

BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



BÙI NGUYỄN THÀNH LONG

NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN HÓA HỌC VÀ ĐÁNH GIÁ
HOẠT TÍNH KHÁNG KHUẨN, KHÁNG NẤM CỦA LOÀI
HOA MỘC (*Osmanthus fragrans* (Thunb.) Lour.)
Ở VIỆT NAM

LUẬN VĂN THẠC SĨ KHOA HỌC VẬT CHẤT

Hà Nội - 2025

BÙI NGUYỄN THÀNH LONG

HÓA HỮU CƠ

2025

BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Bùi Nguyễn Thành Long

**NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN HÓA HỌC VÀ ĐÁNH GIÁ HOẠT
TÍNH KHÁNG KHUẨN, KHÁNG NẤM CỦA LOÀI HOA MỘC
(*Osmanthus fragrans* (Thunb.) Lour.) Ở VIỆT NAM**

LUẬN VĂN THẠC SĨ KHOA HỌC VẬT CHẤT

Ngành: Hóa hữu cơ

Mã số: 8 44 01 14

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC :

TS. Đỗ Tiến Lâm

A handwritten signature in blue ink, consisting of the name 'Lâm' on the top line and 'Đỗ Tiến Lâm' on the bottom line, written in a cursive style.

Hà Nội - 2025

LỜI CAM ĐOAN

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

Tác giả luận văn



Bùi Nguyễn Thành Long

LỜI CẢM ƠN

Luận văn được hoàn thành tại Viện Hóa học và Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Trong quá trình nghiên cứu, tác giả đã nhận được sự giúp đỡ quý báu của thầy cô, đồng nghiệp, bạn bè và gia đình.

Tôi bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc, cảm phục và kính trọng nhất tới TS. Đỗ Tiến Lâm, người thầy đã hướng dẫn tận tình, chu đáo và tạo mọi điều kiện thuận lợi giúp đỡ tôi trong thời gian thực hiện luận văn.

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

Tôi trân trọng cảm ơn các cán bộ Trung tâm Ứng dụng Tin Hóa học và Y-Sinh-Dược, Viện Hóa học các Hợp chất thiên nhiên đã nhiệt tình giúp đỡ và tạo mọi điều kiện cho tôi trong quá trình làm thực nghiệm và hoàn thành luận văn.

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

Tôi trân trọng cảm ơn!

Tác giả luận văn



Bùi Nguyễn Thành Long

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN.....	i
LỜI CẢM ƠN	ii
DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ CÁI VIẾT TẮT.....	v
DANH MỤC CÁC BẢNG.....	vi
DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ.....	vii
MỞ ĐẦU.....	1
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU.....	4
1.1. GIỚI THIỆU VỀ HOA MỘC (<i>OSMANTHUS FRAGRANS</i>)	4
1.2. THÀNH PHẦN HÓA HỌC CỦA HOA MỘC.....	5
1.2.1. Tinh dầu	5
1.2.2. Flavonoid	6
1.2.3. Terpenoid	9
1.2.4. Phenylpropanoid	12
1.2.5. Phenylethanol glycoside	15
1.2.6. Iridoid.....	16
1.2.7. Sterol.....	18
1.2.8. Các hợp chất khác.....	19
1.3. HOẠT TÍNH SINH HỌC LOÀI HOA MỘC	20
1.3.1. Hoạt tính chống oxy hóa.....	20
1.3.2. Hoạt tính chống tăng đường huyết	21
1.3.3. Hoạt tính chống ung thư	21
1.3.4. Hoạt tính chống viêm.....	21
1.3.5. Hoạt tính kháng khuẩn.....	21
1.4. GIỚI THIỆU PHƯƠNG PHÁP MÔ PHÒNG TRONG NGHIÊN CỨU PHÁT TRIỂN THUỐC.	22
1.4.1. Giới thiệu về phương pháp nghiên cứu phát triển thuốc sử dụng công cụ hỗ trợ máy tính.	22
1.4.2. Ứng dụng CADD trong nghiên cứu thuốc định hướng điều trị ung thư	23
CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG, PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU VÀ THỰC NGHIỆM.....	27
2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU.....	27
2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	27
2.2.1. Phương pháp xử lý mẫu	27
2.2.2. Phương pháp chưng cất lôi cuốn hơi nước sử dụng vi sóng	28
2.2.3. Phương pháp xác định thành phần tinh dầu Hoa mộc	29
2.2.4. Phương pháp chiết xuất	30

2.2.5. Phương pháp phân lập các hợp chất	30
2.2.6. Phương pháp xác định cấu trúc hợp chất.....	30
2.2.7. Phương pháp thử nghiệm hoạt tính sinh học	30
2.2.8. Phương pháp sàng lọc ảo in silico	31
2.3. THỰC NGHIỆM	33
2.3.1. Phương pháp xử lý mẫu.....	33
2.3.2. Chung cất lôi cuốn hơi nước sử dụng vi sóng.....	34
2.3.3. Xác định thành phần hóa học của tinh dầu Hoa mộc	35
2.3.4. Phân lập và tinh chế các hợp chất.....	36
2.3.3. Đánh giá hoạt tính sinh học <i>in vitro</i> của các hợp chất sạch	38
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....	39
3.1. VỀ THÀNH PHẦN HÓA HỌC.....	39
3.1.1. Kết quả xác định thành phần hóa học của tinh dầu Hoa mộc	39
3.1.2. Các hợp chất flavonoid	41
3.1.3. Các hợp chất triterpenoid.....	46
3.2. VỀ HOẠT TÍNH SINH HỌC	51
3.2.1. Hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm	51
3.2.2. Hoạt tính gây độc tế bào theo phương pháp MTT	52
3.3. VỀ SÀNG LỌC <i>IN SILICO</i>	53
3.3.1. Kết quả mô phỏng docking phân tử.....	53
3.3.2. Kết quả mô phỏng động lực học phân tử sử dụng kỹ thuật kéo nhanh phối tử.....	56
KẾT LUẬN	60
KIẾN NGHỊ	61
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	62

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ CÁI VIẾT TẮT

Viết tắt	Tiếng Việt
CC	Sắc ký cột
CADD	Nghiên cứu phát triển thuốc sử dụng công cụ hỗ trợ máy tính
DEPT	Phổ DEPT
FPL	Fast pulling ligand
HMBC	Phổ tương tác dị hạt nhân qua nhiều liên kết H-C
HSQC	Phổ tương tác dị hạt nhân trực tiếp H-C
MD	Mô phỏng động lực học phân tử
NMR	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân
TLC	Sắc ký bản mỏng
TMS	Tetramethylsilane
UV	Tia cực tím

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 3. 1. Thành phần hóa học của tinh dầu Hoa mộc thu nhận được từ phương pháp chưng cất lôi cuốn hơi nước có sự hỗ trợ của vi sóng.....	39
Bảng 3.2. Dữ liệu phổ ^1H - và ^{13}C -NMR của 1 và chất tham khảo	43
Bảng 3.3. Dữ liệu phổ ^1H - và ^{13}C -NMR của 4 và chất tham khảo	45
Bảng 3.4. Dữ liệu phổ ^1H - và ^{13}C -NMR của 2 và chất tham khảo	47
Bảng 3.5. Dữ liệu phổ ^1H - và ^{13}C -NMR của 3 và chất tham khảo.	49
Bảng 3.6. Kết quả kháng khuẩn, kháng nấm của các hợp chất phân lập được...	51
Bảng 3.7. Kết quả tác dụng gây độc tế bào của các hợp chất phân lập được	52
Bảng 3.8. Kết quả mô phỏng docking của 10 chất ức chế thực nghiệm.....	53
Bảng 3.9. Kết quả docking phân tử của 4 hợp chất nghiên cứu	54
Bảng 3.10. Kết quả mô phỏng FPL đối với các chất ức chế thực nghiệm.....	57
Bảng 3.11. Kết quả mô phỏng FPL đối với oleanolic acid và luteolin.....	59

DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ

Hình 1.1. Nhiễm sắc thể 17 mã hóa cấu trúc của topoisomerase II α	25
Hình 1.2. Cấu trúc chính của TOP2A ở người.....	25
Hình 1.3. Liên kết DNA TOP2A của con người.....	25
Hình 1.4. Cắt và nối xoắn DNA.....	25
Hình 1.5. Vai trò của Mg^{2+} trong cơ chế xúc tác của TOP2A.....	25
Hình 2.1. Cây Hoa mộc.....	27
Hình 2.2. Sơ đồ minh họa.....	28
Hình 2.3. Máy GC – MS Agilent Technologies 5975C.....	29
Hình 2.4. Sơ đồ chiết mẫu lá Hoa mộc (<i>Osmanthus fragrans</i>).....	33
Hình 2.5. Sơ đồ quy trình chung cất tinh dầu Hoa mộc bằng phương pháp chưng cất hơi nước có sử dụng vi sóng.....	34
Hình 2.6. Sơ đồ phân lập các hợp chất từ Hoa mộc (<i>Osmanthus fragrans</i>).....	37
Hình 3.1. Sắc ký đồ của tinh dầu Hoa mộc thu được từ phương pháp chưng cất lôi cuốn hơi nước có sự hỗ trợ của vi sóng.	40
Hình 3.2. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC (H→C) chính của 1	42
Hình 3.3. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC (H→C) chính của 4	44
Hình 3.4. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC (H→C) chính của 2	47
Hình 3.5. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC (H→C) chính của 3	49
Hình 3.6. Hằng số tương tác giữa năng lượng liên kết tự do thu được từ mô phỏng và thực nghiệm.....	54
Hình 3. 7. Cấu hình tương tác giữa oleanolic acid (A), luteolin (B) với Topoisomerase II được dự đoán bởi phần mềm AutoDock Vina 1.2.5.....	55
Hình 3.8. Hệ số tương tác cao giữa công kéo với năng lượng liên kết tự do thực nghiệm.....	57
Hình 3.9. Đồ thị biểu diễn giá trị RMSD, F_{max} , W của hai phức hệ nghiên cứu. oleanolic acid (A), luteolin (B).....	58

MỞ ĐẦU

Trong những năm gần đây, sự gia tăng mạnh mẽ của các chủng vi sinh vật gây bệnh có khả năng kháng thuốc đã và đang trở thành một trong những thách thức lớn đối với y học hiện đại [1,2]. Theo báo cáo của Tổ chức Y tế Thế giới (WHO), ước tính đến năm 2050, kháng kháng sinh có thể trở thành nguyên nhân gây tử vong hàng đầu với khoảng 10 triệu ca mỗi năm nếu không có giải pháp kịp thời. Việc lạm dụng và sử dụng không hợp lý các loại kháng sinh tổng hợp không chỉ làm giảm hiệu quả điều trị mà còn góp phần thúc đẩy nhanh quá trình hình thành các dòng vi khuẩn, vi nấm kháng thuốc. Chính vì vậy, nhu cầu tìm kiếm các nguồn hoạt chất sinh học mới có nguồn gốc tự nhiên, vừa hiệu quả trong việc ức chế vi sinh vật gây bệnh, vừa hạn chế được tác dụng phụ, đang trở thành xu hướng nghiên cứu ưu tiên của khoa học hiện đại.

Trong kho tàng thực vật phong phú của Việt Nam, có rất nhiều loài cây dược liệu truyền thống chứa các hợp chất thứ cấp có giá trị sinh học cao nhưng chưa được nghiên cứu một cách hệ thống và đầy đủ [3,4]. Một trong những loài thực vật tiềm năng đó là Hoa mộc (*Osmanthus fragrans* (Thunb.) Lour.), một loài cây được biết đến với hương thơm đặc trưng, thường được trồng làm cảnh hoặc sử dụng trong văn hóa thưởng trà, chế biến thực phẩm ở một số nước châu Á [5,6]. Trong y học cổ truyền, Hoa mộc được sử dụng để hỗ trợ tiêu hóa, giảm ho, chống viêm và làm dịu tinh thần. Tuy nhiên, những ứng dụng truyền thống này phần lớn dựa trên kinh nghiệm dân gian, trong khi các nghiên cứu khoa học hiện đại về thành phần hóa học cũng như hoạt tính sinh học của Hoa mộc, đặc biệt trong điều kiện thổ nhưỡng và khí hậu của Việt Nam, vẫn còn rất hạn chế.

Một số nghiên cứu trên thế giới đã bước đầu chỉ ra rằng Hoa mộc chứa nhiều hợp chất sinh học như flavonoid, coumarin, triterpenoid, tinh dầu và các dẫn xuất phenolic – những nhóm chất có tiềm năng cao trong việc kháng khuẩn, kháng nấm và chống oxy hóa [1]. Tuy nhiên, hàm lượng và thành phần cụ thể của các hợp chất này có thể thay đổi tùy theo nguồn gốc địa lý, điều kiện sinh trưởng, thời điểm thu hái cũng như phương pháp chiết xuất. Do đó, việc nghiên cứu đặc

điểm hóa học và hoạt tính sinh học của Hoa mộc thu hái tại Việt Nam là cần thiết để đánh giá tiềm năng ứng dụng thực tế của loài cây này trong lĩnh vực dược phẩm, mỹ phẩm hoặc thực phẩm chức năng [2].

Ung thư đang trở thành một thách thức lớn đối với sức khỏe cộng đồng toàn cầu, với tỷ lệ mắc và tử vong ngày càng tăng. Đặc biệt, tại Việt Nam, ung thư gan và phổi đã trở thành một vấn đề nghiêm trọng, ảnh hưởng đến hàng triệu người. Những nghiên cứu gần đây đã khảo sát tác dụng của chiết xuất từ Hoa mộc (*Osmanthus fragrans*) đối với các dòng tế bào ung thư [1]. Các kết quả cho thấy rằng chiết xuất từ Hoa mộc có thể làm giảm sự sống sót của tế bào ung thư bằng cách gây ra sự chết tế bào (apoptosis) thông qua các con đường sinh lý như tăng cường sự tích tụ các gốc tự do hoặc làm gián đoạn quá trình sinh trưởng và phân chia tế bào ung thư. Điều đó gợi ý đến các hợp chất chính phân lập được từ Hoa mộc (*Osmanthus fragrans*) có khả năng kháng ung thư tốt, đặc biệt là ung thư gan và phổi, hơn nữa ứng dụng công nghệ 4.0 để góp phần làm rõ mối quan hệ giữa tính toán và thực nghiệm.

Xuất phát từ những lý do nêu trên, đề tài “**Nghiên cứu thành phần hóa học và đánh giá hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm của loài Hoa mộc (*Osmanthus fragrans* (Thunb.) Lour.) ở Việt Nam**” được lựa chọn với mong muốn góp phần làm sáng tỏ giá trị khoa học và thực tiễn của loài thực vật này. Nghiên cứu không chỉ nhằm xác định các hợp chất có hoạt tính sinh học có trong Hoa mộc mà còn bước đầu đánh giá khả năng ứng dụng của chúng trong phòng và điều trị các bệnh do vi sinh vật gây ra. Đồng thời, đề tài mở rộng thử nghiệm hoạt tính các hợp chất phân lập được đối với các dòng tế bào ung thư và kiểm nghiệm lại bằng tính toán lý thuyết. Kết quả của đề tài cũng sẽ đóng góp vào cơ sở dữ liệu thực vật dược liệu trong nước, hỗ trợ các định hướng khai thác, phát triển bền vững và nâng cao giá trị kinh tế của loài cây bản địa này.

Mục tiêu nghiên cứu:

- Chiết xuất, phân lập và xác định cấu trúc 2-3 hợp chất sạch từ cây Hoa mộc (*Osmanthus fragrans*) tại Việt Nam.

- Đánh giá *in vitro* hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm của các hợp chất phân lập.

- Đánh giá *in vitro* khả năng gây độc tế bào ung thư gan (Hep-G2), phổi (A549) và kiểm chứng bằng mô hình tính toán lý thuyết.

Nội dung nghiên cứu

- Tổng hợp tài liệu liên quan đến cây Hoa mộc (*Osmanthus fragrans*).

- Xử lý mẫu, chiết xuất và phân lập các hợp chất tinh khiết bằng phương pháp phù hợp.

- Đánh giá *in vitro* hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm và khả năng gây độc tế bào ung thư gan (Hep-G2), phổi (A549).

- Ứng dụng công nghệ 4.0 để kiểm chứng hoạt tính gây độc tế bào ung thư.

Những đóng góp mới của luận văn:

Bốn hợp chất, gồm 2 hợp chất flavonoid: luteolin (1) và quercitrin (4) và 2 hợp chất triterpenoid: oleanolic acid (2) và ursolic aldehyde (3) đã được phân lập và xác định từ loài loài Hoa mộc (*Osmanthus fragrans* (Thunb.) Lour.) ở Việt Nam, phù hợp với thành phần hóa học các loài chi *Osmanthus* đã nghiên cứu.

Đã đánh giá tác dụng kháng khuẩn, kháng nấm và gây độc đối với dòng tế bào ung thư gan (HepG2) và phổi (A549) ở người *in vitro* của 4 hợp chất phân lập được. Kết quả cho biết hợp chất quercitrin (4) thể hiện hoạt tính ức chế tốt nhất đối với hai chủng *Staphylococcus aureus* và *Saccharomyces cerevisiae* với giá trị MIC 100 µg/ml. Hợp chất luteolin (1) thể hiện hoạt tính gây độc đối với dòng tế bào ung thư gan (HepG2) và phổi (A549) ở người tốt nhất với giá trị IC₅₀ lần lượt là 22,23 và 18,35 µM.

Đã mô phỏng liên kết giữa oleanolic acid (2) và luteolin (1) với protein topoisomerase II cho biết, thấy khả năng ái lực liên kết cao với Topoisomerase II từ đó thể hiện hoạt tính kháng u thông qua việc ức chế chức năng hoạt động của protein này. Kết quả mô phỏng này gợi ý tiềm năng ứng dụng của hai hợp chất trong các bước nghiên cứu phát triển thuốc chống ung thư tiếp theo nhằm mục tiêu ức chế Topoisomerase II.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

1.1. GIỚI THIỆU VỀ HOA MỘC (*OSMANTHUS FRAGRANS*)

Chi Hoa mộc (*Osmanthus*) có khoảng 30 loài thuộc họ Ô liu (*Oleaceae*) [5]. Chúng là loại cây thân gỗ nhỏ và cây bụi [6], cao 3-12m. Hoa mộc (*Osmanthus fragrans* (Thunb.) Lour.) nổi tiếng về màu sắc và hương thơm, được trồng làm cảnh tại Bắc Mỹ, Đông Âu, Đông Nam Á và các đảo Thái Bình Dương [7], với lịch sử lên đến hơn 2500 năm. Tại Việt Nam, loài hoa này mọc hoang ở Ninh Bình, Kon Tum và được trồng ở nhiều nơi [3]. Quả của cây Hoa mộc có thể làm giúp ẩm dạ dày, làm dịu gan, bổ thận và xua tan cảm lạnh. Nó được sử dụng như phương thuốc dân gian chữa bệnh dạ dày, giảm đau và cho các mục đích khác như bệnh thấp khớp và hôi miệng [8,9]. Ngoài ra, trong y học dân gian, hạt của Hoa mộc cũng được mô tả là có hiệu quả trong việc cải thiện chức năng tim mạch và được sử dụng như một loại thuốc sắc để làm giảm chứng đau tim [10].

Hoa mộc (*Osmanthus fragrans*) có 3 thứ là *Osmanthus fragrans* var. *thunbergii*, var. *fragrans* và var. *semperflorens*. Dưới đây là bảng so sánh chi tiết 3 thứ của Hoa mộc:

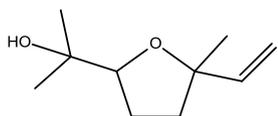
Đặc điểm	<i>Osmanthus fragrans</i> var. <i>fragrans</i>	<i>Osmanthus fragrans</i> var. <i>thunbergii</i>	<i>Osmanthus fragrans</i> var. <i>semperflorens</i>
Tên thông thường	Mộc tê, Quế hoa	Mộc tê vàng Nhật Bản	Mộc tê bốn mùa
Phân bố chính	Trung Quốc, Việt Nam	Nhật Bản, Hàn Quốc	Trung Quốc, Đài Loan
Đặc điểm lá	Lá dày, xanh đậm, mép răng cưa	Lá mỏng, xanh nhạt, mép nguyên	Lá nhỏ, hình elip hẹp, xanh sáng
Đặc điểm hoa			
Màu sắc	Trắng ngà/vàng nhạt	Vàng cam rực rỡ	Trắng tinh khiết
Kích thước	3-4mm	5-6mm	2-3mm
Mùi hương	Thơm nồng, ngọt	Thơm dịu, hương cam quýt	Thơm thanh nhẹ
Thời gian nở	Tháng 8-10	Tháng 9-11	Quanh năm

Thành phần chính tinh dầu	β -ionone (25-30%), methyl anthranilate	linalool oxide (35-40%), γ -decalactone	<i>cis</i> -jasmone (20-25%), benzyl alcohol
Hoạt tính:			
<i>Kháng S. aureus (MIC)</i>	64 $\mu\text{g/ml}$	32 $\mu\text{g/ml}$	128 $\mu\text{g/ml}$
- <i>Chống oxy hóa (IC₅₀)</i>	45 $\mu\text{g/ml}$	38 $\mu\text{g/ml}$	52 $\mu\text{g/ml}$
- <i>Ức chế Topo II (%)</i>	78% (100 $\mu\text{g/ml}$)	65%	82%
Ứng dụng	Trà, rượu thuốc	Mứt, hương liệu bánh	Trang trí món ăn

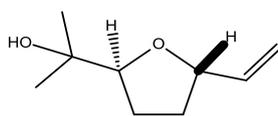
1.2. THÀNH PHẦN HÓA HỌC CỦA HOA MỘC

1.2.1. Tinh dầu

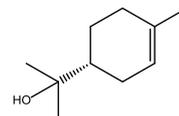
Tinh dầu của Hoa mộc (*Osmanthus fragrans*) được chiết xuất từ các bộ phận khác nhau như hoa, lá, quả có tác dụng cải thiện khả năng miễn dịch, chống ung thư, giảm ho, long đờm [11]. Đồng thời, vì là mùi hương vị tự nhiên, nên tinh dầu Hoa mộc (*Osmanthus fragrans*) là một chất tạo hương quan trọng cho nước hoa, sản phẩm chăm sóc da và mỹ phẩm. Tinh dầu Hoa mộc (*Osmanthus fragrans*) chủ yếu chứa monoterpene, sesquiterpene và alcohol, trong đó, linalool oxide (1), *trans*-linalool oxide (2), α -terpineol (3), linalool (4), linalool oxide (5), α -ionone (6), dihydro- β -ionone (7), γ -decalactone (8) và β -ionone (9) là các thành phần chính và là chất tạo hương thơm [11-15].



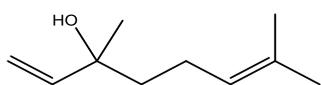
1



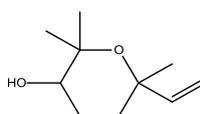
2



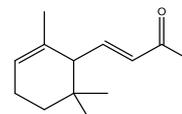
3



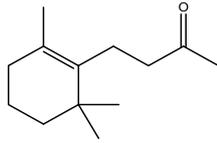
4



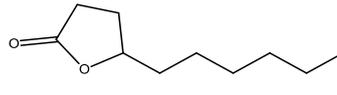
5



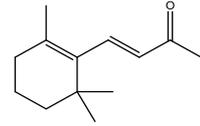
6



7



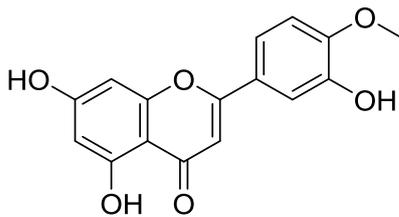
8



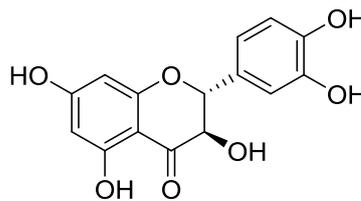
9

1.2.2. Flavonoid

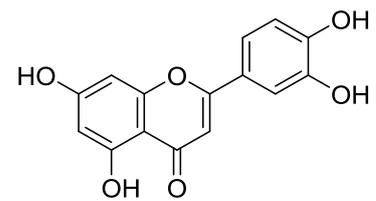
Đặc điểm cấu trúc của flavonoid được phân lập là hai vòng benzen có nhóm hydroxyl phenolic được kết nối với nhau thông qua ba nguyên tử carbon trung tâm, và khung cơ bản của nó là 2-phenylchromone. Các chất chuyển hóa thứ cấp quan trọng về mặt sinh học đã thu hút sự chú ý rộng rãi nhờ các hoạt tính dược lý đáng kể như chống oxy hóa, chống viêm và chống ung thư [16]. Cho đến nay, có 18 flavonoid đã được phân lập từ hạt, lá, quả và hoa của loài Hoa mộc (*Osmanthus fragrans*), gồm diosmetin (**10**), dihydroquercetin (**11**), luteolin (**12**), naringenin (**13**), quercetin (**14**), genistein (**15**), astilbin (**16**), aromadendrin (**17**), proanthocyanidin (**18**), kaempferol-3-*O*- β -*D*-glucopyranoside (**19**), 4'-methoxy-genistin (**20**), isoscutellarein (**21**), naringin (**22**), kaempferol (**23**), apigenin (**24**), rutin (**25**), genistin (**26**) và 3',7- dihydroxy-4'-methoxyisoflavon (**27**).



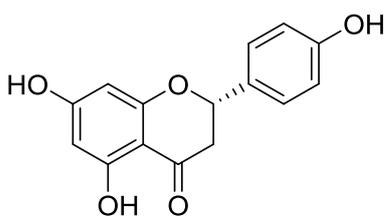
10



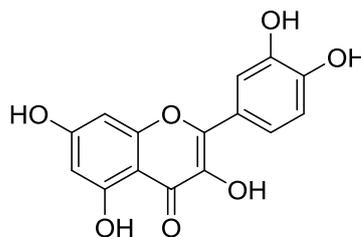
11



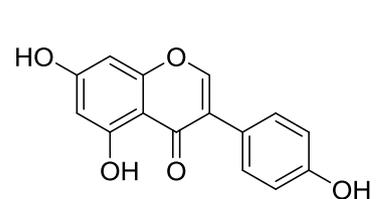
12



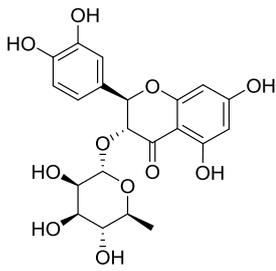
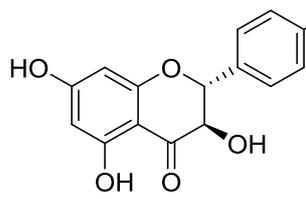
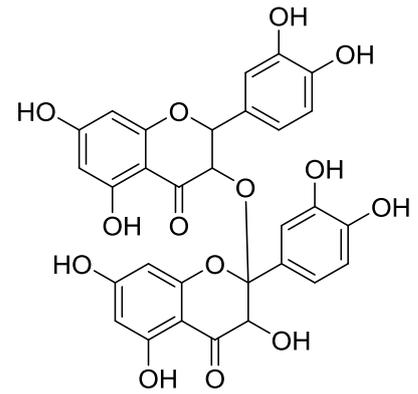
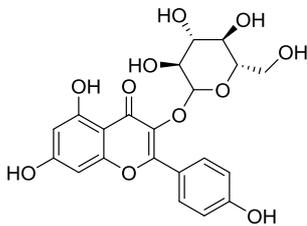
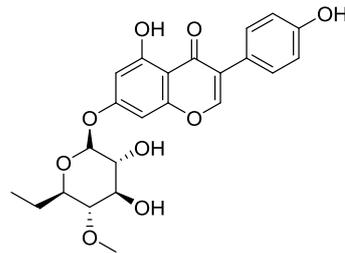
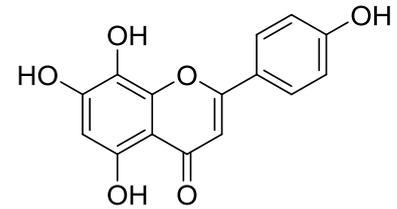
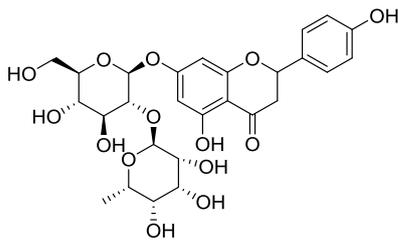
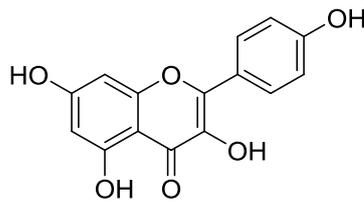
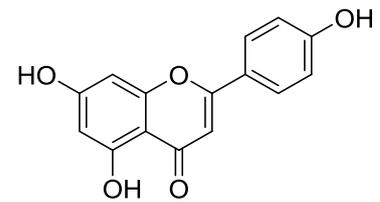
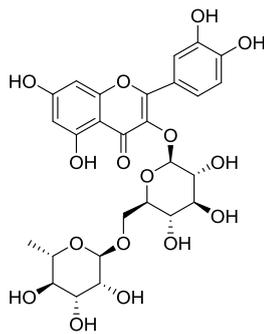
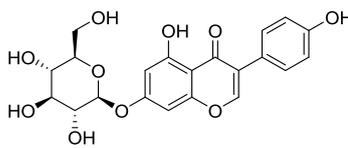
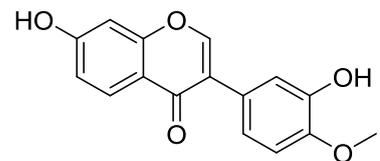
13



14

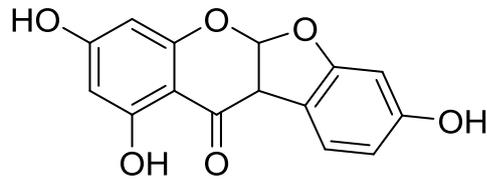


15

**16****17****18****19****20****21****22****23****24****25****26****27**

Các hợp chất quercetin, kaempferol và rutin đã thể hiện hoạt tính chống ung thư và chống oxy hóa tốt, naringin và genistin biểu hiện hoạt tính chống viêm [17]. Ngoài ra, genistein và lupinalbin A (**28**) ức chế sự phát triển của nhiều tế

bào ung thư [18]. Đây là các hoạt chất flavonoid chính trong Hoa mộc (*Osmanthus fragrans*).



28

Diosmetin là một flavonoid glycoside được phân lập từ hoa Hoa mộc (*Osmanthus fragrans*). Các nghiên cứu *in vivo* đã chỉ ra rằng diosmetin có thể kích thích tế bào MH7A và tăng tỷ lệ apoptosis để tác động đến việc kích hoạt các đường truyền tín hiệu PI3K/Akt và NF- κ B, từ đó làm giảm bệnh nhồi máu cơ tim [19,20].

Dihydroquercetin là một flavonoid quan trọng được tìm thấy trong tự nhiên và cũng được phân lập từ hoa Hoa mộc (*Osmanthus fragrans*) thể hiện hoạt tính chống oxy hóa, kháng virus, chống viêm, chống dị ứng, chống apoptosis, chống ung thư tốt, cùng với hoạt tính bảo vệ gan [21-23]. Hơn nữa, dihydroquercetin còn có tác dụng làm giảm huyết áp, giảm bớt các bệnh về tim mạch và còn có thể tái tạo mô não và cải thiện chấn thương [24] và làm giảm các triệu chứng của bệnh thận do tiểu đường ở chuột bằng cách tác động đến đường truyền tín hiệu mTORC2/Akt [25].

Astilbin chủ yếu được tìm thấy trong hoa Hoa mộc (*Osmanthus fragrans*) có hoạt tính chống trầm cảm, chống oxy hóa, trị đái tháo đường, giảm đau và kháng khuẩn, ức chế phù nề, bảo vệ gan và thận, thúc đẩy tăng sinh tế bào sụn và chống viêm và ức chế miễn dịch [26]. Astilbin còn có tác dụng chống thiếu máu não cục bộ và có thể kích hoạt con đường PI3K-Akt và điều chỉnh con đường MAPK [27,28].

Luteolin chủ yếu được tìm thấy trong lá của loài Hoa mộc (*Osmanthus fragrans*) [29] có hoạt tính chống oxy hóa và chống ung thư, đồng thời nó bảo vệ hệ thần kinh và tăng cường trí nhớ [30,31]. Luteolin có thể cải thiện tình trạng tăng uric acid máu và viêm khớp do gout cấp tính bằng cách giảm mức độ các yếu

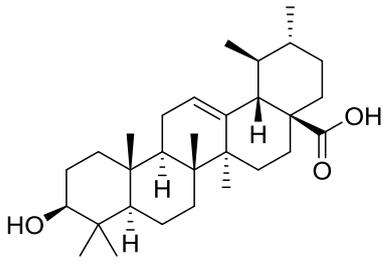
tổ gây viêm (TNF- α , IL-1 β) ở chuột [32], làm giảm các triệu chứng tổn thương gan cấp tính và thiếu máu do thủng gan gây ra [33].

Naringenin không chỉ được phân lập từ loài Hoa mộc (*Osmanthus fragrans*) mà còn được tìm thấy ở các loài như Cam ngọt (*Citrus sinensis*), Ráng chân vịt (*Pteris cretica*), Cà chua (*Lycopersicon esculentum*), Cam đắng (*Citrus aurantium*), Hành lá (*Allium fistulosum*), Lan hoàng thảo (*Dendrobium nobile*),... [34]. Naringenin có tác dụng chống viêm, kháng khuẩn, chống oxy hóa, chống tổn thương phổi, chống lão hóa và chống ung thư (chống ung thư dạ dày, gan, vú, ruột kết,...), có thể điều trị các bệnh chuyển hóa như tiểu đường, tăng huyết áp và tăng lipid máu [35,36], làm giảm quá trình apoptosis bằng cách kích hoạt đường truyền tín hiệu ER và P13K/Akt [37] và ức chế xơ vữa động mạch vành và bảo vệ tế bào cơ tim [38]. Naringenin đóng vai trò điều hòa miễn dịch vì có cấu trúc tương tự như estrogen và có thể điều chỉnh các chất truyền tin thứ cấp của các đường dẫn tín hiệu xuôi dòng (đường dẫn PKC, đường dẫn AKT, đường dẫn MAPK, ... [39].

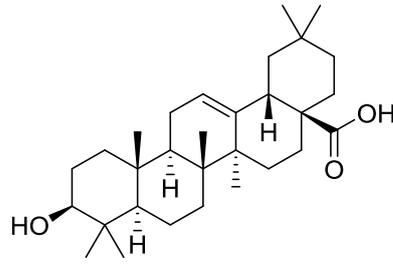
1.2.3. Terpenoid

Terpenoid là một nhóm chất chuyển hóa thứ cấp trong thực vật, có nhiều trong loài Hoa mộc (*Osmanthus fragrans*), có hoạt tính ức chế β -secretase, chống tiểu đường,... [40]. Cho đến nay, có khoảng hơn 20 hợp chất terpenoid đã được phân lập từ quả tươi, hoa, hạt và lá Hoa mộc (*Osmanthus fragrans*), chủ yếu là ursolic acid (**29**) và oleanolic acid (**30**)] thể hiện hoạt tính chống tiểu đường tốt, cùng các dẫn xuất của nó gồm ursolaldehyde (**31**), 3 β -*cis*-*p*-coumaroyloxy-2 α -hydroxyl-urs-12-en-28-oic acid (**32**), 3 β -*trans*-*p*-coumaroyloxy-2 α -hydroxyl-urs-12-en-28-oic acid (**33**), 3-*O*-*cis*-coumaroylmaslinic acid (**34**), 3-*O*-*trans*-*p*-coumaroyltormentic acid (**35**), loganic acid (**36**), maslinic acid (**37**), 2 α -hydroxy-oleanolic acid (**38**), acetyloleanolic acid (**39**), methyl oleanolate (**40**), 3-ketooleanolic acid (**41**), 2 α ,3 β ,23-trihydroxyoleana-12-ene-28-oic acid methyl ester (**42**), oleoside (**43**), lupeol (**44**), borreriagenin (**45**), betulinic acid (**46**), betulin (**47**), fouquierol (**48**), rotundioic acid (**49**) [41].

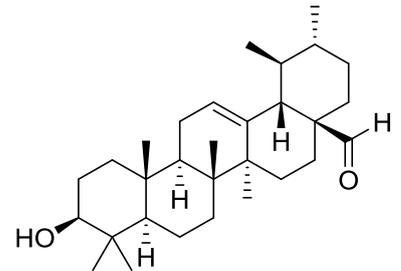
10



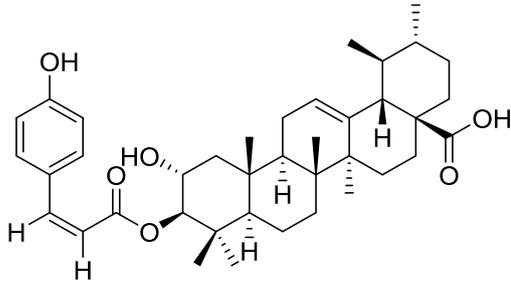
29



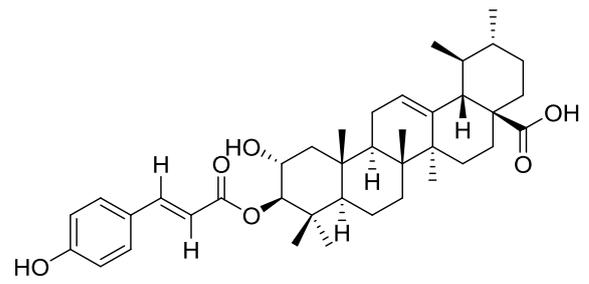
30



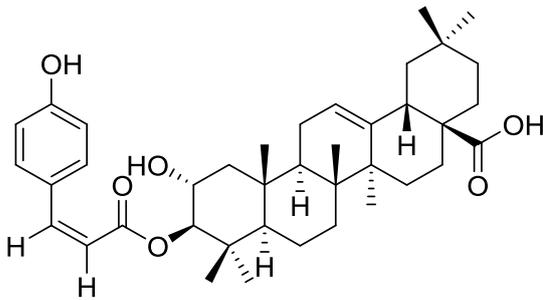
31



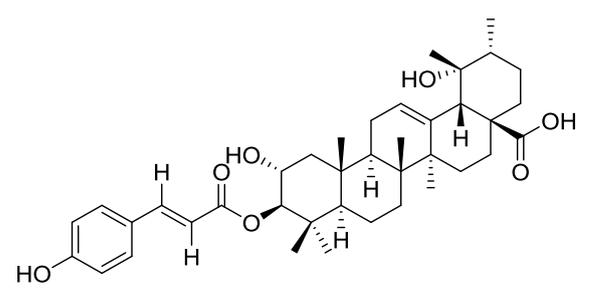
32



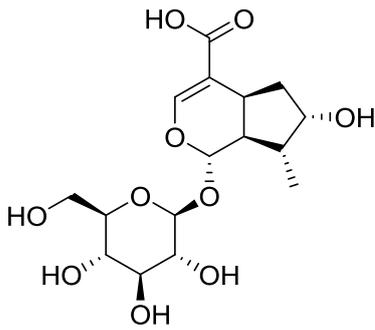
33



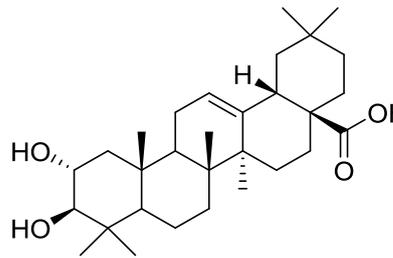
34



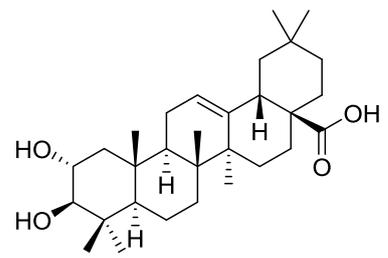
35



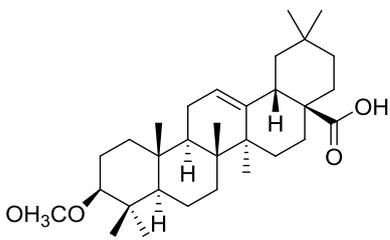
36



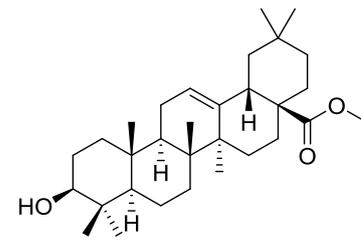
37



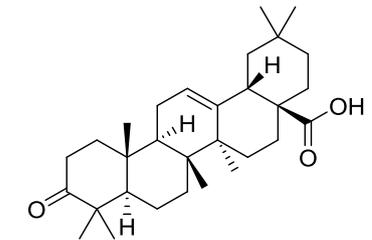
38



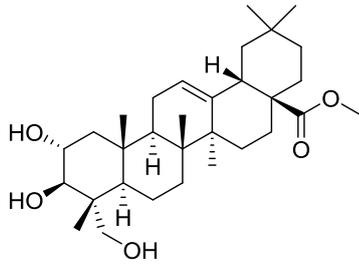
39



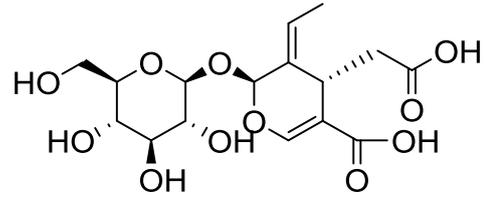
40



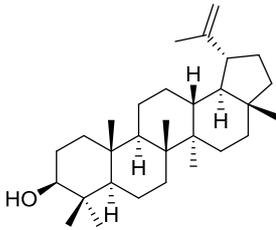
41



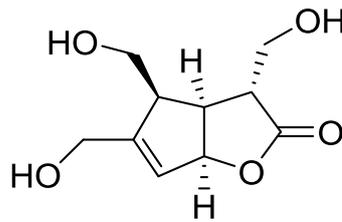
42



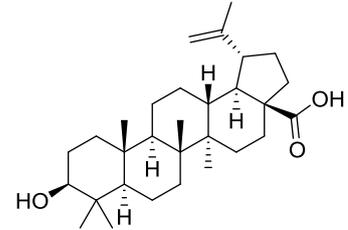
43



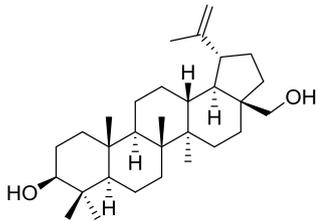
44



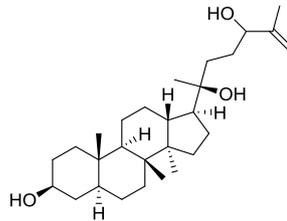
45



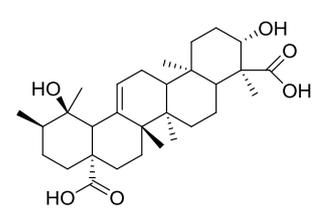
46



47



48



49

Bốn terpenoid trong lá Hoa mộc (*Osmanthus fragrans*) đã được phân lập gồm 3-O-*cis*-coumaroylmaslinic acid, 3 β -*cis*-*p*-coumaroyloxy-2 α -hydroxyl-urs-12-en-28-oic acid, 3-O-*trans*-*p*-coumaroyltormentic acid và 3 β -*trans*-*p*-coumaroyloxy-2 α -hydroxyl-urs-12-en-28-oic acid đều thể hiện hoạt tính chống viêm đáng kể [42]

Loganic acid là một hợp chất glycosid iridoid có hoạt tính chống tạo mỡ và chống loãng xương. Loganic acid ức chế quá trình tạo mỡ của tế bào tiền mỡ 3T3-L1 và ở chuột thử nghiệm [43]. Loganic acid có thể làm tăng sản xuất nguyên bào xương và ngăn chặn sự thoái hóa nguyên bào xương. Điều đó cho thấy rằng loganic acid có thể là một tác nhân chống loãng xương tiềm năng [44].

Oleoside là một hợp chất glycoside iridoid tự nhiên được tìm thấy trong hoa của Hoa mộc (*Osmanthus fragrans*) [45]. Oleoside thúc đẩy hoạt động của các enzym giải độc, cạnh tranh với coenzym Q với tư cách là chất mang điện tử

trong chuỗi vận chuyển điện tử của ty thể, hoạt động như một chất chống oxy hóa nhậy gốc tự do và ức chế quá trình peroxid hóa lipid [46].

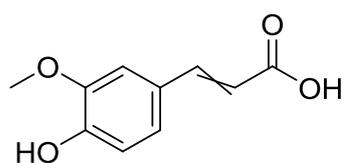
Oleanolic acid là một hợp chất triterpenoid có tác dụng chống ung thư, bảo vệ gan, giảm hoạt động của enzyme, tăng cường tim, thúc đẩy tái tạo tế bào gan, có tác dụng chống viêm, thúc đẩy tăng sinh tế bào lympho, giảm lipid máu và lượng đường trong máu, ức chế kết tập tiểu cầu, và bảo vệ niêm mạc ruột. Ngoài ra, các nghiên cứu đã phát hiện ra rằng oleanolic acid có khả năng dọn các gốc tự do DPPH và bảo vệ các tế bào nội mô tĩnh mạch rốn của con người khỏi bị tổn thương do oxy hóa. Hơn nữa, oleanolic acid có tác dụng chống ung thư như gây ra hiện tượng apoptosis của các tế bào ung thư thực quản thông qua việc điều chỉnh các con đường truyền tín hiệu và nó có ít phản ứng bất lợi và độc tính thấp [47-49]

Maslinic acid là một triterpenoid được tìm thấy trong hoa và quả của loài Hoa mộc (*Osmanthus fragrans*) có tác dụng chống viêm và chống xơ hóa, đồng thời ức chế nhiễm ký sinh trùng, chống oxy hóa, có hiệu quả điều trị ung thư ruột kết, ung thư đại trực tràng, ung thư tuyến tụy, ung thư phổi, ... [50,51].

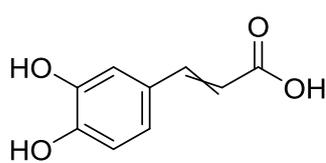
1.2.4. Phenylpropanoid

Phenylpropanoid là được phân bố rộng rãi trong nhiều họ thực vật và có nhiều hoạt tính dược lý. Hiện nay, có khoảng 40 phenylpropanoid đã được phân lập từ Hoa mộc (*Osmanthus fragrans*) và được chia thành các nhóm: phenylpropanoid đơn giản, coumarin và lignan gồm ferulic acid (50), caffeic acid (51), methyl caffeate (52), *p*-hydroxycinnamic acid (53), *p*-hydroxyphenethyl alcohol ethyl (54), *p*-hydroxyphenylacetate (55), C-veratroylglycol (56), *trans-p*-coumaric acid (57), chlorogenic acid (58), 3,4-dihydroxyacetophenone (59), *p*-hydroxyphenylacetic acid (60), methyl-*p*-hydroxyphenylacetate (61), *p*-hydroxyacetophenone (62), tyrosyl acetate (63), hydroxytyrosol (64), 6,7-dihydroxycoumarin (65), 7-hydroxycoumarin (66), coelonin (67), chicanin (68), olivil 4-O- β -D-glucopyranoside (69), olivil 4-O- β -D-glucopyranoside isomer (70), phillyrin (71), methyloleoside-phillyrin (72), syringaresinol (73),

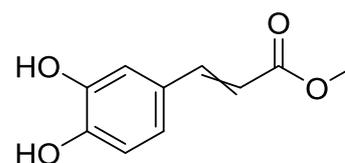
phillygenin (74), indigoticoside A (75), lariciresinol 4'-O- β -D-glucopyranoside (76), ciwujiatone (77), 3,3'-bisdemethylpinoresinol (78), fraxiresinol 1-O- β -D-glucoside (79), (+)-*E*-pinoresinol (80), (+)-pinoresinol (81), trigoflavidone (82), lipedoside A (83), floraosmanoside I (84), floraosmanoside II (85) và floraosmanoside III (86). Trong số đó, hai lignan: phillygenin và ciwujiatone từ hoa và lá của Hoa mộc (*Osmanthus fragrans*) thể hiện hoạt tính chống oxy hóa, chống viêm và bảo vệ gan tốt [52].



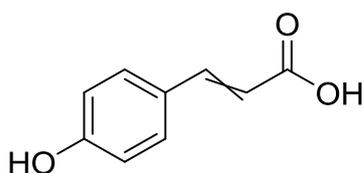
50



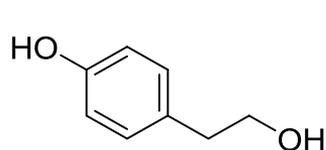
51



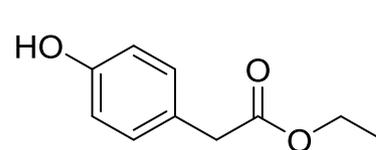
52



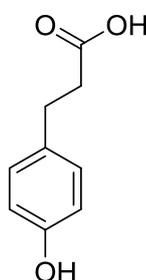
53



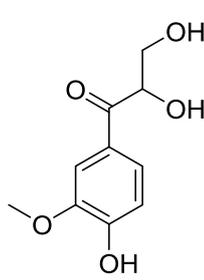
54



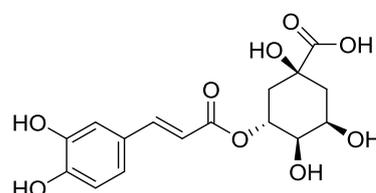
55



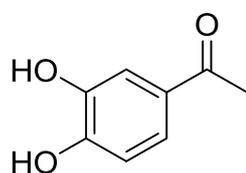
56



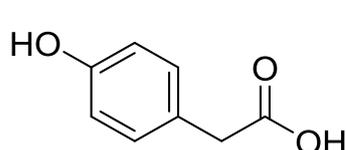
57



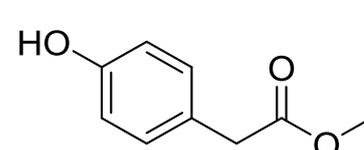
58



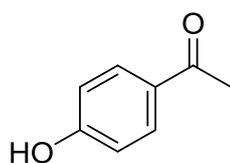
58



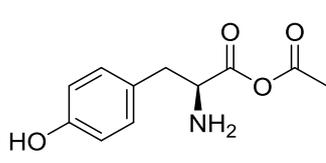
60



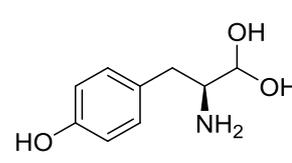
61



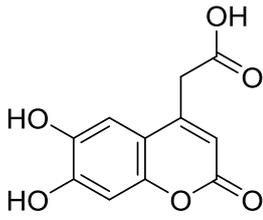
62



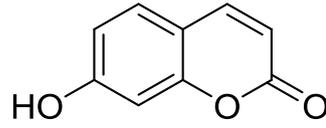
63



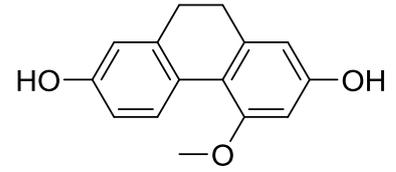
64



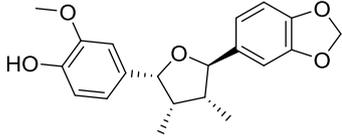
65



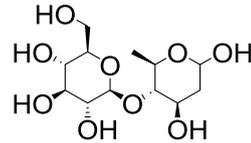
66



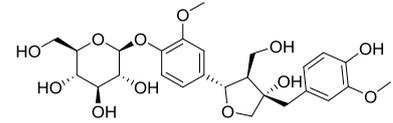
67



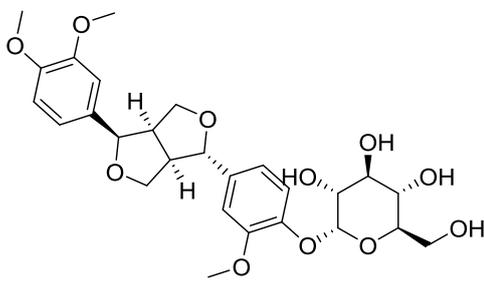
68



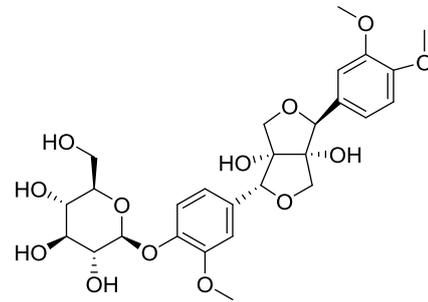
69



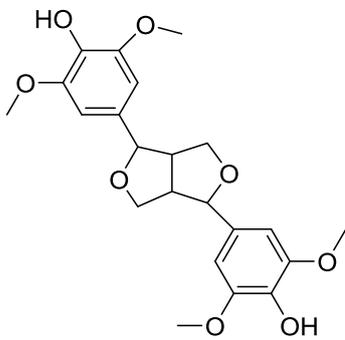
70



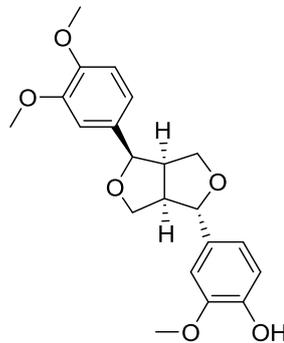
71



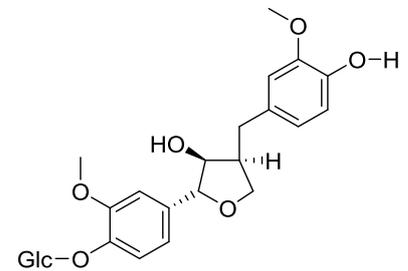
72



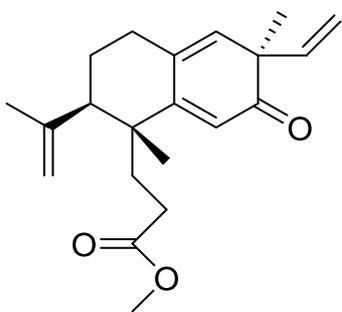
73



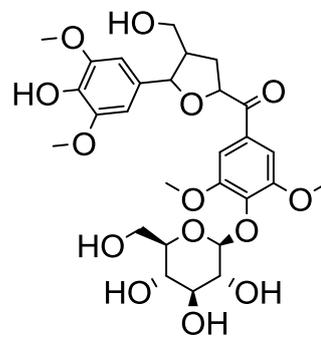
74



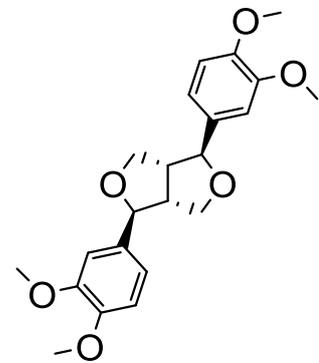
75



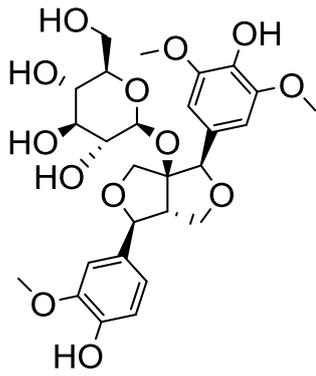
76



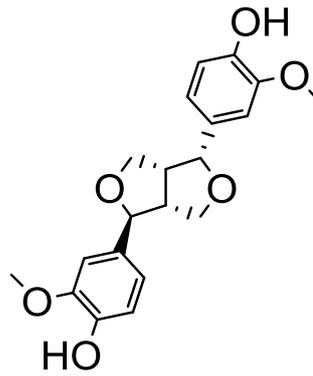
77



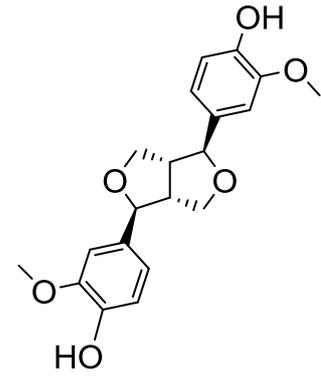
78



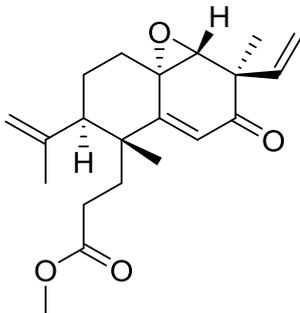
79



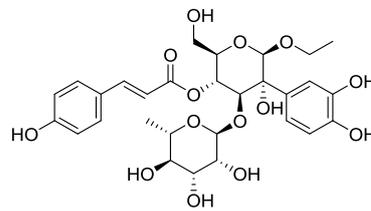
80



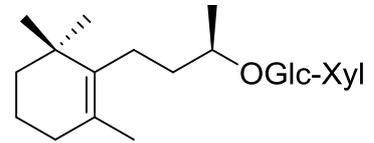
81



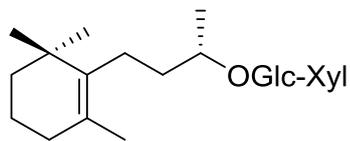
82



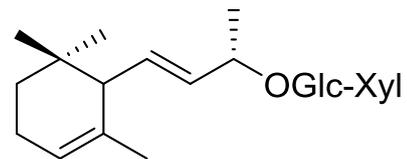
83



84



85

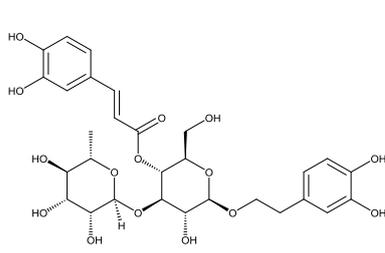


86

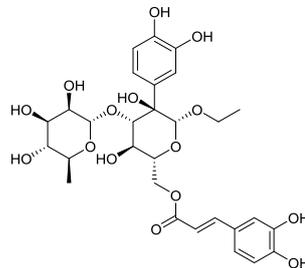
1.2.5. Phenylethanol glycoside

Hợp chất phenylethanol glycoside là một loại hợp chất carbohydrate có phenethyl alcohol thay thế làm aglycon và có đặc tính dược lý đáng kể. Chúng phân bố rộng rãi trong thực vật, là những loại thuốc tiềm năng. Hiện nay, 12 hợp chất phenylethanol glycoside, gồm verbascoside (**87**), isoacteoside (**88**), campneoside I (**89**), r-suspensaside (**90**), suspensaside A (**91**), β -hydroxyacteoside (**92**), salidroside (**93**), osmanthuside H (**94**), hydroxytyrosol glucoside (**95**), forsythoside E (**96**), forsythoside A (**97**) và isooleoacteoside (**98**) đã được phân lập từ rễ, hoa và quả Hoa mộc (*Osmanthus fragrans*) với hoạt tính chống oxy hóa tuyệt vời. Trong số các hợp chất này, verbascoside là hợp chất có hàm lượng cao và thể hiện hoạt tính chống oxy hóa chính trong Hoa mộc

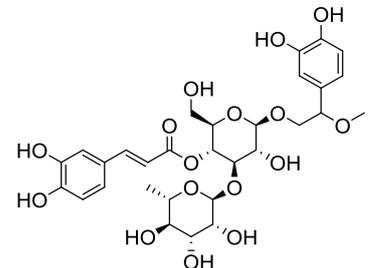
(*Osmanthus fragrans*), salidroside có nhiều trong vỏ, cùi và hạt của Hoa mộc (*Osmanthus fragrans*), cũng là một trong những thành phần quyết định hoạt tính chống oxy hóa của Hoa mộc (*Osmanthus fragrans*) [24].



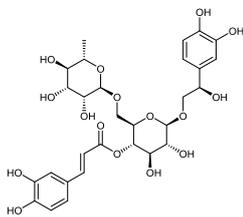
87



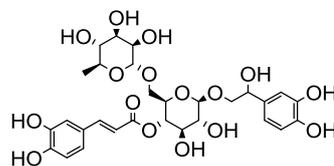
88



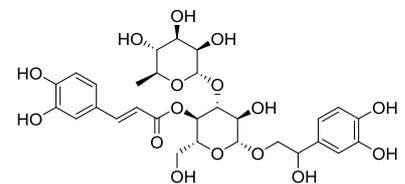
89



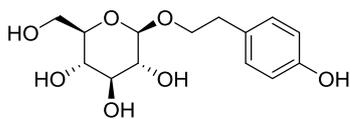
90



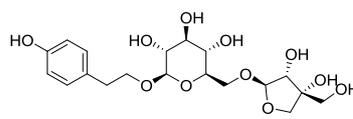
91



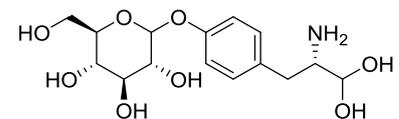
92



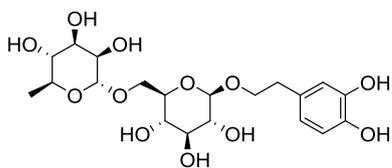
93



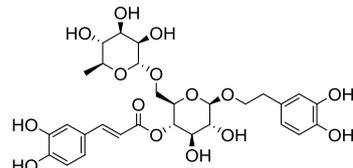
94



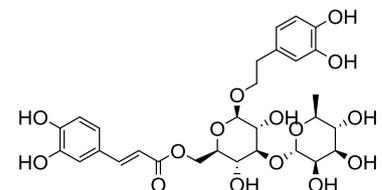
95



96



97

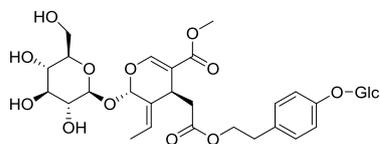
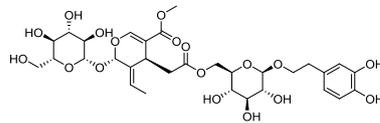
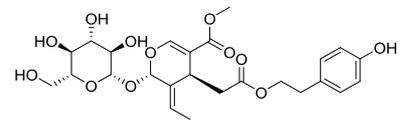
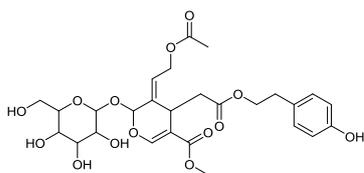
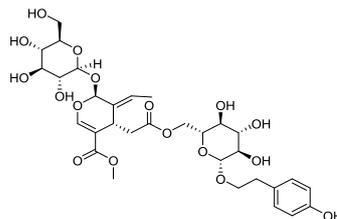
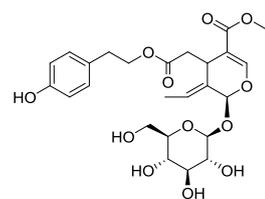
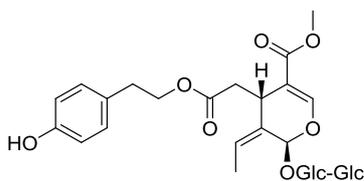
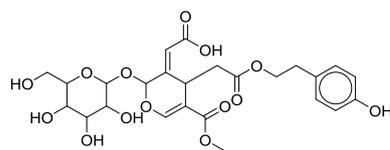
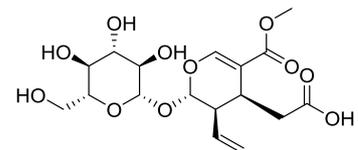
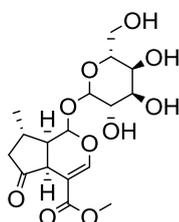
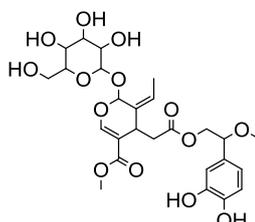
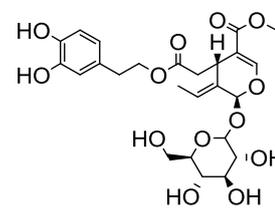
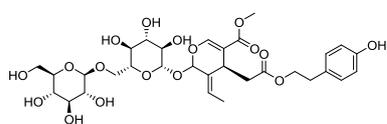
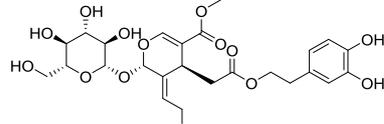
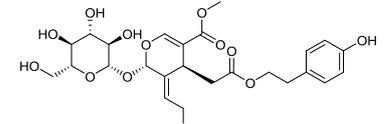


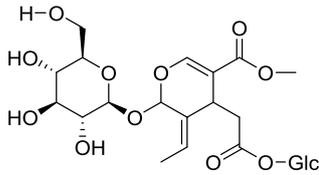
98

1.2.6. Iridoid

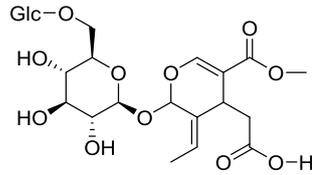
Iridoid là dẫn xuất acetal được tạo ra bằng phản ứng ngưng tụ aldol nội phân tử sau khi alkene hóa iridoidal, các hợp chất này có hai bộ khung cơ bản: cyclopentane iridoid và secoiridoid, có nhiều hoạt tính sinh học, chẳng hạn như chống viêm, chống ung thư, bảo vệ gan, bảo vệ hệ thần kinh và bảo vệ hệ tim mạch [53]. Cho đến nay, 20 iridoid đã được phân lập từ Hoa mộc (*Osmanthus fragrans*), gồm nuzhennoside (**99**), neonuezhenide (**100**), (8E)-ligustroside (**101**),

10-acetoxyligustroside (**102**), specnuezhenide (**103**), ligustroside (**104**), 3'-O-D-glucopyranosyl ligustroside (**105**), nuezhenoside G13 (**106**), secoxyloganin (**107**), verbenalin (**108**), methoxyoleuropein (**109**), oleuropein (**110**), excelside B (**111**), β -hydroxyoleuropein (**112**), 10-hydroxyligustroside (**113**), glucopyranosyl methyloleoside (**114**), glucopyranosyl methyloleoside isomer (**115**), oleoside-11-methyl ester (**116**), oleoside dimethyl ester (**117**) và excelside A (**118**). Trong số đó, nuzhenoside, neonuezhenide, specnuezhenide, nuezhenoside G13 và (8E)-ligustroside đã được phân lập từ rễ, quả và hạt của Hoa mộc (*Osmanthus fragrans*) thể hiện hoạt tính chống huyết khối và điều trị bệnh alzheimer [53,54].

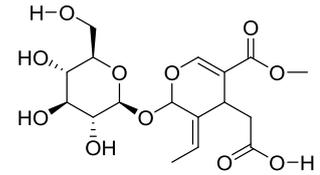
**99****100****101****102****103****104****105****106****107****108****109****110****111****112****113**



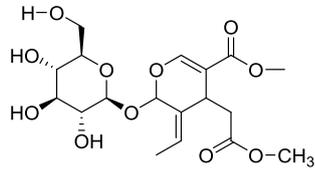
114



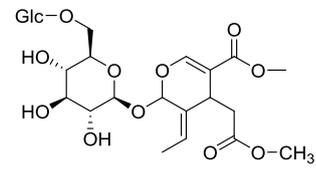
115



116



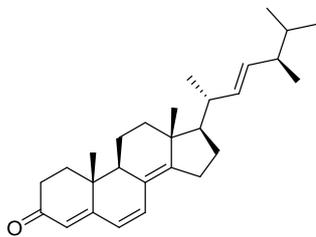
117



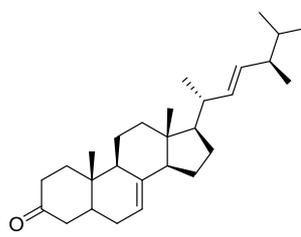
118

1.2.7. Sterol

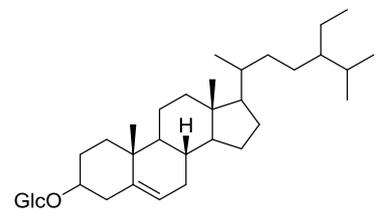
Sterol là nhóm hoạt chất quan trọng phân bố rộng rãi trong hầu hết các loại thực vật. 10 hợp chất steroid bao gồm ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one (**119**), ergosta-7,22-dien-3-one (**120**), β -daucosterine (**121**), β -sitosterol (**122**), stigmasterol (**123**), ergosterol endoperoxide (**124**), α -spinasterol (**125**), daucosterol (**126**), stigmasterol (**127**) và $3\beta,5\alpha,9\alpha$ -trihydroxyergosta-7,22-dien-6-one (**128**) đã được phân lập từ Hoa mộc (*Osmanthus fragrans*).



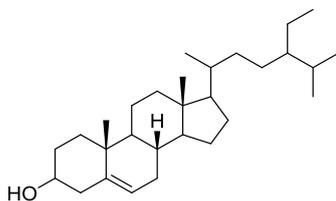
119



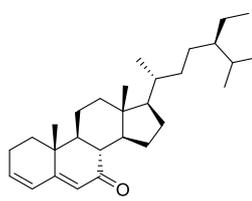
120



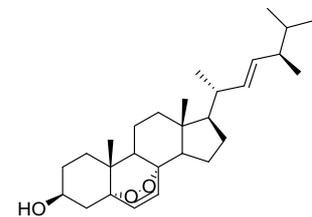
121



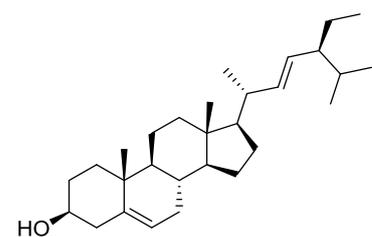
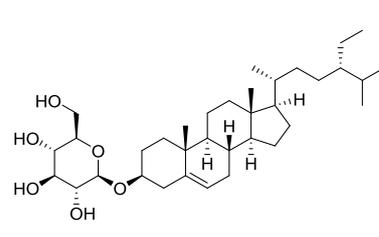
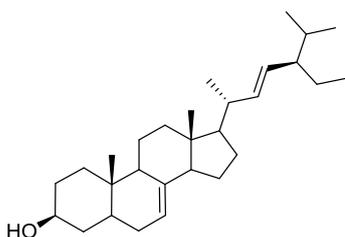
122



123



124

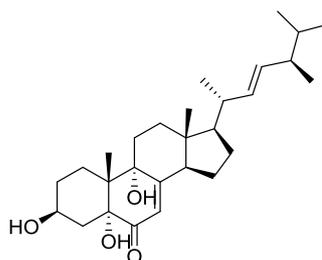


127

125

126

127



128

1.2.8. Các hợp chất khác

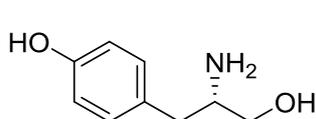
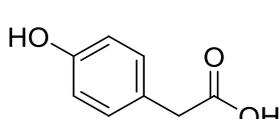
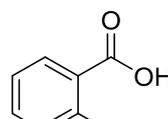
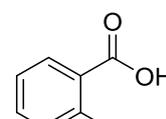
Tyrosol (**129**) là dẫn xuất của phenyl ethyl, có trong hoa của Hoa mộc (*Osmanthus fragrans*) có khả năng loại bỏ các gốc tự do hydroxyl có độc tính cao và có thể ngăn ngừa bệnh tim mạch vành và chống ung thư [55]. Tyrosol còn có tác dụng chống oxy hóa, chống viêm và kháng khuẩn, làm giảm lượng đường trong máu và tăng tuổi thọ. Nó cũng có tác dụng điều trị các bệnh thần kinh thông thường, chẳng hạn như bệnh alzheimer và bệnh parkinson [56] và thúc đẩy sự tăng sinh của tế bào nội mô [57].

P-hydroxyphenylacetic acid (**130**) có trong hoa loài Hoa mộc (*Osmanthus fragrans*) và là nguyên liệu dùng để tổng hợp thuốc chống Parkinson [58]. Hơn nữa, nó cũng có thể được sử dụng để tổng hợp thuốc tim mạch atenolol, được sử dụng để điều trị các tác dụng phụ khác nhau do tăng huyết áp và thuốc giảm đau và chống viêm. Nó thậm chí có thể được sử dụng để tổng hợp thuốc kháng sinh laoxycephalosporin, được sử dụng để làm giảm các triệu chứng nhiễm trùng do vi khuẩn nhạy cảm với kháng sinh, chẳng hạn như nhiễm trùng máu, viêm phế quản, viêm túi mật và các loại viêm khác [59,60].

Salicylic acid (**131**) có trong hoa của loài Hoa mộc (*Osmanthus fragrans*) [60,61,62], được sử dụng rộng rãi trong nhiều ngành công nghiệp, đặc biệt là ngành dược phẩm để điều chế các loại thuốc khác nhau. Nó cũng được sử dụng trong chẩn đoán và điều trị mụn sần và mụn trứng cá đỏ, đồng thời có thể cải thiện da, nồng độ salicylic acid cao có thể tẩy tế bào sừng để đạt được hiệu quả làm trắng; do đó, nó thường được sử dụng để điều trị các bệnh về tuyến bã nhờn ở

nanoglyc [63,64]. Salicylic acid ngăn ngừa huyết khối, giảm độ nhớt của máu, ức chế kết tập và bám dính tiểu cầu, ngăn ngừa xơ cứng động mạch, ... [65,66].

Protocatechualdehyde (**132**) chủ yếu được tìm thấy trong loài Hoa mộc (*Osmanthus fragrans*) [64] có tác dụng ức chế tình trạng viêm, quá trình apoptosis của tế bào, kết tập tiểu cầu, chống oxy hóa và chống xơ hóa gan, nhiễm virus viêm gan B và nhiễm trùng máu, bảo vệ thần kinh, ngăn chặn sự hình thành melanin, thúc đẩy quá trình lành xương và bảo vệ cơ tim, bảo vệ chống thiếu máu não ở chuột [67,68].

**129****130****131****132**

1.3. HOẠT TÍNH SINH HỌC LOÀI HOA MỘC

1.3.1. Hoạt tính chống oxy hóa

Trong số các loại thuốc y học cổ truyền có hoạt tính, dược lý với sự tương đồng giữa thực phẩm và thuốc, Hoa mộc (*Osmanthus fragrans*) đã thu hút sự chú ý rộng rãi như một chất chống oxy hóa tự nhiên trong thực phẩm vì nó có thể ăn được, độc tính thấp và có nhiều hoạt tính sinh học tiềm năng, đồng thời được cho là thể hiện hoạt tính chống oxy hóa mạnh. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng các chiết xuất từ Hoa mộc (*Osmanthus fragrans*) có khả năng loại bỏ các gốc tự do DPPH, ABTS, hydroxyl và superoxide anion.

Hoa mộc (*Osmanthus fragrans*) giàu các thành phần flavonoid, có khả năng chống oxy hóa mạnh và hiệu quả [17]. Khi so sánh hoạt tính chống oxy hóa của 7 flavonoid phân lập từ Hoa mộc (*Osmanthus fragrans*) bằng xét nghiệm DPPH, quercetin được xác định là có hoạt tính loại bỏ DPPH mạnh nhất với giá trị IC_{50} 11,04 $\mu\text{g/ml}$. Hoạt tính chống oxy hóa của rutin tương tự như verbascoside, với giá trị IC_{50} lần lượt là 22,76 và 20,21 $\mu\text{g/ml}$.

Naringin và genistein hầu như không có khả năng chống oxy hóa. Ngoài ra, phillygenin và verbascoside ở nồng độ 40 $\mu\text{g/ml}$ cũng thể hiện hiệu quả chống

oxy hóa mạnh; verbascoside có khả năng dọn gốc tự do theo phương pháp DPPH và hydrogen peroxide mạnh nhất, với giá trị IC_{50} lần lượt là 6,2 và 13,4 μM [18].

Chiết xuất ethyl acetate từ Hoa mộc (*Osmanthus fragrans*) (ở nồng độ 10–200 $\mu\text{g/ml}$) cho thấy hoạt tính chống oxy hóa mạnh nhất đối với DPPH và superoxide anion theo cách phụ thuộc vào liều lượng, với giá trị IC_{50} tương ứng là 28,33 và 30,20 $\mu\text{g/ml}$ [70].

Trong số các hợp chất được phân lập từ quả Hoa mộc (*Osmanthus fragrans*), salidroside (ở nồng độ 0,2–1,2 mg/ml) thể hiện hoạt tính chống oxy hóa vừa phải đối với DPPH và gốc hydroxyl theo cách phụ thuộc vào liều lượng [71].

1.3.2. Hoạt tính chống tăng đường huyết

Ursolic acid và oleanolic acid là các thành phần chính có hoạt tính hạ đường huyết của Hoa mộc (*Osmanthus fragrans*). Lupinalbin A và γ -Decalactone có hoạt tính ức chế α -glucosidase tốt trong thử nghiệm *in vitro*, cả hai đều đã được đánh giá cao về cải thiện lượng đường trong máu ở chuột bị tiểu đường [72].

1.3.3. Hoạt tính chống ung thư

Một số nghiên cứu đã cho thấy hoạt tính chống ung thư của Hoa mộc (*Osmanthus fragrans*) đối với nhiều loại tế bào ung thư. Các hợp chất quercetin, rutin, verbascoside, naringin được phân lập từ Hoa mộc (*Osmanthus fragrans*) ức chế sự tăng sinh và thúc đẩy quá trình apoptosis của tế bào ung thư, các monome flavonoid này có khả năng ức chế sự tăng sinh của tế bào CT26 và HepG2 [17].

1.3.4. Hoạt tính chống viêm

Flavone và phenol đã được chứng minh là thành phần chính có tác dụng chống viêm từ Hoa mộc (*Osmanthus fragrans*), do đó, rất hứa hẹn để phát triển thành một thuốc chống viêm hiệu quả bảo vệ chống lại tổn thương do viêm [73]. Trong đó hai hợp chất phillygenin và phillyrin thu được từ hoa Hoa mộc (*Osmanthus fragrans*) có tác dụng ngăn chặn sự sản sinh NO với giá trị IC_{50} lần lượt là 25,5 và 18,9 μM trên tế bào RAW264.7 được kích thích bằng LPS [74].

1.3.5. Hoạt tính kháng khuẩn

Flavonoid từ Hoa mộc (*Osmanthus fragrans*) có tác dụng kháng khuẩn rõ rệt đối với các chủng *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* và *Bacillus subtilis* [75]. Hiệu quả kháng khuẩn của flavonoid từ Hoa mộc (*Osmanthus fragrans*) tốt hơn so với natri benzoate. Flavonoid từ Hoa mộc (*Osmanthus fragrans*) có hoạt tính kháng khuẩn mạnh nhất đối với *Bacillus subtilis* (MIC 0,25 mg/ml), nhưng khả năng ức chế đối với *Escherichia coli* và *Staphylococcus aureus* yếu hơn (MIC 0,5 mg/ml). Đáng chú ý là hiệu quả kháng khuẩn của flavonoid từ Hoa mộc (*Osmanthus fragrans*) đối với *Pritcularia oryzae* (MIC 1,0 mg/ml). Ngoài ra, sắc tố vàng từ hoa Hoa mộc (*Osmanthus fragrans*) có thể ức chế sự phát triển của *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* và *Salmonella typhi*, với giá trị MIC lần lượt là 1,0; 1,5; 1,5 và 1,5 mg/ml. Rõ ràng, hoạt tính kháng khuẩn đối với *Staphylococcus aureus* là đáng lưu ý nhất [76]. Chiết xuất ethanol từ vỏ quả có hiệu quả kháng khuẩn đáng kể đối với vi khuẩn Gram dương và Gram âm ở nồng độ là 500 mg/ml, với giá trị MIC là 125 mg/ml đối với *Escherichia coli* và 62,5 mg/ml đối với *Staphylococcus aureus*. Là một sản phẩm phụ từ thực vật, vỏ quả Hoa mộc (*Osmanthus fragrans*) được kỳ vọng sẽ được phát triển thành chất bảo quản hoặc tác nhân kháng khuẩn [77]. Các nhà nghiên cứu đã điều tra hiệu quả ức chế của tinh dầu từ lá Hoa mộc (*Osmanthus fragrans*) đối với vi khuẩn. Khi nồng độ tinh dầu là 10 mg/ml, nó có hiệu quả ức chế nhất định đối với *Staphylococcus aureus* và hoạt tính kháng khuẩn mạnh đối với *Rhodotorula glutinis*, nhưng hoạt tính ức chế đối với *Escherichia coli* yếu hơn. Nhìn chung, những nghiên cứu này cung cấp một hướng nghiên cứu chỉ ra tiềm năng trị liệu của Hoa mộc (*Osmanthus fragrans*) đối với các bệnh nhiễm trùng do vi khuẩn và nấm [78].

1.4. GIỚI THIỆU PHƯƠNG PHÁP MÔ PHỎNG TRONG NGHIÊN CỨU PHÁT TRIỂN THUỐC.

1.4.1. Giới thiệu về phương pháp nghiên cứu phát triển thuốc sử dụng công cụ hỗ trợ máy tính.

Nghiên cứu phát triển thuốc sử dụng công cụ hỗ trợ máy tính (CADD) cung cấp một phương pháp mạnh mẽ để đánh giá nhanh chóng và chính xác các thu

viện hợp chất không lồ để tìm chất ức chế enzyme tiềm năng. Nguồn gốc của nó có thể bắt nguồn từ ngày 5 tháng 10 năm 1981, với việc công bố "Cuộc cách mạng công nghiệp tiếp theo: Thiết kế thuốc bằng máy tính tại Merck" trên tạp chí Fortune. Tác động của CADD tiếp tục mở rộng, được thúc đẩy bởi việc giảm đáng kể thời gian và chi phí liên quan đến việc phát triển thuốc mới [79,80]. CADD tạo điều kiện thuận lợi cho cả việc xác định chất ức chế mới và tái sử dụng các loại thuốc hiện có. CADD đã đóng một vai trò trong việc khám phá ra một số loại thuốc đã được đưa ra thị trường, bao gồm dorzolamide, saquinavir, ritonavir và indinavir. Một khía cạnh cốt lõi của CADD liên quan đến việc sử dụng các kỹ thuật tính toán để xác định chất ức chế tiềm năng có ái lực liên kết mạnh với mục tiêu protein. Năng lượng tự do liên kết phối tử (ΔG) của chất ức chế với protein mục tiêu có thể được dự đoán chính xác thông qua quá trình ghép nối phân tử và sau đó được tinh chỉnh bằng mô phỏng động lực học phân tử (MD) [79,80]. Theo đó, việc ước tính nhanh chóng và chính xác giá trị này là một vấn đề rất cần thiết để xác định phối tử nào có thể liên kết với thụ thể hay không.

1.4.2. Ứng dụng CADD trong nghiên cứu thuốc định hướng điều trị ung thư

1.4.2.1. Tình hình ung thư ở trong nước và ngoài nước

Theo số liệu của Tổ chức Ung thư Toàn cầu (GLOBOCAN), năm 2022, toàn cầu ghi nhận khoảng 19,9 triệu ca mắc mới và 9,7 triệu ca tử vong do ung thư. Các loại ung thư phổ biến nhất bao gồm: Ung thư vú (11,7%), ung thư phổi (chiếm 11,4%), ung thư đại trực tràng (10,0%). Ung thư phổi cũng là nguyên nhân hàng đầu gây tử vong, chiếm 18% tổng số ca tử vong do ung thư. Tại Việt Nam, theo số liệu cập nhật năm 2020, tỷ lệ mắc ung thư là 159,7 ca trên 100.000 dân, xếp thứ 92 trên thế giới, tăng 7 bậc so với năm 2018. Các loại ung thư phổ biến nhất bao gồm: Ung thư gan (14,5%), phổi (14,4%), vú ở nữ (11,8%), dạ dày (9,8%), đại trực tràng (9,0%). Đặc biệt, ung thư gan có tỷ lệ mắc và tử vong cao. Việt Nam đứng thứ 3 thế giới về tỷ lệ mắc ung thư gan, chỉ sau Mông Cổ và Lào. Tỷ lệ tử vong do ung thư gan tại Việt Nam cũng ở mức cao, với hơn 25.000 ca mỗi năm. Các yếu tố chính dẫn đến tỷ lệ ung thư gan cao tại Việt Nam bao gồm:

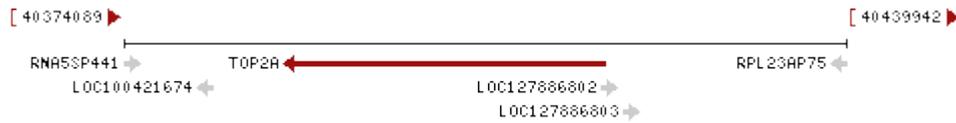
Nhiễm virus viêm gan B và C: Khoảng 20 triệu người Việt Nam nhiễm virus này, trong đó 8 triệu người có nguy cơ cao do viêm gan, xơ gan và ung thư gan. Lạm dụng rượu bia: Uống rượu bia thường xuyên gây tổn thương gan, dẫn đến xơ gan và tăng nguy cơ ung thư gan. Tiêu thụ thực phẩm nhiễm nấm mốc aflatoxin: Loại độc tố này có thể gây tổn thương gan và dẫn đến ung thư. Việc nâng cao nhận thức và thực hiện các biện pháp phòng ngừa là cần thiết để giảm gánh nặng bệnh tật do ung thư gây ra cho cộng đồng.

1.4.2.2. Giới thiệu protein Topoi II

Trong tế bào Eukaryote, DNA-topoisomerase là các enzyme tôpô xúc tác quá trình tháo rời cấu trúc siêu xoắn của phân tử DNA, do đó nó là chìa khóa đóng vai trò thiết yếu trong các quá trình sao chép DNA, phiên mã và phân ly chromatin trong quá trình phân chia tế bào [81,82]. DNA topoisomerase được chia thành topoisomerase I (TOP1) và II (TOP2). TopI tham gia cắt cấu trúc sợi đơn của DNA, không tiêu thụ năng lượng. Ngược lại, TOP2A là một nhóm enzyme xúc tác tháo xoắn DNA bằng cách cắt hai sợi đôi DNA. Hoạt động của nhóm enzyme này đòi hỏi năng lượng và sự có mặt của Mg^{2+} như một cofactor, cho phép các cụm DNA đi qua nhau, do đó làm thay đổi trạng thái tôpô của DNA [81-83].

Con người biểu hiện hai loại paralog topoisomerase II, được gọi là topoisomerase II α và topoisomerase II β . Chúng chia sẻ trình tự axit amin quan trọng ở mức 68%, với vị trí xúc tác của protein chia sẻ khoảng 78% tính đồng nhất [83]. Trong phạm vi nghiên cứu này, chúng tôi chỉ đề cập đến topoisomerase II α như một dấu hiệu tế bào ung thư về vai trò quan trọng của nó trong sự tăng sinh tế bào và phân ly nhiễm sắc thể [83,84].

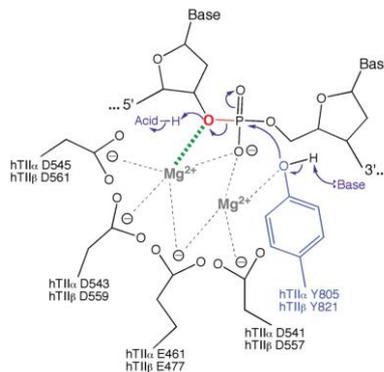
Gen mã hóa dạng alpha của topoisomerase nằm ở nhiễm sắc thể 17. Nếu một số đột biến xảy ra ở gen này, chúng sẽ liên quan đến sự tiến triển của tình trạng kháng thuốc. Bên cạnh đó, đột biến từ gen mã hóa dẫn đến giảm hoạt động của enzyme này, điều này cũng ảnh hưởng đến vai trò trong Ataxia-telangiectasia, liên quan đến việc phát hiện tổn thương DNA và giúp kiểm soát tốc độ tăng trưởng và phân chia tế bào [85].



Hình 1.1. Nhiễm sắc thể 1 chính 2 Liên kết DNA TOP2A của con người

1.4.2.3. Chức năng tế bào của Topoisomerase II α 3Cắt và nối xoắn DNA [88]

Bên cạnh đó, phản ứng cắt đòi hỏi sự xuất hiện của ion kim loại hóa trị hai như Mg^{2+} , liên quan trực tiếp đến cơ chế xúc tác của TOP2A (hình 1.5). Mg^{2+} đóng vai trò quan trọng trong cả cấu trúc và chức năng của topoisomerase II α như hoạt hóa chất chủ vận nucleophile tấn công tyrosine; ổn định tyrosine; ổn định trạng thái chuyển tiếp; và ổn định nhóm rời (3'-oxy) [88,89].



Hình 1.2. Vai trò của Mg^{2+} trong cơ chế xúc tác của TOP2A [88]

Quá trình tái nhiễm phong tiếp theo được bắt đầu bằng một axit cung cấp hydro cho nhóm hydroxyl đầu 3' của deoxyribose, axit này có thể là một phân tử nước hoặc các chất chặn chưa xác định trong vị trí hoạt động của TOP2A [88,89].

Trạng thái tạm thời trung gian của phức hợp cắt enzyme-DNA thường tồn tại trong thời gian ngắn và ngay lập tức có thể đảo ngược. Chính liên kết cộng hóa trị của enzyme-DNA đóng vai trò quan trọng trong cơ chế TOP2A. Đầu tiên, năng lượng liên kết của xương sống DNA deoxyribose-phosphate được bảo toàn bởi các phức hợp cắt enzyme-DNA tạm thời. Thứ hai, liên kết enzyme-DNA cũng bảo toàn tính toàn vẹn của vật liệu di truyền trong suốt sự kiện cắt, ngăn ngừa đột biến tái tổ hợp và chuyển vị vì các phức hợp trung gian ngăn chuỗi DNA bị phân tách khỏi enzyme [88].

Ngoài ra, topoisomerase II là một loại enzyme gây độc gen thiết yếu. Trong các tế bào bình thường, những thay đổi về nồng độ phức hợp phân cắt enzyme-DNA được coi là tín hiệu sinh học. Các tế bào không thể tháo gỡ nhiễm sắc thể

và cuối cùng sẽ chết do thất bại trong nguyên phân nếu số lượng phức hợp phân cắt topoisomerase II-DNA giảm quá thấp. Các hoạt động của DNA trong hệ thống báo cáo giám sát có thể thay đổi các phức hợp tạm thời này thành các đứt gãy mạch đôi vĩnh viễn dưới dạng các dấu hiệu sinh học nếu số lượng phức hợp phân cắt tăng quá cao. Do các đứt gãy DNA, sự ức chế các hoạt động DNA quan trọng, sự chuyển vị nhiễm sắc thể và các bất thường DNA khác được tạo ra. Quá trình apoptosis có thể bắt đầu nếu các đứt gãy mạch đôi áp đảo tế bào [86,88].

Tại Việt Nam, loài hoa này mọc hoang ở Ninh Bình, Kon Tum và được trồng ở nhiều nơi. Hoa mọc dùng để ướp trà, dùng làm nguyên liệu chính cho món bánh quế hoa, một số bộ phận khác của cây cũng được dùng làm các vị thuốc trong đông y. Là nguồn cung cấp dồi dào các chất dinh dưỡng đa dạng như khoáng chất, protein, đồng thời cũng các giàu những hợp chất tự nhiên như flavonoid, terpene, proanthocyanidin, axit hữu cơ, axit béo, các hợp chất dễ bay hơi, polysaccharide, sterol,..... với nhiều hoạt tính sinh học như kháng viêm, chống oxy hóa, hạ đường huyết, kháng khuẩn,....[1,2,4]. Hiện tại, các nghiên cứu về loài Hoa mộc (*Osmanthus fragrans*) tại Việt Nam chỉ tập trung vào mô tả và tổng kết kinh nghiệm sử dụng trong y học dân gian, chưa có nghiên cứu về thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của loài này.

CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG, PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU VÀ THỰC NGHIỆM

2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

Mẫu Hoa mộc thu hái tại Vườn Quốc gia Cúc Phương, huyện Nho Quan, tỉnh Ninh Bình vào tháng 08 năm 2024, được Tiến sĩ Nguyễn Quốc Bình - Bảo tàng thiên nhiên Việt Nam (VAST) xác định tên khoa học là *Osmanthus fragrans* (Thunb.) Lour.), họ Oleaceae (Ô liu).



Hình 2.1. Cây Hoa mộc

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.2.1. Phương pháp xử lý mẫu

Mỗi nhóm chất thực vật có đặc tính hóa lý riêng, đòi hỏi quy trình xử lý mẫu chuẩn nhằm tránh phân hủy hoạt chất. Các bước xử lý mẫu lá Hoa mộc (*Osmanthus fragrans*) được thực hiện như sau:

Làm sạch mẫu: Rửa bằng nước để loại bỏ tạp chất, loại bỏ lá già, dập nát.

Sơ chế: Để ráo nước tự nhiên ở nhiệt độ phòng, nơi thoáng mát.

Đóng gói: Cho mẫu vào túi lưới chuyên dụng, gắn nhãn thông tin bằng bút chì (để trong túi nilon chống thấm).

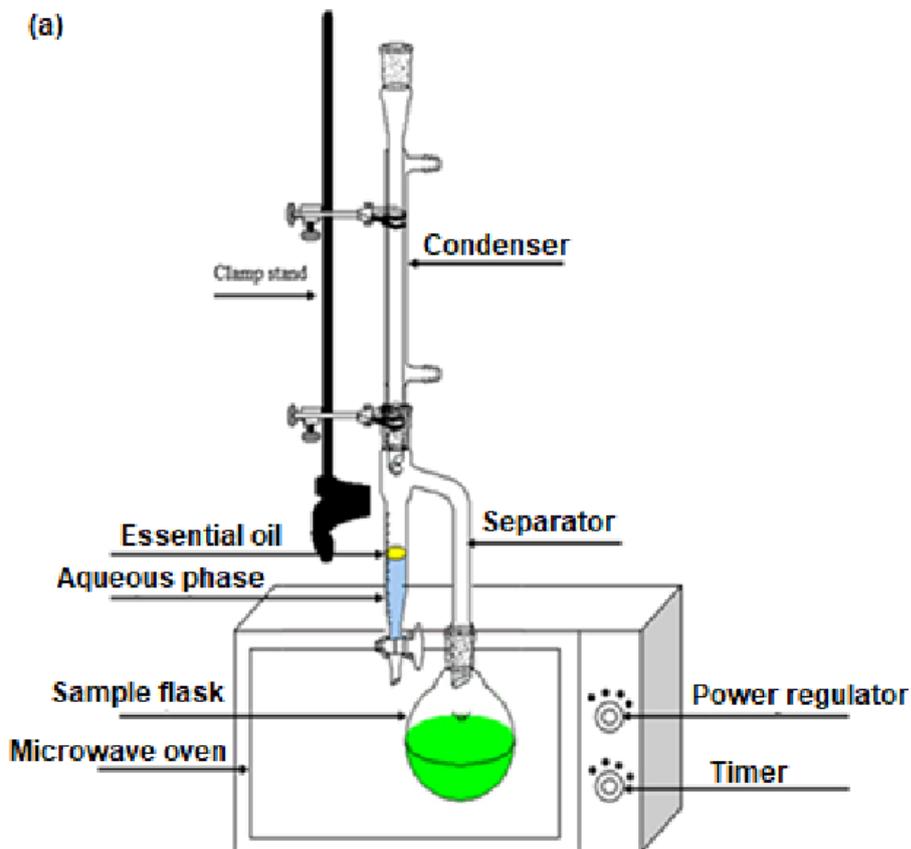
Sấy khô: Sấy ở nhiệt độ $<60^{\circ}\text{C}$ đến khối lượng không đổi.

Nghiền mẫu: Xay thành bột thô (tránh quá mịn), đóng gói kín trong túi nilon.

Lưu trữ: Ghi nhận mã mẫu và thông tin tương ứng. Bảo quản ở điều kiện khô, tránh ẩm mốc để ngăn phân hủy hoạt chất.

2.2.2. Phương pháp chưng cất lôi cuốn hơi nước có sử dụng vi sóng

Trước đây, để tách chiết và thu nhận tinh dầu từ các nguyên liệu thực vật, phương pháp chưng cất lôi cuốn hơi nước thường được sử dụng. Tuy nhiên, gần đây phương pháp chưng cất lôi cuốn hơi nước có sự hỗ trợ của Vi sóng (MAHD- Microwave Assisted Hydrodistillation) được ưa dùng hơn so với phương pháp truyền thống do chúng có ưu điểm về giá thành và thời gian, cũng như thân thiện với môi trường và lượng năng lượng tiêu thụ cũng thấp hơn. Phương pháp chưng cất lôi cuốn hơi nước cũng có thể cải thiện hiệu suất và chất lượng sản phẩm. Nguyên nhân là do quá trình đun nóng bằng vi sóng làm nóng vật chất từ trong ra ngoài, sự tăng nhiệt cục bộ tức thời của vật chất là do sự quay lưỡng cực và sự dẫn truyền ion. Dưới sự tác động của điện trường, có sự định hướng của các lưỡng cực điện, tạo ra sự tương tác giữa điện trường với các phân tử bên trong hợp chất, từ đó tạo ra sự ma sát giữa các phân tử ở bên trong hợp chất. Sự ma sát đó gây áp suất lên bên trong thành của các tế bào tinh dầu và ép tinh dầu ra khỏi tế bào, làm cho tinh dầu được tiết ra hiệu quả hơn.



Hình 2.2. Sơ đồ minh họa

2.2.3. Phương pháp xác định thành phần hóa học của tinh dầu Hoa mộc

Thành phần hóa học của tinh dầu Hoa mộc được xác định bằng cách sử dụng hệ thống sắc ký khí nối ghép khối phổ GC7890A (Agilent) – MSD5975C (Agilent) tại phòng Phân tích hóa học thuộc Viện Hóa học các Hợp chất thiên nhiên.

Trong đó, pha tĩnh là cột mao quản HP – 5MS (đường kính 0,25 mm, chiều dài 60m, độ dày lớp phim tráng cột là 0,25 μm), pha động là khí Heli.



Hình 2.3. Máy GC – MS Agilent Technologies 5975C

Nguyên tắc: Các cấu tử của mẫu nghiên cứu sẽ tách ra khỏi cột mao quản và đi vào trong đầu dò khối phổ. Tùy thuộc vào bản chất của loại chất cần phân tích mà quá trình ion hóa với các kiểu ion hóa khác nhau sẽ diễn ra. Sau đó, các ion được ghi nhận bởi đầu dò. Mỗi loại hóa chất sau khi được phân tích bằng máy sắc ký khí ghép khối phổ sẽ cho ra một mô hình đồ thị. Sau đó, mang phổ khối

thu được đi so sánh với một thư viện phối khô đã được xác định trước. Từ đó có thể xác định được loại chất này là gì.

2.2.4. Phương pháp chiết xuất

Mẫu sau khi xay nhỏ được tiến hành ngâm chiết 3 lần với ethanol (96%) bằng phương pháp siêu âm ở nhiệt độ phòng. Dịch chiết tổng thu được sau quá trình này được cô quay chân không ở nhiệt độ $<50^{\circ}\text{C}$ để thu cặn ethanol thô.

Cặn ethanol thô được hòa tan trong nước cất và tiến hành chiết phân đoạn lần lượt với các dung môi có độ phân cực tăng dần: *n*-hexane và ethyl acetate. Sau khi cô đuổi dung môi bằng hệ thống cô quay chân không, thu được các phân đoạn cao tương ứng: cao *n*-hexane, cao ethyl acetate và cao nước.

2.2.5. Phương pháp phân lập các hợp chất

Các dịch chiết thực vật được phân tích và tách chiết thông qua hệ thống sắc ký lớp mỏng (TLC) và sắc ký cột (CC).

Sắc ký lớp mỏng (TLC): Sử dụng bản mỏng DC-Alufolien 60 F254 và RP-18 F254S (Merck, kích thước hạt: 0.25 mm). Phát hiện hợp chất bằng UV ở bước sóng 254 nm và 365 nm. Thuốc thử vanilin/ H_2SO_4 5% trong methanol

Sắc ký cột (CC): Pha tĩnh là Silica gel 60 (Merck, kích thước hạt: 0,040-0,063 mm). Hệ dung môi giải ly: Sử dụng dung môi phù hợp

2.2.6. Phương pháp xác định cấu trúc hợp chất

Cấu trúc các hợp chất được xác định bằng các phương pháp vật lý và phổ:

- Nhiệt độ nóng chảy (mp):

Thiết bị: Máy Kofler micro-hotstage

- Phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR)

Thiết bị: Máy Bruker Avance 500 MHz

Điều kiện đo: Chuẩn nội: TMS (Tetramethylsilane)

Kỹ thuật 1D: ^1H -NMR, ^{13}C -NMR, DEPT

Kỹ thuật 2D: HMBC, HSQC

2.2.7. Phương pháp thử nghiệm hoạt tính sinh học

2.2.7.1. Phương pháp thử nghiệm hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định

Hoạt tính kháng vi sinh vật được đánh giá bằng phương pháp vi lượng (96-well microtiter plate) theo Vander Bergher & Vlietlinck (1991) và McKane & Kandel (1996) [90]. Chúng vi sinh vật kiểm định:

Vi khuẩn Gram (-): *Escherichia coli* (ATCC 25922) và *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 25923).

Vi khuẩn Gram (+) : *Bacillus subtilis* (ATCC 11774) và *Staphylococcus aureus* (ATCC 11632).

Nấm sợi: *Aspergillus niger* (439) và *Fusarium oxysporum* (M42).

Nấm men: *Candida albicans* (ATCC 7754) và *Saccharomyces cerevisiae* (SH 20).

Chứng dương: Streptomycin (Gr+), Tetracyclin (Gr-), Nystatin/Amphotericin B (nấm) pha trong DMSO. Chứng âm: Mẫu không chứa kháng sinh hoặc chất thử.

Cách tiến hành: Hoạt hóa chủng, pha loãng theo McFarland 0,5. Ủ ở 37°C/24h (vi khuẩn) hoặc 30°C/48h (nấm).

Đánh giá: Các mẫu được pha loãng theo các thang nồng độ thập dần, để tính nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) là nồng độ mà ở đó vi sinh vật bị ức chế gần như hoàn toàn.

2.2.7.2. Phương pháp MTT thử nghiệm hoạt tính gây độc tế bào

Nguyên lý: Phương pháp MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] được NCI (Mỹ) công nhận là tiêu chuẩn sàng lọc hoạt tính ức chế tăng sinh tế bào. Cơ chế dựa trên phản ứng khử MTT thành formazan tím nhờ enzyme oxidoreductase phụ thuộc NADPH trong ty thể [90].

Dòng tế bào: Hep-G2 (ung thư gan) và A549 (ung thư phổi), cung cấp bởi ATCC (Mỹ) và CLS (Đức), nuôi cấy trong DMEM/EMEM/RPMI 1640 (bổ sung L-glutamine 2 mM, kháng sinh, huyết thanh bò 5–10%) ở 37°C, 5% CO₂ .

Quy trình: Tế bào ($1,5 \times 10^5$ tế bào/giếng) được ủ với mẫu thử (nồng độ 6,25–100 µg/ml với cao chiết, 1–50 µM với chất tinh khiết, lặp 3 lần) trên phiên 96 giếng. Chứng dương: Paclitaxel (Taxol) trong DMSO. Formazan hòa tan trong DMSO, đo OD bằng máy Infinite F50 (Tecan, Thụy Sĩ) ở $\lambda = 540/720$ nm.

Đánh giá: Mẫu có % ức chế $\geq 50\%$ được tính IC₅₀ (nồng độ ức chế 50% tế bào sống) bằng phần mềm TableCurve.

2.2.8. Phương pháp sàng lọc ảo in silico [88,89]

2.2.8.1. Chuẩn bị cấu trúc ligand và protein

Cấu trúc ba chiều của các hợp chất nghiên cứu được chuẩn bị bằng MarvinSketch 19.27.0 và PyMOL 1.3.r1. Sau đó, quá trình cực tiểu hóa năng lượng và tính toán lượng tử thực hiện với hàm B3LYP/6-31g(d,p) sử dụng phần mềm Gaussian 09.

Mô hình cấu trúc tinh thể của protein Topoisomerase II được lấy về từ ngân hàng cơ sở dữ liệu Protein (PDB Bank) với ID là 5GWK. Hộp lưới có tọa độ tâm là $-7.109 \times -35.196 \times -2.684$ và kích thước hộp là $22 \times 22 \times 22$ Å.

2.2.8.2. Mô phỏng lắp ghép phân tử sử dụng AutoDock Vina 1.2.5

Việc mô phỏng lắp ghép phân tử sử dụng phần mềm AutoDock Vina 1.2.5 với hàm tính điểm AutoDock4 được thực hiện với tham số exhaustiveness là 100. Sự chênh lệch năng lượng tối đa giữa điểm năng lượng liên kết tự do kém nhất và tốt nhất được xác định là 7 kcal/mol. Cấu hình liên kết tốt nhất là cấu hình có ái lực liên kết phối tử với protein lớn nhất.

2.2.8.3. Mô phỏng động học phân tử

GROMACS phiên bản 2019 được sử dụng để mô phỏng sự thay đổi cấu trúc của phức hệ protein + chất ức chế. Các tham số cho mô phỏng động học phân tử (Molecular dynamic – MD) sẽ được tham khảo từ những nghiên cứu trước đó. Các bước thời gian trong mô phỏng MD sẽ được đặt là 2 fs. Sự tương tác tĩnh điện sẽ được bắt chước thông qua phương pháp Particle-Mesh Ewald nhanh mịn. Tương tác van der Waals (vdW) giữa các hạt có hiệu quả trong phạm vi 0,9 nm. Hệ hòa tan sẽ được cực tiểu hóa bằng phương pháp steepest descent. Hệ đã cực tiểu năng lượng sẽ được hồi phục trong 100 ps mô phỏng NVT (constant number (N), volume (V), temperature (T)) và 2 ns mô phỏng NPT (constant number (N), pressure (P), temperature (T)) ở nhiệt độ 310°K. Trong quá trình mô phỏng NVT và NPT, các nguyên tử C_{α} của protein đích sẽ được “giữ cố định” lại bằng một lực điều hòa nhỏ. Các tọa độ của các phức hệ sẽ được ghi nhận sau mỗi 10 ps.

2.2.8.4. Mô phỏng kéo nhanh phối tử (FPL)

Cấu hình cuối cùng của mô phỏng NPT sẽ được sử dụng làm cấu trúc ban đầu cho mô phỏng động lực học phân tử có hướng (Fast pulling ligand-FPL). Các hệ trong mô phỏng FPL bao gồm 1 protein, 1 phối tử, 15.000 phân tử nước và các

ion Na^+ (tổng số khoảng 50.000 nguyên tử). Tốc độ kéo (v) và hệ số lò xo (k) sẽ được đặt tương ứng ở $0,005 \text{ nm ps}^{-1}$ và $600 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ nm}^{-2}$. Trong quá trình mô phỏng, các nguyên tử C_α của protein đích sẽ bị cố định bằng cách sử dụng thế năng điều hòa yếu. Một lực điều hòa sẽ được đặt vào khối tâm của chất ức chế để tách nó ra khỏi khoang liên kết của protein đích. Giá trị lực kéo và sự dịch chuyển của phối tử dọc theo trục Z sẽ được ghi lại sau mỗi 0.1 ps . Các mô phỏng FPL có thể sẽ được lặp lại với 8 quỹ đạo độc lập để đảm bảo lấy mẫu mô phỏng.

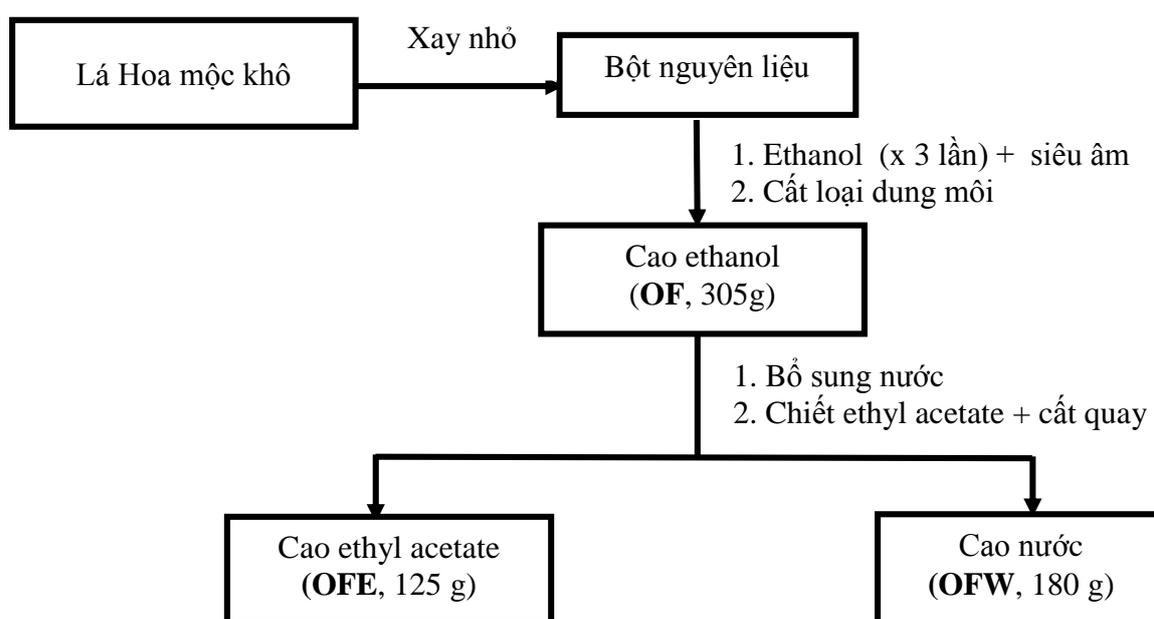
2.2.8.5. Công cụ phân tích

Kết quả thu được từ AutoDock Vina 1.2.5 được phân tích bằng phần mềm PyMOL và Discovery Studio Visualizer. PyMOL được sử dụng để tính toán khoảng cách của các liên kết hydro (Hydrogen Bond - HB) được đo giữa hydro và nguyên tử liên kết tương ứng nó. Liên kết hydro được xác định nếu góc của nguyên tử nhận (A)–hydro (H)–nguyên tử cho (D) lớn hơn 135° với khoảng cách từ A đến D nhỏ hơn $0,35 \text{ nm}$.

Địa điểm thực hiện các thử nghiệm: Viện Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

2.3. THỰC NGHIỆM

2.3.1. Phương pháp xử lý mẫu

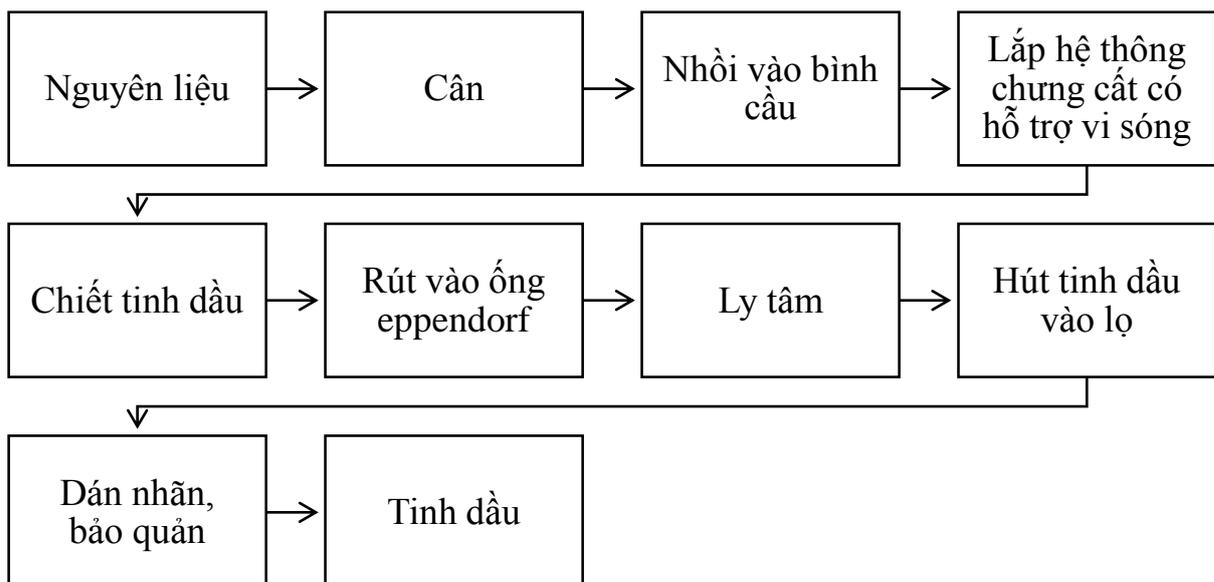


Hình 2.4. Sơ đồ chiết mẫu lá Hoa mộc (*Osmanthus fragrans*)

Lá tươi Hoa mộc (*Osmanthus fragrans*) (7 kg) được sấy khô ở 60°C đến khối lượng không đổi, thu được 2 kg lá khô. Sau đó được nghiền nhỏ và ngâm chiết với ethanol (EtOH) ba lần có hỗ trợ siêu âm ở nhiệt độ phòng. Dịch chiết tổng được cô quay loại bỏ dung môi, thu được cao EtOH thô (**OF**, 305 g). Cao **OF** được hòa tan trong nước và tiếp tục chiết phân đoạn với ethyl acetate (EtOAc). Dịch chiết EtOAc được cô kiệt dung môi, thu được cao ethyl acetate (**OFE**, 125 g), trong khi phần dịch nước còn lại được làm khô, thu được cao nước (**OFW**, 180 g). Việc thu nhận các dịch chiết từ lá Hoa mộc được tóm tắt trong sơ đồ 2.4.

2.3.2. Chung cất lôi cuốn hơi nước sử dụng vi sóng

Hệ thống thu nhận tinh dầu Hoa mộc được sử dụng trong nghiên cứu này bao gồm lò vi sóng R201-A của SHARP, có vai trò như một nguồn nhiệt cho quá trình chưng cất lôi cuốn hơi nước và một bộ chưng cất tinh dầu Clevenger. Một bình cầu 2000mL được đặt vào trong lò vi sóng, nối với hệ thống chưng cất đặt bên ngoài lò, có vai trò ngưng tụ hỗn hợp hơi nước và tinh dầu, tách riêng chúng do có sự khác nhau về tỉ trọng.



Hình 2.5. Sơ đồ quy trình chưng cất tinh dầu Hoa mộc bằng phương pháp chưng cất hơi nước có sử dụng vi sóng.

Thuyết minh quy trình:**Bước 1: Chuẩn bị nguyên liệu**

Hoa mộc thu về được sơ chế bỏ lá và phần hoa bị thối, hỏng, để trong tủ mẫu.

Bước 2: Chung cất

- Mẫu sau khi xử lý được cân bằng cân điện tử.
- Chuyển toàn bộ lượng mẫu trên vào bình cầu dung tích 2 lít. Sau đó thêm vào bình cầu một lượng nước theo tỉ lệ nước: nguyên liệu đã xác định trước phù hợp với thí nghiệm.
- Lắp bộ chung cất tinh dầu
- Bật nước sinh hàn, cắm lò vi sóng.
- Thời gian được đo ngay sau khi lò được bật

Chú ý đảm bảo dòng nước trong sinh hàn luôn được cấp liên tục.

Bước 3: Thu nhận tinh dầu

- Quá trình chung cất được diễn ra cho đến khi lượng tinh dầu trong nguyên liệu không ra thêm được nữa thì tiến hành chiết tinh dầu thô ra nhờ bộ chiết.
- Trong quá trình chung cất, hỗn hợp tinh dầu và nước được ngưng tụ trong ống chia vạch. Nước và tinh dầu có tỉ trọng khác nhau nên sẽ phân lớp trong ống (nước nặng hơn sẽ ở phía dưới còn tinh dầu nhẹ hơn sẽ nằm trên).
- Sau đó, cho tinh dầu thô vào lọ thủy tinh và tiến hành làm khan bằng
- Na_2SO_4 khoảng 1 giờ rồi dùng pipet hút tinh dầu cho vào lọ đựng tinh dầu, đậy nút kín và bảo quản trong tủ lạnh ở nhiệt độ 4°C trước khi đem phân tích.

2.3.3. Xác định thành phần hóa học của tinh dầu Hoa mộc

Cách tiến hành: Chế độ phân tích: Lượng mẫu bơm vào detector với điều kiện phân tích như sau:

Điều kiện GC:

- Nhiệt độ bắt đầu quá trình hóa hơi: 60°C, nhiệt độ kết thúc quá trình hóa hơi: 240°C.

- Quá trình chạy: Khi bắt đầu bơm mẫu thì giữ nhiệt độ của lò ở 60°C trong vòng 5 phút giúp hóa hơi toàn lượng dung môi để hòa mẫu trước khi bơm vào máy. Tiếp đó nâng nhiệt của lò lên dần với tốc độ 40C/phút, khi nhiệt độ nâng lên 240°C thì lưu nhiệt trong 15 phút rồi hạ nhiệt từ từ kết thúc quá trình.

Điều kiện MS:

- Nhiệt độ của nguồn ion hóa: 230°C, nhiệt độ buồng chuyển tiếp: 270°C, ion hóa mẫu ở thế ion hóa 70eV, tốc độ chia dòng 1:100. Khí mang là Heli, tốc độ: 1 ml/phút.

- Lượng mẫu tiêm vào Injector mỗi lần là 1 µl. Tinh dầu được pha loãng trong CH₃OH đến nồng độ 5%.

Xử lý kết quả: Sử dụng thư viện phổ W09N08, HPCH1607 và thư viện trực tuyến NIST Chemistry WebBook để xử lý kết quả nhận được.

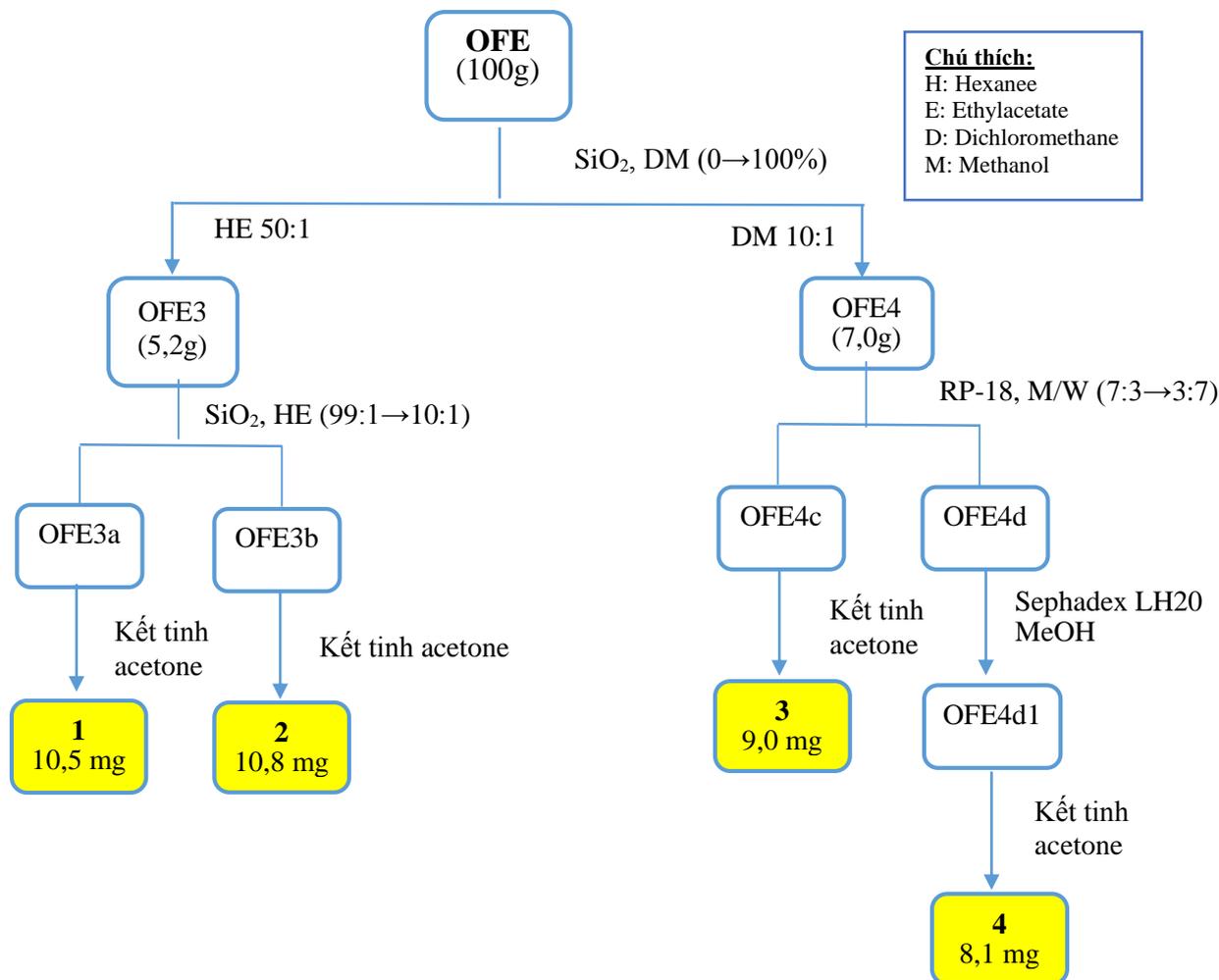
2.3.4. Phân lập và tinh chế các hợp chất

Lấy cao etyl acetate (**OFE**, 100g) được tách trên cột silica gel với hệ dung môi dichloromethane-methanol (0→100% methanol) thu được 6 phân đoạn (**OFE1**→**OFE7**).

Phân đoạn **OFE3** (5,2g) được tách lại trên cột silica gel với hệ dung môi là *n*-hexane/ethyl acetate (99:1→10:1) được 3 phân đoạn nhỏ (**OFE3a**→**OFE3c**). Phân đoạn **OFE3a** được kết tinh lại trong dung môi *n*-hexane/ethyl acetate (30:1) thu được hợp chất luteolin (10,5 mg: **1**), dạng vô định hình, màu vàng nhạt. Phân đoạn **OFE3b** được kết tinh lại trong dung môi acetone thu được hợp chất oleanolic acid (10,8 mg: **2**), dạng bột, màu trắng.

Phân đoạn **OFE4** (7,0g) được tách lại bằng cột RP-18 với hệ dung môi methanol/nước (7:3→3:7) thu được 5 phân đoạn (**OFE4a**→**OFE4e**). Phân đoạn nhỏ **OFE4c** được kết tinh lại trong dung môi acetone thu được hợp chất ursolic aldehyde (9,0 mg: **3**), dạng bột, màu trắng. Phân đoạn nhỏ **OFE4d** được tinh chế

lại bằng Sephadex LH-20 với dung môi methanol sau đó kết tinh lại trong methanol thu được hợp chất quercitrin (8,2 mg: **4**), dạng vô định hình, màu nâu.



Hình 2.6. Sơ đồ phân lập các hợp chất từ Hoa mộc (*Osmanthus fragrans*)

Hàng số vật lý và dữ liệu phổ của các chất phân lập được từ Hoa mộc (*Osmanthus fragrans*):

- **Hợp chất luteolin (1, 10,5 mg)** thu được dưới dạng vô định hình, màu vàng nhạt, nhiệt độ nóng chảy 329-330 °C. Dữ liệu phổ ^1H - và ^{13}C -NMR của **1** xem mục 3.3.1.1, trang 38.

- **Hợp chất oleanolic acid (2, 10,8 mg)** thu được dưới dạng bột, màu trắng, nhiệt độ nóng chảy 300-302 °C. Dữ liệu phổ ^1H - và ^{13}C -NMR của **2** xem mục 3.3.2.1, trang 53.

- **Hợp chất ursolic aldehyde (3, 9,0 mg)** thu được dưới dạng bột, màu trắng, nhiệt độ nóng chảy 218-220 °C. Dữ liệu phổ ^1H - và ^{13}C -NMR của **3** xem mục 3.3.2.2, trang 60.

- **Hợp chất quercitrin (4, 8,2 mg)** thu được dưới vô định hình, màu nâu, nhiệt độ nóng chảy 177-179 °C. Dữ liệu phổ ^1H - và ^{13}C -NMR của **4** xem mục 3.3.1.2, trang 46.

2.3.3. Đánh giá hoạt tính sinh học in vitro của các hợp chất sạch phân lập được

Hoạt tính kháng vi sinh vật được đánh giá bằng phương pháp vi lượng (96-well microtiter plate) theo Vander Bergher & Vlietlinck và McKane & Kandel và hoạt tính gây độc tế bào được đánh giá bằng phương pháp MTT. Kết quả được thể hiện như mục 3.2, trang 68.

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. VỀ THÀNH PHẦN HÓA HỌC

3.1.1. Kết quả xác định thành phần hóa học của tinh dầu Hoa mộc

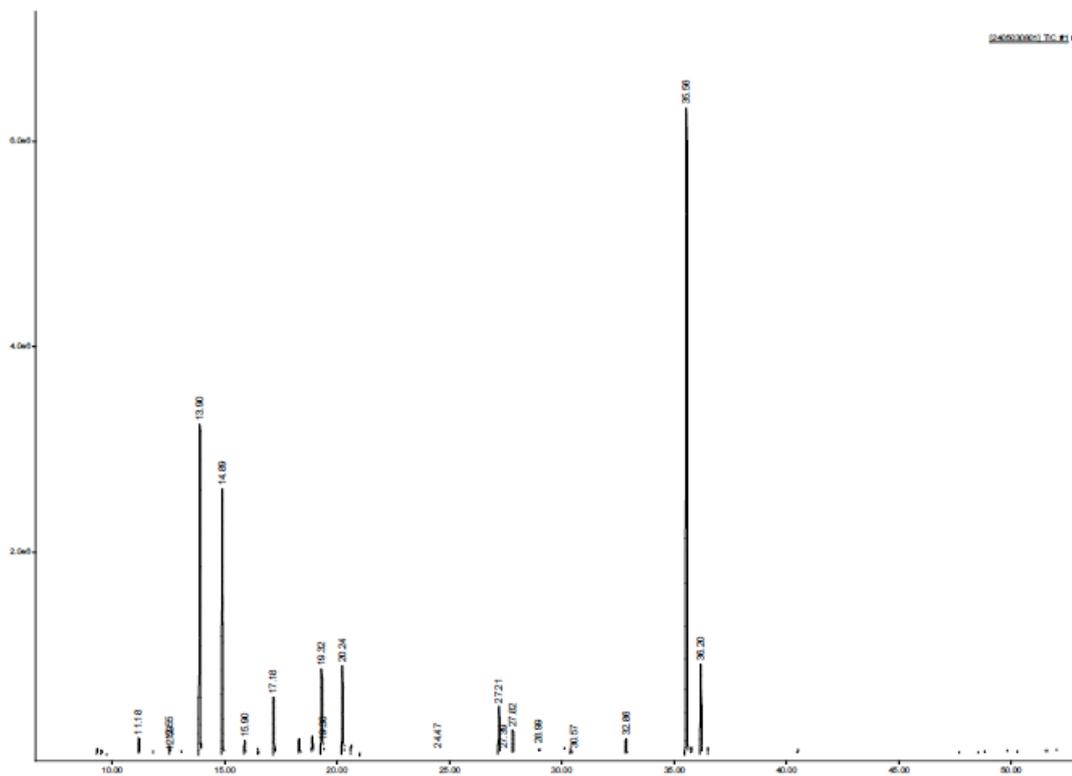
Do tinh dầu là một hỗn hợp nhiều hợp chất hữu cơ khác nhau, có tính chất và tác dụng khác nhau, nên việc phân tích thành phần tinh dầu thu được là vô cùng cần thiết để đánh giá hiệu quả của quá trình tách chiết, cũng như đánh giá tiềm năng của tinh dầu thu được. Do đó, mẫu tinh dầu Hoa mộc được trích ly bằng phương pháp chưng cất hơi nước có sự hỗ trợ vi sóng và được đưa vào phân tích thông qua hệ thống GC/MS nhằm phân tích thành phần tinh dầu, từ đó thấy được sự khác nhau về thành phần hóa học và hàm lượng thành phần qua các mẫu tiến hành đo.

Từ kết quả phân tích thành phần tinh dầu có trong tinh dầu Hoa mộc phân tích bằng phương pháp GC/MS được trình bày tại bảng 3.1 cho thấy có tổng cộng 19 cấu tử được xác định, chiếm 92,28 % tổng hàm lượng tinh dầu. Các chất trên thuộc loại: sesquiterpene, dẫn xuất của sesquiterpene, monoterpene, aldehyde, este. Theo nghiên cứu, một số thành phần chính của tinh dầu Hoa mộc là: Cinnamaldehyde <2-hexyl-(E)-> (22,74%); Dihydromyrcenol (21,60%); Linalool (18,58%); Geraniol (8,07%).

Bảng 3.1. Thành phần hóa học của tinh dầu Hoa mộc thu nhận được từ phương pháp chưng cất lôi cuốn hơi nước có sự hỗ trợ của vi sóng.

STT	Thời gian	RI	Tên cấu tử	%FID
1	11,18	992	myrcene	0,98
2	12,55	1034	limonene	1,75
3	12,59	1035	(Z)- β -ocimene	0,15
4	13,90	1074	dihydromyrcenol	21,60
5	14,89	1103	linalool	18,58
6	15,90	1132	allo-ocimene	0,15
7	17,18	1169	benzyl acetate	6,67

8	19,32	1230	citronellol	5,58
9	19,37	1232	nerol	0,40
10	20,25	1258	geraniol	8,07
11	24,47	1384	(<i>E</i>)- α -damascone	0,21
12	27,21	1471	cylamen aldehyde	1,67
13	27,39	1477	γ -decalactone	0,29
14	27,82	1490	γ -methyl ionone	1,01
15	28,99	1529	6-methyl-alpha-ionone	0,33
16	30,57	1583	γ -undecalactone	0,21
17	32,86	1663	<i>cis</i> -methyl dihydrojasmonate	0,55
18	35,56	1761	2-hexyl-(<i>E</i>)-cinnamaldehyde	22,74
19	36,20	1785	2-hexyl-(<i>Z</i>)-cinnamaldehyde	1,34
			Tổng	92,28



Hình 3.1. Sắc ký đồ của tinh dầu Hoa mộc thu được từ phương pháp chưng cất lôi cuốn hơi nước có sự hỗ trợ của vi sóng.

Các hợp chất terpenoid chiếm ưu thế, trong khi các hợp chất khác thường xuất hiện với số lượng nhỏ hơn. Rong-zhang Mai và các đồng nghiệp của mình đã dùng phương pháp GC-MS và phát hiện ra 48 các hợp chất có trong tinh dầu Hoa mộc của họ với các thành phần chính như: linalool (28,6%), γ -decalactone (14,02%) và (*Z*)- β -ocimene (10,25 %) [76]. Tuy nhiên hàm lượng các chất thu được có sự khác nhau. Chẳng hạn như trong bài nghiên cứu này, hàm lượng linalool thu được là 18,58% , trong khi đó lượng linalool thu được của nhóm nghiên cứu Rong-zhang Mai là 28,6% ; hay hàm lượng decalactone của bài nghiên cứu này là 0,29% ít hơn so với của nhóm tác giả Rong-zhang Mai là 14,02%. Điều này có thể giải thích là do sự khác nhau của khí hậu thu hái, cách thu hái, ngày thu và phương pháp chi ra tinh dầu khác nhau.

3.1.2. Các hợp chất flavonoid

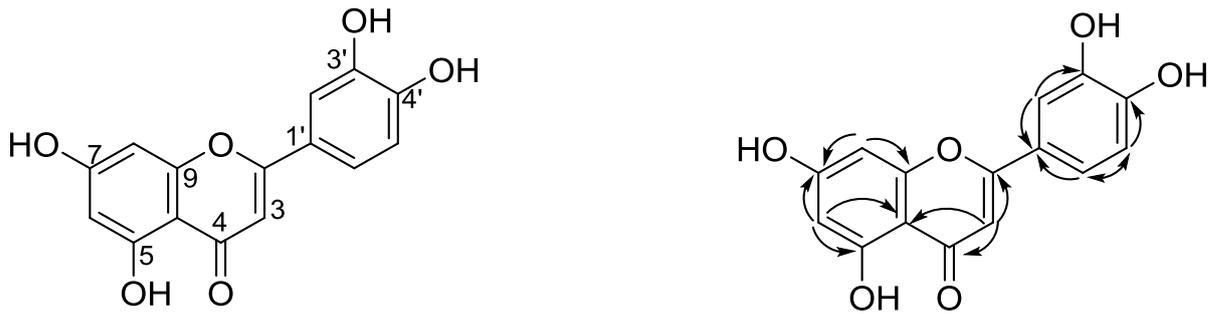
3.1.2.1. Hợp chất luteolin (1)

Phổ $^1\text{H-NMR}$ của **1** quan sát được tín hiệu của năm proton thơm tại δ_{H} 7,46 (1H, brs, H-2'), 7,43 (1H, brs, H-6'), 6,92 (d, $J= 8,5$ Hz, H-5'), 6,83 (1H, d, $J= 2,5$ Hz, H-8) và 5,09 (1H, dd, $J= 2,5$ và 7,5 Hz, H-6). Trong đó, có ba tín hiệu proton thơm dưới dạng hệ AB của vòng A tại δ_{H} 5,09 (1H, dd, $J= 2,5$ và 7,5 Hz, H-6) và 6,83 (1H, d, $J= 2,5$ Hz, H-8); ba tín hiệu proton thơm dưới dạng hệ ABX của vòng B tại δ_{H} 7,46 (1H, dd, $J= 2,5$ và 8,5 Hz, H-2'), 7,43 (1H, d, $J= 2,5$ Hz, H-6') và 6,92 (d, $J= 8,5$ Hz, H-5'). Phổ $^1\text{H-NMR}$ của **1** còn xuất hiện tín hiệu proton tại δ_{H} 12,03 ppm đặc trưng của nhóm hydroxyl liên kết cầu hydro nội phân tử với cacbon thuộc nhóm cacbonyl tại C-4 và tín hiệu của proton nhóm methine tại δ_{H} 6,65 (1H, s, H-3) đặc trưng của khung flavone.

Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ kết hợp với phổ DEPT của **1** xuất hiện 15 tín hiệu của 15 carbon gồm có tín hiệu của 01 nhóm carbon cacbonyl tại δ_{C} 184,0 (C-4); tín hiệu của 06 carbon bậc 4 có oxygen tại các δ_{C} 164,8 (C-2); 162,9 (C-5); 166,9 (C-7); 158,9 (C-9); 147,1 (C-3') và 151,2 (C-4'). Tín hiệu của 02 carbon bậc 4 vòng thơm không có oxygen tại δ_{C} 107,1 (C-10) và 121,5 (C-1'); tín hiệu của 06 carbon

methine có tại δ_C 104,1 (C-3), 101,6 (C-6); 96,0 (C-8); 114,2 (C-2'); 116,8 (C-5') và 121,3 (C-6').

Phân tích dữ liệu phổ $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, DEPT, HSQC và HMBC của **1**, kết hợp các dữ kiện phổ thu được và so sánh với tài liệu tham khảo [91] cho phép xác định hợp chất **1** chính là luteolin hay 3',4',5,7-tetrahydroxyflavone. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC (H \rightarrow C) chính của **1** được thể hiện như hình 3.2.



Hình 3.2. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC (H \rightarrow C) chính của **1**

Bảng 3.2. Dữ liệu phổ ^1H - và ^{13}C -NMR của **1** và chất tham khảo [91]

STT	1 (^1H : 500 MHz, ^{13}C : 125 MHz, CD_3OD)		[91]
	δ_{C}	δ_{H} (mult., J Hz)	$\#\delta_{\text{C}}$
2	164,8	-	166,1
3	104,1	6,65 (1H, s)	103,9
4	184,0	-	183,9
5	162,9	-	163,2
6	101,6	5,09 (1H, dd, $J= 2,5$ và $7,5$ Hz)	100,2
7	166,9	-	166,4
8	96,0	6,83 (1H, d, $J= 2,5$ Hz)	95,0
9	158,9	-	159,4
10	107,1	-	105,3
1'	121,5	-	123,7
2'	114,2	7,46 (1H, brs)	114,2
3'	147,1	-	151,0
4'	151,2	-	151,0
5'	116,8	6,92 (d, $J= 8,5$ Hz)	116,8
6'	120,5	7,43 (1H, brs)	120,3

$\#\delta_{\text{C}}$ của luteolin (^1H : 500 MHz, ^{13}C : 125 MHz, CD_3OD) [91]

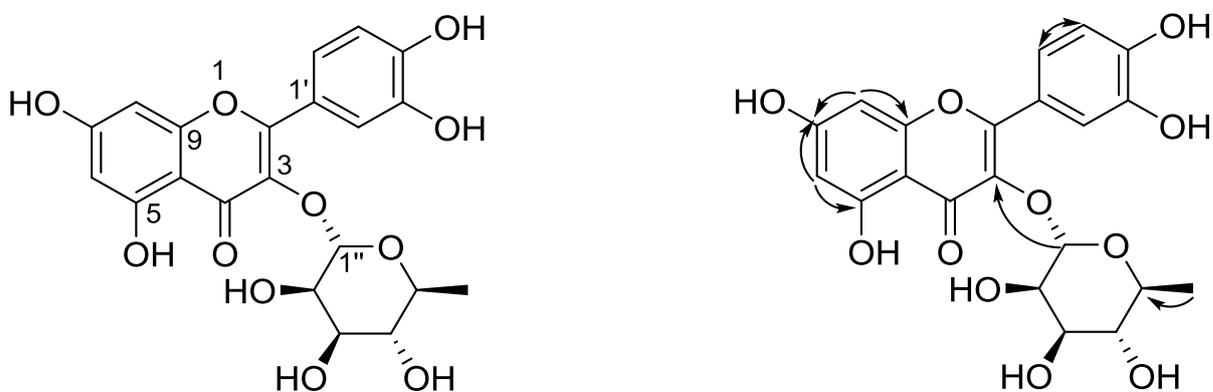
3.1.2.2. Hợp chất quercitrin (**4**)

Phổ ^1H -NMR của **4** cho thấy năm tín hiệu proton thơm tại: δ_{H} 7,35 (1H, d, $J= 2,0$ Hz, H-2'), 7,28 (1H, dd, $J= 8,5$ và $2,0$ Hz, H-6'), 6,90 (1H, d, $J= 8,5$ Hz, H-5'), 6,40 (1H, d, $J= 2,0$ Hz, H-8) và 6,22 (1H, d, $J= 2,0$ Hz, H-6). Trong đó, một cặp proton thơm liên kết *meta* xuất hiện tại δ_{H} 7,35 (1H, d, $J= 2,0$ Hz, H-2') và 7,28 (1H, dd, $J= 8,5$ và

2,0 Hz, H-6'), hơn nữa proton tại δ_H 7,28 (1H, dd, $J= 8,5$ và 2,0 Hz, H-6') còn có liên kết *ortho* với proton tại δ_H 6,90 (1H, d, $J= 8,5$ Hz, H-5') với hằng số tương tác $J= 8,5$ Hz, đã xác nhận sự có mặt của ba nhóm thế trên vòng B. Hai proton thơm còn lại liên kết *meta* tại δ_H 6,22 (1H, d, $J= 2,0$ Hz, H-6) và 6,40 (1H, d, $J= 2,0$ Hz, H-8) cho thấy sự thế hai nhóm hydroxyl trên vòng A của khung flavone.

Phổ ^{13}C -NMR kết hợp với phổ DEPT của **4** xuất hiện 21 tín hiệu của 21 carbon (15 tín hiệu của phần aglycone và 06 tín hiệu của đường L-rhamnosyl). Phần aglycone gồm có tín hiệu của 01 nhóm carbon carbonyl tại δ_C 177,9 (C-4); tín hiệu của 07 carbon bậc 4 có oxygen tại các δ_C 156,5 (C-2); 134,8 (C-3); 161,6 (C-5); 164,5 (C-7); 157,0 (C-9); 145,4 (C-3') và 148,8 (C-4'); tín hiệu của 02 carbon bậc 4 không có oxygen tại δ_C 103,9 (C-10) và 120,8 (C-1'); tín hiệu của 05 carbon methine tại 93,6 (C-8); 98,8 (C-6); 115,5 (C-2'); 115,5 (C-5') và 121,3 (C-6'); Tín hiệu của 6 carbon đường L-rhamnosyl tại δ_C 102,0 (C-1''), 69,9 (C-2''), 70,9 (C-3''), 71,6 (C-4''), 70,5 (C-1'') và 17,3 (C-6''). Phổ HMBC của **4** quan sát được tương tác của proton anomer và C-3 cho phép xác định đường L-rhamnose được gắn vào khung aglycone tại C-3 qua cầu nối oxygen.

Phân tích các dữ liệu phổ của **4**, kết hợp với so sánh các dữ liệu phổ trong tài liệu tham khảo [91] cho thấy hoàn toàn phù hợp. Vì vậy, hợp chất **4** được xác định là quercitrin hay quercetin-3-O-rhamnoside. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC (H \rightarrow C) chính của **4** được thể hiện như hình 3.3.



Hình 3.3. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC (H \rightarrow C) chính của **4**

Bảng 3.3. Dữ liệu phổ ^1H - và ^{13}C -NMR của **4** và chất tham khảo [91]

STT	4 (^1H : 500 MHz, ^{13}C : 125 MHz, CD_3OD)		[91]
	δ_{C}	δ_{H} (mult., J Hz)	$\#\delta_{\text{C}}$
2	156,5	-	156,9
3	134,8	-	134,6
4	177,9	-	178,2
5	161,6	-	161,8
6	98,8	6,22 (1H, d, $J= 2,0$ Hz)	99,2
7	164,5	-	164,7
8	93,6	6,40 (1H, d, $J= 2,0$ Hz)	94,1
9	157,0	-	157,8
10	103,9	-	104,6
1'	120,8	-	121,2
2'	115,5	7,35 (1H, d, $J= 2,0$ Hz)	115,9
3'	145,4	-	145,7
4'	148,8	-	148,9
5'	115,5	6,90 (1H, d, $J= 8,5$ Hz)	116,2
6'	121,3	7,28 (1H, dd, $J= 8,5$ và $2,0$ Hz)	121,6
1''	102,0	5,19 (1H, s)	102,3
2''	69,9	3,88 (1H, d, $J= 2,0$ Hz)	70,5
3''	70,9	3,50 (1H, m)	71,1
4''	71,6	3,16 (1H, m)	71,7
5''	70,5	3,22 (1H, m)	70,9
6''	17,3	0,88 (3H, d, $J= 6,0$ Hz)	17,9

$\#\delta_{\text{C}}$ của quercitrin (^1H : 400 MHz, ^{13}C : 105 MHz, CD_3OD) [91]

3.1.3. Các hợp chất triterpenoid

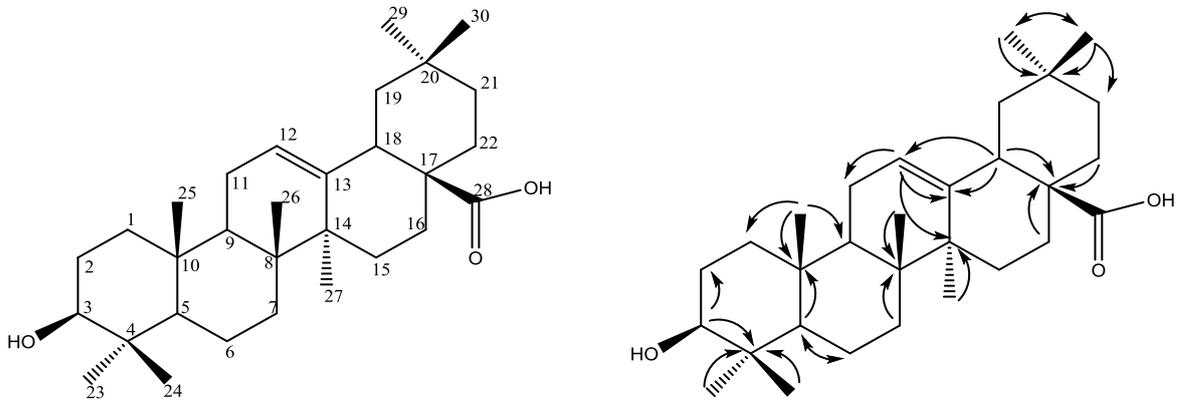
3.1.3.1. Hợp chất oleanolic acid (2)

Phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất **2** cho thấy các tín hiệu đặc trưng của triterpene oleanane, bao gồm: Một proton olefin đặc trưng của liên kết đôi C12–C13 trong khung triterpenoid pentacyclic tại δ_{H} 5,29 (1H, s, H-12), Điều này gợi ý cấu trúc khung olea-12-en. Một proton oxymethine tại δ_{H} 3,20 (1H, dd, $J = 10,5$ và $4,0$ Hz, H-3 α), phù hợp với ít nhất một nhóm hydroxyl trên khung olean-12-en của **2**, hằng số tương tác proton lớn $J_{\text{H-2/H-3}} = 10,5$ Hz cho thấy định hướng của nhóm $3\beta\text{-OH}$. Bảy tín hiệu methyl dạng singlet tại δ_{H} 1,12 (3H, s, H-27), 0,97 (3H, s, H-23), 0,91 (3H, s, H-25), 0,90 (3H, s, H-30), 0,89 (3H, s, H-29), 0,78 (3H, s, H-26), 0,76 (3H, s, H-24).

Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ kết hợp với phổ DEPT, HSQC và HMBC của hợp chất **2** hiển thị tín hiệu của 30 carbon, bao gồm: Một nhóm carbonyl tại δ_{C} 182,1 (C-28). Năm nhóm methine, trong đó có 01 nhóm oxymethine tại δ_{C} 78,8 (C-3), 01 nhóm methine olefine tại δ_{C} 122,7 (C-12), 03 nhóm methine no tại δ_{C} 55,3 (C-5), 47,9 (C-9), 41,5 (C-18). Mười nhóm methylene tại δ_{C} 38,6 (C-1), 27,9 (C-2), 18,6 (C-6), 32,9 (C-7), 23,0 (C-11), 28,1 (C-15), 22,8 (C-16), 46,0 (C-19), 33,9 (C-21), 32,6 (C-22). Bảy nhóm methyl tại δ_{C} 28,3 (C-23), 15,80 (C-24), 15,3 (C-25), 17,2 (C-26), 25,8 (C-27), 33,2 (C-29), 23,5 (C-30). Bảy carbon bậc bốn tại δ_{C} 39,0 (C-4), 39,5 (C-8), 37,2 (C-10), 143,8 (C-13), 41,6 (C-14), 46,6 (C-17), 30,8 (C-20). Phổ HMBC quan sát được tương tác giữa H-3 (δ_{H} 3,20) với C-2, C-24, C-23, xác nhận vị trí của các nhóm $3\beta\text{-OH}$ tại C-3. Tương tác giữa H-12 (δ_{H} 5,29) tương tác với C-13, C-9, C-18, xác nhận vị trí của nối đôi tại vị trí C-12. Ngoài ra, tương tác giữa H-23 và H-24 tương tác với C-3, C-4, C-5; giữa H-25 với C-5, C-9, C-10; giữa H-26 với C-8, C-9, C-14; giữa H-27 tương tác với C-8, C-13, C-14, C-15; giữa H-29 và H-30 với C-19, C-20, C-21 xác nhận vị trí của các nhóm methyl tương ứng.

Phân tích những số liệu phổ kết hợp với các tài liệu phổ thu được [92] cho phép khẳng định **2** phù hợp với hợp chất oleanolic acid hay $3\beta\text{-hydroxy-12-ene-}$

28-oic acid. Đây là hợp chất triterpene gặp trong nhiều loài cây thuốc và đang được chú ý về tiềm năng sử dụng trong điều trị các bệnh mãn và tác dụng ức chế ung thư.



Hình 3.4. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC (H→C) chính của **2**

Bảng 3.4. Dữ liệu phổ ^1H - và ^{13}C -NMR của **2** và chất tham khảo [92]

STT	2 (^1H : 500 MHz, ^{13}C : 125 MHz, CDCl_3)		[92]
	δ_C	δ_H (mult, J Hz)	$\#\delta_C$
1	38,6	1,58 và 0,99 (2H, m)	38,9
2	27,9	1,63 và 1,60 (2H, m)	28,1
3	78,8	3,20 (1H, dd, $J= 10,5$ và $4,0$ Hz)	78,1
4	39,0	-	39,4
5	55,3	0,75 (1H, brs)	55,8
6	18,6	1,58 và 1,40 (2H, m)	18,8
7	32,9	1,56 và 1,37 (2H, m)	33,3
8	39,5	-	39,8
9	47,9	1,61 (1H, m)	48,2
10	37,2	-	37,4
11	23,0	1,90 và 1,91 (2H, m)	23,8
12	122,7	5,29 (1H, s)	122,6
13	143,8	-	144,8
14	41,6	-	42,2
15	28,1	1,69 và 1,05 (2H, m)	28,4

16	22,8	1,99 và 1,59 (2H, m)	23,8
17	46,6	-	46,7
18	41,5	2,80 (1H, dd, $J= 8,5$ và $4,0$ Hz)	42,1
19	46,0	1,64 và 1,15 (2H, m)	46,6
20	30,8	-	31,0
21	33,9	1, 28 và 1,19 (2H, m)	34,3
22	32,6	1,82 và 1,55 (2H, m)	33,2
23	28,3	0,97 (3H, s)	28,8
24	15,8	0,76 (3H, s)	16,5
25	15,34	0,91 (3H, s)	15,6
26	17,2	0,78 (3H, s)	17,5
27	25,8	1,12 (3H, s)	26,2
28	182,1	-	180,0
29	33,2	0,89 (3H, s)	33,4
30	23,5	0,90 (3H, s)	23,8

δ_H và # δ_C của oleanolic acid (1H : 200 MHz, ^{13}C : 50 MHz, $CDCl_3$) [92]

3.1.3.2. Hợp chất ursolic aldehyde (3)

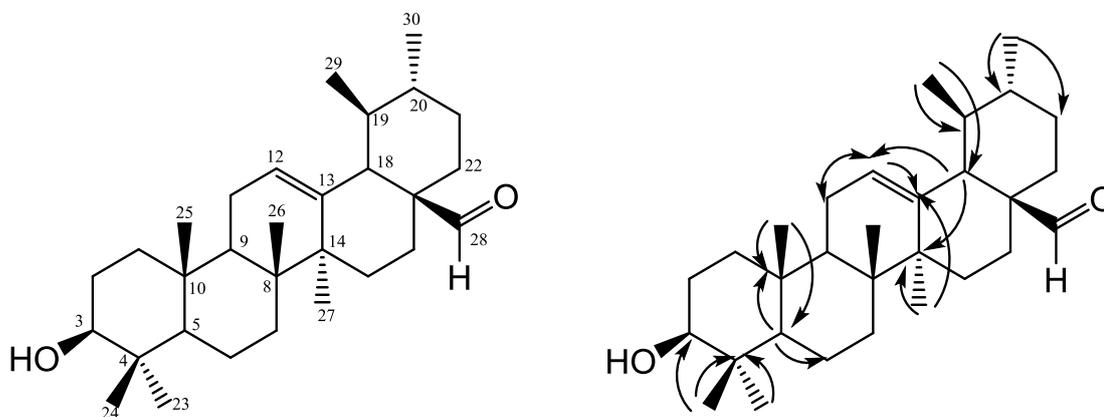
Phổ 1H -NMR của **3** xuất hiện tín hiệu đặc trưng của khung triterpene ursane: Tín hiệu của proton nhóm olefin tại δ_H 5,36 (1H, brs, H-12); tín hiệu của proton oxymethine (3β -OH) tại δ_H 3,46 (1H, dd, $J= 10,8$ và $4,8$ Hz) với hằng số tương tác lớn $J_{H-2/H-3}= 10,8$ Hz xác nhận proton H-3 ở vị trí axial và nhóm 3β -OH; tín hiệu proton nhóm methine tại δ_H 2,20 (1H, d, $J= 11,5$ Hz, H-18); tín hiệu đặc trưng của bảy nhóm methyl bao gồm 5 nhóm methyl dưới dạng singlet tại δ_H 0,99 (3H, s, H-23), 0,95 (3H, s, H-24), 0,78 (3H, s, H-25), 0,76 (3H, s, H-26), 1,11 (3H, s, H-27) và 2 nhóm methyl dưới dạng doublet tại δ_H 0,88 (3H, d, $J= 6,4$ Hz, H-29), 0,97 (3H, d, $J= 6,4$ Hz, H-30). Tín hiệu proton của nhóm aldehyde tại δ_H 9,38 (1H, s, H-28).

Phổ ^{13}C -NMR kết hợp với phổ DEPT, HSQC và HMBC cho biết trong phân tử của **3** có 30 carbon, bao gồm một nhóm aldehyde tại δ_C 207,3 (C-28), bảy nhóm

methine (trong đó có 01 nhóm oxymethine tại δ_C 78,2 (C-3); 01 nhóm olefin tại δ_C 126,2 (C-12); và 05 nhóm methine no tại δ_C 55,3 (C-5), 47,8 (C-9), 52,7 (C-18), 39,1 (C-19) và 39,2 (C-20)), chín methylene tại δ_C 38,9 (C-1), 27,2 (C-2), 18,3 (C-6), 32,9 (C-7), 23,1 (C-11), 28,3 (C-15), 23,5 (C-16), 30,2 (C-21) và 33,3 (C-22), bảy nhóm methyl tại δ_C 29,8 (C-23), 16,7 (C-24), 15,6 (C-25), 17,4 (C-26), 23,3 (C-27), 16,8 (C-29) và 21,3 (C-30), sáu carbon bậc bốn tại δ_C 39,0 (C-4), 39,5 (C-8), 37,1 (C-10), 138,0 (C-13), 42,1 (C-14) và 50,3 (C-17)

Phổ HMBC của **3** cho biết tương tác của H-3 (δ_H 78,2) với C-1 (δ_C 38,9), C-23 (δ_C 29,8) và C-24 (δ_C 16,7) đã xác nhận vị trí 3β -OH; tương tác của H-12 (δ_H 5,36) với C-9 (δ_C 47,8), C-14 (δ_C 42,1) và C-27 (δ_C 23,3) đã xác nhận vị trí liên kết đôi tại C-12; tương tác của H-18 (δ_H 2,20) với C-12 (δ_C 126,2), C-13 (δ_C 138,0), C-17 (δ_C 50,3), C-19 (δ_C 39,1), C-28 (δ_C 207,3) đã xác nhận vị trí H-18 và nhóm aldehyde C-28. Ngoài ra, trên phổ còn xuất hiện tín hiệu tương tác của các nhóm methyl với carbon khung đã xác định cấu trúc khung ursane.

Việc phân tích những số liệu phổ thực nghiệm kết hợp với các tài liệu phổ thu được [93] cho phép khẳng định **3** phù hợp với hợp chất ursolic aldehyde.



Hình 3.5. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC (H \rightarrow C) chính của **3**

Bảng 3.5. Dữ liệu phổ ^1H - và ^{13}C -NMR của **3** và chất tham khảo [93].

TT	3 (^1H : 500 MHz, ^{13}C : 125 MHz, CDCl_3)		[93]
	δ_C	δ_H (mult., J Hz)	# δ_C
1	38,9	1,66 và 1,64 (2H, m)	38,6
2	27,2	1,57 và 1,49 (2H, m)	27,1

3	78,2	3,46 (1H, dd, $J= 10,8$ và $4,8$ Hz)	78,9
4	39,0	-	38,7
5	55,3	0,76 (1H, d, $J= 11,5$ Hz),	55,1
6	18,3	1,96 (1H, dd, $J = 3,5$ và $8,5$ Hz)	18,2
7	32,9	1,56 và 1,30 (2H, m)	33,0
8	39,5	-	39,7
9	47,8	1,60 (1H, m)	47,5
10	37,1	-	36,9
11	23,1	1,97 và 1,88 (2H, m)	23,2
12	126,2	5,36 (1H, brs)	126,1
13	138,0	-	137,7
14	42,1	-	42,1
15	28,3	1,89 và 1,10 (2H, m)	28,1
16	23,5	2,02 và 1,59 (2H, m)	23,2
17	50,3	-	50,1
18	52,7	2,20 (1H, d, $J= 11,5$ Hz)	52,5
19	39,1	1,43 (1H, m)	38,9
20	39,2	0,92 (1H, m)	38,7
21	30,2	1,55 và 1,36 (2H, m)	30,1
22	33,3	1,53 và 1,39 (2H, m)	33,0
23	29,8	0,99 (3H, s)	26,8
24	16,7	0,95 (3H, s)	15,6
25	15,6	0,78 (3H, s)	15,5
26	17,4	0,76 (3H, s)	17,1
27	23,3	1,11 (3H, s)	23,2
28	207,3	9,38 (1H, s)	207,4
29	16,8	0,88 (3H, d, $J= 6,4$ Hz)	16,6
30	21,3	0,97 (3H, d, $J= 6,4$ Hz)	21,0

δ_{H} và # δ_{C} của ursolic aldehyde (^1H : 200 MHz, ^{13}C : 50 MHz, CDCl_3) [93]

Tóm lại, từ lá loài Hoa mộc (*Osmanthus fragrans*) ở Việt Nam đã phân lập và xác định cấu trúc hóa học của 4 hợp chất, bao gồm 2 hợp chất flavonoid: luteolin (1) và quercitrin (4) và 2 hợp chất triterpenoid: oleanolic acid (2) và ursolic aldehyde (3). Kết quả trên phù hợp với thành phần hóa học của loài Hoa mộc (*Osmanthus fragrans*) và chi *Osmanthus* đã công bố trước đây.

3.2. VỀ HOẠT TÍNH SINH HỌC

3.2.1. Hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm

Tác dụng kháng khuẩn và kháng nấm của 4 hợp chất: luteolin (1), oleanolic acid (2), ursolic aldehyde (3) và quercitrin (4) từ Hoa mộc (*Osmanthus fragrans*) đối với vi khuẩn Gr (-): *Escherichia coli* (E.c) và *Pseudomonas aeruginosa* (P.a), Vi khuẩn Gr (+): *Bacillus subtilis* (B.s) và *Staphylococcus aureus* (S.a), Nấm sợi: *Aspergillus niger* (A.n) và *Fusarium oxysporum* (F.o), Nấm men: *Candida albicans* (C.a) và *Saccharomyces cerevisiae* (S.c) thể hiện bảng 3.6.

Bảng 3.6. Kết quả kháng khuẩn, kháng nấm của các hợp chất phân lập được

Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC: µg/ml)									
Ký hiệu	Nồng độ mẫu (µg/ml)	Gr (-)		Gr (+)		Nấm mốc		Nấm men	
		<i>E.c</i>	<i>P.a</i>	<i>B.s</i>	<i>S.a</i>	<i>A.n</i>	<i>F.o</i>	<i>S.c</i>	<i>C.a</i>
1	200	200	>200	200	>200	200	>200	>200	>200
2	200	200	200	>200	>200	>200	200	>200	200
3	200	200	>200	>200	200	>200	>200	200	>200
4	200	200	200	>200	100	>200	>200	100	200

Kết quả cho biết, hợp chất quercitrin (4) thể hiện hoạt tính ức chế tốt nhất đối với hai chủng *Staphylococcus aureus* và *Saccharomyces cerevisiae* với giá trị MIC 100 µg/ml. Ngoài ra, luteolin (1) ức chế đối với chủng *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* và *Aspergillus niger*; oleanolic acid (2) ức chế đối với chủng *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Fusarium oxysporum* và *Candida albicans*; ursolic aldehyde (3) ức chế đối với chủng *Escherichia coli*,

Staphylococcus aureus, và *Saccharomyces cerevisiae*; quercitrin (4) ức chế đối với chủng *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, và *Candida albicans* với giá trị MIC 200 µg/ml. Các trường hợp còn lại không thể hiện hoạt tính ở nồng độ thử nghiệm. Điều đó chứng tỏ, Hoa mộc (*Osmanthus fragrans*) có chứa các hoạt chất kháng khuẩn và kháng nấm tiềm năng, cần được nghiên cứu sâu hơn.

3.2.2. Hoạt tính gây độc tế bào theo phương pháp MTT

Tác dụng gây độc đối với dòng tế bào ung thư gan (HepG2) và phổi (A549) ở người của 4 hợp chất: luteolin (1), oleanolic acid (2), ursolic aldehyde (3) và quercitrin (4) từ Hoa mộc (*Osmanthus fragrans*) được thể hiện như bảng 3.7.

Bảng 3.7. Kết quả tác dụng gây độc tế bào của các hợp chất phân lập được

Ký hiệu	Tế bào HepG2		Tế bào A549	
	Tỷ lệ ức chế tế bào (%)	IC ₅₀ µM	Tỷ lệ ức chế tế bào (%)	IC ₅₀ µM
1	71,43 ± 1,3	22,23	78,01 ± 0,4	18,35
2	66,38 ± 1,0	33,56	72,21 ± 2,5	21,87
3	52,42 ± 2,1	61,32	60,37 ± 0,8	44,29
4	59,87 ± 1,1	39,72	65,34 ± 2,6	28,26
Paclitaxel 50µM	82,37 ± 1,5	1,28	89,33 ± 2,2	0,12

Kết quả cho biết, hợp chất luteolin (1) thể hiện hoạt tính gây độc đối với dòng tế bào ung thư gan (HepG2) và phổi (A549) ở người tốt nhất với giá trị IC₅₀ lần lượt là 22,23 và 18,35 µM, sau đó là oleanolic acid (2) với giá trị IC₅₀ lần lượt là 33,56 và 21,87 µM, tiếp sau là quercitrin (4) với giá trị IC₅₀ lần lượt là 39,72 và 28,26 µM và cuối cùng là ursolic aldehyde (3) với giá trị IC₅₀ lần lượt là 61,32 và 44,29 µM. Điều đó, khẳng định Hoa mộc (*Osmanthus fragrans*) là thảo dược tiềm năng trong phát triển thuốc mới điều trị ung thư. Hơn nữa, nghiên cứu trước đây đã chỉ ra rằng, cao chiết từ Hoa mộc (*Osmanthus fragrans*) có khả năng ức chế topoisomerase II, chống ung thư rất tốt. Nhằm làm sáng tỏ cơ chế ức chế, Trong nghiên cứu này, mô hình *in silico* để sàng lọc các cấu trúc các

hợp chất phân lập được có khả năng ức chế topoisomerase II nhằm góp phần làm sáng tỏ cơ chế, phát triển để thiết kế các loại thuốc mới cho bệnh ung thư.

3.3. VỀ SÀNG LỌC *IN SILICO*

3.3.1. Kết quả mô phỏng docking phân tử

Thông thường, mô phỏng docking phân tử được sử dụng dự đoán cấu hình liên kết của phối tử với protein. Trong số đó, AutoDock Vina 1.2.5, phiên bản cải tiến của AutoDock Vina, được biết đến là một trong những công cụ được sử dụng phổ biến nhất trong các nghiên cứu thiết kế thuốc sử dụng công cụ hỗ trợ máy tính, với hơn 10 000 trích dẫn trong mười hai năm qua. Do đó, phần mềm này được sử dụng để dự đoán năng lượng liên kết tự do và cấu hình liên kết của phối tử với enzyme Topoisomerase II. Do hiệu suất của việc mô phỏng có thể thay đổi tùy thuộc vào đối tượng cụ thể, bước đầu tiên, chúng tôi đánh giá hiệu suất docking của phần mềm trên Topoisomerase II bằng cách kiểm tra kết quả tương tác năng lượng liên kết tự do từ phần mềm của 10 chất ức chế thực nghiệm với năng lượng liên kết tự do của chúng được tính toán từ các giá trị IC_{50} đã được báo cáo thực nghiệm trước đây. Sử dụng công thức Cheng-Prusoff's, hằng số ức chế K_i được tính như sau:

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[S]}{K_m}} = \exp\left(\frac{\Delta G}{RT}\right) \rightarrow IC_{50} = \exp\left(\frac{\Delta G}{RT}\right) + \exp\left(\frac{\Delta G}{RT}\right) \times \frac{[S]}{K_m}$$

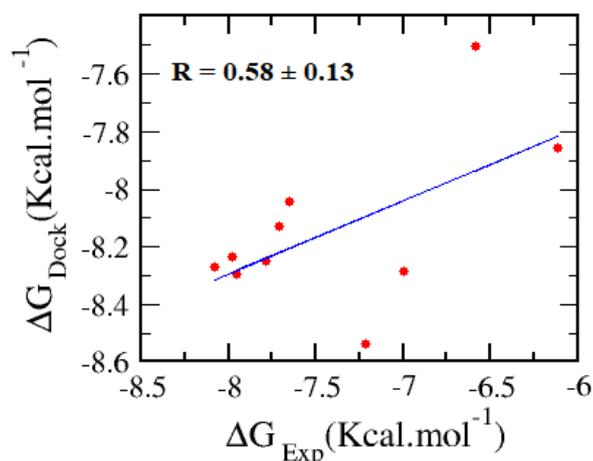
Giả định giá trị IC_{50} bằng với giá trị hằng số K_i , năng lượng liên kết tự do thực nghiệm có thể được suy luận từ công thức trên như sau: $\Delta G_{\text{exp}} = RT \ln(K_i) = RT \ln(IC_{50})$ trong đó, $R = 1.987 \times 10^{-3}$ (kcal/K* mol); $T = 300$ (K) và hằng số ức chế K_i có đơn vị là mol. Kết quả mô phỏng được thể hiện trong bảng 3.8.

Bảng 3.8. Kết quả mô phỏng docking của 10 chất ức chế thực nghiệm

STT	PubChem ID	ΔG_{Dock} (kcal/mol)	ΔG_{Exp} (kcal/mol)
1	CID155186649	-7,21	-8,53
2	CID145982399	-7,71	-8,13

3	CID137637498	-7,98	-8,23
4	CID127024915	-7,95	-8,29
5	CID72707984	-6,99	-8,28
6	CID31703	-8,08	-8,27
7	CID134816158	-7,78	-8,25
8	CID189219	-7,65	-8,04
9	CID53361576	-6,11	-7,85
10	CID155510469	-6,58	-7,50

Kết quả thu được cho thấy, năng lượng liên kết tự do thu được từ mô phỏng có độ tương tác tốt với năng lượng liên kết tự do thu được từ thực nghiệm với hệ số tương tác là $R = 0,58 \pm 0,13$ (Hình 3.6). Có thể nhận định rằng mô hình tính toán này có thể tin cậy trong việc dự đoán các hợp chất tiềm năng có hoạt tính ức chế đối với Topoisomerase II.



Hình 3.6. Hằng số tương tác giữa năng lượng liên kết tự do thu được từ mô phỏng và thực nghiệm

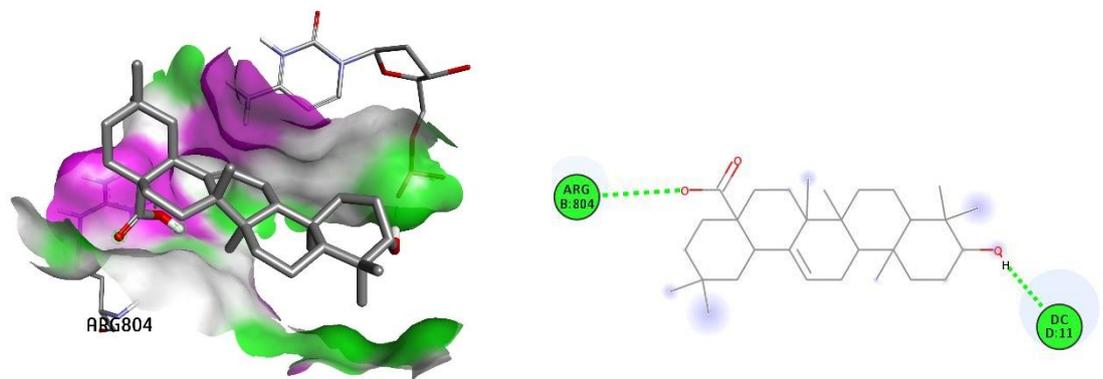
Tiếp tục sử dụng phần mềm với các tham số tiêu chuẩn như trên để mô phỏng docking cho 2 hợp chất nghiên cứu. Kết quả được trình bày tại bảng 3.9, có thể thấy hai hợp chất có ái lực liên kết tự do lần lượt là Oleanolic acid (-7.85 kcal/mol) và Luteolin (-6.55 kcal/mol).

Bảng 3.9. Kết quả docking phân tử của 2 hợp chất nghiên cứu

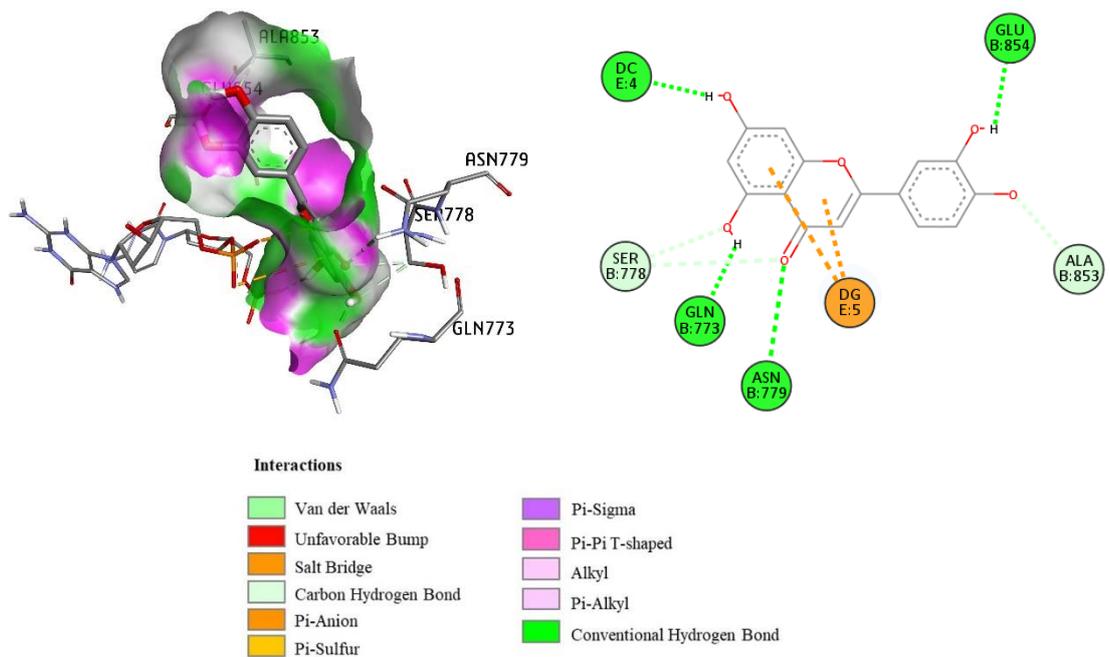
Tên hợp chất	ΔG_{Dock} (kcal/mol)	Số liên kết Hydrogen	Amino axit tham gia tương tác hydro
oleanolic acid	-6.55	2	Arg804, DC11
luteolin	-7.85	4	Gln773, Asn779, Glu854, DC4

Cấu hình liên kết giữa oleanolic acid và luteolin với Topoisomerase II được phân tích bằng phần mềm Discovery Studio và được thể hiện tại hình 3.7.

(A)



(B)



Hình 3. 7. Cấu hình tương tác giữa oleanolic acid (A), luteolin (B) với Topoisomerase II được dự đoán bởi phần mềm AutoDock Vina 1.2.5

Cả hai hợp chất oleanolic acid và luteolin đều hình thành các liên kết hydro với Topoisomerase II. Trong đó, oleanolic acid tạo 2 liên kết hydro với các axit amin Arg804, DC11. Hợp chất luteolin tạo 4 liên kết hydro với Gln773, Asn779, Glu854, DC4, ngoài ra, các liên kết van der Waals khác với các axit amin Ser778, Ala853, DG5 cũng góp phần làm bền vững thêm liên kết giữa hợp chất này với đích protein nghiên cứu.

3.3.2. Kết quả mô phỏng động lực học phân tử sử dụng kỹ thuật kéo nhanh phối tử

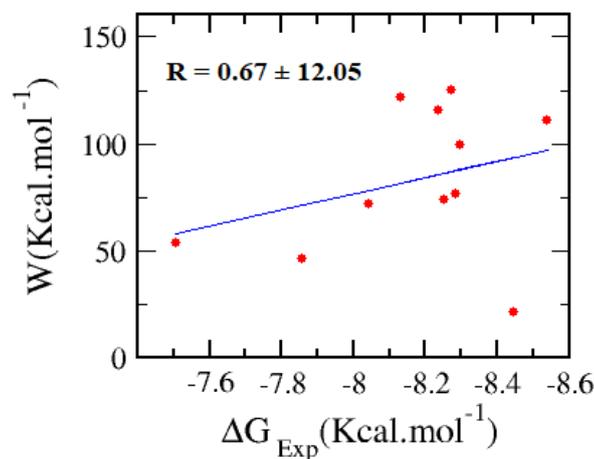
Mặc dù kết quả thu được từ mô phỏng docking phân tử cho hệ số tương tác tốt với dữ liệu thực nghiệm, tuy nhiên, các mô phỏng docking thường dựa vào nhiều phép tính gần đúng và bỏ qua các tham số khác để đạt mục đích đoán nhanh kết quả năng lượng liên kết tự do. Do đó, cần phải tinh chỉnh kết quả mô phỏng docking bằng các phương pháp chính xác và chuyên sâu hơn về mặt tính toán để đảm bảo độ chính xác. Trong nghiên cứu này, phương pháp kéo nhanh phối tử (FPL) đã được sử dụng để tinh chỉnh chính xác năng lượng tự do liên kết phối tử - protein. Ban đầu, cấu hình phức hệ thu được từ mô phỏng docking phân tử được chọn làm cấu trúc đầu vào cho mô phỏng động lực học phân tử. Các phức hệ được mô phỏng trong thời gian 20 ns. Kết quả thu được cho thấy các phức hệ đều đạt đến trạng thái cân bằng nhanh chóng trên tất cả các quỹ đạo.

Trong bước tiếp theo, cấu hình cuối cùng từ mô phỏng động lực học phân tử được sử dụng làm cấu trúc đầu vào để dự đoán năng lượng liên kết tự do thông qua các mô phỏng FPL. Đầu tiên, tiến hành mô phỏng FPL đối với 10 chất ức chế thực nghiệm, cụ thể, một lực bên ngoài được tác dụng vào tâm khối lượng của mỗi phối tử, khiến chúng di chuyển ra khỏi vùng hoạt động của Topoisomerase II trong khoảng thời gian 700 ps. Lực kéo (lực gây đứt gãy liên kết) nhanh chóng đạt giá trị cực đại, khoảng trong vòng 200 ps, trước khi đột ngột trở về 0, phù hợp với sự kết thúc của các tương tác giữa protein và phối tử. Giá trị công kéo cao nhất được ghi lại tương ứng với lực kéo. Trong suốt quá trình mô phỏng, công của lực kéo cũng được tính toán. Dữ liệu thu được bao gồm lực kéo trung bình (F_{max}), và công kéo (W) được báo cáo trong Bảng 3.9.

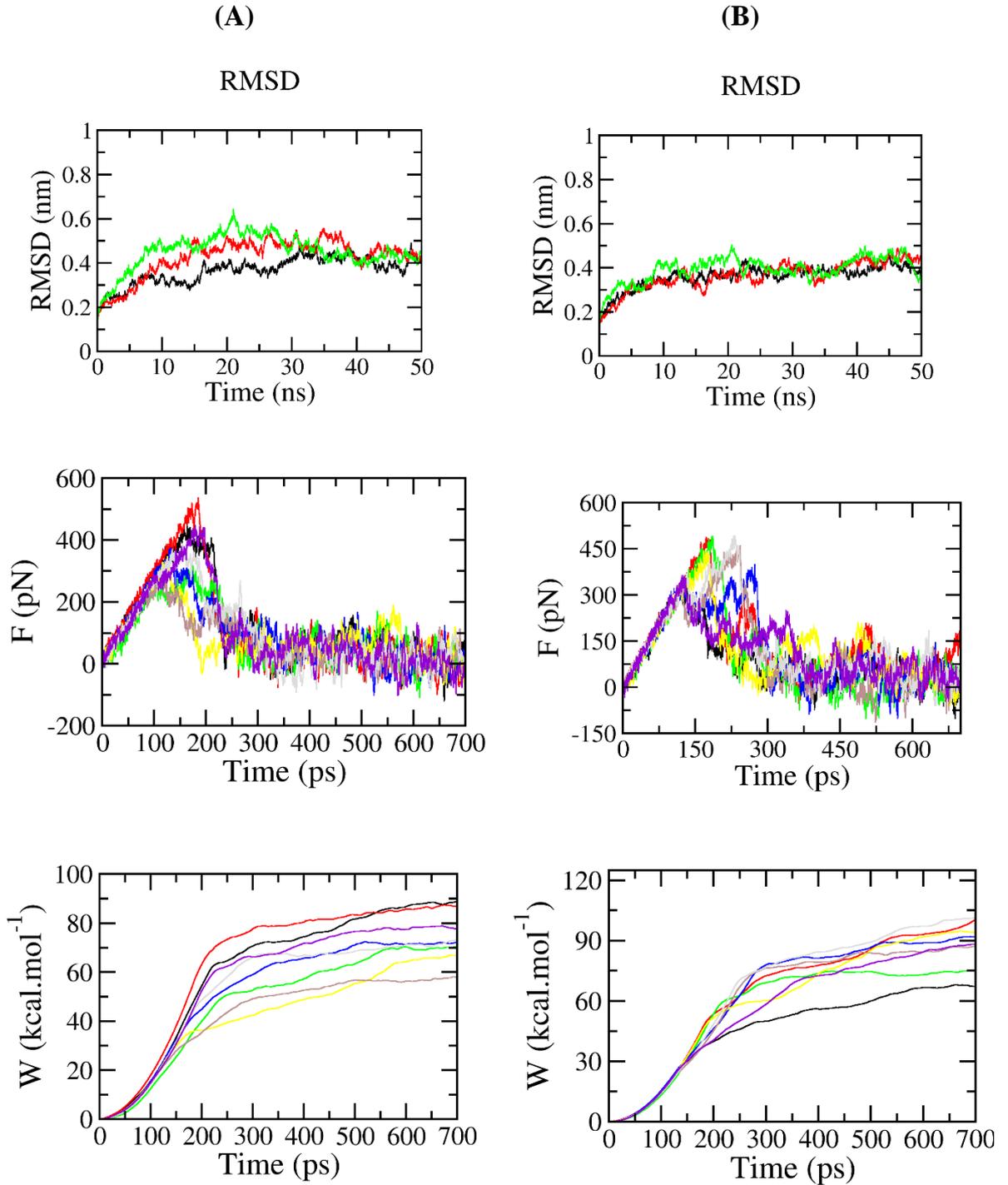
Bảng 3.10. Kết quả mô phỏng FPL đối với các chất ức chế thực nghiệm

STT	PubChem ID	F_{\max}	W
1	CID155186649	830.7803 ± 38.10	111.305 ± 6.24
2	CID145982399	899.9374 ± 62.37	121.852 ± 7.87
3	CID137637498	684.3194 ± 26.21	115.596 ± 7.13
4	CID127024915	806.9056 ± 54.49	99.5315 ± 4.99
5	CID72707984	671.9359 ± 85.97	77.0574 ± 8.87
6	CID31703	891.9894 ± 39.12	124.909 ± 6.09
7	CID134816158	502.6733 ± 45.32	73.8175 ± 8.88
8	CID189219	595.2246 ± 35.00	71.8135 ± 5.97
9	CID53361576	447.2614 ± 17.24	46.2999 ± 1.89
10	CID155510469	480.0836 ± 29.92	54.1262 ± 2.84

Kết quả thu được cho thấy, công kéo trung bình (W) đối với mười chất ức chế thực nghiệm dao động từ 46.3 ± 1.89 đến 121.85 ± 7.87 kcal/mol, trong khi lực kéo tương ứng thay đổi trong khoảng từ 447.26 ± 17.24 đến 899.94 ± 62.37 pN. Hệ số tương tác cao giữa công kéo với năng lượng liên kết tự do thực nghiệm $R_w = 0.67 \pm 12.05$ đã được ghi nhận (Hình 3.8), cho thấy mối tương tác trực tiếp giữa ái lực liên kết phối tử và công kéo cần thiết để phá vỡ liên kết phối tử - protein Topoisomerase II.



Hình 3.8. Hệ số tương tác cao giữa công kéo với năng lượng liên kết tự do thực nghiệm



Hình 3.9. Đồ thị biểu diễn giá trị RMSD, F_{max} , W của hai phức hệ nghiên cứu. *oleanolic acid* (A), *luteolin* (B)

Phân tích hồi quy tuyến tính cho phép thiết lập mối tương tác định lượng giữa năng lượng tự do liên kết (ΔG_{FPL}^{Pre}) và công kéo như sau:

$$\Delta G_{FPL}^{Pre} = -0.0000147 \times W - 6.8207 \quad (1)$$

Nhìn chung, kỹ thuật mô phỏng FPL đã chứng minh là một công cụ đáng tin cậy để dự đoán ái lực liên kết phối tử với Topoisomerase II với độ chính xác

cao. Phương pháp này tiếp tục được sử dụng để dự đoán năng lượng liên kết tự do của hai hợp chất nghiên cứu. Trong mô phỏng này, hai phức hệ được mô phỏng trong thời gian 50 ns. Kết quả thu được cho thấy các phức hệ đều đạt đến trạng thái cân bằng nhanh chóng trên tất cả các quỹ đạo sau 10ns (Hình 3.9).

Năng lượng liên kết tự do của hai hợp chất được dự đoán sử dụng công thức (1), kết quả tính toán được trình bày trong bảng 3.11.

Bảng 3.11. Kết quả mô phỏng FPL đối với oleanolic acid và luteolin

Tên hợp chất	ΔF_{Max}	W	$\Delta G_{\text{FPL}}^{\text{Pre}}$
Oleanolic acid	649.0368 ± 138.68	74.0910 ± 10.24	-6.82
Luteolin	718.0939 ± 103.13	88.1361 ± 11.76	-6.83

Từ số liệu bảng 3.11, có thể thấy năng lượng liên kết tự do của hai hợp chất sau khi được tinh chỉnh bởi mô phỏng động lực học phân tử kết hợp kỹ thuật kéo nhanh phối tử có giá trị lần lượt là oleanolic acid (-6.83 kcal/mol) và luteolin (-6.82 kcal/mol). Giá trị này cho thấy khả năng ái lực liên kết cao với Topoisomerase II từ đó thể hiện hoạt tính kháng u thông qua việc ức chế chức năng hoạt động của protein này. Kết quả mô phỏng này gợi ý tiềm năng ứng dụng của hai hợp chất trong các bước nghiên cứu phát triển thuốc chống ung thư tiếp theo nhằm mục tiêu ức chế Topoisomerase II.

KẾT LUẬN

Qua quá trình nghiên cứu về hóa thực vật, hoạt tính sinh học của loài Hoa mộc (*Osmanthus fragrans* (Thunb.) Lour.) ở Việt Nam, luận văn đã thu được các kết quả chính như sau:

Kết quả phân tích sắc kí khí ghép khối phổ GC-MS đã xác định được các thành phần chính trong tinh dầu Hoa mộc khi chưng cất bằng phương pháp lôi cuốn hơi nước có sự hỗ trợ của vi sóng như: Cinnamaldehyde <2-hexyl-(E)-> (22,74%); Dihydromyrcenol (21,60%); Linalool (18,58%); Geraniol (8,07%).

Từ cao chiết ethyl acetate đã phân lập và xác định cấu trúc hóa học 4 hợp chất, gồm 2 hợp chất flavonoid: luteolin (1) và quercitrin (4) và 2 hợp chất triterpenoid: oleanolic acid (2) và ursolic aldehyde (3).

Đã đánh giá tác dụng kháng khuẩn, kháng nấm và gây độc tế bào đối với dòng tế bào ung thư gan (HepG2) và phôi (A549) ở người *in vitro* của 4 hợp chất phân lập được. Kết quả cho biết hợp chất quercitrin (4) thể hiện hoạt tính ức chế tốt nhất đối với hai chủng *Staphylococcus aureus* và *Saccharomyces cerevisiae* với giá trị MIC 100 µg/ml. Hợp chất luteolin (1) thể hiện hoạt tính gây độc đối với dòng tế bào ung thư gan (HepG2) và phôi (A549) ở người tốt nhất với giá trị IC₅₀ lần lượt là 22,23 và 18,35 µM, sau đó là oleanolic acid (2) với giá trị IC₅₀ lần lượt là 33,56 và 21,87 µM.

Kết quả mô phỏng liên kết giữa oleanolic acid (2) và luteolin (1) với protein topoisomerase II cho biết, oleanolic acid (2) tạo 2 liên kết hydro với các axit amin Arg804, DC11 và luteolin (1) tạo 4 liên kết hydro với Gln773, Asn779, Glu854, DC4. Năng lượng liên kết tự do của hai hợp chất sau khi được tinh chỉnh bởi mô phỏng động lực học phân tử kết hợp kỹ thuật kéo nhanh phôi tử có giá trị lần lượt là oleanolic acid (-6.83 kcal/mol) và luteolin (-6.82 kcal/mol). Giá trị này cho thấy khả năng ái lực liên kết cao với Topoisomerase II từ đó thể hiện hoạt tính kháng u thông qua việc ức chế chức năng hoạt động của protein này. Kết quả mô phỏng này gợi ý tiềm năng ứng dụng của hai hợp chất trong các bước nghiên cứu phát triển thuốc chống ung thư tiếp theo nhằm mục tiêu ức chế Topoisomerase II.

KIẾN NGHỊ

1. Tiếp tục nghiên cứu phân lập các phân đoạn còn lại để bổ sung và hoàn thiện nghiên cứu về thành phần hóa học của loài Hoa mộc ở Việt Nam.

2. Tiếp tục nghiên cứu sâu hơn về hoạt tính kháng viêm và mở rộng thử nghiệm các hoạt tính sinh học khác để góp phần làm sáng tỏ kinh nghiệm sử dụng dân gian và tác dụng dược lý của loài này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Wang B, Luan F, Bao Y, Peng X, Rao Z, Tang Q, Zeng N, 2022, Traditional uses, phytochemical constituents and pharmacological properties of *Osmanthus fragrans*: A review, *J Ethnopharmacol*, 15(293), 115273.
2. Fu CC, Xu FY, Qian YC, Koo HL, Duan YF, Weng GM, Fan TP, Chen MX, Zhu FY, 2022, Secondary Metabolites of *Osmanthus fragrans*: Metabolism and Medicinal Value, *Front Pharmacol*, 13(18), 922204.
3. Nguyễn Tiến Bân (chủ biên), 2003, *Danh lục các loài thực vật Việt Nam. Tập II*, Nhà xuất bản Nông nghiệp, Hà Nội.
4. Võ Văn Chi, 1997, *Từ điển cây thuốc Việt Nam*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
5. Green PS, 2004, Oleaceae, trong: Kadereit JW (chủ biên), *The families and genera of vascular plants. Vol. 7: Flowering Plants. Dicotyledons: Lamiales*, Springer-Verlag, Berlin, Springer, 296–306.
6. Xiang QB, Liu YL, 2008, *An illustrated monograph of the sweet Osmanthus cultivars in China*, Zhejiang Science and Technology Press, Hangzhou.
7. Knoblauch E, 1985, Oleaceae, trong: Engler A, Prantl K (chủ biên), *Die Natürlichen Pflanzenfamilien. Vol. IV/2*, Wilhelm Engelmann, Leipzig, 1.
8. Pan YM, Liang Y, Wang HS, Liang M, 2004, Antioxidant activities of several Chinese medicine herbs, *Food Chem*, 88, 347–350.
9. Pan YM, Zhu ZR, Huang ZL, Wang HS, Liang Y, Wang K, Lei Q, Liang M, 2009, Characterisation and free radical scavenging activities of novel red pigment from *Osmanthus fragrans*' seeds, *Food Chem*, 112, 909–913.
10. Tang WZ, Cao JQ, Zhang XS, Zhao YQ, 2015, *Osmanthus fragrans* seeds, a source of secoiridoid glucosides and its antioxidizing and novel platelet-aggregation inhibiting function, *J Funct Foods*, 14, 337–344.
11. Zheng Y, Zhu LY, Ding N, Zhang HX, 2017, Extraction technology and component analysis of *Osmanthus fragrans* essential oil, *Jiangsu Agric Sci*, 45, 188–191.
12. Wu L, Lu BB, Xi H, Sun SH, Xu JY, Chai GB, Zhang XD, Zong YL, 2019, GC–MS analysis of aroma components of *Osmanthus fragrans* extract, *J Henan Univ Technol (Nat Sci Ed)*, 40, 78–85.
13. Sun BJ, 2011, *Study on aromatic constituents of some Osmanthus fragrans cultivars in China*, Luận văn thạc sĩ, Henan University.
14. Wang LM, 2009, *The Synthesis Regularity of Active Components and Pharmaceutical Research of Osmanthus Fragrans Lour.*, Luận án tiến sĩ, Huazhong University of Science and Technology.

15. Zhang J, 2006, *Study of extraction and analysis of Osmanthus Fragrans Lour. essential oil*, Luận văn thạc sĩ, Zhejiang University of Technology.
16. Liu DY, Min Q, 2017, Review on active components and pharmacological effects of *Osmanthus fragrans* fruit, *J Hubei Univ Sci Technol*, 31, 361–364.
17. Zhou J, Fang X, Wang J, Zhao L, Li Y, Tang F, 2018, Structures and bioactivities of seven flavonoids from *Osmanthus fragrans* ‘Jinqiu’ essential oil extraction residues, *Nat Prod Res*, 32, 558–591.
18. Yin W, Yu Y, Ma QL, Chen T, Zhang GS, 2018, Study on chemical constituents and antitumor activities of leaves of *Osmanthus fragrans*, *J Trop Subtropical Bot*, 26, 178–184.
19. Chen Y, Wang Y, Liu M, Zhou B, Yang G, 2020, Diosmetin exhibits anti-proliferative and anti-inflammatory effects on TNF- α -stimulated human rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes through regulating the Akt and NF- κ B signaling pathways, *Phytother Res*, 34, 1310–1319.
20. Dong L, Hao C, Zhang X, Wang H, 2020, Research progress of dihydroquercetin, *Adv Biotechnol*, 10, 226–233.
21. Wang N, Shi Y, Yao T, Wei Z, Guo X, 2011, Component analysis of sweet-scented osmanthus extract membrane separation products and its application in cigarettes, *Fragr Cosmet*, 39, 22–26.
22. Xue C, Hongxin F, Zhongguang Z, Shuming H, 2017, Research progress on pharmacological effects of dihydroquercetin, *Chin Med J*, 45, 90–92.
23. Lin C, Dawei C, Jungui D, 2022, Research progress in synthetic biology of flavonoids, *J Pharm*, 57, 1322–1335.
24. Wang Q, Haixue K, Lun W, Yang L, Zhibin W, 2011, Protective effect of dihydroquercetin on isoproterenol-induced myocardial ischemia in rats, *Chin J Exp Formulas*, 17, 177–180.
25. Qiao Y, Wei Z, Linxiong D, Xi Xia Z, Fei H, 2020, Renal protective effect of dihydroquercetin on diabetic nephropathy rats and the effect of mTORC2/Akt signaling pathway, *Chin J Nephrol Integr Traditional Chin West Med*, 21, 581–584+660.
26. Wei S, Yumin Z, Tao M, Jun W, 2021, Based on the network pharmacology method to analyze the mechanism and experimental verification of astilbin in the intervention of osteoarthritis, *Drug Eval Stud*, 44, 728–735.
27. Xu Y, 2020, *The Role and Mechanism of Astilbin Up-Regulating Breg Cells in Inflammatory Bowel Disease*, Luận án tiến sĩ, Yangzhou University, Jiangsu.

28. Yu L, 2020, *The Protective Effect of Astilbin on Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury and its Mechanism*, Luận án tiến sĩ, Soochow University, Jiangsu.
29. Tang W, Zhao Y, 2014, Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of Oleracea, *Chin Herb Med*, 45, 590–602.
30. Song X, Xiaolin L, Anyon K, Caixia Y, Dexian Z, et al., 2015, Research progress on antibacterial and anti-resistance effects of luteolin, *Chin Poult*, 37, 44–46.
31. Fu L, Shaokang W, Guiju S, 2019, Research Progress on the Activity and Function of Luteolin, vol. 434, doi 10.26914/c.cnkihy.2019.010680.
32. Yue H, 2019, *Screening of Anti-gout Flavonoids and Study on Intestinal Absorption of Luteolin*, Luận án tiến sĩ, Jilin Agricultural University.
33. Yang D, 2018, *Interventional Effect of Luteolin on Inorganic Mercury-Induced Acute Liver Injury in Mice*, Luận án tiến sĩ, Northeast Agricultural University, Heilongjiang.
34. Lin C, Dawei C, Jungui D, 2022, Research progress in synthetic biology of flavonoids, *J Pharm*, 57, 1322–1335.
35. Zeng M, Yan W, Wolf L, Peaked H, Chaoke T, 2016, Research progress of naringenin and metabolic syndrome, *Chin J Arteriosclerosis*, 24, 1055–1058.
36. Jing T, Ruolan T, Zhongjian L, Bin T, Jianmin G, 2019, Research progress on extraction of naringenin and its anticancer effect, *Green Technol*, 10, 240–244.
37. Qi Q, Zhong-hua H, Hong-dan X, Huai-yu X, Hui-feng S, Ning Z, et al., 2020, Effects of naringenin on oxidative stress and Tau protein phosphorylation in A β 25–35-injured PC12 cells, *Chin J Exp Formulas*, 26, 92–99.
38. Wang Z, Wang J, 2021, Mechanism prediction and pharmacological research progress of naringenin in the treatment of coronary heart disease, *Tradit Chin Med Inf*, 38, 77–81.
39. Zeng W, Fayun Z, Gangjun D, Lingtao J, Lei Q, Wenjuan D, et al., 2018, Naringenin: A New Generation of Immunomodulators, *Adv Biochem Biophysics*, 45, 915–925.
40. Wu C, Xianying F, Wei X, 2017, Research progress on non-volatile components and pharmacological activities of *Osmanthus fragrans*, *Nat Prod Res Dev*, 29, 1439–1448.

41. Kang WY, Song YL, Gu XZ, 2012, α -Glucosidase inhibitory in vitro and antidiabetic activity in vivo of *Osmanthus fragrans*, *J Med Plants Res*, 6, 2850–2856.
42. Jeong DE, Shim SY, Lee M, 2020, Anti-inflammatory activity of phenylpropyl triterpenoids from *Osmanthus fragrans* var. *aurantiacus* leaves, *Int Immunopharm*, 86, 106576.
43. Park E, Kim J, Yeo S, Kim G, Ko EH, Lee SW, et al., 2018, Antiadipogenic Effects of Loganic Acid in 3T3-L1 Preadipocytes and Ovariectomized Mice, *Molecules*, 23, 1663.
44. Park E, Lee CG, Lim E, Hwang S, Yun SH, Kim J, et al., 2020, Osteoprotective Effects of Loganic Acid on Osteoblastic and Osteoclastic Cells and Osteoporosis-Induced Mice, *Int J Mol Sci*, 22, 233.
45. Lv C, 2021, *Process Optimization and Biological Activity Study of Sweet-Scented Osmanthus Extract*, Luận văn thạc sĩ, Shanghai University of Applied Sciences.
46. Araújo M, Prada J, Mariz-Ponte N, Santos C, Pereira JA, Pinto DCGA, et al., 2021, Antioxidant Adjustments of Olive Trees (*Olea Europaea*) under Field Stress Conditions, *Plants*, 10, 684.
47. Shen X, Hongmei Z, Lei Z, Weiwei J, 2019, Research progress of oleanolic acid, *Guangzhou Chem*, 47, 16–19.
48. Li G, Kaifeng Z, Shaogang Q, Lei C, Caixia Y, Yongqi G, 2020, Effects of maslinic acid on H₂O₂-induced oxidative damage and p38 and Nrf2/HO-1 pathways in BRL-3A cells, *Chin J Cell Biol*, 42, 453–460.
49. Zhang Y, Yanna S, Ge W, Huafang W, Ying Y, 2021, To investigate the effect of oleanolic acid on apoptosis of esophageal cancer cells based on the regulation of JNK signaling pathway, *Adv Mod Biomed*, 21, 2226–2229.
50. Yang D, Guang X, Yan Z, Wanchao Z, Luochuan Z, Caifu D, 2021, Research progress on main chemical constituents and biological activities of *Osmanthus fragrans*, *China's Wild Plant Resour*, 40, 47–52.
51. Xuan L, Yingchun H, Fangliang Z, 2021, Research progress on pharmacological effects and mechanisms of maslinic acid, *Chin J Mod Med*, 31, 49–53.
52. Zhou QX, Yue SM, 2013, Analysis of the research status of *Osmanthus fragrans* Lour. in chemical constituents and pharmacological actions based on literature, *J Henan Univ*, 32, 139–142.
53. Li GH, Wang MM, He W, Liu J, Zhang D, Liu JQ, Tang WZ, 2018, Iridoid glycoside extraction technology and anti-thrombotic activity of *Osmanthus fragrans* seeds, *Chin Tradit Herb Drugs*, 49, 3033–3041.

54. Lee DG, Choi JS, Yeon SW, Cui EJ, Park HJ, Yoo JS, Chung IS, Baek NI, 2010, Secoiridoid glycoside from the flowers of *Osmanthus fragrans* var. *aurantiacus* Makino inhibited the activity of β -secretase, *J Korean Soc Appl Biol Chem*, 53, 371–374.
55. García-Villalba R, Tomás-Barberán F, Faça-Berthon P, Roller M, Zafrilla P, Issaly N, et al., 2015, Targeted and Untargeted Metabolomics to Explore the Bioavailability of the Secoiridoids from a Seed/Fruit Extract (*Fraxinus angustifolia* Vahl) in Human Healthy Volunteers: A Preliminary Study, *Molecules*, 20, 22202–22219.
56. Shi X, Weiwei C, Bao H, Zhongjie L, Liying Y, 2020, Extraction and separation of effective substances from radish and its effect on cell proliferation activity, *Strait Pharm*, 32, 27–29.
57. He Z, Baoli X, Lan Y, Xiaobo W, 2017, Star Point Design-Effect Surface Method to Optimize the Extraction Process of Soul Resurrection, *Chin J Pharm*, 33, 413–417.
58. Hu K, Meiju J, Dongdong W, Yuxuan X, Shuqi J, Jie R, 2020, Synthesis of Antiparkinsonian Psychotic Drug Pimaserin, *Synth Chem*, 28, 330–335.
59. Bai X, 2016, Study on the Chemical Constituents of Chinese Medicine Forsythia, *Heilongjiang Med*, 29, 601–602.
60. Peng D, Juan G, Xiumei G, Jinlan W, Shujun Z, 2014, Study on the chemical constituents of Mongolian dandelion root, *Propr Chin Med*, 36, 1462–1466.
61. Zhou L, Zhijin H, Ruxin Z, Jinchao W, Yu H, Na S, et al., 2021, Protective effect of rosmarinic acid on PM_{2.5}-induced oxidative stress in allergic rhinitis, *Chin J Ophthalmol Otolaryngology*, 21, 276–281.
62. Ke L, Min HC, 2019, Research progress on biological effects of rosmarinic acid, *Int J Laboratory Med*, 40, 1032–1036.
63. Wang Y, Liping K, Liyu C, Qing T, 2014, Study on the chemical constituents of red-backed osmanthus, *Nat Prod Res Dev*, 26, 47–49.
64. Dayal S, Kalra KD, Sahu P, 2020, Comparative study of efficacy and safety of 45% mandelic acid versus 30% salicylic acid peels in mild-to-moderate acne vulgaris, *J Cosmet Dermatol*, 19, 393–399.
65. Cockayne S, Hewitt C, Hicks K, Jayakody S, Kang'ombe AR, Stamuli E, et al., 2011, Cryotherapy versus salicylic acid for the treatment of plantar warts (verrucae): a randomised controlled trial, *BMJ*, 342, d3271.
66. Ting JT, Jianfang L, Xiaodong L, 2021, Research progress on extraction method and application of salicylic acid, *Tianjin Chem*, 35, 7–9.

67. Xue A, Meng C, Huajie Z, Luo L, 2018, Analysis of *Osmanthus fragrans* polyphenols by electrospray extraction and ionization mass spectrometry, *Food Sci*, 39, 221–226.
68. Zhang C, Lili G, Rank K, 2013, Pharmacological research progress of protocatechualdehyde, *Chin J Exp Formulas*, 19, 338–342.
69. Jin F, Yaling X, Qingting M, Hanwen Y, Fangyan H, 2021, Protective effect of protocatechualdehyde on neurovascular unit homeostasis disruption after cerebral ischemia-reperfusion injury in rats, *China Pharm*, 32, 1811–1817.
70. Ding LX, Zhang Y, Zong XM, Yu DC, 2010, ESR studies on the scavenging effect on oxygen free radicals in different extracts from *Osmanthus fragrans*, *Chin J Mod Appl Pharm*, 27, 10–13.
71. Pan YM, Zhu ZR, Huang ZL, Wang HS, Liang Y, Wang K, Lei Q, Liang M, 2009, Characterisation and free radical scavenging activities of novel red pigment from *O. fragrans*' seeds, *Food Chem*, 112, 909–913.
72. Shi YJ, 2013, *Study on α -glucosidase activity and pharmacokinetic factors of the Osmanthus active components in Vitro*, Luận văn thạc sĩ, Henan University.
73. Tsai PJ, Tsai TH, Yu CH, Ho SC, 2007, Comparison of NO-scavenging and NO suppressing activities of different herbal teas with those of green tea, *Food Chem*, 103, 181–187.
74. Lee DG, Lee SM, Bang MH, Park HJ, Lee TH, Kim YH, Kim JY, Baek NI, 2011, Lignans from the flowers of *Osmanthus fragrans* var. *aurantiacus* and their inhibition effect on NO production, *Arch Pharm Res (Seoul)*, 34, 2029–2035.
75. Wang LM, Yu LJ, Cui YM, Xiang J, 2008, Flavonoids from *Osmanthus fragrans* extraction and bacteriatic activities, *Nat Prod Res Dev*, 20, 717–720.
76. Chen G, Shi J, 2017, Extraction of yellow pigment from *Osmanthus fragrans* by microwave pretreatment and their antibacterial activity, *Food Res Dev*, 38(21), 15–19.
77. He DN, Jiang ZJ, Zhang WH, Chen XH, Chen MF, 2008, Study on chemical constituents and biological activity of volatile oil from leaves of *Osmanthus fragrans* Lour., *J Jiangsu For Sci Technol*, 35, 1–3.
78. Huang B, 2016, *The effect of Osmanthus fragrans ethanol extract on porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide-stimulated periodontal inflammation*, Luận án tiến sĩ, Southern Medical University.
79. Yu W, MacKerell AD, 2017, in: *Antibiotics*, Springer, 85–106.

80. Marshall GR, 1987, *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 27, 193–213.
81. Nitiss JL, 2009, DNA topoisomerase II and its growing repertoire of biological functions, *Nat Rev Cancer*, 9(5), 327–337.
82. Pogorelčnik B, Perdih A, Solmajer T, 2013, Recent Developments of DNA Poisons – Human DNA Topoisomerase II α Inhibitors – as Anticancer Agents, *Curr Pharm Des*, 19, 2013.
83. Wendorff TJ, Schmidt BH, Heslop P, Austin CA, Berger JM, 2012, The structure of DNA-bound human topoisomerase II alpha: conformational mechanisms for coordinating inter-subunit interactions with DNA cleavage, *J Mol Biol*, 424(3–4), 109–124.
84. Grue P, et al., 1998, Essential mitotic functions of DNA topoisomerase II α are not adopted by topoisomerase II β in human H69 cells, *J Biol Chem*, 273(50), 33660–33666.
85. HGN Committee, 2007, TOP2A DNA topoisomerase II alpha [Homo sapiens (human)] [Online]. Available: NCBI Gene.
86. McClendon AK, Osheroff N, 2007, DNA topoisomerase II, genotoxicity, and cancer, *Mutat Res*, 623(1–2), 83–97.
87. Schmidt BH, Osheroff N, Berger JM, 2012, Structure of a topoisomerase II–DNA–nucleotide complex reveal a new control mechanism for ATPase activity, *Nat Struct Mol Biol*, 19(11), 1147–1154.
88. Deweese JE, Osheroff N, 2009, The DNA cleavage reaction of topoisomerase II: a wolf in sheep’s clothing, *Nucleic Acids Res*, 37(3), 738–748.
89. Sissi C, Palumbo M, 2009, Effects of magnesium and related divalent metal ions in topoisomerase structure and function, *Nucleic Acids Res*, 37, 702–711.
90. Van NTH, Tuyen TT, Nghi DH, Quan PM, Bach PC, Hiep DH, Lam DT, Minh PTH, 2023, New benzophenanthridine alkaloid from stem bark of *Zanthoxylum rhetsa* and its biological activities, *Natural Product Research*, 39(9), 2375–2387.
91. Wawer I, Zielińska A, 2001, ¹³C CP/MAS NMR studies of flavonoids, *Magn Reson Chem*, 39(6), 411–414.
92. Palu D, Bighelli A, Casanova J, Paoli M, 2019, Identification and quantitation of ursolic and oleanolic acids in *Ilex aquifolium* L. leaf extracts using ¹³C and ¹H-NMR spectroscopy, *Molecules*, 24(23), 4413.
93. Hoàng Thị Hương Hương, 2018, *Phân lập và xác định cấu trúc hợp chất triterpenoid từ cây kim ngân (Lonicera japonica) họ Com chấy (Caprifoliaceae)*, Thư viện điện tử Đại học Hùng Vương.