin glucoside)	Tổng cộng
Thời gian lưu	34,661	30,748	27,177	
Nồng độ giới hạn (mg/mL)	0,25-4 mg/mL	0,5-6 mg/mL	0,5-16	
Phương trình hồi quy	$y = 2287,2x - 81,406$	$y = 2287,2x - 81,406$	$y = 3431,9x + 9,75$	
Góc chắn	81,406	81,406	9,75	
Độ dốc	2287,2	2287,2	3431,9	
Hệ số tương quan	$R^2 = 0.9995$	$R^2 = 0,999$	$R^2 = 0.9998$	
Cao tinh chế DCM	6.38	10.97	32.75	50.10
Cao EA1	5.77	12.51	55.98	74.26
Cao MeOH	0.90	2.40	9.37	12.67

Kết quả phân tích thể hiện: Các cao chiết sau khi tinh chế như cao EA1 đều chứa hàm lượng cao các anthraquinone và glucoside của chúng. Do vậy có thể thấy hiệu lực hoạt tính của cao EA1 cao hơn nhiều so với cao MeOH. Từ các kết quả phân tích như vậy, cao EA1 được lựa chọn để làm thành phần hoạt tính chính cho quá trình phối trộn bào chế chế phẩm BVTV thảo mộc. Khi sử dụng dung môi DCM để chiết phân bố cao MeOH sẽ không thu được hoàn toàn các thành phần anthraquinone và glycoside trong lá cây. Do vậy việc sử dụng EtOAc là hợp lý để tiến hành sản xuất cao chiết hoạt tính.

#### **4. 6. Nghiên cứu quy trình công nghệ tạo cao chiết từ mẫu thực vật**

##### **4.6.1. Nghiên cứu quy trình công nghệ tạo cao chiết dichloromethane từ cây đại hoàng – *R. tanguticum*.**

###### *4.6.1.1. Khảo sát dung môi chiết*

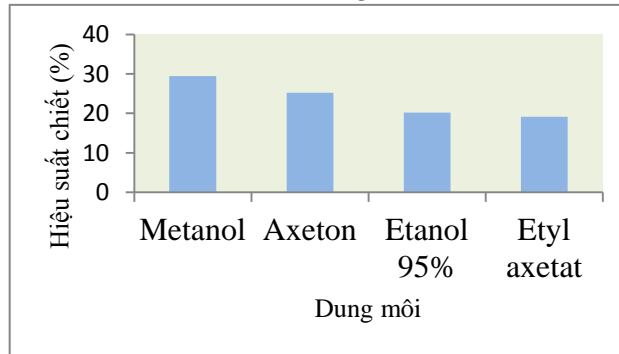
Sau khi ngâm chiết 100 g nguyên liệu đại hoàng (độ ẩm 8%) với các loại dung môi khác nhau: methanol, axeton, etanol 95%, ethyl acetate, tiến hành cô quay các dịch chiết thu được các cao tổng. Kết quả thí nghiệm ảnh hưởng của dung môi tới hiệu suất chiết được thể hiện trong bảng 4.31 và hình 4.34.

Bảng 4.31. Ảnh hưởng của dung môi tới hiệu suất chiết

<b>Dung môi</b>	<b>* Hiệu suất chiết (%)</b>
Methanol	29,4
Acetone	25,2
Etanol 95%	20,2
Ethyl acetate	19,1

\* Hiệu suất chiết được tính theo phần trăm khối lượng nguyên liệu khô





Hình 4.34. Ảnh hưởng của dung môi tới hiệu suất chiết

Dựa vào bảng 4.31 và hình 4.34 hiệu quả chiết khi dùng dung môi methanol là cao nhất đạt 29,4%. Mặt khác, methanol có giá thành rẻ hơn và dễ thu hồi dung môi nên chúng tôi chọn methanol làm dung môi chiết cho quá trình công nghệ này để đạt hiệu quả chiết cao nhất.

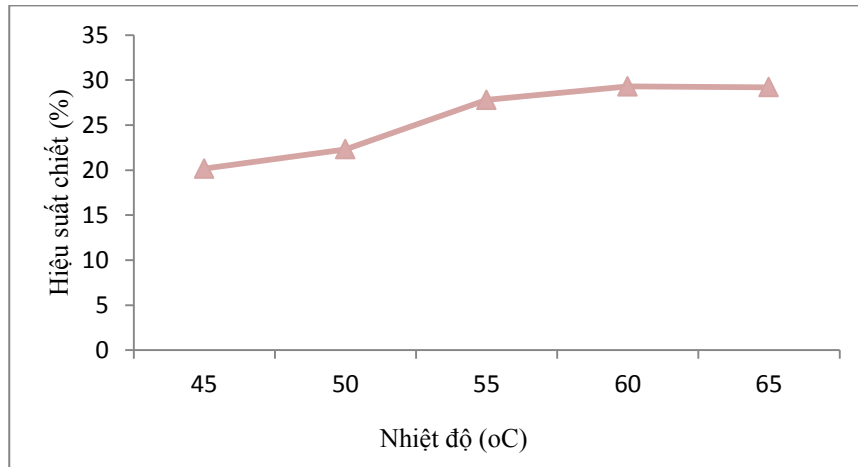
#### 4.6.1.2. Khảo sát nhiệt độ chiết

100 g nguyên liệu đại hoàng (độ ẩm 8%) được ngâm chiết hồi lưu với 240 mL dung môi methanol tại các nhiệt độ khác nhau: 45, 50, 55, 60, 65°C. Quá trình được lặp lại 3 lần. Tiến hành lọc tách bã với dịch chiết, cô quay đuổi dung môi thu được các cao chiết tổng. Kết quả thí nghiệm được thể hiện cụ thể trong bảng 4.32 và hình 4.35.

Bảng 4.32. Ảnh hưởng của nhiệt độ tới hiệu suất chiết

Nhiệt độ (°C)	* Hiệu suất chiết (%)
45 °C	20,15
50 °C	22,3
55 °C	25,8
60 °C	27,28
65 °C	29,4

\* Hiệu suất chiết được tính theo phần trăm khối lượng nguyên liệu khô



Hình 4.35. Ảnh hưởng của nhiệt độ tới hiệu suất chiết

Dựa vào bảng 4.32 và hình 4.35 cho thấy nhiệt độ càng cao làm tăng hiệu suất chiết. Cụ thể hiệu quả chiết tăng dần theo các mức nhiệt độ 45, 50, 55, 60, 65°C với các giá trị tương ứng 20,15; 22,3; 25,8; 27,28; 29,4%. Tại nhiệt độ 65°C hiệu suất đạt cao nhất. Vì vậy, nhiệt độ thích hợp để chiết cao chiết là nhiệt độ 65°C (tại nhiệt độ sôi của dung môi methanol).

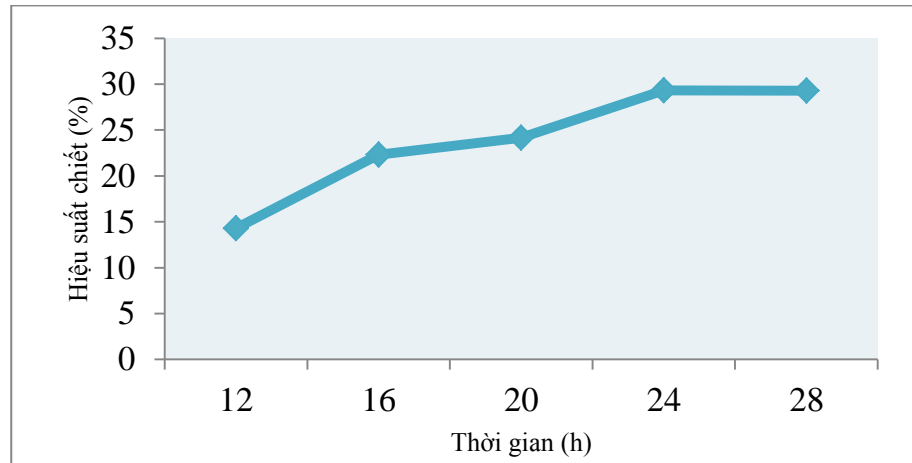
#### 4.6.1.3. Khảo sát thời gian chiết

Chúng tôi tiến hành ngâm chiết hồi lưu 100 g nguyên liệu đại hoàng (độ ẩm 8%) với 240 mL dung môi methanol tại nhiệt độ 65°C và thay đổi thời gian chiết, cụ thể 12h, 16h, 20h, 24h, 28h. Quá trình chiết được lặp lại 3 lần. Gộp các dịch chiết và cô quay đuổi dung môi thu được các cao tổng. Hiệu suất chiết được thể hiện cụ thể trong bảng 4.33 và hình 4.36

Bảng 4.33. Ảnh hưởng của thời gian tới hiệu suất chiết

Thời gian (h)	*Hiệu suất chiết (%)
12	14,28
16	22,30
20	24,15
24	29,4
28	29,29

\* Hiệu suất chiết tính theo phần trăm khối lượng nguyên liệu khô



Hình 4.36. Ảnh hưởng của thời gian tới hiệu suất chiết

Thời gian chiết phụ thuộc vào các yếu tố: dung môi, nhiệt độ, tỉ lệ dung môi/ nguyên liệu. Thời gian chiết càng dài thì hiệu quả chiết càng cao. Dựa trên cơ sở hình 4.4 có thể thấy khi mẫu nguyên liệu được chiết ở thời điểm 24 h và 28 h thì hiệu quả chiết thay đổi không đáng kể. Vì vậy, tổng thời gian chiết thích hợp qua 3 lần chiết là 24 h.

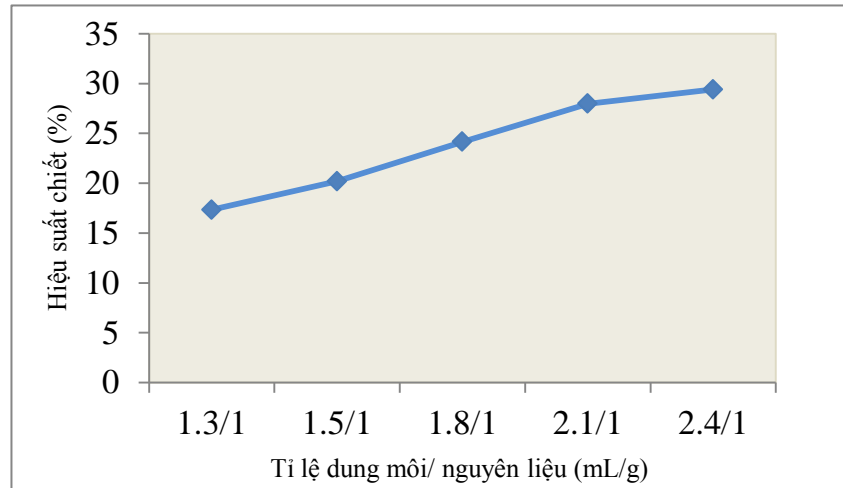
#### 4.6.1.4. Khảo sát tỉ lệ dung môi/nguyên liệu (mL/g)

Lượng nguyên liệu đại hoàng (100 g, độ ẩm 8%) được ngâm chiết hồi lưu với dung môi methanol tại nhiệt độ 65°C và thay đổi lượng tỉ lệ dung môi/ nguyên liệu (w/m) tại các giá trị khác nhau: 1,3/1; 1,5/1; 1,8/1; 2,1/1; 2,4/1. Thời gian mỗi lần chiết kéo dài 8h, sau đó tiến hành lọc tách bã với dịch chiết. Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Số liệu được lấy trung bình đối với 3 mẫu thí nghiệm.

Bảng 4.34. Ảnh hưởng của tỉ lệ dung môi/nguyên liệu (mL/g) tới hiệu suất chiết

Tỉ lệ dung môi/ nguyên liệu (mL/g)	*Hiệu suất chiết (%)
1,3/1	17,34
1,5/1	20,19
1,8/1	24,15
2,1/1	27,98
2,4/1	29,4

\* Hiệu suất chiết tính theo phần trăm khối lượng nguyên liệu khô



Hình 4.37. Ảnh hưởng của tỉ lệ dung môi/nguyên liệu (mL/g) tới hiệu suất chiết

Dựa trên bảng 4.34 và hình 4.37, hiệu suất chiết có xu hướng tăng dần theo lượng tăng của dung môi sử dụng và đạt hiệu quả cao nhất ở tỉ lệ dung môi/nguyên liệu 2,4/1. Khi gia nhiệt ở nhiệt độ 65°C, dung môi methanol thẩm thấu vào trong các tế bào, làm phá vỡ các liên kết. Nếu lượng methanol quá ít thì không đủ hòa tan các chất dẫn tới hiệu suất thấp. Sử dụng càng nhiều dung môi methanol thì khả năng khuếch tán của các cấu tử vào dung môi càng lớn. Tuy nhiên, ở một giới hạn nhất định, hiệu suất thu hồi sẽ tăng lên không đáng kể mặc dù lượng dung môi tăng. Trong thí nghiệm này, chúng tôi chọn tỉ lệ dung môi/nguyên liệu 2,4/1 để hiệu suất chiết đạt kết quả tối ưu.

#### 4.6.1.5. Tối ưu hóa các điều kiện công nghệ tạo cao chiết dichloromethane đại hoàng theo quy hoạch thực nghiệm

Quá trình tối ưu hóa tìm cực trị của hàm được tiến hành trên cơ sở sử dụng phần mềm chuyên dụng Moddle 5.0 để xác định kết quả tối ưu và có thể biểu diễn được bề mặt đáp ứng của hàm mục tiêu trong vùng khảo sát. Mức độ phù hợp của các kết quả tính toán được kiểm chứng lại bằng kết quả so sánh với thực nghiệm.

Bảng 4.35. Kết quả thí nghiệm theo ma trận của quy hoạch thực nghiệm kế hoạch bậc hai Box-Behnken

	Nhiệt độ °C	Thời gian (h)	Tỉ lệ	Hiệu suất chiết (%)
<b>1</b>	55	16	2.1	22.8

2	65	16	2.1	24.9
3	55	24	2.1	26.7
4	65	24	2.1	30.3
5	55	20	1.8	22.8
6	65	20	1.8	25.6
7	55	20	2.4	27.4
8	65	20	2.4	29.7
9	60	16	1.8	21.6
10	60	24	1.8	26.1
11	60	16	2.4	24.5
12	60	24	2.4	30.2
13	60	20	2.1	29.1
14	60	20	2.1	29.5
15	60	20	2.1	29.3

Mô hình toán học mô tả mối quan hệ giữa hàm mục tiêu (hiệu suất chiết cây đại hoàng) và các biến mã (nhiệt độ chiết, thời gian chiết, tỉ lệ dung môi/nguyên liệu) được biểu diễn bằng phương trình biến mã như nhau:

$$Y=29.3+1.35x_1+2.4375x_2+1.9625x_3-1.175x_1^2-1.95x_2^2-1.75x_3^2+0.374x_1x_2-0.125x_2x_3+0.300x_1x_3$$

Trong vùng khảo sát, phương trình hồi quy cho thấy hiệu suất chiết chịu ảnh hưởng bậc 1, bậc 2 của 3 nhân tố nhiệt độ chiết, thời gian chiết, tỉ lệ dung môi/nguyên liệu. Trong đó, nhân tố nhiệt độ chiết, thời gian chiết, tỉ lệ dung môi/nguyên liệu ảnh hưởng tuyến tính (ảnh hưởng đồng biến) và lớn nhất đến hiệu suất chiết ( $x_1 < x_3 < x_2$ ). Các yếu tố bậc 2 (yếu tố bình phương) ảnh hưởng tương tác âm (ảnh hưởng nghịch biến) đến hiệu suất chiết và đồng thời chịu ảnh hưởng của (các cặp nhân tố chập đôi) các cặp nhân tố nhiệt độ

chiết\*thời gian chiết; nhiệt độ chiết \*tỉ lệ dung môi/nguyên liệu; thời gian chiết\*tỉ lệ dung môi/nguyên liệu.

Các giá trị F = 113.996 (có ý nghĩa) và Lack of fit: 4.22 (không ý nghĩa) khẳng định sự tương thích của mô hình với điều kiện tiến hành khảo sát thí nghiệm. Các giá trị R<sup>2</sup>=0.995 và R<sup>2</sup> Adj.= 0.986 và Q<sup>2</sup>=0.931 khẳng định trên 99% các biến số được phản ánh bởi mô hình bề mặt đáp ứng miêu tả quá trình chiết cây đại hoàng.

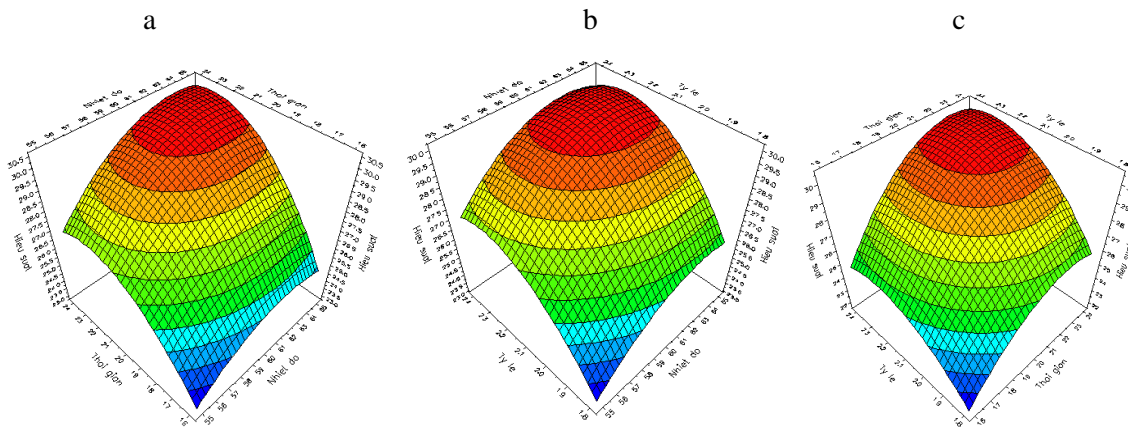
Bảng 4.36. Sự tương thích của mô hình đối với các điều kiện khảo sát tạo cao chiết đại hoàng

Hieu suat	DF	SS	MS	F	p	SD
			(variance)			
<b>Total</b>	15	10814.5	720.966			
<b>Constant</b>	1	10693.4	10693.4			
<b>Total Corrected</b>	14	121.139	8.65276			2.94156
<b>Regression</b>	9	120.551	13.3946	113.996	0	3.65986
<b>Residual</b>	5	0.5875	0.1175			0.342783
<b>Lack of Fit</b>	3	0.5075	0.169167	4.22916	0.197	0.411299
<b>(Model Error)</b>						
<b>Pure Error</b>	2	0.08	0.04			0.2
<b>(Replicate Error)</b>						
<b>N = 15</b>	Q2 =	0.931	Cond. no. =	4.2385		
<b>DF = 5</b>	R2 =	0.995	Y-miss =	0		
	R2 Adj. =	0.986	RSD =	0.3428		

Bảng 4.37. Các hệ số có nghĩa trong phương trình biến thực

Hieu suat	Coeff. SC	Std. Err.	P	Conf. int(±)
<b>Constant</b>	29.3	0.197906	2.67E-10	0.508734
<b>T</b>	1.35	0.121192	0.000102	0.311535

<b>H</b>	2.4375	0.121192	5.62E-06	0.311535
<b>R</b>	1.9625	0.121192	1.64E-05	0.311535
<b>T*T</b>	-1.175	0.17839	0.001211	0.458567
<b>H*H</b>	-1.95	0.17839	0.000111	0.458567
<b>R*R</b>	-1.75	0.17839	0.000187	0.458567
<b>T*H</b>	0.374995	0.171391	0.080304	0.440577
<b>T*R</b>	-0.125001	0.171391	0.498518	0.440576
<b>H*R</b>	0.300001	0.171391	0.140453	0.440577
<b>N = 15</b>	Q2 =	0.931	Cond. no. =	4.2385
<b>DF = 5</b>	R2 =	0.995	Y-miss =	0
	R2 Adj. =	0.986	RSD =	0.3428
			Conf. lev. =	0.95



Hình 4.38. Các bề mặt đáp ứng biểu diễn tương quan các thông số công nghệ với quá trình chiết cây đại hoàng

a: Tương quan giữa thời gian chiết và nhiệt độ chiết; b: Tương quan giữa tỉ lệ dung môi/nguyên liệu và nhiệt độ; c: Tương quan giữa tỉ lệ dung môi/nguyên liệu và thời gian

#### 4.6.1.6. Tối ưu hóa thực nghiệm

Tiến hành tối ưu hóa thực nghiệm đối với các yếu tố nhiệt độ, thời gian, tỉ lệ dung môi methanol /nguyên liệu để thu được hiệu suất chiết cao nhất, kết quả thể hiện trong bảng 4.38

Tại nhiệt độ 65°C, thời gian chiết 24 h và tỉ lệ dung môi/nguyên liệu là 2.4 là điều kiện tối ưu, khi đó hiệu suất của quá trình chiết tạo cao MeOH cây đại hoàng là cao nhất, đạt 30.7 %.

Bảng 4.38. Bảng kết quả tối ưu

	Nhiệt độ chiết (°C)	Thời gian chiết (h)	Tỉ lệ dung môi / nguyên liệu (ml/g)	Hiệu suất chiết (%)
1	63.3094	22.915	2.282	31.2293
2	63.313	22.9036	2.2784	31.2293
3	63.2614	22.9565	2.282	31.2293
4	65	24	2.4	30.725
5	60.5	22.4	2.16	30.5622
6	65	24	2.22	30.9125
7	65	21.6	2.4	30.4955
8	62	24	2.4	30.752

4.6.1.7. Kiểm tra lại mô hình tối ưu hóa ứng với các giá trị của thông số tại điểm tối ưu

Thực nghiệm quá trình chiết được tiến hành với 3 mẻ chiết tại điều kiện tối ưu. Nguyên liệu đại hoàng được ngâm chiết tại nhiệt độ 65°C, thời gian chiết 24h, tỉ lệ dung môi/nguyên liệu 2.4. Hiệu suất quá trình chiết cây đại hoàng đạt 29.52%. Như vậy, các dữ liệu thực nghiệm đã phản ánh tính hợp lý và chính xác của mô hình thực nghiệm.

STT	Thời gian	Nhiệt độ	Tỉ lệ dung môi/nguyên liệu	Hiệu suất (%)
1	24 h	65°C	2.4	29.20
2	24 h	65°C	2.4	29.80
3	24 h	65°C	2.4	29.55
	Hiệu suất trung bình			29.52

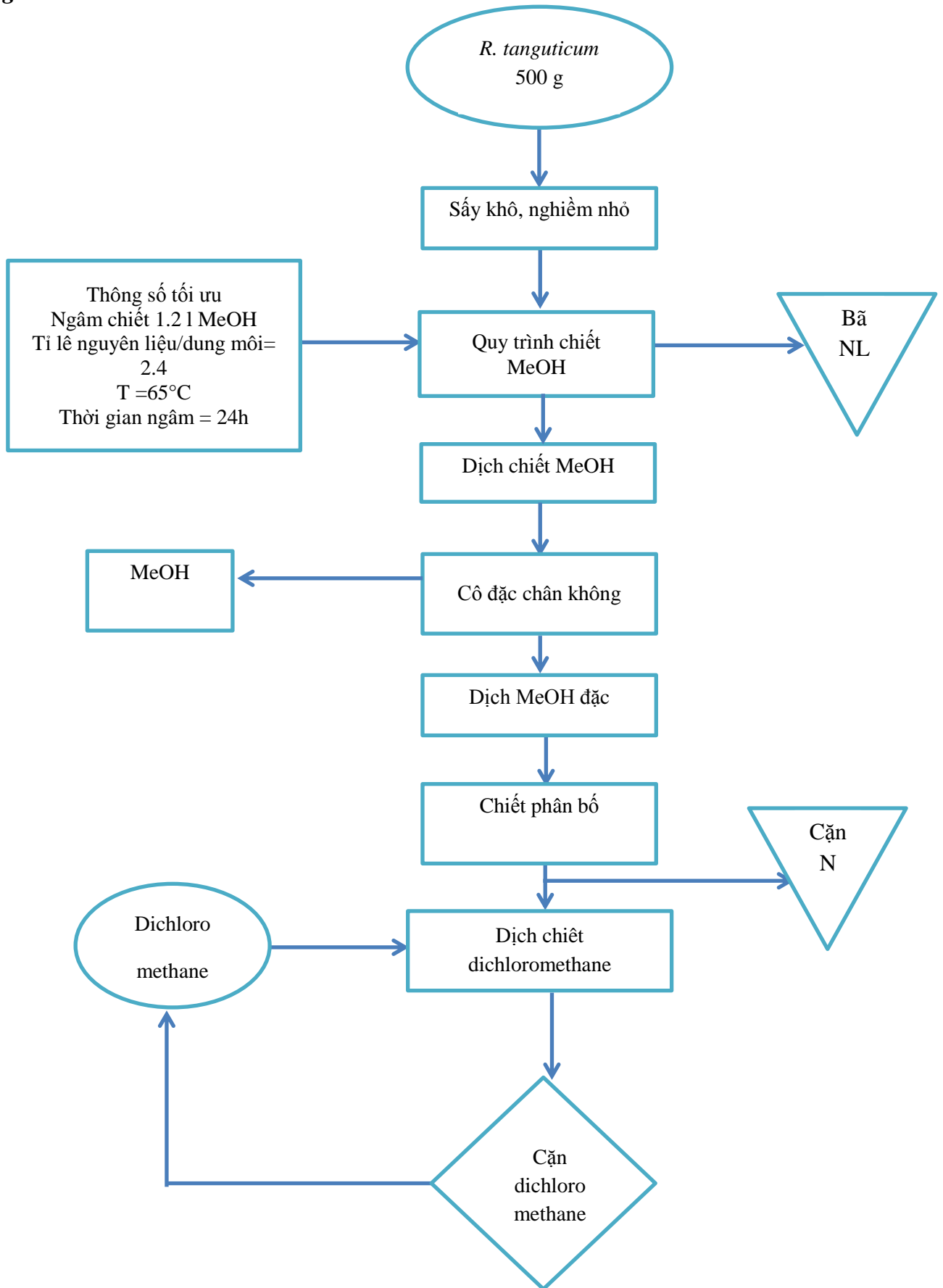
4.6.1.8. Thuyết minh quy trình công nghệ tạo cao chiết dichloromethane cây đại hoàng – *R. tanguticum*

500 g nguyên liệu bột *R. tanguticum* sau khi được sấy khô đem nghiền mịn được cho vào bình thủy tinh dung tích 5 lít. Bổ sung vào bình 1.2 lít dung môi methanol. Bình thủy tinh



được đập nát nhám và để trong bể nước nóng ở  $T^{\circ}\text{C} = 65^{\circ}\text{C}$  trong thời gian 24h. Sau đó dịch ngâm chiết được lọc qua vải lọc thu bã nguyên liệu và dịch chiết methanol tổng. Dịch chiết này được đem cô quay thu hồi dung môi methanol cho lần chiết khác và  $m = 146.50$  (g) cao chiết methanol tổng. Phần cao chiết methanol tổng được hoàn tan trong nước và chiết phân bố với dung môi diclo methane cho cao chiết dichloromethane giàu hoạt chất anthraquinone.

4.6.2. Quy trình công nghệ tạo cao chiết dichloromethane cây đại hoàng – *R. tanguticum*



### 4.6.3. Nghiên cứu quy trình công nghệ tạo cao chiết ethyl acetate từ cây muồng trâu *S. alata*

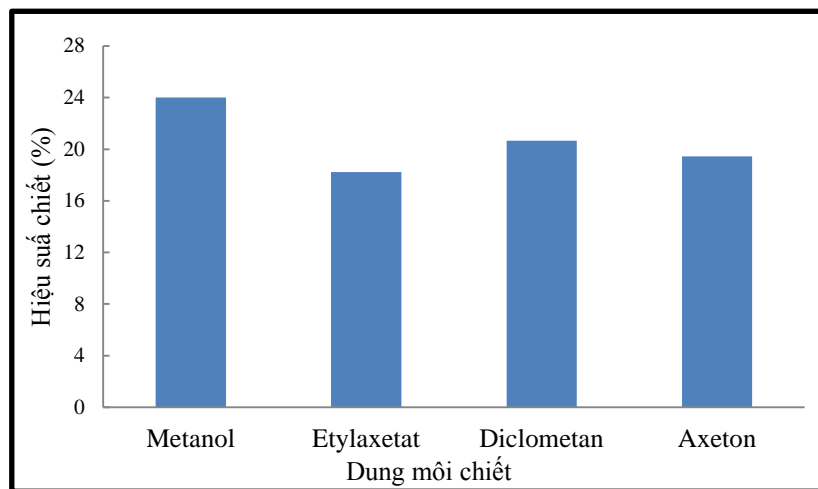
#### 4.6.3.1. Khảo sát dung môi chiết

Kết quả khảo sát ảnh hưởng của dung môi chiết tới hiệu suất chiết nguyên liệu khô của quá trình chiết lá muồng trâu được thể hiện trong bảng 4.39 và hình 4.39

Bảng 4.39. Ảnh hưởng của loại dung môi chiết

Dung môi	Khối lượng cao tổng (g)	*Hiệu suất chiết (%)
Methanol	24,01	24,01
Ethyl acetate	18,24	18,24
Dichloromethane	20,67	20,67
Acetone	19,45	19,45

\*Hiệu suất chiết tính theo phần trăm khối lượng nguyên liệu khô



Hình 4.39. Biểu đồ ảnh hưởng của các dung môi chiết

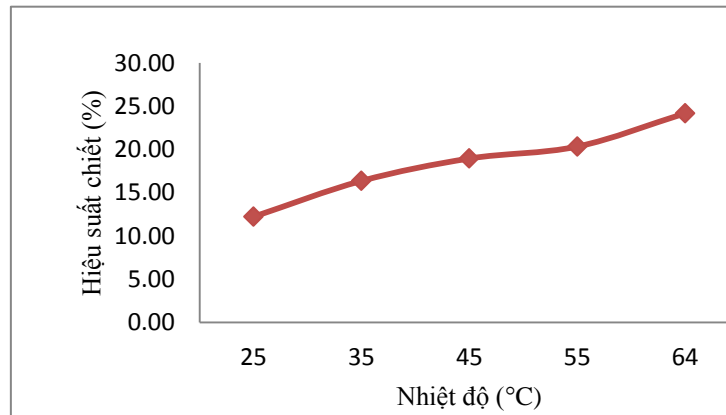
Trên cơ sở bảng 4.39, hiệu quả chiết khi dùng dung môi MeOH là cao nhất ở mức 24,01%. Mặt khác, methanol có giá thành rẻ hơn nên chọn methanol làm dung môi chiết cho quá trình công nghệ này.

#### 4.6.3.2. Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ chiết

Kết quả khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ chiết tới hiệu suất của quá trình chiết lá muồng trâu được thể hiện trong bảng 4.40 và hình 4.40.

Bảng 4.40. Khảo sát nhiệt độ chiết tới hiệu suất chiết cao muồng trâu

Nhiệt độ chiết (°C)	25	35	45	55	<b>64</b>
Hiệu suất (%)	12,21	16,35	18,94	20,32	<b>24,17</b>



Hình 4.40. Biểu đồ ảnh hưởng của nhiệt độ chiết

Từ biểu đồ đã cho ta thấy, nhiệt độ càng tăng dần tới nhiệt độ sôi của dung môi thì khối lượng cao tổng thu được càng nhiều. Do đó, chúng tôi lựa chọn chiết tại nhiệt độ sôi của dung môi (64°C) là nhiệt độ chiết tối ưu.

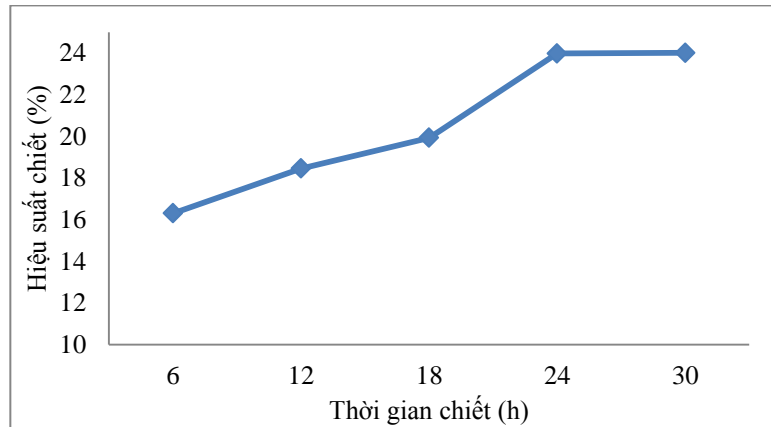
#### 4.6.3.3. Khảo sát ảnh hưởng của thời gian chiết

Kết quả nghiên cứu sự ảnh hưởng của thời gian chiết tới hiệu suất của quá trình chiết là muồng trâu được biểu diễn cụ thể trong bảng 4.41 và hình 4.41.

Bảng 4.41. Ảnh hưởng của thời gian chiết tới hiệu suất chiết cao tổng

<b>Thời gian chiết (giờ)</b>	6h	12h	18h	<b>24h</b>	30h
<b>Hiệu suất chiết (%)</b>	16,31	18,46	19,93	<b>23,98</b>	24,01

*Hiệu suất chiết: Tính theo % nguyên liệu khô; thời gian chiết là tổng thời gian của 3 lần chiết*



Hình 4.41. Đồ thị ảnh hưởng của thời gian chiết tới hiệu suất chiết

Các kết quả cho thấy thời gian chiết tăng dần thì lượng cao tổng cũng tăng dần nhưng từ 24h trở đi có sự tăng nhẹ không đáng kể. Vì vậy lựa chọn thời gian chiết là 24 h mang lại hiệu quả cao.

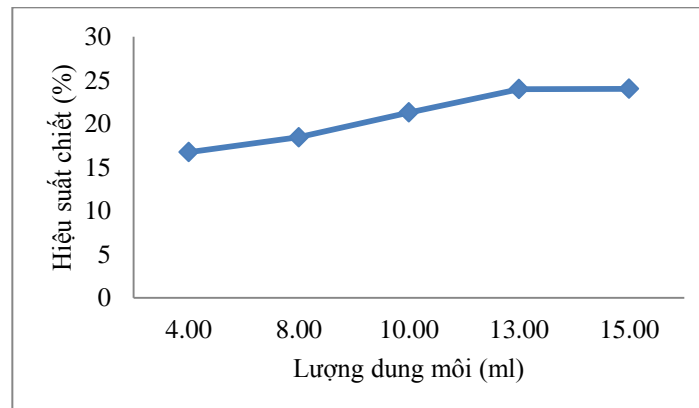
#### 4.6.3.4. Khảo sát ảnh hưởng của tỉ lệ dung môi/ nguyên liệu

Kết quả khảo sát sự ảnh hưởng của tỉ lệ dung môi methanol/ nguyên liệu tới hiệu suất quá trình chiết là Muồng trâu được thể hiện ở bảng 4.42 và hình 4.42.

Bảng 4.42. Ảnh hưởng của tỉ lệ dung môi/nguyên liệu

Tỉ lệ dung môi/ nguyên liệu (mL/g)	4/1	8/1	10/1	<b>13/1</b>	15/1
Hiệu suất chiết (%)	16,73	18,45	21,29	<b>23,97</b>	24,01

\*Hiệu suất chiết: Tính theo % nguyên liệu khô; tỉ lệ dung môi/nguyên liệu là tổng tỉ lệ dung môi của 3 lần chiết



Hình 4.42. Đồ thị ảnh hưởng của lượng dung môi đến quá trình chiết

Từ bảng số liệu thu được ta nhận thấy, tỉ lệ thích hợp cho quá trình chiết cao tổng bằng dung môi methanol là 13/1.

Nếu lượng dung môi sử dụng nhỏ hơn sẽ không thể chiết hết phần chất mang hoạt tính có trong nguyên liệu. Nếu dùng lượng dung môi quá nhiều thì sản phẩm thu được không thay đổi so với dùng lượng dung môi hợp lý cho khối lượng nguyên liệu cần chiết vì hàm lượng của các thành phần mang hoạt tính là xác định.

#### 4.6.3.5. Tối ưu hóa các điều kiện công nghệ tạo cao chiết MeOH muồng trâu theo quy hoạch thực nghiệm

Hàm mục tiêu Y thể hiện hiệu suất chiết của lá Muồng trâu với dung môi methanol. Bảng 4.43 thể hiện kết quả nghiên cứu của quá trình chiết nguyên liệu lá muồng trâu thực hiện theo phương pháp bố trí ma trận thực nghiệm kế hoạch bậc hai. Theo ma trận được lập, thông số được khảo sát nhiệt độ, thời gian, tỉ lệ dung môi/ nguyên liệu là các biến độc lập X1, X2, X3.

Bảng 4.43. Kết quả thí nghiệm theo ma trận của quy hoạch thực nghiệm kế hoạch bậc hai Box-Behnken

	Nhiệt độ °C	Thời gian (h)	Tỉ lệ	Hiệu suất chiết (%)
1	35	12	10.5	13.23
2	64	12	10.5	21.32
3	35	24	10.5	18.51
4	64	24	10.5	23.71
5	35	18	6	8.32
6	64	18	6	12.5
7	35	18	15	18.51
8	64	18	15	24.42
9	49.5	12	6	9.53

10	49.5	24	6	12.61
11	49.5	12	15	24.22
12	49.5	24	15	24.65
13	49.5	18	10.5	22.73
14	49.5	18	10.5	23.11
15	49.5	18	10.5	23.52

Bảng 4.44. Sự tương thích của mô hình đối với các điều kiện khảo sát tạo cao chiết muồng trâu

<b>Cao chiết</b>	<b>DF</b>	<b>SS</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>p</b>	<b>SD</b>
			(variance)			
<b>Total</b>	15	5746.77	383.118			
<b>Constant</b>	1	5259.95	5259.95			
<b>Total Corrected</b>	14	486.821	34.7729			5.89686
<b>Regression</b>	9	480.398	53.3775	41.5489	0.000	7.30599
<b>Residual</b>	5	6.42347	1.28469			1.13344
<b>Lack of Fit (Model Error)</b>	3	6.11126	2.03709	13.0499	0.072	1.42727

<b>Pure Error</b>	2	0.312201	0.1561			0.395096
<b>(Replicate Error)</b>						
<b>N = 11</b>						
<b>DF = 4</b>	Q2 =	0.798	Cond. no. =	4.2385		
	R2 =	0.987	Y-miss =	0		

Bảng 4.45. Các hệ số có nghĩa trong phương trình biến thực

<b>Hieu suat</b>	<b>Coeff. SC</b>	<b>Std. Err.</b>	<b>P</b>	<b>Conf. int(±)</b>
<b>Constant</b>	23.12	0.654393	3.41853e-007	1.68218
<b>T</b>	2.9225	0.400733	0.000758697	1.03012
<b>H</b>	1.3975	0.400733	0.0175198	1.03012
<b>R</b>	6.105	0.400733	2.20956e-005	1.03012
<b>T*T</b>	-2.87125	0.589862	0.00460226	1.51629
<b>H*H</b>	-1.05625	0.589862	0.133349	1.51629
<b>R*R</b>	-4.31125	0.589862	0.000751028	1.51629
<b>T*H</b>	-0.722503	0.566722	0.25838	1.45681
<b>T*R</b>	0.4325	0.566722	0.479806	1.45681
<b>H*R</b>	-0.662499	0.566722	0.295097	1.45681
<b>N = 15</b>	Q2 =	0.798	Cond. no. =	4.2385
<b>DF = 5</b>	R2 =	0.987	Y-miss =	0
	R2 Adj. =	0.963	RSD =	1.1334
			Conf. lev. =	0.95

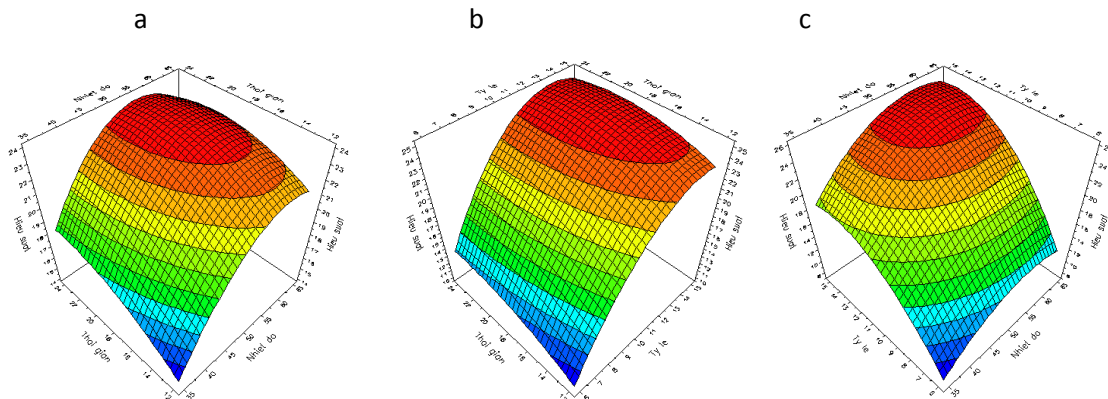


Mô hình toán học mô tả mối quan hệ giữa hàm mục tiêu (hiệu suất chiết lá Muồng trâu khô) và các biến mã (nhiệt độ chiết, thời gian chiết, tỉ lệ dung môi/ nguyên liệu) được biểu diễn bằng phương trình biến mã như sau:

$$Y=23.12+2.92x_1+1.39x_2+6.10x_3-2.87x_1^2-1.05x_2^2-4.31x_3^2-0.72x_1x_2+0.43x_2x_3-0.66x_1x_3$$

Trong vùng khảo sát, phương trình hồi quy cho thấy hiệu suất chiết chịu ảnh hưởng bậc 1, bậc 2 của 3 nhân tố nhiệt độ chiết, thời gian chiết, tỉ lệ dung môi/ nguyên liệu và chịu ảnh hưởng đồng thời của các cặp nhân tố nhiệt độ chiết\*thời gian chiết; nhiệt độ chiết\*tỉ lệ dung môi/ nguyên liệu; thời gian chiết\*tỉ lệ dung môi/ nguyên liệu.

Các giá trị F = 41,54 (có ý nghĩa) và Lack of fit: 13,04 (không ý nghĩa) khẳng định sự tương thích của mô hình với điều kiện tiến hành khảo sát thí nghiệm. Các giá trị R<sup>2</sup>=0,987 và R<sup>2</sup> Adj.= 0,963 và Q<sup>2</sup>=0,798 khẳng định trên 98.7% các biến số được phản ánh bởi mô hình bề mặt đáp ứng miêu tả quá trình chiết muồng trâu.



Hình 4.43. Các bề mặt đáp ứng biểu diễn tương quan các thông số công nghệ với quá trình chiết muồng trâu

*a: Tương quan giữa thời gian chiết và nhiệt độ chiết; b: Tương quan giữa thời gian và tỉ lệ dung môi/ nguyên liệu; c: Tương quan giữa nhiệt độ và tỉ lệ dung môi/ nguyên liệu*

Từ đồ thị a nhận thấy, khi thời gian chiết tăng dần tới 19.5 h và nhiệt độ chiết tới 57°C thì hiệu suất chiết tăng dần. Từ đồ thị b cho thấy khi thời gian tăng dần tới 19.5 h và tỉ lệ dung môi/ nguyên liệu tăng tới 13.7/1 thì hiệu suất chiết tăng và đạt cực đại. Tương tự, theo đồ thị c, nhiệt độ tăng tới 57°C và tỉ lệ dung môi/ nguyên liệu tăng dần tới 13.7/1 thì hiệu suất chiết tăng dần và không thay đổi nhiều khi tiếp tục tăng nhiệt độ và tỉ lệ dung môi/

nguyên liệu. Như vậy, hiệu suất quá trình chiết đạt tối ưu tại nhiệt độ 57° C, thời gian 19.5h và tỉ lệ dung môi/ nguyên liệu là 13.7/1.

#### 4.6.3.6. Tối ưu hóa thực nghiệm

Tiến hành tối ưu hóa thực nghiệm đối với các yếu tố nhiệt độ, thời gian, tỉ lệ dung môi methanol / nguyên liệu để thu được hiệu suất chiết cao nhất, kết quả thể hiện trong bảng 4.5.2.8

Tại nhiệt độ 57° C, thời gian chiết 19.5 h và tỉ lệ dung môi /nguyên liệu là 13.7/1 là điều kiện tối ưu, khi đó hiệu suất của quá trình chiết lá muồng là cao nhất, đạt 26.2565 %.

Bảng 4.46. Bảng kết quả tối ưu

	Nhiệt độ chiết (°C)	Thời gian chiết (h)	Tỉ lệ dung môi / nguyên liệu (ml/g)	Hiệu suất chiết (%)
<b>1</b>	57.287	19.479	13.7377	26.2564
<b>2</b>	<b>57.1252</b>	<b>19.5195</b>	<b>13.7028</b>	<b>26.2565</b>
<b>3</b>	57.2259	19.6012	13.7088	26.2564
4	58.2	22.8	14.1	25.8435
<b>5</b>	52.4	18.6	13.2	25.8275
<b>6</b>	58.2	18	15	25.8931
<b>7</b>	55.3	22.8	14.1	25.8796
<b>8</b>	52.4	18.6	13.2	25.8275

Như vậy điểm tối ưu được xác định là:

Thời gian chiết: 19.5 h;

Tỉ lệ dung môi methanol /nguyên liệu: 13.7/1;

Nhiệt độ chiết: 57°C

Thời gian chiết được tính bằng tổng thời gian chiết đối với mỗi mẻ chiết (3 mẻ).

4.6.3.7. Kiểm tra lại mô hình tối ưu hóa ứng với các giá trị của thông số tại điểm tối ưu

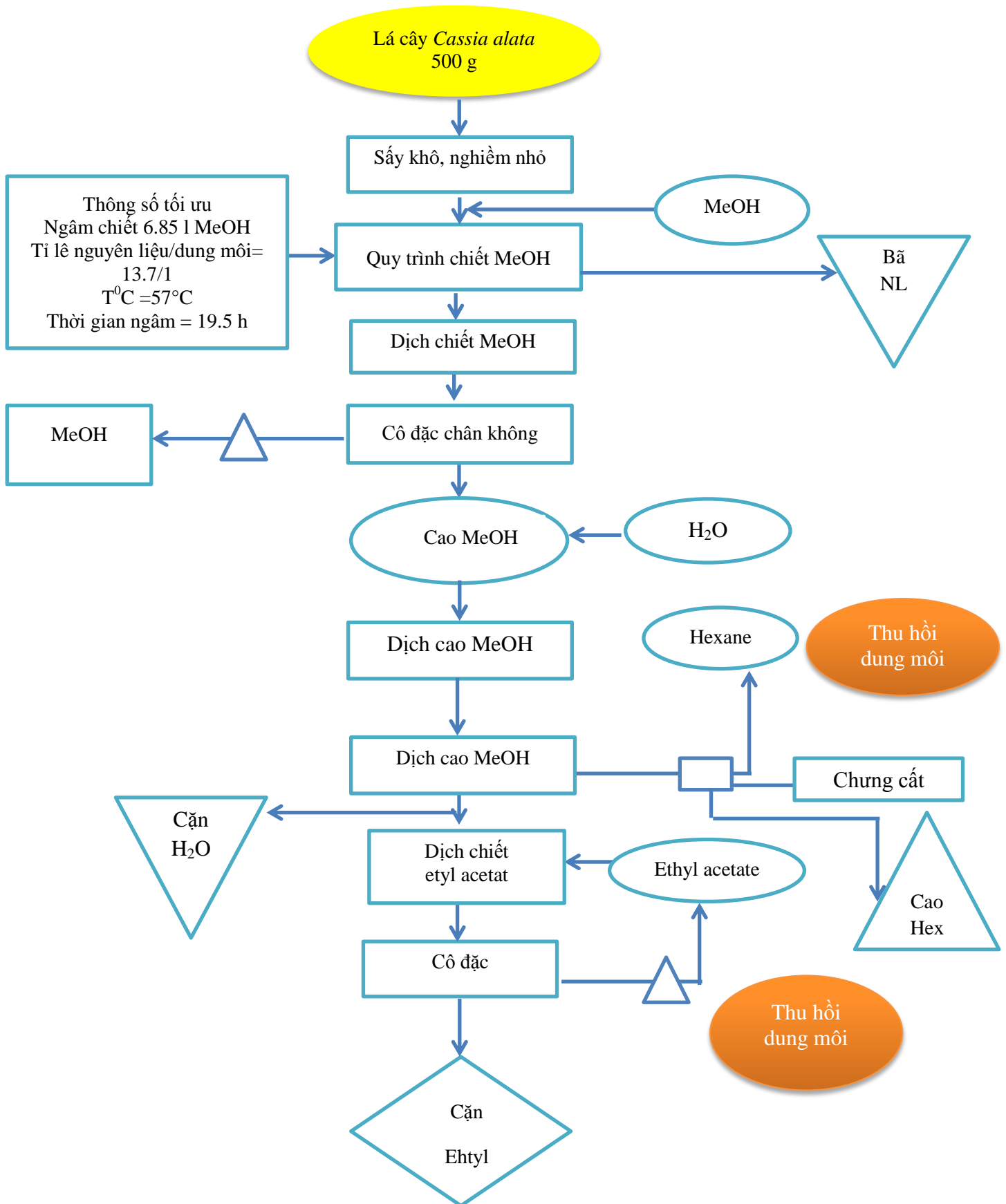
STT	Thời gian	Nhiệt độ	Tỉ lệ dung môi/nguyên liệu (ml/g)	Hiệu suất (%)
1	19.5 h	57° C	13.7/1	25,02
2	19.5 h	57° C	13.7/1	25,32
3	19.5 h	57° C	13.7/1	25.43
Hiệu suất trung bình				25,25

4.6.3.8. Thuyết minh quy trình công nghệ tạo cao chiết ethyl acetate cây muồng trâu

*S.alata*

500 g nguyên liệu bột lá cây *S. alata* sau khi được sấy khô đem nghiền mịn được cho vào bình thủy tinh dung tích 10 lít. Bổ sung vào bình 6.85 lít dung môi methanol. Bình thủy tinh được đậy nút nhám và để trong bể nước nóng ở  $T^{\circ}\text{C} = 57^{\circ}\text{C}$  trong thời gian 19.5 h. Sau đó dịch ngâm chiết được lọc qua vải lọc thu bã nguyên liệu và dịch chiết methanol tổng. Dịch chiết này được đem cô quay thu hồi dung môi methanol cho lần chiết khác và  $m = 126.25$  (g) cao chiết methanol tổng. Phần cao chiết methanol tổng được hoàn tan trong nước và chiết phân bố theo độ phân cực tăng dần với các dung môi n-hexane, ethyl acetate cho cao chiết ethyl acetate giàu hoạt chất anthraquinone và flavol.

4.6.4. Quy trình công nghệ tạo cao chiết ethyl acetate cây muồng trâu *S.alata*



## KẾT LUẬN

Luận án đã thực hiện được những kết quả bao gồm:

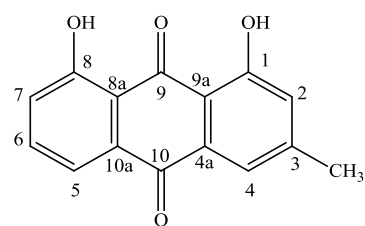
### 1. Nghiên cứu thành phần hóa học

- Phân lập và xác định cấu trúc của 7 hợp chất gồm 4 anthraquinone gồm: **DH1** (chrysophanol), **DH2** (physcion), **DH3** (emodin), **DH4** (alo-emodin), 2 stilbene: **DH5** (rhapotigenin), **DH6** (deoxyrhapotigenin) từ cặn dichloromethane và 1 hỗn hợp 2 stilbene **DH7** (rhaponticin và isorhapontin) từ cặn ethyl acetate củ cây đại hoàng *R. tanguticum*.

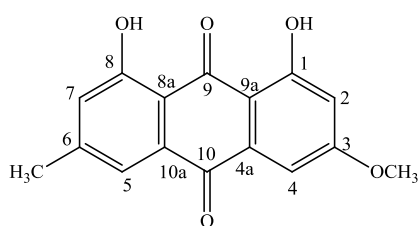
- Phân lập và xác định cấu trúc của 7 hợp chất gồm 3 anthraquinone gồm: **RT1** (chrysophanol), **RT2** (physcion), **RT3** (emodin), 2 hợp chất sterol gồm: **RT6** ( $\beta$ -sitosterol), **RT7** (daucosterol) từ cặn n-hexane và 2 anthraquinone glycoiside gồm: **RT4** (emodin-8-*O*- $\beta$ -D-glucoside), và 1 hỗn hợp anthraquinone glycoiside **RT5** 2 chất (chrysophanol -8-*O*- $\beta$ -D-glucoside và physcion -8-*O*- $\beta$ -D-glucoside) từ cặn ethyl acetate của cây lưỡi bò *R. trisetifer*.

- Phân lập và xác định cấu trúc của 8 hợp chất gồm 2 anthraquinone **SA4** (rhein), **SA5** (aloe-emodin) và 1 anthraquinone glycoiside **SA6** (aloe-emodin-8-*O*-glucoside) 3 hợp chất phenol gồm **SA1** (methyl 2,4,6-trihydroxybenzoate), **SA2** (kaempferol), **SA3** (-) epiafzelechin) và 2 hợp chất phenolic glycoside **SA7** (kaempferol-3-*O*-glucoside), **SA8** (kaempferol-3-*O*-gentiobioside) từ cặn ethyl acetate của cây muồng trâu - *S. alata*.

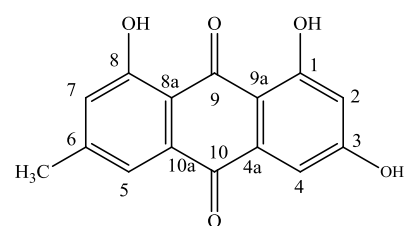
Các chất phân lập được từ cây đại hoàng - *R. tanguticum*



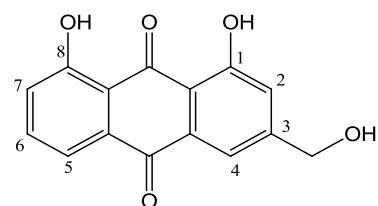
**DH1** (chrysophanol)



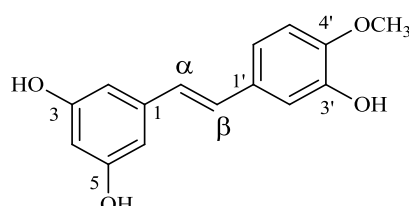
**DH2** (physcion)



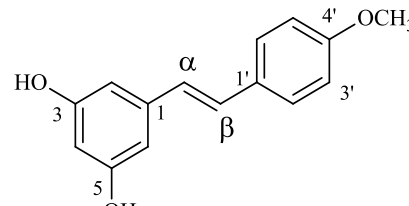
**DH3** (emodin)



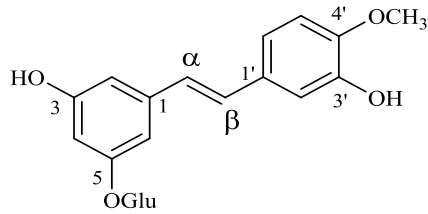
**DH4** (alo-emodin)



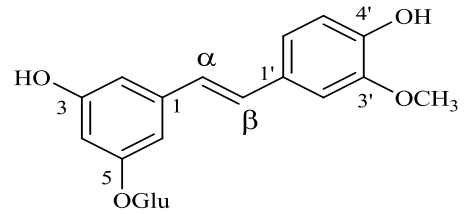
**DH5** (rhapotigenin)



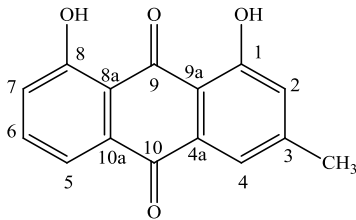
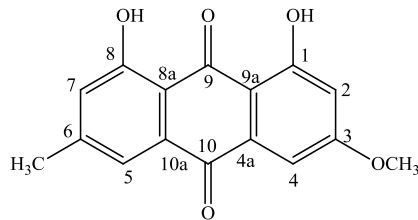
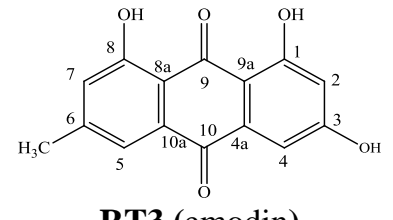
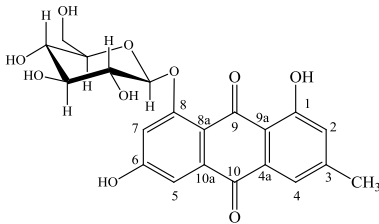
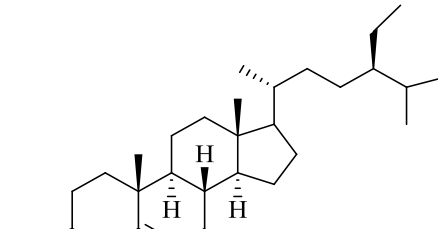
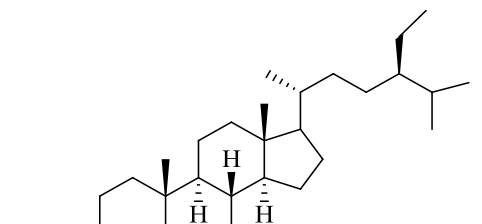
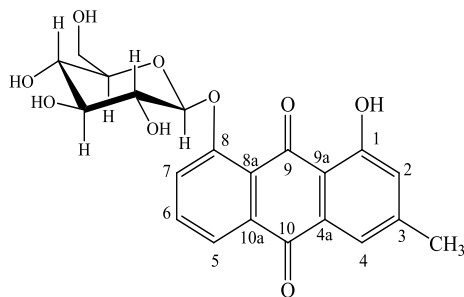
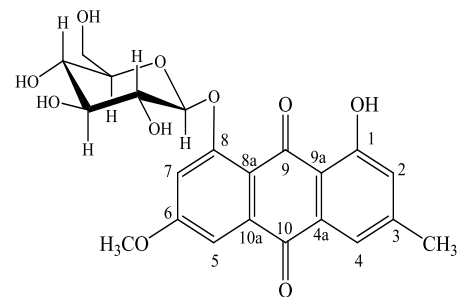
**DH6** (deoxyrhapotigenin)



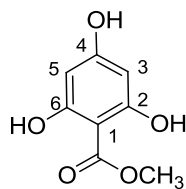
rhaponticin



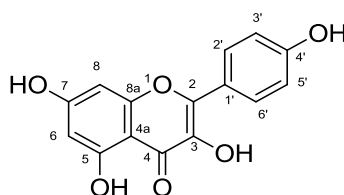
isorhapontin

**Hợp chất DH7 (rhaponticin và isorhapontin)**Các chất phân lập được từ cây lữôi bò - *R. trisetifer***RT1 (chrysophanol)****RT2 (physcion)****RT3 (emodin)****RT4 (emodin-8-O- $\beta$ -D-glucoside)****RT6 ( $\beta$ -sitosterol)****RT7 (daucosterol)**chrysophanol-8-O- $\beta$ -D-glucosidephyscion-8-O- $\beta$ -D-glucoside**RT5 (chrysophanol -8-O- $\beta$ -D-glucoside và physcion -8-O- $\beta$ -D-glucoside)**

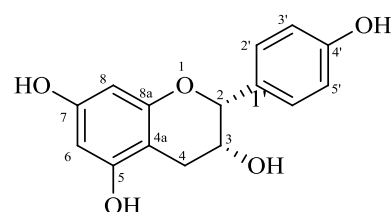
Các chất phân lập được từ cây muồng trâu - *S. alata*

**SA1**

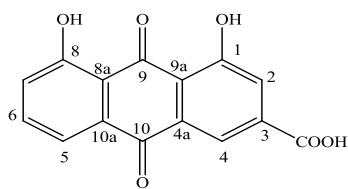
(methyl 2,4,6-trihydroxybenzoate)

**SA2**

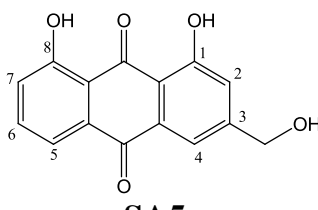
(kaempferol)

**SA3**

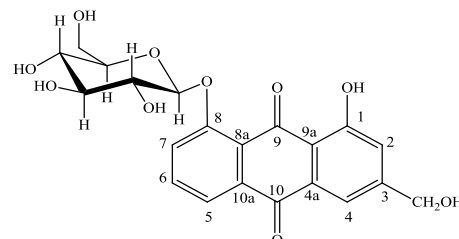
((-)-epiafzelechin)

**SA4**

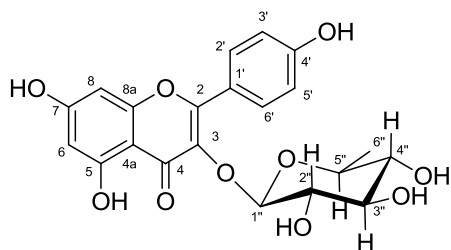
(rhein)

**SA5**

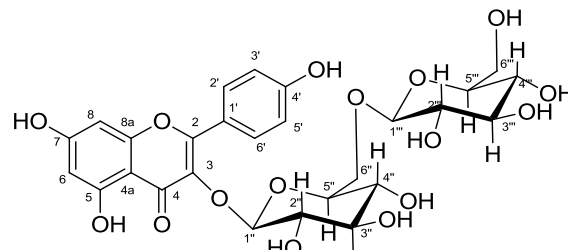
(aloë-emodin)

**SA6**

(aloë-emodin-8-O-glucoside)

**SA7**

(kaempferol-3-O-glucoside)

**SA8**

(kaempferol-3-O-gentiobioside)

## 2. Nghiên cứu hoạt tính sinh học

+ Cao chiết dichloromethane và cao chiết ethyl acetate của cây đại hoàng *R. tanguticum* có hoạt tính *in vivo* mạnh đối với 5 chủng nấm gây bệnh: *M. oryzae* (**RCB**), *P. infestans* (**TLB**), *P. recondita* (**WLR**), *B. graminis* f.sp. *hordei* (**BPM**) và *C. coccodes* (**PAN**) ở nồng độ 3000 µg/mL. Đối với nấm *B. graminis* f.sp. *hordei* (**BPM**), 2 cao chiết dichloromethane và cao chiết ethyl acetate có hiệu quả 95-97% ngay cả ở nồng độ thấp 500 µg/mL.

Cao chiết dichloromethane và cao chiết ethyl acetate của cây đại hoàng *R. tanguticum* có khả năng ức chế *in vitro* mạnh đối với 4 chủng vi khuẩn *Acidovorax avenae* subsp. *cattlyae* (Aac), *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* (Xap), và *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa) với giá trị MIC từ 125 đến

250 µg/mL. Trong đó, đối với chủng *Acidovorax avenae* subsp. *cattlyae* 2 cao chiết có giá trị IC<sub>90</sub> lần lượt là 63.4 µg/mL và 118.6 µg/mL; giá trị IC<sub>50</sub> lần lượt là 30.8 µg/mL và 46.0 µg/mL.

Các chất thử nghiệm **DH1** (chrysophanol), **DH2** (physcion) và **DH3** (emodin) đều có hiệu quả ức chế lại các nấm *B. cinerea*, *C. gloeosporioides*, *R. solani*, *P. infestans* ở nồng độ 100-300 ppm. Đối với **DH3** (emodin), hiệu quả tăng từ 65-88% so chất đối chứng tùy nồng độ khác nhau.

+ Cao chiết methanol của *R. trisetifer* có hoạt tính *in vivo* với 2 chủng nấm *B.graminis* f.sp. *hordei* (**BPM**) và *C. coccodes* (**PAN**). Cao chiết n-hexane, cao chiết ethyl acetate thu được từ cao chiết methanol cho hiệu quả kiểm soát đối với các chủng nấm gây bệnh này với hiệu quả từ 93 đến 100% ở nồng độ 3000 µg/mL.

Cao chiết n-hexane của *R. trisetifer* thể hiện hoạt tính *in vitro* kìm hãm 4 chủng vi khuẩn *Acidovorax avenae* subsp. *cattlyae* (92.0%) và *X. pruni* (86.0%) và thể hiện sự kìm hãm mạnh *R. solanacearum* (100%) và *P. actinidiae* (100%) ở nồng độ 512 µg/mL.

+ Cao chiết ethyl acetate từ cây muồng trâu *S. alata* thể hiện hoạt tính *in vivo* đối với 4 chủng nấm *M. grisea* (**RCB**), *P. infestans* (**TLB**), *P. recondita* (**WLR**), *C. gloeosporioides* (**PAN**) với hiệu quả kháng nấm cao (hơn 90%) ở nồng độ 3000 µg/mL.

Cao chiết ethyl acetate thể hiện hoạt tính *in vitro* kìm hãm 6 chủng vi khuẩn: *A. avenae* subsp. *cattlyae*, *B. glumae*, *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, *P. syringae* pv. *actinidiae*, *R. solanacearum* và *X. arboricola pruni* với giá trị MIC từ 125 đến 600 µg/mL. Trong đó, đối với chủng *Acidovorax avenae* subsp. *cattlyae* cao dịch chiết ethyl acetate có hoạt tính *in vitro* mạnh ở nồng độ MIC 125 µg/mL.

Hợp chất **CA4** (rhein), **CA5** (aloe- emodin) có hoạt tính *in vitro* đối với vi khuẩn *Acidovorax avenae* subsp. *cattlyae* gây bệnh cháy lá trên cây hoa Lan, trong đó hợp chất **CA4** (rhein) thể hiện hoạt tính mạnh nhất (MIC <19 µg/mL) (ở nồng độ 10 µg/mL).

### 3. Nghiên cứu tối ưu hóa và đề xuất quy trình công nghệ

- Nghiên cứu tối ưu hóa quá trình công nghệ tạo cao chiết từ rễ cây đại hoàng *R. tanguticum*: thời gian chiết: 24h, tỉ lệ dung môi methanol /nguyên liệu: 2.4/1, nhiệt độ chiết: 65°C



- Đề xuất quy trình công nghệ tạo cao chiết dichloromethane cây đại hoàng *R.tanguticum*.
- Nghiên cứu tối ưu hóa quá trình công nghệ tạo cao chiết lá cây muồng trâu *S. alata*: thời gian chiết: 19.5 h, tỉ lệ dung môi methanol /nguyên liệu: 13.7/1, nhiệt độ chiết: 57°C
- Đề xuất quy trình công nghệ tạo cao chiết ethyl acetate cây muồng trâu *S.alata*.

### **KIẾN NGHỊ**

- Nghiên cứu mối quan hệ giữa cấu trúc và hoạt tính của các hợp chất phenolic đối với hoạt tính *in vivo* kháng một số nấm gây bệnh và hoạt tính *in vitro* kháng một số vi khuẩn gây bệnh cho cây trồng .
- Tiếp tục nghiên cứu tối ưu hóa quá trình chiết có sử dụng siêu âm hay vi sóng đối với cây đại hoàng *R. tanguticum*
- Tiếp tục nghiên cứu tối ưu hóa quá trình chiết có sử dụng siêu âm hay vi sóng đối với cây muồng trâu *S. alata*.

### **ĐIỂM MỚI CỦA LUẬN ÁN**

- Lần đầu tiên công bố các hoạt tính mới về ức chế nấm và vi khuẩn gây bệnh cây trồng của các hoạt chất nguồn gốc thực vật như *R. tanguticum*, *S. alata*, *R. trisetifer*, chỉ ra cấu trúc của các hoạt chất chính mang có tác dụng mạnh và tiềm năng ứng dụng của các chất này trong phát triển thuốc BVTV mới thân thiện môi trường.

- Thành phần các cao có hoạt tính đã được nghiên cứu định lượng bằng phương pháp HPLC, từ đó làm rõ cơ sở khoa học và hiệu lực tác dụng của các cao chiết từ thực vật đang nghiên cứu.

- Luận án công bố về các quy trình chiết cao mang hoạt tính với các điều kiện chiết được khảo sát và nghiên cứu bằng phương pháp bề mặt đáp ứng. Hai mô hình công nghệ xây dựng cho các đối tượng *R. tanguticum* và *S. alata* đã mô tả được bản chất của các quá trình đang nghiên cứu. Các giá trị tối ưu của các điều kiện công nghệ đã được chỉ ra từ các mô hình thiết lập.

## DANH MỤC CÔNG TRÌNH CỦA TÁC GIẢ

**Duong Quang Pham** , Hieu Trung Pham, Jae Woo Han , Tung Huu Nguyen, Huong Thanh Nguyen , Thi Duyen Nguyen , Thu Trang Thi Nguyen , Cuong Tu Ho, Hong Minh Pham, Hoang Dinh Vu, Gyung Ja Choi , Quang Le Dang. Extracts and metabolites derived from the leaves of *Cassia alata* L. exhibit *in vitro* and *in vivo* antimicrobial activities against fungal and bacterial plant pathogens. *Industrial Crops & Products* 166 (2021) 113465

**Duong Quang Pham**, Jae Woo Han, Nga Thu Dao, Jin-Cheol Kim, Hieu Trung Pham, Tung Huu Nguyen, Ngoc Thanh Nguyen, Gyung Ja Choi, Hoang Dinh Vu, Quang Le Dang. *In vitro* and *in vivo* antimicrobial potential against various phytopathogens and chemical constituents of the aerial part of *Rumex trisetifer* Campd. *South African Journal of Botany* 133 (2020) 73-82.

**Duong Quang Pham**, Duong Thi Ba, Nga Thu Dao, Gyung Ja Choi, Thuy Thu Vu, Jin-Cheol Kim, Thi Phuong Ly Giang, Hoang Dinh Vu, Quang Le Dang. Antimicrobial efficacy of extracts and constituents fractionated from *Rheum tanguticum* Maxim. ex Balf. rhizomes against phytopathogenic fungi and bacteria. *Industrial Crops & Products* 108 (2017) 442–450.

**Pham Quang Duong**, Nguyen Thi Duyen, Phung Ton Quyen, Nguyen Quang Tung, Vu Hong Son, Vu Dinh Hung, Le Dang Quang. Isolation and identification of phenolic compounds from the leaf extract of *Cassia alata* L. *Vietnam Journal of Chemistry, International Edition*, 55(5): 589-594, 2017.

**Pham Quang Duong**, Ba Thi Duong, Dao Thu Nga, Le Dang Quang, Vu Dinh Hoang. Stilbene constituents of rhizomes of *Rheum tanguticum* Maxim. Ex Balf. (Polygonaceae). *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*. (2016), 54(2B), 230-234

**TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. Jin W. and Tu P.-F. (2005). Preparative isolation and purification of trans-3,5,4'-trihydroxystilbene-4'-O- $\beta$ -d-glucopyranoside and (+)catechin from *Rheum tanguticum* Maxim. ex Balf. using high-speed counter-current chromatography by stepwise elution and stepwise increasing the flow-rate of the mobile phase. *J Chromatogr A*, **1092**(2), 241–245.
2. Jin W., Wang Y.-F., Ge R.-L., et al. (2007). Simultaneous analysis of multiple bioactive constituents in *Rheum tanguticum* Maxim. ex Balf. by high-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, **21**(14), 2351–2360.
3. Zhao X.-H., Han F., Li Y.-L., et al. (2013). Preparative Isolation and Purification of Three Stilbene Glycosides from the Tibetan Medicinal Plant *Rheum tanguticum* Maxim. Ex Balf. by High-speed Counter-current Chromatography. *Phytochem Anal*, **24**(2), 171–175.
4. Liangliang Gao (2012). Isolation of cinnamic acid derivatives from the root of *Rheum tanguticum* Maxim.ex Balf. and its significance. *J Med Plants Res*, **6**(5).
5. Liu J., Liu C.-S., Wang Q.-L., et al. (2014). Activated-Constituents in the Rhizomes and Roots of *Rheum tanguticum*. *Asian J Chem*, **26**(19), 6635–6641.
6. Gao L., Xu X., and Yang J. (2014). A New Phenylbutanone Derivative from the Roots of *Rheum tanguticum*. *Chem Nat Compd*, **50**(2), 217–219.
7. Chen T., Li H., Zou D., et al. (2016). Separation of three anthraquinone glycosides including two isomers by preparative high-performance liquid chromatography and high-speed countercurrent chromatography from *Rheum tanguticum* Maxim. ex Balf. *J Sep Sci*, **39**(16), 3105–3112.
8. Chen T., Yang X., Wang N., et al. (2018). Separation of six compounds including two n-butyrophenone isomers and two stilbene isomers from *Rheum tanguticum* Maxim by recycling high speed counter-current chromatography and preparative high-performance liquid chromatography. *J Sep Sci*, **41**(19), 3660–3668.

9. Shen N., Zhou H., and Xu W. (2021). Anthraquinone and Flavonoid Compounds from Gum of *Rheum tanguticum*. *Chem Nat Compd*, **57(3)**, 521–522.
10. Yue H., Jiang S., Wang L., et al. (2022). Hypoglycemic ingredients identification of *Rheum tanguticum* Maxim. ex Balf. by UHPLC-triple-TOF-MS/MS and interrelationships between ingredients content and glycosidase inhibitory activities. *Ind Crops Prod*, **178**, 114595.
11. Im Mi Gyeong and Kim Mi La (2003). Antimicrobial Activity of Methanol Extract from *Rheum tanguticum* against Food Hazardous Microorganisms and the Composition of the Extract. *Korean J. Soc. Food Cookery Sci*, **19(4)**, 470–476.
12. Qi Y., Wang M., Zhang B., et al. (2022). Effects of Natural *Rheum tanguticum* on the Cell Wall Integrity of Resistant Phytopathogenic *Pectobacterium carotovorum* subsp. *Carotovorum*. *Molecules*, **27(16)**, 5291.
13. Jin J.H., Ngoc T.M., Bae K., et al. (2011). Inhibition of Experimental Atopic Dermatitis by Rhubarb (Rhizomes of *Rheum tanguticum*) and 5-Lipoxygenase Inhibition of its Major Constituent, Emodin. *Phytother Res*, **25(5)**, 755–759.
14. Hong J.-Y., Chung H.-J., Bae S.Y., et al. (2014). Induction of Cell Cycle Arrest and Apoptosis by Physcion, an Anthraquinone Isolated From Rhubarb (Rhizomes of *Rheum tanguticum*), in MDA-MB-231 Human Breast Cancer Cells. **19(4)**, 273–278.
15. Agarwal S.K., Singh S.S., Lakshmi V., et al. (2001). Chemistry and Pharmacology of Rhubarb (*Rheum* species)— A Review. *JSIR Vol6001 January 2001*.
16. Zheng Q., Wu H., Guo J., et al. (2013). Review of Rhubarbs: Chemistry and Pharmacology. *Chin Herb Med*, **5(1)**, 9–32.
17. Bhat R. (2020). Bioactive Compounds of Rhubarb (*Rheum* Species). *Bioactive Compounds in Underutilized Vegetables and Legumes*. Springer International Publishing, Cham, 1–16.
18. Bajracharya G.B. and Gupta R.K. (2021). Rhubarb: The King of Herbs with Diverse Bioactivities. *Ethnopharmacology of Wild Plants*. CRC Press.

19. Phương Đ.T.K. and Phuong P.Đ. (2014). Phân lập chrysophanol, physcion và emodin trong cây chít chít nhẵn (*Rumex crispus* L., Polygonaceae). *Tạp Chí Dược Học*, **54(9)**, 59–66.
20. Demirezer L.Ö., Kuruüzüm-Uz A., Bergere I., et al. (2001). The structures of antioxidant and cytotoxic agents from natural source: anthraquinones and tannins from roots of *Rumex patientia*. *Phytochemistry*, **58(8)**, 1213–1217.
21. Demirezer Ö., Kuruüzüm A., Bergere I., et al. (2001). Five naphthalene glycosides from the roots of *Rumex patientia*. *Phytochemistry*, **56(4)**, 399–402.
22. Günaydin K., Topçu G., and Mariana Ion R. (2002). 1,5-Dihydroxyanthraquinones and an Anthrone from Roots of *Rumex Crispus*. *Nat Prod Lett*, **16(1)**, 65–70.
23. Kerem Z., Bilkis I., Flaishman M.A., et al. (2006). Antioxidant Activity and Inhibition of  $\alpha$ -Glucosidase by trans-Resveratrol, Piceid, and a Novel trans-Stilbene from the Roots of Israeli *Rumex bucephalophorus* L. *J Agric Food Chem*, **54(4)**, 1243–1247.
24. Jang D.S., Kim J.M., Kim J.-H., et al. (2005). 24-nor-Ursane type triterpenoids from the stems of *Rumex japonicus*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, **53(12)**, 1594–1596.
25. Jiang L., Zhang S., and Xuan L. (2007). Oxanthrone C-glycosides and epoxy-naphthoquinol from the roots of *Rumex japonicus*. *Phytochemistry*, **68(19)**, 2444–2449.
26. Zhao H., Wang Z., Cheng J., et al. New Chromone Glucoside from Roots of *Rumex gmelini*. *Natural Product Research & Development*, **21(2)**, 189–191.
27. Mei R., Liang H., Wang J., et al. (2009). New Seco-anthraquinone Glucosides from *Rumex nepalensis*. *Planta Med*, **75(10)**, 1162–1164.
28. Liang H.-X., Dai H.-Q., Fu H.-A., et al. (2010). Bioactive compounds from *Rumex plants*. *Phytochem Lett*, **3(4)**, 181–184.
29. Zhang H., Guo Z., Wu N., et al. (2012). Two Novel Naphthalene Glucosides and an Anthraquinone Isolated from *Rumex dentatus* and Their Antiproliferation Activities in Four Cell Lines. *Molecules*, **17(1)**, 843–850.
30. El-Kashak W.A., Elshamy A.I., Mohamed T.A., et al. (2017). Rumpictuside A: Unusual 9,10-anthraquinone glucoside from *Rumex pictus* Forssk. *Carbohydr Res*, **448**, 74–78.

31. Orbán-Gyapai O., Liktör-Busa E., Kúsz N., et al. (2017). Antibacterial screening of *Rumex* species native to the Carpathian Basin and bioactivity-guided isolation of compounds from *Rumex aquaticus*. *Fitoterapia*, **118**, 101–106.
32. Kengne I.C., Feugap L.D.T., Njouendou A.J., et al. (2021). Antibacterial, antifungal and antioxidant activities of whole plant chemical constituents of *Rumex abyssinicus*. *BMC Complement Med Ther*, **21**(1), 164.
33. Shafiq N., Noreen S., Rafiq N., et al. (2020). Isolation of bioactive compounds from *Rumex hastatus* extract and their biological evaluation and docking study as potential anti-oxidant and anti-urease agents. *J Food Biochem*, **44**(8), e13320.
34. Tsamo L.D.F., Yimgang L.V., Wouamba S.C.N., et al. (2021). A New Ceramide (Rumexamide) and Other Chemical Constituents from *Rumex abyssinicus* Jacq (Polygonaceae): Isolation, Characterization, Antibacterial Activities and Chemophenetic Significance. *Advances in Biological Chemistry*, **11**(5), 266–282.
35. Li Y.-X., Li N., Li J.-J., et al. (2022). New seco-anthraquinone glucoside from the roots of *Rumex crispus*. *Nat Prod Bioprospecting*, **12**(1), 29.
36. Aierken K., Li J., Xu N., et al. (2023). Chemical constituents of *Rumex dentatus* L. and their antimicrobial and anti-inflammatory activities. *Phytochemistry*, **205**, 113509.
37. Kisangau D.P., Hosea K.M., Lyaruu H.V.M., et al. (2009). Screening of traditionally used Tanzanian medicinal plants for antifungal activity. *Pharm Biol*, **47**(8), 708–716.
38. Humeera N., Kamili A.N., Bandh S.A., et al. (2013). Antimicrobial and antioxidant activities of alcoholic extracts of *Rumex dentatus* L. *Microb Pathog*, **57**, 17–20.
39. Elzaawely A.A., Xuan T.D., and Tawata S. (2005). Antioxidant and Antibacterial Activities of *Rumex japonicus* Aerial Parts. *Biol Pharm Bull*, **28**(12), 2225–2230.
40. Harshaw D., Nahar L., Vadla B., et al. (2010). Bioactivity of *Rumex obtusifolius* (Polygonaceae). *Arch Biol Sci*, **62**(2), 387–392.
41. Al Akeel R., Al-Sheikh Y., Mateen A., et al. (2014). Evaluation of antibacterial activity of crude protein extracts from seeds of six different medical plants against standard bacterial strains. *Saudi J Biol Sci*, **21**(2), 147–151.

42. Vasas A., Orbán-Gyapai O., and Hohmann J. (2015). The Genus *Rumex*: Review of traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *J Ethnopharmacol*, **175**, 198–228.
43. Li J.-J., Li Y.-X., Li N., et al. (2022). The genus *Rumex* (Polygonaceae): an ethnobotanical, phytochemical and pharmacological review. *Nat Prod Bioprospecting*, **12**(1), 21.
44. Gupta D. and Singh J. (1991). Flavonoid glycosides from *Cassia alata*. *Phytochemistry*, **30**(8), 2761–2763.
45. Hemlata and Kalidhar S.B. (1993). Alatinone, an anthraquinone from *Cassia alata*. *Phytochemistry*, **32**(6), 1616–1617.
46. Hazni H., Ahmad N., Hitotsuyanagi Y., et al. (2008). Phytochemical Constituents from *Cassia alata* with Inhibition against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Planta Med*, 1802–1805.
47. Liu A., Xu L., Zou Z., et al. (2009). [Studies on chemical constituents from leaves of *Cassia alata*. *J Chin Mater Medica*, **34**(7), 861–863.
48. Yadav S.K. (2013). Isolation and characterization of chemical compounds from flowers of *Cassia alata*. *Pharma Chem*, **5**(5), 59–62.
49. Promgool T., Pancharoen O., and Deachathai S. (2014). Antibacterial and antioxidative compounds from *Cassia alata* Linn. *Songklanakarinn J Sci Technol*, **36**(4), 459–463.
50. Zhou M., Liu C., Yang J., et al. (2020). Alatains A and B, unique hetero-dimeric polyphenols from *Cassia alata* and their anti-tobacco mosaic virus activity. *Fitoterapia*, **147**, 104763.
51. Chimi Fotso S., Tcho Tadjong A., Tsopgni W.D.T., et al. (2021). Chemical constituents and antimicrobial activities of some isolated compounds from the Cameroonian species of *Senna alata* (*Cassia alata* L. Roxb synonym, The plant list 2013). (Leguminosae). *Trends Phytochem Res*, **5**(1), 37–43.
52. Yang P.-S., Dai J.-M., Gu X.-J., et al. (2022). Indole Alkaloids and Chromones from the Stem Bark of *Cassia alata* and Their Antiviral Activities. *Molecules*, **27**(10), 3129.
53. Yang W.-W., Xiao D., Yin G.-Y., et al. (2022). Two New Antibacterial Anthraquinones from the Twigs of *Cassia alata*. *Chem Nat Compd*, **58**(3), 414–417.

54. Phongpaichit S., Pujenjob N., Rukachaisirikul V., et al. (2004). Antifungal activity from leaf extracts of *Cassia alata* L., *Cassia fistula* L. and *Cassia tora* L. *Songklanakarin J Sci Technol*, **26(5)**, 741–748.
55. Abubacker M.N., Ramanathan R., and Kumar T.S. (2008). *In vitro* antifungal activity of *Cassia alata* Linn. flower extract. *NPR Vol71 January-Febr 2008*.
56. Wuthi-udomlert M., Kupittayanant P., and Gritsanapan W. (2010). In vitro evaluation of antifungal activity of anthraquinone derivatives of *Senna alata*. *J Health Res*, **24**, 117–122.
57. Legaspi C.L. and Maramba C. (2020). The Phytochemical Content and the In vitro Antifungal Properties of *Senna alata* (Linn.) Roxb.: A Review. *Acta Med Philipp*, **54**, 86–93.
58. Khan M.R., Kihara M., and Omoloso A.D. (2001). Antimicrobial activity of *Cassia alata*. *Fitoterapia*, **72(5)**, 561–564.
59. Somchit M.N., Reezal I., Nur I.E., et al. (2003). In vitro antimicrobial activity of ethanol and water extracts of *Cassia alata*. *J Ethnopharmacol*, **84(1)**, 1–4.
60. Adedayo O., Anderson W.A., Moo-Young M., et al. (2001). Phytochemistry and Antibacterial Activity of *Senna alata* Flower. *Pharm Biol*, **39(6)**, 408–412.
61. Saito S.T., Trentin D. da S., Macedo A.J., et al. (2012). Bioguided Fractionation Shows *Cassia alata* Extract to Inhibit *Staphylococcus epidermidis* and *Pseudomonas aeruginosa* Growth and Biofilm Formation. *Evid Based Complement Alternat Med*, **2012**, e867103.
62. Ogunjobi A.A. and Abiala M.A. (2013). Antimicrobial activity of *Senna alata* and *Phyllanthus amarus*. *Glob J Pharmacol*, **7(2)**, 198–202.
63. Ou I. and FK O. (2015). Leaf essential oil of *Senna alata* Linn from South East Nigeria and its antimicrobial activity. *Int J Res Pharm Chem*, **5(1)**, 27–33.
64. El-Sayyad S.M. and Ross S.A. (1983). A phytochemical study of some *Cassia* species cultivated in Egypt. *J Nat Prod*, **46(3)**, 431–432.
65. Dave H. and Ledwani L. (2012). A review on anthraquinones isolated from *Cassia* species and their applications. .



66. Zhao Y., Zhao K., Jiang K., et al. (2016). A Review of Flavonoids from *Cassia* Species and their Biological Activity. *Curr Pharm Biotechnol*, **17(13)**, 1134–1146.
67. Khurm M., Wang X., Zhang H., et al. (2021). The genus *Cassia* L.: Ethnopharmacological and phytochemical overview. *Phytother Res*, **35(5)**, 2336–2385.
68. Zhao L.-C., Liang J., Li W., et al. (2011). The Use of Response Surface Methodology to Optimize the Ultrasound-Assisted Extraction of Five Anthraquinones from *Rheum palmatum* L. *Molecules*, **16(7)**, 5928–5937.
69. Yeong Y.L., Pang S.F., Putranto A., et al. (2022). Optimisation of microwave-assisted extraction (MAE) of anthraquinone and flavonoids from *Senna alata* (L.) Roxb. *Nat Prod Res*, **36(14)**, 3756–3760.
70. Le X.D., Nguyen M.C., Vu D.H., et al. (2019). Optimization of Microwave-Assisted Extraction of Total Phenolic and Total Flavonoid Contents from Fruits of *Docynia indica* (Wall.) Decne. Using Response Surface Methodology. *Processes*, **7(8)**, 485.
71. Agrios, G. N. 2005. *Plant Pathology. 5th (Ed.)*, Elsevier Academic Press, Burlington, Mass, .
72. Báo cáo Đề tài nghị Định Thư Hàn Quốc KRICT-VIIC ”Hợp tác nghiên cứu chế phẩm trừ dịch hại có nguồn gốc thực vật” NĐT.2010/02, năm 2010-2012. .
73. Báo cáo thường niên ngành thuốc Bảo vệ thực vật năm 2012 và triển vọng năm 2013. Trung tâm thông tin PTNNNT (Agroinfo), 58 p. .
74. Bộ NN&PTNT 2013. Danh mục thuốc BVTV được phép sử dụng, hạn chế sử dụng và cấm sử dụng ở VN năm 2013. .
75. Bùi Lan Anh. 2013. Nghiên cứu sử dụng một số loài thực vật và chế phẩm thảo mộc trong sản xuất rau họ hoa thập tự tại Thái Nguyên. Luận văn Tiến sỹ. Trường ĐH Thái Nguyên. 227pp. .
76. Vũ Triệu Mân. Giáo trình bệnh cây đại cương. Trường Đại học Nông Nghiệp 1- Hà Nội, 2007. .
77. Website của Cục bảo vệ môi trường Mỹ-Environmental Protection Agency: <http://www.epa.gov/oppbppd1/biopesticides/whatarebiopesticides.htm>. .

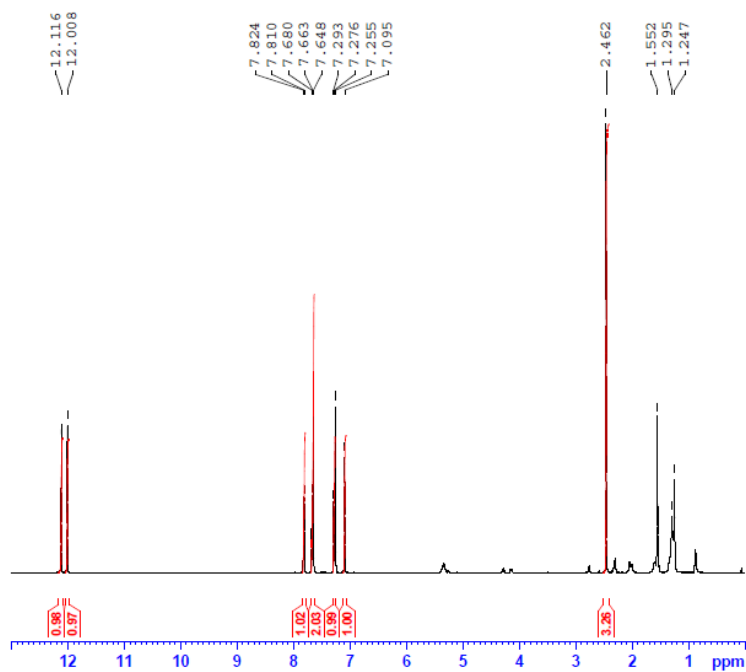
78. Biopesticides Market Size & Share Global Analysis Report, 2022-2030. Polaris, <https://www.polarismarketresearch.com/industry-analysis/biopesticides-market>.
79. Toan D.H., Hoang D.V., Hoang V.D., et al. (2021). Application of botanical pesticides in organic agriculture production: Potential and challenges. *Vietnam J Sci Technol*, **59(6)**, 679–701.
80. Lê Đăng Quang Nguyễn Trung Huy (2023). Thuốc bảo vệ thực vật sinh học: lựa chọn tất yếu của nông nghiệp bền vững. *Vietnam J Sci Technol*, 10A, 26-29.
81. Choi G.-J., Jang K.-S., Kim J.-S., et al. (2004). In Vivo Antifungal Activities of 57 Plant Extracts Against Six Plant Pathogenic Fungi. *Plant Pathol J*, **20(3)**, 184–191.
82. Kim Y.-M., Lee C.-H., Kim H.-G., et al. (2004). Anthraquinones Isolated from *Cassia tora* (Leguminosae) Seed Show an Antifungal Property against Phytopathogenic Fungi. *J Agric Food Chem*, **52(20)**, 6096–6100.
83. Abramson J.H. (2011). WINPEPI updated: computer programs for epidemiologists, and their teaching potential. *Epidemiol Perspect Innov*, **8(1)**, 1.
84. Danielsen K., Aksnes D.W., and Francis G.W. (1992). NMR study of some anthraquinones from rhubarb. *Magn Reson Chem*, **30(4)**, 359–360.
85. Kang S.C., Lee C.M., Choung E.S., et al. (2008). Anti-proliferative effects of estrogen receptor-modulating compounds isolated from *Rheum palmatum*. *Arch Pharm Res*, **31(6)**, 722–726.
86. Lee S.W., Hwang B.S., Kim M.-H., et al. (2012). Inhibition of LFA-1/ICAM-1-mediated cell adhesion by stilbene derivatives from *Rheum undulatum*. *Arch Pharm Res*, **35(10)**, 1763–1770.
87. Ngoc T.M., Minh P.T.H., Hung T.M., et al. (2008). Lipoxygenase inhibitory constituents from rhubarb. *Arch Pharm Res*, **31(5)**, 598.
88. Coşkun M., Toshiko S., Hori K., et al. (1990). Anthraquinone glycosides from *Rhamnus libanoticus*. *Phytochemistry*, **29(6)**, 2018–2020.
89. Ko S.K., Whang W.K., and Kim I.H. (1995). Anthraquinone and stilbene derivatives from the cultivated Korean Rhubarb Rhizomes. *Arch Pharm Res*, **18(4)**, 282–288.

90. Dinh Hoang Vu, Thi Cham Ba, Kim Anh Bui, Viet Hung Tran, Dai Lam Tran. Study on chemical constituents of rhizomes of *Polygonum cuspidatum* siesb. et Zucc. (Polygonaceae) growing in Vietnam, Vietnam journal of chemistry 2012 vol. 50(5) 628-630. .
91. Ngô Quốc Luân “Khảo sát thành phần hóa học cây ô môi (*Cassia grandis* L.f), họ Vang (Caesalpiniaceae) mọc Đồng bằng sông Cửu Long”. Luận án Tiến sỹ, Học viện Khoa học và Công nghệ, Tp Hồ Chí Minh (2017). .
92. Lee, Yong Rok (2007). First Concise Synthesis of Biologically Interesting Nigrolineabenzopyran A, ( $\pm$ )-Blandachromene II, and ( $\pm$ )-Daurichromene D. *Bull Korean Chem Soc*, **28(11)**, 2061–2064.
93. Kaewsuwan S. (2004). Bioassay-guided isolation of the antioxidant constituent from *Cassia alata* L. leaves. *Songklanakarin J Sci Technol*, **26**.
94. Davis A.L., Cai Y., Davies A.P., et al. (1996).  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR Assignments of Some Green Tea Polyphenols. *Magn Reson Chem*, **34(11)**, 887–890.
95. Kazuma K., Noda N., and Suzuki M. (2003). Malonylated flavonol glycosides from the petals of *Clitoria ternatea*. *Phytochemistry*, **62(2)**, 229–237.
96. Demirezer L.O., Karahan N., Ucakturk E., et al. (2011). HPLC Fingerprinting of Sennosides in Laxative Drugs with Isolation of Standard Substances from Some *Senna* Leaves. 10.

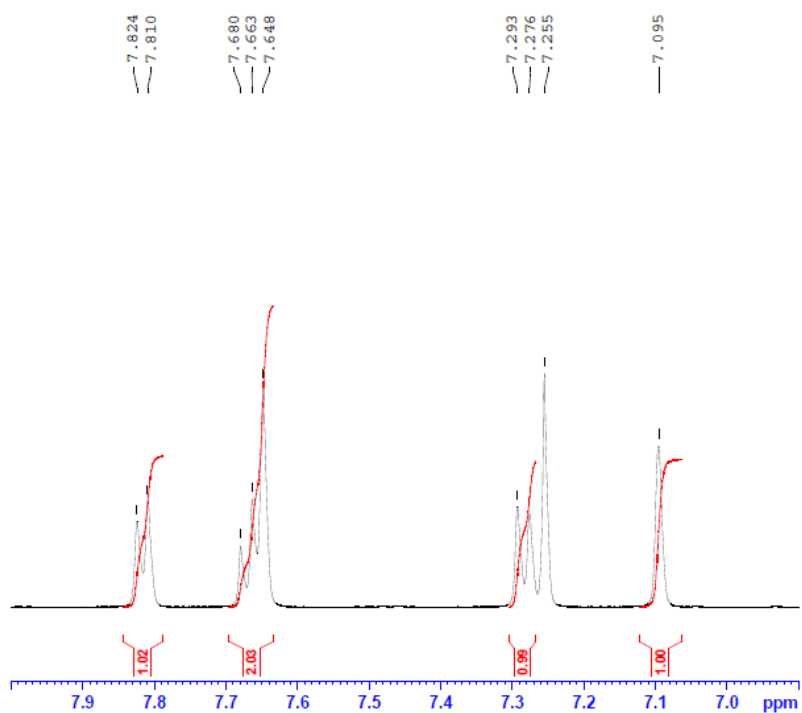
# I. PHỤ LỤC PHỔ

## PHỤ LỤC 1.1. Hợp chất DH1

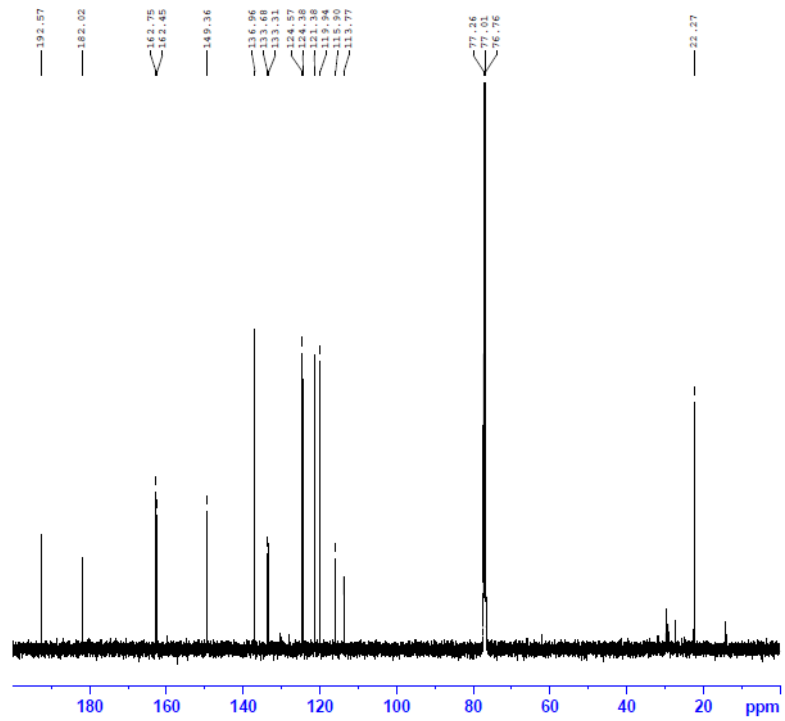
### Phổ $^1\text{H}$ NMR (500 MHz) DH1 trong $\text{CDCl}_3$



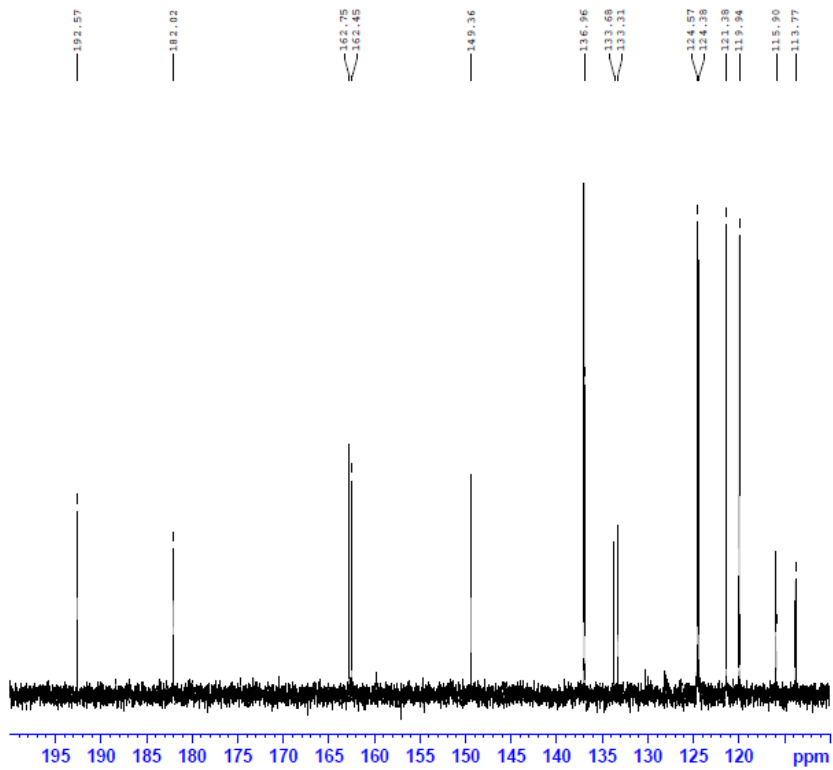
### Phổ $^1\text{H}$ NMR giãn rộng DH1



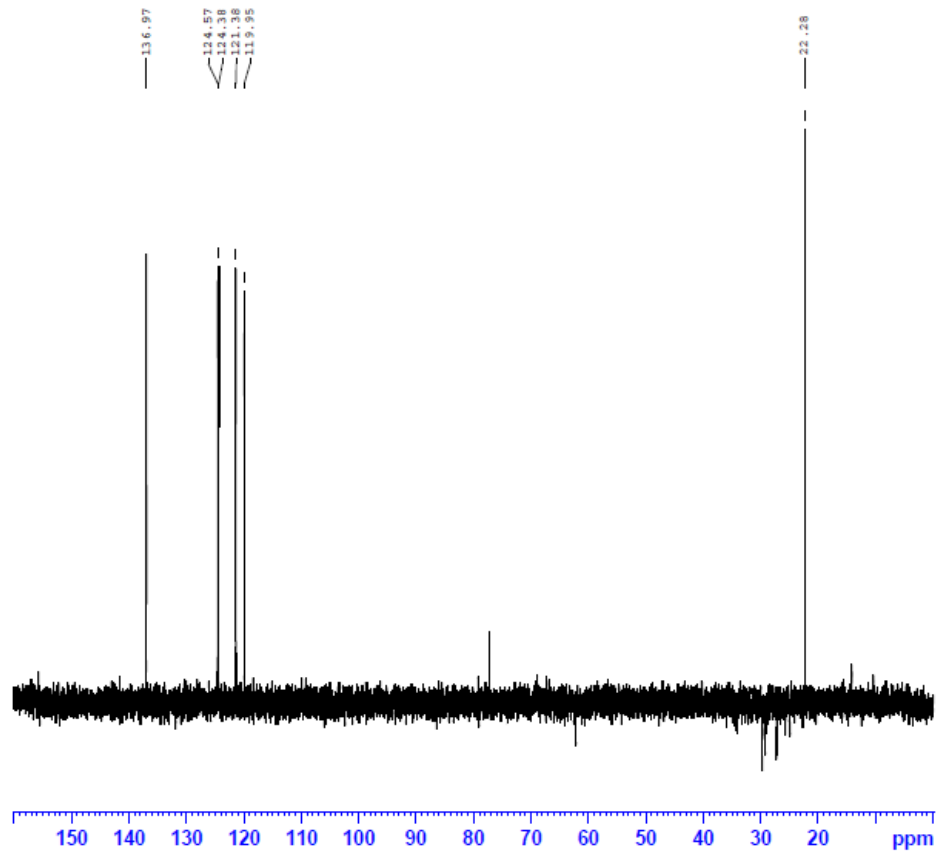
Phổ  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz) DH1 trong  $\text{CDCl}_3$



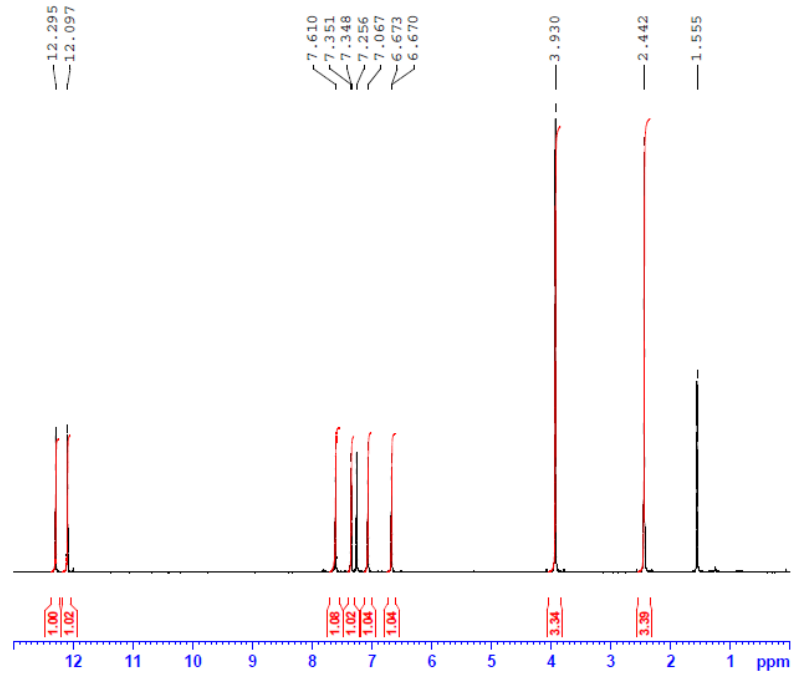
Phổ  $^{13}\text{C}$  NMR giãn rộng DH1



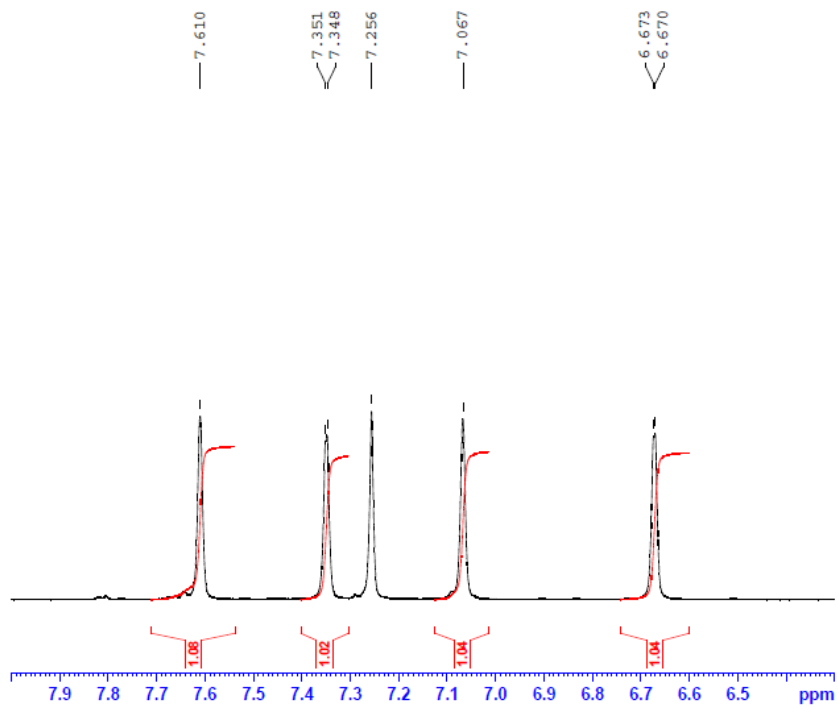
## Phổ DEPT 135 DH1

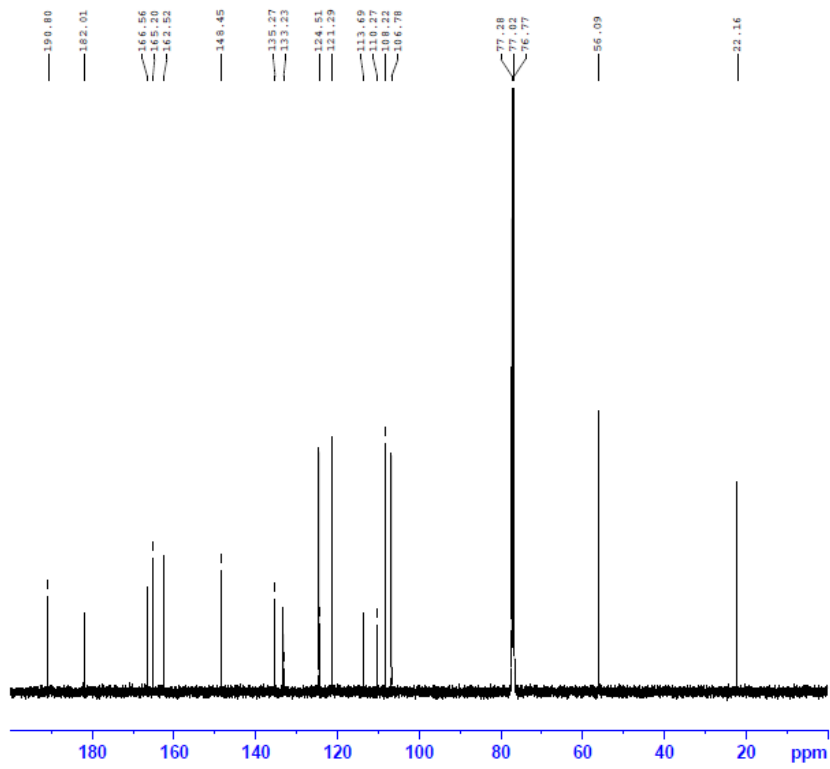
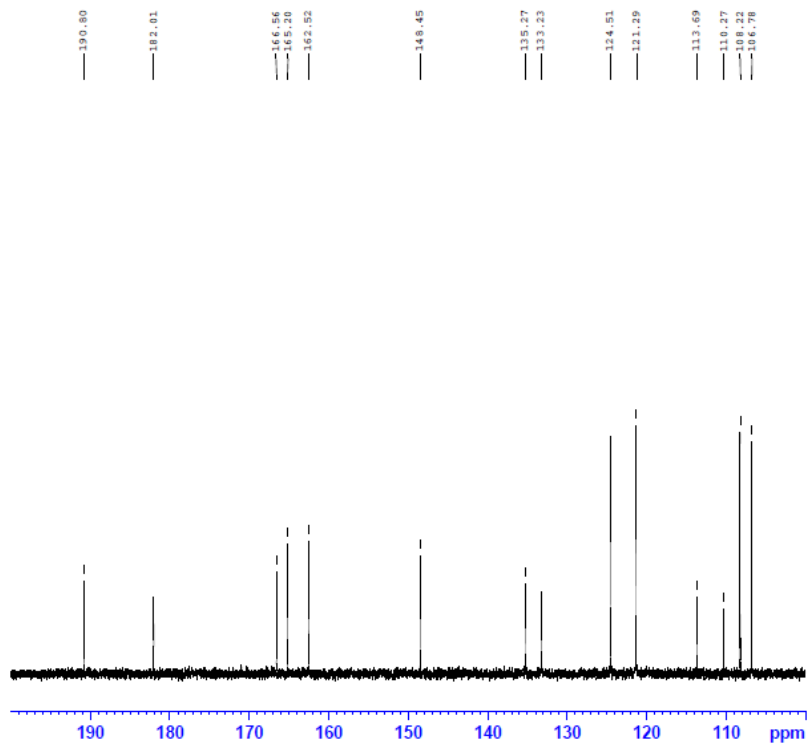


**PHỤ LỤC 1.2. Hợp chất DH2**  
**Phổ  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz) DH2 trong  $\text{CDCl}_3$**



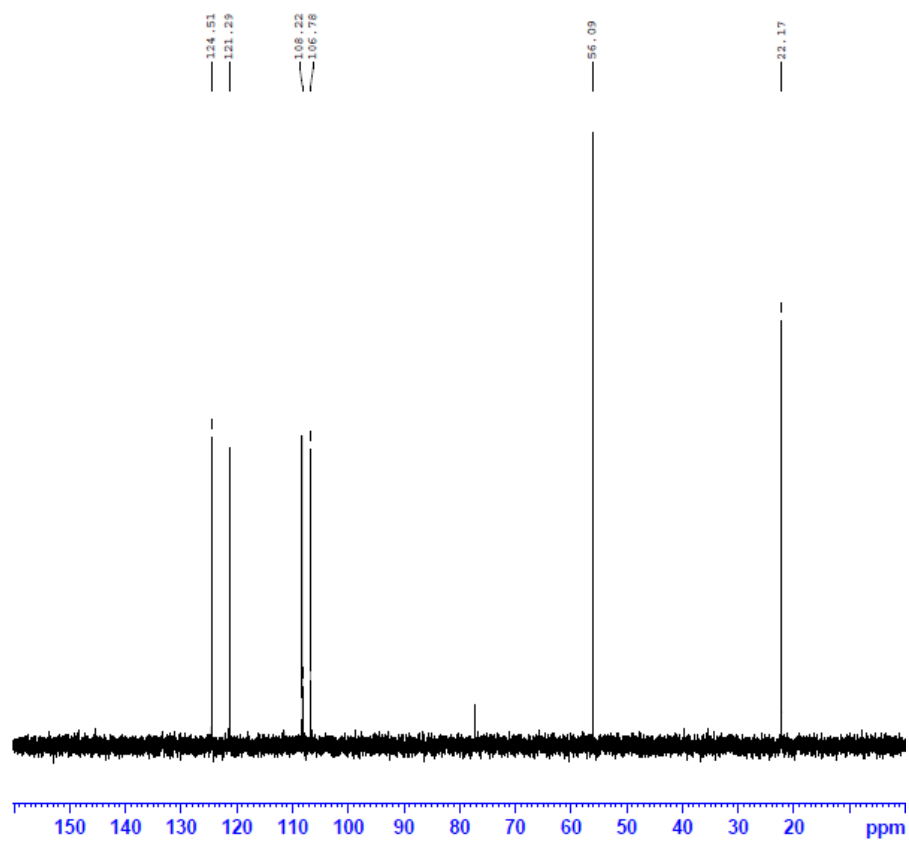
**Phổ  $^1\text{H}$  NMR giãn rộng DH2**



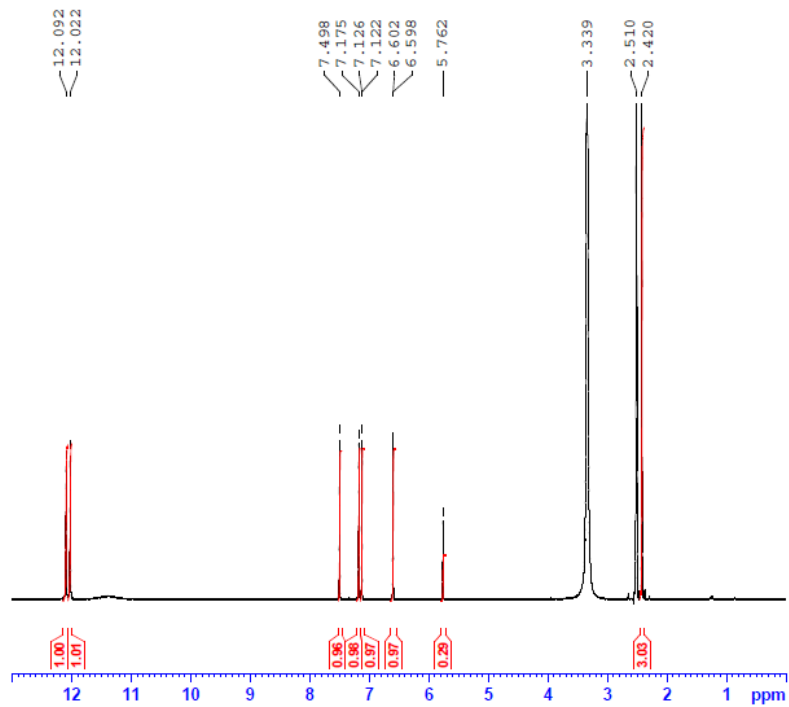
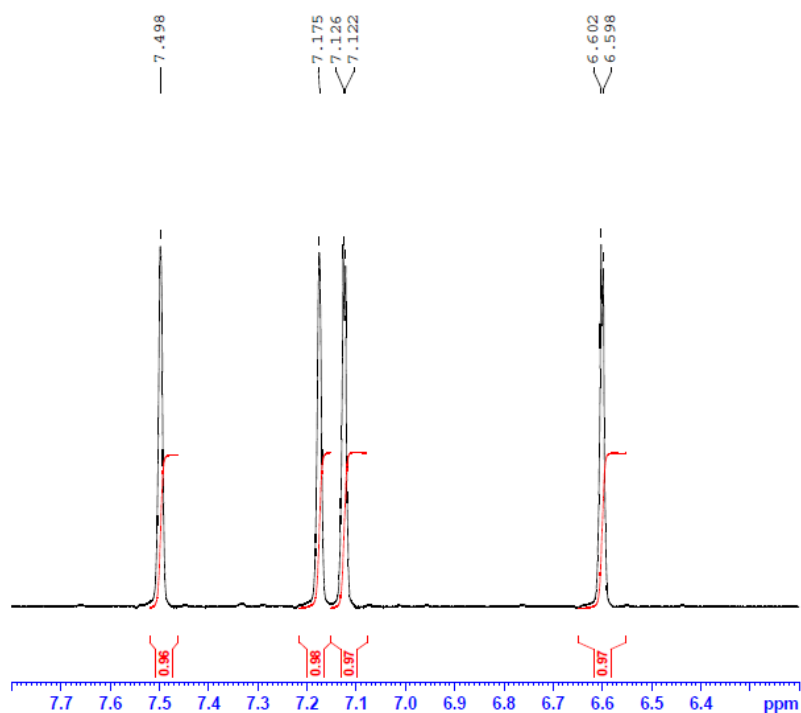
Phổ  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz) DH2 trong  $\text{CDCl}_3$ Phổ  $^{13}\text{C}$  NMR giãn rộng DH2



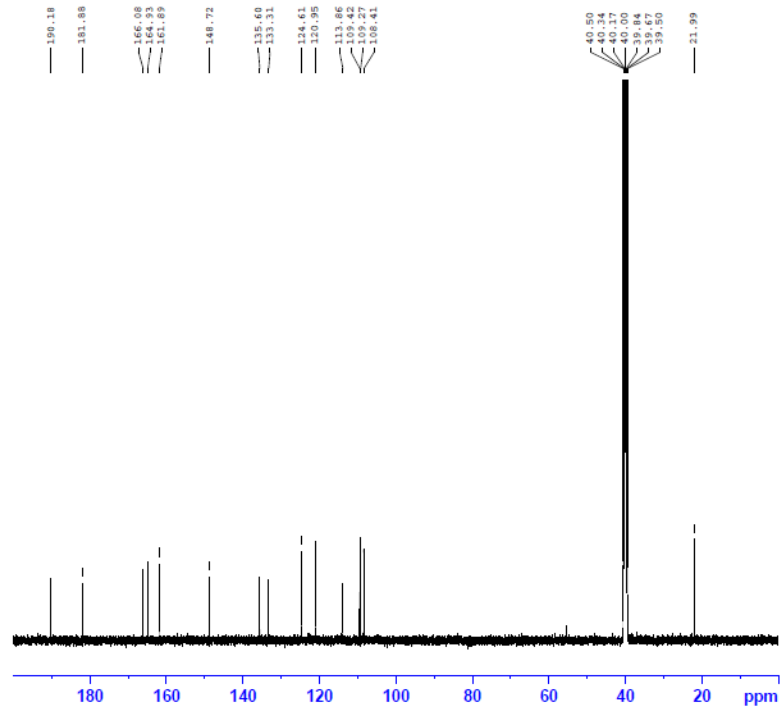
## Phổ DEPT 135 DH2



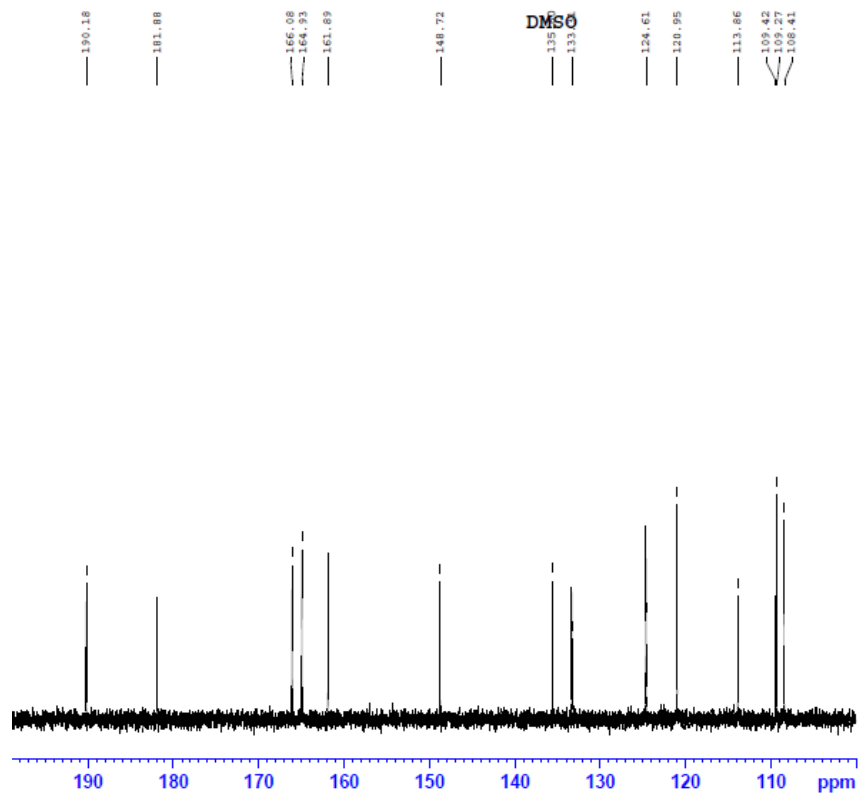
## PHỤ LỤC 1.3. Hợp chất DH3

Phổ  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz) DH3 trong  $\text{DMSO-}d_6$ Phổ  $^1\text{H}$  NMR giãn rộng DH3

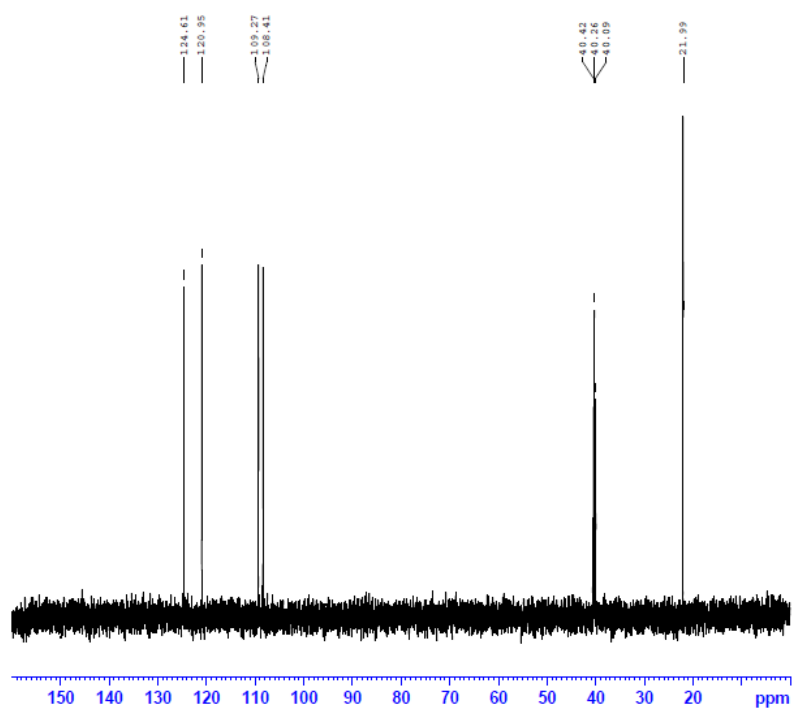
Phổ  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz) DH3 trong DMSO- $d_6$



Phổ  $^{13}\text{C}$  NMR giãn rộng DH3

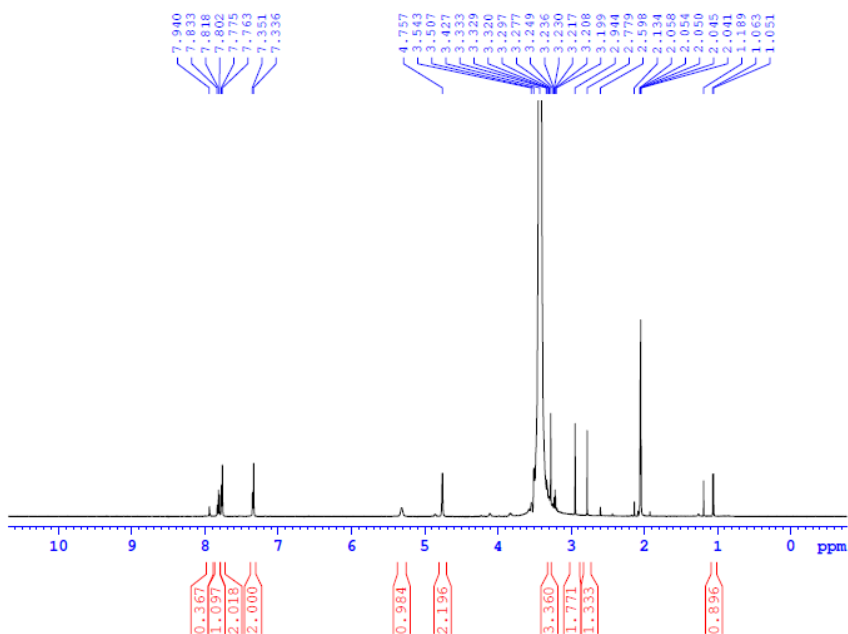


## Phổ DEPT 135 DH3

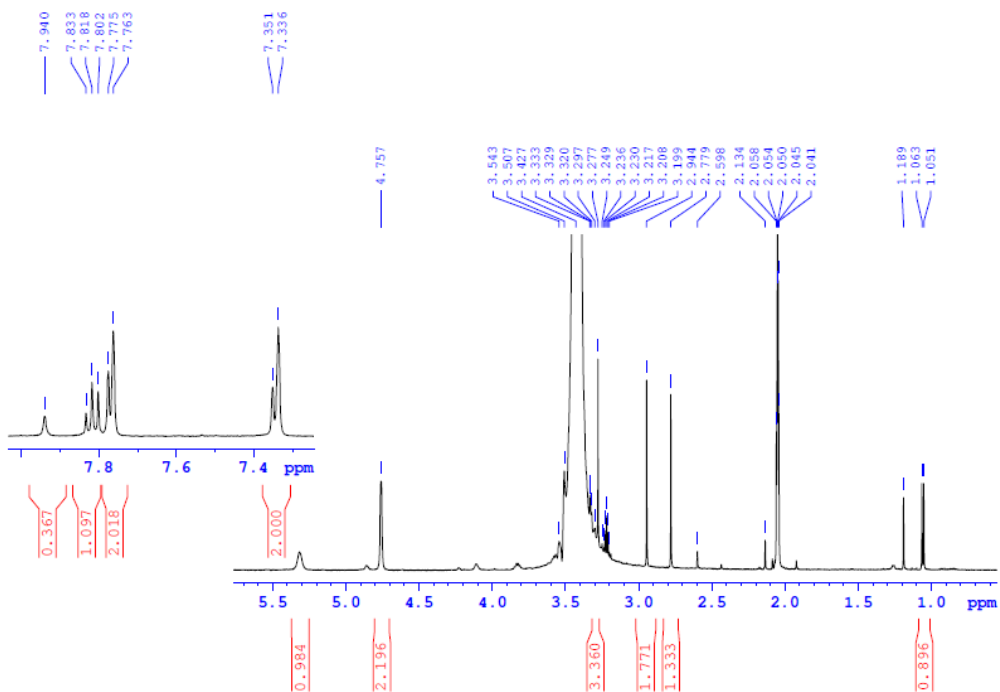


### PHỤ LỤC 1.4. Hợp chất DH4

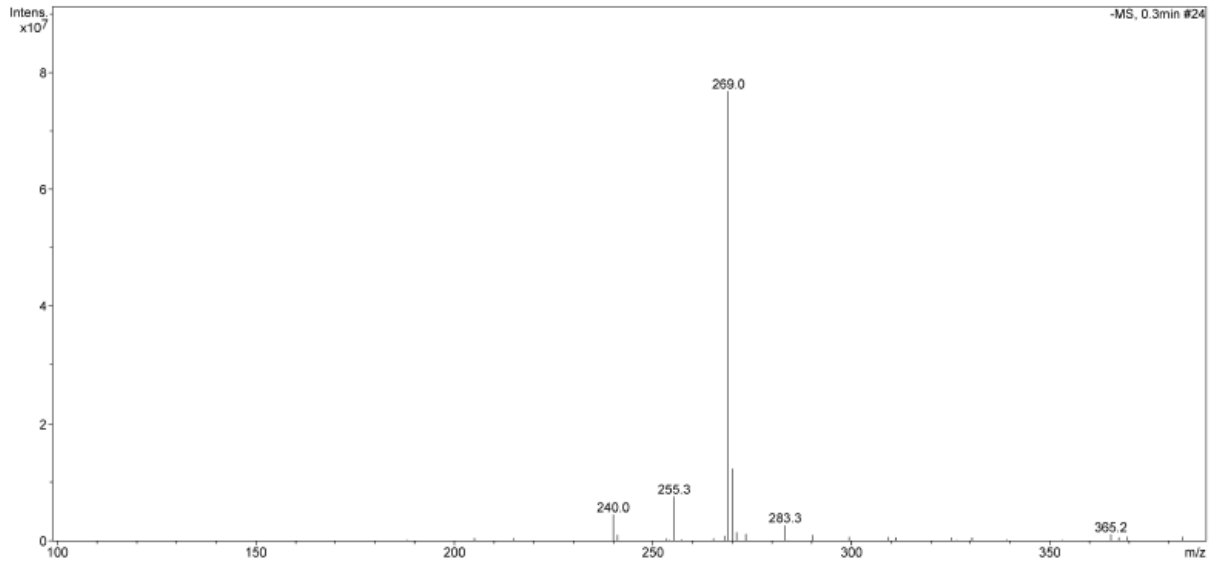
#### Phổ $^1\text{H}$ NMR (500 MHz) DH4 trong Acetone- $d_6$



#### Phổ $^1\text{H}$ NMR giãn rộng DH4

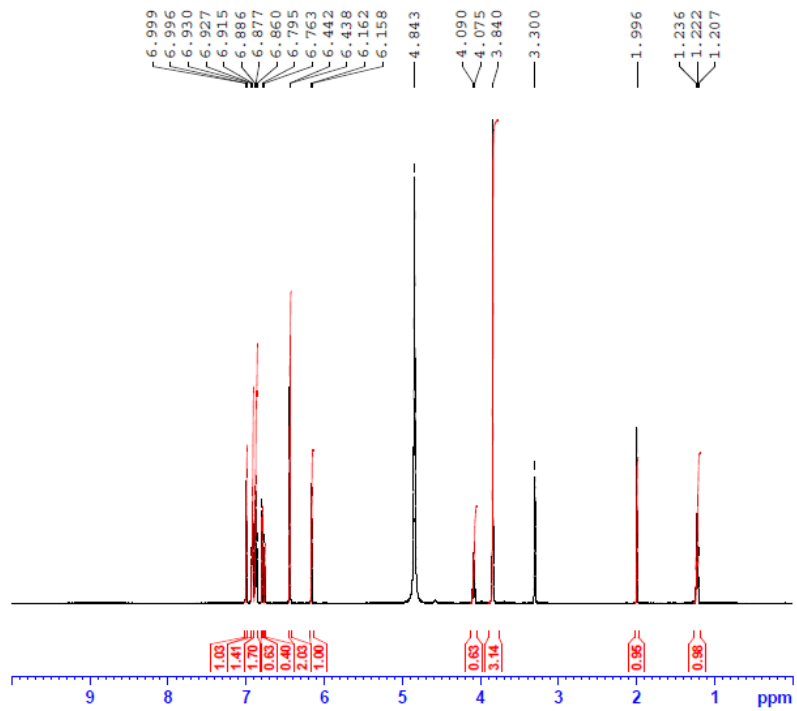


# Phổ MS DH4

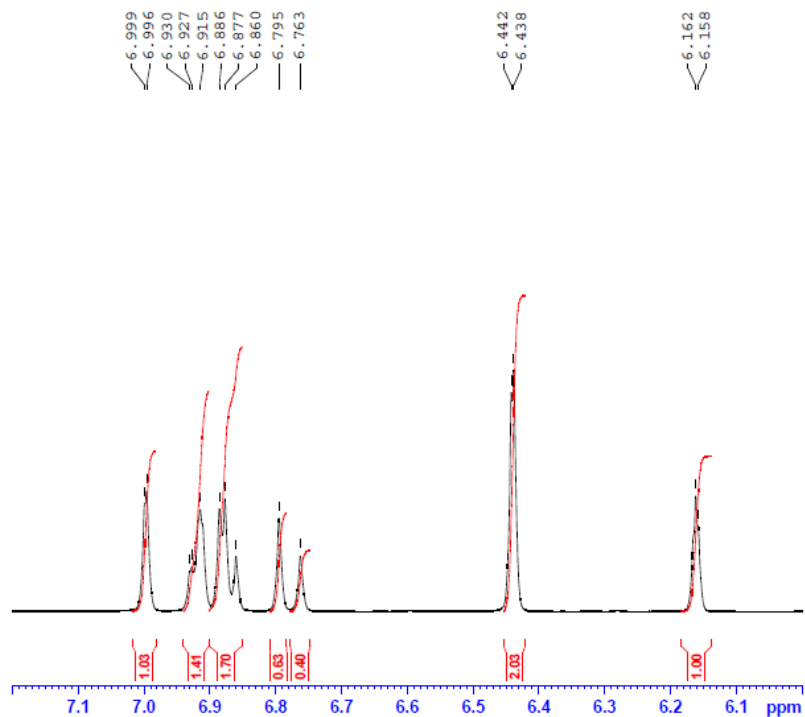


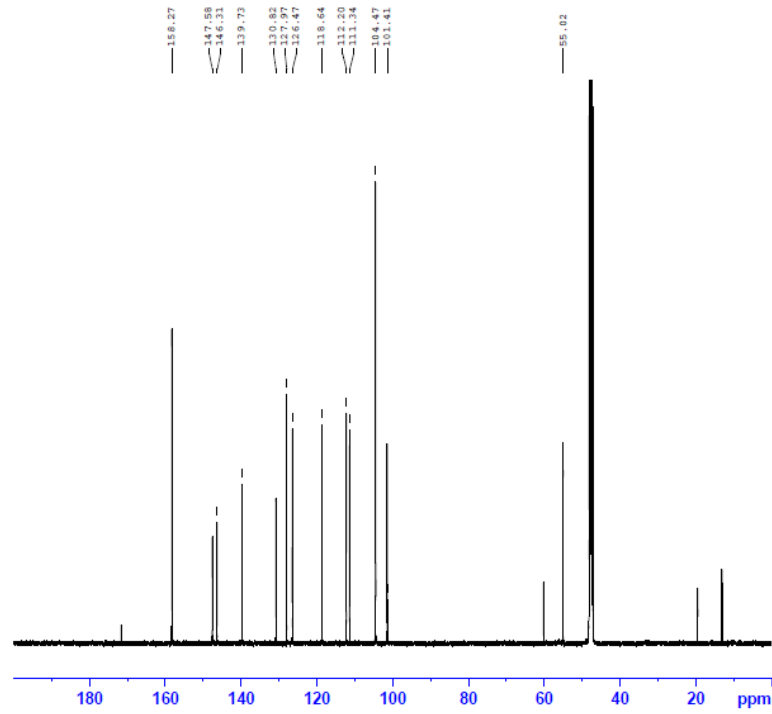
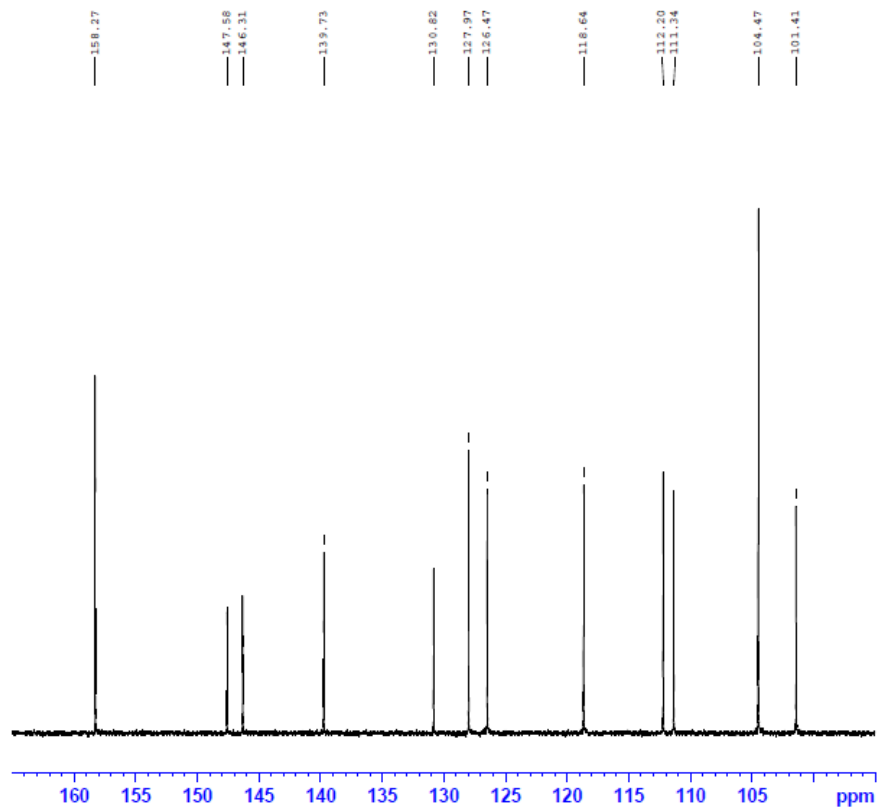
### PHỤ LỤC 1.5. Hợp chất DH5

#### Phổ $^1\text{H}$ NMR (500 MHz) DH5 trong $\text{CD}_3\text{OD}$



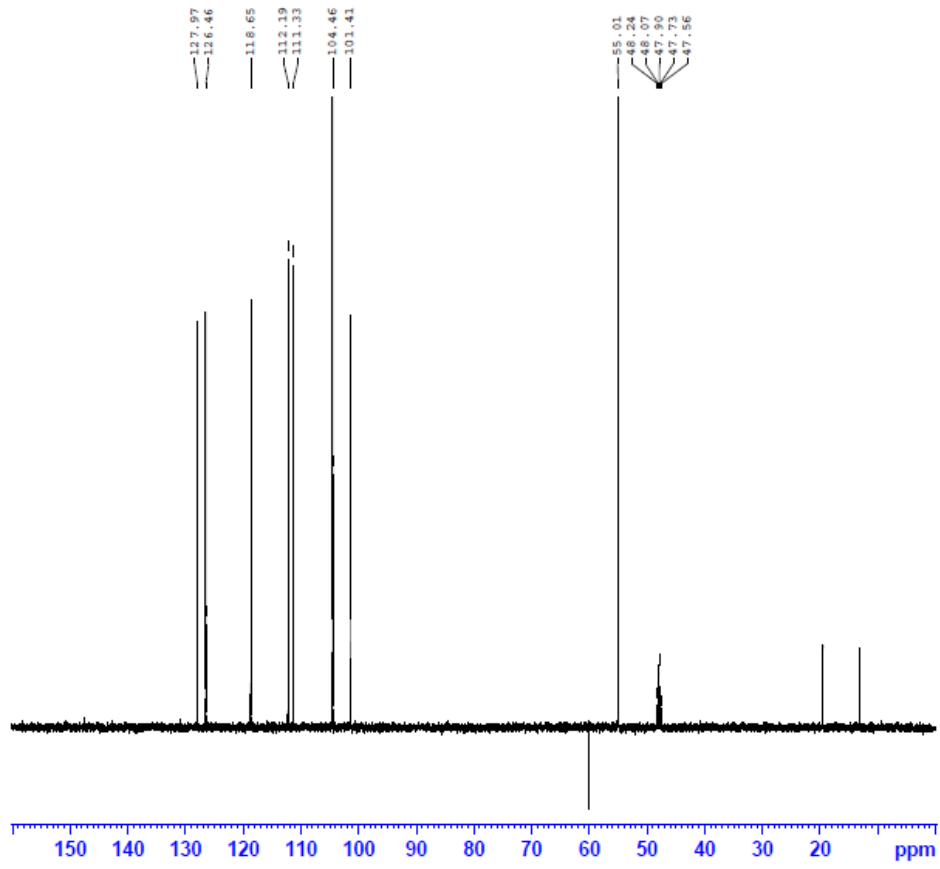
#### Phổ $^1\text{H}$ NMR giãn rộng DH5

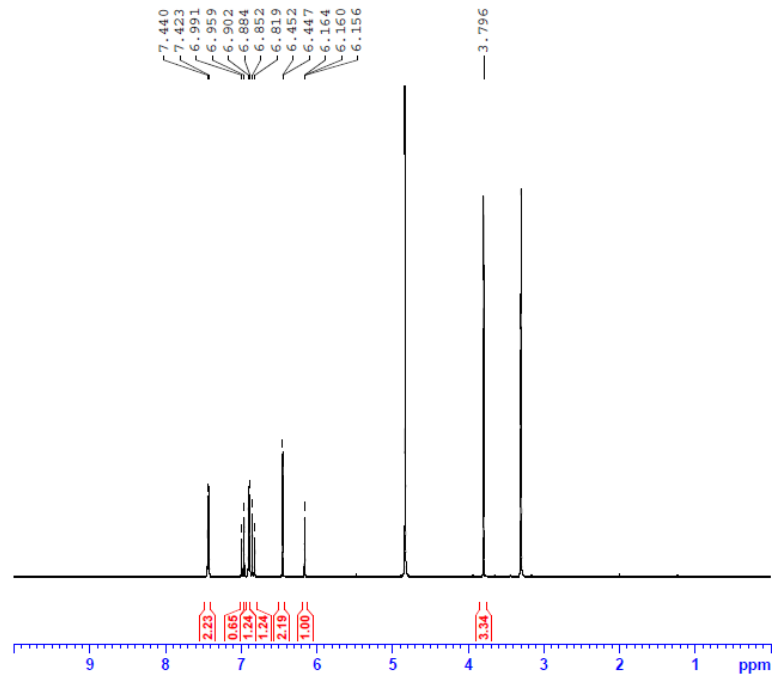
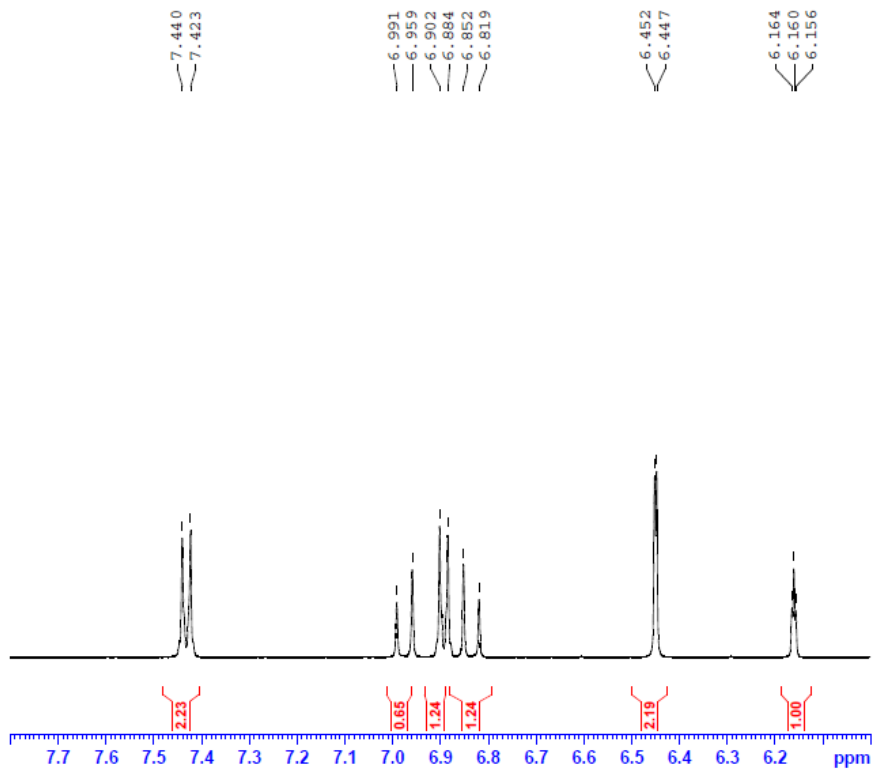


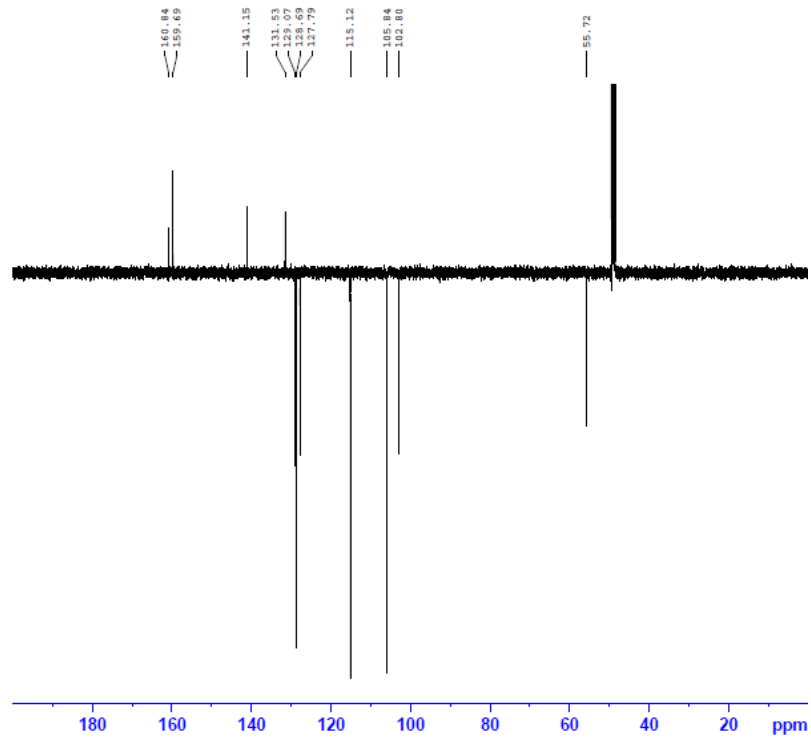
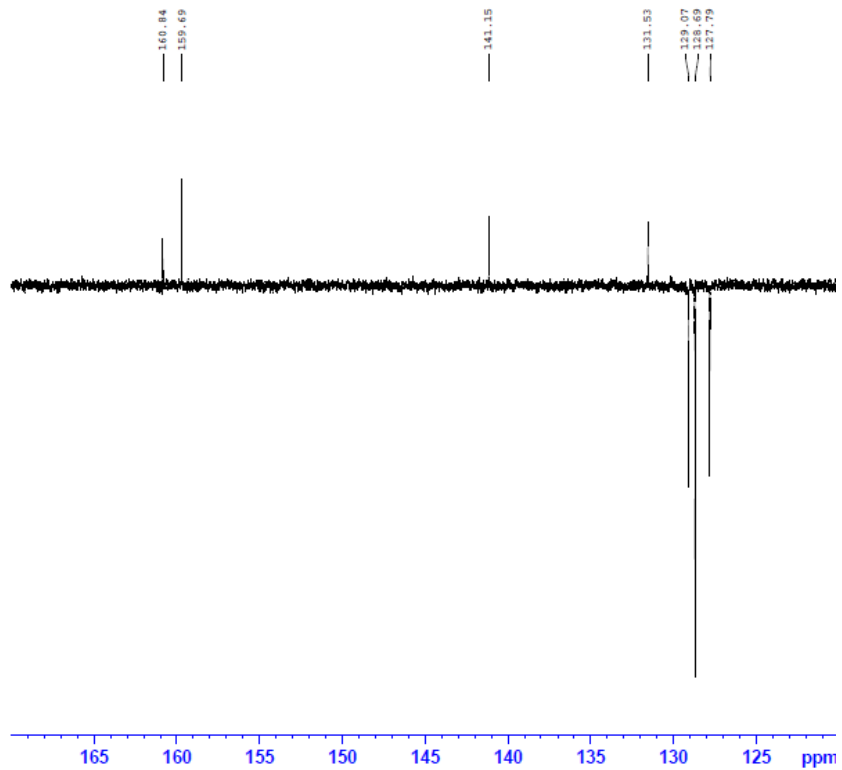
Phổ  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz) DH5 trong  $\text{CD}_3\text{OD}$ Phổ  $^{13}\text{C}$  NMR giãn rộng DH5



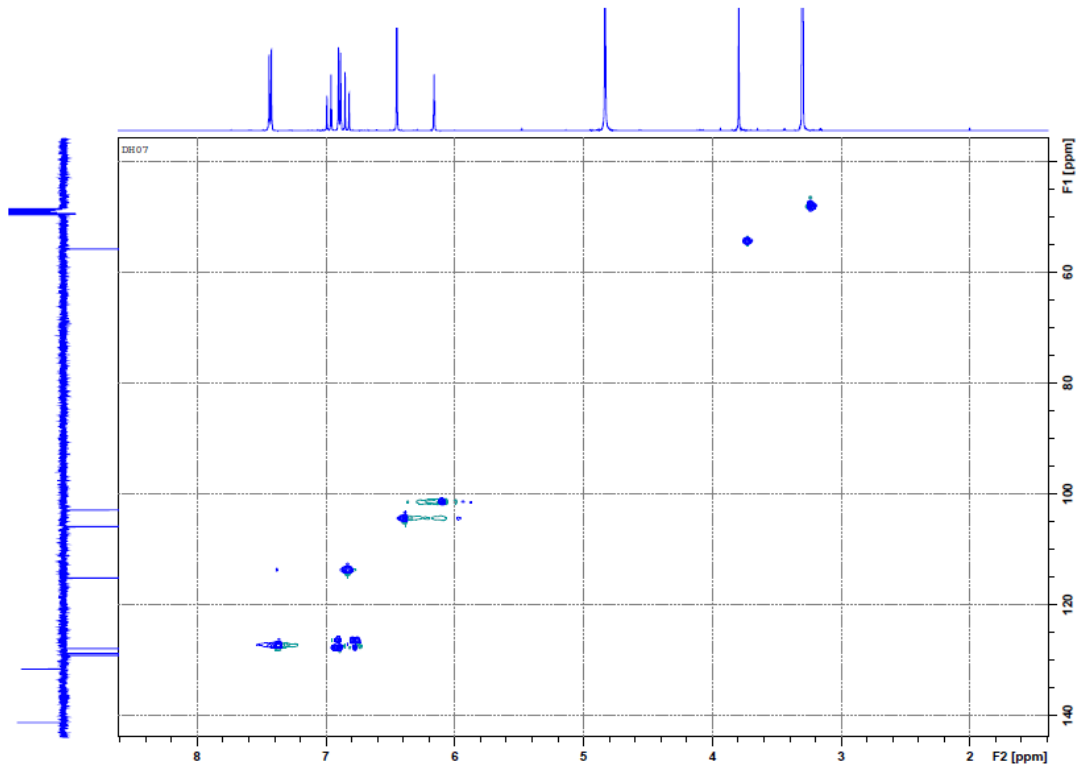
## Phổ DEPT 135 DH5



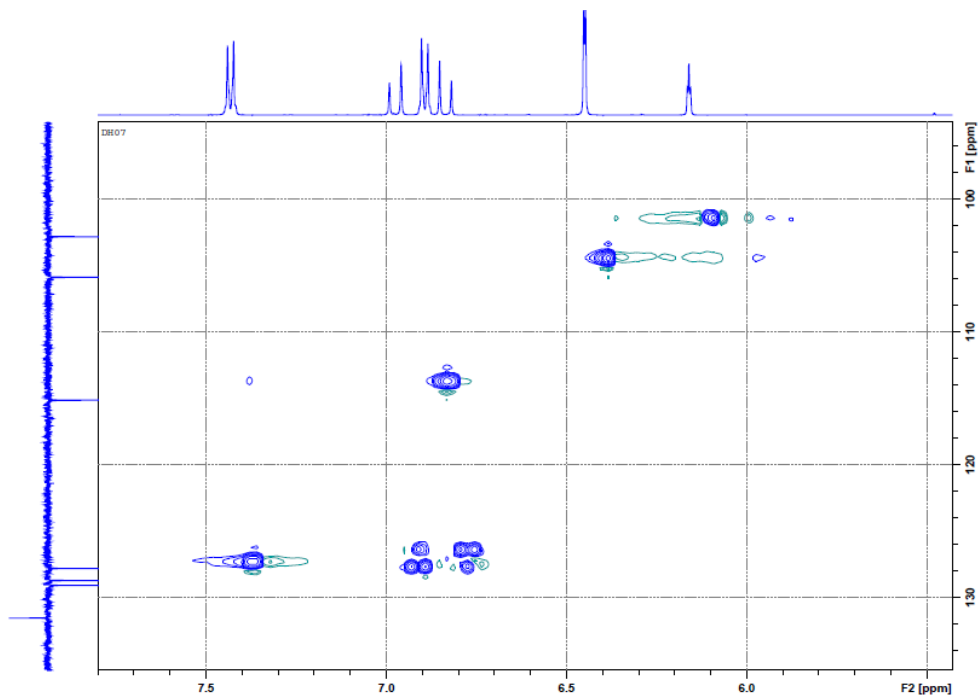
**PHỤ LỤC 1.6. Hợp chất DH6****Phổ  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz) DH6 trong  $\text{CD}_3\text{OD}$** **Phổ  $^1\text{H}$  NMR giãn rộng DH6**

**Phổ Jmod (125 MHz) DH06 trong CD<sub>3</sub>OD****Phổ Jmod giãn rộng DH06**

## Phổ HSQC DH06

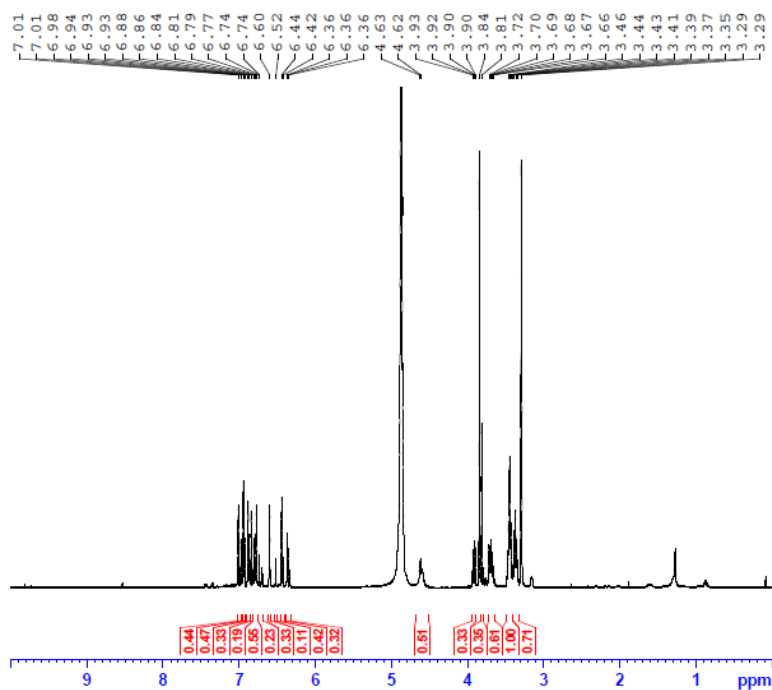


## Phổ HSQC giãn rộng DH06

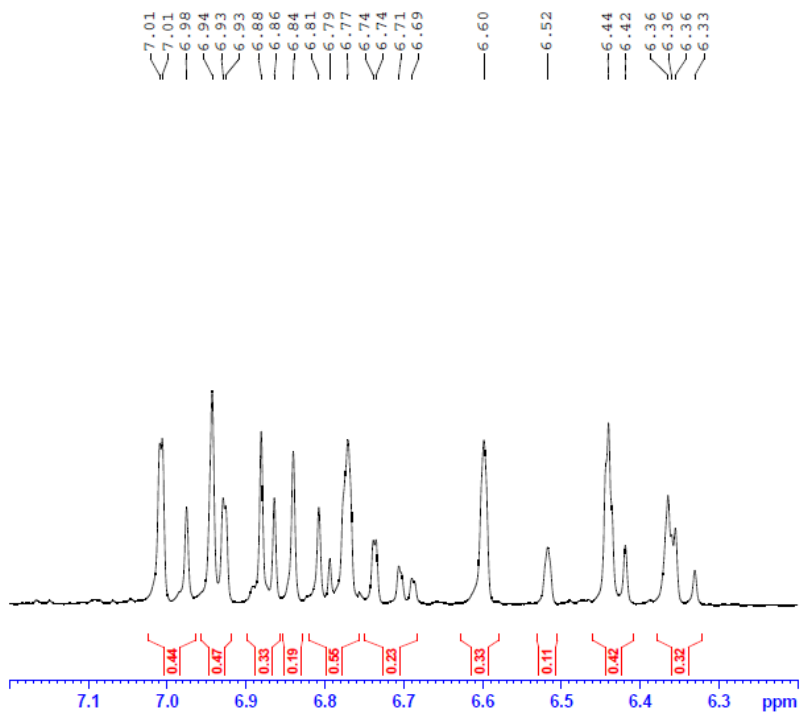


### PHỤ LỤC 1.7. Hợp chất DH7

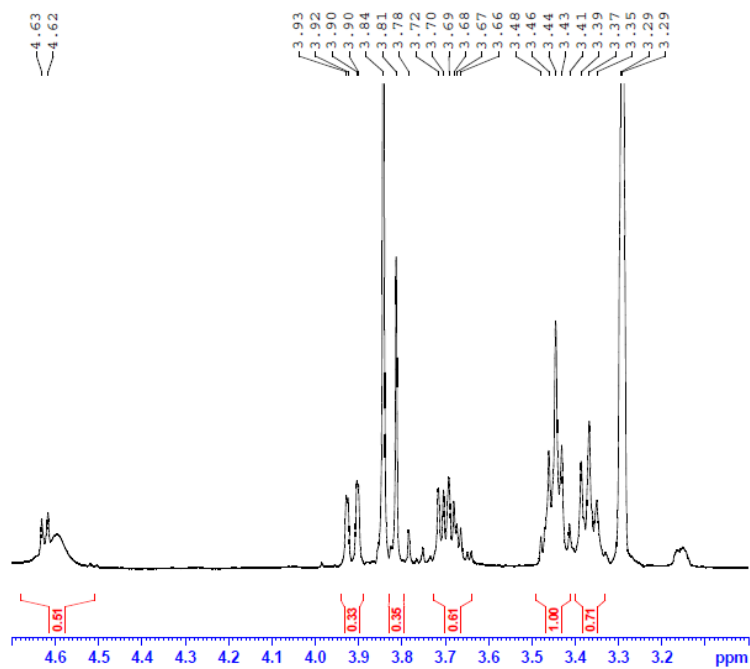
#### Phổ $^1\text{H}$ NMR (500 MHz) DH7 trong $\text{CD}_3\text{OD}$



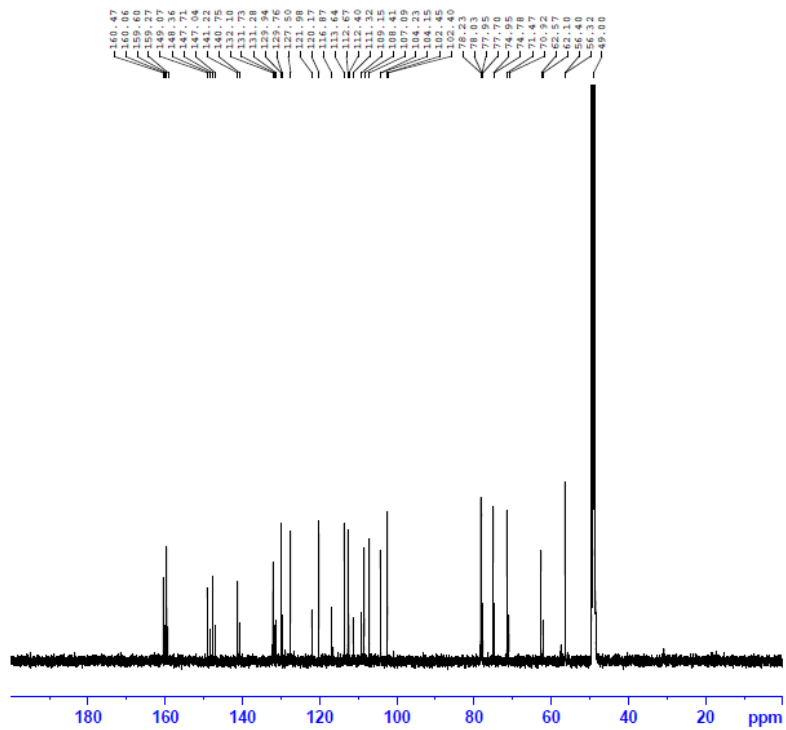
#### Phổ $^1\text{H}$ NMR giãn rộng DH7

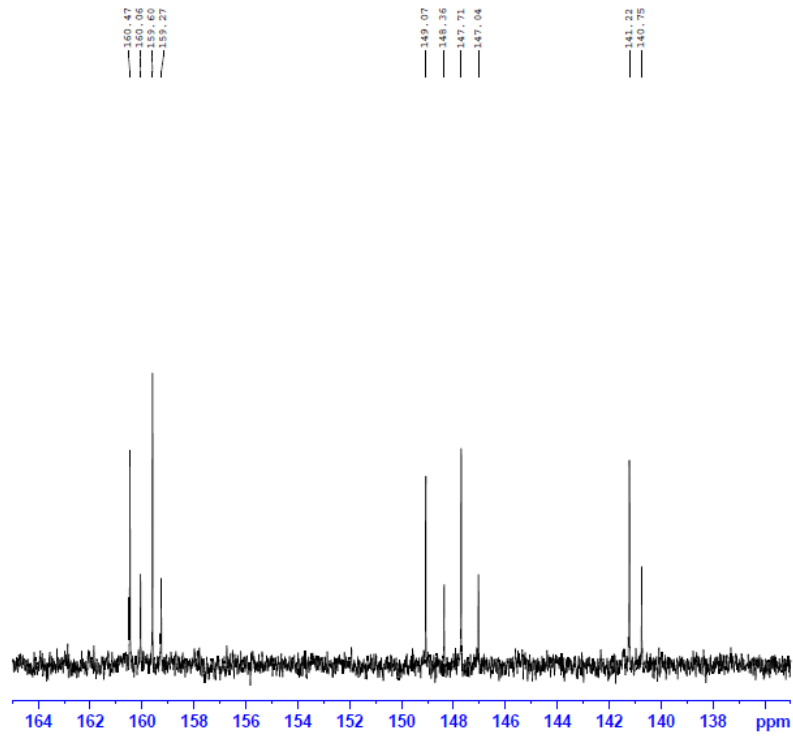
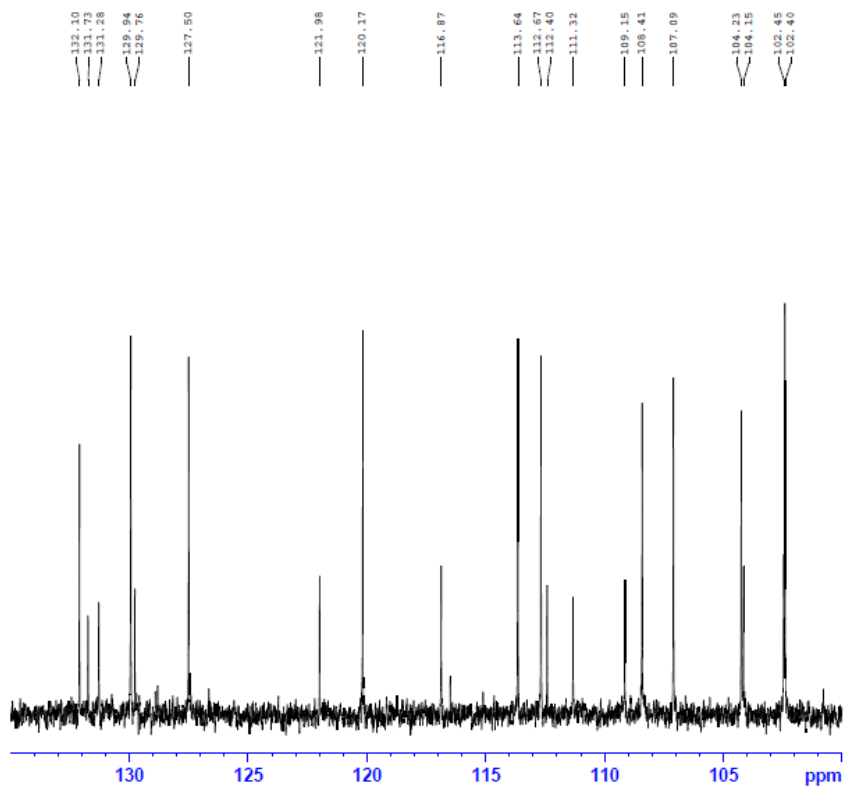


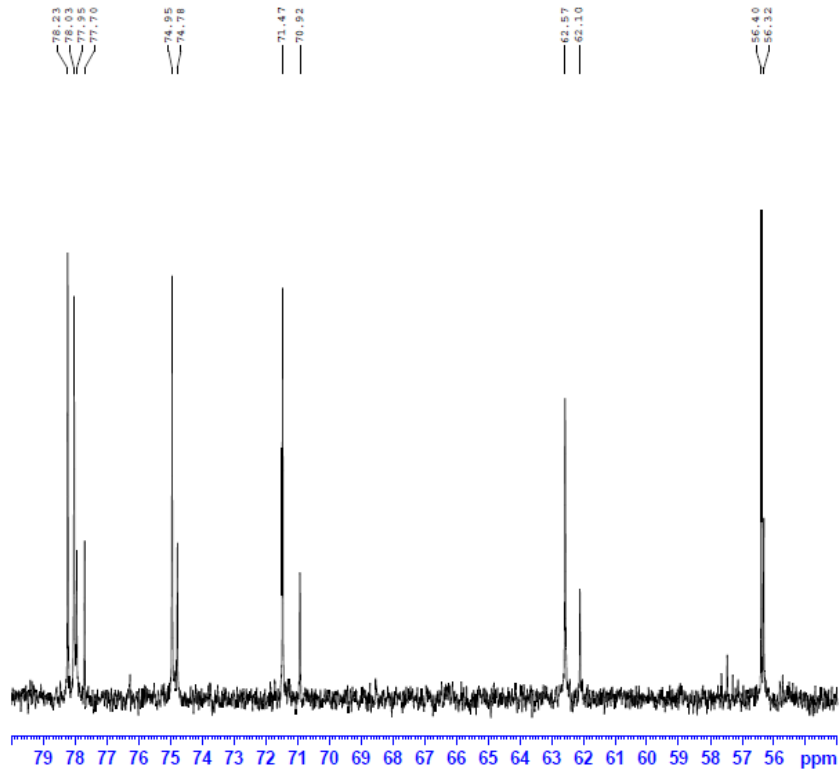
### Phổ $^1\text{H}$ NMR giãn rộng DH7



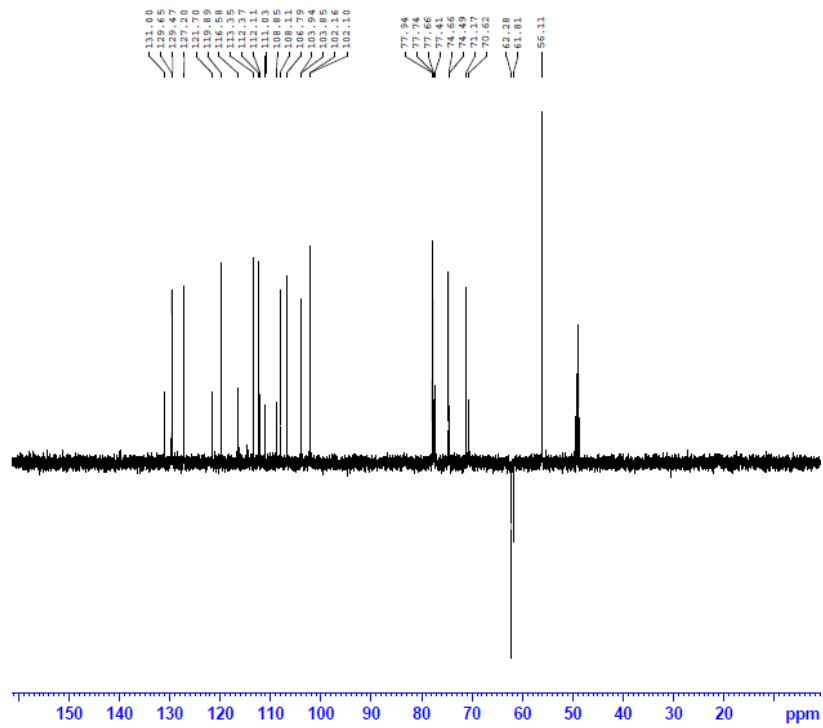
### Phổ $^{13}\text{C}$ NMR (125 MHz) DH7 trong $\text{CD}_3\text{OD}$



Phổ  $^{13}\text{C}$  NMR giãn rộng DH7Phổ  $^{13}\text{C}$  NMR giãn rộng DH7



Phổ  $^{13}\text{C}$  NMR giãn rộng DH7



Phổ DEPT 135 DH7



**PHỤ LỤC 1.8. Hợp chất RT1**

(Xem phổ DH1)

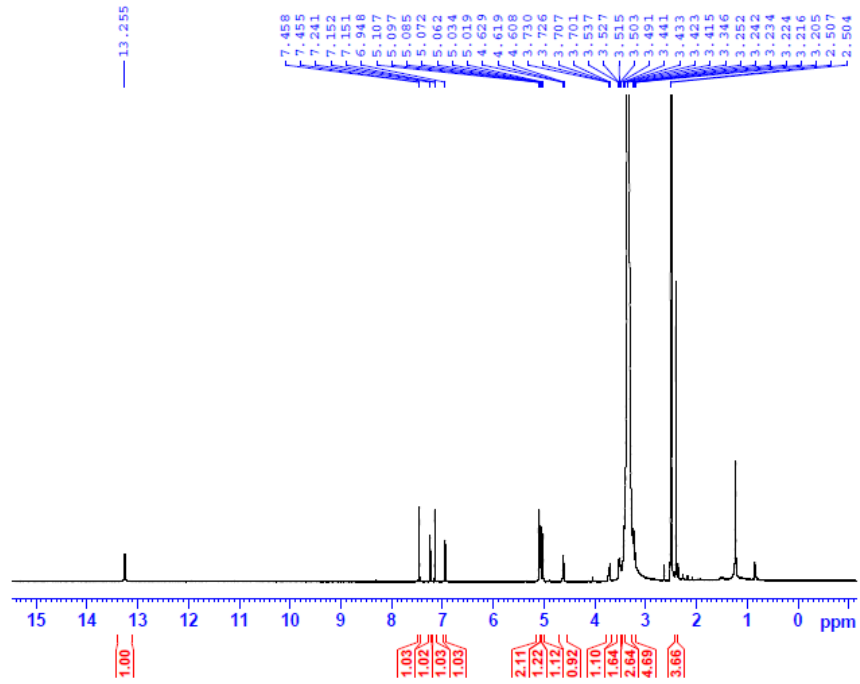
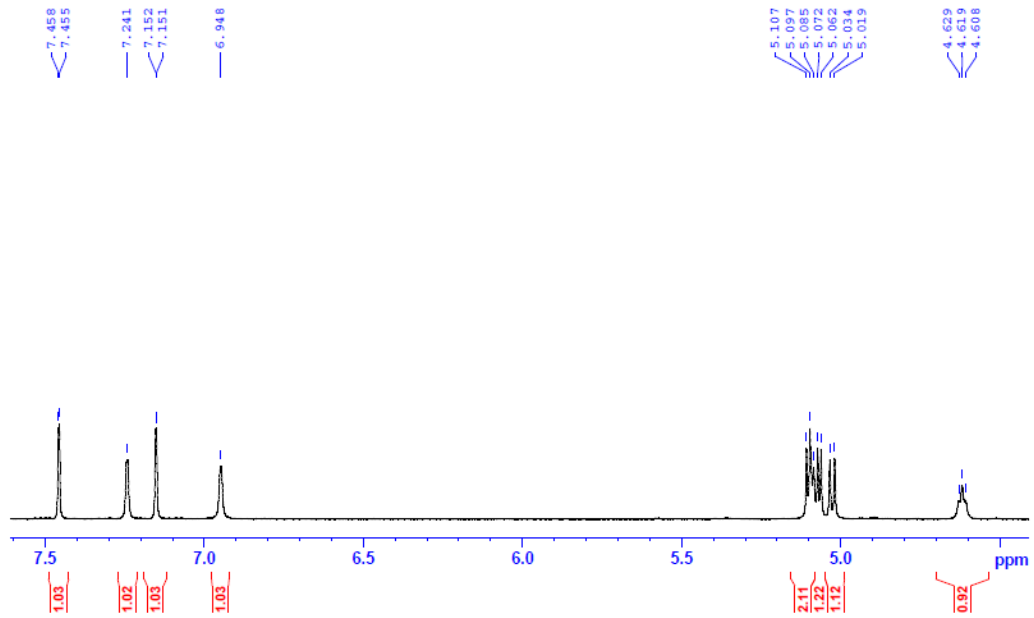
**PHỤ LỤC 1.9. Hợp chất RT2**

(Xem phổ DH2)

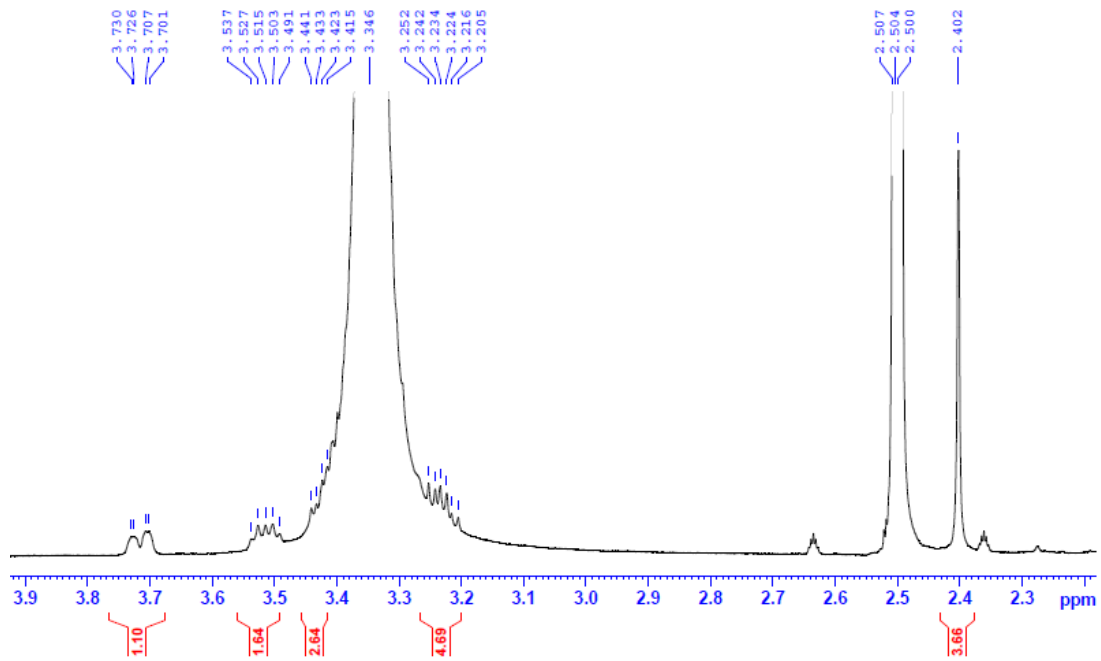
**PHỤ LỤC 1.10. Hợp chất RT3**

(Xem phổ DH3)

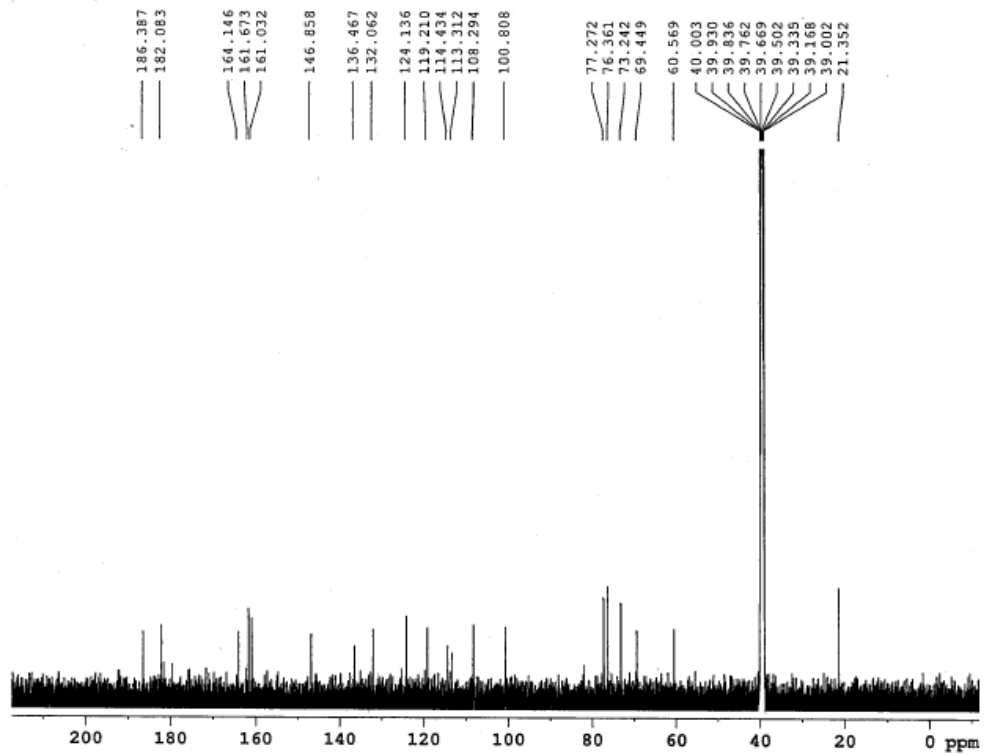
## PHỤ LỤC 1.11. Hợp chất RT4

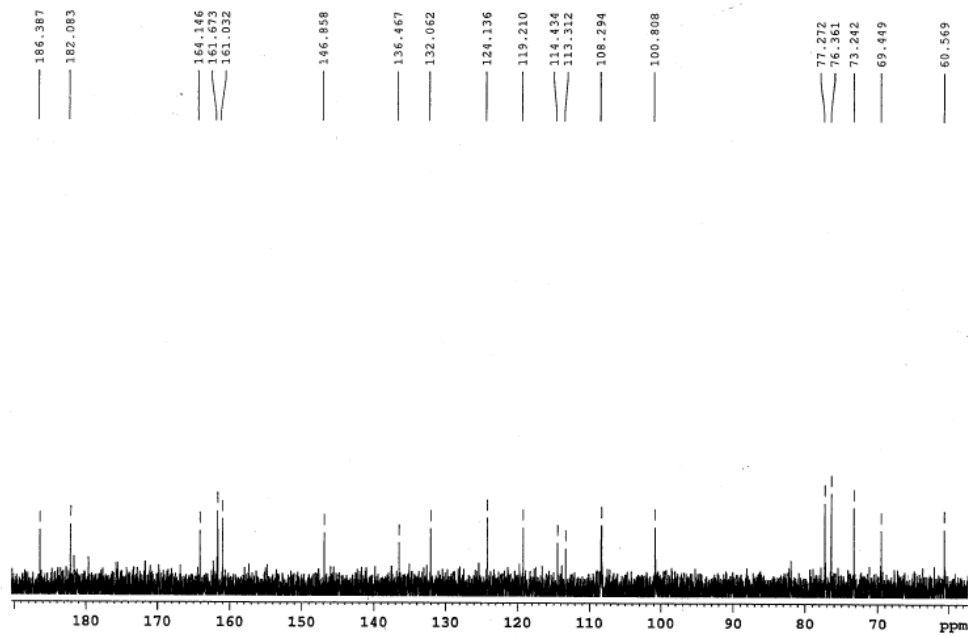
Phổ  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz) RT4 trong  $\text{DMSO-}d_6$ Phổ  $^1\text{H}$  NMR giãn rộng RT4

### Phổ $^1\text{H}$ NMR giãn rộng RT4

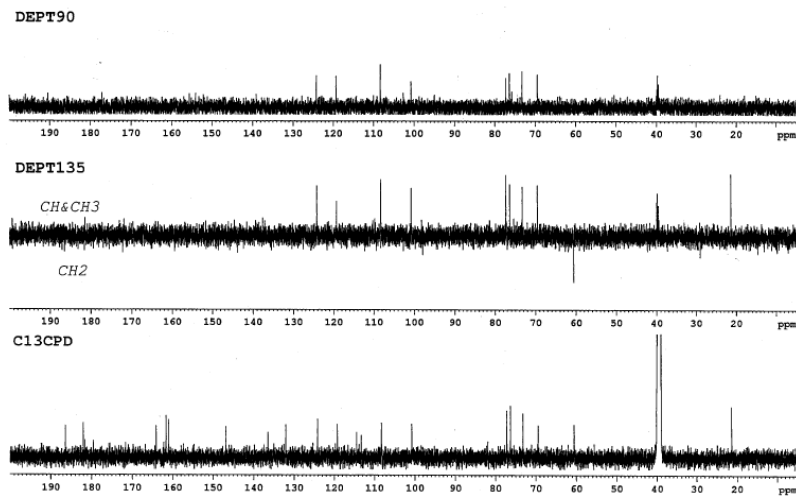


### Phổ $^{13}\text{C}$ NMR (125 MHz) RT4 trong $\text{DMSO}-d_6$



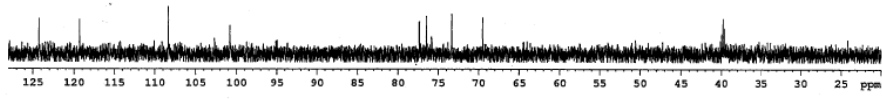
Phổ  $^{13}\text{C}$  NMR giãn rộng RT4

## Phổ DEPT 135 RT4

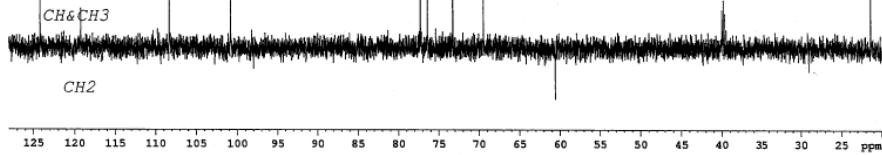


## Phổ DEPT 135 giãn rộng RT4

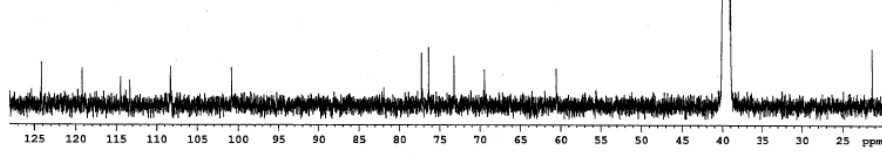
DEPT90



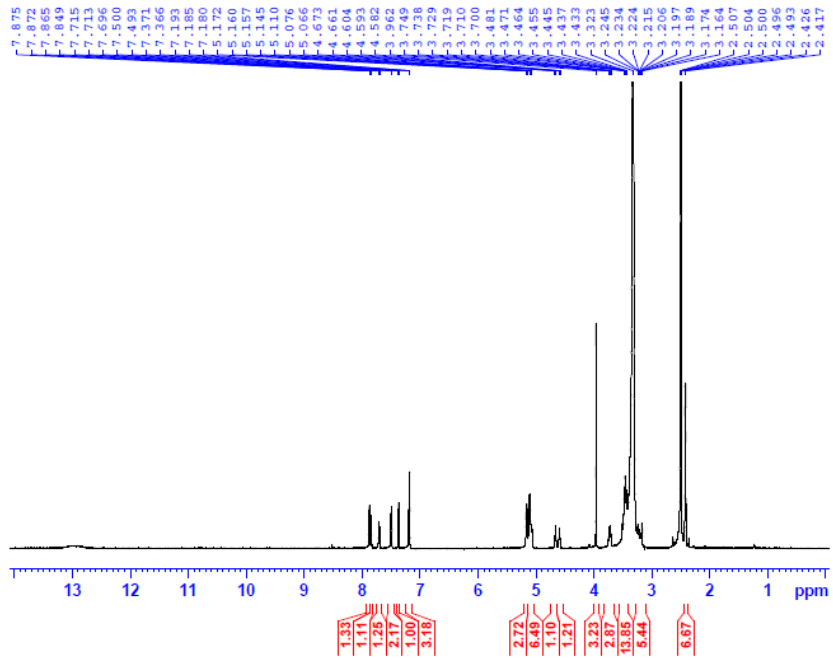
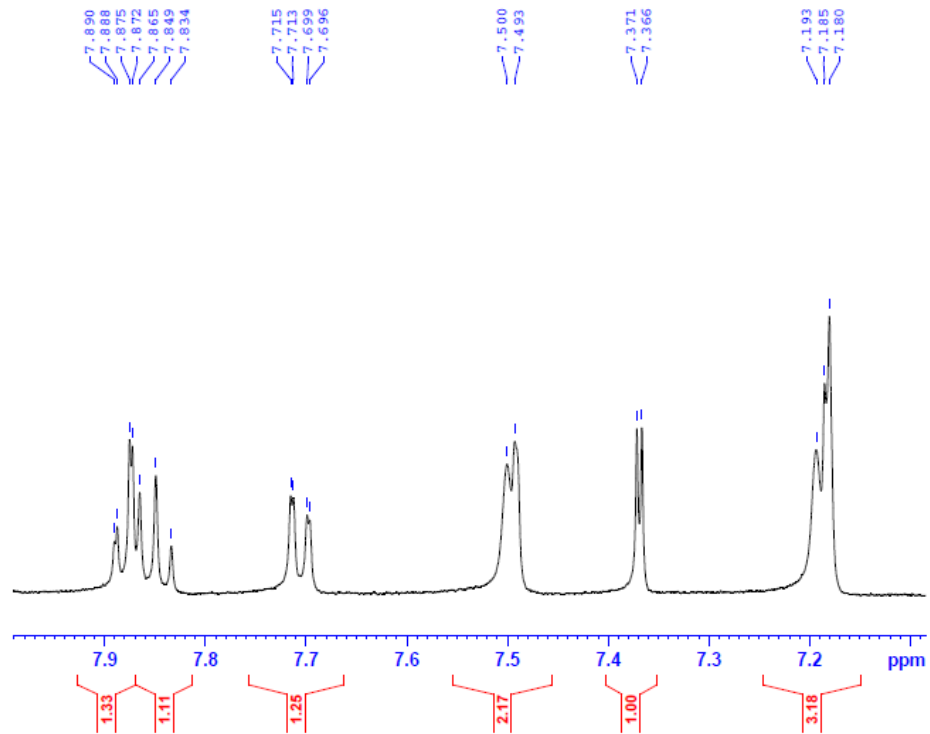
DEPT135



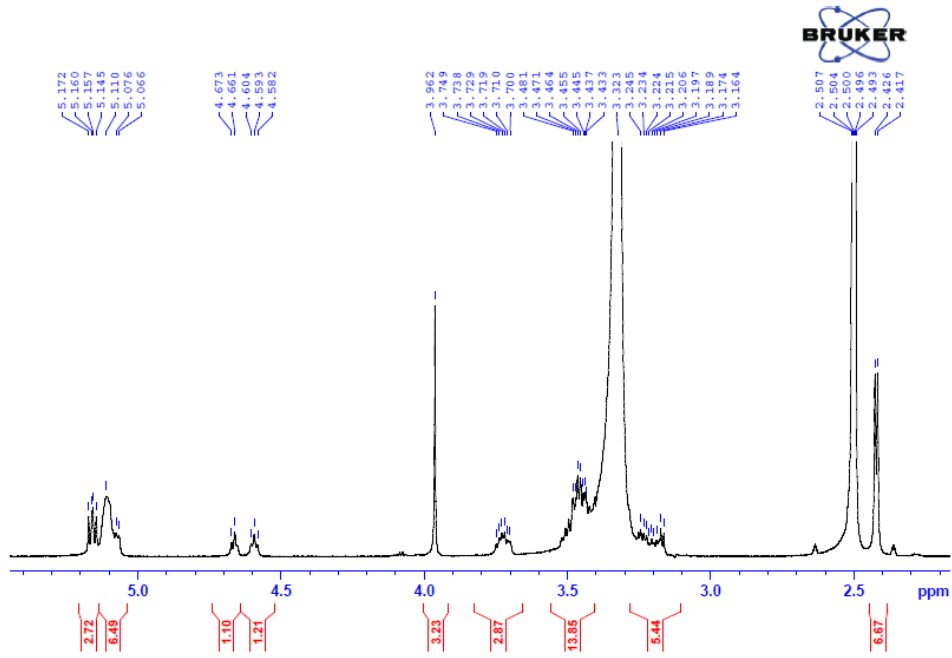
C13CPD



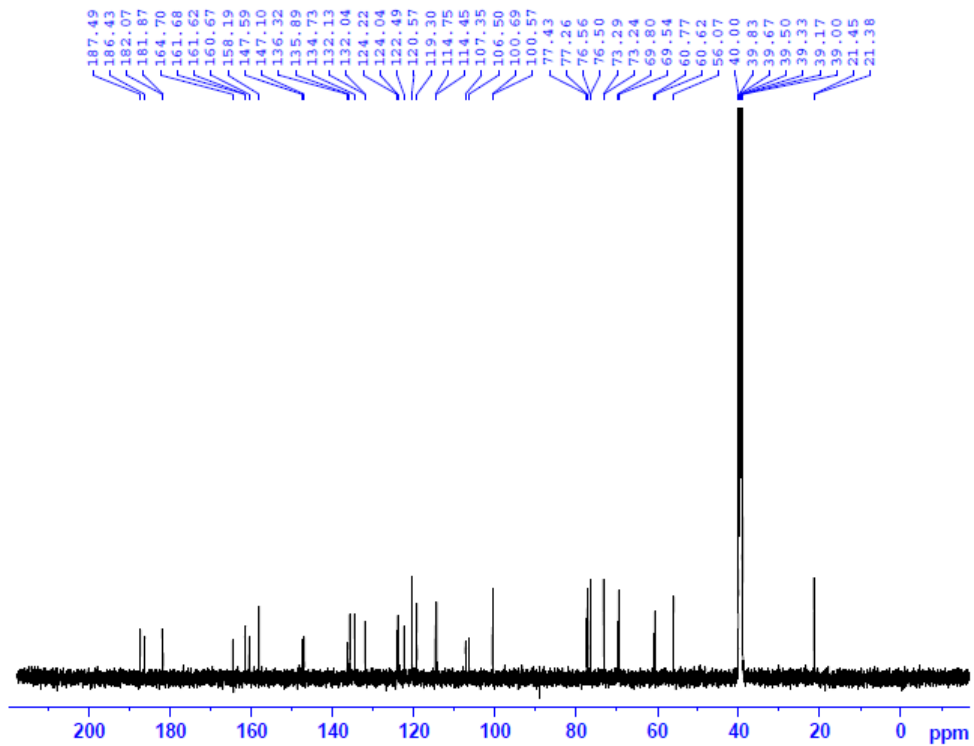
## PHỤ LỤC 1.12 Hợp chất RT5

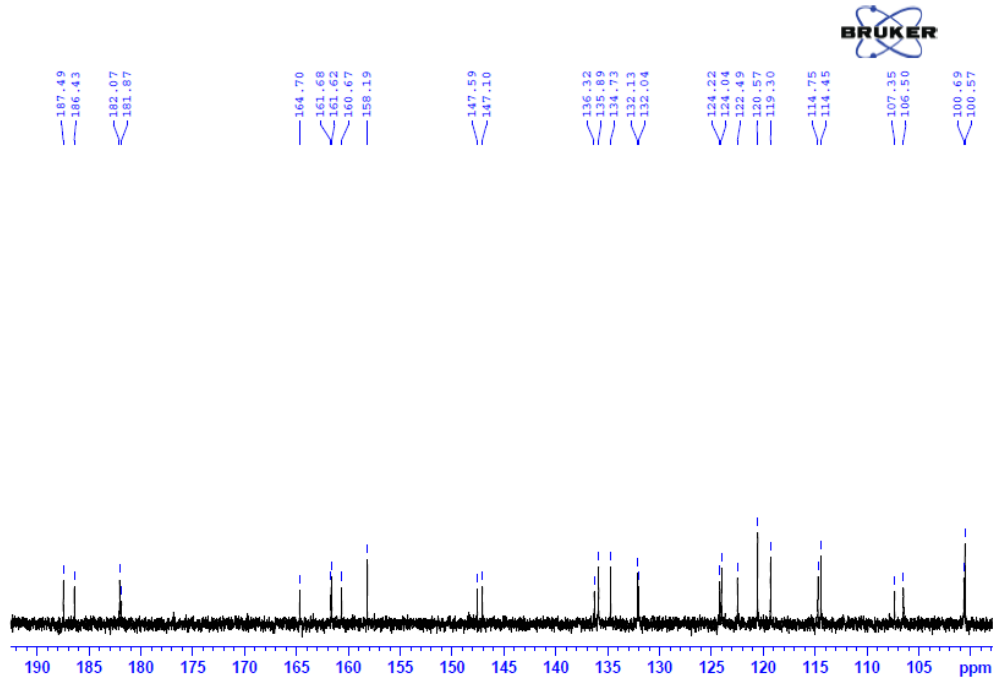
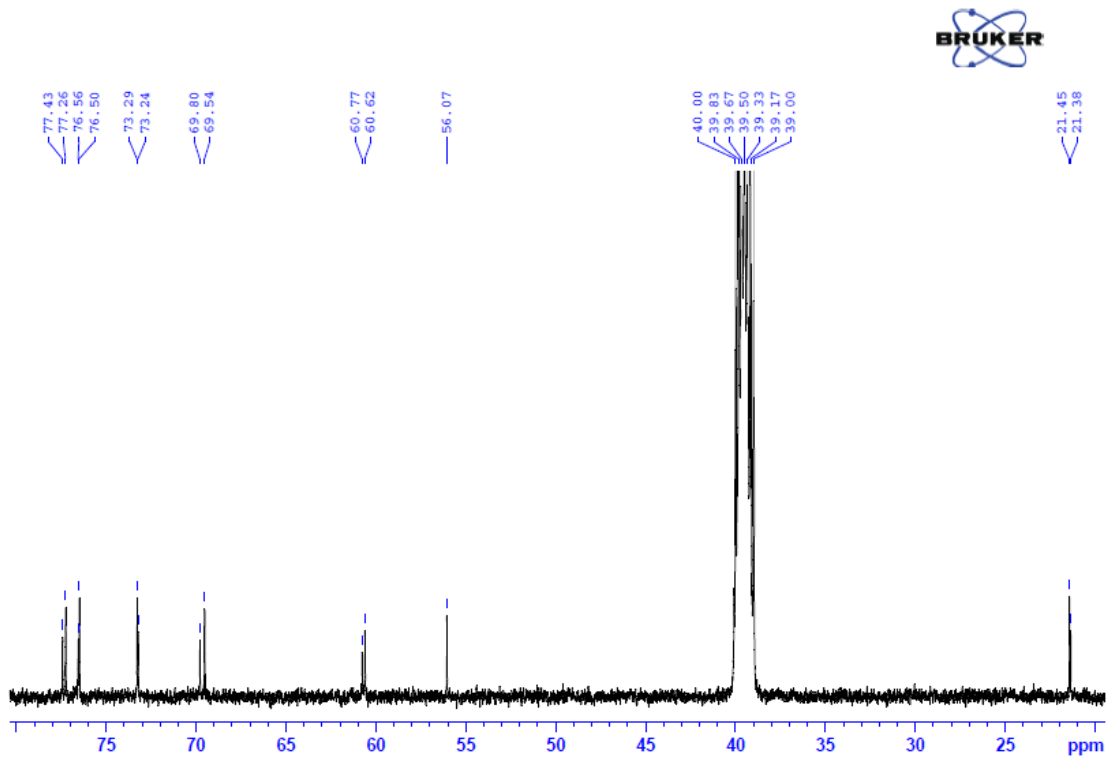
Phổ  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz) RT5 trong  $\text{DMSO-}d_6$ Phổ  $^1\text{H}$  NMR giãn rộng RT5

### Phổ $^1\text{H}$ NMR giãn rộng RT5



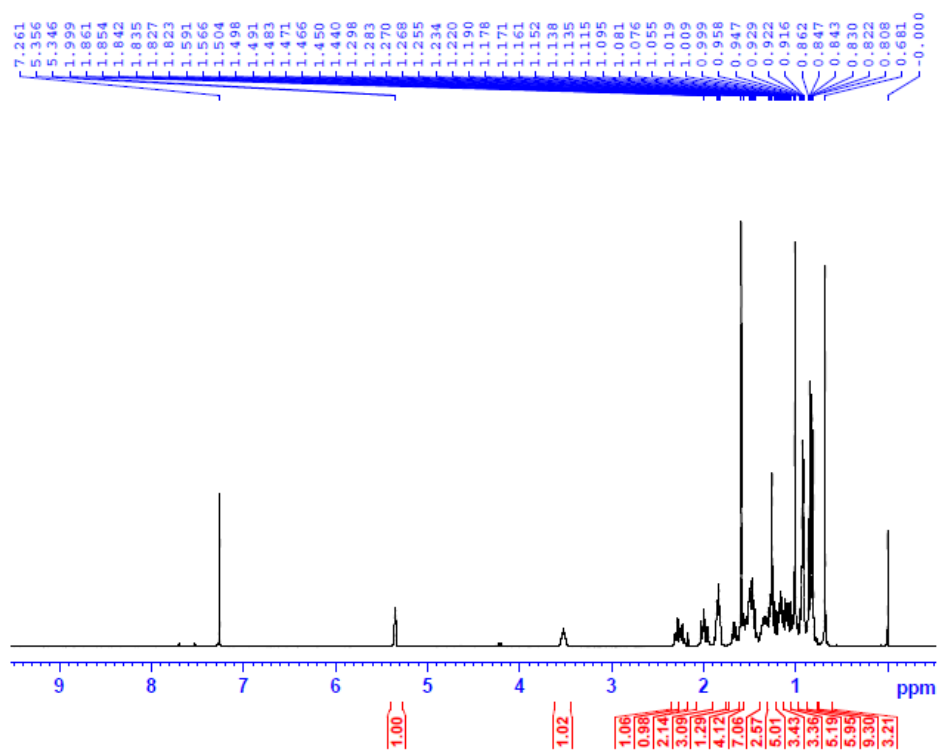
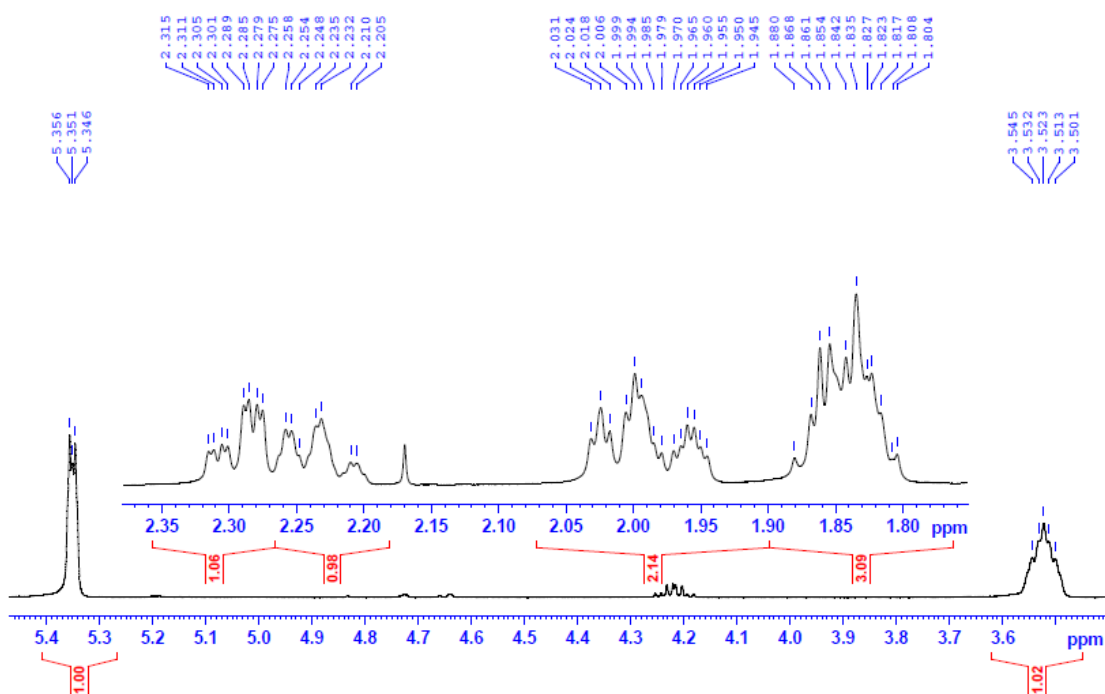
### Phổ $^{13}\text{C}$ NMR (125 MHz) RT5 trong $\text{DMSO-}d_6$

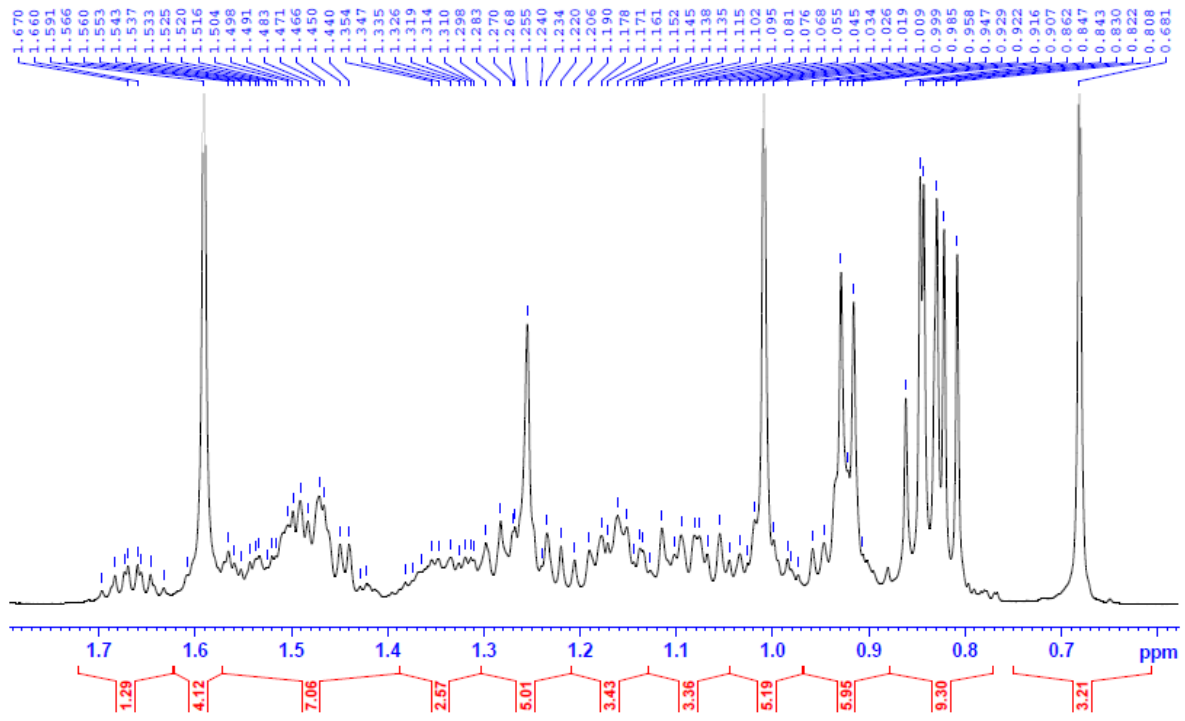


Phổ  $^{13}\text{C}$  NMR giãn rộng RT5Phổ  $^{13}\text{C}$  NMR giãn rộng RT5

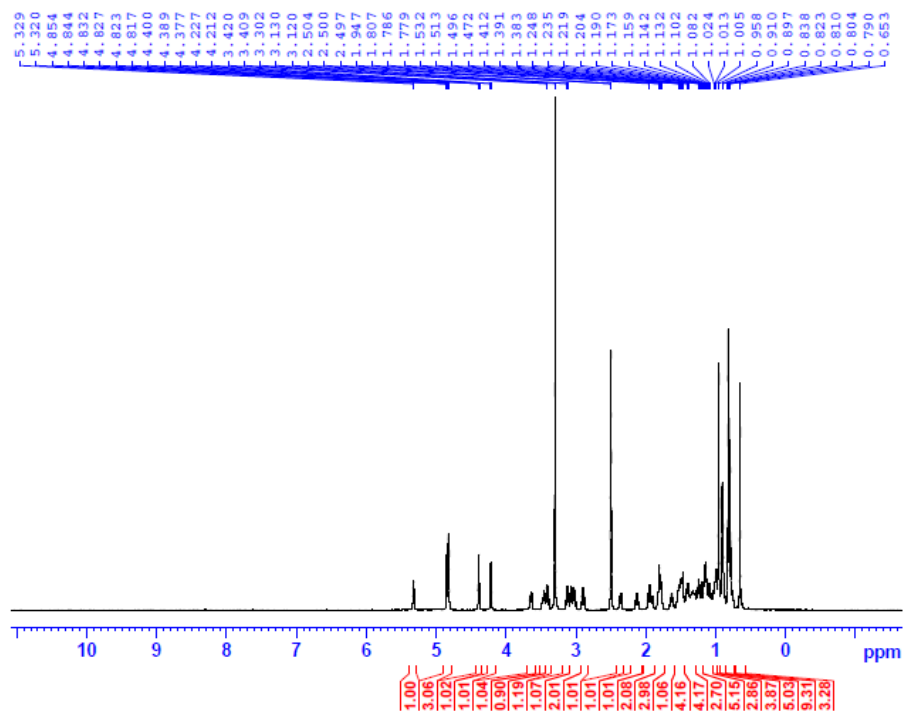
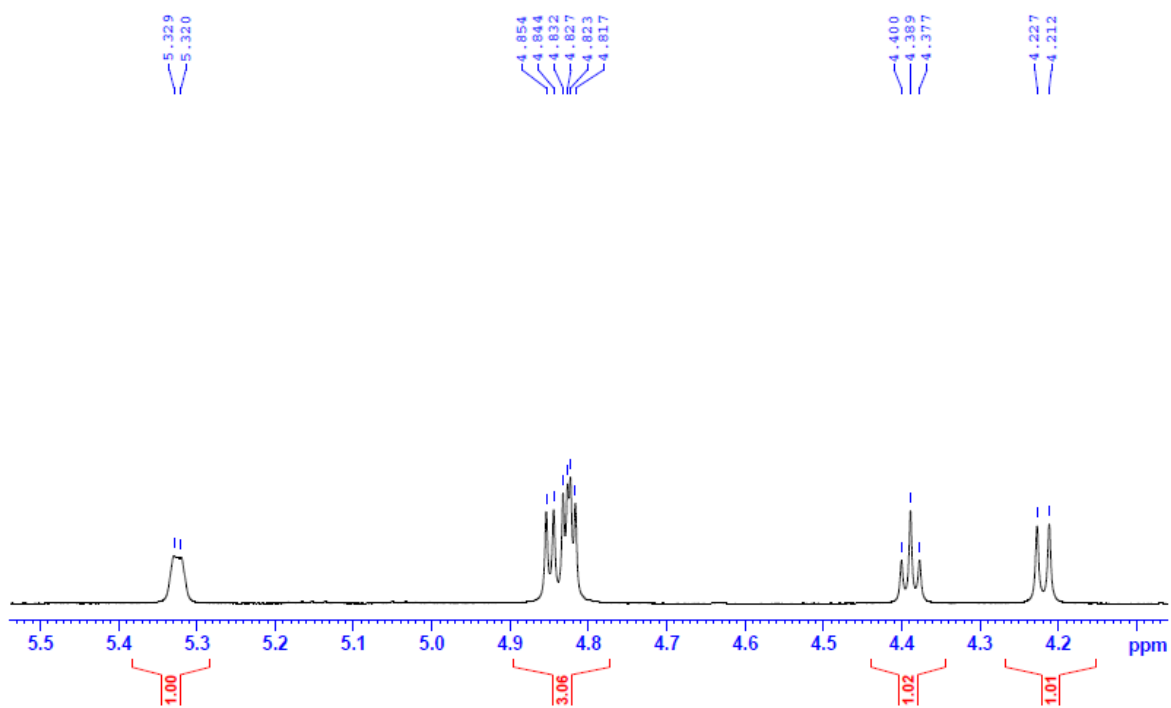


## PHỤ LỤC 1.13. Hợp chất RT6

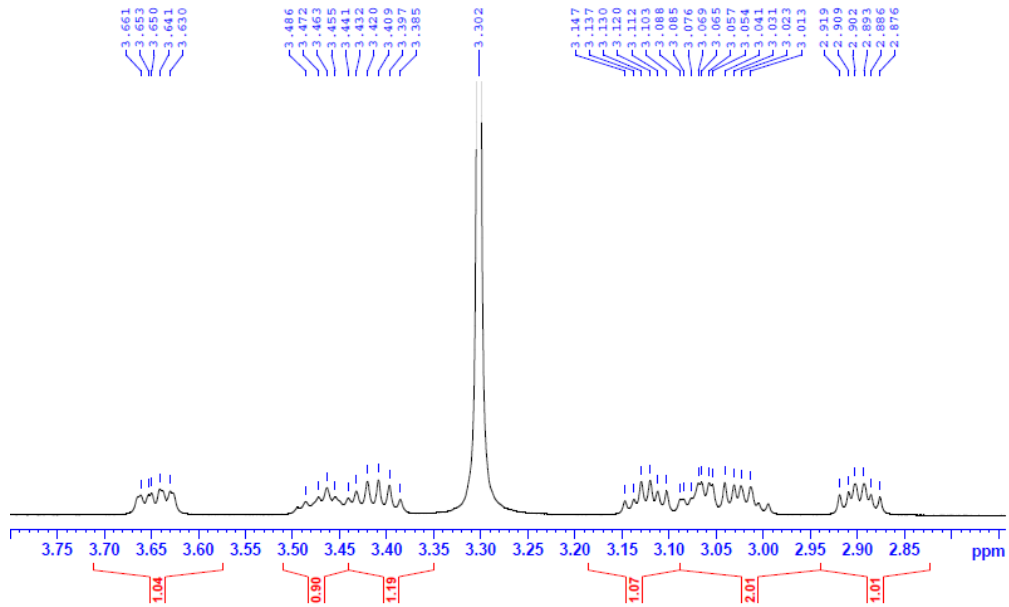
Phổ  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz) RT6 trong  $\text{CDCl}_3$ Phổ  $^1\text{H}$  NMR giãn rộng RT6

Phổ  $^1\text{H}$  NMR giãn rộng RT6

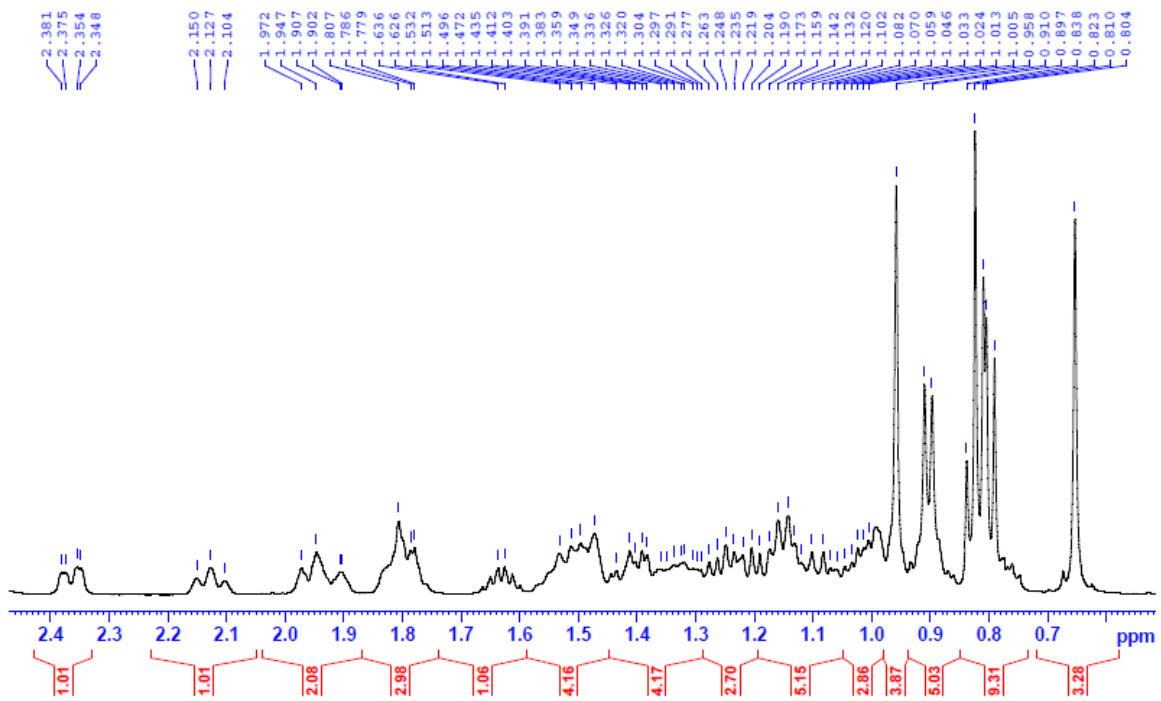
## PHỤ LỤC 1.14. Hợp chất RT7

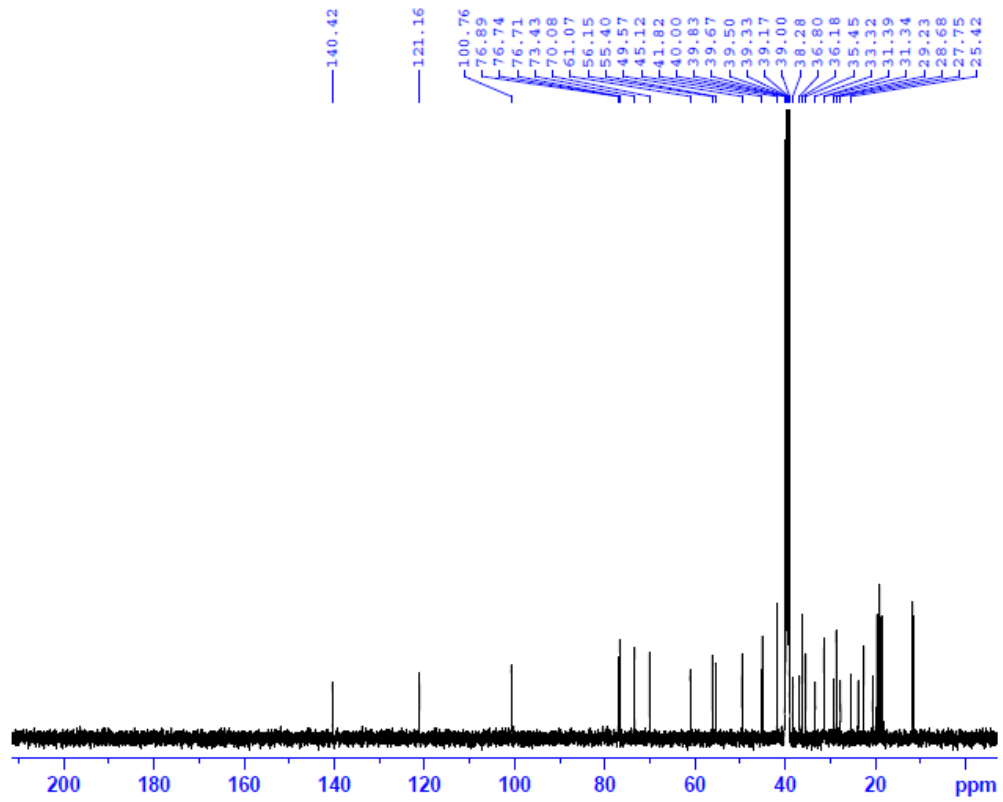
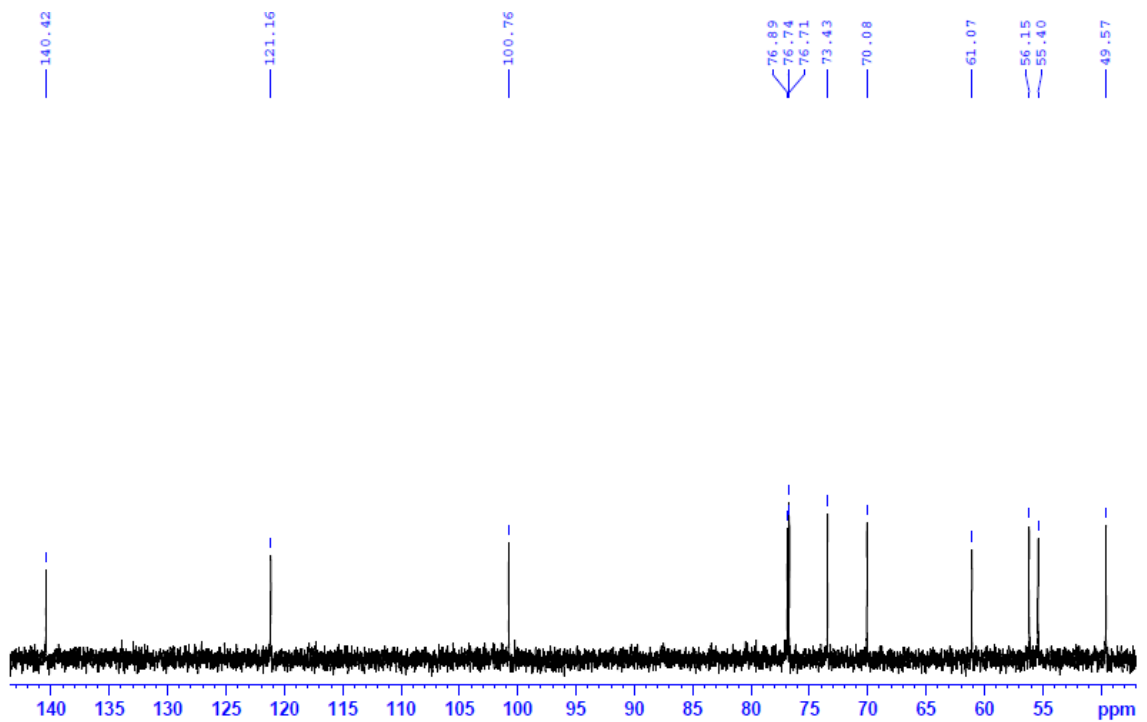
Phổ  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz) RT7 trong  $\text{DMSO-}d_6$ Phổ  $^1\text{H}$  NMR giãn rộng RT7

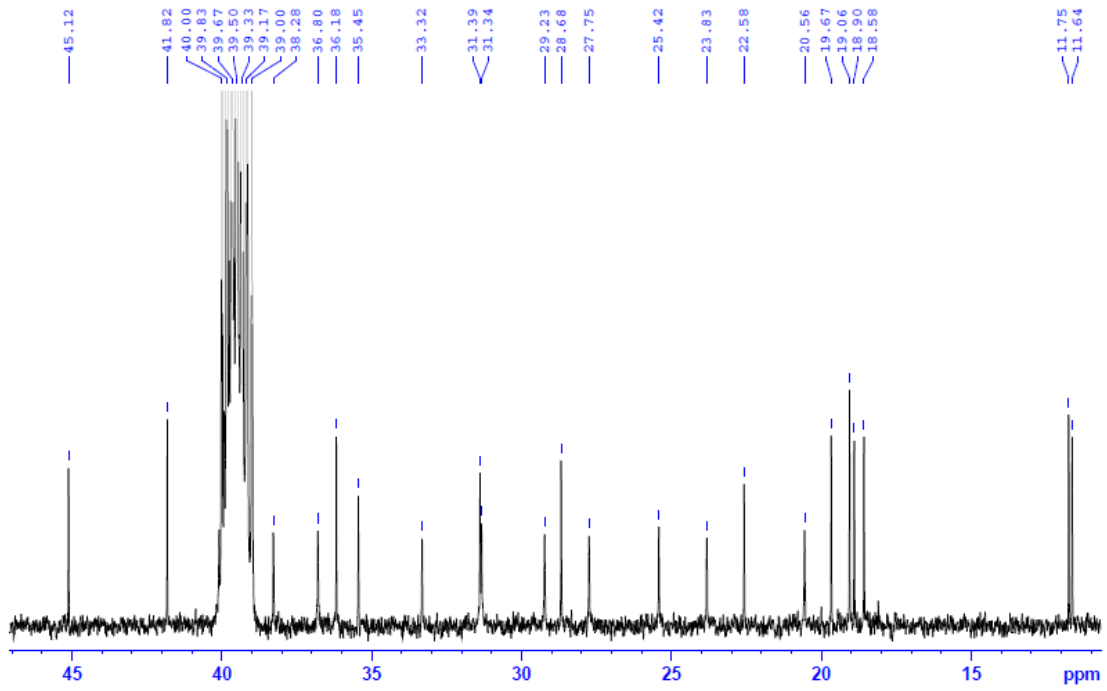
### Phổ $^1\text{H}$ NMR giãn rộng RT7

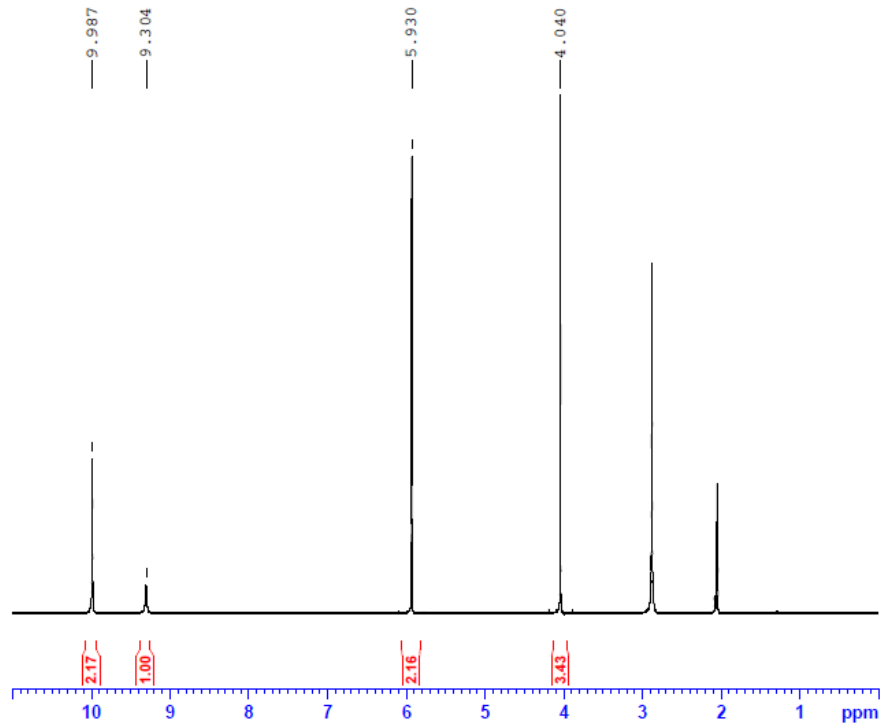


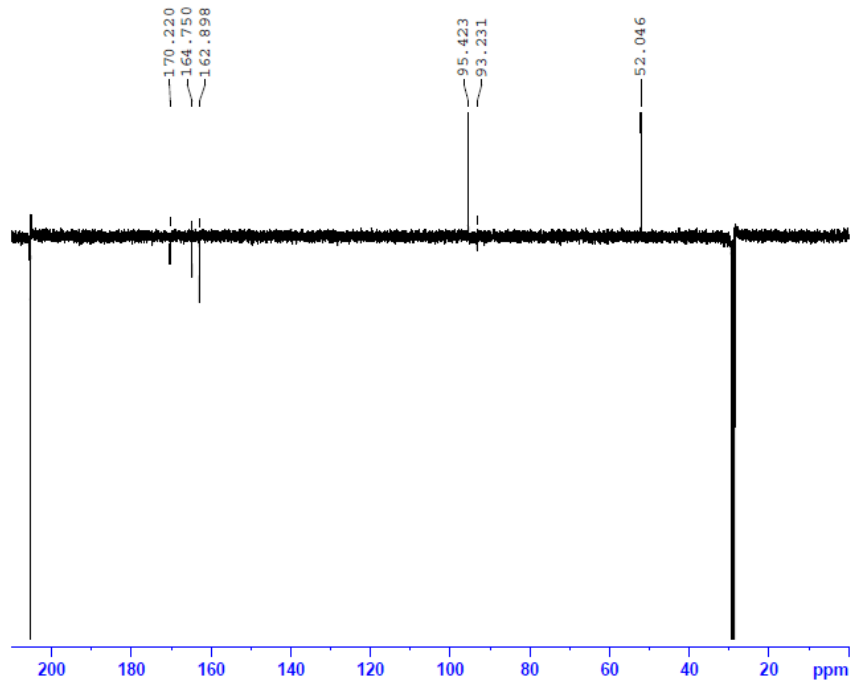
### Phổ $^1\text{H}$ NMR giãn rộng RT7



Phổ  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz) RT7 trong  $\text{DMSO-}d_6$ Phổ  $^{13}\text{C}$  NMR giãn rộng RT7

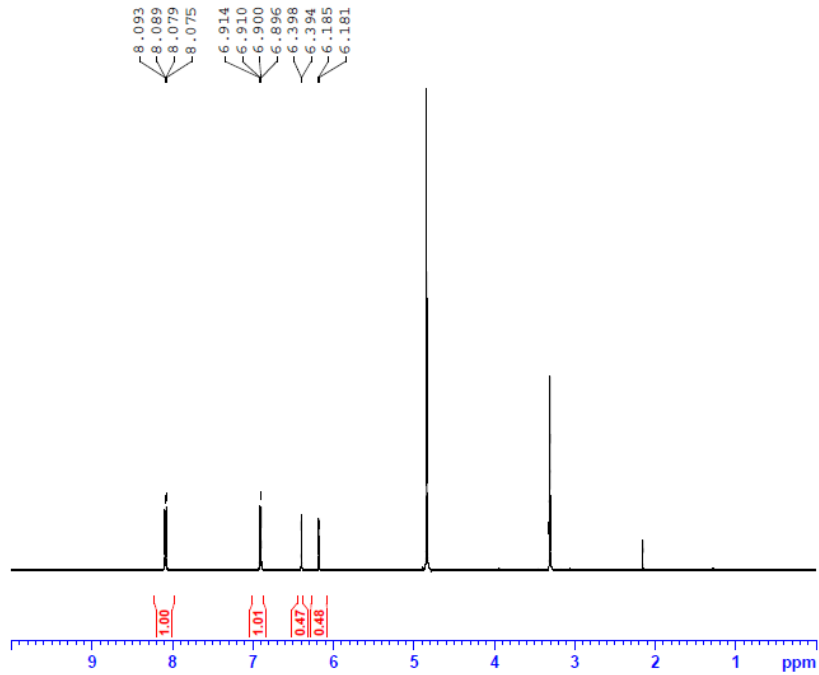
Phổ  $^{13}\text{C}$  NMR giãn rộng RT7

**PHỤ LỤC 1.15. Hợp chất SA1****Phổ  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz) SA1 trong  $\text{CD}_3\text{OD}$** 

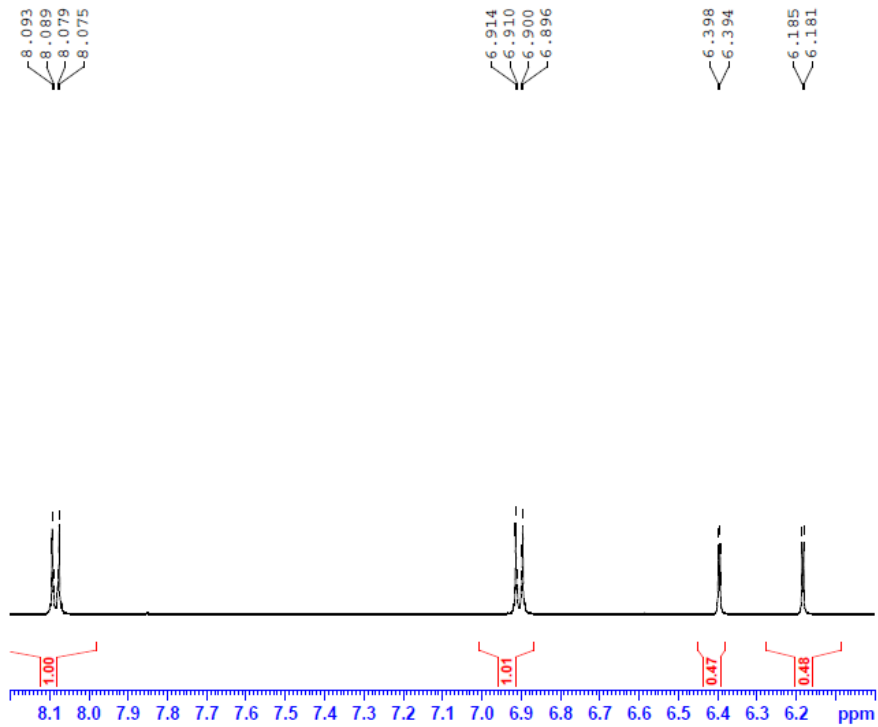
**Phổ Jmod (125 MHz) SA1 trong CD<sub>3</sub>OD**

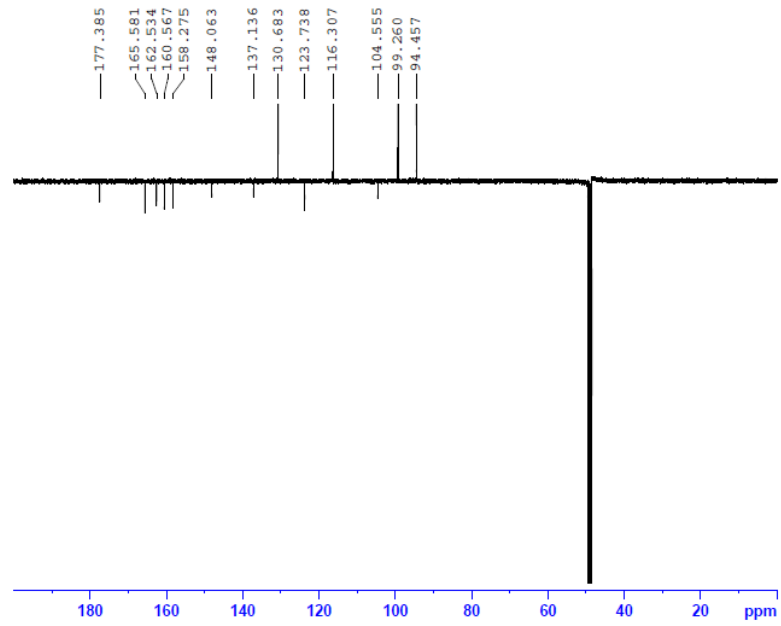
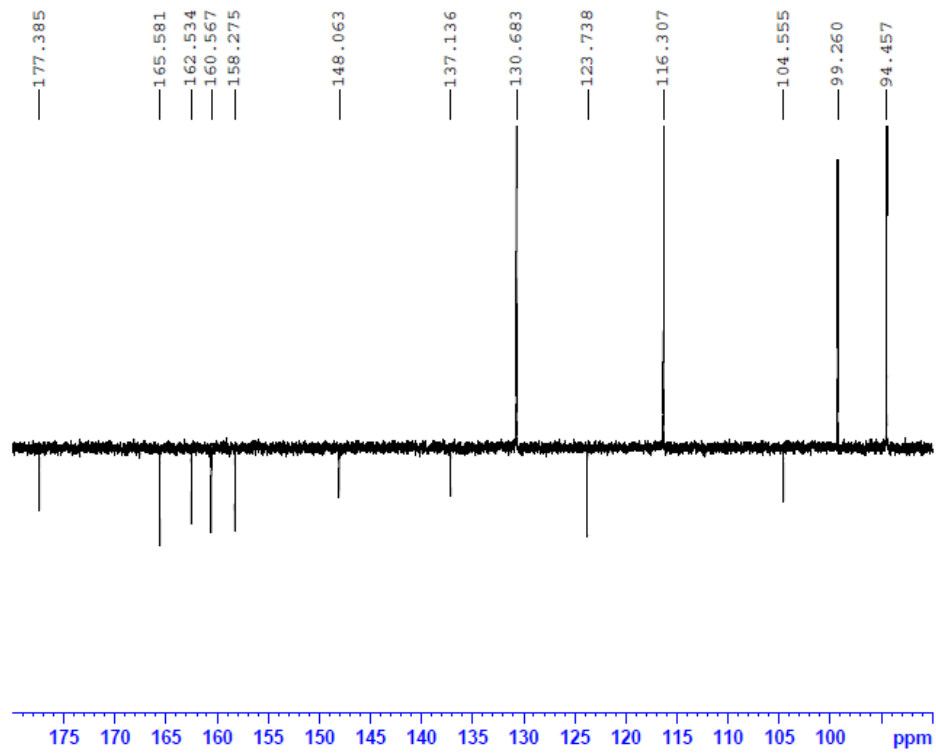


**PHỤ LỤC 1.16. Hợp chất SA2**  
**Phổ  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz) SA2 trong  $\text{CD}_3\text{OD}$**



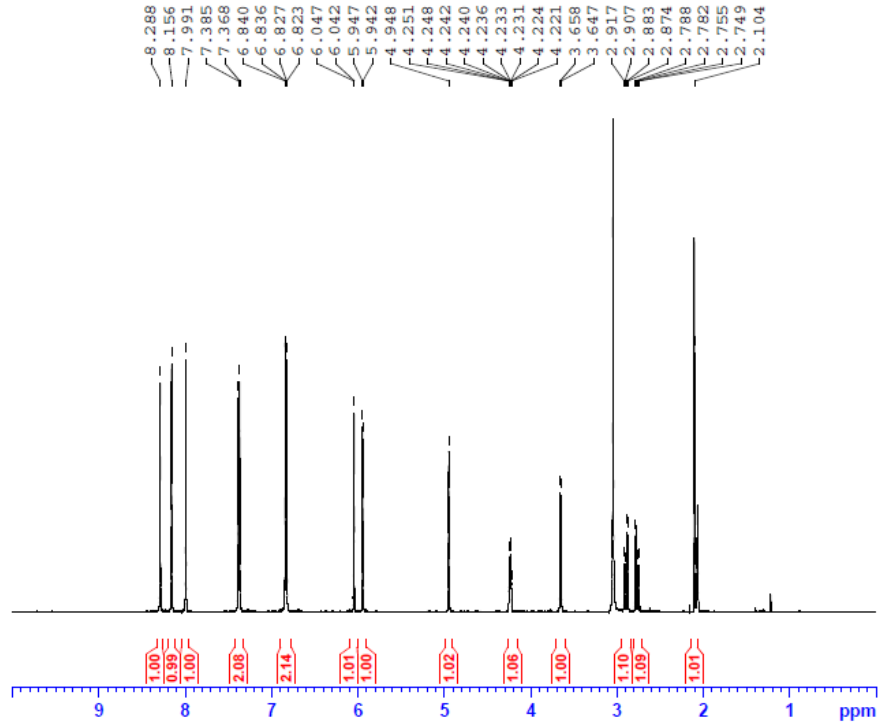
**Phổ  $^1\text{H}$  NMR giãn rộng SA2**



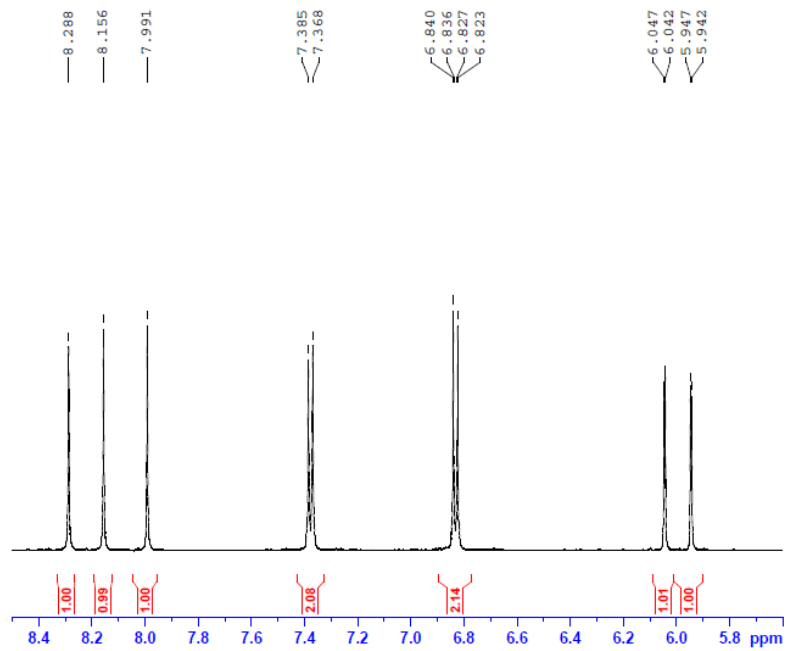
**Phổ Jmod (125 MHz) SA2 trong CD<sub>3</sub>OD****Phổ Jmod giãn rộng SA2**

### PHỤ LỤC 1.17. Hợp chất SA3

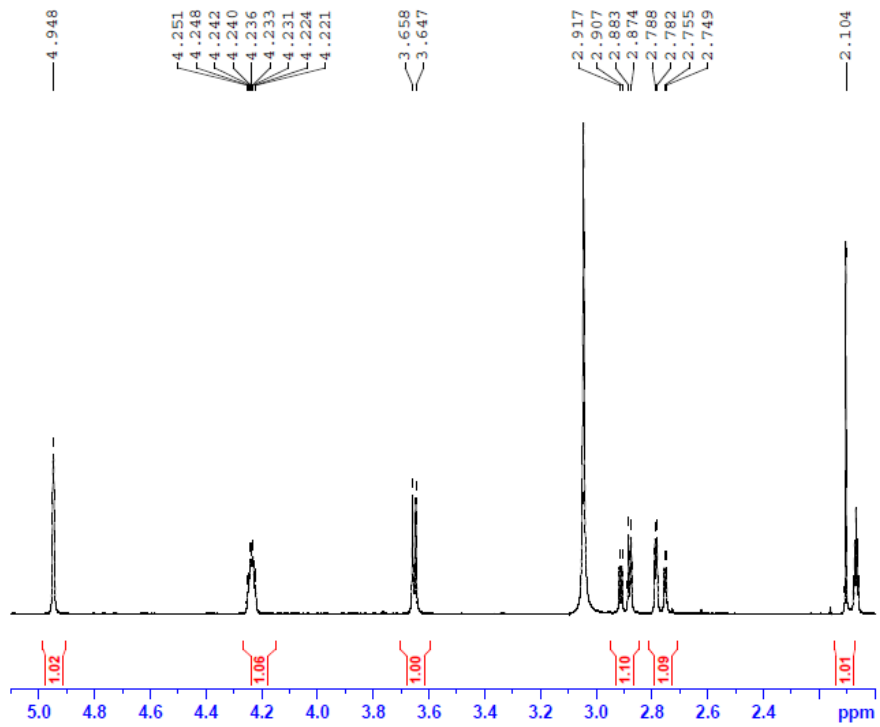
#### Phổ $^1\text{H}$ NMR (500 MHz) SA3 trong $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$



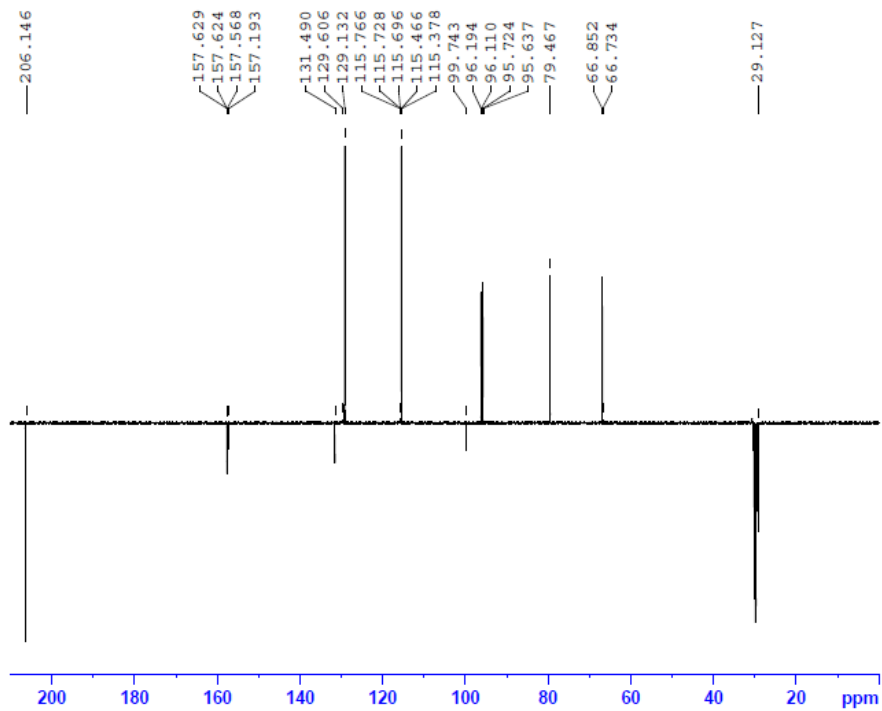
#### Phổ $^1\text{H}$ NMR giãn rộng SA3

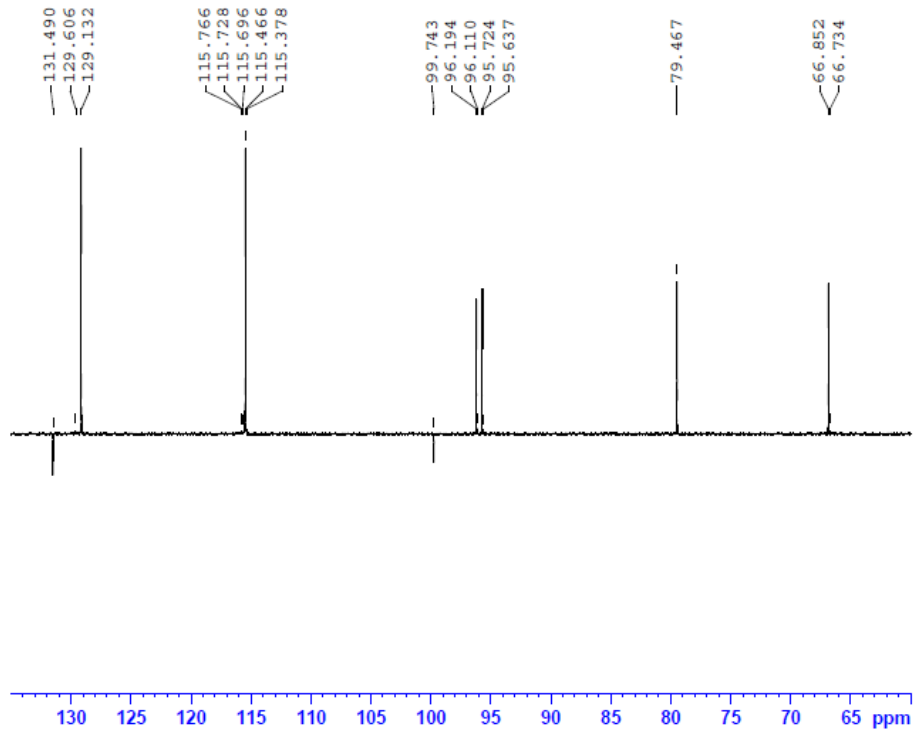


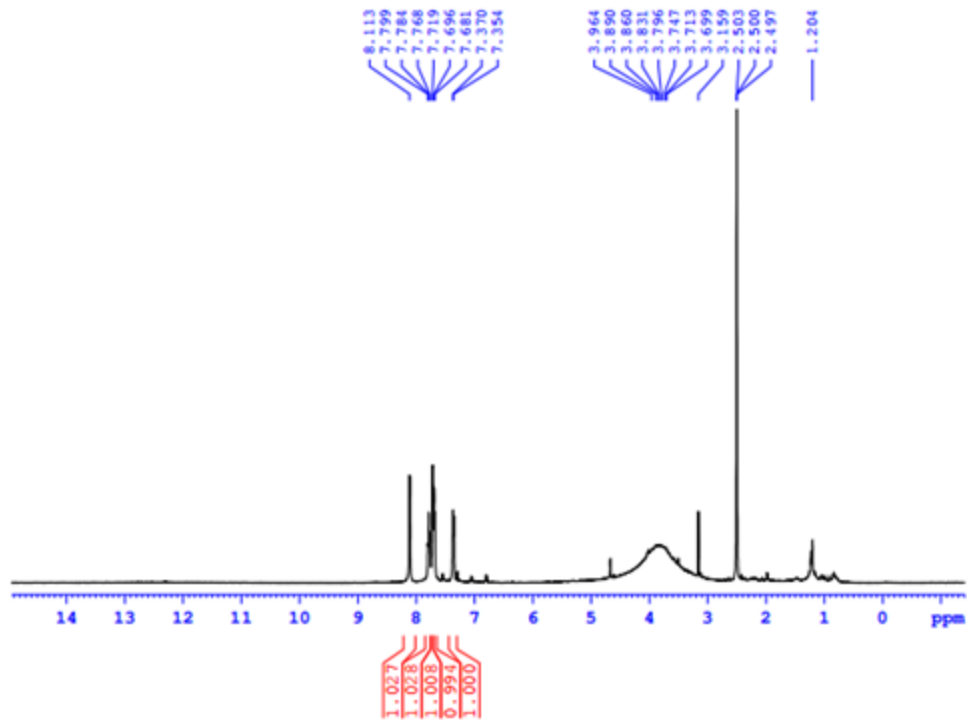
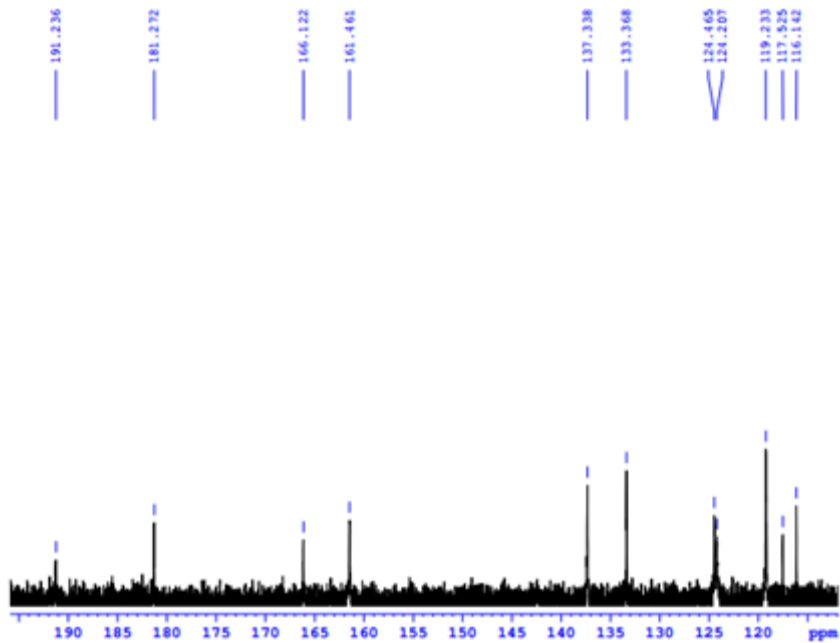
### Phổ $^1\text{H}$ NMR giãn rộng SA3



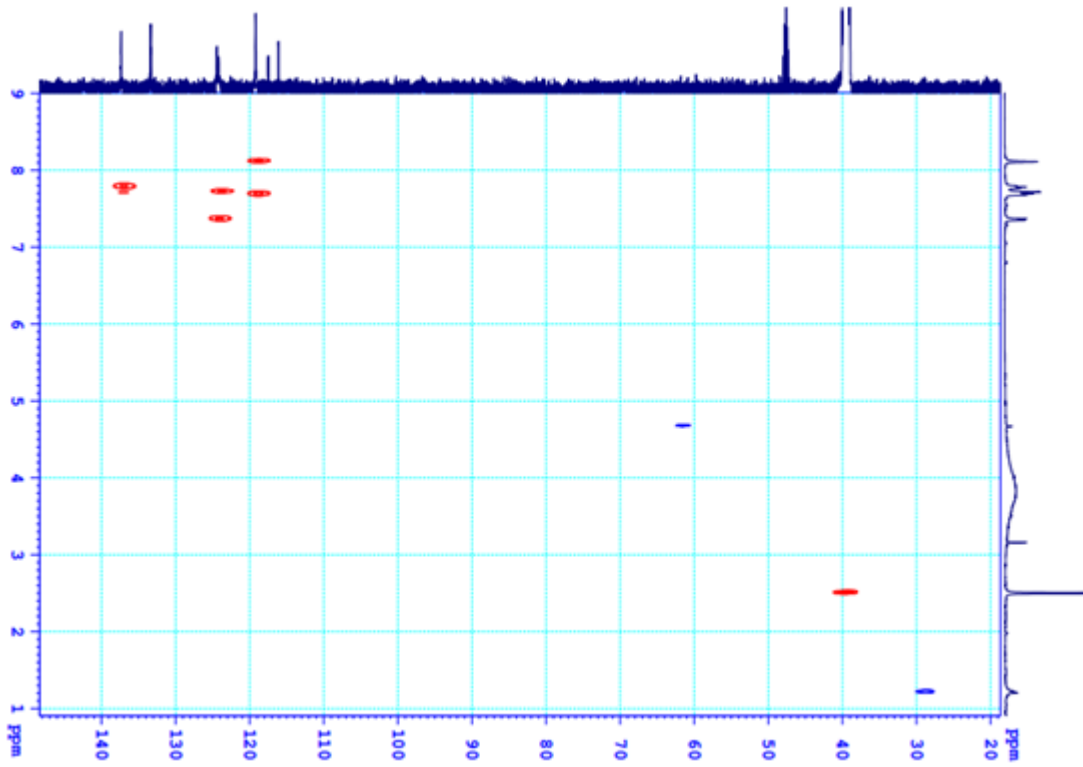
### Phổ Jmod (125 MHz) SA3 trong $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$



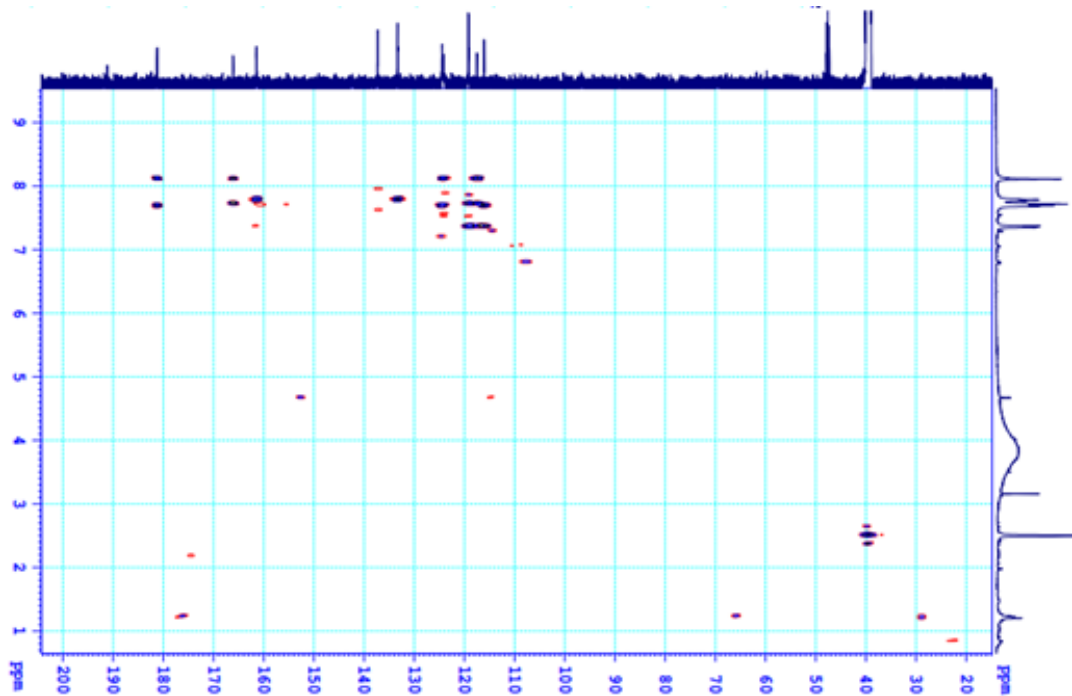
**Phổ Jmod giãn rộng SA3**

**PHỤ LỤC 1.18. Hợp chất SA4****Phổ  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz) SA4 trong  $\text{DMSO-}d_6$** **Phổ  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz) SA4 trong  $\text{DMSO-}d_6$** 

## Phổ HSQC SA4



## Phổ HMBC SA4

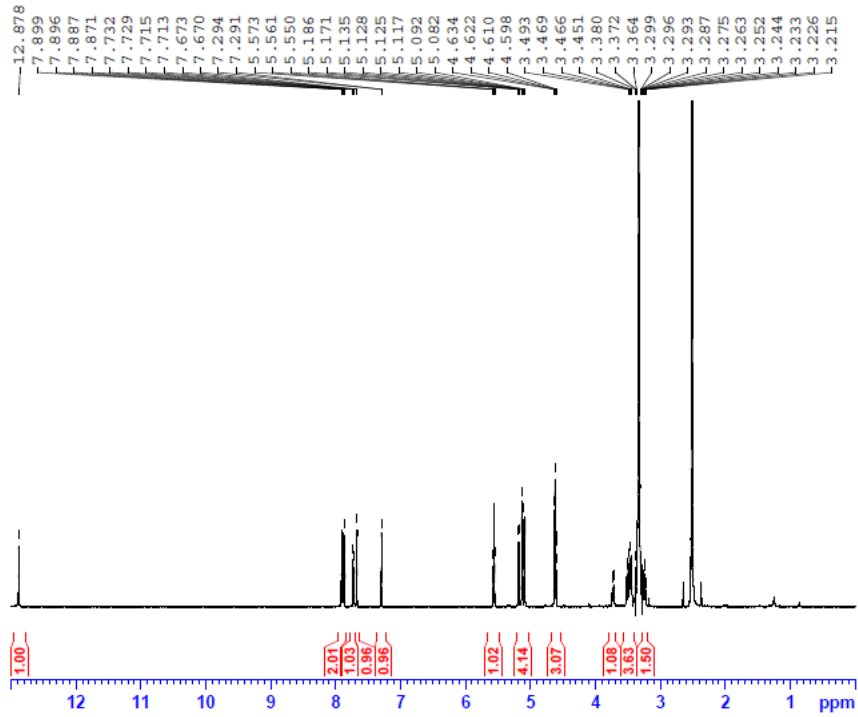
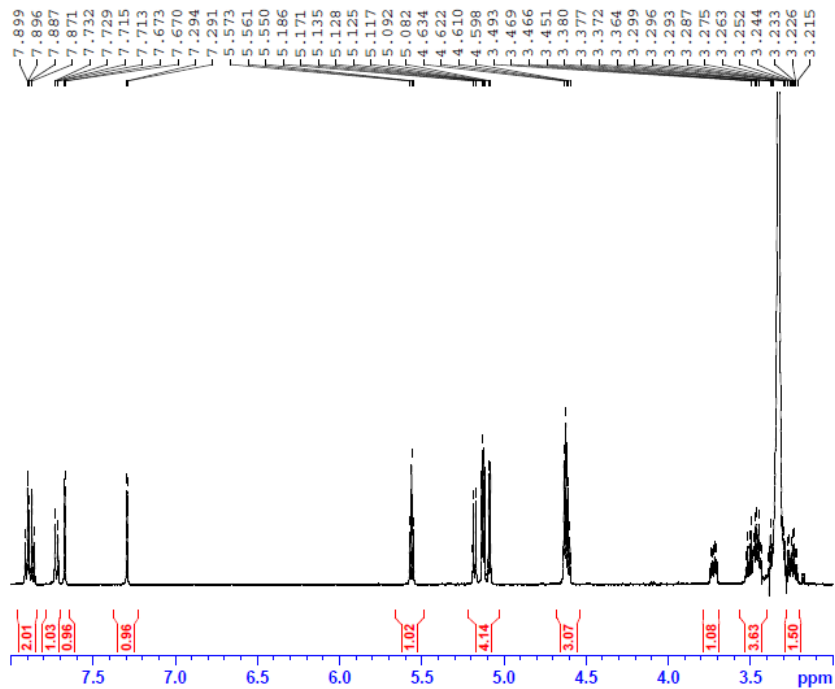


**PHỤ LỤC 1.19. Hợp chất SA5**

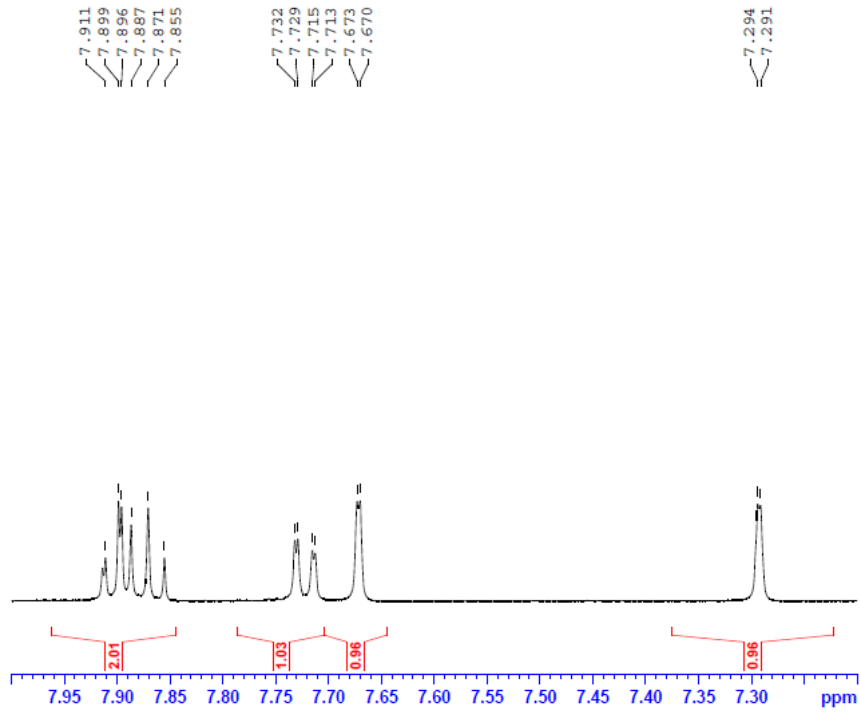
(Xem phổ **DH4**)



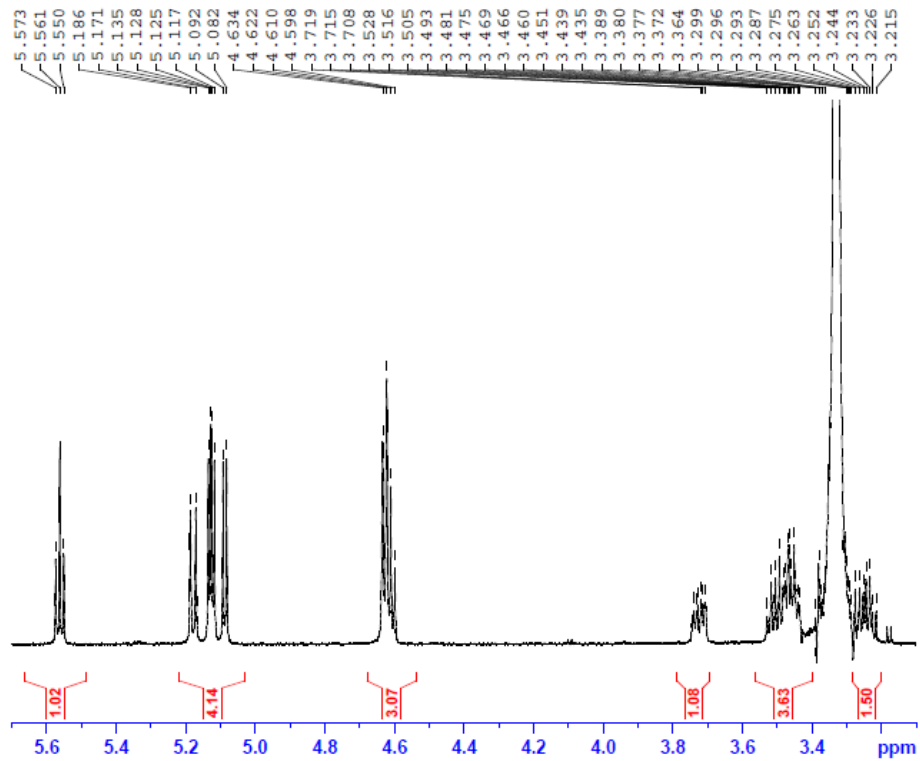
## PHỤ LỤC 1.20. Hợp chất SA6

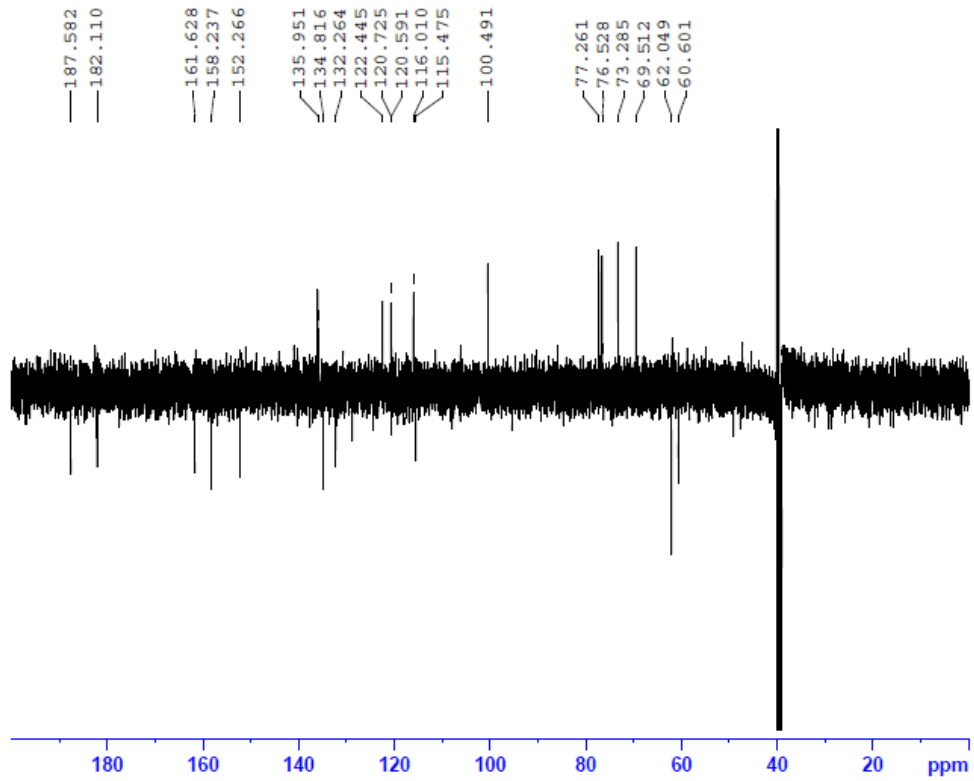
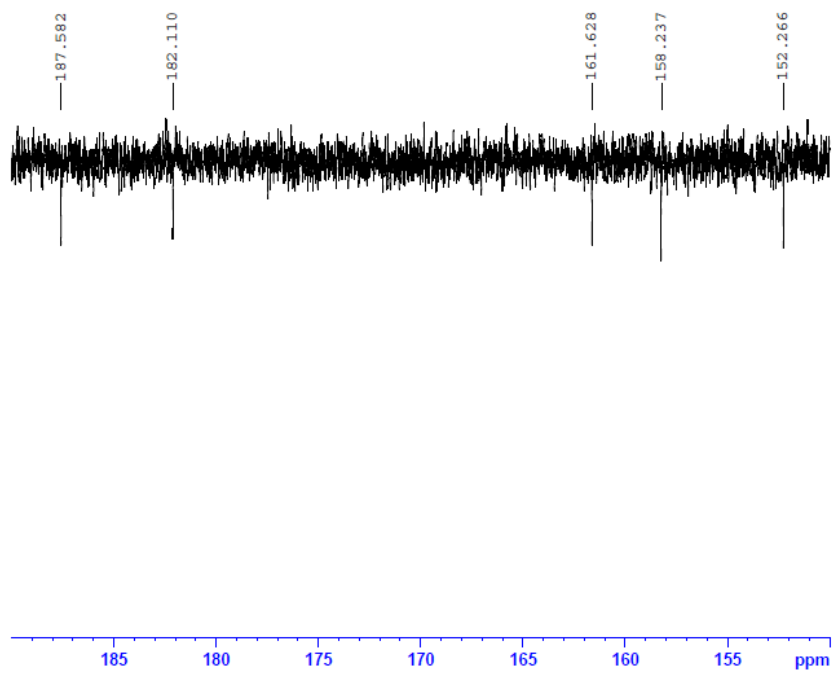
Phổ  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz) SA6 trong  $\text{DMSO-}d_6$ Phổ  $^1\text{H}$  NMR giãn rộng SA6

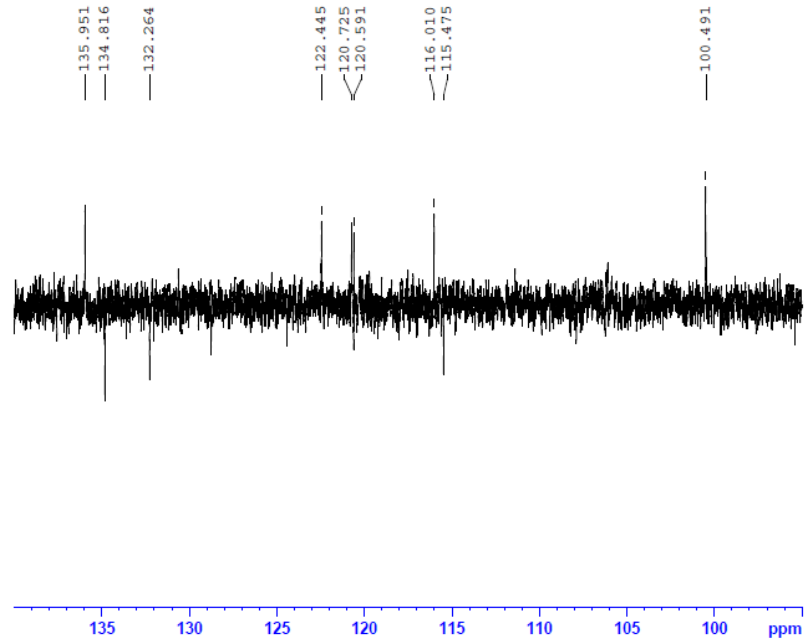
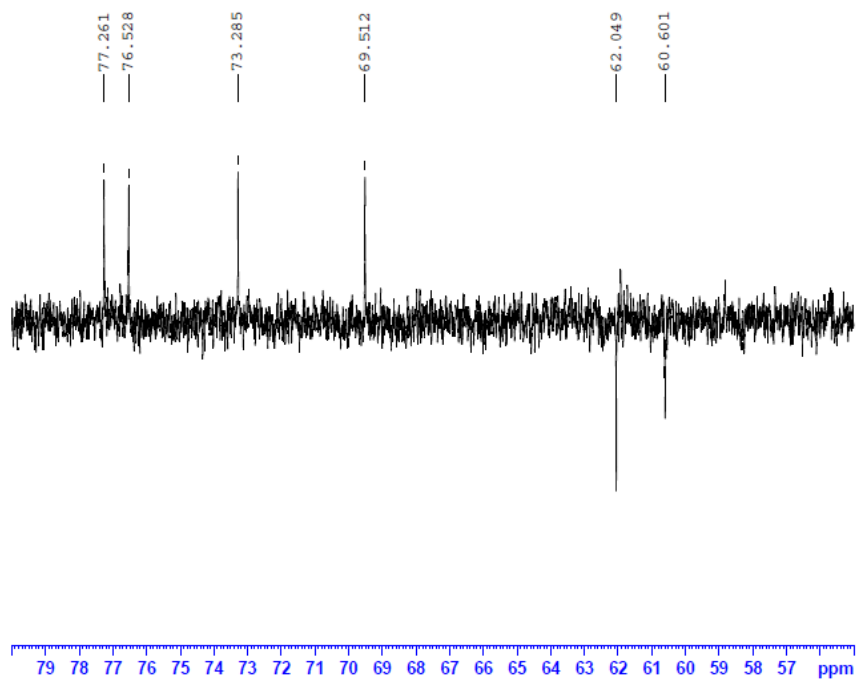
Phổ  $^1\text{H}$  NMR giãn rộng SA6



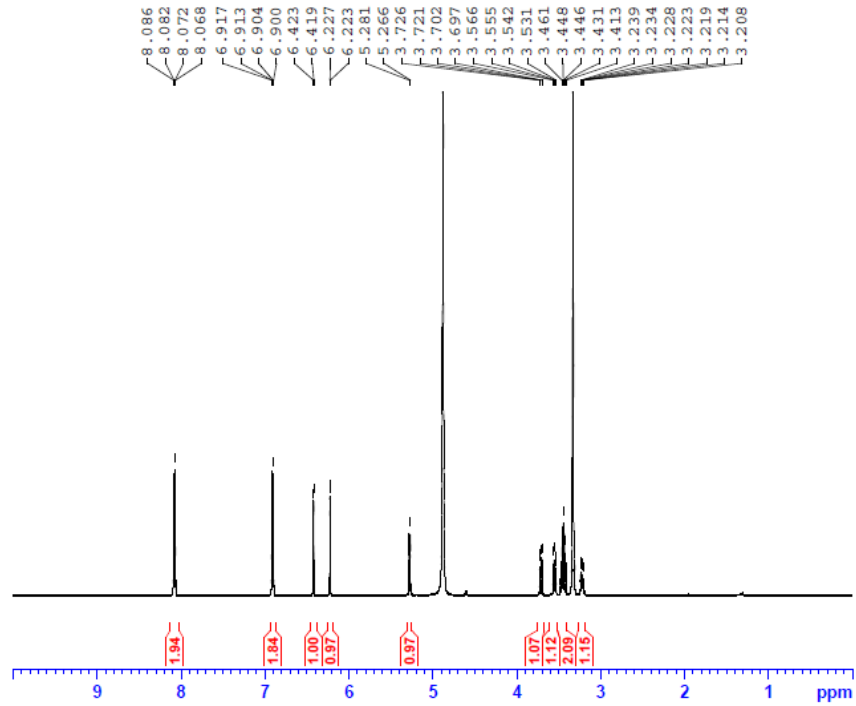
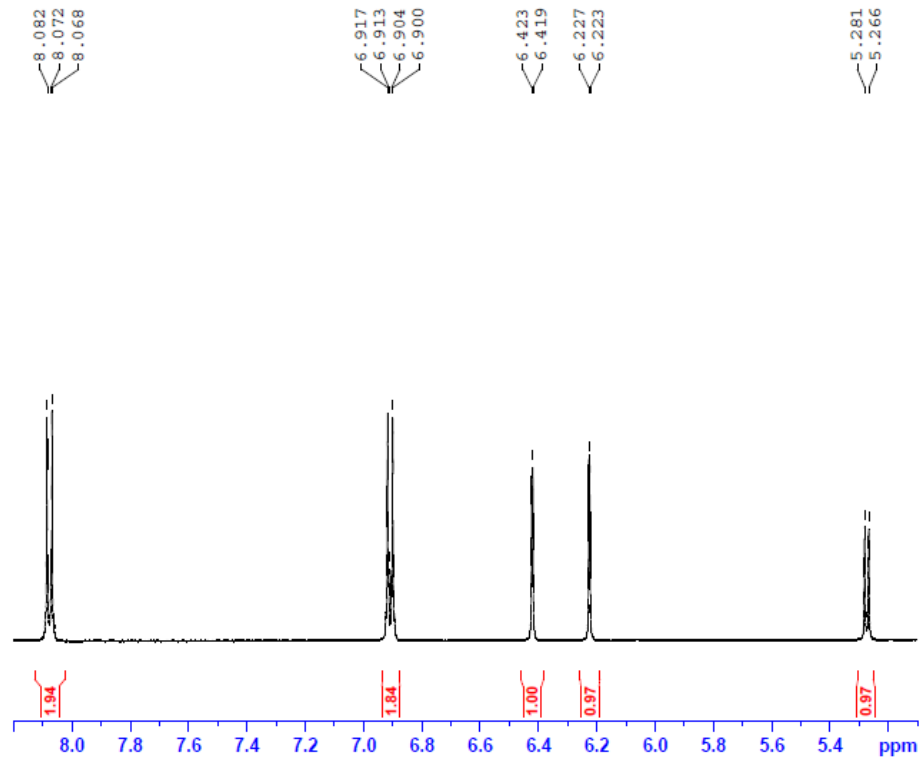
Phổ  $^1\text{H}$  NMR giãn rộng SA6



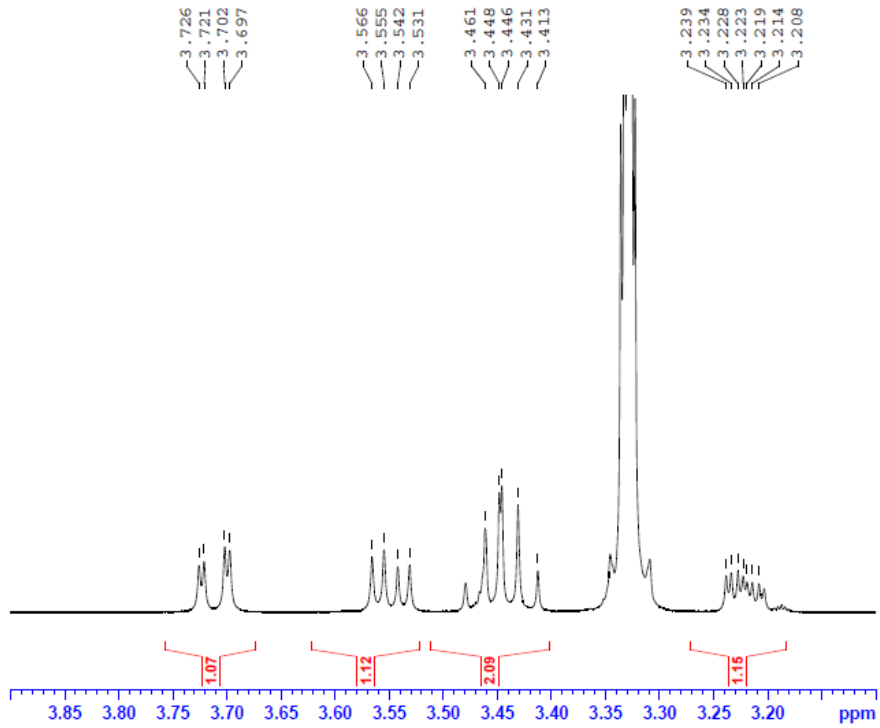
**Phổ Jmod (125 MHz) SA6 trong DMSO- $d_6$** **Phổ Jmod giãn rộng SA6**

**Phổ Jmod giãn rộng SA6****Phổ Jmod giãn rộng SA6**

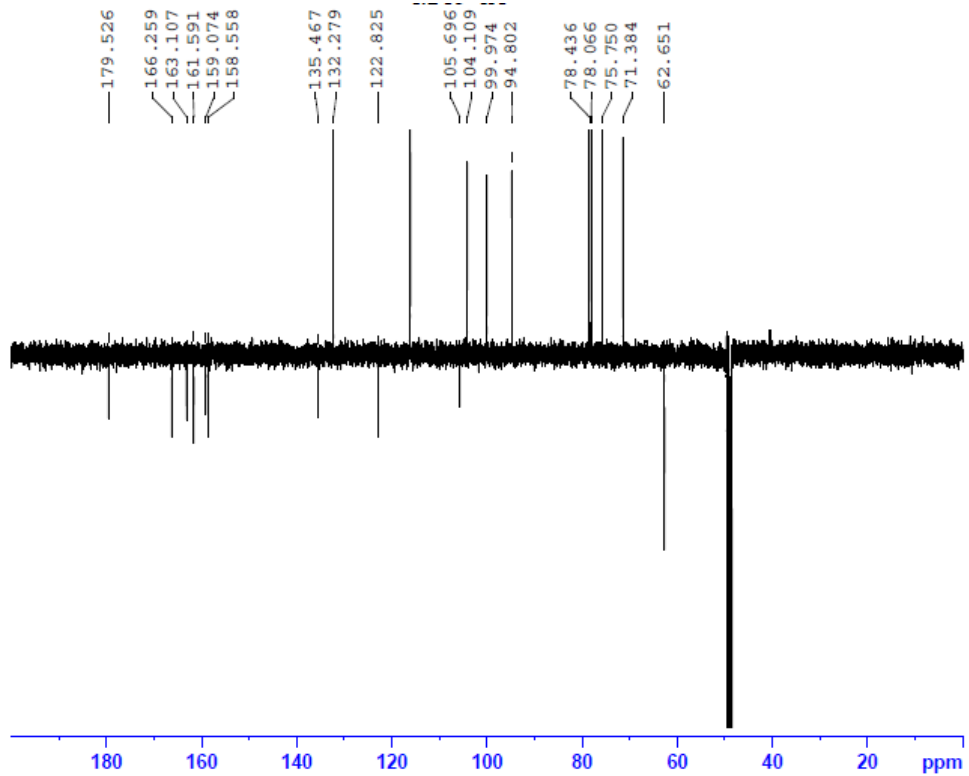
## PHỤ LỤC 1 21. Hợp chất SA7

Phổ  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz) SA7 trong  $\text{CD}_3\text{OD}$ Phổ  $^1\text{H}$  NMR giãn rộng SA7

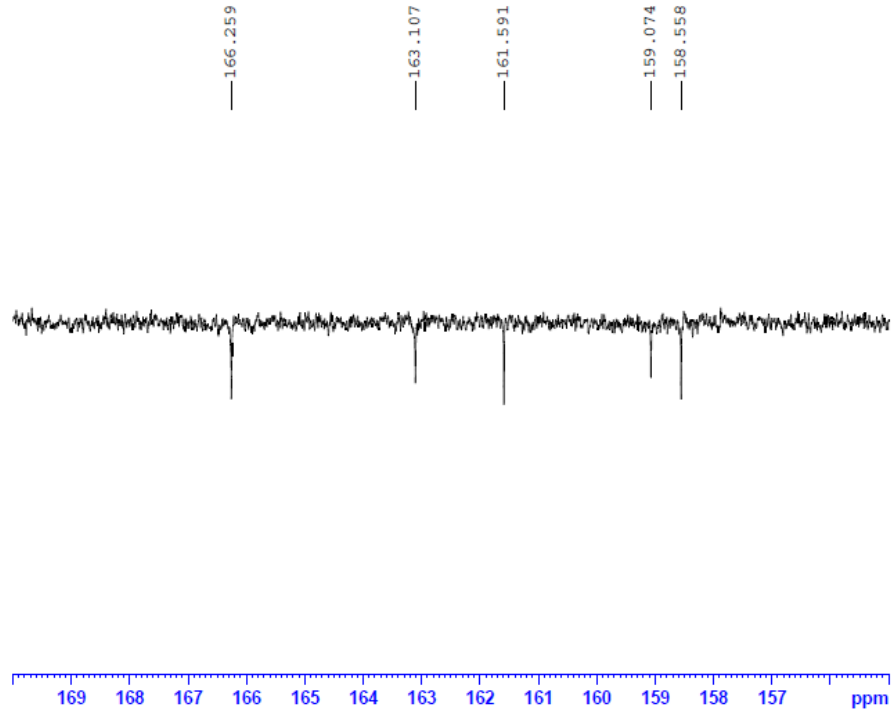
**Phổ  $^1\text{H}$  NMR giãn rộng SA7**



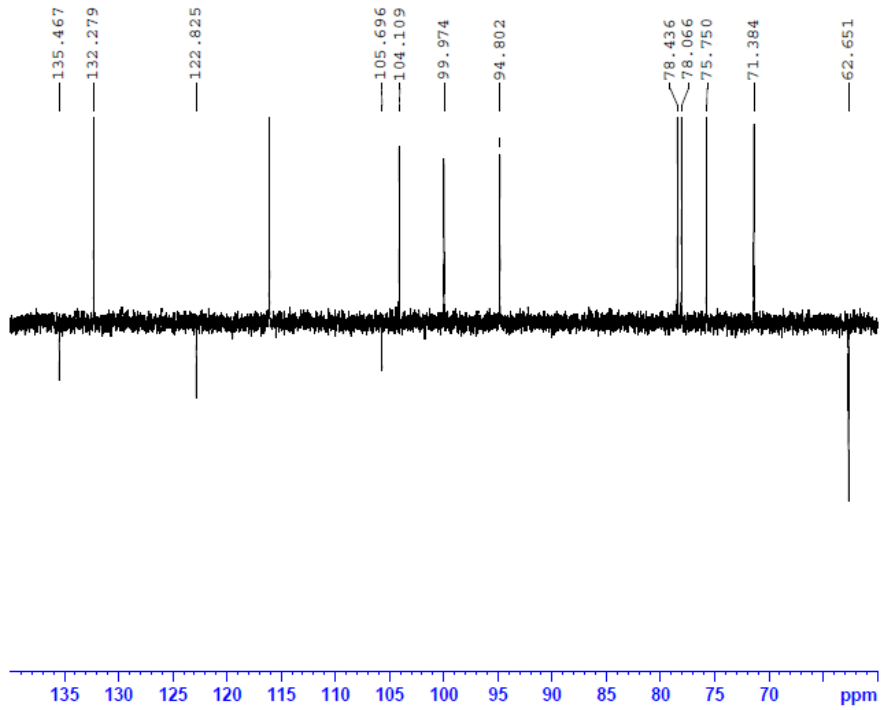
**Phổ Jmod (125 MHz) SA6 trong  $\text{CD}_3\text{OD}$**



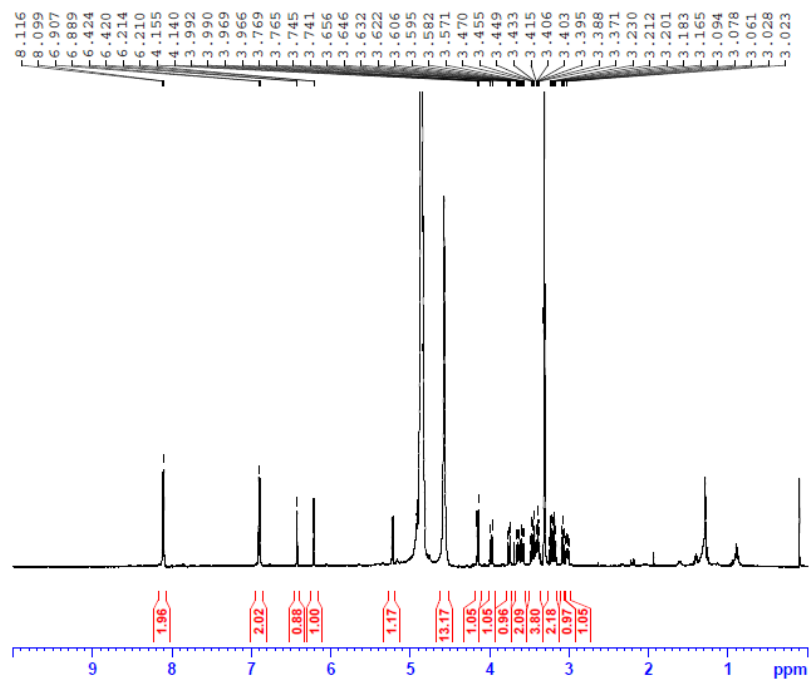
## Phổ Jmod giãn rộng SA7



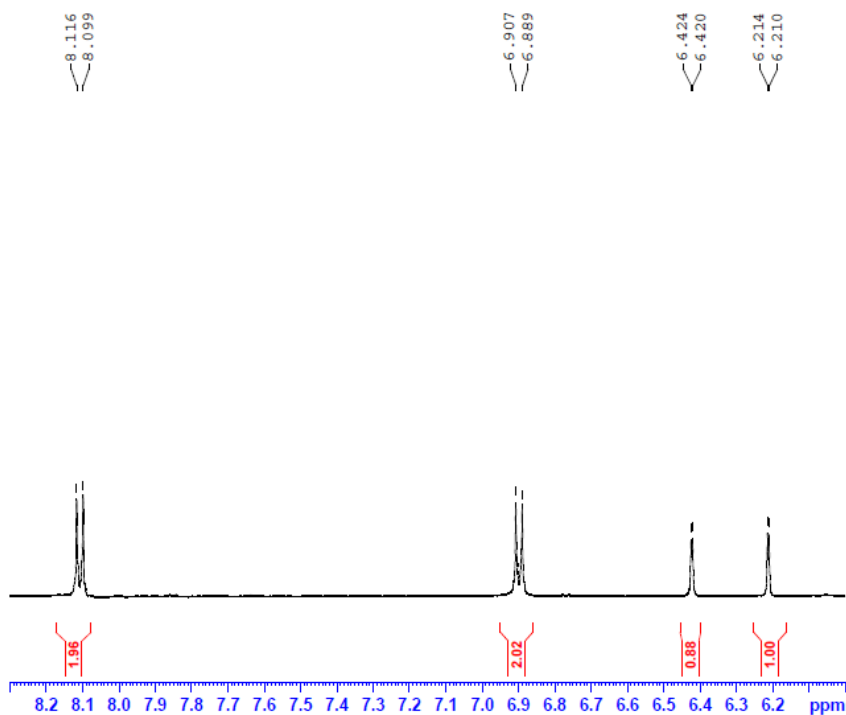
## Phổ Jmod giãn rộng SA7



**PHỤ LỤC I.1. Hợp chất SA8**  
**Phổ  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz) SA8 trong  $\text{CD}_3\text{OD}$**

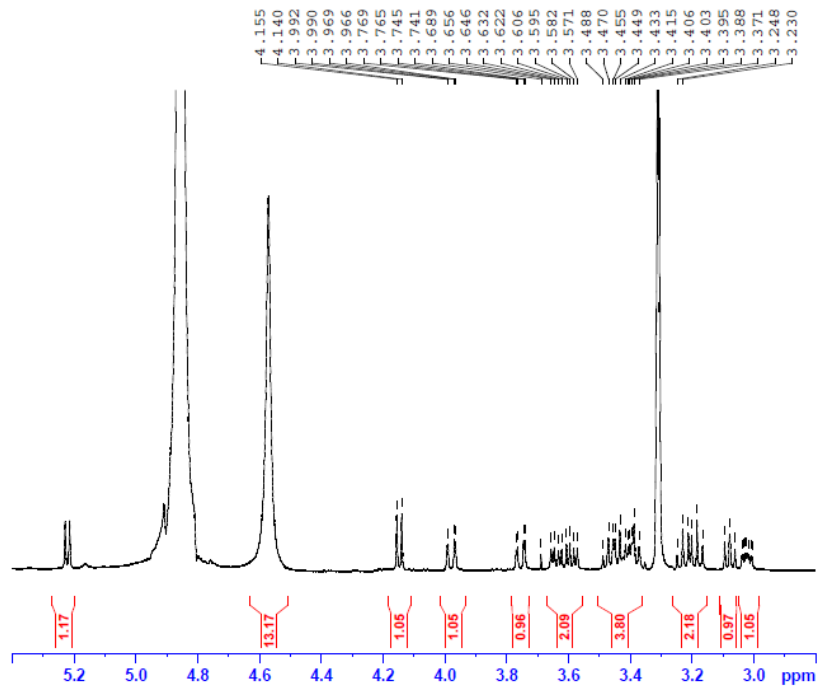


**Phổ  $^1\text{H}$  NMR giãn rộng SA8**

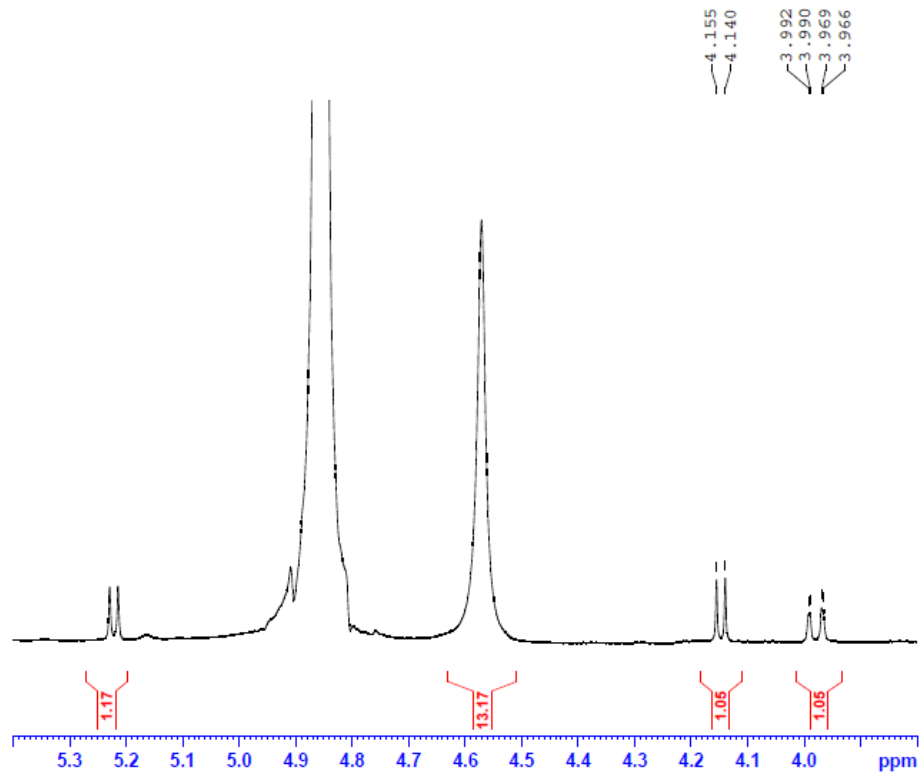




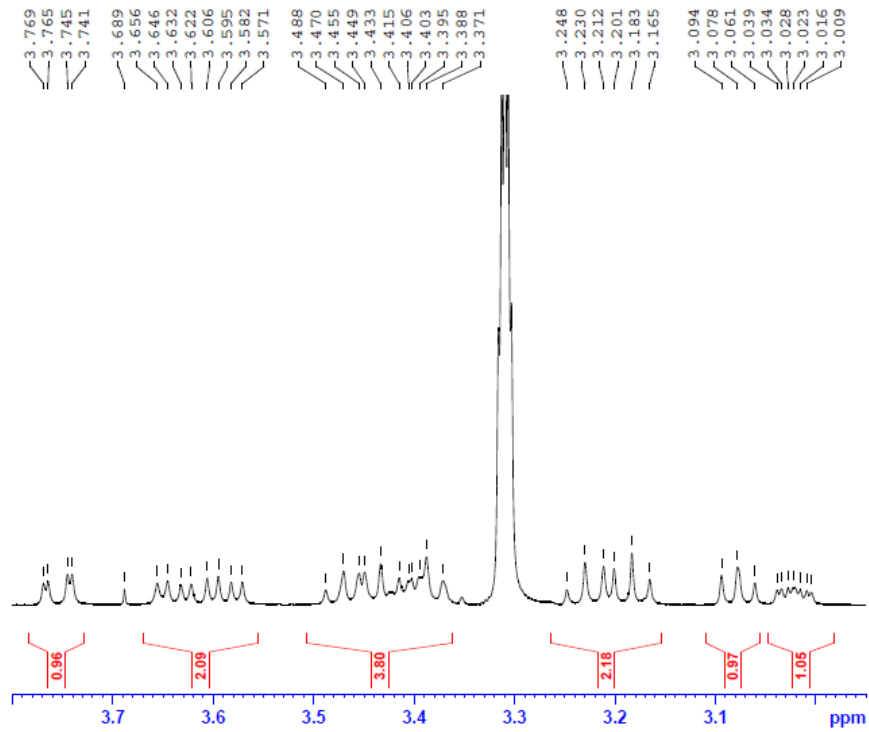
### Phổ $^1\text{H}$ NMR giãn rộng SA8



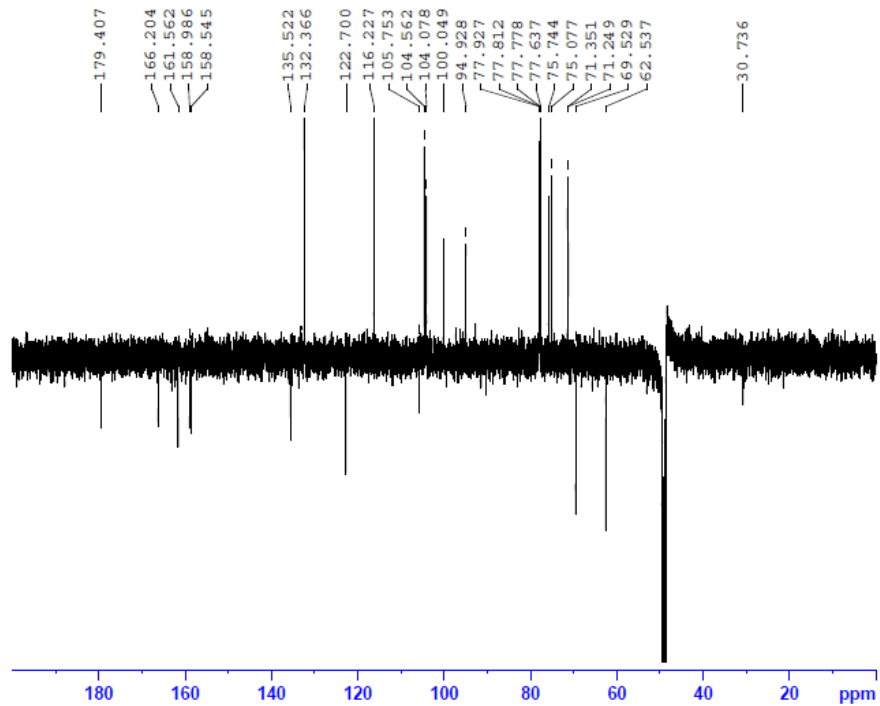
### Phổ $^1\text{H}$ NMR giãn rộng SA8



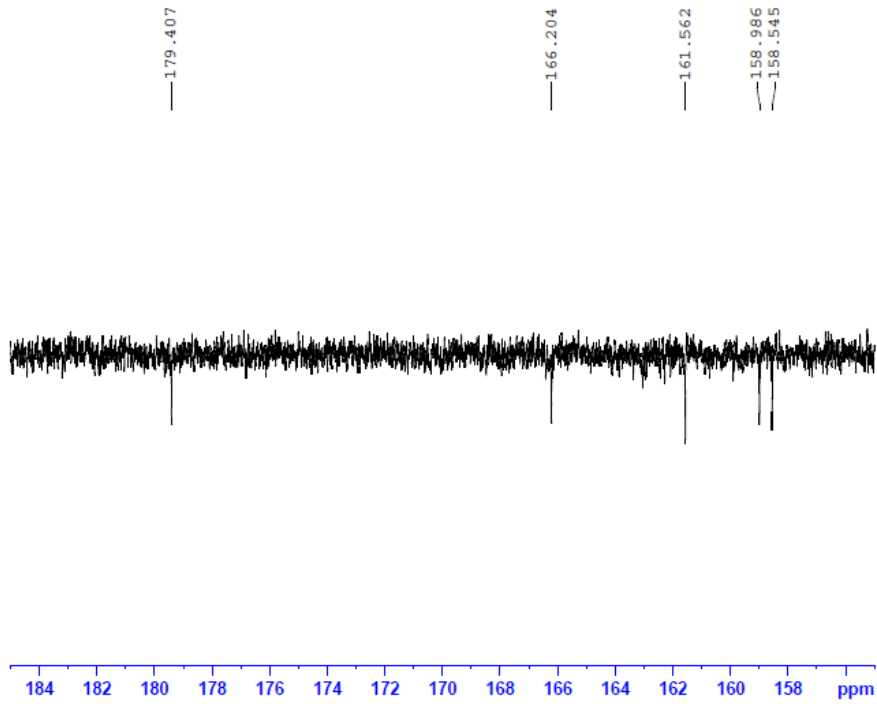
### Phổ $^1\text{H}$ NMR giãn rộng SA8



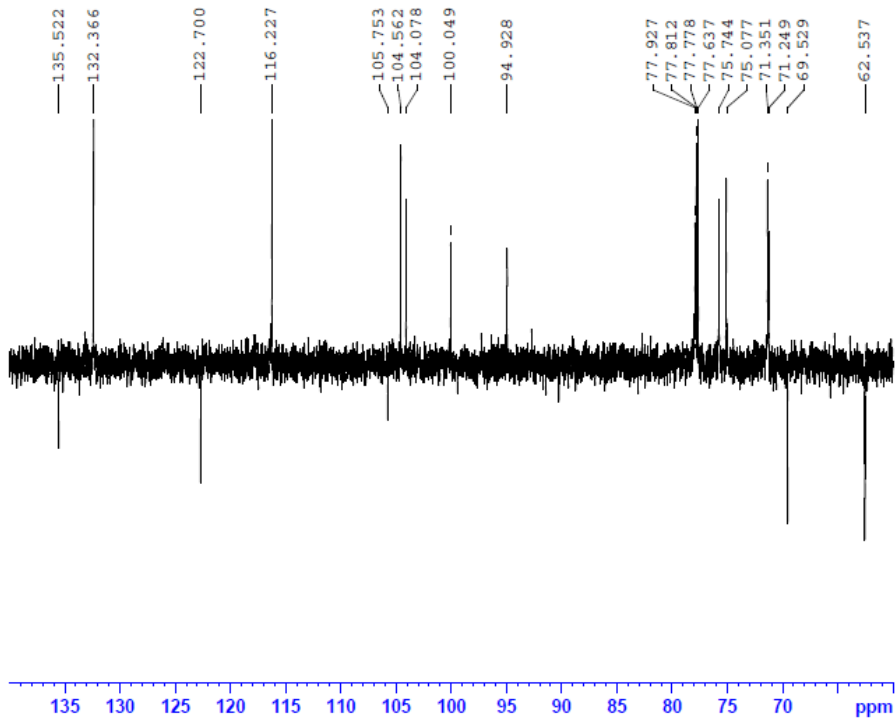
### Phổ Jmod (125 MHz) SA8 trong $\text{CD}_3\text{OD}$



## Phổ Jmod giãn rộng SA8

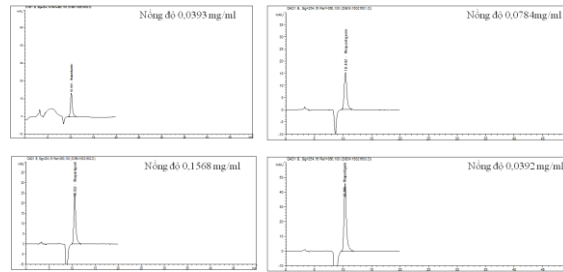


## Phổ Jmod giãn rộng SA8

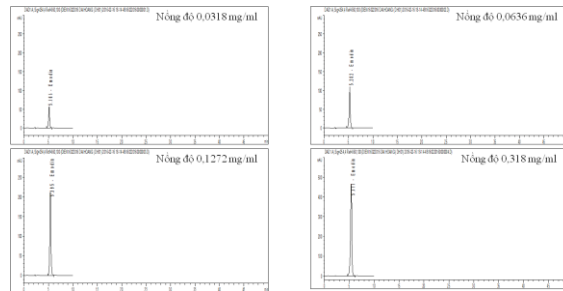


## II. PHỤ LỤC HPLC

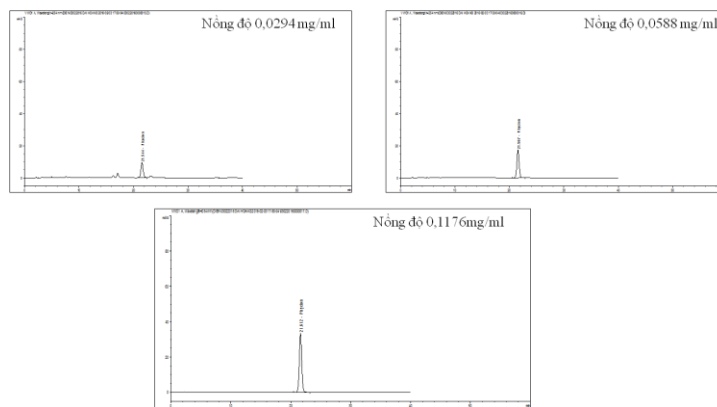
PHỤ LỤC II.1. Sắc kí đồ HPLC của các hợp chất **DH3** (emodin), **DH5** (rhapontigenin), **DH2** (physcion), **DH1** (chrysophanol), **DH6** (desoxyrhaponticin) trong cao chiết dichloromethane từ cây đại hoàng – *R. tanguticum*



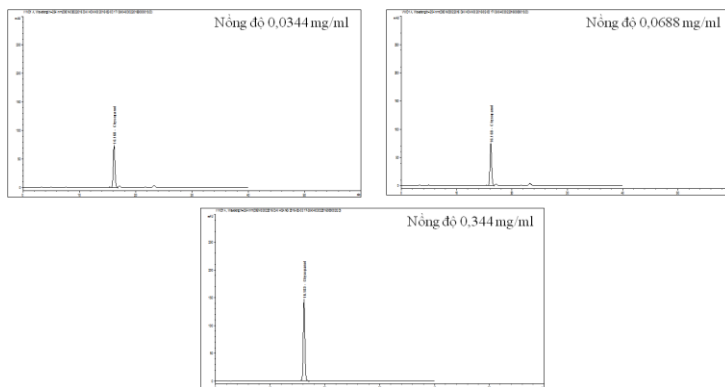
Hình II.1.1. Sắc kí đồ HPLC-DH3



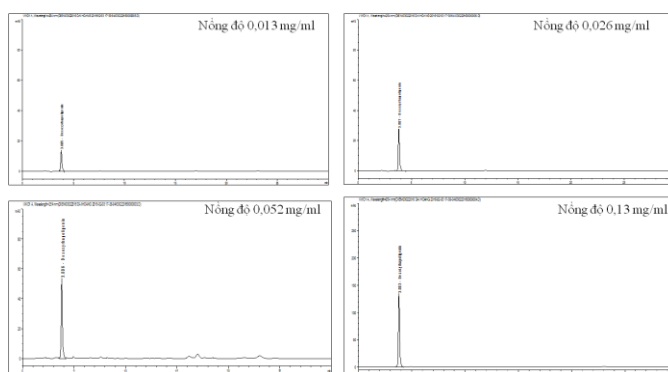
Hình II.1.1. Sắc kí đồ HPLC-DH5



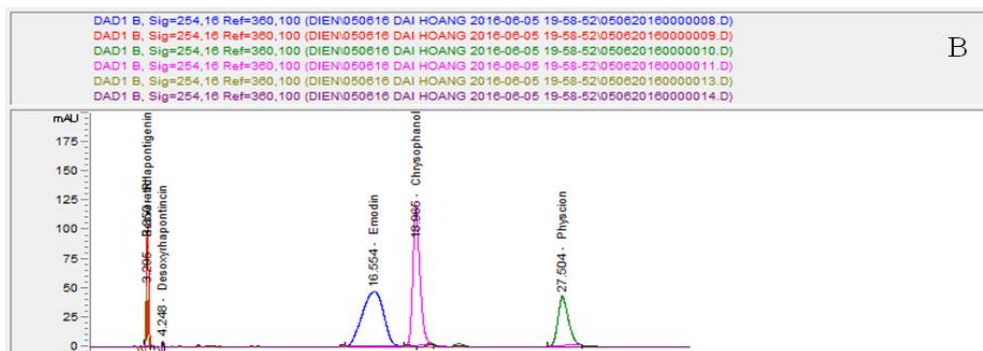
Hình II.1.2. Sắc kí đồ HPLC-DH2



Hình II.1.3. Sắc kí đồ HPLC-DH1

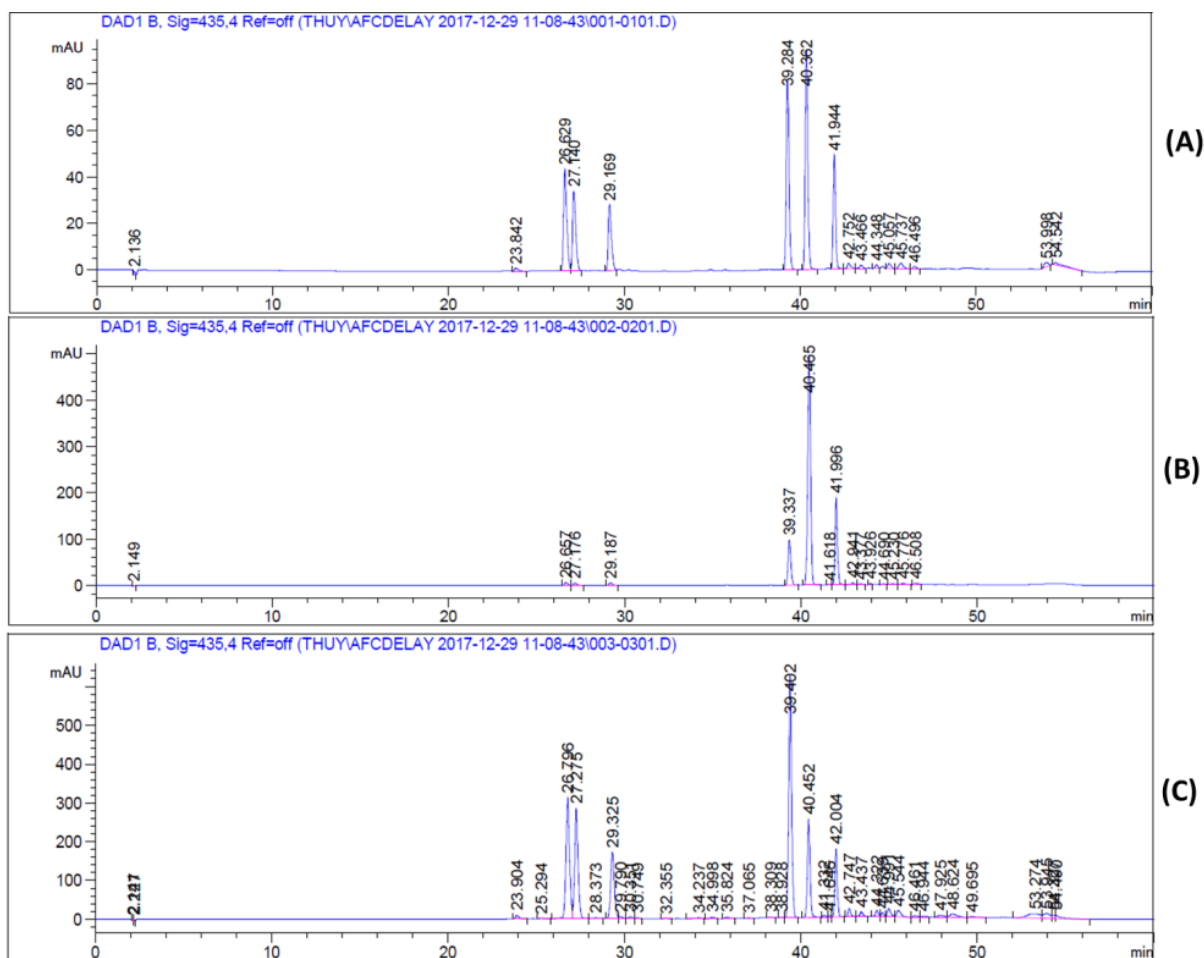


Hình II.1.4. Sắc kí đồ HPLC-DH6



Hình II.1.5. Sắc kí đồ HPLC của các hợp chất **DH3** (emodin), **DH5** (rhapontigenin), **DH2** (physcion), **DH1** (chrysophanol), **DH6** (desoxyrhapontincin) trong cao chiết dichloromethane

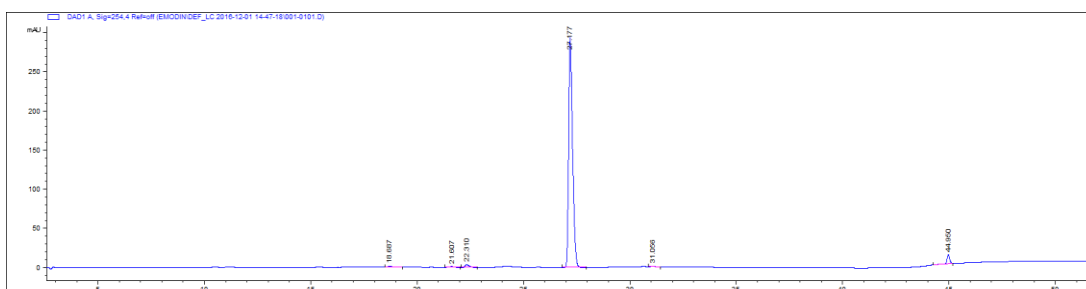
PHỤ LỤC II.2. Sắc kí đồ HPLC của các hợp chất **RT1** (chrysophanol), **RT2**(physcion), **RT3**(emodin), **RT4**(emodin -8-*O*- $\beta$ -*D*-glucopyranoside) , **RT5a** (chrysophanol -8-*O*- $\beta$ -*D*-glucopyranoside), **RT5b**( physcion -8-*O*- $\beta$ -*D*-glucopyranoside) và các thành phần trong cao chiết methanol (A), n-hexane (B), ethyl acetate(C) cây lưỡi bò *R. trisetifer*.



**RT5a**-chrysophanol -8-*O*- $\beta$ -*D*-glucopyranoside ( $t_R$  26.6 min), **RT4**- emodin -8-*O*- $\beta$ -*D*-glucopyranoside ( $t_R$  27.2 min), **RT5b**- physcion -8-*O*- $\beta$ -*D*-glucopyranoside ( $t_R$  29.2 min), **RT1**- chrysophanol ( $t_R$  40.4 min), **RT3**-emodin ( $t_R$  39.3 min) và **RT2**-physcion ( $t_R$  41.9 min) trong cặn chiết MeOH (A) và cặn chiết Hex (B) và cặn chiết EtOAc (C) của *Rumex trisetifer*. **RT1**- chrysophanol; **RT2**- physcion; **RT3**-emodin; **RT5a** chrysophanol -8-*O*- $\beta$ -*D*-glucopyranoside; **RT4**- emodin -8-*O*- $\beta$ -*D*-glucopyranoside; **RT5b** physcion -8-*O*- $\beta$ -*D*-glucopyranoside. Pha động: 0.2%  $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{H}_2\text{O}$  (A) – MeOH (B) theo chương trình (60 min): 0-5 min (20% B), 5-25 min (20→70% B), 25-30 min (70% B), 30-40 min

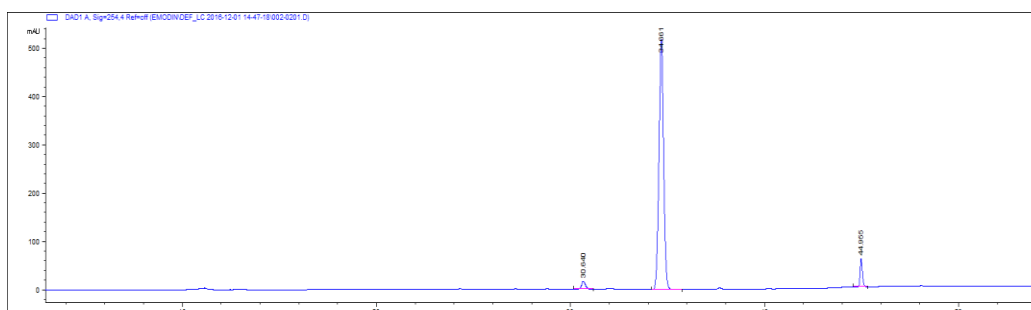
(70→100% B), 40-50 min (100% B), 50-55 min (100→20 %B), 55-60 min (20%B). UV xác định: 254 nm. Tốc độ dòng: 0.5 mL/min. Thể tích bơm: 10 µL.

PHỤ LỤC II.3. Sắc kí đồ HPLC của các hợp chất **SA4** (rhein), **SA5** (aloe-emodin), **SA6** (aloe-emodin-8-*O*-glucoside) trong cao chiết cao chiết dichloromethane, cao chiết ethyl acetate và cao chiết methanol từ cây muồng trâu – *S. alata*



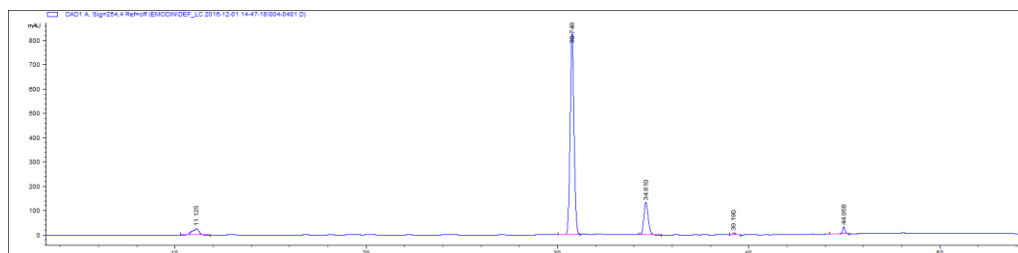
Hình II.3.1. Sắc kí đồ HPLC của **SA6**

*SA6: Aloe emodin glucoside. Hệ DM A: 0,2% CH<sub>3</sub>COOH/H<sub>2</sub>O; Hệ DM B: MeOH, gradient theo chế độ tại phần 4.6.2; UV tại 254 nm; tốc độ dòng 0,5 ml/phút.*



Hình II.3.2. Sắc kí đồ HPLC của **SA4**

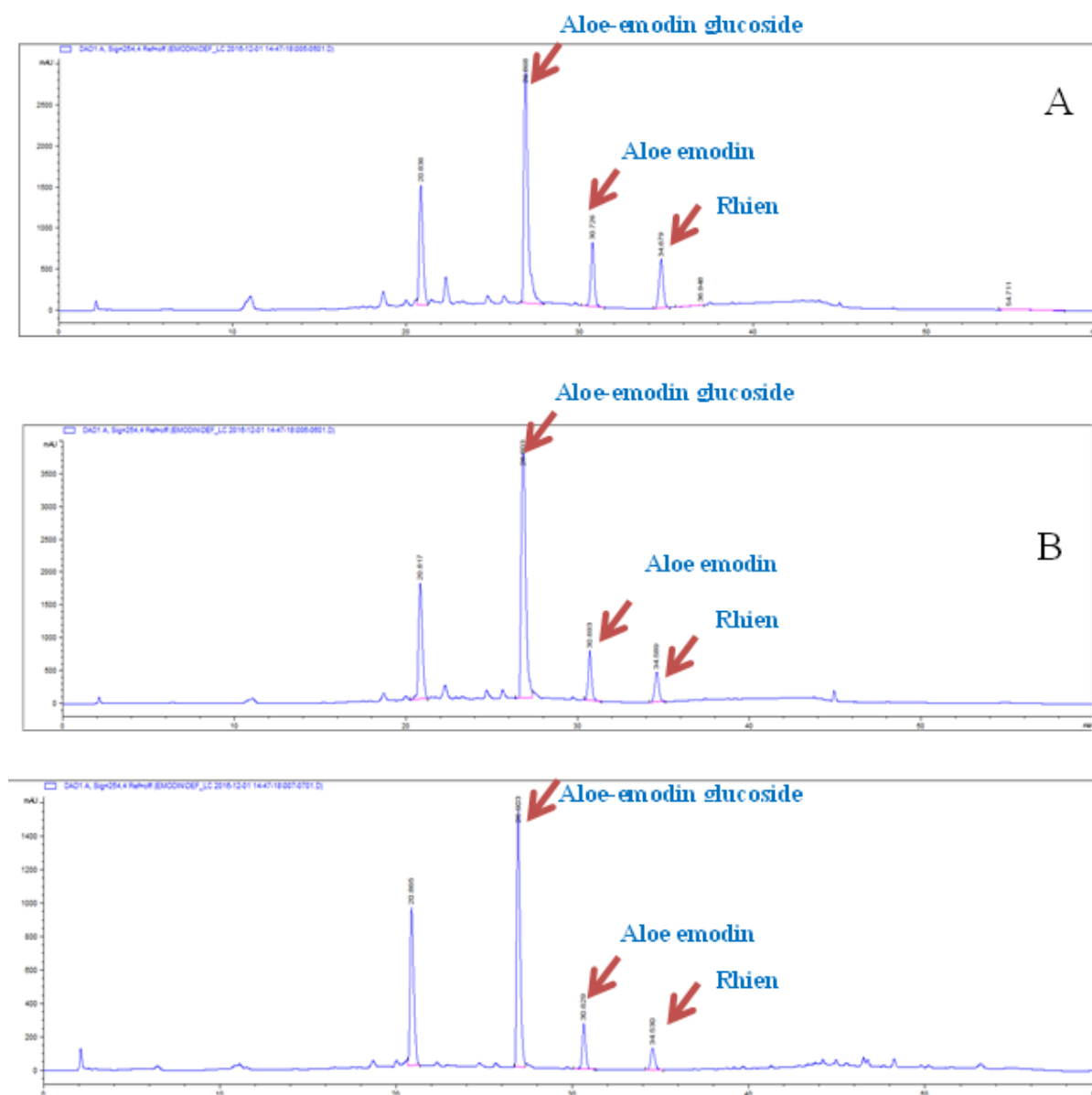
*SA4: rhein. Hệ DM A: 0,2% CH<sub>3</sub>COOH/H<sub>2</sub>O; Hệ DM B: MeOH, gradient theo chế độ tại phần 4.6.2; UV tại 254 nm; tốc độ dòng 0,5 ml/phút.*



Hình II.3.3. Sắc kí đồ HPLC của **SA5**

TCA5: aloe-emodin.. Hệ DM A: 0,2%  $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{H}_2\text{O}$ ; Hệ DM B: MeOH, gradient theo chế độ tại phần 4.6.2; UV tại 254 nm; tốc độ dòng 0,5 ml/phút.

Tiến hành sắc kí lỏng hiệu năng cao với cao chiết dichloromethane, cao chiết ethyl acetate và cao chiết methanol. Sắc kí đồ HPLC của các cao chiết như hình II.3.4



Hình II.3.4. Sắc kí đồ HPLC của SA6(alo emodin glucoside), SA5(aloe-emodin), SA4 (rhein) trong cao

Cao tinh chế DCM; B. Cao EA; C. Cao chiết tổng bằng methanol. Hệ DM A: 0,2%  $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{H}_2\text{O}$ ; Hệ DM B: MeOH, gradient theo chế độ tại phần 4.6.2; UV tại 254 nm; tốc độ dòng 0,5 ml/phút.



