

CÔ LẬP VÀ XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG β -ECDYSONE TỪ LÁ CÂY THÔNG ĐỎ LÁ DÀI (*Taxus wallichiana*) TRỒNG TẠI THÀNH PHỐ ĐÀ LẠT, TỈNH LÂM ĐỒNG

Nguyễn Văn Trí¹, Bùi Thế Vinh¹, Lâm Bích Thảo¹, Cao Ngọc Giang¹ và Trần Ngọc Hùng^{2*}

¹Trung tâm Sâm và Dược liệu Thành phố Hồ Chí Minh

²Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Thủ Dầu Một

*Người chịu trách nhiệm bài viết: Trần Ngọc Hùng (email: hungngoc@tdmu.edu.vn)

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 05/06/2019

Ngày nhận bài sửa: 14/08/2019

Ngày duyệt đăng: 30/10/2019

Title:

Purification and quantitative analysis of β -ecdysone from the leaf of yew (*Taxus wallichiana*) cultivated in Da Lat city, Lam Dong province

Từ khóa:

Định lượng β -ecdysone, thông đỏ lá dài, tinh sạch β -ecdysone

Keywords:

Purify β -ecdysone, quantitative analysis β -ecdysone, yew

ABSTRACT

Besides being the source of anticancer compounds, the yew (*Taxus wallichiana*) is also rich in other various potential secondary metabolites which have been applied in agriculture and aquaculture. Among of them, β -ecdysone, a hormone in moulting induction in insects and crustaceans. By using chromatography, 1D and 2D nuclear magnetic resonance (NMR) spectral analysis and comparison with standard β -ecdysone compound, β -ecdysone was isolated from the yew leaves, growing in Da Lat city, Lam Dong province. After extracted by segmental shaking with ethyl acetate and analysed by high performance liquid chromatography (HPLC), the β -ecdysone concentration was determined by 55 mg/kg of dried leaves.

TÓM TẮT

Ngoài các hoạt chất chống ung thư, cây thông đỏ lá dài (*Taxus wallichiana*) còn chứa nhiều chất có giá trị ứng dụng trong nông nghiệp và nuôi trồng thủy sản, điển hình là hợp chất β -ecdysone có tác dụng kích thích lột xác ở côn trùng và giáp xác. Bằng các phương pháp sắc ký, phân tích phổ cộng hưởng từ hạt nhân NMR một chiều và hai chiều, so sánh với chất chuẩn, nghiên cứu đã phân lập được hợp chất β -ecdysone từ lá cây thông đỏ lá dài trồng tại khu vực thành phố Đà Lạt, tỉnh Lâm Đồng. Tách chiết theo phương pháp lắc phân đoạn với ethyl acetate và định lượng bằng quy trình sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC, nghiên cứu đã xác định được hàm lượng β -ecdysone trong lá cây thông đỏ lá dài đạt 55 mg/kg khô.

Trích dẫn: Nguyễn Văn Trí, Bùi Thế Vinh, Lâm Bích Thảo, Cao Ngọc Giang và Trần Ngọc Hùng, 2019. Cô lập và xác định hàm lượng β -ecdysone từ lá cây thông đỏ lá dài (*Taxus wallichiana*) trồng tại thành phố Đà Lạt, tỉnh Lâm Đồng. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 55(5A): 12-17.

1 GIỚI THIỆU

Cây thông đỏ lá dài thuộc họ Thanh Tùng, là loài cây bản địa vùng Himalaya, phân bố từ Đông Afghanistan đến phía Tây tỉnh Vân Nam, Trung Quốc, ở độ cao 2000 – 3000 m. Tại Việt Nam, thông

đỏ lá dài được xếp vào danh mục thực vật rừng nguy cấp và quý hiếm. Các quần thể thông đỏ lá dài mọc tự nhiên hiện nay còn rất ít. Các nhà khoa học mới chỉ phát hiện được 2 quần thể, 162 cây tại tỉnh Đắk Lắk và 410 cây tại khu vực núi Voi, tỉnh Lâm Đồng. Hiện nay, một số khu vực có độ cao khoảng 1500 tại

ting Lâm Đồng cũng đã xây dựng vùng trồng thông đờ lá dài từ nguồn cây nuôi cấy mô (Vương Chí Hùng và Nguyễn Hoàng Nghĩa, 2011).

Rất nhiều hoạt chất có giá trị dược tính đã được phát hiện trong cây thông đờ lá dài như tinh dầu, diterpenoid, lignin, steroid, sterol và biflavonoid. Trên thế giới, thông đờ lá dài là nguồn nguyên liệu tách chiết taxol, một hoạt chất điều trị bệnh ung thư rất hiệu quả. Bên cạnh đó, trong lá thông đờ lá dài còn chứa một lượng lớn β -ecdysone (20-hydroxyecdysone), một chất có tác dụng tương tự với hormone gây lột xác ở côn trùng và giáp xác. Trên cây thông đờ lá dài, chất này tồn tại như một cơ chế tự vệ, giúp cây chống lại các loài côn trùng gây hại. Nghiên cứu về hợp chất này trên cây thông đờ lá dài vẫn chưa được nhiều (Lafont, 2009; Gupta, 2015). Năm 2011, Zia đã ghi nhận về sự hiện diện của 20-hydroxyecdysone (20-HE) trong cây *Taxus wallichiana* Zucc. Ở Việt Nam, các nghiên cứu về ecdysteroid chỉ mang tính chất thăm dò và phát hiện, nghiên cứu ứng dụng phục vụ đời sống con người chưa nhiều. Điển hình có thể kể đến một số tác giả đã nghiên cứu tách chiết ecdysteroid trên những đối tượng như nhộng tằm, lá dâu tằm và phân tằm (Nguyễn Thị Thanh Bình và ctv., 1998; Nguyễn Thị Thanh Bình và ctv., 1999; Lê Văn Đắc, 2018); tách chiết từ cây Bình linh cong mảnh (Trịnh Thị Thủy và ctv., 2000) hoặc từ cây lược vàng (Nguyễn Thị Minh Hằng, 2017). Năm 2017, nhóm nghiên cứu của Trịnh Thị Thủy đã phân lập được 20-HE từ vỏ cây thông nang (*Dacrycarpus imbricatus* (Blume) de Laub.), chất này cho thấy có khả năng giảm sự tăng sinh các dòng tế bào bạch cầu cấp tính (AML) trên người (Trinh et al., 2017). Ecdysteroid, đặc biệt là hoạt chất β -ecdysone, trên cây thông đờ đến nay vẫn chưa có báo cáo nào được công bố. Nghiên cứu này sử dụng kết hợp các phương pháp sắc ký để cô lập β -ecdysone từ lá cây thông đờ và xác định hàm lượng hoạt chất này bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC).

2 THỰC NGHIỆM

2.1 Nguyên liệu

Nguyên liệu sử dụng để nghiên cứu là lá thông đờ lá dài trồng ở thành phố Đà Lạt, tỉnh Lâm Đồng, do trung tâm trồng và chế biến cây thuốc Đà Lạt cung cấp. Chất chuẩn β -ecdysone (20-hydroxyecdysone) do công ty Sigma Aldrich cung cấp, độ tinh khiết 99,5%.

2.2 Phương pháp tiến hành

Chiết tách, tinh sạch β -ecdysone từ cao tổng

Sắc ký phân bố - cột diaion

Hai lít hạt diaion được sử dụng để nạp vào bình, sử dụng nước cất rửa qua hai lần, xả hết nước. Hai trăm mL cao tổng thông đờ lá dài được bổ sung thêm 200 mL methanol hòa tan hoàn toàn, cho vào bình chứa diaion ngâm trong 48 giờ cho hạt hấp phụ mẫu, sau đó xả hết mẫu còn lại trong cột; tiến hành sắc ký lần lượt bằng H₂O : ethanol với các nồng độ ethanol tăng dần (0; 20%; 40% và 60%); ở mỗi phân đoạn hứng đến khi nhạt màu. Các phân đoạn được chấm trên sắc ký lớp mỏng (SKLM) với chất chuẩn để tìm phân đoạn chứa ecdysone. Thuốc thử hiện hình vết là H₂SO₄ 10% trong cồn, sấy ở 105°C 5 phút và soi dưới UV 366 nm.

Lắc phân bố thu phân đoạn

Phân đoạn chứa ecdysone từ cột A được cô quay chân không đến hết ethanol. Dịch nước thu được lắc phân bố với ethyl acetate tỉ lệ 1/1, mỗi lần lắc 200 mL, thu phần ethyl acetate; thêm vào phần dịch ethyl acetate một lượng Na₂SO₄ (tỉ lệ 2 g Na₂SO₄/500 mL dịch) ngâm trong 30 phút; lọc lấy phần dịch mang cô quay chân không tới cạn; tiến hành lắc qua một lần phân đoạn chứa ecdysone; gom tất cả cặn lại ghi nhận khối lượng và mang đi phân tách bằng sắc ký hấp phụ.

Sắc ký hấp phụ cột silica gel

Phần cặn được hòa tan với một lượng tối thiểu methanol; bổ sung thêm một lượng silica gel có khối lượng bằng với khối lượng cặn, trộn đều đến khô hoàn toàn; cân một lượng silica gel gấp 45 lần khối lượng mẫu, hòa thành hỗn dịch với dung môi dichloromethane (DCM) với tỷ lệ 1:1 rồi nạp vào cột; để cột ổn định trong 48 giờ rồi nạp mẫu và tiến hành sắc ký với hệ pha động là DCM:MeOH (tỉ lệ lần lượt là 100:0; 95:5; 90:10 và 85:15); hứng thu phân đoạn các dịch lần lượt ra khỏi cột; thể tích hứng mỗi phân đoạn là 100 mL; chấm sắc ký lớp mỏng (SKLM) các phân đoạn với ecdysone chuẩn; thuốc thử hiện hình vết là H₂SO₄ 10% trong cồn và soi dưới UV 366 nm; gộp các lọ có kết quả sắc ký đồ giống nhau. Quá trình sắc ký dừng lại khi đã thu được tất cả ecdysone trong cột.

Định lượng β -ecdysone trong lá cây thông đờ lá dài

Lá cây thông đờ lá dài được phơi khô, xay thành bột rồi ngâm chiết đến kiệt (đánh giá dịch chiết bằng sắc ký lớp mỏng đến khi vết chất rất mờ) chất chiết bằng methanol (MeOH). Cao methanol tiếp tục được hòa nước, lắc với dichloromethane (DCM), phân đoạn nước được tiếp tục lắc với ethyl acetate (EtOAc), cô dịch EtOAc đến cạn, dùng làm mẫu cao nghiên cứu xác định hàm lượng β -ecdysone; cân một lượng chính xác cặn EtOAc, pha loãng một lượng chính xác với MeOH; lọc qua màng 0,22 μ m

tiến hành phân tích theo phương pháp đã được xây dựng với ba lần lặp lại, xác định nồng độ β -ecdysone dựa vào phương trình đường chuẩn đã được xây dựng. Hàm lượng β -ecdysone có trong cao tổng được xác định theo tỷ lệ % giữa khối lượng β -ecdysone xác định từ mẫu thử với khối lượng khô của nguyên liệu từ cây thông đỏ lá dài. Quy trình định lượng β -ecdysone trong cao thông đỏ lá dài bằng phương pháp HPLC được thực hiện trong điều kiện: pha động là MeOH:H₂O với tỷ lệ thể tích 40:60, lọc qua màng 0,22 μ m; pha tĩnh: cột HiQ sil C18HS (Size: 4,6 mm x 250 mm); detector UV-Vis PDA, bước sóng: 244 nm; nhiệt độ cột: 40°C; tốc độ dòng: 0,5 mL/ phút; thời gian phân tích: 60 phút; thể tích bơm: 20 μ L.

Xây dựng đường chuẩn

Pha một loạt các dung dịch chất chuẩn β -ecdysone có nồng độ khác nhau rồi tiến hành sắc ký để thu nhận được các đỉnh chất chuẩn tương ứng. Xây dựng đường chuẩn hồi quy tuyến tính biểu hiện sự biến thiên của nồng độ theo chiều cao hay diện tích đỉnh. Tiến hành sắc ký mẫu thử và xác định chiều cao hay diện tích đỉnh. Dựa vào đường chuẩn, xác định nồng độ mẫu thử dựa vào chiều cao hay diện tích đỉnh.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

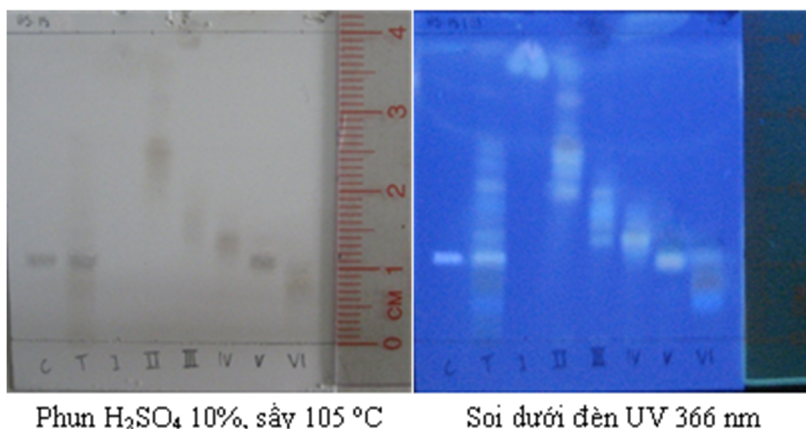
3.1 Chiết tách, tinh sạch β -ecdysone từ cao tổng

Kết quả chạy cột sắc ký phân bố cho 3 phân đoạn

20%; 40% và 60% lần lượt là 4 lít, 5,2 lít và 2 lít. Trong đó, chỉ có phân đoạn 40% ethanol có vết trùng với ecdysone chuẩn. Phân đoạn này được lắc phân bố với ethyl acetate. Khối lượng cao sau khi cô quay là 10,48 g.

Cao được hòa tan trong methanol rồi chạy sắc ký hấp phụ - cột silica gel (cột B) bằng hệ pha động là DCM: MeOH, tỉ lệ lần lượt là 100:0; 95:5; 90:10 và 85:15. Tổng số thu được 80 bình hứng. Các bình hứng sau khi châm SKLM với chất chuẩn là β -ecdysone được chia thành 7 phân đoạn chính. Trong đó phân đoạn VI (từ bình 41 đến 68, khối lượng 0,3953 g) có vạch trùng với vạch ecdysone chuẩn (Hình 1). Tuy nhiên, ở phân đoạn vẫn còn nhiều vết tạp khác nên cần phải chạy tiếp cột thứ hai (cột B1) với hệ pha động là DCM:MeOH, tỉ lệ 85:15 để loại tạp. Tổng số hứng được 18 lọ, mỗi lọ 25 ml. Kết quả SKLM cho thấy phân đoạn V (lọ 8 – 13, khối lượng 0,01 g) là β -ecdysone. Chất có kết tinh dạng tinh thể màu trắng. Khối lượng ecdysone ở phân đoạn V là 10 mg. Cấu trúc chất được xác định bằng các dữ liệu phổ NMR và HMBC.

Chất phân đoạn V thu được ở dạng tinh thể màu trắng, tan trong dung môi MeOH. Sắc ký lớp mỏng với hệ dung môi DCM:MeOH (85:15) thu được giá trị $R_f = 0,35$, hiện màu bằng dung dịch acid H₂SO₄ 10% trong cồn cho vết màu xám đen, phát quang dưới tia UV 366 nm. Hợp chất phân đoạn V được phân tích các dữ liệu phổ để chứng minh đó là β -ecdysone.



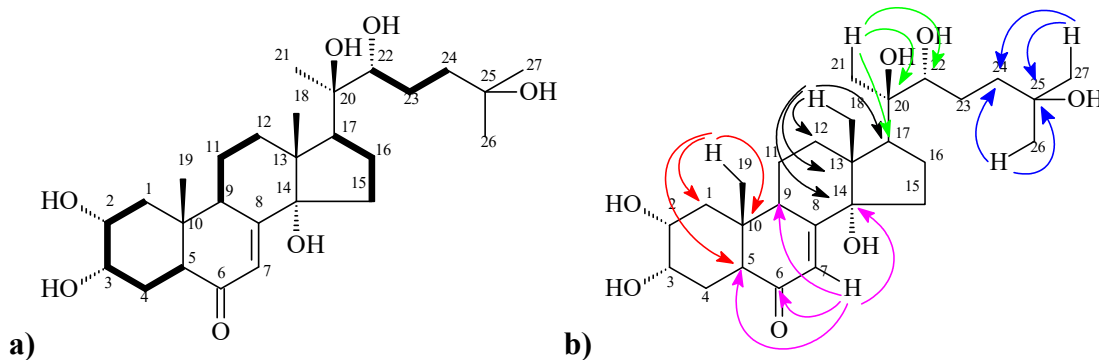
Hình 1: SKLM phân đoạn của cột B1. Hệ dung môi DCM: MeOH (85:15)

Bảng 1: Phổ của hợp chất phân đoạn V cột B2 trong C₅D₅N

C	Phổ ¹ H-NMR (500MHz) và ¹³ C-NMR (125MHz)		Tương quan trên phổ HMBC	
	δ _H (ppm)	δ _C (ppm)	J	
1	1,90 (1H, m)	38,4	C-2, C-3, C-5, C-9, C-10, C-19	
	2,17 (1H, m)			
2	4,27 (1H, m)	68,6	C-1, C-10	
3	4,26 (1H, s)	68,6		
4	1,82 (1H, m)	32,9	C-2, C-3, C-10	
	2,05 (1H, m)			
5	3,03 (1H, m)	51,9	C-4, C-6, C-7, C-10, C-19	
6		204,2		
7	6,28 (1H, s)	122,1	C-5, C-6, C-9, C-14	
8		166,7		
9	3,60 (1H, m)	34,9	C-1, C-7, C-8, C-10, C-11	
10		39,1		
11	1,76 (1H, m)	21,6	C-9, C-10	
	1,91 (1H, m)			
12	2,60 (1H, dt, J ¹ =13, J ² =5)	32,5	C-9, C-11, C-13, C-14, C-18	
	1,96 (1H, m)			
13		48,6	48,6	
14		84,7	84,7	
15	2,16 (1H, m)	32,2	C-8, C-14, C-16, C-17	
	1,90 (1H, m)			
16	2,47 (1H, m)	21,9	C-13, C-14, C-15, C-17, C-20	
	2,05 (1H, m)			
17	3,03 (1H, m)	50,6	C-13, C-15, C-16, C-18, C-20, C-21, C-22	
18	1,23 (3H, s)	18,4	C-12, C-13, C-14, C-17	
19	1,09 (3H, s)	24,9	C-1, C-5, C-10	
20		77,4	77,4	
21	1,63 (3H, s)	22,1	C-17, C-20, C-22	
22	3,91 (1H, d, J=10)	78,1	C-20, C-21, C-24	
23	1,87 (1H, m)	27,9	C-24, C-25	
	2,17 (1H, m)			
24	2,31 (1H, m)	43,1	C-23, C-26, C-27	
	1,83 (1H, m)			
25		70,1	70,1	
26	1,40 (3H, s)	30,5	C-24, C-25	
27	1,40 (3H, s)	30,6	C-24, C-25	

Dữ liệu phổ ¹H-NMR (Bảng 1) của phân đoạn V cho thấy các mũi cộng hưởng tương ứng với sự hiện diện của năm nhóm -CH₃ liên kết với carbon tứ cấp ở vùng trường cao tại 1,63 ppm (CH₃ - 21, s); 1,40 ppm (CH₃ - 26 và CH₃ - 27, s); 1,24 ppm (CH₃ - 18, s) và 1,09 ppm (CH₃ - 19, s), 3,03 ppm (H - 5 và H - 17, m). Ba proton trên ba carbon liên kết với oxy có tín hiệu ở 4,26 ppm (H-3, s); 4,27 ppm (H-2, m,) và 3,91 ppm (H-22, d, J=10). Ở vùng trường thấp cũng cho thấy tín hiệu của proton olefin cộng hưởng tại 6,28 ppm (H-7, s). Phổ ¹³C-NMR kết hợp với phổ HMBC cho thấy hợp chất V có tất cả 27

carbon, trong đó có năm nhóm -CH₃, tám nhóm -CH₂, bảy nhóm -CH và bảy carbon tứ cấp. Ở vùng trường thấp thấy sự hiện diện của một carbon nhóm carbonyl cộng hưởng tại 203,9 ppm (C-6), hai carbon olefin 166,5 ppm (C-8) và 122,2 ppm (C-7). Tín hiệu của sáu carbon liên kết trực tiếp với oxy xuất hiện tại 84,7 ppm (C-14), 78,1 ppm (C-22), 77,4 ppm (C-20), 70,1 ppm (C-25), 68,6 ppm (C-2), 68,6 ppm (C-3). Tương quan trên phổ ¹H-¹H COSY của hợp chất V cột B2 cũng cho thấy sự phù hợp với cấu trúc β-ecdysone.



Hình 2: a) Tương quan ¹H-¹H COSY của hợp chất trong phân đoạn V cột B2;

b) Tương quan HMBC của hợp chất phân đoạn V cột B2

Bảng 2: So sánh hợp chất phân đoạn V và β-ecdysone chuẩn

Carbon	Hợp chất V(δ _C (ppm))	β-ecdysone (δ _C (ppm))
1	38,4	37,98
2	68,6	68,13
3	68,6	68,04
4	32,9	32,45
5	51,9	51,4
6	204,2	203,49
7	122,1	121,64
8	166,7	166,11
9	34,9	34,39
10	39,1	38,65
11	21,6	21,47
12	32,5	31,98
13	48,6	48,05
14	84,7	84,15
15	32,2	31,77
16	21,9	21,09
17	50,6	50,08
18	18,4	17,88
19	24,9	24,46
20	77,4	76,82
21	22,1	21,69
22	78,1	77,53
23	27,9	27,47
24	43,1	42,65
25	70,1	69,51
26	30,5	29,99
27	30,6	30,12

Phổ HMBC (heteronuclear multiple bond connectivity) cho thấy tương tác giữa proton olefin với C-5, C-9 và C-14 nên proton olefin nằm ở C-7. Do có sự tương quan giữa H-19 và C-1, C-5, C-10 nên nhóm CH₃-19 gắn ở vị trí C-10. Proton trên C-18 tương quan với C-12, C-13, C-14 và C-17 chứng tỏ nhóm CH₃-18 gắn với C-13. Tương quan giữa H-21 với C-17, C-20, C-22 cho thấy nhóm CH₃-21 liên

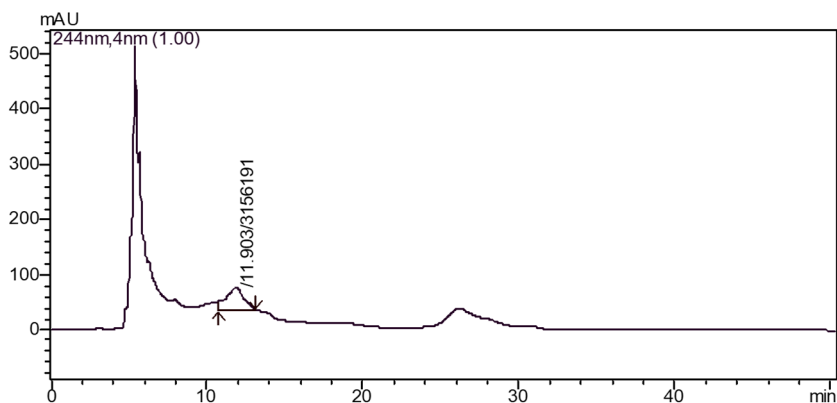
kết với C-20. Các proton trên C-26 và C-27 đều cho tương quan với C-24 và C-25, vậy hai nhóm CH₃-26 và CH₃-27 cùng gắn trên C-25.

Những dữ liệu trên cho thấy hợp chất phân đoạn V cột B2 là một steroid khung cholestan có tất cả 27 carbon, trong đó có năm nhóm –CH₃, tám nhóm –CH₂, bảy nhóm –CH, bảy carbon tứ cấp, một nối đôi ở C₇, sáu nhóm –OH và một nhóm –C=O. Kết hợp so sánh số liệu phổ với tài liệu tham khảo của β-ecdysone thấy có sự trùng khớp, điều đó cho thấy hợp chất phân đoạn V là β-ecdysone (Hình 2 và Bảng 2).

3.2 Định lượng β-ecdysone trong lá cây thông đỏ lá dài

Từ 1 kg lá cây thông đỏ lá dài khô, xay thành bột rồi ngâm trong methanol. Cô quay thu được 250 g cao methanol. Tiếp tục được lặc với dichloromethane, cô đặc phân đoạn nước còn lại được 40 g cao tổng. Hòa tan 15 g cao tổng với EtOAc, lặc phân đoạn và cô quay được 2,0208 g cao EtOAc. Cao EtOAc được tiến hành định lượng theo quy trình HPLC đã được xây dựng. Quá trình phân tích được lặp lại 3 lần trong cùng điều kiện (Hình 3). Nồng độ β-ecdysone (μg/ml) trong mẫu cao EtOAc được tính theo phương trình: $y = 164896x - 42687$. Trong đó: y là diện tích đỉnh; x là nồng độ (μg/ml).

Nồng độ β-ecdysone có trong mẫu cao EtOAc đạt 20,738 μg/ml, chiếm 1,026% trong cao EtOAc. Như vậy, với phương pháp lặc phân đoạn EtOAc, hiệu suất thu nhận β-ecdysone là 0,138% cao tổng (Bảng 3), tương ứng với 55 mg/ kg lá thông đỏ khô. Kết quả nghiên cứu cũng phù hợp với công bố trước đó của nhóm tác giả Trịnh Thị Thủy cho thấy có thể tách được β-ecdysone từ cao chiết EtOAc vỏ của cây thông nang, mọc ở khu vực tỉnh Đắc Lắc (Trinh *et al.*, 2017). Kết quả nghiên cứu là cơ sở để sản xuất các chế phẩm giàu β-ecdysone từ cao chiết lá cây thông đỏ lá dài.



Hình 3: Kết quả HPLC của mẫu EtOAc lần 2 hệ MeOH:H₂O (40:60)

Bảng 3: Hàm lượng β-ecdysone trong cao EtOAc

Lần lặp lại	Nồng độ β-ecdysone (µg/ml)	Hiệu suất đối với cao EtOAc (%)	Hiệu suất đối với cao tổng (%)
Lần 1	23,773	1,176	0,158
Lần 2	19,399	0,960	0,129
Lần 3	19,040	0,942	0,127
Trung bình	20,738	1,026	0,138

4 KẾT LUẬN

Bằng các phương pháp sắc ký phân bố, sắc ký cột, sắc ký lớp mỏng và sắc ký điều chế kết hợp với phương pháp phổ NMR 1 chiều (¹H, ¹³C) và 2 chiều (HMBC), so sánh với chất chuẩn, nghiên cứu đã phân lập được hợp chất β-ecdysone trong lá cây thông đỏ lá dài (*Taxus wallichiana*) trồng tại thành phố Đà Lạt, tỉnh Lâm Đồng. Bằng phương pháp lắc phân đoạn EtOAc, định lượng theo quy trình HPLC, nghiên cứu đã xác định được hàm lượng β-ecdysone đạt 55 mg/ kg lá cây thông đỏ lá dài khô.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn Sở Khoa học và Công nghệ Thành phố Hồ Chí Minh đã hỗ trợ kinh phí để thực hiện đề tài này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Gupta, D., 2015. An overview of taxus. Journal of Drug Discovery and Therapeutics. 3(29): 1-7.
 Lafont, R., Dinan, L., 2009. Ecdysone: Structures and function. Springer. 551-578.
 Lê Văn Đắc và Vũ Thị Loan, 2018. Ecdysteroid ở thực vật và đa dạng các loài thực vật chứa ecdysteroid. Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nhiệt đới. 15: 3-13.
 Nguyễn Thị Thanh Bình, Đào Minh Cường, Mai Văn Trì và Nguyễn Văn Hùng, 1998. Kết quả kiểm tra hoạt tính sinh học của hợp chất ecdysteroid được tách chiết từ lá dâu *Morus alba* L. Tạp Chí Sinh Học, 20(1): 57-59.

Nguyễn Thị Thanh Bình, Mai Văn Trì, Nguyễn Văn Hùng và Nguyễn Thành Minh, 1999. Tách chiết ecdysteroid từ phân tử, Tạp Chí Sinh Học, 21(2): 52-54.
 Nguyễn Thị Minh Hằng, 2017. Nghiên cứu hoàn thiện công nghệ phân lập ecdysteroid và bào chế thực phẩm chức năng Fragra từ cây lược vàng (*Callisia fragrans* (Lindl.) Woods). Đề tài KHCN Viện Hàn lâm KHCN Việt Nam. Mã số: VAST.UĐCN.03:14-17.
 Rufaie, Z. H., Munshi, N. A., Sharma, R. K., Ahmed, K., Malik, G. N. and Raja, T. A., 2011. Occurrence of insect moulting hormone (β-ecdysone) in some locally available plants. International journal of advanced biological research. 1(1): 104-107.
 Trịnh Thị Thủy, Trần Văn Sung, Guenter and Adam, 2000. Nghiên cứu thành phần hóa học cây Bình linh cọng mảnh (*Vitex leptobotrys*). Tạp Chí Hóa Học. 38(2): 1-7.
 Trinh Thi Thuy, Nguyen Thanh Tam, Nguyen Thi Hoang Anh et al., 2017. 20-Hydroxyecdysone from *Dacrycarpus imbricatus* bark inhibits the proliferation of acute myeloid leukemia cells. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine 2017. 10(2): 157-159.
 Vương Chí Hùng, Nguyễn Hoàng Nghĩa, 2011. Nghiên cứu một số đặc điểm lâm học của cây thông đỏ lá dài (*Taxus allichiana* Zucc.) tại Lâm Đồng, truy cập ngày 30 tháng 7 năm 2019. Địa chỉ http://vafs.gov.vn/vn/wp-content/uploads/sites/2/2011/03/4_1_2011.pdf