BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO BỘ Y TẾ

VIỆN DƯỢC LIỆU

PHẠM QUỐC TUẤN

NGHIÊN CỨU VỀ THỰC VẬT, THÀNH PHẦN HÓA HỌC VÀ MỘT SỐ TÁC DỤNG SINH HỌC CỦA CÂY LẠC TÂN PHỤ (*Astilbe rivularis* Buch.- Ham. ex D. Don, họ Saxifragaceae)

LUẬN ÁN TIẾN SĨ DƯỢC HỌC

HÀ NỘI, 2015

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO BỘ Y TẾ

VIỆN DƯỢC LIỆU

PHẠM QUỐC TUẤN

NGHIÊN CỨU VỀ THỰC VẬT, THÀNH PHẦN HÓA HỌC VÀ MỘT SỐ TÁC DỤNG SINH HỌC CỦA CÂY LẠC TÂN PHỤ (*Astilbe rivularis* Buch.- Ham. ex D. Don, họ Saxifragaceae)

LUẬN ÁN TIẾN SĨ DƯỢC HỌC

CHUYÊN NGÀNH: **Dược học cổ truyền**

MÃ SỐ: **62 72 04 06**

Người hướng dẫn khoa học: **1. TSKH. Nguyễn Minh Khởi**

2. PGS.TS. Minkyun Na

HÀ NỘI, 2015

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của riêng tôi dưới sự hướng dẫn khoa học của TSKH. Nguyễn Minh Khởi, PGS.TS. MinKyun Na. Các số liệu, kết quả nêu trong luận án là trung thực và chưa từng được ai công bố trong bất kỳ công trình nào khác.

Tôi xin chịu trách nhiệm về nghiên cứu của mình.

Tác giả

Phạm Quốc Tuấn

LỜI CẢM ƠN

Luận án tiến sĩ này được thực hiện tại Viện Dược liệu dưới sự hướng dẫn khoa học của TSKH. Nguyễn Minh Khởi, PGS.TS. MinKyun Na. Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc nhất tới các thầy về định hướng khoa học, tận tình hỗ trợ, chỉ bảo, giúp đỡ, tạo điều kiện thuận lợi nhất cho tôi hoàn luận án.

Tôi xin trân trọng cảm ơn các nhà khoa học, tác giả các công trình khoa học đã trích dẫn trong luận án vì đã cung cấp nguồn tư liệu quý báu, những kiến thức liên quan trong quá trình nghiên cứu hoàn thành luận án.

Tôi xin trân trọng cảm ơn Ban lãnh đạo, các khoa, phòng và các đồng nghiệp tại Viện Dược liệu; Đại học Quốc gia Chung Nam (Hàn Quốc); Trường Đại học Dược Hà Nội; Viện Hóa học, Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam; Trường Cao đẳng Dược Phú Thọ đã nhiệt tình giúp đỡ, tạo điều kiện và cộng tác để giúp tôi hoàn thành công trình này.

Tôi xin bày tỏ lòng cảm ơn tới: TS. Phương Thiện Thương, PGS. TS. Nguyễn Văn Tập, TS. Nguyễn Thùy Dương, DSCKI. Lê Đình Bích đã có những ý kiến đóng góp quý báu giúp tôi hoàn thiện luận án.

Tôi xin chân thành cảm ơn TTƯT.TS. Hà Quang Lợi – Hiệu trưởng Trường Cao đẳng Dược Phú Thọ - nơi tôi công tác, đã động viên tinh thần và tạo điều kiện thuận lợi về thời gian, kinh phí để tôi hoàn thành luận án này.

Cuối cùng xin cảm ơn những người thân yêu trong gia đình; cảm ơn những bạn bè thân thiết đã dành cho tôi những tình cảm, sự động viên chí tình trong suốt thời gian qua.

Phạm Quốc Tuấn

MỤC LỤC

Mục lục

Danh mục các ký hiệu, chữ viết tắt

Danh mục các hình, bảng

Trang

ĐẶT VẤN ĐỀ 1

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN 3

1.1. THỰC VẬT HỌC 3

1.1.1. Phân loại thực vật, phân bố của chi *Astilbe* Buch.-Ham. ex D. Don và cây Lạc tân phụ trên thế giới 3

1.1.1.1. Về phân loại thực vật 3

1.1.1.2. Phân bố 12

1.1.2. Nghiên cứu phân loại, phân bố của chi *Astilbe* và cây Lạc tân phụ ở Việt Nam 14

1.1.2.1. Phân loại thực vật 14

1.1.2.2. Phân bố 15

1.2. THÀNH PHẦN HÓA HỌC 15

1.2.1. Thành phần hóa học một số loài thuộc chi *Astilbe* 15

1.2.1.1. Các sterol 15

1.2.1.2. Triterpenoid 16

1.2.1.3. Các dẫn xuất của acid benzoic 22

1.2.1.4. Flavonoid 24

1.2.1.5. Các hợp chất khác 30

1.2.2. Thành phần hóa học của cây Lạc tân phụ 31

1.3. TÁC DỤNG SINH HỌC VÀ CÔNG DỤNG 32

1.3.1. Tác dụng sinh học, công dụng của một số loài thuộc chi 32

Astilbe
1.3.1.1. Tác dụng sinh học 33
1.3.1.2. Công dụng 37
1.3.2. Tác dụng sinh học, công dụng của cây Lạc tân phụ 38
1.3.2.1. Tác dụng sinh học 38
1.3.2.2. Công dụng 39
CHƯƠNG 2. NGUYÊN VẬT LIỆU, TRANG THIẾT BỊ VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU 41
2.1. NGUYÊN VẬT LIỆU, TRANG THIẾT BỊ NGHIÊN CỨU 41
2.1.1. Nguyên liệu nghiên cứu 41
2.1.2. Động vật, tế bào thí nghiệm 41
2.1.3. Thuốc thử, hóa chất, dung môi 41
2.1.4. Máy móc, thiết bị 42
2.2. ĐỊA ĐIỂM NGHIÊN CỨU 43
2.2.1. Nghiên cứu thực địa 43
2.2.2. Nghiên cứu trong phòng thí nghiệm 43
2.3. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU 43
2.3.1. Nghiên cứu về thực vật học 43
2.3.1.1. Mẫu tiêu bản thực vật 44
2.3.1.2. Xác định tên khoa học 44
2.3.1.3. Nghiên cứu giải phẫu 44
2.3.2. Nghiên cứu về hoá học 44
2.3.2.1. Phương pháp định tính 45
2.3.2.2. Phương pháp chiết xuất, phân lập các hợp chất 45
2.3.2.3. Phương pháp xác định cấu trúc hoá học các hợp chất 45
2.3.3. Nghiên cứu tác dụng sinh học 45
2.3.3.1. Mẫu nghiên cứu 45

2.3.3.2. Xác định độc tính cấp 46
2.3.3.3. Đánh giá tác dụng chống oxy hóa 46
2.3.3.4. Xác định hoạt tính ức chế hoạt động enzym xanthin oxidase 47
2.3.3.5. Đánh giá tác dụng chống viêm 48
2.3.3.6. Đánh giá tác dụng giảm đau 51
2.3.4.7. Thử tác dụng làm tăng cường hấp thu glucose 53
2.3.4. Phương pháp xử lý số liệu thống kê 54
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU 55
3.1. THỰC VẬT HỌC 55
3.1.1. Xác định tên khoa học của cây Lạc tân phụ 55
3.1.2. Đặc điểm hình thái thực vật 56
3.1.3. Đặc điểm giải phẫu 58
3.1.3.1. Cấu tạo giải phẫu lá chét 58
3.1.3.2. Cấu tạo giải phẫu thân khí sinh 59
3.1.3.3. Cấu tạo giải phẫu thân rễ 60
3.1.3.4. Cấu tạo giải phẫu rễ 60
3.2. THÀNH PHẦN HÓA HỌC 60
3.2.1. Định tính các nhóm chất hữu cơ 60
3.2.2. Chiết xuất và phân lập các hợp chất 62
3.2.2.1. Chiết xuất và phân lập các hợp chất từ phần trên mặt đất cây Lạc tân phụ 62
3.2.2.2. Chiết xuất và phân lập các hợp chất từ phần dưới mặt đất cây Lạc tân phụ 64
3.2.3. Xác định cấu trúc hóa học các hợp chất phân lập từ cây Lạc tân phụ 66
3.2.3.1. Xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất phân lập từ phần trên mặt đất 66

3.2.3.2. Xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất phân lập từ phần dưới mặt đất 86
3.3. TÁC DỤNG SINH HỌC 102
3.3.1. Độc tính cấp của CDMĐLTP 102
3.3.2. Tác dụng chống oxy hóa của CDMĐLTP 103
3.3.3. Hoạt tính ức chế hoạt động XO 103
3.3.4. Tác dụng chống viêm của CDMĐLTP 104
3.3.4.1. Tác dụng chống viêm cấp của CDMĐLTP trên mô hình gây phù bàn chân chuột bằng carrageenan 104
3.3.4.2. Tác dụng chống viêm mạn của CDMĐLTP trên mô hình gây u hạt thực nghiệm bằng bông 105
3.3.5. Tác dụng giảm đau của CDMĐLTP 106
3.3.5.1. Tác dụng giảm đau trung ương của CDMĐLTP trên mô hình mâm nóng 106
3.3.5.2. Tác dụng giảm đau ngoại vi của CDMĐLTP trên mô hình gây đau quặn bằng acid acetic 107
3.3.6. Tác dụng làm tăng cường hấp thu glucose của các oleanan triterpenoid phân lập được từ CDMĐLTP 107
3.3.6.1. Tác dụng độc tế bào của các oleanan triterpenoid 108
3.3.6.2. Tác dụng làm tăng cường hấp thu glucose của các oleanan triterpenoid 109
CHƯƠNG 4. BÀN LUẬN 112
4.1. VỀ THỰC VẬT HỌC 112
4.2. VỀ HÓA HỌC 115
4.3. VỀ TÁC DỤNG SINH HỌC 122
4.3.1. Về độc tính cấp 122
4.3.2. Về tác dụng chống oxy hóa 123

4.3.3. Về hoạt tính ức chế hoạt động XO 125
4.3.4. Về tác dụng chống viêm 126
4.3.5. Về tác dụng giảm đau 129
4.3.6. Về tác dụng làm tăng cường hấp thu glucose của các oleanan triterpenoid 130
4.3.7. Hạn chế trong nghiên cứu tác dụng sinh học 135
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ 137
KẾT LUẬN 137
Về thực vật học 137
Về hóa học 137
Về tác dụng sinh học 138
KIẾN NGHỊ 139

TÀI LIỆU THAM KHẢO
CÁC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN
PHỤ LỤC

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, TỪ VIẾT TẮT

A.	: *Astilbe*
ACAT	: Acyl-CoA: Cholesterol acyltransferase
ADN	: Acid deoxyribonucleic
BSA	: Bovine Serum Albumin
BuOH	: Butanol
CC	: Column Chromatography (Sắc ký cột)
CDMĐLTP	: Cao chiết bằng ethanol từ phần dưới mặt đất của cây Lạc tân phụ
COSY	: Correlation Spectroscopy
cs.	: Cộng sự
COX	: Cyclooxygenase
DĐVN	: Dược điển Việt Nam
DEPT	: Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	: Dimethylsulfoxid
DPPH	: 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl
EC_{50}	: Effective Concentration 50% (Nồng độ hiệu quả 50%)
ED_{50}	: Effective Dose 50% (Liều có tác dụng 50%)
ESI-MS	: Electron Spray Ionization Mass Spectrometry (Phổ khối lượng ion hóa phun mù điện tử)
EtOAc	: Ethyl acetat
EtOH	: Ethanol
FBS	: Fetal Bovine Serum
GLUT	: Glucose Transporter
HEPES	: 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HIF	: Hypoxia-Inducible Factor (yếu tố thiếu oxy cảm ứng)

HIV : Human Immunodeficiency Virus

HMBC : Heteronuclear Multiple Bond Correlation

HMQC : Heteronuclear Multiple Quantum Coherence

HPLC : High Perfomance Liquid Chromatography (Sắc ký lỏng hiệu năng cao)

HR-ESI-MS : High Resolution Electron Spray Ionization Mass Spectrometry (Phổ khối lượng ion hóa phun mù điện tử phân giải cao)

HSQC : Heteronuclear Single Quantum Coherence

HSV : *Herpes simplex* virus

Hx : *n*-Hexan

IC_{50} : Inhibitory Concentration 50% (Nồng độ ức chế 50%)

IL : Interleukin

IR : InfraRed (Hồng ngoại)

IU : International Unit (Đơn vị quốc tế)

KRPH : Krebs-Ringer Phosphate-HEPES

LC_{50} : Lethal Concentration 50% (Nồng độ chết 50%)

LD_{50} : Lethal dose 50% (Liều chết 50%)

M : Mean (Trung bình)

MeOH : Methanol

MIC : Minimum Inhihitory Concentration (Nồng độ tối thiểu ức chế)

MPLC : Medium Presure Liquid Chromatography (Sắc ký lỏng áp suất trung bình)

MTT : 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromid

Na CMC : Natri Carboxyl Methyl Cellulose

NBT : Nitroblue tetrazolium

NK : Natural Killer (Tế bào diệt tự nhiên)

NMR : Nuclear Magnetic Resonance (Cộng hưởng từ hạt nhân)

NO : Nitrogen oxide

NOESY : Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy

OD : Optical Density (Mật độ quang)

p : Probability (Xác suất)

PBS : Phosphate Buffered Saline

PE : Petroleum ether (Ether dầu hỏa)

PG: : Prostaglandin

PTP : Protein tyrosine phosphatase

P/ư : Phản ứng

ROS : Reactive Oxygen Species (Các dạng oxy phản ứng)

SD : Standard Deviation (Độ lệch chuẩn)

SDS : Sodium dodecyl sulphat

SE : Standard Error (Sai số chuẩn)

TGF : Tumor Growth Factor (Yếu tố phát triển khối u)

TLC : Thin Layer Chromatography (Sắc ký lớp mỏng)

TLTK : Tài liệu tham khảo

TNF: : Tumor Necrosis Factor (Yếu tố hoại tử khối u)

UV : Ultraviolet (Tử ngoại)

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor (Yếu tố tăng trưởng mạch nội mô)

Vis : Visible (Khả kiến)

XO : Xanthin oxidase

DANH MỤC CÁC HÌNH

Trang

Hình 1.1. Hình ảnh một số loài thuộc chi *Astilbe* 9

Hình 1.2. Hình ảnh 3 thứ của loài *A. rivularis* 12

Hình 1.3. Hình ảnh lá kép, cụm hoa, hoa, quả của loài *A. rivularis* 15

Hình 3.1. Thân rễ 56

Hình 3.2. Lá kép 56

Hình 3.3. Cụm hoa 57

Hình 3.4. Cấu tạo hoa 57

Hình 3.5. Quả, hạt 58

Hình 3.6. Vi phẫu cuống lá chét cắt ngang 58

Hình 3.7. Vi phẫu lá chét 59

Hình 3.8. Vi phẫu thân khí sinh 59

Hình 3.9. Vi phẫu thân rễ 60

Hình 3.10. Vi phẫu rễ 60

Hình 3.11. Sơ đồ chiết xuất, phân lập các hợp chất từ phần trên mặt đất của cây Lạc tân phụ 64

Hình 3.12. Sơ đồ chiết xuất, phân lập các hợp chất từ phần dưới mặt đất của cây Lạc tân phụ 66

Hình 3.13. Cấu trúc của hợp chất SL-1 68

Hình 3.14. Cấu trúc của hợp chất SL-2 71

Hình 3.15. Cấu trúc của hợp chất SL-3 73

Hình 3.16. Cấu trúc của hợp chất SL-4 74

Hình 3.17. Cấu trúc của hợp chất SL-5 76

Hình 3.18. Cấu trúc của hợp chất SL-6 78

Hình 3.19. Cấu trúc của hợp chất SL-7 80

Hình 3.20. Cấu trúc của hợp chất SL-8 82

Hình 3.21. Cấu trúc của hợp chất SL-9 84
Hình 3.22. Cấu trúc của hợp chất SL-10 85
Hình 3.23. Cấu trúc của hợp chất SR-4 88
Hình 3.24. Cấu trúc của hợp chất SR-1 90
Hình 3.25. Cấu trúc của hợp chất SR-2 92
Hình 3.26. Tương tác HMBC (→), NOESY (↔) chính của hợp chất SR-2 93
Hình 3.27. Phổ HMBC của hợp chất SR-2 93
Hình 3.28. Phổ NOESY của hợp chất SR-2 94
Hình 3.29. Cấu trúc của hợp chất SR-3 95
Hình 3.30. Cấu trúc của hợp chất SR-6 97
Hình 3.31. Cấu trúc của hợp chất SR-5 99
Hình 3.32. Cấu trúc của hợp chất SR-7 101
Hình 3.33. Hoạt tính ức chế hoạt động XO của CDMĐLTP 103
Hình 3.34. Tác dụng chống viêm của CDMĐLTP trên phù chân chuột do carrageenan theo thời gian 104
Hình 3.35. Tác dụng độc tế bào của các oleanan triterpenoid 108
Hình 3.36. Tác dụng tăng (%) hấp thu glucose vào tế bào sợi cơ chuột C2C12 của hợp chất SR-1 và SR-1 + insulin theo thời gian 109
Hình 3.37. Tác dụng làm tăng (%) hấp thu glucose vào tế bào sợi cơ chuột C2C12 của các hợp chất ở thời điểm 2 giờ sau khi ủ với chất 110

DANH MỤC CÁC BẢNG

Trang

Bảng 1.1. Phân bố địa lý các loài thuộc chi *Astilbe* 13

Bảng 1.2. Các sterol có trong một số loài thuộc chi *Astilbe* 16

Bảng 1.3. Các triterpenoid có trong một số loài thuộc chi *Astilbe* 18

Bảng 1.4. Các dẫn xuất của acid benzoic có trong một số loài thuộc chi *Astilbe* 23

Bảng 1.5. Các aglycon của flavonoid có trong một số loài thuộc chi *Astilbe* 25

Bảng 1.6. Flavonoid phân lập được từ một số loài thuộc chi *Astilbe* 27

Bảng 1.7. Một số hợp chất khác phân lập từ các loài thuộc chi *Astilbe* 30

Bảng 1.8. Các hợp chất phân lập từ loài *A. rivularis* 31

Bảng 1.9. Tác dụng kháng khối u của triterpenoid phân lập được từ một số loài thuộc chi *Astilbe* 35

Bảng 3.1. Kết quả định tính các nhóm chất có trong cây Lạc tân phụ 61

Bảng 3.2. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất SL-1 67

Bảng 3.3. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất SL-2 69

Bảng 3.4. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất SL-3 71

Bảng 3.5. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất SL-4 74

Bảng 3.6. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất SL-5 75

Bảng 3.7. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất SL-6 77

Bảng 3.8. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất SL-7 79

Bảng 3.9. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất SL-8 81

Bảng 3.10. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất SL-9 83

Bảng 3.11. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất SL-10 84

Bảng 3.12. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất SR-4 86

Bảng 3.13. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất SR-1 88

Bảng 3.14. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất SR-2 90
Bảng 3.15. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất SR-3 94
Bảng 3.16. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất SR-6 96
Bảng 3.17. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất SR-5 98
Bảng 3.18. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất SR-7 100
Bảng 3.19. Ảnh hưởng của CDMĐLTP lên khối lượng u hạt 106
Bảng 3.20. Ảnh hưởng của CDMĐLTP đến thời gian phản ứng đau 106
Bảng 3.21. Ảnh hưởng của CDMĐLTP đến số cơn quặn đau của chuột 107
Bảng 4.1. Các hợp chất phân lập được từ loài *A. rivularis* 115

ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây Lạc tân phụ có tên khoa học là *Astilbe rivularis* Buch.-Ham. ex D. Don, thuộc họ Thường sơn hay Cỏ tai hổ (Saxifragaceae) [1],[9],[129]. Cây này phân bố ở Ấn Độ, Pakistan, Bhutan, Nepal, Thái Lan, Lào, Indonesia, Myanmar, nam Trung Quốc và Việt Nam [1],[9],[72],[89],[129],[144]. Theo kinh nghiệm dân gian của một số dân tộc ở châu Á (Ấn Độ, Nepal, Trung Quốc): thân rễ, rễ của cây Lạc tân phụ được sử dụng làm thuốc chữa các chứng bệnh phong tê thấp nhức mỏi, chứng ngã sưng đau. Ngoài ra còn dùng chữa viêm dạ dày mạn tính, nhiễm khuẩn đường tiêu hóa, lị, tiêu chảy, sa tử cung, chảy máu, vô sinh, thuốc bổ trong trường hợp cơ thể suy nhược, rối loạn kinh nguyệt,…[5],[34],[43],[51],[72],[89],[126],[142]. Toàn cây chữa viêm khớp, trúng gió, đau lưng, bong gân, sưng cơ [63],[68],[71-72], lá dùng làm sạch máu [70].

Ở Việt Nam, chi *Astilbe* mới biết có một loài duy nhất là *A. rivularis*, mọc hoang dại ở Lào Cai và một vài tỉnh Tây Bắc [1],[9],[18]. Người dân tộc vùng cao ở các tỉnh Lào Cai (Sa Pa) và Lai Châu cũng dùng rễ, thân rễ cây thuốc này để chữa các chứng bệnh đau nhức xương khớp, chứng ngã sưng đau,...

Mặc dù vậy cho đến nay, ở nước ta chưa có công trình nào đi sâu nghiên cứu về dược học, cũng như về thành phần hóa học của cây Lạc tân phụ. Mặt khác, việc sử dụng cây thuốc này theo kinh nghiệm dân gian để chữa các chứng bệnh trên cũng chưa được nghiên cứu chứng minh.

Xuất phát từ tình hình thực tế trên, chúng tôi đã lựa chọn thực hiện đề tài: **"Nghiên cứu về thực vật, thành phần hóa học và một số tác dụng sinh học của cây Lạc tân phụ (*Astilbe rivularis* Buch.-Ham. ex D. Don, họ Saxifragaceae)"** làm luận án tiến sĩ Dược học, chuyên ngành Dược học cổ truyền, với 3 mục tiêu sau:

1. Về thực vật học: Xác định tên khoa học, các đặc điểm hình thái quan

trọng, khẳng định "*tính đúng*" của đối tượng nghiên cứu (*Astilbe rivularis*).

2. Về thành phần hóa học: Định tính, phân lập và xác định cấu trúc một số hợp chất từ phần trên mặt đất và dưới mặt đất của cây Lạc tân phụ.

3. Về tác dụng sinh học: Xác định độc tính cấp và một số tác dụng sinh học của cao chiết và một số hợp chất phân lập được từ phần dưới mặt đất của cây Lạc tân phụ.

Để đạt 3 mục tiêu trên, Đề tài được tiến hành các nội dung sau:

• *Về thực vật*

- Mô tả đặc điểm thực vật, phân tích hoa, quả, hạt và xác định tên khoa học của mẫu nghiên cứu.

- Xác định đặc điểm giải phẫu lá, thân, thân rễ, rễ của cây Lạc tân phụ.

• *Về hóa học*

- Định tính các nhóm chất hóa học có trong phần trên mặt đất và dưới mặt đất của cây Lạc tân phụ.

- Chiết xuất, phân lập và nhận dạng cấu trúc một số hợp chất phân lập được từ phần trên mặt đất và dưới mặt đất của cây Lạc tân phụ.

• *Về tác dụng sinh học*

- Xác định độc tính cấp cao chiết phần dưới mặt đất của cây Lạc tân phụ.

- Đánh giá tác dụng chống oxy hóa: khả năng dọn gốc tự do DPPH và dọn gốc tự do superoxyd ($O_2^{\bullet -}$) của cao chiết phần dưới mặt đất của cây Lạc tân phụ.

- Xác định hoạt tính ức chế hoạt động enzym xanthin oxidase của cao chiết phần dưới mặt đất của cây Lạc tân phụ.

- Đánh giá tác dụng chống viêm cấp, viêm mạn; tác dụng giảm đau của cao chiết phần dưới mặt đất của cây Lạc tân phụ.

- Thử tác dụng làm tăng cường hấp thu glucose của một số hợp chất phân lập được từ phần dưới mặt đất của cây Lạc tân phụ.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN

1.1. THỰC VẬT HỌC

1.1.1. Phân loại thực vật, phân bố của chi *Astilbe* Buch.-Ham. ex D. Don và cây Lạc tân phụ trên thế giới

1.1.1.1. Về phân loại thực vật

a) Chi Astilbe Buch.-Ham. ex D. Don

Theo các tài liệu đã công bố, chi *Astilbe* Buch.-Ham. ex D. Don thuộc họ Thường sơn hay còn gọi là họ Cỏ tai hổ (Saxifragaceae). Họ Saxifragaceae nằm trong các bậc taxon khác là bộ Cỏ tai hổ (Saxifragales); phân lớp Hoa hồng (Rosidae); lớp Ngọc lan/lớp Hai lá mầm (Magnoliopsida/Dicotyledone); ngành Ngọc lan/ngành Thực vật hạt kín (Magnoliophyta/Angiospermae).

Chi *Astilbe* lần đầu tiên được Buchanan-Hamilton (viết tắt là Buch.-Ham.) và David Don (viết tắt là D. Don) cùng công bố vào năm 1825, trong cuốn "*Prodr. Fl. Nepal"*. Tuy nhiên chi *Astilbe* khi đó, hai ông mới đề cập được 2 loài là *A. rivularis* và *A. decandra* [38].

Chi *Astilbe* Buch.-Ham. ex D. Don theo tiếng Trung Quốc gọi là *"Lạc tân phụ"* (落新妇属: luo xin fu shu) [129]. Ở một số nơi khác lại gọi các đại diện của chi *Astilbe* là *"False goatsbeard"* (râu dê giả) hoặc *"Spirea", "Feather-tree"* (cây có lông) [143]. Hiện nay chi *Astilbe* đã biết có khoảng 18 - 24 loài [129],[143]. Tra cứu tại IPNI (The International Plant Names Index) thấy có 87 bản ghi về *Astilbe,* khoảng 60 taxon được mô tả. Trong số đó nhiều tên đồng nghĩa hoặc loài lai tạo hoặc loài đã chuyển sang chi khác hoặc không tồn tại [146]. Tra cứu tại The Plant List, có 101 bản ghi về *Astilbe.* Trong số đó có 26 tên loài và 6 thứ được chấp nhận, còn lại là tên đồng nghĩa hoặc tên còn nghi ngờ [147]. Trong danh sách này, một số loài đã được phân loại đến dưới loài (thứ, var.).

Sự giống nhau của các đặc điểm hình thái giữa các taxon *Astilbe* gây ra khó khăn để phân biệt các loài và các biến thể loài. Chỉ có một loài trong chi là *A. biternata* có hoa đơn tính khác gốc và cũng chỉ có duy nhất loài *A. simplicifolia* có lá đơn. Các loài còn lại đều có lá kép lông chim nhưng về hình dạng và kích thước của lá chét thường khác nhau. Còn một số đặc điểm khác như lông và hình thái của lông; đặc điểm của hoa (có cánh hoa hay tiêu giảm),…cũng là những chi tiết điển hình về hình thái của chi *Astilbe*, đó cũng là dẫn liệu hữu ích để xây dựng khóa phân loại các loài. Tuy nhiên, tùy theo số taxon mô tả và các đặc điểm điển hình của chúng mà các tác giả đã xây dựng khóa phân loại loài theo các cách khác nhau.

Theo công trình nghiên cứu của Chung Y.H. và cs. [35], chi *Astilbe* ở Hàn Quốc có 5 loài và 3 thứ. Căn cứ vào một số đặc điểm điển hình thái của lông ở cụm hoa và trên mặt lá; kiểu cụm hoa và tỷ lệ về chiều dài giữa cánh hoa và nhị,…các tác giả này đã xây dựng khóa phân loại và mô tả chi tiết cho 8 taxon, bao gồm: *A. simplicifolia* Makino; *A. taquetti* (Leveille) Koidzumi; *A. koreana* (Komarov) Nakai; *A. microphylla* Knoll; *A. divaricata* Nakai; *A. chinensis* var. *davidii* Franchet; *A. chinensis* var. *paniculata* Nakai và *A. chinensis* var. *chinensis* Franchet.

Hiện nay, một số loài thuộc chi *Astilbe* được trồng làm cảnh, hoặc đã được lai ghép để tạo ra giống cây làm cảnh mới. Hatch L.C. đã căn cứ vào kiểu cụm hoa, hình thái của cánh hoa để xây dựng khóa phân loại cho 15 loài và dưới loài như: *A. simplicifolia*; *A. rivularis; A. rubra*; *A. japonica* var. *glaberrima; A. ×arendsii; A. chinensis* var. *taquetii; A. chinensis; A. japonica* var. *glaberrima; A. koreana*; *A. ×arendsii*; *A. japonica* var. *glaberrim*; *A. japonica*; *A.thunbergii* var. *formosa; A.thunbergii*; *A. grandis* [121].

Khi nghiên cứu phân loại họ Saxifragaceae ở Trung Quốc, Pan J.T. đã xác định chi *Astilbe* ở quốc gia này có 7 loài (3 loài đặc hữu). Trong đó một loài còn được chia thành 3 thứ (var.). Trước tiên các đại diện của chi được chia ra bởi

kiểu cụm hoa và số lượng cánh hoa. Bước tiếp theo của khóa dựa vào các đặc điểm đặc trưng của đài và cánh hoa để mô tả các loài cụ thể [89].

Khóa phân loại các loài của chi *Astilbe* ở Trung Quốc [89]

1. Cánh hoa 5, bình thường; cụm hoa dày đặc hoa (Sect. *Simplicifoliae* Engl. emend. J. T.Pan)

2. Cánh hoa hình đường hoặc hình đường - thìa, đài có lông tuyến mịn

3. Đài nhẵn mặt ngoài

4. Các cuống cụm hoa phủ dầy đặc lông màu nâu, cong, dài; ngọn lá chét thường nhọn thon ngắn đến nhọn…….....

…….1. *A. chinensis* (Maxim.) Franch. et Savat.

4*. Các cuống cụm hoa phủ lông tuyến; ngọn lá chét thường nhọn thon ngắn đến nhọn thon……...2. *A. grandis* Stapf. Ex Wils.

3*. Đài có lông tuyến ở mặt ngoài..... 3. *A. rubra* Hook. F. et Thoms.

2*. Cánh hoa hình thìa, đài không có lông tuyến ở mép

5. Cánh hoa rộng đầu ở ngọn, gân đơn; đài tù ở đỉnh, hầu như nguyên; cây kích thước trung bình, cao 0,4 - 1,5 m……..……...

……4. *A. longicarpa* (Hayata) Hayata

5*. Cánh hoa nhọn ở ngọn, 4 - 6 gân; đài nhọn và rải rác răng cưa ở ngọn; cây nhỏ, cao 15 - 30 cm…….....5. *A. macroflora* Hayata

1*. Cánh hoa 1-5, teo dần hoặc không có; cụm hoa thưa thớt hoa (Sect. *Astilbe*)

6. Đài 5, giống như da, có lông tuyến ở mặt ngoài; cánh hoa thỉnh thoảng 2-3-5, teo dần hoặc không có……6. *A. macrocarpa* Knoll

6*. Đài 4 - 5, gần như màng, nhẵn ở mặt ngoài; cánh 1-(2-3-5), teo dần hoặc không có

7. Cánh hoa 1-(2-3-5), teo dần hoặc không có

8. Lá chét hình mũi mác, hình trứng hẹp hoặc hình trứng - thoi hẹp; cánh hoa thường không có hoặc thỉnh thoảng chỉ có 1 và teo dần..... 7b. *A. rivularis* var. *angusta* C.Y. Wu ex J.T. Pan

8*. Lá chét thường hình trứng, trứng rộng đến bầu dục rộng; cánh hoa 1-(2-3-5), teo dần hoặc không có .... 7a. *A. rivularis* var. *myriantha* (Diels) J.T. Pan

7*. Cánh hoa không có……...7. *A. rivularis* Buch.-Ham. ex D. Don

Năm 2006, Trader B.W. [121] nghiên cứu sự thay đổi đặc điểm hình thái của *Astilbe* dựa trên sử dụng 101 tiêu bản mẫu của 6 phòng tiêu bản ở Mỹ. 28 đặc điểm hình thái của 21 taxon được phân tích, sử dụng *Saxifragopsis fragarioides* là taxon nhóm ngoài. Đồng thời tác giả sử dụng gen plasmid *mat*K để tiến hành phân tích sự phát sinh loài. Kết quả so sánh phân tích hình thái và phân tử là tương đồng. Dựa trên các kết quả nghiên cứu, Trader B.W. đã thiết lập khóa phân loại mới gồm 13 loài như sau:

Khóa phân loại các loài chi *Astilbe* bởi Trader B.W. [121]

1a. Lá đơn .....……..….*A. simplicifolia* Makino

1b. Lá kép

2a. Cây đơn tính khác gốc..... ……...….*A. biternata* Britton

2b. Cây lưỡng tính

3a. Cánh hoa 1 - 5, teo dần hoặc không có; cụm hoa thưa thớt hoa

4a. Đài 5, gần như da, có lông tuyến ở mặt ngoài; cánh hoa 2-3-5 hoặc không có …… .....…….*A. macrocarpa* Knoll

4b. Đài 4 - 5, gần như màng, mặt ngoài nhẵn; cánh hoa 1-(2-3-5), teo dần hoặc không có…….*A. rivularis* Buch.-Ham. ex D. Don

3b. Cánh hoa 5, bình thường

5a. Cụm hoa dầy đặc hoa

6a. Cánh hoa hình đường, đài có lông tuyến mịn

7a. Đài nhẵn ở mặt ngoài

8a. Cuống cụm hoa phủ lông màu nâu, xoăn, dài; ngọn lá chét thường nhọn thon ngắn đến nhọn .... *A. chinensis* (Maxim.) Franch.

8b. Cuống cụm hoa phủ lông tuyến; ngọn lá chét thường nhọn thon ngắn đến nhọn thon……......
.....*A. grandis* Stapf. ex Wils.

7b. Đài có lông tuyến

9a. Lông chỉ có ở mặt ngoài .....
.....*A. rubra* Hook. f. et Thoms.

9b. Đài có lông ở hai mặt .....*A. microphylla* Hayata

6b. Cánh hoa hình thìa

10a. Đài hoa không có lông tuyến ở mép

11a. Cánh hoa rộng đầu ở ngọn, gân đơn; đài tù ở ngọn, hầu như nguyên; cây kích thước trung bình, cao 0,4 - 1,4 m……..…….*A. longicarpa* (Hayata) Hayata

11b. Cánh hoa nhọn ở ngọn, 4 - 6 gân; đài nhọn và rải rác răng cưa ở ngọn; cây nhỏ, cao 15 - 30 cm.....
.....*A. macroflora* Hayata

10b. Đài có lông, như màng ở mép

12a. Lá chét hình mũi mác và có nhiều lông cứng, mép lá chét có nhiều lông.....*A. philippinensis* Henry

12b. Lá chét hình mũi mác, rải rác lông lởm chởm và bóng…….. .....…….*A. japonica* A. Gray

5b. Cụm hoa dầy đặc hoa, nhưng thưa thớt nhánh, cánh hoa hình thìa, mép đài nguyên, lá chét hình trứng.....
.....*A. thunbergii* (Siebold et Zucc.) Miq.

Cũng theo Trader B.W., 8 taxon được xếp vào thứ là thích hợp: *A. grandis* var. *austrosinensis, A. grandis* var. *koreana, A. rivularis* var. *angustifoliolata, A. rivularis* var. *myriantha, A. thunbergii* var. *fujisanensis, A. thunbergii* var. *formosa, A. japonica* var. *glaberrima, A.chinensis* var. *davidii* [121].

Có thể nói, việc nghiên cứu phân loại chi *Astilbe* trên thế giới đã được tiến

hành cách đây gần 200 năm và đến nay đã tương đối hoàn thiện. Theo Thực vật chí Trung Quốc, tập 8, năm 2001, chi *Astilbe* có các đặc điểm cơ bản sau [129]:

Cây thảo sống lâu năm. Thân rễ mập. Thân khí sinh có nhiều lông màu nâu hoặc lông mềm dài. Lá so le, có cuống dài, lá kép chụm ba 2 - 4 lần, hiếm khi lá đơn; lá kèm mỏng như màng; lá chét hình mũi mác, trứng, hoặc hình trứng rộng đến hình bầu dục, mép có răng cưa. Chùy hoa ở tận cùng, có lá bắc. Hoa màu trắng, màu hoa cà hoặc tía, lưỡng tính hoặc đơn tính, hiếm khi tạp tính hoặc khác gốc. Đài 4 hoặc 5. Cánh hoa thường 1 - 5, thỉnh thoảng nhiều hơn hoặc không có. Nhị thường 5 hoặc 8 - 10. Lá noãn 2 hoặc 3, ± hàn liền hoặc tự do; bầu hơi trên hoặc hơi dưới, 2 hoặc 3 ngăn với đính noãn trung trụ hoặc một ngăn với đính noãn mép; nhiều noãn. Quả nang hoặc quả đại. Hạt nhỏ.

Thực vật chí Bắc Mỹ mô tả chi *Astilbe* có một số đặc điểm khác so với Thực vật chí Trung Quốc như: không có thân rễ, không bao giờ có lá đơn. Trong khi đó loài *A. simplifolia* là loài duy nhất của chi này có lá đơn [143].

Hiện nay vẫn còn sự tranh luận giữa việc sắp xếp loài hoặc thứ của một số taxon thuộc chi *Astilbe* nói chung và *A. rivularis* nói riêng. Theo Pan J.T. và Obha H., *A. rivularis* gồm 3 taxon là *A. rivularis, A. rivularis* var. *angustifoliolata, A. rivularis* var. *myriantha* [89],[129]. Trader B.W. [121] nghiên cứu sự thay đổi đặc điểm hình thái của chi *Astilbe* dựa trên những tiêu bản của các phòng tiêu bản ở Mỹ và sử dụng gen plasmid *mat*K để tiến hành phân tích sự phát sinh loài. Ông cho rằng *A. angustifoliolata, A. myriantha* chỉ là thứ của *A. rivularis.* Tuy nhiên, năm 2013, Zhu W.D. và cs. nghiên cứu phân tử về phát sinh loài và địa sinh học của chi *Astilbe* ở châu Á và bắc đông Mỹ, cho rằng *A. rivularis* var. *rivularis, A. rivularis* var. *angustifoliolata* cùng tổ tiên, dễ dàng nhận biết bởi lông màu nâu dài dọc theo thân và cuống lá, lá chét có lông tuyến, không có cánh hoa hoặc teo dần, nhị 5 đến 10; *A. rivularis* var. *myriantha* có quan hệ gần với tổ lưỡng tính hơn là thứ của *A. rivularis.* Diels mô tả đầu tiên là loài riêng biệt *A. myriantha* dựa trên sự thiếu hụt cánh hoa, lá chét

hình trứng và thiếu hụt lông màu đồng dài trên cuống chung. Taxon này là tạp tính hoặc đơn tính cận khác gốc và phân bố hẹp từ núi Quingling-Daba xung quanh lòng chảo Sichuan đến núi bắc Henduang của Trung Quốc. Dựa vào kết quả nghiên cứu, Zhu W.D. và cs. cho rằng taxon này ở mức độ loài *A. myriantha* [140].

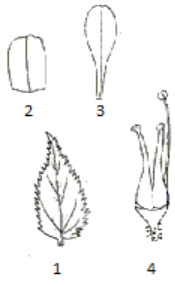
Hình ảnh minh họa một số loài thuộc chi *Astilbe* được thể hiện ở Hình 1.1 [130],[143].

A. biternata

1. Lá kép, cụm hoa; 2. Hoa 3. Quả

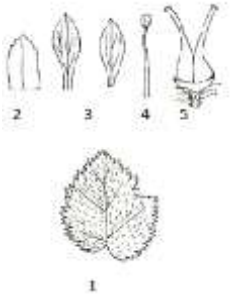
A. chinensis

1. Lá kép; 2. Cụm hoa; 3. Một phần thân; 4. Đài hoa; 5. Cánh hoa; 6. Nhị; 7. Nhụy



A. longicarpa

1. Lá chét; 2. Đài hoa; 3. Cánh hoa; 4. Nhị, nhụy

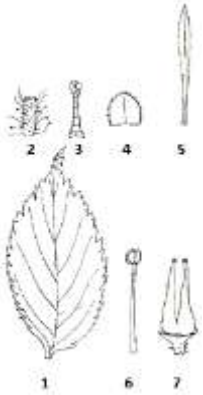


A. macroflora

1. Lá chét; 2. Đài hoa; 3. Cánh hoa; 4. Nhị; 5. Nhụy

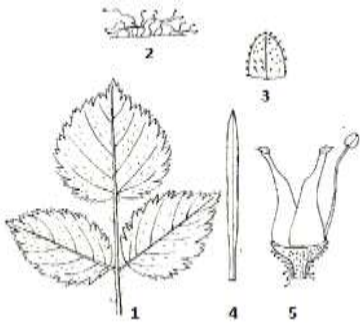
A. macrocarpa

1. Lá kép; 2. Một phần cuống hoa; 3. Đài hoa; 4. Cánh hoa; 5. Nhị; 6. Nhụy



A. grandis

1. Lá chét; 2. Một phần thân; 3. Lông tuyến ở cụm hoa; 4. Đài hoa; 5. Cánh hoa; 6. Nhị; 7. Nhụy



A. rubra

1. Lá chét; 2. Lông tuyến ở cụm hoa; 3. Đài hoa; 4. Cánh hoa; 5. Nhị, nhụy

Hình 1.1. Hình ảnh một số loài thuộc chi *Astilbe*

b) Cây Lạc tân phụ

Cây Lạc tân phụ có tên khoa học là *Astilbe rivularis* Buch.-Ham. ex D. Don, thuộc họ Thường sơn hay Cỏ tai hổ (Saxifragaceae). Ở Trung Quốc cây

này còn được gọi là Lạc tân phụ khe suối (溪畔落新妇: xi pan luo xin fu), Hồng thăng ma, Dã cao lương, Bum chang mo, Chính nhi chi hoa, Dâm dương hoắc, ...[126],[129]; Ở Nepal, Ấn Độ có tên Budho aushadhi, Budho okhali, Gane gurjo, Thulo aushadhi, Bhadangoo, Thulo Okhati, Bansupari, Buro okhoti,… [19],[43],[51],[53],[70],[72],[94],[108].

Theo Thực vật chí Trung Quốc, tập 8, năm 2001 [129], đặc điểm hình thái loài *A. rivularis* được mô tả như sau:

Cây thảo sống lâu năm, cao 0,6 - 2,5 m. Thân mang lông tuyến dài màu nâu. Lá kép chụm ba, 2 - 3 lần lông chim; cuống chung và cuống lá chét nhiều lông dài màu nâu. Phiến lá chét hình mũi mác, hình trứng hẹp đến rộng, hình bầu dục hoặc bầu dục rộng, hình bầu dục-thoi, bầu dục hẹp - trứng ngược hoặc trứng ngược, kích thước 4 - 14,5 x 1,7 - 8,4 cm, có nhiều lông dài màu nâu ở mặt dưới và nhiều lông tuyến dọc theo gân, dải rác có nhiều lông tuyến màu nâu ở mặt trên, gốc lá hình tim lệch hoặc tròn đến hình nêm; mép lá có răng nhọn hai lần; ngọn lá nhọn thon. Chùy hoa dài đến 42 cm, có nhiều hoa; các nhánh dài từ 1 - 18 cm, lông tuyến xoăn màu nâu; 3 lá bắc hình gần bầu dục, kích thức 1,1 - 1,4 x 0,2 - 0,6 mm, nhiều lông màu nâu, mép nguyên hoặc có răng nhọn; cuống nhỏ hoa 0,8 - 1,8 mm. Đài hoa 4 hoặc 5, màu xanh hình trứng hoặc bầu dục đến tròn dài, kích thước 1,2 - 1,5 x khoảng 1 mm, gần như màng, hơi lồi mặt ngoài, hơi lõm mặt trong, không có lông, 1 gân. Không có cánh hoa, thỉnh thoảng 1 (-5) và bị teo. Nhị hoa 5 - 10 (-12), kích thước 0,2 - 2,4 mm. Nhụy hoa khoảng 2 mm; 2 lá noãn, gốc dính liền, bầu hơi trên; vòi nhụy rời. Ra hoa, kết quả vào tháng 6 - 11.

Tuy nhiên vẫn theo tài liệu trên, loài *A. rivularis* ở Trung Quốc có tới 3 dưới loài (var., thứ), cách phân biệt cụ thể như sau:

- Lá chét hình mác hoặc trứng hẹp đến hình trứng ngược - thoi hẹp.....*A. rivularis* var. *angustifoliolata*

- Lá chét hình trứng hoặc rất rộng đến bầu dục rộng, hoặc bầu dục - thoi hoặc trứng ngược

+ Lá chét thường hình trứng, hình bầu dục rộng ….....*A. rivularis* var. *myriantha* (Diels)

+ Lá chét hình bầu dục - thoi hoặc trứng ngược (những lá ở ngọn), hoặc hình trứng (những lá dưới)..... *A. rivularis* var. *rivularis*

Đặc điểm hình thái và phân bố của 3 thứ thuộc loài *A. rivuralis* ở Trung Quốc như sau:

- ***Astilbe rivularis* var. *rivularis***

- Tên khác: 溪畔落新妇(原变种) xi pan luo xin fu (Lạc tân phụ khe suối) Yuan bian zhong (chủng nguyên bản).

- Mô tả: Lá chét hình bầu dục - thoi hoặc trứng ngược (những lá ở ngọn), hoặc hình trứng (những lá dưới). Không có cánh hoa. Ra hoa kết quả vào tháng 7 - 10. 2*n* = 28.

- Phân bố: mọc ở những khu rừng, bìa rừng, những bụi rậm, đồng cỏ có độ cao 900 - 3.200 m. Phân bố ở các tỉnh Hà Nam, Sơn Tây, Tứ Xuyên, Tây Tạng, Vân Nam - Trung Quốc, Bhutan, bắc Ấn độ, Indonesia, Kashmir (Ấn Độ - Pakistan), Lào, Nepal, Thái Lan.

- ***Astilbe rivularis* var. *myriantha* (Diels) J.T. Pan**

- Tên khác: 多花落新妇 duo hua luo xin fu (Lạc tân phụ nhiều hoa).

Syn.: *Astilbe myriantha* Diels; *A. heteropetala* Mattfeld; *A. virescens* Hutchinson.

- Mô tả: Lá chét thường hình trứng, hình bầu dục rộng. Hoa không cánh, thỉnh thoảng 1(–5) và teo dần. Ra hoa kết quả vào tháng 6 - 10.

- Phân bố: ở những khu rừng, bụi rậm, khe núi có bóng dâm, độ cao 1.100 - 2.500 m. Phân bố ở các tỉnh đông nam Cam Túc, Quý Châu, Tây Hà Nam, Hồ

Bắc, Sơn Tây, Tứ Xuyên - Trung Quốc.

- ***Astilbe rivularis* var. *angustifoliolata* H. Hara**

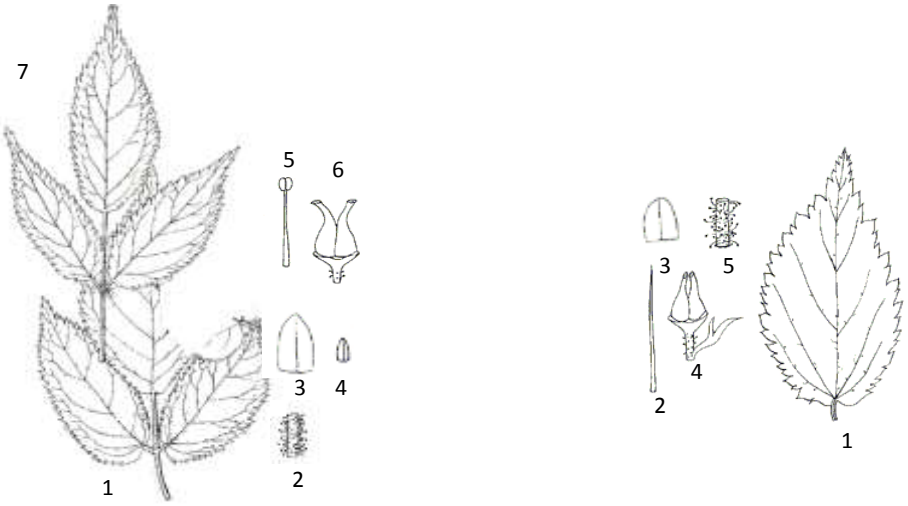
- Tên khác: 狭叶落新妇 xia ye luo xin fu (Lạc tân phụ lá hẹp).

Syn.: *Astilbe rivularis* var. *angustata* C. Y. Wu ex J. T. Pan.

- Mô tả: Lá chét hình mác hoặc trứng hẹp đến hình trứng ngược - thoi hẹp. Cánh hoa thường không có, thỉnh thoảng 1 và teo dần. Ra hoa kết quả vào tháng 9 - 11.

- Phân bố: mọc ở những khu rừng, bìa rừng, khe núi gần nước, độ cao 1.500 - 2.800 m. Phân bố ở tây bắc Vân Nam - Trung Quốc, bắc Myanmar.

Hình ảnh minh họa 3 thứ của loài *A. rivularis* thể hiện ở Hình 1.2 [130].



A. rivularis* var. *rivularis

1. Lá chét; 2. Một phần cuống hoa; 3. Đài; 4. Đài tiêu giảm; 5. Nhị; 6. Nhụy

A. rivularis* var. *angustifoliolata

7. Lá chét

A. rivularis* var. *myriantha

1. Lá chét; 2. Cánh hoa; 3. Đài; 4. Nhụy; 5. Một phần cuống hoa

Hình 1.2. Hình ảnh 3 thứ của loài *A. rivularis*

Những thông tin về các thứ thuộc loài *A. rivularis* ở Trung Quốc trên đây là rất quan trọng để tham khảo khi nghiên cứu xác định tên khoa học cây Lạc tân phụ ở Việt Nam.

1.1.1.2. Phân bố

Theo các tài liệu đã công bố, chi *Astilbe* phân bố chủ yếu ở vùng ôn đới

ấm, cận nhiệt đới bắc bán cầu [1],[9],[35],[89],[121],[129],[143-144]. Sự phân bố chi *Astilbe* trên thế giới được thể hiện ở Bảng 1.1.

Bảng 1.1. Phân bố địa lý các loài thuộc chi *Astilbe*

TT	Tên loài	Phân bố ở quốc gia, vùng lãnh thổ	TLTK
1	*A. simplicifolia* Makino	Nhật Bản, Hàn Quốc	[35],[89]
2	*A. chinensis* (Maxim.) Franch. Et Savat.	Trung Quốc, Nga, Nhật Bản, Triều Tiên	[35],[89],[129]
3	*A. grandis* Stapf ex Wils.	Trung Quốc, Triều Tiên	
4	*A. longicarpa* (Hayata) Hayata	Đài Loan	[89],[129]
5	*A. macroflora* Hayata	Đài Loan	
6	*A. japonica* (Morr.et Decne.) A. Gray	Nhật Bản	[89]
7	*A. thunbergii* (Sieb. Et Zucc.) Miq.	Nhật Bản	[89]
8	*A. microphylla* Knoll	Nhật Bản, Hàn Quốc	[35],[89]
9	*A. philippinensis* Henry	Philipin	[89]
10	*A. rubra* Hook. F. et Thoms.	Trung Quốc, Ấn Độ	[35],[89],[129]
11	*A. macrocarpa* Knoll	Trung Quốc	[89],[129]
12	*A. biternata* (Vent.) Britt.	Mỹ	[89],[143]
13	*A. platyphylla* H.Boiss.	Nhật Bản	[89]
14	*A. rivularis* Buch.-Ham. ex D. Don	Trung Quốc, Thái Lan, Ấn Độ, Bhutan, Nepal, Kashimir, Lào, Việt Nam, Pakistan	[1],[72],[89], [129],[144]
15	*A. indica* Bl.	Indonesia	[89]
16	*A. crenatilobata* (Britt.) Small	Mỹ	
17	*A. apoensis* Hallier	Philipin	
18	*A. khasiana* Hallier	Ấn Độ	

Từ bảng trên cho thấy hầu hết các loài thuộc chi *Astilbe* phân bố ở châu Á, bao gồm khu vực Đông Á (Nhật Bản, Triều Tiên, Trung Quốc, Đài Loan), Nga. Sau đến khu vực Đông Nam Á (Việt Nam, Lào, Indonesia, Myanmar, Thái Lan) và khu vực Nam Á (Nepal, Ấn Độ, Pakistan),...Ngoại trừ loài *A. biternata* - đặc hữu của Bắc Mỹ.

Riêng về loài *A. rivularis*, phân bố chủ yếu ở vùng Nam Á (Kashimir, Nepal, Bhutan, Ấn Độ), sang đến Trung Quốc và xuống tới Thái Lan, Lào, Indonesia, Phillipin, Việt Nam [1],[9],[72],[89],[129],[144]. Chúng mọc ở rừng, bìa rừng, bụi rậm, đồng cỏ có nước, khe suối trên cao nguyên có độ cao 900 - 3.200 m [1],[72],[129].

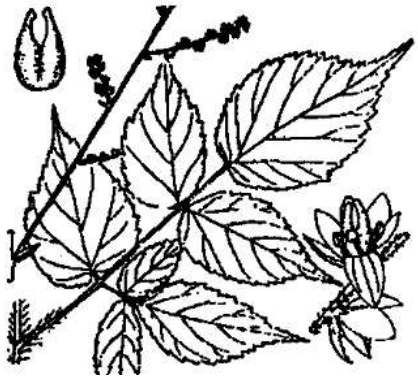
1.1.2. Nghiên cứu phân loại, phân bố của chi *Astilbe* và cây Lạc tân phụ ở Việt Nam

1.1.2.1. Phân loại thực vật

Người đề cập tới loài *Astilbe rivularis* Buch.-Ham. ex D. Don đầu tiên ở Việt Nam là Phạm Hoàng Hộ. Trong bộ "*Cây cỏ Việt Nam*", tập I, năm 1999, Ông mô tả họ Saxifragaceae ở nước ta có 2 chi với 2 loài là: Hổ nhĩ thảo (*Saxifraga sarmentosa* L.f.) và Lạc tân phụ (*A. rivularis*) [9]. Đến năm 2005, trong bộ "*Danh lục các loài thực vật Việt Nam*", tập III, các tác giả của tài liệu này khẳng định lại các thông tin của Phạm Hoàng Hộ đã đề cập ở trên, đồng thời có đính chính về tên khoa học loài Hổ nhĩ thảo chính xác là *Saxifraga stolonifera* W. Cartis (= *S. stolonifera* Meerb., *S. sarmentosa* L.f. ex Schreber) [1]. Ngoài 2 công trình này cho đến nay, hiện chưa có tài liệu nào nghiên cứu về thực vật học đối với loài *A. rivularis* cũng như về họ Saxifragaceae ở Việt Nam. Đồng thời loài *A. rivularis* cho đến nay cũng chưa có tên gọi theo tiếng Việt. Tên gọi *"Lạc tân phụ"* là theo cách gọi theo phiên âm tiếng Hán của người Trung Quốc.

Phạm Hoàng Hộ đã mô tả đặc điểm hình thái của loài Lạc tân phụ như sau: Cỏ đa niên đứng, không có chồi bò, thân có lông. Lá 2 lần kép; lá phụ xoan

rộng, chót nhọn, đáy tròn hay hình tim, mặt trên nâu, mặt dưới lợt, bìa có răng kép; cuống 3-5 cm, Chùm tụ tán cao 40 cm ở ngọn; hoa nhỏ; tiền diệp hẹp; đài 5 răng; cánh hoa vàng; tiểu nhị 5 hay 10; tâm bì 2, rời nhau. Nang hình sừng rời nhau, trên đài còn lại; hột nhiều, nhỏ (Hình 1.3) [9].



Hình 1.3. Hình ảnh lá kép, cụm hoa, hoa, quả của loài *A. rivularis* [9]

1.1.2.2. Phân bố

Do chưa được đi sâu điều tra nghiên cứu, nên về sự phân bố của Lạc tân phụ ở Việt Nam cũng chưa được đề cập nhiều. Theo các tài liệu [1],[9],[18], cây Lạc tân phụ chỉ thấy phân bố tự nhiên ở vùng núi cao Hoàng Liên Sơn, thuộc huyện Sa Pa, tỉnh Lào Cai và một số tỉnh Tây Bắc (Lai Châu).

Tóm lại, về cây Lạc tân phụ (*Astilbe rivularis*) cũng như họ Saxifragaceae ở Việt Nam chưa có những công trình đi sâu nghiên cứu về thực vật học.

1.2. THÀNH PHẦN HÓA HỌC

1.2.1. Thành phần hóa học một số loài thuộc chi *Astilbe*

Một số loài thuộc chi *Astilbe* đã được các nhà khoa học trên thế giới nghiên cứu về thành phần hóa học. Tổng hợp các tài liệu tham khảo được cho thấy, thành phần hóa học chính đã được phân lập từ các loài thuộc chi *Astilbe* là triterpenoid, flavonoid, phytosterol, dẫn xuất của acid benzoic,...Sau đây là những ghi nhận tóm tắt các nhóm chất chủ yếu của chi *Astilbe*.

1.2.1.1. Các sterol

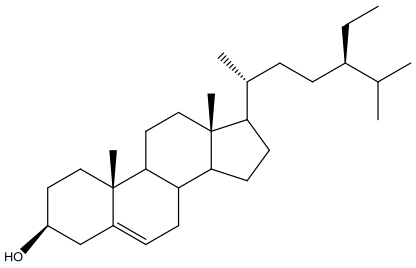
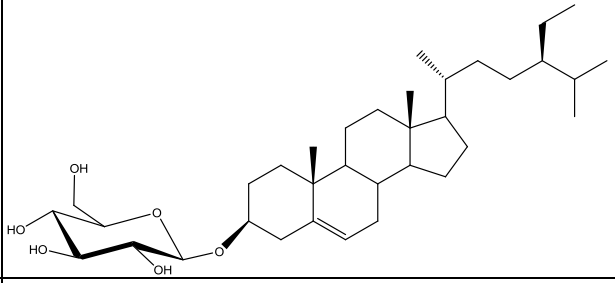
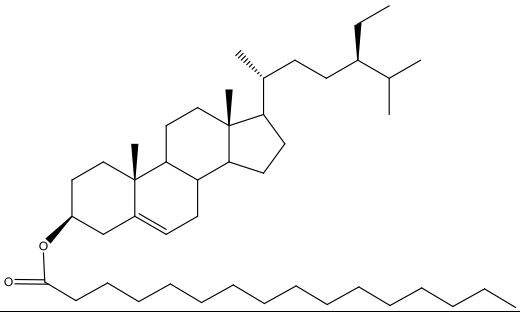
Từ rễ loài *A. chinensis*, năm 2002, Sun H.X. và cs. đã tách và xác định

được cấu trúc *β*-sitosterol **(1)**, daucosterol **(2)**, *β*-sitosterol palmitat **(3)** [113]. Thân rễ của loài *A. chinensis* cũng có chứa các hợp chất **1–3** [114].

Năm 2012, Zou Y. và cs. [141] sử dụng phương pháp sắc ký cột cũng đã phân lập được hợp chất **1** từ cao chiết MeOH thân rễ loài *A. myriantha.*

Các sterol có trong một số loài thuộc chi *Astilbe* được trình bày ở Bảng 1.2.

Bảng 1.2. Các sterol có trong một số loài thuộc chi *Astilbe*

Số TT	Tên hợp chất	Tên khác	TLTK
1	*β*-Sitosterol **(1)**		[113-114], [141]
2	*β*-Sitosterol-3-*O*-*β*-glucopyranosid (daucosterol, **2**)		[113-114]
3	*β*-sitosterol palmitat **(3)**		[113-114]

1.2.1.2. Triterpenoid

Triterpenoid phân lập từ một số loài thuộc chi *Astilbe* có cấu trúc 5 vòng (pentacyclic triterpenoid), thuộc 2 nhóm oleanan, ursan. Hầu hết các triterpenoid ở trong chi *Astilbe* có nhóm carboxylic vị trí C-27 và đây là đặc điểm đặc trưng

nhất của các hợp chất trong chi *Astilbe*.

a) Loài A. chinensis

Năm 2003, Sun H.X. và cs. [114] nghiên cứu thành phần hóa học của cao chiết PE từ thân rễ loài *A. chinensis* bởi sàng lọc thử nghiệm chống ung thư *in vitro*, kết quả phân lập được 4 oleanan triterpenoid, gồm: acid 3β-hydroxyolean-12-en-27-oic (acid β-peltoboykinolic, **4**), acid 3β-acetoxyolean-12-en-27-oic (acid acetyl β-peltoboykinolic **5**), acid 3β,6β-dihydroxyolean-12-en-27-oic (acid astilbic, **6**) và một ursan triterpenoid là acid 3β-hydroxyurs-12-en-27-oic **(16)**.

Năm 2006, Hu J.Y. và cs. báo cáo đã tách và xác định được cấu trúc 2 triterpenoid mới từ cao chiết EtOAc thân rễ loài *A. chinensis* là acid 3β,6β,24-trihydroxyolean-12-en-27-oic **(10)**, acid 3β-acetoxy-6β-hydroxyurs-12-en-27-oic **(20)** [48]. Năm 2009, Hu J.Y. và cs. [49] tiếp tục nghiên cứu thành phần hóa học của cao chiết EtOH, sử dụng phương pháp CC đã phân lập và xác định được cấu trúc 6 triterpenoid, trong đó có 4 triterpenoid mới: acid 3β,6β,7α-trihydroxyolean-12-en-27-oic **(8)**, 3β,6β-dihydroxyurs-12-en-27-oic acid (acid astilbotriterpenic, **19**), acid 3β,6β,24-trihydroxyours-12-en-27-oic **(22)**, acid 3β,6β,7α-trihydroxyurs-12-en-27-oic **(23)** và **10**, **20**.

Cũng từ thân rễ loài *A. chinensis*, vào năm 2009, Cai X. F. và cs. [27] đã tách và xác định được cấu trúc 6 triterpenoid mới: acid 3β-acetoxy-6β-hydroxyolean-12-en-27-oic **(7)**, 3β,24-dihydroxyolean-12-en-27-oic **(9)**, acid 3β,6β -dihydroxy,24-norolean-12,4(23)-dien-27-oic **(12)**, acid 3α-hydroxyolean-5,12-dien-27-oic **(14)**, acid 3β-acetoxyurs-12-en-27-oic **(17)**, **22** và 6 triterpenoid đã biết **4**, **10**, acid 3α-acetoxyolean-12-en-27-oic **(13)**, **16**, acid 3α-acetoxyurs-12-en-27-oic **(18)**, **20**. Rễ của loài *A. chinensis* có mặt **4** và **6** [131].

b) Loài A. koreana

Năm 2006, Na M.K. và cs. [83] đã nghiên cứu phân lập các chất theo định hướng phân đoạn có tác dụng sinh học của cao chiết MeOH thân rễ loài *A. koreana*. Từ phân đoạn EtOAc có tác dụng ức chế mạnh nhất PTP 1B, đã tách và xác định cấu trúc được 5 triterpenoid, trong đó có một hợp chất mới là acid 3α,24-dihydroxyolean-12-en-27-oic **(15)** và 4 hợp chất đã biết là **4, 6**, acid 3-oxoolean-12-en-27-oic **(11)**, **16**.

c) Loài A. myriantha

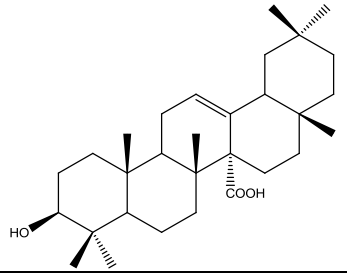
Năm 2011, Song Q. Y. và cs. [111] đã phân lập từ cao chiết EtOH của rễ loài *A. myriantha* được 7 triterpenoid: **4**, **6**, **13**, **16**, **22**, acid 3β,24-dihydroxyurs-12-en-27-oic **(21)**, 3β,6β -dihydroxyurs-12-en-7α,27α-olid **(24)**. Hợp chất **24** là ursan triterpenoid mới, chứa 6 vòng, một vòng tạo thêm bởi ester nội phân tử giữa nhóm carboxylic ở vị trí C-27 với nhóm OH ở vị trí C-7. Các hợp chất **4, 6**, **16** cũng được báo cáo có mặt trong thân rễ loài *A. myriantha* [141].

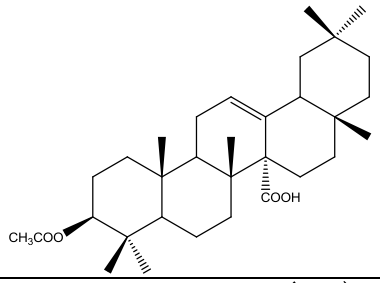
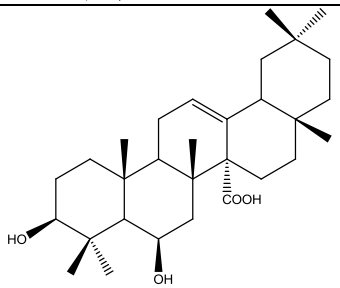
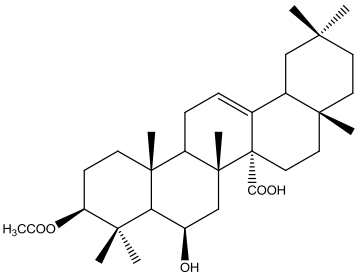
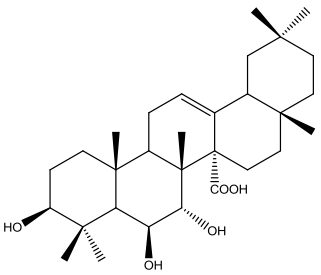
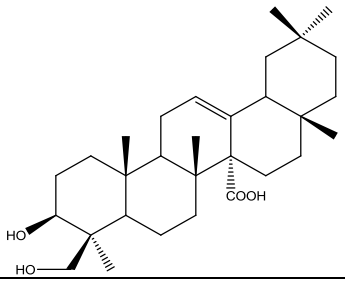
d) *Loài A. thunbergii*

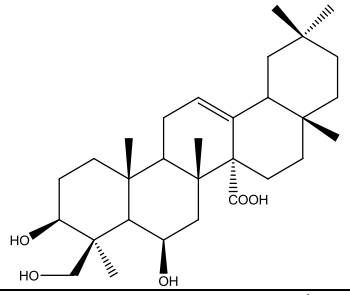
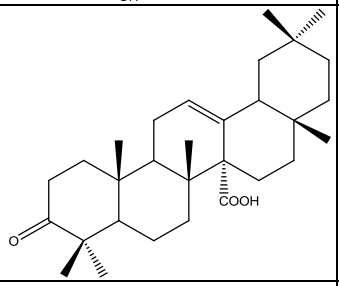
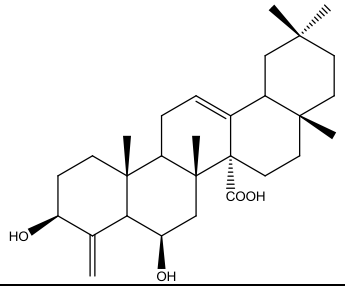
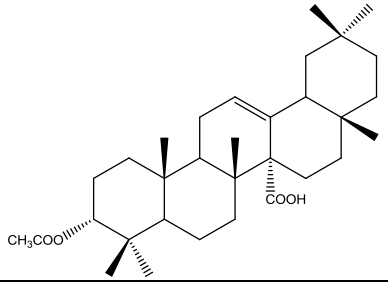
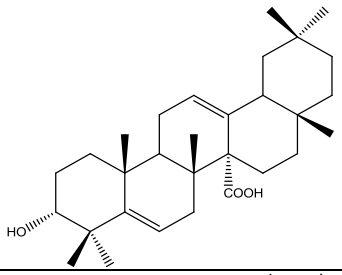
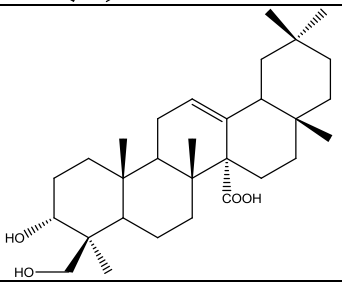
Năm 1972, Takahashi K. và cs. đã phân lập và xác định cấu trúc của 2 triterpenoid **4, 6** từ rễ loài *A. thunbergii* var. *congests*. Hợp chất **6** là hợp chất mới, lần đầu tiên phân lập được từ loài này [118].

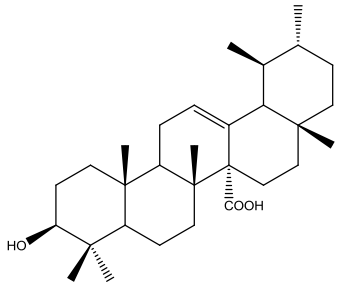
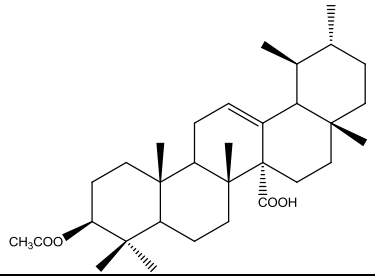
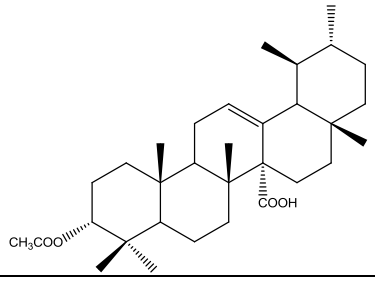
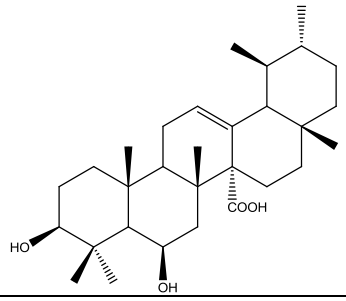
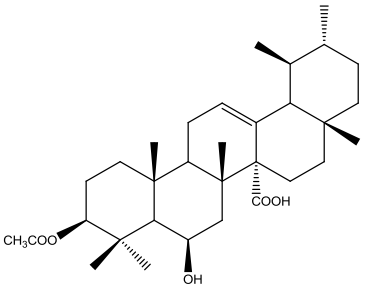
Các triterpenoid phân lập từ một số loài thuộc chi *Astilbe* được tổng hợp tại Bảng 1.3.

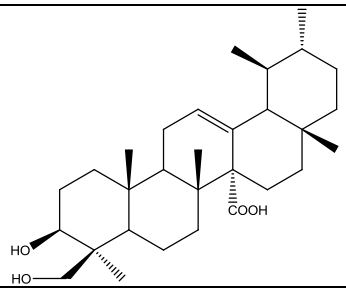
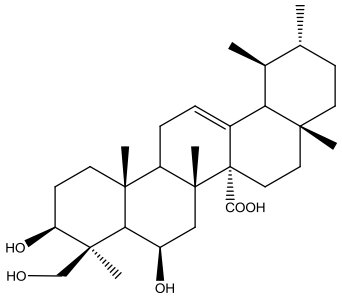
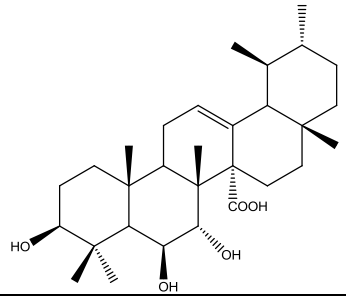
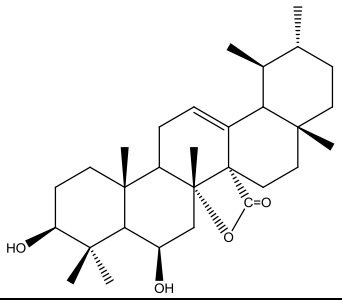
Bảng 1.3. Các triterpenoid có trong một số loài thuộc chi *Astilbe*

Số TT	Tên hợp chất	Cấu trúc hóa học	TLTK
I. Triterpenoid có khung oleanan			
1	Acid 3β-hydroxyolean-12-en-27-oic (Acid β-peltoboykinolic, **4**)		[27],[83], [111],[114], [118],[141]

2	Acid 3β-acetoxyolean-12-en-27-oic (Acid acetyl β-peltoboykinolic, **5**)		[114]
3	Acid 3β,6β -dihydroxyolean-12-en-27-oic (acid astilbic, **6**)		[83],[111], [114],[118], [131],[141]
4	Acid 3β-acetoxy-6β-hydroxyolean-12-en-27-oic **(7)**		[27]
5	Acid 3β,6β,7α -trihydroxyolean-12-en-27-oic **(8)**		[49]
6	Acid 3β,24-dihydroxyolean-12-en-27-oic **(9)**		[27]

7	Acid 3β,6β,24-trihydroxyolean-12-en-27-oic **(10)**		[27],[48-49]
8	Acid 3-oxoolean-12-en-27-oic **(11)**		[83]
9	Acid 3β,6β -dihydroxy,24-norolean-12,4(23)-dien-27-oic **(12)**		[27]
10	Acid 3α-acetoxyolean-12-en-27-oic **(13)**		[27],[111]
11	Acid 3α-hydroxyolean-5,12-dien-27-oic **(14)**		[27]
12	Acid 3α,24-dihydroxyolean-12-en-27-oic **(15)**		[83]

II. Triterpenoid có khung ursan			
13	Acid 3β-hydroxyurs-12-en-27-oic **(16)**		[27],[83], [111],[114], [141]
14	Acid 3β-acetoxyurs-12-en-27-oic **(17)**		[27]
15	Acid 3α-acetoxyurs-12-en-27-oic **(18)**		[27]
16	Acid 3β,6β-dihydroxyurs-12-en-27-oic (acid astilbotriteripenic, **19**)		[49]
17	Acid 3β-acetoxy-6β-hydroxyurs-12-en-27-oic **(20)**		[27],[48-49]

18	Acid 3β,24-dihydroxyurs-12-en-27-oic **(21)**		[111]
19	Acid 3β,6β,24-trihydroxyurs-12-en-27-oic **(22)**		[27],[49], [111]
20	Acid 3β,6β,7α-trihydroxyurs-12-en-27-oic **(23)**		[49]
21	3β,6β -Dihydroxyurs-12-en-7α,27α-olid **(24)**		[111]

1.2.1.3. Các dẫn xuất của acid benzoic

Bergenin **(25)** là *C*-glucosid của acid 4-*O*-methyl gallic (isocoumarin) được phân lập từ nhiều họ khác nhau như: Euphorbiaceae, Saxifragaceae, Myrsinaceae, Fabaceae...[99]. Hợp chất **25** có mặt trong nhiều loài thuộc chi *Astilbe*, như ở rễ, thân rễ, toàn cây của loài *A. chinensis* [66],[113],[131]*;* thân rễ của các loài *A. thunbergii* [58], *A. divaricata* [55], *A. myriantha* [141]*;* toàn cây *A. longicarpa* [66]*; A. macroflora* [138].

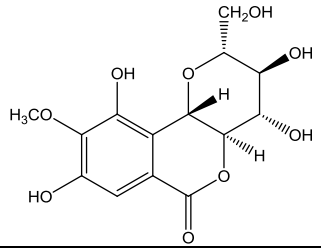
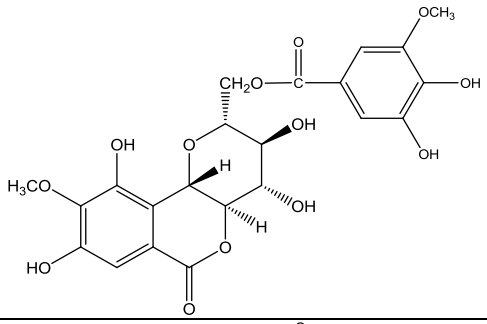
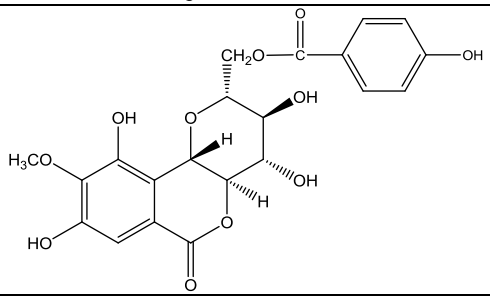
Năm 2011, Xue Y. và cs. [131] nghiên cứu thành phần hóa học từ thân

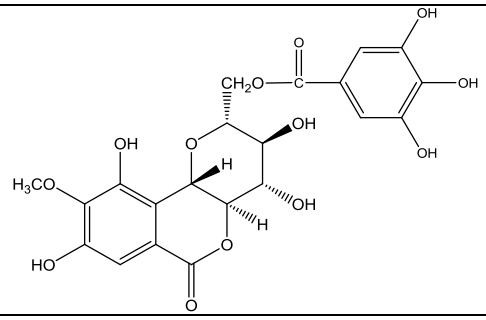
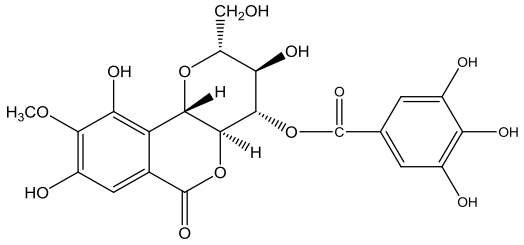
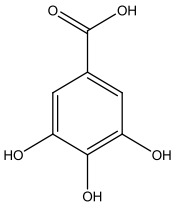
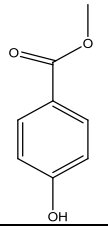
rễ loài *A. chinensis*, các tác giả đã phân lập và xác định cấu trúc được một hợp chất mới 11-*O*-(3'-methylgalloyl)-bergenin **(26)**, cùng với hợp chất **25**, 11-*O*-(4-hydroxybenzoyl bergenin **(27)**, 11-*O*-galloyl bergenin **(28)** và một số hợp chất khác. Các hợp chất **25**, **28-29** cũng được phân lập từ thân rễ loài *A. chinensis* [33].

Acid gallic **(30)**, methyl *p*-hydroxy benzoat **(31)** được Zou Y. và cs. phân lập được từ thân rễ loài *A. myriantha* [141].

Các dẫn xuất của acid benzoic phân lập được từ một số loài thuộc chi *Astilbe* được tóm tắt tại Bảng 1.4.

Bảng 1.4. Các dẫn xuất của acid benzoic có trong một số loài thuộc chi *Astilbe*

Số TT	Tên hợp chất	Cấu trúc hóa học	TLTK
1	Bergenin **(25)**		[55],[58],[66], [113],[131], [138],[141]
2	11-*O*-(3'-methylgalloyl)-bergenin **(26)**		[131]
3	11-*O*-(4-hydroxybenzoyl bergenin **(27)**		[131]

4	11-*O*-galloyl bergenin **(28)**		[33],[131]
5	4-*O*-galloyl bergenin **(29)**		[33]
6	Acid gallic **(30)**		[141]
7	Methyl *p*-hydroxy benzoat **(31)**		[141]

1.2.1.4. Flavonoid

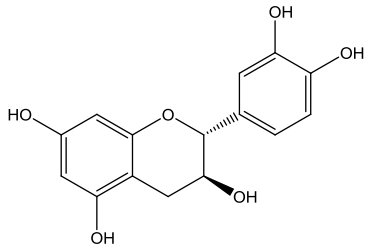
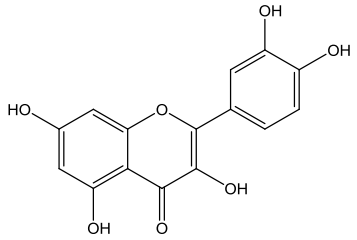
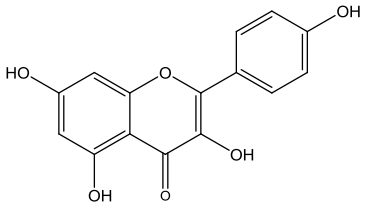
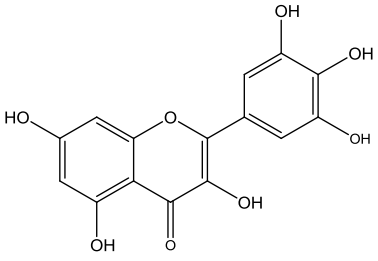
Năm 1985, Bohm B.A. và cs. [26] nghiên cứu flavonoid của chi *Astilbe* và *Rodgersia* so với chi *Aruncus* thấy rằng flavonoid của 4 loài nghiên cứu (*A. biternata, A. chinensis, A. thunbergii, A.* x*arendsii*) chủ yếu là flavonol dựa trên các alycon là quercetin, kaempferol, myricetin. Các flavonoid này ở dưới dạng hoặc aglycon hoặc liên kết với các đường ở vị trí số 3, có thể là 3-*O*-monoglycosid, 3-*O*-diglycosid, 3-*O*-triglycosid. Các đường liên kết được nhận biết là: glucose, galactose, rhamnose, arabinose và xylose. Riêng dihydrochalcon glycosid có mặt tại loài lai tạo *A.* x*arendsii*.

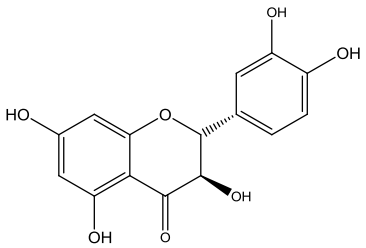
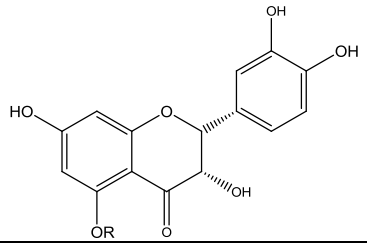
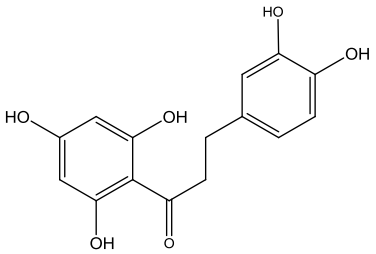
Flavonoid có aglycon là flavan-3-ol như (+)-catechin có mặt ở thân rễ loài

A.myriantha [141]; flavanonol như astilbin **(46)** trong thân rễ loài *A. thunbergii, A. longicarpa* [58],[66], isoastilbin **(47)** phân lập được từ thân rễ loài *A. chinensis* [131].

Các aglycon của flavonoid phân lập từ một số loài thuộc chi *Astilbe* được liệt kê ở Bảng 1.5.

Bảng 1.5. Các aglycon của flavonoid có trong một số loài thuộc chi *Astilbe*

Số TT	Tên aglycon	Cấu trúc hóa học	TLTK
1	(+)-Catechin		[141]
2	Quercetin		[26],[66], [118]
3	Kaempferol		[26]
4	Myricetin		[26]

5	(2*R*,3*R*)-Taxifolin		[58]
6	(2*R*,3*S*)-Taxifolin		[131]
7	2',4',6',3,4-Pentahydroxydihydro-chalcon		[26]

Flavonoid phân lập được từ một số loài thuộc chi *Astilbe* được tổng hợp ở Bảng 1.6 dưới đây.

Bảng 1.6. Flavonoid phân lập được từ một số loài thuộc chi *Astilbe*

Flavonoid	Loài						TLTK
	A. chinensis	*A. biternata*	*A. thunbergii*	*A. myriantha*	*A. xarendsii*	*A. longicarpa*	
1. Aglycon							
Quercetin **(32)**	+		+			+	[66],[118]
(+)-Catechin **(33)**	+			+			[33],[141]
2. Các flavonoid monoglycosid							
2.1. Flavonoid -3-*O*-monoglycosid							
- Quercetin aglycon							
Quercetin-glucosid (isoquercitrin, **34**)	+	+	+		+		[26]
Quercetin-rhamnosid (quercitrin, **35**)	+		+		+		
Quercetin-galactosid **(36)**	+	+	+		+		
Quercetin-arabinosid **(37)**	+	+	+		+		
Quercetin-xylosid **(38)**		+					
- Kaempferol aglycon							
Kaempferol-glucosid **(39)**	+	+	+		+		[26]
Kaempferol-galactosid **(40**	+	+	+		+		
Kaempferol-rhamnosid **(41)**	+		+		+		
Kaempferol-arabinosid **(42)**			+		+		
- Myricetin aglycon							

Myricetin-glucosid **(43)**			+				[26]
Myricetin-rhamnosid **(44)**			+				[26]
Myricetin-arabinosid **(45)**			+				
- (2R,3R)-Taxifolin aglycon							
(2*R*,3*R*)-Taxifolin-rhamnosid (astilbin, **46**)	+		+			+	[58],[66]
- (2R,3S)-Taxifolin aglycon							
(2*R*,3*S*)-Taxifolin-rhamnosid (isoastilbin, **47**)	+						[131]
2.2. Flavonoid-2'-*O*-monoglycosid							
-2',4',6',3,4-Pentahydroxydihydrochalcon aglycon							
2',4',6',3,4-Pentahydroxydihydrochalcon-2'-*O*-glucosid **(48)**					+		[26]
2',4',6',3,4-Pentahydroxydihydrochalcon-2'-*O*-galactosid **(49)**					+		
3. Flavonoid-3-*O*-diglycosid							
- Quercetin aglycon							
Quercetin-rutinosid (rutin, **50**)	+		+		+		[26]
Quercetin-glucosyl-glucosid **(51)**		+			+		

Quercetin-galactosyl-galactosid **(52)**		+					[26]
Quercetin-glucosyl-xylosid **(53)**			+		+		
Quercetin-galactosyl-xylosid **(54)**			+				
- Kaempferol aglycon							
Kaempferol-rutinosid **(55)**	+		+				[26]
Kaempferol-glucosyl-xylosid **(56)**			+		+		
Kaempferol-glucosyl-glucosid **(57)**		+					
Kaempferol-galactosyl-xylosid **(58)**			+				
4. Flavonoid-3-*O*-triglycosid							
- Quercetin aglycon							
Quercetin-glucosyl-xylosyl-xylosid **(59)**					+		[26]
Quercetin-glucosyl-(rhamnosyl-xylosid hoặc xylosyl-rhamnosid)*** (60)**			+				
- Kaempferol aglycon							
Kaempferol-glucosyl-xylosyl-xylosid **(61)**					+		[26]
Kaempferol-glucosyl-(rhamnosyl-xylosid hoặc xylosyl-rhamnosid)*** (62)**	+						

Ghi chú: +: có mặt hợp chất; ***** : chưa xác định được trình tự liên kết của các phân tử đường.

1.2.1.5. Các hợp chất khác

Acid 2-hydroxyphenylacetic **(63)** được báo cáo có mặt ở toàn cây *A. chinensis, A. longicarpa* [66].

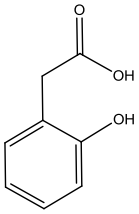
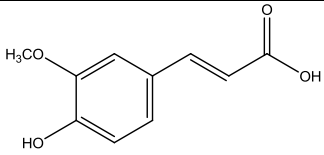
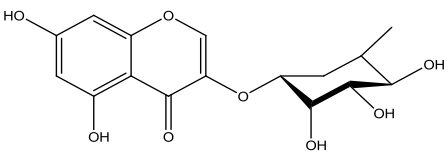
Acid hydrocyanic **(64)** được phân lập từ loài *A. chinensis* [139].

Năm 2012, Zou Y. [140] đã tách và xác định cấu trúc acid 4-hydroxy-3-methoxycinnamic (acid ferulic, **65**) từ thân rễ loài *A. myriantha*.

3,5,7-trihydroxychromon 3-*O*-α-L-rhamnopyranosid (eucryphin, **66**) là một glycosid có khung chromon, lần đầu tiên được phân lập và xác định cấu trúc từ vỏ loài *Eucryphia cordifolia* (Cunoniaceae) [122]. Hợp chất **66** cũng được phân lập từ thân rễ loài *A. thunbergii* và *A. chinensis,* có tác dụng làm nhanh lành vết bỏng trên chuột [112],[131].

Một số hợp chất khác phân lập từ các loài thuộc chi *Astilbe* được liệt kê ở Bảng 1.7.

Bảng 1.7. Một số hợp chất khác phân lập từ các loài thuộc chi *Astilbe*

Số TT	Tên hợp chất	Cấu trúc hóa học	TLTK
1	Acid 2-hydroxy phenylacetic **(63)**		[66]
2	Acid hydrocyanic **(64)**		[139]
3	Acid 4-hydroxy-3-methoxycinnamic (acid ferulic, **65**)		[141]
4	3,5,7-trihydroxychromon 3-*O*-α-L-rhamnopyranosid (eucryphin **66**)		[112],[131]

1.2.2. Thành phần hóa học của cây Lạc tân phụ

Hiện nay, ở Việt Nam chưa có công trình nào nghiên cứu về thành phần hóa học của loài *A. rivularis.* Trên thế giới cũng có một số tác giả Ấn Độ, Nepal, Trung Quốc đã đề cập đến nhưng kết quả công bố còn chưa nhiều.

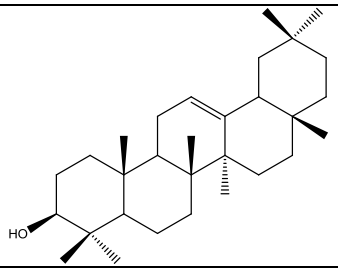
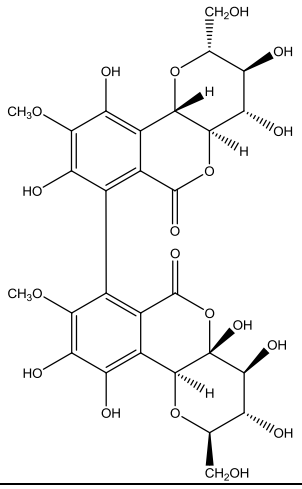
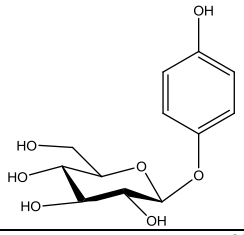
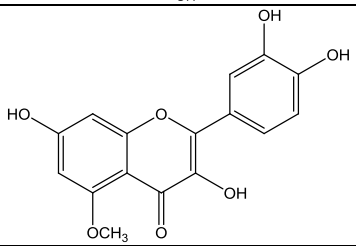
Theo các công trình nghiên cứu đã công bố, phần trên mặt đất của loài *A. rivularis* có *β*-sitosterol **(1)**, bergenin (**25)**, các triterpenoid: acid 3*β*-hydroxyolean-12-en-27-oic **(4)**, acid astilbic **(6)**, 3*β*-hydroxyolean-12-en **(67)** và các flavonoid: quercetin **(32)**, azaleatin **(70)** [43],[142]; từ thân rễ phân lập được hợp chất **25** và 3 triterpenoid **4-6** [43].

Năm 2011, Rajbhandari M. [97] nghiên cứu phân lập các chất theo định hướng tác dụng kháng virus của các phân đoạn cao chiết MeOH từ thân rễ loài *A. rivularis*, kết quả phân lập và xác định được cấu trúc 3 hợp chất: **(25)**, dimer bergenin **(68)** và hydroquinon *β*-D-glucopyranosid (arbutin, **69**).

Các hợp chất phân lập được từ loài *A. rivularis* được tổng hợp tại Bảng 1.8.

Bảng 1.8. Các hợp chất phân lập từ loài *A. rivularis*

Số TT	Tên hợp chất	Cấu trúc hóa học	TLTK
1	*β*-Sitosterol **(1)**	Cấu trúc như Bảng 1.3	[43]
2	Acid 3*β*-hydroxyolean-12-en-27-oic **(4)**	Cấu trúc như Bảng 1.3	
3	Acid 3*β*-acetoxyolean-12-en-27-oic **(5)**	Cấu trúc như Bảng 1.3	
4	Acid astilbic **(6)**	Cấu trúc như Bảng 1.3	
5	Bergenin **(25)**	Cấu trúc như Bảng 1.4	[43],[97]
6	Quercetin **(32)**	Cấu trúc như Bảng 1.5	

7	3β-Hydroxyolean-12-en (β-amyrin, **67**)		[43]
8	Dimer bergenin **(68)**		[97]
9	Hydroquinon β-D-glucopyranosid (arbutin, **69**)		
10	Azaleatin **(70)**		[142]

Tóm lại: qua tập hợp các công trình nghiên cứu đã công bố về thành phần hóa học của loài *A. rivularis* trên thế giới, thấy rằng cũng chứa các nhóm chất rất đặc trưng của chi *Astilbe* là các oleanan triterpenoid có nhóm carboxylic ở vị trí C-27, bergenin và flavonoid. Đây là những dữ liệu hữu ích trong việc định hướng nghiên cứu thành hóa học, tác dụng sinh học của cây Lạc tân phụ mọc ở Việt Nam.

1.3. TÁC DỤNG SINH HỌC VÀ CÔNG DỤNG

1.3.1. Tác dụng sinh học, công dụng của một số loài thuộc chi *Astilbe*

1.3.1.1. Tác dụng sinh học

a) Tác dụng chống oxy hóa, chống viêm, giảm đau

Theo công trình nghiên cứu của Na M.K. và cs., cao chiết EtOH từ thân rễ loài *A. chinensis* có tác dụng chống oxy hóa trên 3 mô hình thí nghiệm: dọn gốc tự do DPPH, dọn gốc tự do hydroxyl và ức chế peroxyd hóa lipid lần lượt là 90,6 ± 1,6%, 42,1 ± 1,9%, 90,5 ± 1,1% ở nồng độ 100 μg/ml. Trong nghiên cứu này, cao chiết EtOH từ thân rễ loài *A. koreana* cũng có tác dụng chống oxy hóa ở cả 3 mô hình trên [80].

Từ kết quả quá trình sàng lọc chống oxy hóa [80], Na M.K. và cs. nghiên cứu hiệu quả cao chiết EtOH từ loài *A. chinensis* và *A. koreana* đối với đáp ứng viêm gây ra do chiếu tia UV B (35 mJ/cm^2). Kết quả thấy rằng chúng có hiệu quả ức chế viêm do tác nhân UV B trên tế bào sừng người bởi các cơ chế: ngăn cản sản xuất PG E_2 (nồng độ PG E_2 lần lượt: 1043,7 ± 118,0; 1076,9 ± 136,0 pg/ml sau khi dùng cao chiết loài *A. koreana; A. chinensis* với nồng độ 50 μg/ml trong 24 giờ so với 2225,0 ± 141,2; 2281,1 ± 136,0 pg/ml không dùng cao chiết); ức chế sản xuất NO (nồng độ NO sau khi dùng cao chiết *A. koreana; A. chinensis* là 6,25, 12,5, 25,0, 50,0 μg/ml trong 12 giờ lần lượt: 220,1 ± 10,9, 188,9 ± 8,5, 150,9 ± 5,2, 140,9 ± 7,4 μM; 208,3 ± 11,1, 185,0 ± 7,5, 154,3 ± 6,0, 132,0 ± 8,2 μM so với 235,0 ± 11,6; 215,3 ± 13,8 μM không dùng cao chiết). Tác dụng này có thể do ức chế tích lũy ROS nội tế bào [81-82].

Năm 2005, Moon T.C và cs. [78] nghiên cứu tác dụng chống viêm của acid astilbic **(6)** phân lập từ loài *A. chinensis*, kết quả thấy rằng hợp chất **6** ức chế sản xuất leukotrien phụ thuộc vào 5-lipooxygenase (leukotriene5-lipooxygenase-dependent leukotriene) trên tế bào mast phân lập từ tủy xương chuột theo nồng độ với IC_{50} = 2,1 μM. Ngoài ra, hợp chất **6** còn ức chế cơn quặn đau trên chuột gây ra do tiêm màng bụng chuột dung dịch acid acetic 0,7% (ức chế 47 - 62% ở liều 0,4 - 50 mg/kg) trong khi aspirin dùng liều 200 mg/kg có

tác dụng ức chế 62% .

b) Ức chế enzym PTP 1B, elastase, tyrosinase và α-glucosidase

Theo Na M.K. và cs. [83], cao chiết MeOH từ thân rễ loài *A. koreana* có tác dụng ức chế enzym PTP 1B với IC_{50} = 22,7 μg/ml. Cao chiết này được phân đoạn lần lượt bằng các dung môi Hx, EtOAc, BuOH và nghiên cứu tác dụng ức chế enzym PTP 1B, thấy rằng phân đoạn EtOAc có tác dụng mạnh nhất với IC_{50} = 9,5 μg/ml. Từ đó, các tác giả phân lập được 5 triterpenoid có tác dụng ức chế enzym PTP 1B với IC_{50} = 4,9 - 12,8 μg/ml.

Lee S.H. và cs. nghiên cứu tác dụng ức chế enzym elastase và tyrosinase của cao chiết MeOH từ thân rễ *A. chinensis* ở các phân đoạn khác nhau. Kết quả thấy rằng phân đoạn nước có tác dụng ức chế hai enzym tốt nhất (nồng độ phản ứng 20 μg 155 μl^{-1} ức chế enzym elastase 92%; ở nồng độ phản ứng 20 μg 150 μl^{-1} ức chế enzym tyrosinase nước 90%) [64].

Năm 2011, Sancheti S. và cs. tiến hành sàng lọc tác dụng ức chế enzym α-glucosidase của cao chiết các cây thuốc cho thấy cao chiết MeOH từ thân rễ loài *A. chinensis* (Hàn Quốc) có tác dụng ức chế mạnh enzym α-glucosidase với IC_{50} = 30 ± 2 μg/ml [104].

c) Tác dụng nhanh lành vết bỏng

Các nhà khoa học Nhật Bản cho biết cao chiết EtOH và phân đoạn tan/EtOAc có tác dụng nhanh làm lành vết bỏng; phân đoạn không tan/EtOAc không có tác dụng. Nhóm nghiên cứu đã phân lập được 3 hợp chất bergenin **(25)**, astilbin **(46),** eucryphin **(66)** đều có tác dụng nhanh làm lành vết bỏng với ED_{50} lần lượt là 190, 64, 4 μg/vết bỏng. Hợp chất **66** có tác dụng mạnh nhất [58]. Cơ chế tác dụng của hợp chất này có thể là tăng sự hình thành mạch ở chỗ da bị tổn thương do thúc đẩy quá trình sản xuất VEGF, TGF-β1 (tạo ra do tăng biểu hiện HIF-1α) ở trong tế bào sừng [112].

d) Tác dụng chống nấm

Nghiên cứu của Song Q.Y. và cs. cho thấy cao chiết EtOH 95% từ rễ loài *A. myriantha* có tác dụng ức chế nấm *Colletotrichum gloeosporioides* (tốc độ ức chế: 1,54% ở nồng độ 1.000 mg/ml trong vòng 72 giờ). Trong số 7 triterpenoid phân lập được, acid 3*β*,6*β*,24-trihydroxyurs-12-en-27-oic **(22)** có tác dụng ức chế mạnh nhất *C. gloeosporioides* (tốc độ ức chế > 68% ở nồng độ 100 mg/ml trong vòng 72 giờ) và có phổ rộng tác dụng ức chế các nấm gây bệnh ở thực vật như: *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* f.sp. Niveum, *Fusarium oxysporum* f. sp. Cubens, *C. gloeosporioides, C. lagenarium, Penicillium citrinum, Penicillium digitatum* với EC_{50} trong khoảng 13,9 - 34,0 μg/ml [111].

e) Tác dụng kháng khối u

Theo nghiên cứu của Tu J. và cs., phân đoạn triterpenoid từ thân rễ loài *A. chinensis* không những có tác dụng ức chế rõ ràng sự phát triển của chuột mang khối u mà còn tăng sinh đáng kể tế bào lách, tăng tác dụng tế bào NK và mức độ bài tiết IL-2 bởi tế bào lách trên chuột mang khối u, thúc đẩy phản ứng quá mẫn kiểu muộn và tăng kháng lượng kháng thể anti-SRBC trên chuột không mang khối u. Điều này chỉ ra phân đoạn triterpenoid cải thiện cả hai đáp ứng miễn dịch tế bào đặc hiệu, không đặc hiệu và miễn dịch thể dịch [124].

Các công trình nghiên cứu dược lý về triterpenoid phân lập được từ chi *Astilbe* cho thấy một số triterpenoid có tác dụng độc tế bào, kháng khối u và gây cảm ứng, thúc đẩy sự chết tế bào ung thư theo chương trình trên mô hình *in vitro.* Tác dụng kháng khối u của các triterpenoid được tổng hợp ở Bảng 1.9.

Bảng 1.9. Tác dụng kháng khối u của triterpenoid phân lập được từ một số loài thuộc chi *Astilbe*

Số TT	Tên hợp chất	Tác dụng	TLTK
1	Acid 3*β*-hydroxyolean-12-en-27-oic **(4)**	- Độc mạnh với các dòng tế bào ung thư người *in vitro:* HO-8910 (ung thư biểu mô buồng trứng), HeLa (ung thư cổ tử cung),	[115-116],

		HL-60 (bệnh bạch cầu cấp), COLO-205 (ung thư biểu mô đại - trực tràng người) với IC_{50} lần lượt 8,01 ± 0,89, 3,94 ± 0,13, 3,67 ± 0,19, 7,31 ± 0,24 μg/ml. - Gây cảm ứng, thúc đẩy sự chết tế bào HO-8910, COLO-205, HeLa theo chương trình.	[123]
2	Acid 3*β*-acetoxyolean-12-en-27-oic **(5)**	- Độc mạnh với các dòng tế bào ung thư người *in vitro:* HO-8910, HeLa, HL-60 với IC_{50} lần lượt 12,90 ± 1,92, 6,11 ± 0,38, 12,55 ± 1,27 μg/ml.	[115]
3	Acid astilbic **(6)**	- Độc mạnh với các dòng tế bào ung thư người *in vitro:* HO-8910, HeLa, HL-60 với IC_{50} lần lượt 22,24 ± 0,57, 11,91 ± 1,02, 24,24 ± 3,82 μg/ml. - Ức chế sự tăng sinh và gây cảm ứng, thúc đẩy sự chết tế bào COLO-205 theo chương trình.	[115], [137]
4	Acid 3*β*,6*β*,7*α*-trihydroxyolean-12-en-27-oic **(8)**	- Độc với các dòng tế bào SK-N-SH (u nguyên bào thần kinh người) và HL-60 có ý nghĩa với IC_{50} lần lượt là 17,94 và 37,00 μg/ml.	[49]
5	Acid 3*β*,6*β*,24-trihydroxyolean-12-en-27-oic **(10)**	- Độc với các dòng tế bào SK-N-SH và HL-60 có ý nghĩa với IC_{50} lần lượt là 34,98 và 38,19 μg/ml.	[49]
6	Acid 3*β*-hydroxyurs-12-en-27-oic **(16)**	- Độc mạnh với 8 dòng tế bào ung thư như hợp chất **19**, với IC_{50} trong khoảng 4 - 8 μg/ml.	[134]
7	Acid 3*β*-acetoxyurs-	- Độc với dòng tế bào HL-60 với IC_{50} =	

	12-en-27-oic **(17)**	5,1 μM.	[27]
8	Acid 3α-acetoxyurs-12-en-27-oic **(18)**	- Độc với dòng tế bào HL-60 với IC_{50} = 3,9 μM.	[27]
9	Acid 3β,6β-dihydroxyurs-12-en-27-oic **(19)**	- Độc mạnh với 7 dòng tế bào ung thư người: Bcap37 (ung thư biểu mô vú), HeLa, HepG2 (ung thư gan), HO-8910, K562 (bệnh bạch cầu cấp), PAA (ung thư tế bào tuyến phổi), SGC7901 (ung thư biểu mô dạ dày) và 1 dòng ung thư trên chuột: P388 (bệnh bạch cầu cấp) với IC_{50} trong khoảng 8 - 19 μg/ml. - Gây cảm ứng, thúc đẩy sự chết tế bào HeLa theo chương trình.	[134]
10	Acid 3β-acetoxy-6β-hydroxyurs-12-en-27-oic **(20)**	- Độc với dòng tế bào HL-60 với IC_{50} = 9,6 μM.	[27]
11	Acid 3β,6β,24-trihydroxyurs-12-en-27-oic **(22)**	- Độc với các dòng tế bào SK-N-SH và HL-60 có ý nghĩa với IC_{50} lần lượt là 31,82 và 10,19 μg/ml.	[49]
12	Acid 3β,6β,7α-trihydroxyurs-12-en-27-oic **(23)**	- Độc với các dòng tế bào SK-N-SH và HL-60 có ý nghĩa với IC_{50} lần lượt là 44,28 và 19,04 μg/ml.	[49]

1.3.1.2. Công dụng

Các loài *A. rivularis, A. japonica, A. chinensis, A. thunbergii* được người Trung Hoa gọi là Hồng thăng ma (Hong Shengma), người Nhật gọi là Aka-Shouma, sử dụng làm thuốc chữa bệnh thay thế vị thuốc "Thăng ma" [58],[89]. Hồng Thăng ma được sử dụng để điều trị vết thương, bầm tím do chấn thương, động vật cắn, hoại tử do tê cóng, vết bỏng, viêm da do nhiễm trùng, chữa phong

thấp, đau đầu, đau dạ dày,...[58],[89].

1.3.2. Tác dụng sinh học, công dụng của cây Lạc tân phụ

1.3.2.1. Tác dụng sinh học

a) Tác dụng chống oxy hóa, chống viêm

Năm 2009, Madal P. và cs. [73] nghiên cứu khả năng chống oxy hóa *in vitro* của cao chiết MeOH từ thân rễ loài *A. rivularis* ở các phân đoạn rửa giải sắc ký cột với các dung môi khác nhau, thấy rằng nồng độ 100 μg/ml ở phân đoạn rửa giải diethyl ether trong EtOAc có khả năng dọn gốc tự do 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) là 95,23%; phân đoạn rửa giải aceton trong EtOH có tác dụng dọn gốc $O_2^{\bullet-}$ là 80,4% so với quercetin và phân đoạn rửa giải EtOH trong MeOH có tác dụng chống peroxid hóa lipid là 45,83% so với cucurmin. Cũng trong nghiên cứu này, hỗn hợp 4 phân đoạn rửa giải có khả năng dọn gốc tự do DPPH > 90% được thử tác dụng chống viêm trên mô hình gây phù bàn chân chuột bằng carrageenan. Kết quả với liều 200 mg/kg sau 24 giờ tỷ lệ ức chế là 56,2% (ibuprofen ở liều 20 mg/kg sau 24 giờ tỷ lệ ức chế là 48,18%).

b) Tác dụng kháng khuẩn, kháng virus, độc với tế bào

Năm 2009, Rajbhandari M. và cs. [96] nghiên cứu tác dụng chống virus của cao chiết MeOH từ 47 loài thuộc 27 họ thực vật được sử dụng trong y học cổ truyền Nepal. Kết quả nghiên cứu cho thấy chỉ có cao chiết thân rễ loài *A. rivularis* và *Bergenia ciliata* có tác dụng mạnh nhất chống lại HSV-1 với IC_{50} < 6,25 μg/ml, Human influenza A với IC_{50} lần lượt < 6,25 và 9,0 μg/ml ở nồng độ không độc với tế bào.

Năm 2012, Adhikari P. và cs. [20] nghiên cứu tác dụng kháng khuẩn, độc với tế bào của cao chiết MeOH từ thân rễ loài *A. rivularis*, kết quả cho thấy có tác dụng kháng khuẩn mạnh *E. coli* (MIC = 0,011 mg/ml), độc nhẹ tế bào (độc với ấu trùng tôm biển: LC_{50} = 92,01 μg/ml).

c) Tác dụng chống loét đường tiêu hóa

Nghiên cứu của Mitra P. và cs. về tác dụng chống loét đường tiêu hóa của các phân đoạn tách bằng TLC từ cao rễ *A. rivularis* trong MeOH trên các mô hình gây loét dạ dày chuột bằng EtOH, indomethacin, acid hydrocloric, stress do phải bơi, thắt môn vị và mô hình gây loét tá tràng chuột bằng cysteamin, so sánh với omeprazol. Kết quả thấy rằng có một phân đoạn có tác dụng chống loét đường tiêu hóa chuột trên tất cả các mô hình nghiên cứu, tuy nhiên vẫn kém so với omeprazol [76].

1.3.2.2. Công dụng

a) Tính vị, tác dụng

- Rễ, thân rễ có vị cay, hơi đắng, tính ấm, có tác dụng hành khí, chỉ thống, hoạt huyết, tán ứ, khu phong trừ thấp [5],[142].

- Toàn cây khu phong trừ thấp [5].

b) Công dụng

- Theo y học cổ truyền Trung Quốc: thân rễ Lạc tân phụ được gọi là Hồng thăng ma, dùng để thay thế vị thuốc Thăng ma [58],[126].

Rễ, thân rễ Lạc tân phụ chữa trị chứng ngã sưng đau, phong thấp nhức mỏi, viêm dạ dày mãn tính, lở chảy nước vàng (hoàng thuỷ sang) [5],[89],[126], [142]. Ngoài ra, một số dân tộc ở tỉnh Vân Nam - Trung Quốc còn dùng thân rễ Lạc tân phụ chữa bệnh tim do phong thấp, vết thương chảy máu ngoài da; rễ chữa bệnh lao, viêm gan, kiết lị, bệnh vô sinh, vết thương bầm tím, sa tử cung [126]; rễ, thân, toàn cây chữa viêm khớp dạng thấp, chứng sưng đau do bị ngã, viêm dạ dày, trúng gió, đau lưng [63],[68].

- Các dân tộc ở dãy núi Himalaya thuộc Nepal, Ấn Độ sử dụng Lạc tân phụ để chữa bong gân, sưng cơ, giảm đau trong đau đầu, đau răng, đau nhức cơ thể, sốt, buồn nôn, chóng mặt, co thắt tử cung sau khi sinh, lị, ỉa chảy, đau dạ dày, chảy máu, vàng da, vô sinh, thuốc bổ trong trường hợp cơ thể suy nhược, rối loạn kinh nguyệt, kích thích tình dục [19],[25],[34],[43],[51],[70-72],[94].

c) Cách dùng, liều dùng

- Dịch toàn cây đắp chữa bong gân, sưng cơ [71-72].

- Rễ, thân, toàn cây: dùng dạng sắc, nước tắm chữa viêm khớp dạng thấp, chứng ngã sưng đau, viêm dạ dày, trúng gió, đau lưng [63],[68]. Thân rễ dùng sắc uống 9 - 15 g hoặc ngâm rượu [142].

- Thân rễ được nhai như nhai trầu cau và giảm đau [34].

- Dịch ép của rễ, hoặc bột trộn với mật ong uống để phục hồi sức khỏe sau khi sinh hoặc cầm chảy máu kinh nguyệt quá mức. Uống 6 thìa cà phê dịch này x 3 lần/ngày trong trường hợp loét đường tiêu hóa, ỉa chảy, lị [72].

- Bột rễ được uống với nước nóng hoặc với sữa điều trị các triệu chứng sốt, buồn nôn/chóng mặt, đau đầu và vô sinh, vàng da [43],[51].

- Một vài mảnh thân rễ tươi được sử dụng dưới dạng trà thuốc hoặc thuốc đắp hoặc dưới dạng bột để điều trị đau răng, dùng đến khi khỏi. Một vài mảnh thân rễ sắc thuốc uống 1 - 2 lần/ngày để điều trị đau người trong lúc sinh; tiếp tục dùng vài ngày đến khi khỏi. Thuốc sắc cũng được dùng 1 - 2 ngày để cầm chảy máu nội tạng, giảm đau. Trộn 1 thìa cà phê bơ với 100 gam thân rễ uống 1 - 3 lần/ngày x 3 ngày trong khi sinh để giảm sự co thắt tử cung. Vỏ rễ được sử dụng để điều trị đau người, rối loạn kinh nguyệt. Lá được dùng để làm sạch máu [70].

CHƯƠNG 2. NGUYÊN VẬT LIỆU, TRANG THIẾT BỊ VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. NGUYÊN VẬT LIỆU, TRANG THIẾT BỊ NGHIÊN CỨU

2.1.1. Nguyên liệu nghiên cứu

Nguyên liệu nghiên cứu là cây Lạc tân phụ (*Astilbe rivuralis* Buch.-Ham. ex D. Don), mọc tự nhiên ở vùng núi cao xã Bản Khoang, huyện Sa Pa, tỉnh Lào Cai. Thu hái toàn bộ cây Lạc tân phụ vào tháng 8, 11/2010; tháng 7, 9/2011; 12/2013, rửa sạch. Lấy riêng phần trên mặt đất (lá kép, thân khí sinh) và dưới mặt đất (thân rễ, rễ), sấy khô ở nhiệt độ 50 ^{o}C, tán nhỏ.

2.1.2. Động vật, tế bào thí nghiệm

- Chuột nhắt trắng chủng Swiss, cả hai giống, cân nặng từ 18 - 22 g, khỏe mạnh do Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương cung cấp. Động vật giống đực dùng cho thí nghiệm đánh giá tác dụng dược lý, động vật giống cái dùng cho thử nghiệm độc tính cấp.

- Chuột cống trắng chủng Wistar, giống đực, 8 - 10 tuần tuổi, cân nặng từ 140 - 160 g, khỏe mạnh do Học viện Quân y cung cấp.

Động vật được nuôi ổn định với điều kiện phòng thí nghiệm Bộ môn Dược lực, Trường Đại học Dược Hà Nội ít nhất 5 ngày trước khi thực hiện nghiên cứu. Được nuôi dưỡng bằng thức ăn tiêu chuẩn do Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương cung cấp, uống nước tự do.

- Nguyên bào cơ chuột C2C12 (Mouse muscle myoblasts C2C12) của hãng ATCC (Manassas, VA, Mỹ).

2.1.3. Thuốc thử, hóa chất, dung môi

- DPPH, xanthin, insulin, 2-deoxy-glucose, carrageenan, xanthin oxidase (XO), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromid (MTT) của hãng Sigma Aldrich (Mỹ).

- Nitroblue tetrazolium (NBT) của hãng Merck (Đức).

- Indomethacin, prednisolon, codein phosphat: đạt tiêu chuẩn DĐVN IV.

- Môi trường nuôi cấy tế bào: Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS) của hãng Gibco BRL (Grand Island, NE, Mỹ).

- 2-Deoxy-[^{3}H]-glucose của hãng PerkinElmer Life Sciences (Boston, MA, Mỹ).

- Rosiglitazon của hãng Masung & Co., Ltd (Seoul, Hàn Quốc).

- Các hóa chất, dung môi khác đạt tiêu chuẩn phân tích hoặc DĐVN IV.

2.1.4. Máy móc, thiết bị

- Quan sát, phân tích hoa, quả, hạt, tiêu bản thực vật, chụp ảnh trực tiếp trên kính hiển vi Leica Wetzlar GmbH, kính soi nổi Krussoptroni, máy ảnh kỹ thuật số Canon shot S400 tại Bộ môn Thực vật - Trường Đại học Dược Hà Nội.

- Máy đo phổ UV: UV-1800 (Shimadzu, Nhật Bản); máy cất quay chân không: Buchi Rotavapor R220 và R210 (Thụy Sĩ), Khoa Hóa phân tích - Tiêu chuẩn, Viện Dược liệu.

- Máy đo phổ hồng ngoại: Impact 410 Nicolet (Mỹ), Viện Hoá học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam; Thermo Nicolet 380 (Mỹ), Trường Đại học Quốc gia Chung Nam (Hàn Quốc); IR Affinity -1 (Shimadzu, Nhật Bản), Trường Cao đẳng Dược Phú Thọ.

- Máy đo phổ khối lượng ion hóa phun mù điện tử (ESI-MS): Agilent 1100 LC/MSD Trap SL (Mỹ); máy đo phổ khối lượng ion hóa phun mù điện tử phân giải cao (HR-ESI-MS): FT-ICR-MS Varian 920-MS (Mỹ), Viện Hoá học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam và JMS 700 Mstation (Nhật Bản), Trường Đại học Quốc gia Chung Nam (Hàn Quốc).

- Máy đo nhiệt độ nóng chảy: Stuart SMP 10 (Anh); tủ sấy chân không: Labtech LVO-2040 (Hàn Quốc), Trường Cao đẳng Dược Phú Thọ.

- Phân cực kế: Jasco P-2000 (Nhật Bản); máy sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC): Gilson UV/VIS 155, sử dụng cột YMC Triart C18 (5 μm, 250 mm x 4,6 mm); máy đọc vi đĩa: Tecan microplate reader (Männedorf, Thụy Sĩ), Khoa

Dược - Trường Đại học Quốc gia Chung Nam (Hàn Quốc).

- Máy đo phổ cộng hưởng từ hạt nhân: Bruker AM500 FT-NMR (Mỹ), Viện Hoá học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam; Bruker DMX 300, Bruker DMX 600 (Đức), Trường Đại học Quốc gia Chung Nam, Hàn Quốc.

- Máy đo thể tích chân chuột Plethysmometer (Ugo Basile, Ý); máy đo đau dùng mâm nóng (Ugo Basile, Ý), Bộ môn Dược lực - Trường Đại học Dược Hà Nội.

2.2. ĐỊA ĐIỂM NGHIÊN CỨU

2.2.1. Nghiên cứu thực địa

Xã Bản Khoang, huyện Sa Pa, tỉnh Lào Cai.

2.2.2. Nghiên cứu trong phòng thí nghiệm

- Nghiên cứu thực vật: Bộ môn Thực vật - Trường Đại học Dược Hà Nội; Khoa Hóa phân tích - Tiêu chuẩn, Khoa Tài nguyên Dược liệu - Viện Dược liệu; Phòng Thực vật - Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật.

- Nghiên cứu về hóa học: Khoa Hóa phân tích - Tiêu chuẩn, Viện Dược liệu; Trường Cao đẳng Dược Phú Thọ; Trung tâm các phương pháp phổ ứng dụng, Viện Hóa học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam; Khoa Dược - Đại học Quốc gia Chung Nam (Hàn Quốc).

- Nghiên cứu về dược lý:

+ Đánh giá tác dụng chống oxy hóa: Khoa Hóa phân tích - Tiêu chuẩn, Viện Dược liệu;

+ Thử độc tính cấp, đánh giá tác dụng chống viêm, giảm đau: Bộ môn Dược lực - Trường Đại học Dược Hà Nội;

+ Đánh giá tác dụng làm tăng cường hấp thu glucose: Bộ môn Dược lý, Khoa Dược - Đại học Quốc gia Chung Nam (Hàn Quốc).

2.3. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.3.1. Nghiên cứu về thực vật học

2.3.1.1. Mẫu tiêu bản thực vật

Theo phương pháp thu thập và làm mẫu thực vật hiện hành. Trong đó, mẫu được lấy cả cây, đủ các bộ phận. Mẫu được lấy vào 2 thời kỳ cây đang có hoa và khi có quả già, gồm các lần thu thập vào tháng 8, 11 năm 2010 và tháng 7, 9/2011. Nơi lấy mẫu: xã Bản Khoang, huyện Sa Pa, tỉnh Lào Cai. Mẫu được ép, sấy khô và khâu trên bìa cứng theo quy định.

Các mẫu tiêu bản được lưu trữ tại: Phòng thực vật - Viện Sinh thái - Tài nguyên sinh vật, số hiệu: Phạm Quốc Tuấn 001; Khoa Tài nguyên Dược liệu - Viện Dược liệu, số hiệu: Phamquoctuan 02.

2.3.1.2. Xác định tên khoa học

Theo phương pháp so sánh hình thái, được đối chiếu bởi các khoá phân loại đến loài và thứ (var.) của chi *Astilbe* Buch.-Ham ex D. Don, họ Saxifragaceae trong các bộ Thực vật chí Trung Quốc [129], Pakistan [144], Ấn Độ thuộc Anh [47], Ấn Độ [40]; Cây cỏ Việt Nam của Phạm Hoàng Hộ [9],...

Việc thẩm định lại kết quả xác định tên khoa học các mẫu thu thập, được thực hiện bởi:

- Một số chuyên gia về phân loại thực vật ở Việt Nam: tại phòng Thực vật - Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật (Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam) và Khoa Tài nguyên Dược liệu - Viện Dược liệu;

- Đối chiếu với các mẫu cùng loài đã được xác định, đang được lưu trữ tại Bảo tàng thực vật - Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật và qua website của Kew Royal Botanic Gardens.

2.3.1.3. Nghiên cứu giải phẫu

Theo phương pháp nghiên cứu hình thái giải phẫu thực vật, bao gồm các bộ phận thân (thân khí sinh, thân rễ), lá chét và rễ. Các tiêu bản giải phẫu được làm theo phương pháp nhuộm kép (đỏ carmin và xanh methylen) [2],[4]. Quan sát dưới kính hiển vi soi nổi và chụp ảnh bằng máy ảnh kỹ thuật số.

2.3.2. Nghiên cứu về hoá học

2.3.2.1. Phương pháp định tính

Chiết xuất, định tính sơ bộ các nhóm chất theo phương pháp phân tích sàng lọc các nhóm hợp chất thiên nhiên có trong dược liệu bằng các phản ứng hóa học và TLC [8],[16],[30],[75].

2.3.2.2. Phương pháp chiết xuất, phân lập các hợp chất

- Dược liệu được chiết bằng MeOH, phân đoạn bằng các dung môi có độ phân cực tăng dần [8].

- Phân lập các chất bằng sắc ký cột (CC): chất hấp phụ là silica gel pha thuận (230 - 400 mesh, Rankem - Ấn Độ và 70 - 230 mesh - Merck); pha đảo YMC RP-18 (30 - 50 μm, Fuji Silysia Chemical Ltd., Nhật); Sephadex LH20 (Amersham Biosciences). Theo dõi các phân đoạn sắc ký bằng TLC, thực hiện trên bản mỏng tráng sẵn pha thuận silica gel 60 F_{254S} (Merck), pha đảo RP-18 F_{254} (Merck). Phát hiện các chất: phun dung dịch acid sulfuric 10%/EtOH và hơ nóng; soi đèn tử ngoại ở hai bước sóng 254 nm và 366 nm [8],[28],[105].

- Phân lập bằng MPLC: sử dụng máy Biotage Isolera^{TM}, pha đảo C_{18} SNAP Cartridge KP-C_{18}-HS, pha thuận SNAP Cartridge KP-Sil (340 g, Biotage AB, Uppsala, Thụy Điển), tốc độ dòng 80 ml/phút, bước sóng phát hiện 210 nm và 254 nm.

2.3.2.3. Phương pháp xác định cấu trúc hoá học các hợp chất

Xác định cấu trúc các hợp chất phân lập được dựa trên các tính chất vật lý: nhiệt độ nóng chảy, góc quay cực riêng ($[\alpha]_D^{20}$); các phương pháp phổ bao gồm: phổ tử ngoại khả kiến (UV-Vis), phổ hồng ngoại (IR), phổ khối lượng (MS, HR-MS), phổ cộng hưởng từ hạt nhân một chiều (^{1}H, ^{13}C NMR và DEPT), hai chiều (COSY, NOESY, HMQC, HSQC, HMBC) [4],[8],[10],[12],[92].

2.3.3. Nghiên cứu tác dụng sinh học

2.3.3.1. Mẫu nghiên cứu

- Cao chiết bằng EtOH từ phần dưới mặt đất Lạc tân phụ (CDMĐLTP)

[chiết 3 lần], sấy đến khối lượng không đổi (hiệu suất chiết: 6,42%, độ ẩm: 1,5%). CDMĐLTP được phân tán trở lại bằng natri carboxymethyl cellulose (Na CMC) 0,5% (hoặc với nước trong thử nghiệm xác định độc tính cấp) với liều phù hợp để cho chuột thí nghiệm uống.

- Các hợp chất tinh khiết phân lập được từ CDMĐLTP.

2.3.3.2. Xác định độc tính cấp

• *Phương pháp nghiên cứu* [3],[7]: chuột nhắt trắng có khối lượng 18 - 22 g, khỏe mạnh, giống cái, được chia ngẫu nhiên thành các lô, mỗi lô 10 con. Để chuột nhịn đói 12 giờ và uống nước tùy thích trước khi thí nghiệm. Dùng kim đầu tù cho chuột uống CDMĐLTP theo mức liều tăng dần quy định cho từng lô, mỗi lần không quá 0,2 ml/10 g thể trọng. Theo dõi chuột liên tục trong vòng 6 giờ, tỉ lệ chết trong 72 giờ và các dấu hiệu khác trong vòng 7 ngày sau khi dùng chế phẩm thử.

• *Các chỉ tiêu theo dõi bao gồm:*

- Tình trạng chung của chuột: hoạt động tự nhiên, tư thế, màu sắc (mũi, tai, đuôi), lông, phân, nước tiểu.

- Tỷ lệ chuột chết trong 72 giờ và các dấu hiệu khác trong vòng 7 ngày sau khi thử nghiệm.

- Xác định LD_{50} (nếu có): Theo phương pháp Litchfield-Wilcoxon [7].

2.3.3.3. Đánh giá tác dụng chống oxy hóa

a) Đánh giá khả năng dọn gốc tự do DPPH

• *Phương pháp nghiên cứu* [75],[80],[93]: pha mẫu thử trong MeOH, sau đó cho vào ống nghiệm hỗn hợp gồm 10 µl dung dịch mẫu thử, 990 µl dung dịch DPPH trong MeOH 50 µg/ml để được nồng độ chính xác khoảng 5, 10, 20, 40, 80 µg/ml. Trộn hỗn hợp trong khoảng 1 phút rồi để yên trong 30 phút trong bóng tối, nhiệt độ thường. Dung dịch sau khi phản ứng được đo mật độ quang ở bước sóng 517 nm (OD_{517}). Làm đồng thời mẫu thử và mẫu chứng (1.000 µl

dung dịch DPPH 50 μg/ml).

Mẫu đối chứng dương dùng 10 μl dung dịch quercetin, 990 μl dung dịch DPPH trong MeOH 50 μg/ml để được nồng độ quercetin là 0,1875, 0,375, 0,75, 1,50, 3,0, 6,0 μg/ml.

• *Tính toán kết quả:* % ức chế DPPH của mẫu thử được tính toán theo công thức sau:

$$I\ (\%) = [(OD_{ch} - OD_{th})/OD_{ch}] \times 100$$

- I (%): Phần trăm ức chế DPPH của mẫu thử.

- OD_{ch}, OD_{th}: Mật độ quang của mẫu chứng, mẫu thử.

b) Đánh giá khả năng dọn gốc tự do superoxid ($O_2^{\bullet-}$)

• *Phương pháp nghiên cứu* [93]*:*

Hỗn hợp phản ứng bao gồm 460 μl dung dịch đệm phosphat (pH 8,0) chứa 0,1 mM EDTA, 10 μl dung dịch mẫu thử pha trong DMSO (nồng độ cuối cùng chính xác khoảng 100, 10, 1, 0,5, 0,1 μg/ml), 10 μl dung dịch xanthin 5 mM, 10 μl dung dịch NBT 5 mM, cuối cùng thêm 10 μl dung dịch XO (4,2 mIU). Trộn đều hỗn hợp trong khoảng 1 phút rồi để yên trong 5 phút tiếp theo ở nhiệt độ phòng cho phản ứng xảy ra. Đo OD của hỗn hợp ở bước sóng 560 nm (OD_{560}). Làm đồng thời với mẫu thử là mẫu chứng 10 μl DMSO nhưng không chứa mẫu thí nghiệm.

Mẫu đối chứng dương: 10 μl dung dịch quercetin cùng nồng độ với mẫu thử trong DMSO.

• *Tính toán kết quả:* Khả năng (%) dọn gốc tự do $O_2^{\bullet-}$ được tính toán theo công thức sau:

$$I\ (\%) = [(OD_{ch} - OD_{th})/OD_{ch}] \times 100$$

- I (%): Khả năng (%) dọn gốc tự do $O_2^{\bullet-}$ của mẫu thử.

- OD_{ch}, OD_{th}: Mật độ quang của mẫu chứng, mẫu thử.

2.3.3.4. Xác định hoạt tính ức chế hoạt động enzym xanthin oxidase

• *Phương pháp nghiên cứu:* sử dụng phương pháp xác định hoạt tính ức

chế hoạt động XO [87].

Tiến hành tương tự như phương pháp đánh giá tác dụng dọn gốc tự do $O_2^{\bullet-}$ ở trên, nhưng khác là hỗn hợp phản ứng không chứa 10 µl dung dịch NBT 5 mM mà thay bằng thêm 10 µl dung dịch đệm phosphat. Đo OD của hỗn hợp ở bước sóng 290 nm (OD_{290}).

Mẫu đối chứng dương: 10 µl dung dịch quercetin cùng nồng độ với mẫu thử trong DMSO.

• *Tính toán kết quả:* Hoạt tính ức chế XO của mẫu thử được tính toán theo công thức sau:

$$I\ (\%) = [(OD_{ch} - OD_{th})/OD_{ch}] \times 100$$

- I (%): Hoạt tính ức chế XO của mẫu thử.

- OD_{ch}, OD_{th}: Mật độ quang của mẫu chứng, mẫu thử.

2.3.3.5. Đánh giá tác dụng chống viêm

a) Đánh giá tác dụng chống viêm cấp trên mô hình gây phù bàn chân chuột bằng carrageenan

• *Thiết kế các mức liều thử nghiệm tác dụng chống viêm cấp*

Thực nghiệm đánh giá tác dụng chống viêm cấp trên mô hình gây phù bàn chân chuột bằng carrageenan được sử dụng để đánh giá tác dụng chống viêm, đồng thời để lựa chọn mức liều tối ưu thể hiện tác dụng dược lý của CDMĐLTP áp dụng cho các nghiên cứu tiếp theo. Cách tính các mức liều thử như sau:

Liều dùng theo kinh nghiệm trên người: 10 - 20 g dược liệu/người (50 kg)/ngày, tương đương 0,2 - 0,4 g dược liệu/kg/ngày.

Liều quy đổi trên chuột cống (gấp 6,47 lần liều người) [6]: 1,29 - 2,58 g dược liệu/kg chuột. Do hiệu suất chiết cao là 6,42%, liều trên chuột tính theo mg cao khô: 83 - 166 mg cao/kg chuột**.**

Từ đó, thiết kế các mức liều thử trong thực nghiệm này là: 80, 160, 320 mg cao/kg chuột tương đương với 1,25, 2,5, 5,0 g dược liệu/kg chuột.

• *Bố trí thí nghiệm*: Sử dụng mô hình gây phù bằng carrageenan theo

Winter [127].

Chuột cống trắng đực được chia ngẫu nhiên thành các lô:

- Lô chứng: uống dung môi Na CMC 0,5%.

- Lô đối chiếu: uống indomethacin trong Na CMC 0,5% liều 10 mg/kg.

- Các lô thử: uống chế phẩm thử là CDMĐLTP trong Na CMC 0,5% với các mức liều thử: 80 mg/kg (1,25 g dược liệu/kg); 160 mg/kg (2,5 g dược liệu/kg); 320 mg/kg (5,0 g dược liệu/kg).

Động vật thí nghiệm được uống dung môi pha thuốc hoặc chế phẩm nghiên cứu với cùng thể tích 1 ml/100 g chuột vào một giờ nhất định hàng ngày trong vòng 5 ngày trước khi làm thực nghiệm. Trước khi dùng thuốc 1,5 giờ, chuột không được ăn nhưng được uống nước bình thường. Ngày thứ năm, sử dụng máy đo thể tích chân chuột Plethysmometer để đo thể tích bàn chân sau phải của từng chuột. Sau khi uống dung môi, thuốc đối chiếu hoặc chế phẩm nghiên cứu lần cuối cùng, chuột được tiêm 0,1 ml dung dịch carrageenan 1% trong nước muối sinh lý vào dưới da gan bàn chân sau phải. Đo thể tích bàn chân sau phải của từng chuột vào các thời điểm 1, 3, 5, 7 giờ sau khi gây viêm.

- *Kỹ thuật đo độ phù bàn chân chuột*

Dùng bút đánh dấu cố định mặt bên khớp gối chân sau phải của chuột. Nhúng bàn chân sau phải vào dung dịch đo đến đúng vị trí đã đánh dấu, đọc kết quả hiển thị trên thiết bị đo. Kỹ thuật đo được thực hiện bởi cùng một kỹ thuật viên và là phép đo mù (kỹ thuật viên bị làm mù về các lô động vật thí nghiệm).

- *Thông số đánh giá*

- Thể tích bàn chân sau phải của từng chuột.

- Mức độ phù bàn chân sau phải của từng chuột được tính theo công thức [100],[103]:

$$\Delta V\ (\%) = [(V_t - V_o)/V_o] \times 100$$

+ ΔV: Mức độ phù chân chuột tại thời điểm t giờ sau khi gây viêm.

+ V_o, V_t: Thể tích bàn chân chuột trước khi gây viêm và tại thời điểm t giờ sau khi gây

viêm.

- % ức chế phù của các lô thử so với lô chứng được tính theo công thức:

$$I\ (\%) = [(\Delta V_{ch} - \Delta V_{th})/\Delta V_{ch}] \times 100$$

+ I (%): Phần trăm ức chế phù của lô thử so với lô chứng tại cùng thời điểm.

+ ΔV_{ch}, ΔV_{th}: Mức độ phù chân chuột trung bình ở lô chứng và lô thử.

Dựa trên phần trăm ức chế phù tại các thời điểm thực nghiệm của các mức liều thử, từ đó chọn ra liều thử phù hợp nhất cho các nghiên cứu tiếp theo.

b) Đánh giá tác dụng chống viêm mạn trên mô hình gây u hạt thực nghiệm bằng viên bông

Tác dụng chống viêm mạn của CDMĐLTP được tiến hành theo phương pháp gây u hạt thực nghiệm bằng viên bông [125].

- *Chuẩn bị viên bông, dụng cụ và điều kiện phẫu thuật*

Dùng bông nha khoa, cân 20 mg rồi vê thành viên. Nhúng các viên bông vào dung dịch carrageenan 1% trong nước muối sinh lý. Sấy khô qua đêm và nhúng vào dung dịch kháng sinh trước khi cấy.

Tiệt trùng dụng cụ mổ, ngâm dụng cụ mổ trong cốc đựng EtOH 90%.

- *Bố trí thí nghiệm*

Chuột cống trắng được nuôi ổn định trong điều kiện phòng thí nghiệm, được chia ngẫu nhiên thành các lô:

- Lô chứng: uống dung môi Na CMC 0,5%, thể tích 1 ml/100 g chuột.

- Lô đối chiếu: uống prednisolon trong Na CMC 0,5% liều 5 mg/kg, thể tích 1 ml/100g chuột.

- Lô thử: uống chế phẩm thử là CDMĐLTP pha trong Na CMC 0,5% với mức liều thử 80 mg/kg, thể tích 1 ml/100 g chuột.

Sau khi uống dung môi, thuốc đối chiếu và chế phẩm thử 30 phút, chuột được gây mê bằng thiopental. Cạo sạch lông vùng lưng phía trên, sát trùng bằng betadin 10%, dùng mũi kéo bấm một lỗ nhỏ ở da, luồn hai mũi kéo qua lỗ thủng, tách kỹ để da không dính vào cơ rồi cấy viên bông vào nơi đã bóc tách da.

Chuột được uống dung môi, thuốc đối chiếu và chế phẩm thử hàng ngày trong 7 ngày liên tục. Đến ngày kết thúc thực nghiệm, sau khi uống thuốc lần cuối cùng 5 giờ, giết chuột bằng ether, bóc tách u hạt dưới da lưng.

Cân ngay khối lượng u hạt tươi.

Sấy khô u hạt đến khối lượng không đổi. Cân khối lượng u hạt khô.

- *Thông số đánh giá*

- Khối lượng u hạt tươi/khô của từng chuột (sau khi đã trừ khối lượng trước khi cấy).

- Tỷ lệ % độ giảm khối lượng u hạt của lô thử so với lô chứng biểu thị theo công thức sau:

$$X\% = [(M_{ch} - M_{th}) / M_{ch}] \times 100$$

+ X% : Tỷ lệ % giảm khối lượng u hạt của lô thử so với lô chứng.

+ M_{ch}: Khối lượng u hạt trung bình của lô chứng.

+ M_{th} : Khối lượng u hạt trung bình của lô thử.

2.3.3.6. Đánh giá tác dụng giảm đau

a) Đánh giá tác dụng giảm đau trung ương trên mô hình mâm nóng

- *Bố trí thí nghiệm*

Sử dụng mô hình mâm nóng để đánh giá tác dụng giảm đau trung ương [125]. Đặt từng động vật lên máy đo phản xạ đau bằng mâm nóng có nhiệt độ ổn định trong khoảng 55 - 56 ^{o}C. Sử dụng đồng hồ trên thiết bị để xác định thời gian phản ứng đau của từng chuột (khoảng thời gian tính từ lúc đặt chuột lên mâm nóng đến khi chuột có phản ứng liếm chân sau hoặc nhảy lên cao để tìm cách trốn khỏi tấm kim loại nóng). Chỉ chọn những chuột có thời gian phản ứng đau từ 8 đến 30 giây. Chuột nhắt trắng đực được chia ngẫu nhiên thành các lô:

- Lô chứng: uống dung môi Na CMC 0,5%.

- Lô đối chiếu: uống codein trong Na CMC 0,5% liều 60 mg/kg.

- Các lô thử: uống chế phẩm thử là CDMĐLTP pha trong Na CMC 0,5% với các mức liều thử 80 mg/kg.

Động vật thí nghiệm được uống dung môi pha thuốc hoặc chế phẩm nghiên cứu với cùng thể tích 0,2 ml/20 g chuột vào một giờ nhất định hàng ngày trong vòng 5 ngày trước khi làm thực nghiệm. Trước khi dùng thuốc 1,5 giờ, chuột không được ăn nhưng được uống nước bình thường. Ngày thứ năm, sau khi uống thuốc 90 phút, sử dụng mâm nóng để xác định thời gian phản ứng đau của từng chuột.

- *Thông số đánh giá*

Thời gian phản ứng đau bình thường và sau khi dùng thuốc của từng chuột.

b) Đánh giá tác dụng giảm đau ngoại vi trên mô hình gây đau quặn bằng acid acetic

- *Bố trí thí nghiệm*

Sử dụng mô hình gây đau quặn để đánh giá tác dụng giảm đau ngoại vi [125]. Chuột nhắt trắng đực được chia ngẫu nhiên thành các lô:

- Lô chứng: uống dung môi Na CMC 0,5%.

- Lô đối chiếu: uống indomethacin trong Na CMC 0,5% liều 10 mg/kg.

- Các lô thử: uống chế phẩm thử CDMĐLTP pha trong Na CMC 0,5% với các mức liều thử 80 mg/kg.

Động vật thí nghiệm được uống dung môi pha thuốc hoặc chế phẩm nghiên cứu với cùng thể tích 0,2 ml/20 g chuột vào một giờ nhất định hàng ngày trong vòng 5 ngày trước khi làm thực nghiệm. Trước khi dùng thuốc 1,5 giờ, chuột không được ăn nhưng được uống nước bình thường. Ngày thứ năm, sau khi uống thuốc 2 giờ, tiêm màng bụng dung dịch acid acetic 1% với thể tích 0,2 ml/20 g chuột cho tất cả các chuột. Ngay sau khi tiêm, đếm cơn quặn đau của từng chuột trong từng 5 phút một cho đến phút thứ 30.

Cơn quặn đau được tính khi toàn thân chuột vươn dài, 2 chân (hoặc 1 chân) sau doãi ra sau, ưỡn cong người, bụng chạm sát vào sàn hoặc chuột xoắn mình sang một bên hoặc bụng chuột bị co thắt rất mạnh.

- *Thông số đánh giá*

- Số cơn quặn của từng chuột ở các thời điểm.

2.3.3.7. Thử tác dụng làm tăng cường hấp thu glucose

a) Nuôi cấy và biệt hóa tế bào

Nguyên bào cơ chuột C2C12 được nuôi trong môi trường DMEM chứa 10% FBS ở trong tủ ấm 37 °C có khí quyển chứa 5% CO_2. Các nguyên bào hợp lại được biệt hóa bởi ủ trong DMEM chứa 1% FBS. Sau đó môi trường được thay thế hàng ngày đến ngày thứ 4 [46],[90]. Các hợp chất được hòa tan trong DMSO và nồng độ cuối cùng của DMSO trong môi trường không vượt quá 0,3%.

b) Xác định độc tế bào

Tác dụng độc tế bào của chất thử được xác định bằng cách dùng MTT để định lượng tế bào sống. Trong các đĩa nuôi cấy 96 giếng có chứa tế bào sợi cơ chuột C2C12 đã biệt hóa được thêm vào các hợp chất có nồng độ khác nhau hoặc digitonin 100 µg/ml như là chất đối chứng độc tế bào. Các tế bào được ủ trong 24 giờ ở 37 ^oC và thuốc thử MTT (5 mg/ml) được thêm vào mỗi giếng. Sau 2, 4 giờ, thêm 200 µl DMSO để phá vỡ tế bào và hòa tan các tinh thể formazan tạo thành do tế bào sống khử hóa MTT. Định lượng formazan bằng cách đo OD ở bước sóng 562 nm (OD_{562}) [46]. Làm song song mẫu trắng (không ủ tế bào với thuốc) và mẫu có thử thuốc (có ủ tế bào với thuốc thử). Kết quả được tính theo công thức:

Tác dụng độc tế bào được biểu thị bằng tỷ lệ % tế bào sống giảm, được tính theo công thức sau:

$$I\ (\%) = [(OD_{tr} - OD_{th})/OD_{tr}] \times 100$$

- I%: Tác dụng độc tế bào.

- OD_{tr}, OD_{th}: Mật độ quang của lô trắng, lô thử.

c) Đánh giá tác dụng làm tăng cường hấp thu glucose

Đánh giá tác dụng làm tăng cường hấp thu glucose của chất thử được thực

hiện theo phương pháp của Kim K.Y. và cs. [56]. Tế bào sợi cơ chuột C2C12 sau khi nuôi cấy phát triển tốt được chuyển vào vi đĩa 24 giếng và bỏ đói trong DMEM với 0,2% BSA, ủ trong dung dịch đệm KRPH (Krebs-Ringer-Phosphate-HEPES) [10 mM HEPES, pH 7,4, 136 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 1 mM $MgSO_4$, 1 mM $CaCl_2$, đệm phosphat 10 mM]. Các hợp chất được cho vào môi trường cùng hoặc không cùng với 100 nM insulin trong 30 phút. Hấp thu glucose được bắt đầu khi thêm 0,5 μCi/ml 2-deoxy-[^{3}H]-glucose và 100 μM 2-deoxy-D-glucose trong mỗi giếng (nồng độ cuối cùng của các đường trong môi trường nuôi cấy tế bào). Sau 10 phút, các tế bào được rửa 3 lần với đệm PBS (Phosphate buffered saline) [pH 7,4; ở 4 ^oC] rồi ly giải với SDS (Sodium dodecyl sulfate) 0,1% và NaOH 0,5 M. Hoạt tính phóng xạ được xác định bởi sử dụng đếm nhấp nháy trong môi trường lỏng bằng máy β-counter và được chuẩn hóa theo mức độ protein toàn phần [57].

Rosiglitazon (30 μM) và acid ursolic (10 μM) được sử dụng làm chất đối chứng dương.

2.3.4. Phương pháp xử lý số liệu thống kê

Các số liệu nghiên cứu được xử lý thống kê theo phương pháp thống kê sinh học, sử dụng phần mềm GraphPad Prism 5 để tính toán.

Với các số liệu thuộc phân phối chuẩn, biến liên tục, kết quả được biểu diễn dưới dạng M ± SE (hoặc SD). So sánh giá trị trung bình giữa các lô bằng one-way ANOVA, dùng hậu kiểm Dunnett's test để so sánh giá trị trung bình của các lô thử so với lô chứng.

Với các số liệu không thuộc phân phối chuẩn, biến phân hạng, kết quả được trình bày dưới dạng trung vị (tứ phân vị). Dùng thuật toán Kruskal Wallis để so sánh giữa các lô, Mann-Whitney U test để so sánh kết quả giữa lô thử với lô chứng.

Giá trị $p<0,05$ được coi là khác nhau có ý nghĩa thống kê.

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. THỰC VẬT HỌC

3.1.1. Xác định tên khoa học của cây Lạc tân phụ

Tiến hành phân tích, nghiên cứu đặc điểm hình thái của lá, thân rễ, thân khí sinh, cấu tạo của hoa, quả và hạt của các mẫu được thu thập ở các sườn núi, khe suối tại xã Bản Khoang, huyện Sa Pa, tỉnh Lào Cai vào tháng 8, 11/2010 và tháng 7, 09/2011. Các mẫu tiêu bản ở Phụ lục 2.

Kết quả, ở tất cả các mẫu đã thu thập trên đều có các đặc điểm nổi bật như: *Lá kép lông chim 2-3 lần; phiến lá chét hình thoi - bầu dục, trứng, trứng ngược hay hình bầu dục rộng. Điều đặc biệt là khi phân tích hoa, không thấy có cánh hoa,...* Cùng với các đặc điểm hình thái khác, đem đối chiếu với khóa phân loại các loài thuộc chi *Astilbe* Buch.-Ham. ex D. Don, họ Saxifragaceae trong:

- Các thực vật chí: Trung Quốc [129]; Pakistan [144]; Ấn Độ thuộc Anh [47]; Ấn Độ [40];

- Khóa phân loại các loài thuộc chi *Astilbe* của Pan J.T. (1995) [89], Trader B.W. (2006) [121];

- Một số tài liệu trong nước khác, của Phạm Hoàng Hộ (1999) [9], Nguyễn Tiến Bân và cs. (2003) [1] và Võ Văn Chi (2012) [5].

Cho thấy, các mẫu Lạc tân phụ thu thập ở Sa Pa - Lào Cai kể trên đều thuộc chi *Astilbe* và có tên khoa học của loài chính xác là *Astilbe rivularis* Buch.-Ham. ex D. Don, họ Thường sơn hay Cỏ tai hổ (Saxifragaceae).

Kết quả nghiên cứu này được giám định lại bởi TS. Dương Đức Huyến, ThS. Đỗ Văn Hài - Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật với tiêu bản số: Phạm Quốc Tuấn 001 ngày 22/11/2010 và CN. Ngô Văn Trại – Viện Dược liệu với tiêu bản số: Phamquoctuan 02 ngày 21/09/2011 (Phụ lục 1 và 2).

Đem đối chiếu với các mẫu có tên khoa học là *Astilbe rivularis* Buch.-Ham. ex D. Don, họ Saxifragaceae, gồm các số hiệu: Lã Đình Mỡi, sine num.;

Mẫu sine coll.; Khôi-Đỏ, sine num; Khôi-Đỏ 131; VH131 (đang lưu trữ tại Bảo tàng thực vật - Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật) và các tiêu bản số: K000674066, K000674067, K000674068 lưu trữ trong website của KEW royal botanic gardens [145], cho thấy các mẫu nghiên cứu mới thu thập được ở Sa Pa không có sai khác gì so với các mẫu được đối chiếu. Điều này cho phép *khẳng định các mẫu nghiên cứu trong Luận án này đúng thuộc loài Astilbe rivularis Buch.-Ham. ex D. Don, họ Saxifragaceae.*

3.1.2. Đặc điểm hình thái thực vật

Cây thảo sống lâu năm có thân rễ, đường kính 0,5 - 3 cm, rễ nhỏ và nhiều rễ nhủ tơ, thân khí sinh mang cụm hoa thẳng đứng cao 0,5 - 2,2 m, có rãnh dọc khi khô, đôi khi có màu tím, mang lông dài màu nâu (Hình 3.1).

Hình 3.1. Thân rễ

Lá kép lông chim chụm ba, 2-3 lần lẻ, mỗi nhánh lá kép cuối thường mang 3 - 5 lá chét (ít khi 7 lá chét); cuống lá kép dạng bẹ, mép bẹ lá có lông dài màu nâu đối với lá kép mọc ở thân khí sinh hoặc mặt trước của bẹ lá mọc ở thân rễ có một lớp lông dài màu nâu ôm vào thân rễ; gốc cuống chung và gốc các cuống lá chét nhiều lông dài màu nâu mọc thành cụm; có lá kèm. Lá chét có cuống rất ngắn hoặc dài 0,3 - 4 cm; riêng cuống lá chét ngọn dài đến 9 cm; Phiến lá chét nguyên hình trứng, trứng ngược hoặc hình thoi - bầu dục ở lá ngọn, hình trứng ở lá bên; kích thước 3,7 - 14,6 cm x 2,0 - 11,0 cm, có nhiều lông dài màu nâu ở mặt dưới và có nhiều lông

1. Lá kép 2. Bẹ lá kép

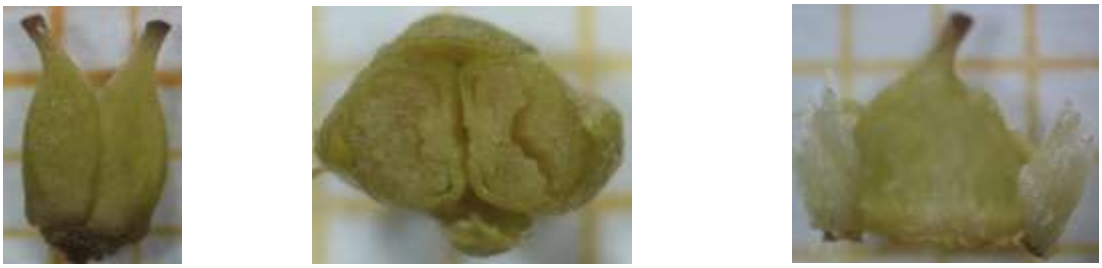
Hình 3.2. Lá kép

tuyến dọc theo các gân; gốc lá cụt, hình tim, hình tim lệch, lệch, tròn đến hình nêm; mép lá có răng nhọn hai lần, không đều; đầu lá nhọn thắt lại thành đuôi dài; hệ gân bên hình lông chim 7 - 8 đôi (Hình 3.2).

Cụm hoa hình chùy, dài 13 - 50 cm, có nhiều nhánh, các nhánh tận cùng dài từ 1 - 20 cm, có nhiều lông tuyến xoăn màu nâu; ở kẽ có lá bắc mỏng như màng, hình tam giác hẹp, kích thước 1, 1 - 1, 8 x 0,2 - 0,6 mm, có nhiều lông màu nâu, mép nguyên hoặc có răng nhọn (Hình 3.3).

Hình 3.3. Cụm hoa

1. Hoa 2. Lá đài và nhị 3. Cuống hoa mang 3 lá bắc 4. Các loại lá bắc



5. Bầu 6. Bầu cắt ngang 7. Tách dọc một lá noãn

Hình 3.4. Cấu tạo hoa

Hoa có 3 lá bắc; cuống hoa dài 0,8 - 1,8 mm, có nhiều lông màu nâu. Đài gồm 4 hoặc 5 lá đài màu xanh, hình trứng hoặc hình bầu dục đến tròn dài, kích thước 1,2 - 1,8 x 0,8 - 1 mm, hơi lồi ở mặt dưới, hơi lõm ở mặt trên, không có lông, 1 gân, dính liền với bầu ở gốc, không rụng; không cánh hoa. Nhị hoa 4 hoặc 5 đối diện với đài, chỉ nhị dài khoảng 1,5 mm, bao phấn 2 ô, đính gốc. Bộ

nhụy gồm 2 lá noãn hình bầu dục hợp lại ở gốc, mỗi lá noãn kéo dài thành một vòi nhụy ngắn khoảng 1 mm, núm nhụy hình đầu, bầu trên, đính noãn bên (Hình 3.4).

Quả gồm 2 đại, dài khoảng 4 mm. Hạt nhỏ, nhiều, màu nâu, dài khoảng 2,0 - 2,5 mm, có cánh ở hai đầu vì vỏ hạt kéo dài, thuôn, có nếp nhăn hoặc hơi nhăn, bóng (Hình 3.5). Ra hoa, kết quả vào tháng 8 - 11.

1. Cụm quả 2. Quả chưa mở 3. Quả đã mở 4. Hạt

Hình 3.5. Quả, hạt

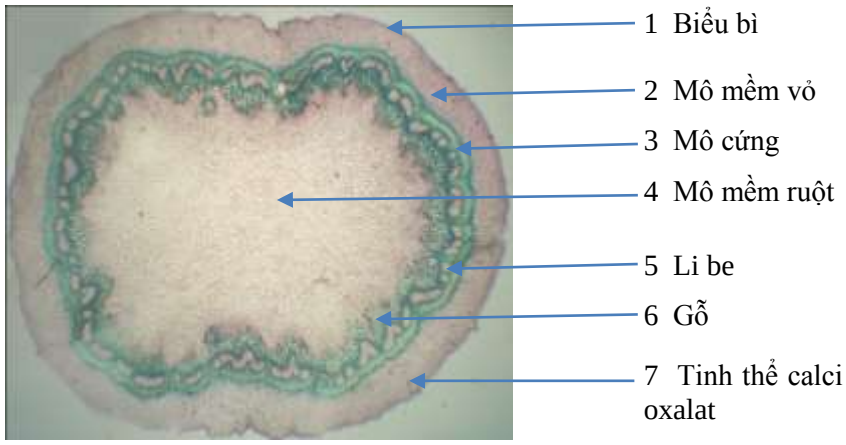
3.1.3. Đặc điểm giải phẫu

Các bộ phận của cây Lạc tân phụ được nghiên cứu vi phẫu gồm: lá chét, thân khí sinh, thân rễ và rễ. Các tiêu bản được làm bằng phương pháp nhuộm kép, quan sát dưới kính hiển vi soi nổi, mô tả các đặc điểm và chụp ảnh.

3.1.3.1. Cấu tạo giải phẫu lá chét

a) Cuống lá chét

Vi phẫu cuống lá chét (Hình 3.6) có cấu tạo đối xứng qua mặt phẳng gồm: Mô mềm vỏ, mô mềm ruột, trong tế bào mô mềm có chứa tinh thể calci oxalat hình cầu gai.

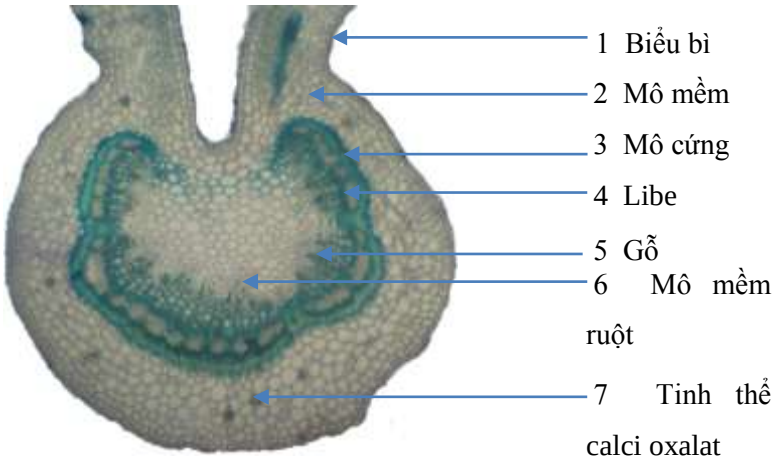


Hình 3.6. Vi phẫu cuống lá chét cắt ngang

Vòng mô cứng xếp thành một vòng uốn lượn. Một vòng các bó li be - gỗ. Mỗi bó thường có một bó gỗ và 1 - 3 bó li be.

b) Phiến lá chét

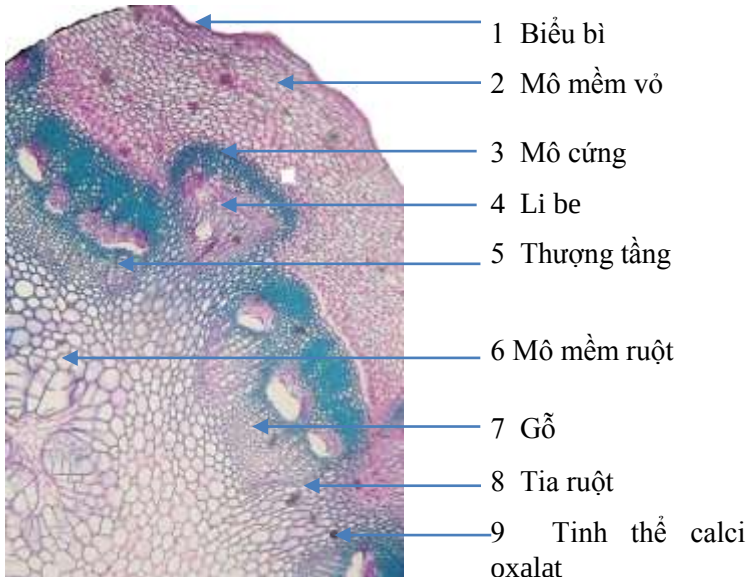
Vi phẫu lá chét cắt ngang (Hình 3.7) có cấu tạo giống với cuống lá gồm có: biểu bì, mô mềm vỏ, mô mềm ruột, vòng mô cứng và vòng bó libe - gỗ nhưng vòng mô cứng và vòng các bó li be - gỗ bị đứt đoạn ở phía trên của gân giữa, trong các tế bào mô mềm thường có tinh thể calci oxalat hình cầu gai.



Hình 3.7. Vi phẫu lá chét

3.1.3.2. Cấu tạo giải phẫu thân khí sinh

Giải phẫu thân khí sinh (Hình 3.8) có cấu tạo gần giống cuống lá chét gồm: biểu bì; mô mềm vỏ; vòng mô cứng gần như liên tục; các bó li be - gỗ xếp thành vòng uốn lượn gồm 24 - 30 bó, cứ một bó to ở chỗ lồi của thân, xếp ở phía ngoài xen kẽ một bó nhỏ xếp ở trong, giữa li be và gỗ là thượng tầng. Giữa các bó li be - gỗ là tia ruột, các tia này có thể đi từ trong mô mềm ruột đến mô mềm vỏ, nhưng phần lớn bị chặn bởi mô cứng. Trong mô mềm vỏ và mô mềm ruột có tinh thể calci oxalat hình cầu gai.

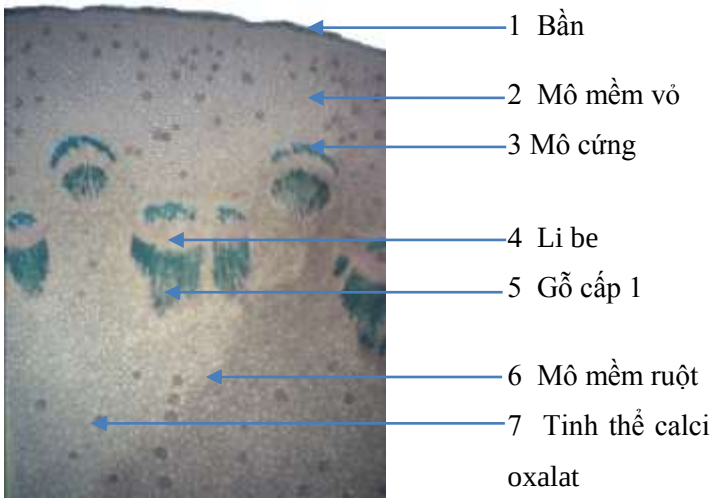


Hình 3.8. Vi phẫu thân khí sinh

3.1.3.3. Cấu tạo giải phẫu thân rễ

Vi phẫu thân rễ (Hình 3.9) gồm:

Ngoài cùng là lớp bần gồm 2-3 lớp tế bào; mô mềm vỏ có chứa tinh thể calci oxalat hình cầu gai; các bó li be - gỗ, mỗi bó có cung mô cứng ở phía ngoài và bó li be gỗ xếp chồng ở trong.

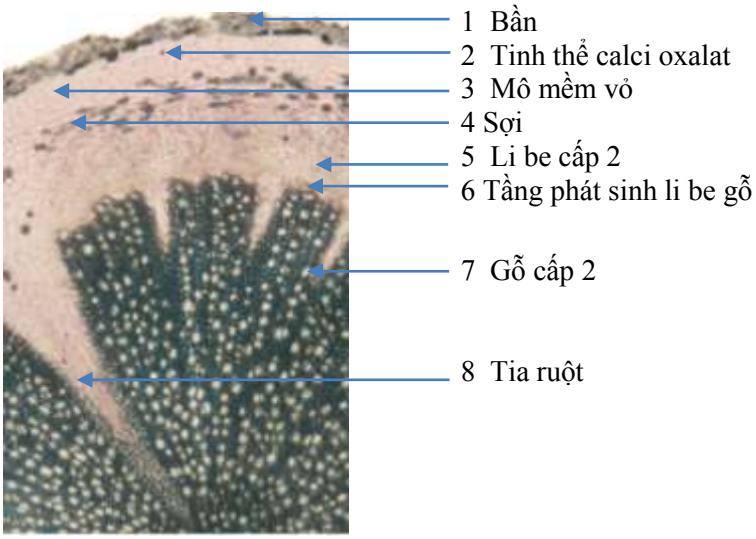


Hình 3.9. Vi phẫu thân rễ

3.1.3.4. Cấu tạo giải phẫu rễ

Cắt ngang qua rễ (Hình 3.10) từ ngoài vào trong gồm có:

Lớp bần: nhiều lớp tế bào bần; mô mềm vỏ trong đó có nhiều tinh thể calci oxalat hình cầu gai; Li be cấp 2 gồm 17 - 22 bó ở phía ngoài có 3 - 9 tầng sợi xen kẽ với mô mềm li be, phía trong là một đám lớn các tế bào mô mềm li be; tầng phát sinh li be - gỗ; gỗ cấp 2: trong đó có nhiều mạch gỗ, sợi gỗ và mô mềm gỗ; giữa các bó li be - gỗ là tia ruột, tia ruột có thể vào sâu đến gần tâm hoặc chỉ có ở phần li be.



Hình 3.10. Vi phẫu rễ

3.2. THÀNH PHẦN HÓA HỌC

3.2.1. Định tính các nhóm chất hữu cơ

Định tính sự hiện diện các nhóm chất hữu cơ có trong phần trên và dưới mặt đất của cây Lạc tân phụ bằng các phản ứng hóa học với các thuốc thử đặc

hiệu. Kết quả được trình bày trong Bảng 3.1.

Bảng 3.1. Kết quả định tính các nhóm chất có trong cây Lạc tân phụ

Số TT	Nhóm chất	Phản ứng định tính	Kết quả		Kết luận sơ bộ	
			Phần trên mặt đất	*Phần dưới mặt đất*	*Phần trên mặt đất*	*Phần dưới mặt đất*
1	Glycosid tim	P/ư Liebermann-Burchard	+	+	Không có	Không có
		P/ư Balject	-	-		
		P/ư Legal	-	-		
2	Saponin	P/ư tạo bọt	+++	++	Có	Có
3	Phytosterol/ triterpenoid	P/ư Salkowski	+++	+++	Có	Có
		P/ư Liebermann-Burchard	+	+		
		P/ư Rosenthaler	+++	+++		
4	Alcaloid	P/ư Bouchardat	-	-	Không có	Không có
		P/ư Mayer	-	-		
		P/ư Dragendoff	-	-		
5	Coumarin	P/ư đóng, mở vòng lacton	-	-	Không có	Không có
		P/ư Diazo hoá	-	-		
		Quan sát huỳnh quang dưới ánh sáng tử ngoại khi tác dụng với kiềm	-	-		
6	Flavonoid	P/ư với amoniac	++	+	Có	Có
		P/ư với dung dịch NaOH loãng	+++	+++		
		P/ư Shinoda	+++	+++		
		P/ư với dung dịch $FeCl_3$ 5%	+++	+++		
		P/ư Diazo hóa	+	+		
7	Anthranoid	P/ư Bortraeger	-	-	Không có	Không có
		P/ư vi thăng hoa	-	-		
8	Tanin	P/ư với dung dịch gelatin 1%	+++	+++	Có	Có
		P/ư với dung dịch $FeCl_3$ 5%	+++	+++		
		P/ư với dung dịch chì acetat 10%	+++	+++		
		P/ư Stiasni	+++	+++		

Số TT	Nhóm chất	Phản ứng định tính	Kết quả		Kết luận sơ bộ	
			Phần trên mặt đất	*Phần dưới mặt đất*	*Phần trên mặt đất*	*Phần dưới mặt đất*
9	Carbohydrat	P/ư với thuốc thử Fehling	+++	+++	Có	Có
		P/ư Molisch	+++	++		
10	Acid hữu cơ	P/ư Na_2CO_3 bột	-	-	Không có	Không có
11	Protein/acid amin	P/ư Biuret	-	-	Không có	Không có
		P/ư Ninhydrin	-	-		
12	Chất béo	Vết mờ trên giấy lọc	-	-	Không có	Không có

Ghi chú:

(-): Phản ứng âm tính (++): Phản ứng dương tính rõ

(+): Phản ứng dương tính (+++): Phản ứng dương tính rất rõ

Nhận xét: Qua kết quả các phản ứng định ở trên, sơ bộ kết luận trong phần trên mặt đất và dưới mặt đất của cây Lạc tân phụ chứa các nhóm chất saponin, triterpenoid và phytosterol, flavonoid, tanin, carbohydrat; không chứa glycosid tim, alcaloid, coumarin, anthranoid, acid hữu cơ, protein/acid amin và chất béo.

3.2.2. Chiết xuất và phân lập các hợp chất

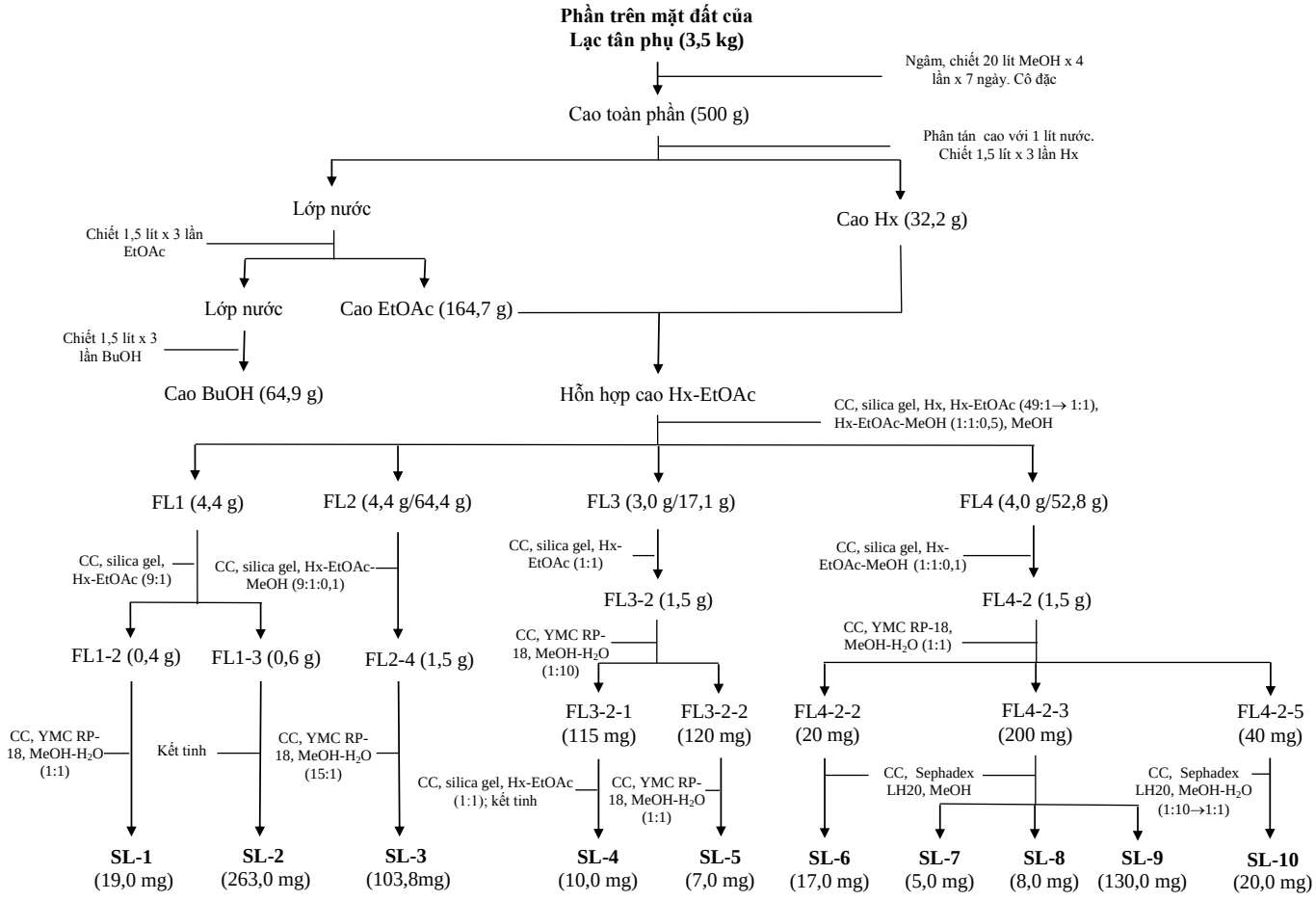
3.2.2.1. Chiết xuất và phân lập các hợp chất từ phần trên mặt đất của cây Lạc tân phụ

Phần trên mặt đất của cây Lạc tân phụ được rửa sạch, sấy khô ở nhiệt độ khoảng 50 ^oC, cắt nhỏ thành các mảnh 2-5 mm (3,5 kg). Ngâm dược liệu với 20 lít MeOH × 4 lần × 7 ngày ở nhiệt độ phòng. Lọc, gộp dịch lọc rồi thu hồi dịch lọc trên máy cất quay chân không thu được cao toàn phần (500 g). Phân tán cao với 1 lít nước (đun nóng trên nồi cách thủy cho cao tan). Sau đó lắc, chiết hỗn hợp trên 1,5 lít × 3 lần với lần lượt các dung môi: Hx, EtOAc, BuOH. Sau khi chiết xong, gộp các dịch chiết, cô được cao ở các phân đoạn: Hx (32,2 g); EtOAc (164,7 g); BuOH (64,9 g) và phân đoạn nước. Tiến hành phân lập các hợp chất trong phần trên mặt đất của cây Lạc tân phụ bằng CC và TLC.

Từ sắc ký đồ TLC cao phân đoạn Hx và EtOAc thấy có nhiều vết chất trùng nhau, gộp chúng lại thành cao Hx-EtOAc. Cao Hx-EtOAc được tách bằng CC, chất nhồi cột silica gel, rửa giải gradient với hệ dung môi: Hx, Hx-EtOAc (49:1 → 1:1), Hx-EtOAc-MeOH (1:1:0,5), MeOH thu được 5 phân đoạn: FL1 (4,4g); FL2: (64,4 g); FL3 (17,1 g); FL4 (52,8 g) và FL5 (4,9 g).

Phân đoạn FL1 (4,4 g) được tách bằng CC pha thường, chất nhồi cột là silica gel với hệ dung môi rửa giải Hx-EtOAc (9:1) được 3 phân đoạn (FL1-1 → FL1-3). Phân đoạn FL1-2 (0,4 g) tiếp tục tách bằng CC pha đảo, chất nhồi cột là YMC RP-18 với hệ dung môi là MeOH-H_2O (1:1) được chất rắn màu trắng **SL-1** (19,0 mg). Phân đoạn FL1-3 (0,6 g) tinh chế bằng kết tinh trong hệ dung môi Hx-EtOAc (4:1) thu được chất rắn màu trắng **SL-2 (**263,0 mg). Phân đoạn FL2 (4,4 g) được tách bằng CC pha thường, chất nhồi cột silica gel với hệ dung môi rửa giải Hx-EtOAc-MeOH (9:1:0,1) thu được 6 phân đoạn (FL2-1 → FL2-6). Phân đoạn FL2-4 (1,5 g) tiếp tục tách bằng CC pha đảo, chất nhồi cột là YMC RP-18 với hệ dung môi rửa giải MeOH-H_2O (15:1) được chất rắn màu trắng **SL-3** (103,8 mg). Phân đoạn FL-3 (3,0 g) được tách bằng CC pha thường, chất nhồi cột silica gel với hệ dung môi rửa giải Hx-EtOAc (1:1) thu được 4 phân đoạn (FL3-1 → FL3-4). Phân đoạn FL3-2 (1,5 g) tiếp tục tách bằng CC pha đảo với hệ dung môi rửa giải MeOH-H_2O (1:10) được 2 phân đoạn (FL3-2-1 → FL3-2-2). Phân đoạn FL3-2-1 (115 mg) tiếp tục tinh chế bằng CC pha thường với hệ dung môi rửa giải Hx-EtOAc (1:1) và kết tinh lại thu được chất kết tinh không màu **SL-4** (10,0 mg). Phân đoạn FL3-2-2 (120 mg) tinh chế bằng CC pha đảo với hệ dung môi rửa giải MeOH-H_2O (1:1) thu được chất rắn màu vàng **SL-5** (7,0 mg). Phân đoạn FL4 (4,0 g) được tách bằng CC pha thường, chất nhồi cột silica gel với hệ dung môi rửa giải Hx-EtOAc-MeOH (1:1:0,1) thu được 3 phân đoạn (FL4-1 → FL4-3). Phân đoạn FL4-2 (1,5 g) tiếp tục tách bằng CC pha đảo, chất nhồi cột là YMC RP-18 với hệ dung môi rửa giải MeOH-H_2O (1:1) được 5 phân đoạn (FL4-2-1 → FL4-2-5). Các phân đoạn FL4-2-2 (20 mg); FL4-2-3 (200 mg)

tinh chế bằng CC Sephadex LH20 với dung môi rửa giải MeOH theo thứ tự thu được các chất rắn màu vàng **SL-6** (17,0 mg); **SL-7** (5,0 mg), **SL-8** (8,0 mg) và **SL-9** (130,0 mg). Phân đoạn FL4-2-5 (40 mg) tiếp tục tinh chế bằng CC Sephadex LH20 rửa giải gradient với hệ dung môi MeOH-H_2O (1:10 → 1:1) thu được tinh thể không màu **SL-10** (20,0 mg). Sơ đồ chiết xuất, phân lập như Hình 3.11.



Hình 3.11. Sơ đồ chiết xuất, phân lập các hợp chất từ phần trên mặt đất của cây Lạc tân phụ

3.2.2.2. Chiết xuất và phân lập các hợp chất từ phần dưới mặt đất cây Lạc tân phụ

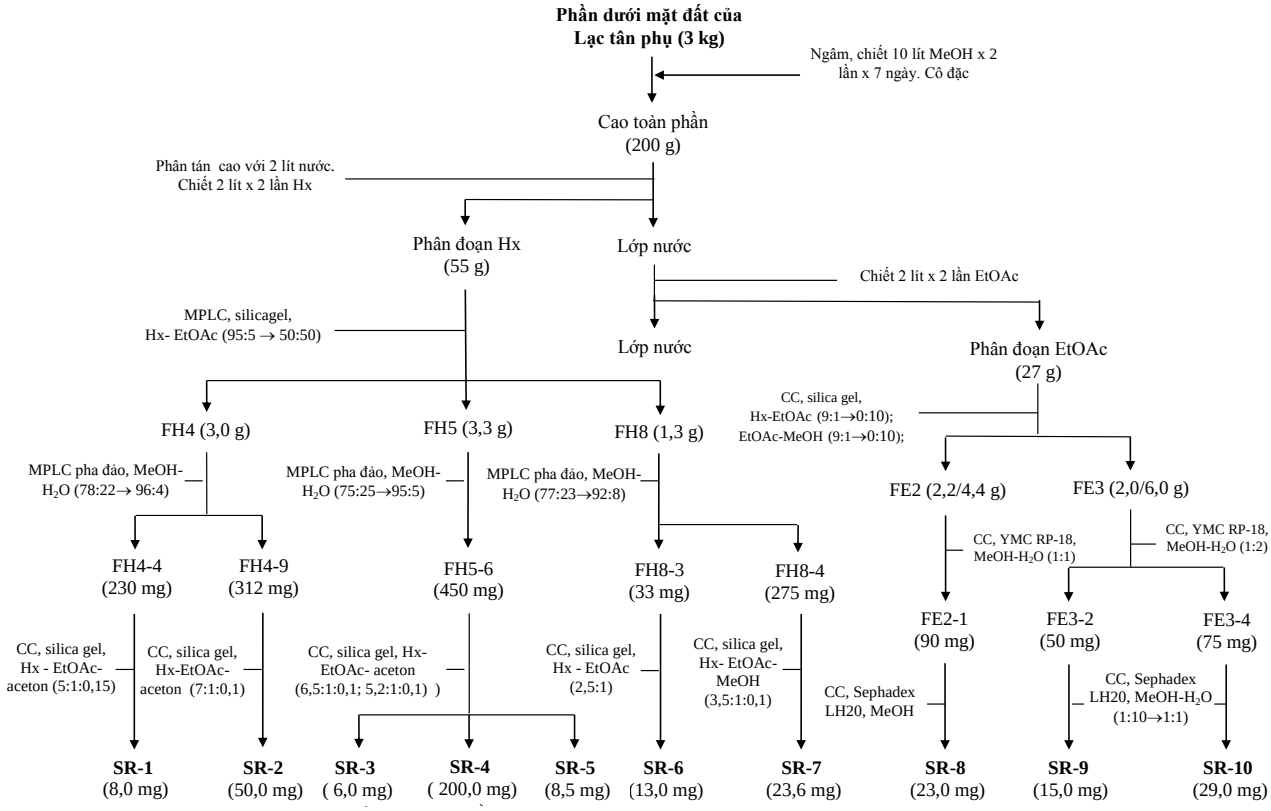
Phần dưới mặt đất (thân rễ và rễ) của cây Lạc tân phụ (3,0 kg) được rửa sạch, sấy khô ở nhiệt độ khoảng 50 ^oC, nghiền nhỏ, ngâm, chiết bằng 10 lít MeOH x 2 lần x 7 ngày ở nhiệt độ phòng. Lọc, gộp dịch lọc rồi thu hồi dịch lọc

trên máy cất quay chân không thu được cao toàn phần (200 g). Phân tán cao với 2 lít nước. Lắc, chiết lần lượt với 2 lít Hx, EtOAc, BuOH x 3 lần được cao ở các phân đoạn Hx (55 g), EtOAc (27 g), BuOH (50 g) và phân đoạn nước.

Cao phân đoạn Hx được tách bằng MPLC silica gel (SNAP Cartridge KP-Sil, 340 g) với gradient hệ dung môi Hx-EtOAc (95:5 → 50:50) thu được 10 phân đoạn: FH1 (8,0 g); FH2 (12,0 g); FH3 (3,0 g); FH4 (3,0 g); FH5 (3,3 g); FH6 (5,0); FH7 (6,0 g); FH8 (1,3 g); FH9 (4,0 g); FH10 (5,0 g). Phân đoạn FH4 (3,0 g) được tách bằng MPLC, sử dụng cột pha đảo (C_{18} SNAP Cartridge KP-C_{18}-HS, 120 g), rửa giải gradient với hệ dung môi MeOH-nước (78:22 → 96:4) thu được 9 phân đoạn (FH4-1 → FH4-9). Phân đoạn FH4-4 (230 mg) được chạy CC pha thường, chất nhồi cột là silica gel, rửa giải với hệ dung môi Hx- EtOAc-aceton (5:1:0,15) thu được hợp chất **SR-1** (8,0 mg)**.** Hợp chất **SR-2** (50,0 mg) thu được bởi từ phân đoạn FH4-9 (312 mg) được chạy CC silica gel với hệ dung môi Hx-EtOAc-aceton (7:1:0,1). Phân đoạn FH-5 (3,3 g) được tách bằng MPLC, sử dụng cột pha đảo, rửa giải gradient với hệ dung môi MeOH-H_2O (75:25 → 95:5) thu được 7 phân đoạn (FH5-1 → FH5-7). Phân đoạn FH5-6 (450 mg) tiếp tục được chạy CC silica gel với hệ dung môi Hx-EtOAc-aceton (6,5:1:0,1, 5,2:1:0,1, 800 ml cho mỗi bước) thu được hợp chất **SR-3** (6,0 mg), **SR-4** (200,0 mg) và **SR-5** (8,5 mg). Phân đoạn FH8 (1,3 g) được tinh chế tách bằng MPLC pha đảo, rửa giải hệ dung môi MeOH-H_2O (77:23 → 92:8) được 5 phân đoạn (FH8-1 → FH8-5). Phân đoạn FH8-3 (33 mg) được tách bằng chạy qua cột silica gel với hệ dung môi rửa giải Hx- EtOAc (2,5:1) được hợp chất **SR-6** (13,0 mg). Tinh chế phân đoạn FH8-4 (275 mg), sử dụng cột silica gel, rửa giải bằng hệ dung môi Hx-EtOAc-MeOH (3,5:1:0,1) thu được hợp chất **SR-7** (23,6 mg).

Cao phân đoạn EtOAc (27,0 g) tách bằng CC, chất nhồi cột silica gel, rửa giải gradient với hệ dung môi: Hx-EtOAc (9:1→0:10), EtOAc-MeOH (9:1 → 0:10) thu được 6 phân đoạn: FE1 (5,5 g); FE2: (4,4 g); FE3 (6,0 g); FE4 (4,0 g),

FE5 (2,0 g) và FE6 (3,3 g). Phân đoạn FE2 (2,2 g) tiếp tục tách bằng CC pha đảo, chất nhồi cột là YMC RP-18 với hệ dung môi rửa giải MeOH-H_2O (1:1) được 5 phân đoạn (FE2-1 → FE2-5). Phân đoạn FE2-1 (90 mg) tinh chế bằng CC Sephadex LH20 với dung môi rửa giải MeOH thu được chất rắn màu vàng **SR-8** (23,0 mg). Phân đoạn FE3 (2,0 g) được tách bằng tách bằng CC pha đảo với hệ dung môi rửa giải MeOH-H_2O (1:2) được 4 phân đoạn (FE-3-1 → FE3-4). Phân đoạn FE3-2 (50 mg) và FE3-4 (75 mg) được tinh chế bằng CC Sephadex LH20 với hệ dung môi rửa giải gradient với hệ dung môi MeOH-H_2O (1:10 → 1:1) thu được chất rắn màu vàng **SR-9** (15,0 mg) và chất rắn màu trắng **SR-10** (29,0 mg). Sơ đồ chiết xuất, phân lập như Hình 3.12.



Hình 3.12. Sơ đồ chiết xuất, phân lập các hợp chất từ phần dưới mặt đất của cây Lạc tân phụ

3.2.3. Xác định cấu trúc hóa học các hợp chất phân lập từ cây Lạc tân phụ

3.2.3.1. Xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất phân lập từ phần trên mặt đất

- **SL-1 (acid 3β-acetoxyolean-12-en-27-oic, acid acetyl β-peltoboykinolic)**

Bột vô định hình, màu trắng. Nhiệt độ nóng chảy: 235-237 ^{o}C; UV (MeOH) λ_{max} (nm): 201; IR (KBr) ν_{max} (cm^{-1}): 3242, 2934, 1740, 1707, 1665, 1466, 1375, 1240; ESI-MS *m/z*: 497,4 $[M-H]^-$. Dữ liệu phổ ^{1}H NMR, ^{13}C NMR ở Bảng 3.2.

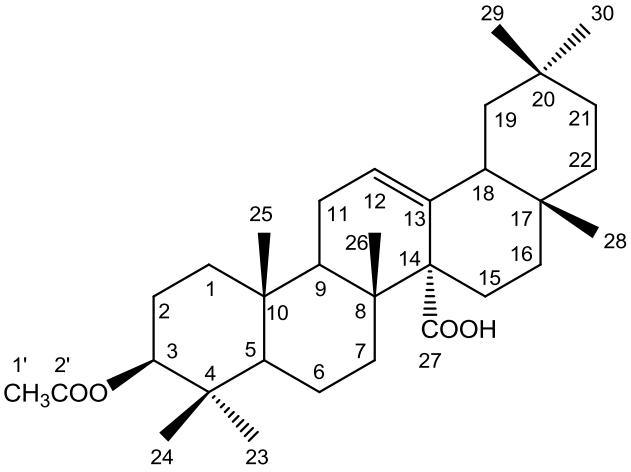
Bảng 3.2. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất SL-1

Vị trí C	$^{*}\delta_C$	δ_C [a,b]	Nhóm chức	δ_H [a,c] (độ bội, *J* = Hz)
C-1	38,0	38,2 (CH_2)	-CH_2-	
C-2	23,5	23,6 (CH_2)	-CH_2-	
C-3	80,8	80,7 (CH)	>CH-O-	4,51 (dd, *J*=4,5; 11,5)
C-4	37,6	37,7 (C)		
C-5	55,1	55,1 (CH)	>CH-	
C-6	18,2	18,1 (CH_2)	-CH_2-	
C-7	36,3	36,3 (CH_2)	-CH_2-	
C-8	39,9	39,9 (C)		
C-9	46,9	47,1 (CH)	>CH-	
C-10	36,9	37,0 (C)		
C-11	22,7	22,8 (CH_2)	-CH_2-	
C-12	126,2	126,3 (CH)	-CH=	5,69 (dd, *J*=2,0; 4,5)
C-13	137,4	137,6 (C)	>C=	
C-14	55,7	55,9 (C)		
C-15	22,2	22,3 (CH_2)	-CH_2-	
C-16	27,5	27,6 (CH_2)	-CH_2-	
C-17	32,9	32,9 (C)		
C-18	49,2	49,2 (CH)	>CH-	
C-19	43,8	44,0 (CH_2)	-CH_2-	
C-20	30,1	31,1 (C)		
C-21	34,3	34,4 (CH_2)	-CH_2-	

C-22	36,5	36,6 (CH_2)	-CH_2-	
C-23	28,1	28,1 (CH_3)	-CH_3	0,84 (s)
C-24	16,5	16,5 (CH_3)	-CH_3	0,85 (s)
C-25	16,8	16,8 (CH_3)	-CH_3	0,98 (s)
C-26	18,1	18,1 (CH_3)	-CH_3	1,03 (s)
C-27	180,7	180,0[#] (C)	-COOH	
C-28	28,5	28,3 (CH_3)	-CH_3	0,84 (s)
C-29	33,4	33,4 (CH_3)	-CH_3	0,83 (s)
C-30	23,6	23,6 (CH_3)	-CH_3	0,83 (s)
C-1'	21,4	21,3 (CH_3)	-CH_3	2,05 (s)
C-2'	171,3	171,2 (C)	-COO-	

**δ_c của acid 3β-acetoxyolean-12-en-27-oic đo trong $CDCl_3$ [114]; [a]Đo trong $CDCl_3$, [b]125 MHz, [c]500 MHz; [#] Tín hiệu có cường độ yếu.*

Phổ IR cho thấy các băng và dải hấp thụ của nhóm -OH (3242 cm^{-1}); nhóm C=C (1665 cm^{-1}); nhóm C=O (1740, 1707 cm^{-1}); nhóm C-O (1240 cm^{-1}). Phổ ^{13}C-NMR có tín hiệu của 32 nguyên tử carbon, kết hợp với phổ ESI-MS cho pic ion *m/z* 497,4 $[M-H]^-$ phù hợp với công thức phân tử $C_{32}H_{50}O_4$ (498,37). Phổ ^{1}H NMR có một tín hiệu của proton methin olefinic ở δ_H 5,69 (1H, dd, *J*=2,0; 4,5 Hz, H-12); 7 tín hiệu của proton nhóm methyl liên kết với carbon bậc 3 dưới dạng singlet ở δ_H 0,84, 0,85, 0,98, 1,03, 0,84, 0,83 x 2 (3H, s, H_3-23, 24, 25, 26, 28, 29, 30); một tín hiệu của proton oxymethin ở δ_H 4,51 (1H, dd, *J*=4,5; 11,5 Hz, H-3) phù hợp với tín hiệu oxycarbon trên phổ ^{13}C NMR ở δ_C 80,7 (C-3). Phổ



Hình 3.13. Cấu trúc của hợp chất SL-1

^{13}C NMR và DEPT chỉ ra sự có mặt 8 nhóm methyl, 10 nhóm methylen, 5 nhóm methin và 9 carbon bậc 4, trong đó có nhóm carbonyl ở δ_C 180,0 (C-27), 2 carbon olefinic ở δ_c 126,3 (C-12) và 137,6 (C-13). Như vậy **SL-1** là một triterpenoid thuộc nhóm oleanan, có vị trí nhóm carboxylic tại C-27. Ngoài ra, trên phổ ^{1}H NMR và ^{13}C NMR cho biết có một tín hiệu của nhóm acetyl (singlet của proton methyl gắn với nhóm carboxylic ở δ_H 2,05 (3H, s) và δ_C (171,2). Từ các dữ liệu phổ thu được cho thấy hợp chất **SL-1** là một ester của acid acetic với một oleanan triterpenoid có một liên kết đôi, một nhóm carboxylic (C-27). So sánh các dữ liệu phổ của hợp chất thu được với acid 3β-acetoxyolean-12-en-27-oic trong tài liệu [114] thấy phù hợp, hợp chất **SL-1** xác định là acid 3β-acetoxyolean-12-en-27-oic (Hình 3.13).

- **SL-2 (β-sitosterol)**

Bột vô định hình, màu trắng; nhiệt độ nóng chảy 140-142 ^{o}C; IR (KBr) ν_{max} (cm^{-1}): 3440, 2923, 1684, 1396, 1259; ESI-MS *m/z*: 437,14 $[M+Na]^+$. Dữ liệu phổ ^{1}H NMR, ^{13}C NMR ở Bảng 3.3.

Bảng 3.3. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất SL-2

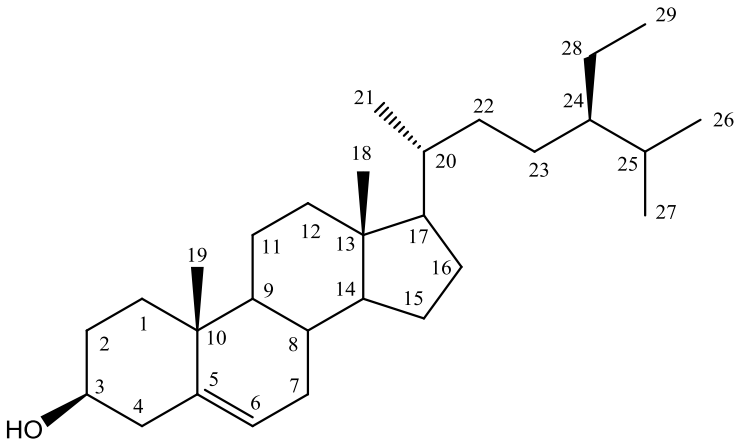
Vị trí C	$^*\delta_C$	δ_C [a,b]	Nhóm chức	δ_H [a,c] (độ bội, *J* = Hz)
C-1	37,2	37,2 (CH_2)	-CH_2-	
C-2	31,9	31,2 (CH_2)	-CH_2-	
C-3	71,7	71,4 (CH)	>CH-OH	3,49 (m)
C-4	42,3	41,9 (CH_2)	-CH_2-	
C-5	140,6	140,8 (C)	>C=	
C-6	121,6	121,5 (CH)	-CH=	5,34 (d, *J*= 5,0)
C-7	31,9	31,8 (CH_2)	-CH_2-	
C-8	31,9	31,8 (CH)	>CH-	
C-9	50,0	50,1 (CH)	>CH-	
C-10	36,5	36,4 (C)		
C-11	21,2	21,0 (CH_2)	-CH_2-	

C-12	39,7	39,7 (CH_2)	-CH_2-	
C-13	42,3	42,2 (C)		
C-14	56,8	56,7 (CH)	>CH-	
C-15	24,4	24,2 (CH_2)	-CH_2-	
C-16	28,3	28,1 (CH_2)	-CH_2-	
C-17	56,0	56,0 (CH)	>CH-	
C-18	11,9	11,7 (CH_3)	-CH_3	0,68 (s)
C-19	19,9	18,9 (CH_3)	-CH_3	1,01 (s)
C-20	36,2	36,0 (CH)	>CH-	
C-21	18,8	18,7 (CH_3)	-CH_3	0,93 (d, *J*=6,5)
C-22	33,9	33,9 (CH_2)	-CH_2-	
C-23	26,0	26,0 (CH_2)	-CH_2-	
C-24	45,7	45,8 (CH)	>CH-	
C-25	29,1	29,1 (CH)	>CH-	
C-26	19,0	19,2 (CH_3)	-CH_3	0,82 (d, *J*=7,0)
C-27	19,5	19,7 (CH_3)	-CH_3	0,84 (d, *J*=7,0)
C-28	23,0	23,0 (CH_2)	-CH_2-	
C-29	12,1	11,8 (CH_3)	-CH_3	0,86 (t, *J*= 7,5)

**δ_c của β-sitosterol đo trong $CDCl_3$ [132]; [a]Đo trong $CDCl_3$, [b]125 MHz, [c]500 MHz.*

Phổ ESI-MS cho pic ion *m/z*: 437,14 $[M+Na]^+$ phù hợp với công thức phân tử $C_{29}H_{50}ONa$ (437,38). Phổ IR cho thấy các băng và dải hấp thụ của nhóm -OH (3440 cm^{-1}); nhóm C=C (1684 cm^{-1}). Phổ ^1H NMR chỉ ra một doublet của proton methin olefinic ở δ_H 5,34 (1H, d, *J*= 5,0 Hz, H-6); một tín hiệu của proton oxymethin ở δ_H 3,49 (1H, m, H-3). Trên phổ cũng xuất hiện 6 tín hiệu nhóm methyl, trong đó 2 nhóm methyl liên kết với carbon bậc 3 dưới dạng singlet ở δ_H 0,68 (3H, s, H_3-18) và 1,01 (3H, s, H_3-19); 3 nhóm methyl liên kết với carbon bậc 2 xuất hiện dưới dạng doublet ở δ_H 0,93 (3H, d, *J*=6,5 Hz, H_3-21); 0,82 (3H, d, *J*=7,0 Hz, H_3-26); 0,84 (3H, d, *J*=7,0, H_3-27) và một nhóm methyl liên kết với carbon bậc 1 xuất hiện dưới dạng triplet ở δ_H 0,86 (3H, t, *J*=7,5 Hz, H_3-29).

Phổ ^{13}C NMR, DEPT chỉ ra sự có mặt của 29 nguyên tử carbon, trong đó có tín hiệu của 6 nhóm methyl ở δ_C 11,7, 18,9, 18,7, 19,2, 19,7, 11,8 lần lượt được gán vào các vị trí C-18, C-19, C-21, C-26, C-27, C-29 và 2 tín hiệu của carbon olefinic ở δ_C 140,8 và 121,5 được quy vào vị trí C-5, C-6. Từ các dữ liệu phổ trên, chúng tôi đề xuất hợp chất **SL-2** là một sterol có một liên kết đôi (C=C) và một nhóm hydroxyl ở vị trí số 3. So sánh các dữ liệu phổ của hợp chất thu được với *β*-sitosterol trong tài liệu [132] thấy phù hợp, hợp chất **SL-2** xác định là *β*-sitosterol (Hình 3.14).



Hình 3.14. Cấu trúc của hợp chất SL-2

- **SL-3 (*β*-sitosterol-3-*O*-*β*-D-glucopyranosid, daucosterol)**

Bột vô định hình màu trắng; nhiệt độ nóng chảy: 282-285 ^{o}C; IR (KBr) ν_{max} (cm^{-1}): 3426, 2944, 1638, 1461, 1376, 1076, 1022; ESI-MS *m/z*: 575,4 [M-H]$^{-}$; Dữ liệu phổ ^{1}H NMR, ^{13}C NMR ở Bảng 3.4.

Bảng 3.4. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất SL-3

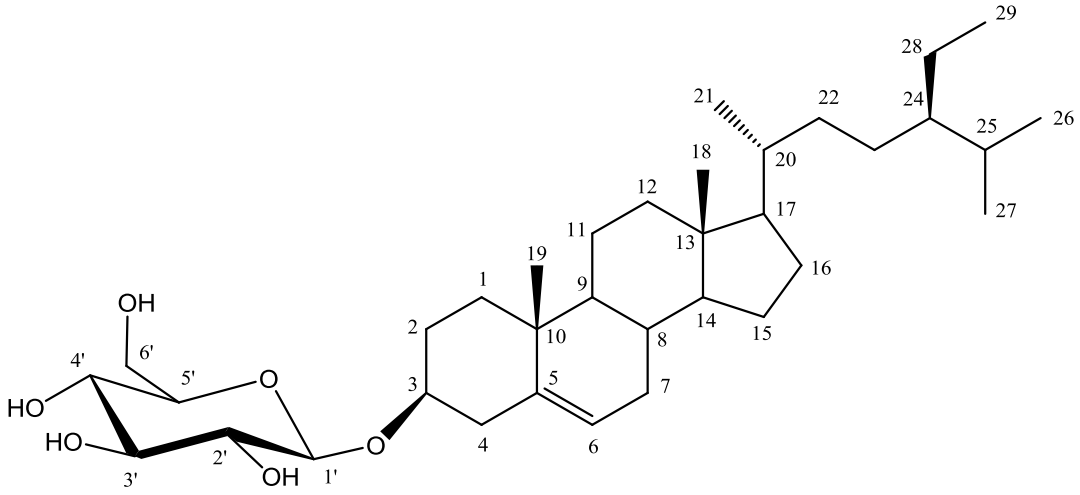
Vị trí C	$^{*}\delta_C$	δ_C [a,b]	Nhóm chức	δ_H [a,c] (độ bội, *J* = Hz)
C-1	36,8	37,1 (CH_2)	-CH_2-	
C-2	29,0	29,4 (CH_2)	-CH_2-	
C-3	78,4	79,1 (CH)	>CH-O-	3,58 (m)
C-4	38,1	38,5 (CH_2)	-CH_2-	
C-5	139,9	140,2 (C)	>C=	
C-6	121,4	122,1 (CH)	-CH=	5,37 (t, *J*=2,5)
C-7	31,4	31,7 (CH_2)	-CH_2-	
C-8	31,4	31,7 (CH)	>CH-	
C-9	49,7	50,1 (CH)	>CH-	

C-10	36,2	36,6 (C)		
C-11	20,5	20,9 (CH_2)	-CH_2-	
C-12	39,3	39,6 (CH_2)	-CH_2-	
C-13	41,8	42,1 (C)		
C-14	56,3	56,6 (CH)	>CH-	
C-15	23,7	24,1 (CH_2)	-CH_2-	
C-16	27,7	28,1 (CH_2)	-CH_2-	
C-17	55,5	55,9 (CH)	>CH-	
C-18	11,1	11,7 (CH_3)	-CH_3	0,69 (s)
C-19	18,5	19,0 (CH_3)	-CH_3	1,01 (s)
C-20	35,6	36,0 (CH)	>CH-	
C-21	18,0	18,6 (CH_3)	-CH_3	0,93 (d, *J*=6,5)
C-22	33,4	33,8 (CH_2)	-CH_2-	
C-23	25,4	26,0 (CH_2)	-CH_2-	
C-24	45,4	45,7 (CH)	>CH-	
C-25	28,6	29,0 (CH)	>CH-	
C-26	18,1	18,8 (CH_3)	-CH_3	0,82 (d, *J*=7,0)
C-27	18,9	19,6 (CH_3)	-CH_3	0,84 (d, *J*=7,0)
C-28	22,5	22,9 (CH_2)	-CH_2-	
C-29	11,1	11,8 (CH_3)	-CH_3	0,85 (t, *J*=7,5)
C-1'	100,6	101,0 (CH)	-O-CH-O- |	4,41 (d, *J*=8,0)
C-2'	73,1	73,4 (CH)	>CH-OH	3,25 (m)
C-3'	76,1	76,3 (CH)	>CH-OH	3,42-3,45 (m)
C-4'	69,7	69,9 (CH)	>CH-OH	3,42-3,45 (m)
C-5'	75,6	75,6 (CH)	>CH-O-	3,30 (m)
C-6'	61,1	61,6 (CH_2)	-CH_2-OH	3,76 (dd, *J*=12,0; 4,0); 3,85 (dd, *J*=12,0; 3,0)

**δ_C của β-sitosterol-3-O-β-D-glucopyranosid đo trong $CDCl_3$ - CD_3OD [65]; [a]Đo trong $CDCl_3$ - CD_3OD, [b]125 MHz, [c]500 MHz.*

Hợp chất **SL-3** có công thức phân tử $C_{35}H_{60}O_6$ (576,44) theo phổ ESI-MS

cho pic ion *m/z*: 575,4 $[M-H]^-$. Phổ IR cho thấy các băng và dải hấp thụ của nhóm –OH (3426 cm^{-1}) và nhóm C=C (1638 cm^{-1}). So sánh số liệu phổ NMR của hợp chất **SL-3** với **SL-2** thấy có các tín hiệu trùng với nhau ở phần aglycon, nên hợp chất **SL-3** là dẫn xuất của **SL-2**. Phổ ^{1}H NMR còn có sự xuất hiện tín hiệu doublet proton anomer ở δ_H 4,41 (1H, d, *J*=8,0 Hz, H-1'), 2 tín hiệu proton oxymethylen ở δ_H 3,76 (dd, *J*=12,0; 4,0 Hz, H-6'a), 3,85 (dd, *J*=12,0; 3,0 Hz, H-6'b) và 4 tín hiệu proton oxymethin δ_H ở 3,25-3,45 (H-2' - H-5'). Phổ ^{13}C-NMR và DEPT cho thấy có tín hiệu của 35 nguyên tử carbon trong phân tử, trong đó có 6 nhóm methyl, 12 nhóm methylen, 14 nhóm methin và 3 carbon bậc 4 nên hợp chất **SL-3** có thêm phần đường *β*-D-glucopyranose. So sánh các dữ liệu phổ của hợp chất thu được với daucosterol trong tài liệu [65] thấy phù hợp, hợp chất **SL-3** xác định là *β*-sitosterol-3-*O*-*β*-D-glucopyranosid (daucosterol) (Hình 3.15).



Hình 3.15. Cấu trúc của hợp chất SL-3

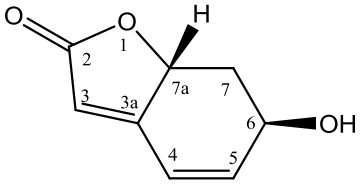
- **SL-4 (aquilegiolid)**

Tinh thể không màu; UV (MeOH) λ_{max} (nm): 200, 251; IR (KBr) ν_{max} (cm^{-1}): 3456, 2926, 1728, 1635, 1418, 1162, 1053; HR-ESI-MS *m/z*: 175,03618 $[M+Na]^+$; Dữ liệu phổ ^{1}H NMR, ^{13}C NMR ở Bảng 3.5.

Bảng 3.5. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất SL-4

Vị trí C	$^{*}\delta_C$	$\delta_C^{a,b}$	Nhóm chức	$\delta_H^{a,c}$ (độ bội, *J* = Hz)
C-2	173,7	173,3 (C)	-COO-	
C-3a	164,4	162,6 (C)	>C=	
C-3	139,6	137,3 (CH)	-CH=	5,82 (s)
C-4	112,2	112,7 (CH)	-CH=	6,62 (d, *J*=10,0)
C-5	121,4	122,1 (CH)	-CH=	6,32 (dd, *J*=10,0; 5,0)
C-6	64,3	64,5 (CH)	>CH-OH	4,66 (m)
C-7a	77,0	76,3 (CH)	>CH-O-	5,31 (ddd, *J*=13,0; 5,0; 1,5)
C-7	38,0	37,3 (CH_2)	-CH_2-	1,80 (td, *J*=13,0; 4,5); 2,65 (m)

**δ_c của aquilegiolid đo trong $(CD_3)_2CO$ [44]; [a]Đo trong $CDCl_3$, [b]125 MHz, [c]500 MHz.*



Hình 3.16. Cấu trúc của hợp chất SL-4

Phổ IR cho thấy các băng và dải hấp thụ của nhóm -OH (3456 cm^{-1}), nhóm C=O (1728 cm^{-1}), liên kết C=C (1635 cm^{-1}). Phổ ^{13}C NMR, DEPT chỉ ra sự có mặt 8 nguyên tử carbon, gồm có một nhóm methylen, 5 nhóm methin và 2 carbon bậc 4, phù hợp với công thức phân tử $C_8H_8O_3Na$ (175,03709) được thể hiện trên phổ khối HR-ESI-MS *m/z*: 175,03618 $[M+Na]^+$. Phổ ^{1}H NMR chỉ ra 3 tín hiệu proton methin olefinic ở δ_H 5,82 (1H, s, H-3), 6,62 (d, *J*=10,0 Hz, H-4), 6,32 (dd, *J*=10,0; 5,0 Hz, H-5), phù hợp với các tín hiệu của hai liên kết đôi trên phổ ^{13}C NMR ở δ_C 137,3 (C-3), 162,6 (C-3a), 112,7 (C-4), 122,1 (C-5). Ngoài ra, phổ ^{13}C NMR còn chỉ ra tín hiệu đặc trưng của một nhóm carbonyl ester ở δ_C 173,3 (C-2); 2 tín hiệu oxymethin carbon ở δ_C 64,5 (C-6), 76,3 (C-7a) tương ứng với tín hiệu hai proton oxymethin dịch về trường thấp trên phổ ^{1}H NMR ở δ_H 4,66 (m, H-6), 5,31 (ddd, *J*=13,0; 5,0; 1,5 Hz, H-7a). Thêm vào đó, phổ NMR còn cho thấy tín hiệu của hai proton geminal

ở vị trí C-7 [δ_H 1,80 (td, *J*=13,0; 4,5 Hz, H-7α); 2,65 (m, H-7β); δ_C 37,3]. So sánh các dữ liệu phổ của hợp chất thu được với aquilegiolid trong tài liệu [44] thấy phù hợp, hợp chất **SL-4** xác định là aquilegiolid (Hình 3.16). Mặc dù đã được phân lập từ một số loài thực vật khác [24],[74],[88], nhưng đây là lần đầu tiên aquilegiolid được phân lập từ một loài thuộc chi *Astilbe*.

- **SL-5 (quercetin)**

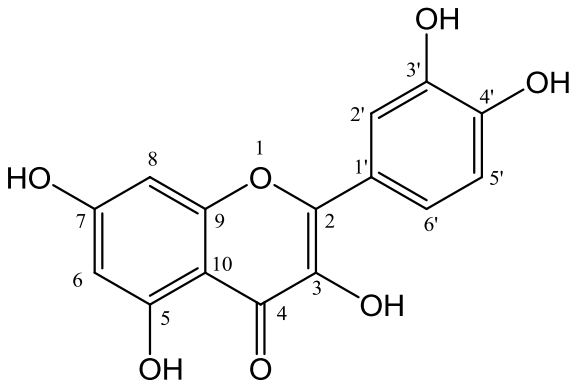
Bột màu vàng; nhiệt độ nóng chảy 310-312 ^oC; UV (MeOH) λ_{max} (nm): 212, 265, 351; IR (KBr) ν_{max} (cm^{-1}): 3406, 1668, 1610, 1520, 1453; ESI-MS *m/z*: 300,9 $[M-H]^-$. Dữ liệu phổ ^1H NMR, ^{13}C NMR ở Bảng 3.6.

Bảng 3.6. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất SL-5

Vị trí C	$^*\delta_C$	$\delta_C^{a,b}$	Nhóm chức	$\delta_H^{a,c}$ (độ bội, *J* = Hz)
2	146,8	146,7 (C)	-O-C= |	
3	135,7	135,7 (C)	HO-C= |	
4	175,8	175,8 (C)	>C=O	
5	160,7	160,7 (C)	HO-C= |	
6	98,1	98,2 (CH)	-CH=	6,18 (d, *J*=2,0)
7	163,8	164,0 (C)	HO-C= |	
8	93,3	93,3 (CH)	-CH=	6,40 (d, *J*=2,0)
9	156,1	156,1 (C)	-O-C= |	
10	103,0	102,9 (C)	>C=	
1′	121,9	121,9 (C)	>C=	
2′	115,6	115,0 (CH)	-CH=	7,67(d, *J*=2,0)
3′	145,0	145,0 (C)	HO-C= |	
4′	147,6	147,7 (C)	HO-C= |	
5′	115,6	115,6 (CH)	-CH=	6,88 (d, *J*=8,5)
6′	119,9	119,9 (CH)	-CH=	7,54 (dd, *J*= 2,0; 8,5)

**δ_c của quercetin đo trong DMSO-d_6 [101]; [a]Đo trong DMSO-d_6, [b]125 MHz, [c]500 MHz.*

Phổ ESI-MS cho pic ion *m/z* 300,9 $[M-H]^-$ phù hợp với công thức phân tử $C_{15}H_{10}O_7$ (302,04). Phổ IR cho thấy các băng và dải hấp thụ của nhóm -OH (3406 cm^{-1}); nhóm C=O (1668 cm^{-1}); các nhóm C=C (1610, 1520, 1453 cm^{-1}). Phổ UV cho các đỉnh hấp thụ tại 212, 265 và 351 nm (liên kết đôi liên hợp). Phổ ^{13}C NMR và DEPT chỉ ra sự có mặt của 15 nguyên tử carbon (5 nhóm methin, 10 carbon bậc 4), trong đó tín hiệu δ_C 175,8 của nhóm carbonyl ở vị trí C-4. Các dữ liệu trên gợi ý rằng **SL-5** là một chất có 15 C, có nhóm OH, nhóm C=O, liên kết đôi C=C, có các đỉnh hấp thụ UV đặc trưng cho liên kết đôi liên hợp, chứng tỏ đây là một flavonoid nhóm flavon. Phổ ^1H NMR chỉ ra 2 tín hiệu ở δ_H 6,18 (1H, d, *J*=2,0 Hz), 6,40 (1H, d, *J*=2,0 Hz) phù hợp với các proton vị trí *meta* H-6 và H-8 trên vòng A và hệ ABX ở δ_H 7,67 (1H, d, *J*=2,0 Hz, H-2′), 6,88 (1H, d, *J*=8,5 Hz, H-5′), 7,54 (1H, dd, *J*= 2,0; 8,5 Hz, H-6′) phù hợp với proton thuộc nhóm catechol trên vòng B (thế tại các vị trí 3′ và 4′). Như vậy, **SL-5** được xác định là một flavonoid nhóm flavon, có công thức phân tử là $C_{15}H_{10}O_7$, vòng A có hai proton tại vị trí số 6 và 8, vòng B có các proton tại vị trí số 2′, 5′ và 6′, các vị trí khác đều có nhóm thế OH. Vì vậy, hợp chất **SL-5** được xác định là quercetin (Hình 3.17). So sánh các dữ liệu phổ của hợp chất thu được với quercetin trong tài liệu [101] thấy phù hợp.



Hình 3.17. Cấu trúc của hợp chất SL-5

- **SL-6 (quercetin-3-*O*-β-D-galactopyranosid, hyperin)**

Bột vô định hình màu vàng; nhiệt độ nóng chảy: 236-237 ^oC; UV (MeOH) λ_{max} (nm): 257, 360; IR (KBr) ν_{max} (cm^{-1}): 3456, 1659, 1606, 1495; ESI-MS *m/z*: 463,0 $[M-H]^-$; Dữ liệu phổ ^1H NMR, ^{13}C NMR ở Bảng 3.7.

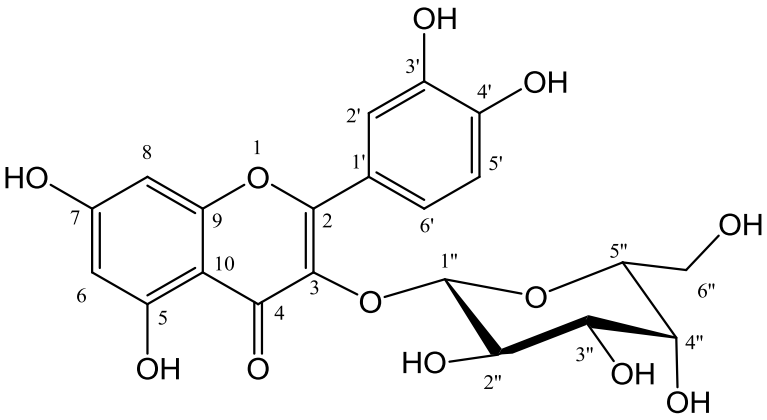
Bảng 3.7. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất SL-6

Vị trí C	$^{*}\delta_C$	$\delta_C^{a,b}$	Nhóm chức	$\delta_H^{a,c}$ (độ bội, *J* = Hz)
2	158,5	158,5 (C)	-O-C= |	
3	135,1	135,8 (C)	-O-C= |	
4	179,1	179,5 (C)	>C=O	
5	162,7	163,0 (C)	HO-C= |	
6	99,7	100,0 (CH)	-CH=	6,22 (d, *J*=2,0)
7	165,7	166,2 (C)	HO-C= |	
8	94,6	94,8 (CH)	-CH=	6,41 (d, *J*=2,0)
9	158,2	158,8 (C)	-O-C= |	
10	105,5	105,6 (C)	>C=	
1′	122,8	123,0 (C)	>C=	
2′	115,9	116,1 (CH)	-CH=	7,86 (d, *J*=2,0)
3′	145,6	145,8 (C)	HO-C= |	
4′	149,7	149,9 (C)	HO-C= |	
5′	117,7	117,8 (CH)	-CH=	6,88 (d, *J*=9,0)
6′	122,8	123,0 (CH)	-CH=	7,60 (dd, *J*= 2,0; 9,0)
1″	105,4	105,5 (CH)	-O-CH-O- |	5,18 (d, *J*=7,5)
2″	73,1	73,2 (CH)	>CH-OH	3,84 (m)
3″	75,0	75,1 (CH)	>CH-OH	3,59 (m)
4″	69,9	70,0 (CH)	>CH-OH	3,87 (m)
5″	77,0	77,2 (CH)	>CH-O-	3,50 (m)
6″	61,9	62,0 (CH_2)	-CH_2-OH	3,67 (dd, *J*=6,0; 11,0); 3,57 (m)

**δ_c của hyperin đo trong CD_3OD [62]; [a]Đo trong CD_3OD, [b]125 MHz, [c]500 MHz.*

Phổ ESI-MS cho pic ion *m/z* 463,0 $[M-H]^-$ phù hợp với công thức phân tử $C_{21}H_{20}O_{12}$ (464,10). Phổ IR cho thấy các băng và dải hấp thụ của nhóm -OH

(3456 cm^{-1}); nhóm C=O (1659 cm^{-1}); các nhóm C=C (1606, 1495 cm^{-1}). So sánh phổ ^{1}H NMR của hợp chất **SL-6** với **SL-5** thấy các tín hiệu của vòng A, B khá giống nhau, thể hiện 2 tín hiệu ghép cặp *meta* điển hình ở δ_H 6,22 (1H, d, *J*=2,0 Hz, H-6), 6,41 (1H, d, *J*=2,0 Hz, H-8) và hệ ABX trên vòng B ở δ_H 7,86 (1H, d, *J*=2,0 Hz, H-2′), 6,88 (1H, d, *J*=9,0 Hz, H-5′), 7,60 (1H, dd, *J*= 2,0; 9,0 Hz, H-6′). Do vậy khẳng định cấu trúc hợp chất **SL-6** có aglycon là quercetin. Tuy nhiên, trên phổ ^{1}H NMR của **SL-6** xuất hiện một doublet của proton anomer ở δ_H 5,18 (1H, d, *J*=7,5 Hz, H-1"), 6 tín hiệu proton oxymethin và oxymethylen ở trong vùng δ_H 3,50 - 3,87 là chứng tỏ dấu hiệu hình thành của một liên kết *β*-monoglycosid. Phổ ^{13}C NMR và DEPT chỉ ra sự có mặt của 21 nguyên tử carbon, gồm có 1 nhóm methylen, 8 nhóm methin, 9 carbon bậc 4, trong đó: 1 tín hiệu nhóm carbonyl ở δ_C 179,5 (C-4); các tín hiệu của đường hexose: 4 oxymethincarbon ở δ_C 73,2 (C-2"), 75,1 (C-3"), 70,0 (C-4"), 77,2 (C-5") và 1 oxymethylencarbon ở δ_C 62,0 (C-6"). Từ đó có thể đề xuất rằng liên kết *β*-monoglycosid là *β*-galactopyranosid. So sánh các dữ liệu phổ của hợp chất thu được với hyperin trong tài liệu [62] thấy phù hợp, hợp chất **SL-6** xác định là quercetin-3-O-*β*-D-galactopyranosid (hyperin) (Hình 3.18).



Hình 3.18. Cấu trúc của hợp chất SL-6

- **SL-7 (quercetin-3-*O*-*β*-D-glucopyranosid, isoquercitrin)**

Bột vô định hình màu vàng; UV (MeOH) λ_{max} (nm): 206, 257, 358; ESI-MS *m/z*: 463,0 $[M-H]^-$; Dữ liệu phổ ^{1}H NMR, ^{13}C NMR ở Bảng 3.8.

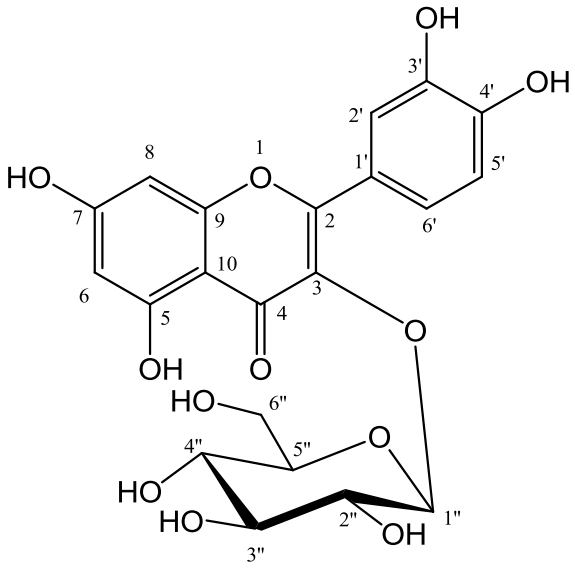
Bảng 3.8. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất SL-7

Vị trí C	$^{*}\delta_C$	$\delta_C^{a,b}$	Nhóm chức	$\delta_H^{a,c}$ (độ bội, *J* = Hz)
2	159,2	158,5 (C)	-O-C=	
3	135,8	135,6 (C)	-O-C=	
4	179,6	179,5 (C)	>C=O	
5	163,2	163,0 (C)	HO-C=	
6	100,1	99,9 (CH)	-CH=	6,23 (br s)
7	166,3	166,0 (C)	HO-C=	
8	94,9	94,7 (CH)	-CH=	6,41 (br s)
9	158,6	159,0 (C)	-O-C=	
10	105,8	105,7 (C)	>C=	
1′	123,2	123,2 (C)	>C=	
2′	116,1	116,0 (CH)	-CH=	7,73 (d, *J*=2,0)
3′	146,1	145,9 (C)	HO-C=	
4′	150,0	149,9 (C)	HO-C=	
5′	117,7	117,6 (CH)	-CH=	6,89 (d, *J*=8,0)
6′	123,3	123,1 (CH)	-CH=	7,60 (dd, *J*= 2,0; 8,0)
1″	104,5	104,4 (CH)	-O-CH-O-	5,26 (d, *J*=7,5)
2″	75,9	75,7 (CH)	>CH-OH	3,51 (t, *J*= 9,0)
3″	78,3	78,4 (CH)	>CH-OH	3,45 (t, *J*=9,0)
4″	71,4	71,2 (CH)	>CH-OH	3,35 (t, *J*=9,0)
5″	78,5	78,1 (CH)	>CH-O-	3,25 (m)
6″	62,7	62,6 (CH_2)	-CH_2-OH	3,73 (dd, *J*=2,0; 12,0); 3,60 (dd, *J*=5,5; 12,0)

**δ_c của isoquercitrin đo trong CD_3OD [56]; [a]Đo trong CD_3OD, [b]125MHz, [c]500 MHz.*

Phổ ESI-MS cho pic ion *m/z* 463,0 $[M-H]^-$ phù hợp với công thức phân tử $C_{21}H_{20}O_{12}$ (464,10). So sánh phổ NMR của hợp chất **SL-7** với **SL-6** thấy có các

tín hiệu ở vòng A, B khá giống nhau. Trên phổ ^{1}H NMR của **SL-7** xuất hiện của một doublet của proton anomer ở δ_H 5,26 (1H, d, *J*=7,5 Hz); 6 tín hiệu proton oxymethin, oxymethylen ở trong vùng δ_H 3,25 - 3,73 cũng chứng tỏ dấu hiệu hình thành của một liên kết *β*-monoglycosid tương tự như **SL-6**. Trên phổ ^{13}C NMR có các tín hiệu về sự có mặt liên kết của đường hexose: 4 tín hiệu oxymethincarbon ở δ_C 75,7 (C-2"), 78,4 (C-3"), 71,2 (C-4"), 78,1 (C-5") và 1 tín hiệu oxymethylencarbon ở δ_C 62,6 (C-6"). Từ các dữ liệu phổ trên, khẳng định hợp chất **SL-7** cũng là một *β*-monoglycosid có aglycon là quercetin. So sánh các tín hiệu đường hexose trên phổ ^{13}C NMR của hợp chất **SL-7** với **SL-6** thấy có sự chênh lệch về độ dịch chuyển hóa học về phía trường thấp khá lớn ở các vị trí C-2", C-3" lần lượt là 2,5 và 3,3 ppm. Với những dữ liệu MS, NMR cho thấy đường liên kết với quercetin của hợp chất **SL-7** là đồng phân vị trí của đường *β*-D-galactopyranose. Từ đó có thể đề xuất đường liên kết với aglycon của hợp chất **SL-7** là *β*-D-glucopyranose. So sánh các dữ liệu phổ của hợp chất thu được với isoquercitrin trong tài liệu [56] thấy phù hợp, hợp chất **SL-7** xác định là quercetin-3-O-*β*-D-glucopyranosid (isoquercitrin) (Hình 3.19).



Hình 3.19. Cấu trúc hợp chất SL-7

- **SL-8 (engeletin)**

Bột vô định hình màu vàng nhạt; nhiệt độ nóng chảy: 175-176 ^{o}C; UV (MeOH) λ_{max} (nm): 217, 266, 274, 295, 377; IR (KBr) ν_{max} (cm^{-1}): 3381, 1644, 1598, 1518, 1469; ESI-MS *m/z*: 433,1 $[M-H]^-$; Dữ liệu phổ ^{1}H NMR, ^{13}C NMR ở Bảng 3.9.

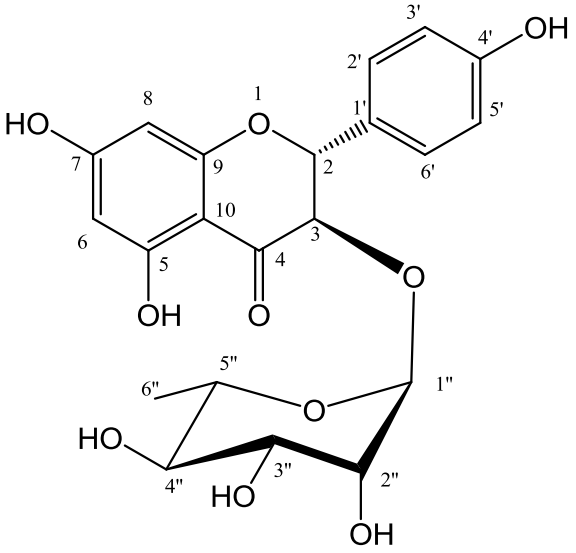
Bảng 3.9. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất SL-8

Vị trí C	$^{*}\delta_C$	$\delta_C^{a,b}$	Nhóm chức	$\delta_H^{a,c}$ (độ bội, *J* = Hz)
2	83,9	81,5 (CH)	>CH-O-	5,29 (d, *J*=10,0)
3	78,7	76,0 (CH)	>CH-O-	4,74 (d, *J*=10,0)
4	196,0	194,7 (C)	>C=O	
5	165,5	163,4 (C)	HO-C=	
6	97,5	96,1 (CH)	-CH=	5,88 (d, *J*=2,0)
7	168,6	166,9 (C)	HO-C=	
8	96,3	95,1 (CH)	-CH=	5,91 (d, *J*=2,0)
9	164,1	162,2 (C)	-O-C=	
10	102,5	101,0 (C)	>C=	
1′	128,6	126,5 (C)	>C=	
2′	116,4	115,2 (CH)	-CH=	7,33 (d, *J*=8,5)
3′	130,0	129,0 (CH)	-CH=	6,79 (d, *J*=8,5)
4′	159,4	157,8 (C)	HO-C=	
5′	130,0	129,0 (CH)	-CH=	6,79 (d, *J*=8,5)
6′	116,4	115,2 (CH)	-CH=	7,33 (d, *J*=8,5)
1″	102,2	100,3 (CH)	-O-CH-O-	3,97 (s)
2″	72,2	70,4 (CH)	>CH-OH	3,28 (s)
3″	71,8	70,1 (CH)	>CH-OH	3,13 (m)
4″	73,8	71,6 (CH)	>CH-OH	3,12 (m)
5″	70,5	69,0 (CH)	>CH-O-	3,90 (dd, *J*=6,5; 9,5)
6″	18,7	17,7 (CH_3)	-CH_3	1,05 (d, *J*=6,5)

**δ_c của engeletin đo trong $(CD_3)_2CO$ [11]; [a]Đo trong DMSO-d_6, [b]125 MHz, [c]500 MHz.*

Phổ ESI-MS cho pic ion *m/z* 433,1 $[M-H]^-$ phù hợp với công thức phân tử $C_{21}H_{22}O_{10}$ (434,12). Phổ IR cho thấy các băng và dải hấp thụ của nhóm -OH (3381 cm^{-1}); nhóm C=O (1644 cm^{-1}); các nhóm C=C (1598, 1518, 1469 cm^{-1}). Phổ ^1H NMR chỉ ra 2 tín hiệu proton thơm ở các vị trí *meta* trên vòng A: δ_H 5,88

(1H, d, *J*=2,0 Hz), 5,91 (1H, d, *J*=2,0 Hz) lần lượt ở các vị trí H-6, H-8. Trên vòng B, có 2 tín hiệu cặp doublet kép của 4 proton thơm: δ_H 7,33 (d, *J*=8,5 Hz) ở vị trí H-2', H-6'; 6,79 (d, *J*=8,5 Hz) ở vị trí H-3′, H-5′, với hai cặp proton ở vị trí *ortho* (*J*=8,5 Hz) đối xứng nhau. Từ các tín hiệu trên cho thấy vòng B có một nhóm thế ở vị trí C-4′. Mặt khác, nhận thấy trên vòng C có tín hiệu cặp doublet ở δ_H 5,29 (d, *J*=10,0 Hz), 4,74 (d, *J*=10,0 Hz) cho biết hai proton ở vị trí H-2, H-3 ở khác phía với nhau (2β-H, 3α-H). Từ các tín hiệu phổ ^{1}H NMR ở trên, dự kiến hợp chất **SL-8** có aglycon là trihydroxydihydroflavonol. Đường α-L-rhamnopyranose được gắn với C-3 của aglycon qua các tín hiệu của phổ ^{1}H NMR: một doublet nhóm methyl ở δ_H 1,05 (3H, d, *J*=6,5 Hz, H-6"), singlet của proton anomer ở δ_H 3,97 (s, H-1") và 4 tín hiệu proton oxymethin δ_H 3,12 - 3,90. Phổ ^{13}C NMR và DEPT chỉ ra sự có mặt của 21 nguyên tử carbon (1 nhóm methyl, 13 nhóm methin, 7 carbon bậc 4), trong đó có tín hiệu của một nhóm carbonyl (δ_C 194,7, C-4); một nhóm methyl (δ_C 17,7, C-6"); 4 nhóm oxymethin (δ_C 70,4, 70,1, 71,6, 69,0, C2"-5"). So sánh các dữ liệu phổ của hợp chất thu được với engeletin trong tài liệu [11],[102] thấy phù hợp, hợp chất **SL-8** xác định là (2*R*,3*R*)-4′,5,7-trihydroxydihydroflavonol-3β-O-α-L-rhamnopyranosid (engeletin) (Hình 3.20). Tra cứu tài liệu thấy rằng engeletin là glycosid đầu tiên của dihydrokaempferol aglycon được phân lập từ chi *Astilbe.*



Hình 3.20. Cấu trúc của hợp chất SL-8

- **SL-9 (quercitrin)**

Bột màu vàng; nhiệt độ nóng chảy: 230-232 ^{o}C; UV (MeOH) λ_{max} (nm):

202, 256, 349; IR (KBr) ν_{max} (cm^{-1}): 3346, 1659, 1605, 1507, 1455; ESI-MS *m/z*: 447,0 $[M-H]^-$. Dữ liệu phổ ^1H NMR, ^{13}C NMR ở Bảng 3.10.

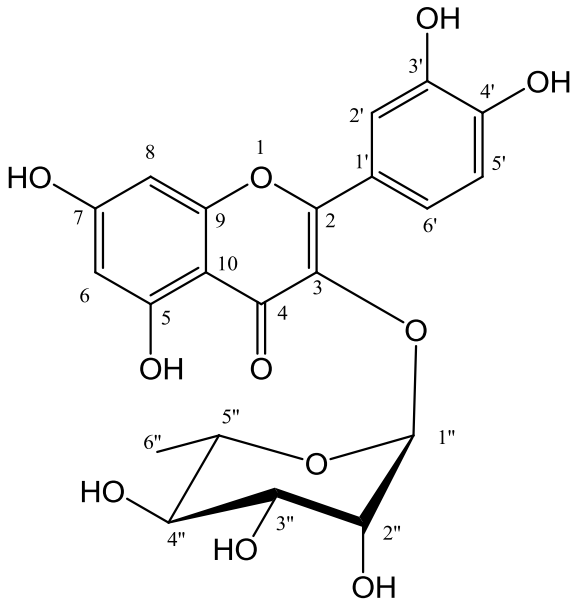
Bảng 3.10. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất SL-9

Vị trí C	$^*\delta_C$	δ_C [a,b]	Nhóm chức	δ_H [a,c] (độ bội, *J* = Hz)
2	158,0	159,3 (C)	-O-C=	
3	134,9	136,2 (C)	-O-C=	
4	178,2	179,7 (C)	>C=O	
5	162,0	163,2 (C)	HO-C=	
6	99,4	99,9 (CH)	-CH=	6,22 (d, *J*=2,0)
7	165,0	165,9 (C)	HO-C=	
8	94,2	94,7 (CH)	-CH=	6,39 (d, *J*=2,0)
9	157,2	158,5 (C)	-O-C=	
10	104,8	105,9 (C)	>C=	
1′	121,5	122,9 (C)	>C=	
2′	116,2	116,4 (CH)	-CH=	7,36 (d, *J*=2,5)
3′	145,9	146,4 (C)	HO-C=	
4′	149,2	149,8 (C)	HO-C=	
5′	116,4	117,0 (CH)	-CH=	6,93 (d, *J*=8,0)
6′	121,8	123,0 (CH)	-CH=	7,33 (dd, *J*= 2,0; 8,0)
1″	102,6	103,6 (CH)	-O-CH-O-	5,37 (d, *J*=1,5)
2″	71,9	72,2 (CH)	>CH-OH	4,24 (m)
3″	71,3	72,0 (CH)	>CH-OH	3,77 (dd, *J*=3,5; 9,5)
4″	71,1	73,3 (CH)	>CH-OH	3,36 (m)
5″	70,8	71,9 (CH)	>CH-O-	3,44 (dd, *J*=6,5; 9,5)
6″	18,2	17,6 (CH_3)	-CH_3	0,96 (d, *J*=6,5)

**δ_c của quercitrin đo trong DMSO-d_6 [31]; [a]Đo trong CD_3OD, [b]125 MHz, [c]500 MHz.*

Phổ ESI-MS cho pic ion *m/z* 447,0 $[M-H]^-$ phù hợp với công thức phân tử

$C_{21}H_{20}O_{11}$ (448,10). Phổ IR cho thấy các băng và dải hấp thụ của nhóm -OH (3346 cm^{-1}); nhóm C=O (1659 cm^{-1}); các nhóm C=C (1605, 1507, 1455 cm^{-1}). Khi so sánh phổ NMR của hợp chất **SL-9** với **SL-5** thấy các tín hiệu của vòng A, B khá giống nhau. Do vậy khẳng định cấu trúc hợp chất **SL-9** có aglycon là quercetin. Tuy nhiên, trên phổ ^1H NMR có sự xuất hiện của một doublet của nhóm methyl ở δ_H 0,96 (*J*= 6,5 Hz, H-6"), doublet của proton anomer ở δ_H 5,37 (*J*= 1,5 Hz, H-1") và 4 tín hiệu proton oxymethin δ_H 3,36 - 4,24 là dấu hiệu của một đường α-L-rhamnopyranose. Phổ ^{13}C NMR chỉ ra sự có mặt của 21 nguyên tử carbon; phân tích các tín hiệu trên phổ DEPT xác nhận gồm 1 nhóm methyl, 10 nhóm methin, 10 carbon bậc 4 và trong đó có tín hiệu một nhóm carbonyl (δ_C 179,7, C-4); một nhóm methyl (δ_C 17,6, C-6"), 4 nhóm oxymethin (δ_C 72,2, 72,0, 73,3, 71,9, C2"-5"). So sánh các dữ liệu phổ của hợp chất thu được với quercitrin trong tài liệu [31],[77] thấy phù hợp, hợp chất **SL-9** xác định là quercetin-3-*O*-α-L-rhamnopyranosid (quercitrin) (Hình 3.21).



Hình 3.21. Cấu trúc của hợp chất SL-9

- **SL-10 (bergenin)**

Tinh thể không màu; nhiệt độ nóng chảy: 238-240 ^oC; UV (MeOH) λ_{max} (nm): 222, 275; IR (KBr) ν_{max} (cm^{-1}): 3392, 1703, 1612, 1529, 1465, 1346, 1097; ESI-MS *m/z*: 327,0 $[M-H]^-$; Dữ liệu phổ ^1H NMR, ^{13}C NMR ở Bảng 3.11.

Bảng 3.11. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất SL-10

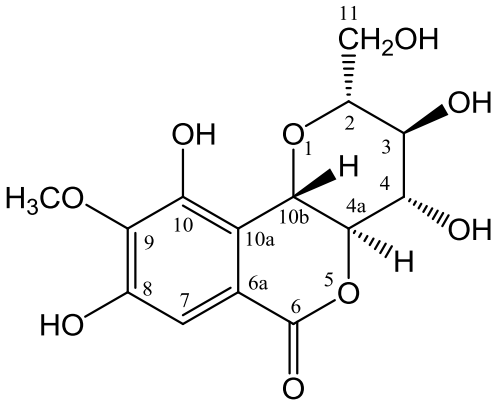
Vị trí C	$^*\delta_C$	$\delta_C^{a,b}$	Nhóm chức	$\delta_H^{a,c}$ (độ bội, *J* = Hz)
C-2	83,1	83,1 (CH)	>CH-O-	3,70 (m)

C-3	71,9	71,9 (CH)	>CH-OH	3,45 (t, *J*=9,0)
C-4a	81,5	81,4 (CH)	>CH-O-	4,09 (t, *J*=10,0)
C-4	75,7	75,7 (CH)	>CH-O-H	3,83 (t, *J*=9,0)
C-6a	119,5	119,4 (C)	>C=	
C-6	165,8	165,8 (C)	-COO-	
C-7	111,1	111,1 (CH)	-CH=	7,11 (s)
C-8	152,4	152,3 (C)	HO-C=	
C-9	142,3	142,0[#] (C)	-O-C=	
C-10a	117,3	117,3 (C)	>C=	
C-10b	74,3	74,3 (CH)	>CH-O-	4,98 (d, *J*=10,0)
C-10	149,5	149,4 (C)	HO-C=	
C-11	62,7	62,7 (CH_2)	-CH_2-OH	3,72 (m); 4,06 (m)
OCH_3	60,9	60,9 (CH_3)	-OCH_3	3,93 (s)

**δ_c của bergenin đo trong CD_3OD [85]; [a]Đo trong CD_3OD, [b]125 MHz, [c]500 MHz.*

[#] Tín hiệu có cường độ yếu.

Phổ ESI-MS cho pic ion *m/z*: 327,0 $[M-H]^-$ phù hợp với công thức phân tử $C_{14}H_{16}O_9$ (328,08). Phổ IR cho thấy các băng và dải hấp thụ của nhóm –OH (3392 cm^{-1}), nhóm C=O (1703 cm^{-1}) và nhóm C=C (1612, 1529, 1465 cm^{-1}). Phổ ^1H NMR chỉ ra một singlet của proton gắn trên vòng thơm có 5 nhóm thế ở δ_H 7,11 (1H, s, H-7); một tín hiệu nhóm methoxy gắn vào vòng thơm ở δ_H 3,93 (3H, s). Bên cạnh đó, các tín hiệu ở δ_H 4,98 (1H, d, *J*=10,5 Hz, H-10b) và 3,45 - 4,09 (m, 6H) đặc trưng của nhóm oxymethin, điều này chỉ ra rằng sự có mặt của *C*-glucosyl. Trên phổ ^{13}C NMR và DEPT có 14 tín hiệu carbon (1 nhóm methyl, 1 nhóm methylen, 6 nhóm methin và 6 carbon bậc 4), trong đó có một vòng thơm



Hình 3.22. Cấu trúc của hợp chất SL-10

ở δ_C 111,1 (C-7), 152,3 (C-8), 142,0 (C-9), 149,4 (C-10), 117,3 (C-10a), 119,4 (C-6a); một tín hiệu nhóm methoxy (OCH_3) ở δ_C 60,9 và một nhóm carbonyl ester ở 165,8 (C-6). Ngoài ra còn có các tín hiệu đặc trưng của phần *C*-glucosyl ở δ_C 83,1 (C-2), 71,9 (C-3); 75,7 (C-4); 81,4 (C-4a), 74,3 (C-10b); 62,7 (C-11). So sánh các dữ liệu phổ của hợp chất thu được với bergenin trong tài liệu [85] thấy phù hợp, hợp chất **SL-10** xác định là bergenin (Hình 3.22).

3.2.3.2. Xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất phân lập từ phần dưới mặt đất

- **SR-4 (acid 3*β*-hydroxyolean-12-en-27-oic, acid *β*-peltoboykinolic)**

Tinh thể không màu. UV (MeOH) λ_{max} (nm): 204; IR (KBr) ν_{max} (cm^{-1}): 3480, 2932, 1686, 1628, 1454, 1188; ESI-MS *m/z*: 455,3 $[M-H]^-$, 457,2 $[M+H]^+$. Dữ liệu phổ ^1H NMR, ^{13}C NMR ở Bảng 3.12.

Bảng 3.12. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất SR-4

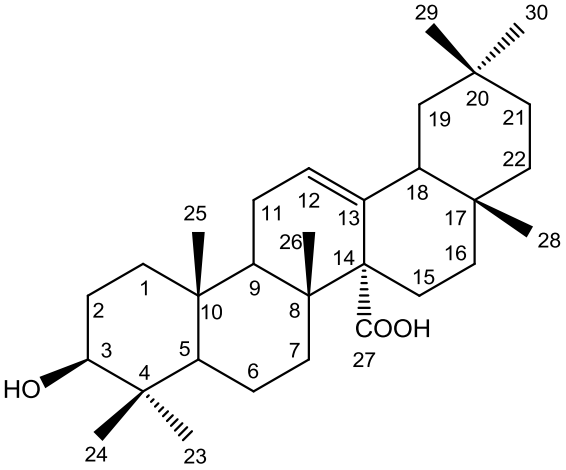
Vị trí C	$^*\delta_C$	δ_C [a,b]	Nhóm chức	δ_H [a,c] (độ bội, *J* = Hz)
C-1	38,6	38,8 (CH_2)	-CH_2-	
C-2	27,5	27,7 (CH_2)	-CH_2-	
C-3	79,4	79,3 (CH)	>CH-OH	3,20 (m)
C-4	38,7	38,9 (C)		
C-5	55,2	55,4 (CH)	>CH-	
C-6	18,2	18,4 (CH_2)	-CH_2-	
C-7	36,3	36,4 (CH_2)	-CH_2-	
C-8	39,7	40,0 (C)		
C-9	47,2	47,4 (CH)	>CH-	
C-10	37,1	37,2 (C)		
C-11	22,8	23,0 (CH_2)	-CH_2-	
C-12	126,2	126,1 (CH)	-CH=	5,66 (t, *J*=3,0)
C-13	138,2	138,1 (C)	>C=	
C-14	55,8	56,0 (C)		
C-15	22,2	22,4 (CH_2)	-CH_2-	

C-16	26,9	27,2 (CH_2)	-CH_2-	
C-17	32,8	33,0 (C)		
C-18	49,0	49,2 (CH)	>CH-	
C-19	43,9	44,2 (CH_2)	-CH_2-	
C-20	31,1	31,2 (C)		
C-21	36,5	36,7 (CH_2)	-CH_2-	
C-22	34,3	34,5 (CH_2)	-CH_2-	
C-23	28,1	28,3 (CH_3)	-CH_3	0,96 (s)
C-24	16,0	15,8 (CH_3)	-CH_3	0,78 (s)
C-25	16,4	16,5 (CH_3)	-CH_3	0,95 (s)
C-26	18,0	18,2 (CH_3)	-CH_3	1,02 (s)
C-27	179,4	179,4 (C)	-COOH	
C-28	28,2	28,4 (CH_3)	-CH_3	0,84 (s)
C-29	33,5	33,4 (CH_3)	-CH_3	0,82 (s)
C-30	23,6	23,8 (CH_3)	-CH_3	0,83 (s)

**δ_c của acid 3β-hydroxyolean-12-en-27-oic đo trong CD_3OD [114]; [a]Đo trong $CDCl_3$, [b]75 MHz, [c]300 MHz.*

Phổ ESI-MS cho pic ion *m/z*: 455,3 $[M-H]^-$, 457,2 $[M+H]^+$ phù hợp với công thức phân tử $C_{30}H_{48}O_3$ (456,36). Phổ IR cho thấy các băng và dải hấp thụ của nhóm -OH (3480 cm^{-1}); nhóm C=O (1686 cm^{-1}); nhóm C=C (1628 cm^{-1}) và nhóm C-O (1188 cm^{-1}). Phổ ^1H NMR chỉ ra tín hiệu đặc trưng của proton olefinic ở δ_H 5,66 (1H, t, *J*=3,0 Hz, H-12); một tín hiệu proton oxymethin ở δ_H 3,2 (1H, m, H-3) và 7 nhóm methyl liên kết với carbon bậc 3 dưới dạng singlet ở δ_H 0,96, 0,78, 0,95, 1,02, 0,84, 0,82, 0,83 được quy vào các vị trí H_3-23, 24, 25, 26, 28, 29, 30. Phổ ^{13}C NMR xuất hiện 30 tín hiệu carbon, gồm một nhóm carboxylic ở δ_C 179,4 (C-27); một nhóm oxymethincarbon ở δ_C 79,3 (C-3); 2 nhóm carbon olefinic ở δ_C 126,2 (C-12) và 138,1 (C-13). Dựa vào các dữ liệu phổ trên, có thể đề xuất rằng hợp chất **SR-4** cũng là một oleanan triterpenoid chứa một liên kết đôi, một nhóm hydroxyl và một nhóm carboxyl. So sánh phổ

NMR giữa hợp chất **SR-4** và hợp chất **SL-1** thấy có các dữ liệu phổ tương đồng. Tuy nhiên, hợp chất **SR-4** không có các tín hiệu của nhóm acetyl trên phổ NMR như **SL-1** nên nó có thể là acid *3β*-hydroxy-olean-12-en-27-oic. Điều này được khẳng định lại khi so sánh các dữ liệu phổ của hợp chất thu được với hợp chất **SR-4** trong tài liệu [114] thấy phù hợp (Hình 3.23).



Hình 3.23. Cấu trúc của hợp chất SR-4

- **SR-1 (acid 6*β*-hydroxy-3-oxoolean-12-en-27-oic)**

Bột màu trắng. Dữ liệu phổ ^{1}H NMR, ^{13}C NMR ở Bảng 3.13.

Bảng 3.13. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất SR-1

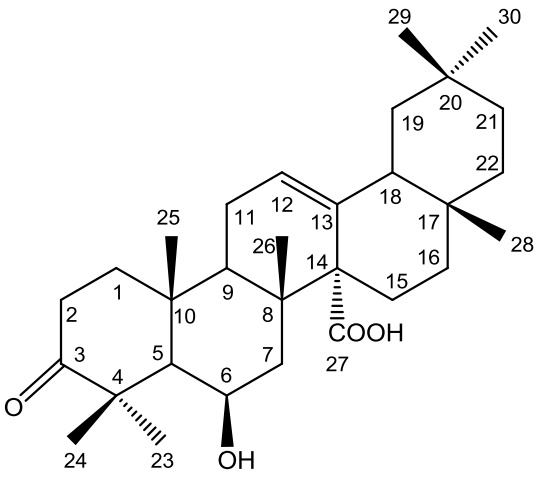
Vị trí C	$^{*}\delta_C$	δ_C [a,b]	Nhóm chức	δ_H [a,c] (độ bội, *J* = Hz)
C-1	41,3	42,2 (CH_2)	-CH_2-	
C-2	33,8	35,0 (CH_2)	-CH_2-	
C-3	215,3	216,0 (C)	>C=O	
C-4	48,0	49,1 (C)		
C-5	55,7	57,2 (CH)	>CH-	
C-6	66,4	68,2 (CH)	>CH-OH	4,67 (br s)
C-7	42,9	44,7 (CH_2)	-CH_2-	
C-8	38,4	39,8 (C)		
C-9	46,0	47,8 (CH)	>CH-	
C-10	36,0	37,3 (C)		
C-11	22,5	23,9 (CH_2)	-CH_2-	
C-12	124,7	125,9 (CH)	-CH=	5,84 (dd, *J*=2,4; 6,4)
C-13	136,9	138,6 (C)	>C=	
C-14	55,5	56,8 (C)		

C-15	21,7	23,3 (CH_2)	-CH_2-	
C-16	27,3	28,7 (CH_2)	-CH_2-	
C-17	32,5	31,5 (C)		
C-18	48,6	50,2 (CH)	>CH-	
C-19	43,4	44,8 (CH_2)	-CH_2-	
C-20	30,6	30,3 (C)		
C-21	34,0	35,0 (CH_2)	-CH_2-	
C-22	36,1	37,3 (CH_2)	-CH_2-	
C-23	25,5	26,2 (CH_3)	-CH_3	1,18 (s)
C-24	23,1	24,1 (CH_3)	-CH_3	1,67 (s)
C-25	16,2	17,4 (CH_3)	-CH_3	1,76 (s)
C-26	19,5	20,8 (CH_3)	-CH_3	1,66 (s)
C-27	176,6	178,9 (C)	-COOH	
C-28	28,0	28,9 (CH_3)	-CH_3	1,01 (s)
C-29	33,2	33,7 (CH_3)	-CH_3	0,73 (s)
C-30	23,4	24,4 (CH_3)	-CH_3	0,89 (s)

**δ_C của acid 6β-hydroxy-3-oxoolean-12-en-27-oic đo trong DMSO-d_6 [69]; [a]Đo trong C_5D_5N, [b]150 MHz, [c]600 MHz.*

Phổ ^{1}H NMR chỉ ra tín hiệu đặc trưng của proton olefinic ở δ_H 5,84 (1H, dd, *J*=2,4; 6,4 Hz, H-12); một tín hiệu proton oxymethin ở δ_H 4,67 (1H, br s, H-6) và 7 methyl liên kết với carbon bậc 3 dưới dạng singlet ở δ_H 1,18, 1,67, 1,76, 1,66, 1,01, 0,73, 0,89 được quy vào các vị trí H_3-23, 24, 25, 26, 28, 29, 30. Phổ ^{13}C NMR xuất hiện 30 tín hiệu carbon, gồm một nhóm carbonyl ở δ_C 216,0 (C-3); một nhóm carboxylic ở δ_C 178,9 (C-27); một nhóm oxymethincarbon ở δ_C 68,2 (C-6); 2 nhóm carbon olefinic ở δ_C 125,9 (C-12) và 138,6 (C-13); 7 nhóm methyl ở δ_C 26,2 (C-23), 24,1 (C-24), 14,4 (C-25), 20,8 (C-26), 28,9 (C-28), 33,7 (C-29), 24,4 (C-30). Dựa trên dữ liệu phổ NMR, có thể đề xuất rằng hợp chất **SR-1** là một oleanan triterpenoid chứa một liên kết đôi (C=C), một nhóm

hydroxyl, một nhóm carboxylic và một nhóm carbonyl. So sánh các dữ liệu phổ của hợp chất thu được với acid *6β*-hydroxy-3-oxoolean-12-en-27-oic trong tài liệu [69] thấy phù hợp, hợp chất **SR-1** xác định là acid *6β*-hydroxy-3-oxoolean-12-en-27-oic (Hình 3.24). Mặc dù đã được phân lập từ loài *Chrysosplenium carnosum* (Saxifragaceae) [69], nhưng đây là lần đầu tiên hợp chất **SR-1** được phân lập từ một loài thuộc chi *Astilbe*.



Hình 3.24. Cấu trúc của hợp chất SR-1

- **SR-2 (acid 3*β*-*trans*-*p*-coumaroyloxy-olean-12-en-27-oic)**

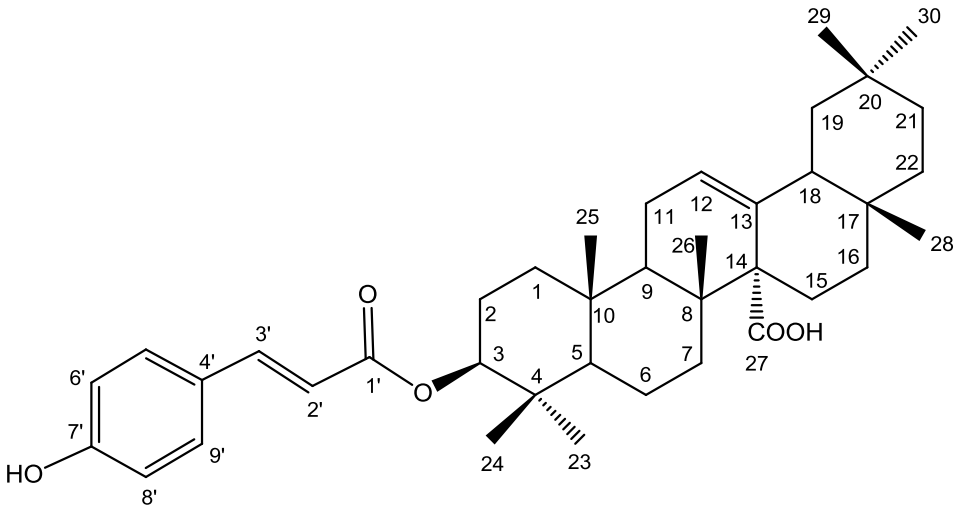
Bột vô định hình màu trắng, $[\alpha]_D^{20}$ +25,1 (*c* 0,1; $CHCl_3$); IR (KBr) ν_{max} (cm^{-1}): 3310, 2948, 1683, 1586; HR-ESI-MS *m/z:* 625,3870 $[M+Na]^+$; tinh khiết: 98,69%. Dữ liệu phổ ^1H NMR, ^{13}C NMR ở Bảng 3.14.

Bảng 3.14. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất SR-2

Vị trí C	δ_C [a,b]	Nhóm chức	δ_H [a,c] (độ bội, *J* = Hz)	Tương tác HMBC (H→C)
C-1	37,7 (CH_2)	-CH_2-	1,48 (m)	
C-2	23,7 (CH_2)	-CH_2-	1,89; 1,72 (m)	
C-3	78,2 (CH)	>CH-O-	5,02 (t, *J*= 2,4)	1, 5, 24, 1'
C-4	37,5 (C)			
C-5	51,1 (CH)	>CH-	1,62 (d, *J*=12,0)	7, 9, 23, 24, 25, 26
C-6	18,9 (CH_2)	-CH_2-	1,48; 1,33 (m)	
C-7	37,4 (CH_2)	-CH_2-	1,89; 1,79 (m)	
C- 8	40,3 (C)			
C-9	47,8 (CH)	>CH-	2,91 (dd, *J*=11,5; 5,2)	5, 7, 8, 10, 11, 14, 25, 26
C-10	34,7 (C)			
C-11	23,6 (CH_2)	-CH_2-	1,96; 1,89 (m)	

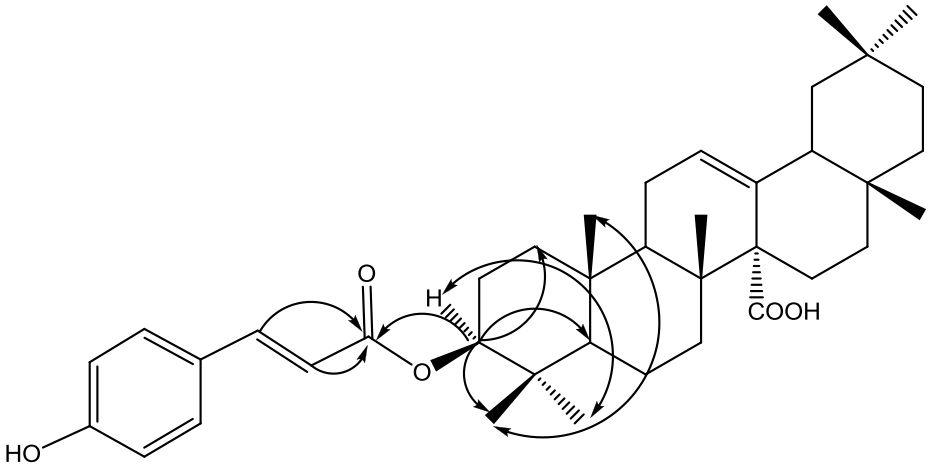
C-12	125,8 (CH)	-CH=	5,80 (t; *J*= 3,4)	9, 11, 14, 18
C-13	139,0 (C)	>C=		
C-14	57,0 (C)			
C-15	23,4 (CH_2)	-CH_2-	2,42 (d, *J*=13,4); 2,11 (m)	
C-16	28,8 (CH_2)	-CH_2-	2,48 (td, 13,2, 3,6); 2,01 (m)	
C-17	33,7 (C)			
C-18	50,3 (CH)	>CH-	2,21 (dd, *J*=13,5; 3,6)	14, 16, 17, 19, 28
C-19	44,8 (CH_2)	-CH_2-	1,79; 1,33 (m)	
C-20	31,6 (C)			
C-21	35,1 (CH_2)	-CH_2-	1,07 (m)	
C-22	37,3 (CH_2)	-CH_2-	1,26 (m)	
C-23	28,4 (CH_3)	-CH_3	0,91 (s)	4, 5, 23
C-24	22,4 (CH_3)	-CH_3	0,89 (s)	3, 4, 5, 10, 23, 25
C-25	16,7 (CH_3)	-CH_3	1,00 (s)	1, 5, 9, 10, 24
C-26	18,9 (CH_3)	-CH_3	1,14 (s)	7, 8, 14, 28
C-27	178,7 (C)	-COOH		
C-28	29,0 (CH_3)	-CH_3	1,03 (s)	16, 17, 18, 22, 26
C-29	33,8 (CH_3)	-CH_3	0,89 (s)	19, 20, 21
C-30	24,2 (CH_3)	-CH_3	0,74 (s)	19, 20, 29
C-1'	167,2 (C)	-COO-		
C-2'	116,3 (CH)	-CH=	6,58 (d, *J*=15,8)	1', 4'
C-3'	145,2 (CH)	-CH=	8,00 (d, *J*=15,8)	1', 2', 4', 5', 9'
C-4'	126,5 (C)	>C=		
C-5'	131,0 (CH)	-CH=	7,53 (d, *J*=8,6)	6', 7', 9'
C-6'	117,1 (CH)	-CH=	7,04 (d, *J*=8,6)	4', 7', 8'
C-7'	161,7 (C)	HO-C= |		
C-8'	117,1 (CH)	-CH=	7,04 (d, *J*=8,6)	4', 7', 6'
C-9'	131,0 (CH)	-CH=	7,53 (d, *J*=8,6)	5', 7', 8'

[a]Đo trong C_5D_5N, [b]150 MHz, [c]600 MHz.



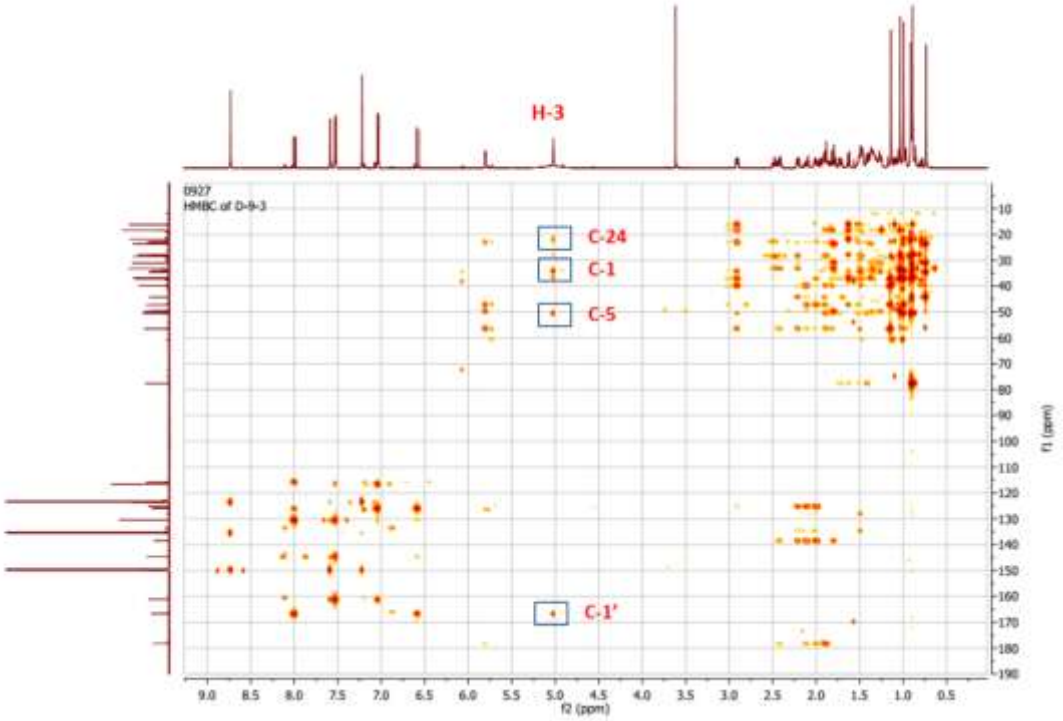
Hình 3.25. Cấu trúc của hợp chất SR-2

Phổ HR-ESI-MS cho pic ion *m/z*: 625,3870 $[M+Na]^+$ phù hợp với công thức phân tử $C_{39}H_{54}NaO_5$ (theo tính toán: 625,3869). Phổ IR cho thấy các băng và dải hấp thụ của nhóm -OH (3310 cm^{-1}); nhóm C=O (1683 cm^{-1}); nhóm C=C (1586 cm^{-1}). Phổ ^1H NMR chỉ ra các tín hiệu của một proton methin olefinic ở δ_H 5,80 (1H, t, *J*=3,4 Hz) và một proton oxymethin ở δ_H 5,02 (1H, t, *J*=2,4 Hz) và 7 nhóm methyl dạng singlet ở δ_H 0,74, 0,89 x 2, 0,91, 1,00, 1,03, 1,14 (3H, s). Thêm vào đó, tín hiệu vòng thơm thế vị trí 1, 4 ở δ_H 7,53 (2H, d, *J*=8,6 Hz) và 7,04 (2H, d, *J*=8,6 Hz), và 2 tín hiệu proton methin olefinic ở δ_H 8,00 (1H, d, *J* = 15,8 Hz) và 6,58 (1H, d, *J*=15,8 Hz) đề xuất có mặt của nhóm *trans-p*-coumaroyl trong hợp chất **SR-2**. Phổ ^{13}C NMR, HMQC cho thấy có 39 tín hiệu carbon, gồm 7 nhóm methyl, 10 nhóm methylen, 11 nhóm methin và 11 carbon bậc 4. Sự có mặt của một liên kết đôi ở δ_C 139,0 và 125,8, một oxymethin ở δ_C 78,2, và 7 nhóm methyl ở δ_C 33,8, 29,0, 28,4, 24,2 x 2, 18,9, 16,7 chỉ ra khung của **SR-2** là một oleanan triterpenoid và dữ liệu phổ của nó tương đồng với phổ hợp chất **SR-4** (acid 3*β*-hydroxyolean-12-en-27-oic). Hợp chất **SR-2** có thể là acid 3*β*-hydroxyolean-12-en-27-oic chứa một nhóm *trans-p*-coumaroyl. Tất cả các tín hiệu ^1H và ^{13}C NMR của hợp chất **SR-2** được quy kết dựa trên phân tích các phổ HMQC, HMBC, COSY và NOESY.

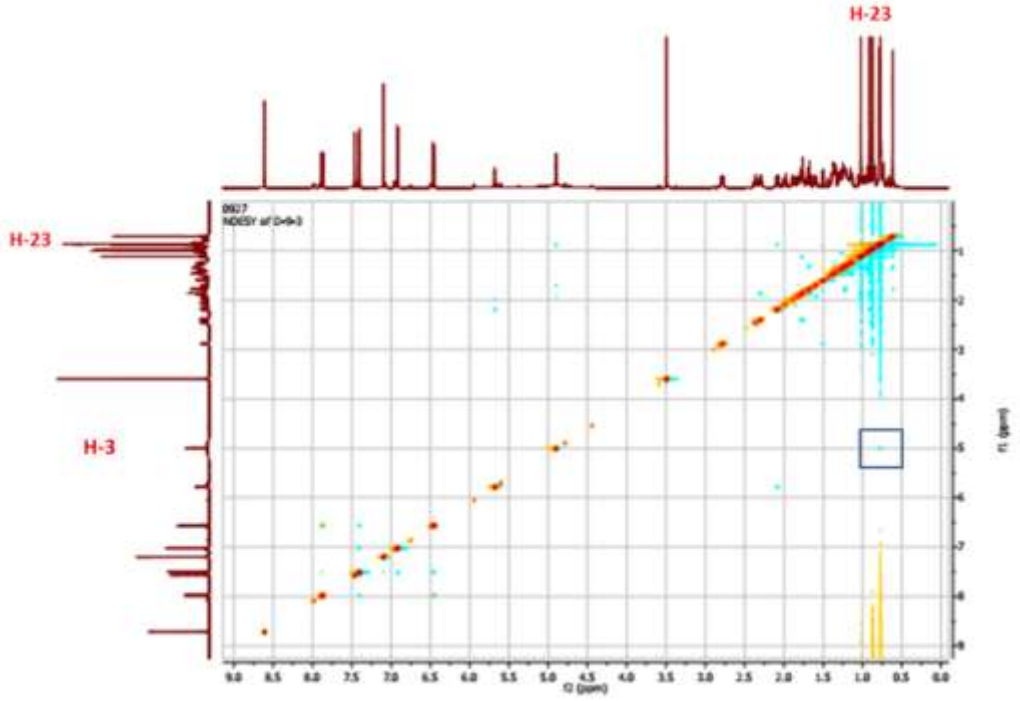


Hình 3.26. Tương tác HMBC (→), NOESY (↔) chính của hợp chất SR-2

Trên phổ HMBC, tín hiệu proton oxymethin ở H-3 (δ_H 5,02) tương quan với C-1 (δ_C 37,7), C-5 (δ_C 51,1), C-24 (δ_C 22,4), và C-1' (δ_C 167,2) (Hình 3.27), có thể đề xuất rằng nhóm *trans-p*-coumaroyl ở vị trí C-3. Hướng của H-3 là *α*-equatorial dựa trên tương quan NOESY giữa H-3 (δ_H 5,02) và H-23 (δ_H 0,91) (Hình 3.28). Dựa trên phân tích ở trên, cấu trúc hợp chất **SR-2** được xác định là acid 3*β*-*trans*-*p*-coumaroyloxy-olean-12-en-27-oic (Hình 3.25, 3.26).



Hình 3.27. Phổ HMBC của hợp chất SR-2



Hình 3.28. Phổ NOESY của hợp chất SR-2

- **SR-3 (3*β*,6*α*-dihydroxylup-20(29)-en)**

Bột màu trắng. ESI-MS *m/z:* 465,3 $[M+Na]^+$. Dữ liệu phổ ^1H NMR, ^{13}C NMR ở Bảng 3.15.

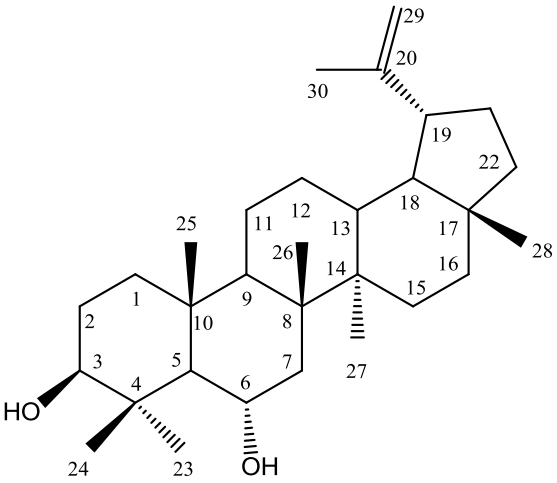
Bảng 3.15. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất SR-3

Vị trí C	$^*\delta_C$	$\delta_C^{a,b}$	Nhóm chức	$\delta_H^{a,c}$ (độ bội, *J* = Hz)
C-1	38,5	39,9 (CH_2)	-CH_2-	
C-2	27,0	27,8 (CH_2)	-CH_2-	
C-3	78,7	79,7 (CH)	>CH-OH	3,11 (dd, *J*=4,8; 11,4)
C-4	39,1	40,4 (C)		
C-5	60,6	61,7 (CH)	>CH-	
C-6	68,8	69,1 (CH)	>CH-OH	3,98 (td, *J*=3,6; 10,5)
C-7	46,7	47,0 (CH_2)	-CH_2-	
C-8	42,1	43,2 (C)		
C-9	49,9	51,3 (CH)	>CH-	
C-10	39,3	40,4 (C)		
C-11	20,8	22,0 (CH_2)	-CH_2-	
C-12	25,0	26,4 (CH_2)	-CH_2-	

C-13	37,6	39,1 (CH)	>CH-	
C-14	43,0	44,1 (C)		
C-15	27,4	28,6 (CH_2)	-CH_2-	
C-16	35,5	36,7 (CH_2)	-CH_2-	
C-17	42,9	44,0 (C)		
C-18	48,3	49,5 (CH)	>CH-	
C-19	47,9	49,4 (CH)	>CH-	2,43 (td, *J*=6,0; 10,8)
C-20	150,8	151,9 (C)	>C=	
C-21	29,8	30,9 (CH_2)	-CH_2-	
C-22	39,9	41,0 (CH_2)	-CH_2-	
C-23	30,9	31,5 (CH_3)	-CH_3	1,29 (s)
C-24	15,5	16,1 (CH_3)	-CH_3	1,03 (s)
C-25	17,1	17,7 (CH_3)	-CH_3	0,93 (s)
C-26	17,5	18,0 (CH_3)	-CH_3	1,16 (s)
C-27	14,5	15,0 (CH_3)	-CH_3	0,96 (s)
C-28	18,0	18,4 (CH_3)	-CH_3	0,85 (s)
C-29	109,4	110,2 (CH_2)	CH_2=	4,71 (br s); 4,58 (br s)
C-30	19,3	19,5 (CH_3)	-CH_3	1,71 (s)

**δ_c của 3β,6α-dihydroxylup-20(29)-en đo trong $CDCl_3$ [39]; [a]Đo trong CD_3OD, [b]150 MHz, [c]600 MHz.*

Phổ ESI-MS cho pic ion *m/z*: 465,3 $[M+Na]^+$ phù hợp với công thức phân tử $C_{30}H_{30}O_2Na$ (465,37). Phổ ^1H NMR chỉ ra tín hiệu của 6 nhóm methyl liên kết với carbon bậc 3 dưới dạng singlet ở δ_H 1,29, 1,03, 0,93, 1,16, 0,96, 0,85, được gán vào các vị trí H_3-23, 24, 25, 26, 27, 28; một nhóm isopropenyl [δ_H 1,71 (3H, s); 4,71 (1H, br s) và 4,58 (1H, br s)]; 2 tín hiệu



Hình 3.29. Cấu trúc của hợp chất SR-3

proton oxymethin δ_H 3,11 (dd, *J*=4,8; 11,4 Hz, H-3) và 3,98 (td, *J*=3,6; 10,5 Hz, H-6). Phổ ^{13}C NMR có 30 tín hiệu carbon, trong đó hai carbon olefinic ở δ_c 151,9 (C-20) và 110,2 (C-29); 2 oxymethincarbon ở δ_c 79,7 (C-3) và 69,1 (C-6). Dựa trên dữ liệu phổ NMR, có thể đề xuất rằng hợp chất **SR-3** là một lupan triterpenoid chứa một liên kết đôi (C=C) và hai nhóm hydroxyl. So sánh các dữ liệu phổ của hợp chất thu được với 3*β,6α*-dihydroxylup-20(29)-en trong tài liệu [39] thấy phù hợp, hợp chất **SR-3** xác định là 3*β,6α*-dihydroxylup-20(29)-en (Hình 3.29). Mặc dù đã được phân lập từ một loài thực vật khác [39],[79], nhưng đây là lần đầu tiên hợp chất **SR-3** được phân lập từ một loài thuộc chi *Astilbe*.

- **SR-6 (acid 3*β,6β*-dihydroxyolean-12-en-27-oic, acid astilbic)**

Bột màu trắng. ESI-MS *m/z*: 471,3 $[M-H]^-$, 495,3 $[M+Na]^+$. Dữ liệu phổ ^{1}H NMR, ^{13}C NMR ở Bảng 3.16.

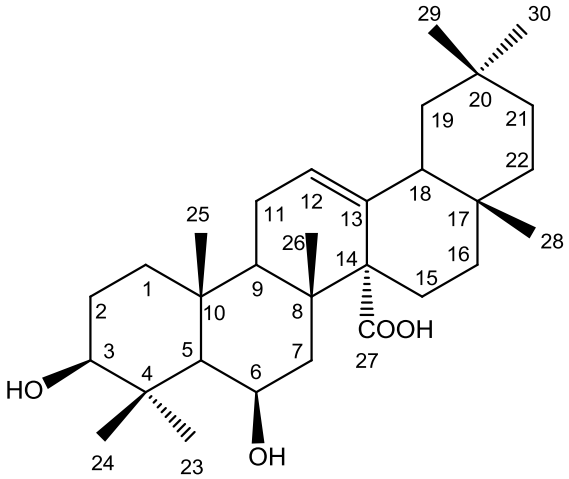
Bảng 3.16. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất SR-6

Vị trí C	$^*\delta_C$	δ_C [a,b]	Nhóm chức	δ_H [a,c] (độ bội, *J* = Hz)
C-1	41,5	41,8 (CH_2)	-CH_2-	
C-2	28,5	28,8 (CH_2)	-CH_2-	
C-3	78,4	78,8 (CH)	>CH-OH	3,34 (dd, *J*=4,2; 11,7)
C-4	40,4	40,7 (C)		
C-5	56,1	56,4 (CH)	>CH-	
C-6	67,5	67,8 (CH)	>CH-OH	4,88 (s)
C-7	45,1	45,4 (CH_2)	-CH_2-	
C-8	39,6	40,0 (C)		
C-9	48,1	48,3 (CH)	>CH-	
C-10	37,3	37,7 (C)		
C-11	23,6	24,0 (CH_2)	-CH_2-	
C-12	125,9	126,2 (CH)	-CH=	5,89 (t, *J*=3,3)
C-13	138,1	138,5 (C)	>C=	
C-14	56,9	57,3 (C)		

C-15	23,1	23,4 (CH_2)	-CH_2-	
C-16	28,5	28,8 (CH_2)	-CH_2-	
C-17	33,5	33,8 (C)		
C-18	49,9	50,3 (CH)	>CH-	
C-19	44,5	44,9 (CH_2)	-CH_2-	
C-20	31,2	31,6 (C)		
C-21	34,8	35,1 (CH_2)	-CH_2-	
C-22	37,1	37,4 (CH_2)	-CH_2-	
C-23	28,7	29,0 (CH_3)	-CH_3	1,29 (s)
C-24	18,1	18,4 (CH_3)	-CH_3	1,75 (s)
C-25	18,0	18,3 (CH_3)	-CH_3	1,74 (s)
C-26	20,4	20,7 (CH_3)	-CH_3	1,71 (s)
C-27	178,8	179,1 (C)	-COOH	
C-28	28,5	28,8 (CH_3)	-CH_3	1,05 (s)
C-29	33,5	33,8 (CH_3)	-CH_3	0,76 (s)
C-30	23,8	24,2 (CH_3)	-CH_3	0,91 (s)

**δ_C của acid 3β,6β-dihydroxyolean-12-en-27-oic đo trong C_5D_5N [114]; [a]Đo trong C_5D_5N, [b]75 MHz, [c]300 MHz.*

Phổ ESI-MS cho pic ion *m/z*: 471,3 $[M-H]^-$ và 495,3 $[M+Na]^+$phù hợp với công thức phân tử $C_{30}H_{48}O_4$ (472,36). Phổ ^{1}H NMR chỉ ra tín hiệu đặc trưng của proton olefinic ở δ_H 5,98 (1H, t, *J*=3,3 Hz, H-12); hai tín hiệu proton oxymethin ở δ_H 3,34 (1H, dd, *J*=4,2; 11,7 Hz, H-3), 4,88 (1H, s, H-6) và 7 methyl liên kết với carbon bậc 3 dưới dạng singlet ở δ_H 1,29, 1,75, 1,74, 1,71, 1,05, 0,76, 0,91 được quy vào các vị trí H_3-23, 24, 25, 26, 28, 29, 30. Phổ ^{13}C NMR xuất hiện 30 tín hiệu carbon, gồm một nhóm carboxylic ở δ_C 179,1 (C-



Hình 3.30. Cấu trúc của hợp chất SR-6

27); hai nhóm oxymethincarbon ở δ_C 78,8 (C-3), 67,5 (C-6); 2 nhóm carbon olefinic ở δ_C 125,9 (C-12) và 138,1 (C-13). Dựa trên dữ liệu phổ NMR, có thể đề xuất rằng hợp chất **SR-6** cũng là một oleanan triterpenoid chứa một liên kết đôi, hai nhóm hydroxyl, một nhóm carboxyl. So sánh các dữ liệu phổ của hợp chất thu được với acid 3*β*,6*β*-dihydroxyolean-12-en-27-oic trong tài liệu [114] thấy phù hợp, hợp chất **SR-6** xác định là acid 3*β*,6*β*-dihydroxyolean-12-en-27-oic (acid astilbic) (Hình 3.30).

- **SR-5 (acid 3*β*,6*β*,7*α*-trihydroxyolean-12-en-27-oic)**

Bột màu trắng. Dữ liệu phổ ^{1}H NMR, ^{13}C NMR ở Bảng 3.17.

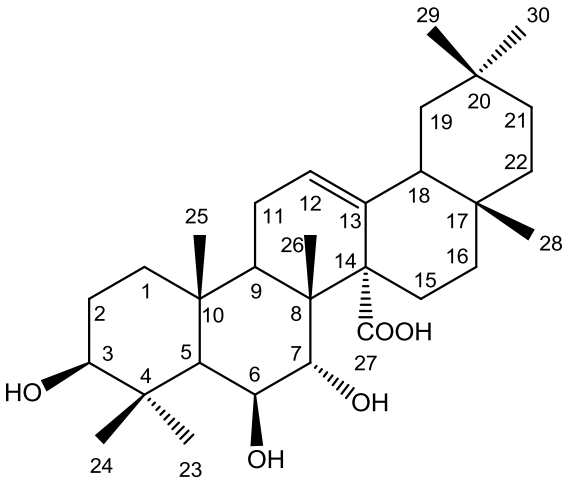
Bảng 3.17. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất SR-5

Vị trí C	$^*\delta_C$	δ_C [a,b]	Nhóm chức	δ_H [a,c] (độ bội, *J* = Hz)
C-1	39,3	41,0 (CH_2)	-CH_2-	
C-2	27,1	27,7 (CH_2)	-CH_2-	
C-3	78,5	79,6 (CH)	>CH-OH	3,11 (dd, *J*=4,9; 11,4)
C-4	39,1	40,3 (C)		
C-5	49,9	51,5 (CH)	>CH-	
C-6	67,9	67,7 (CH)	>CH-OH	4,42 (t, *J*=2,7)
C-7	82,8	84,8 (CH)	>CH-OH	4,33 (d, *J*=3,3)
C-8	43,0	44,3 (C)		
C-9	49,6	51,4 (CH)	>CH-	
C-10	35,9	37,1 (C)		
C-11	21,4	22,6 (CH_2)	-CH_2-	
C-12	127,8	129,5 (CH)	-CH=	5,67 (t, *J*=3,6)
C-13	134,2	135,5 (C)	>C=	
C-14	56,2	57,8 (C)		
C-15	22,9	24,0 (CH_2)	-CH_2-	
C-16	26,6	27,7 (CH_2)	-CH_2-	
C-17	34,4	33,7 (C)		
C-18	48,4	49,8 (CH)	>CH-	

C-19	42,5	43,9 (CH_2)	-CH_2-	
C-20	30,8	31,7 (C)		
C-21	34,4	35,6 (CH_2)	-CH_2-	
C-22	36,7	37,8 (CH_2)	-CH_2-	
C-23	27,2	27,8 (CH_3)	-CH_3	1,05 (s)
C-24	17,4	17,8 (CH_3)	-CH_3	1,18 (s)
C-25	17,9	18,1 (CH_3)	-CH_3	1,29 (s)
C-26	12,6	13,1 (CH_3)	-CH_3	1,21 (s)
C-27	177,5	180,1 (C)	-COOH	
C-28	28,3	28,7 (CH_3)	-CH_3	0,89 (s)
C-29	33,0	33,5 (CH_3)	-CH_3	0,91 (s)
C-30	24,0	24,4 (CH_3)	-CH_3	0,91 (s)

**δ_c của acid 3β,6β,7α-trihydroxyolean-12-en-27-oic đo trong $CDCl_3$ [48]; [a]Đo trong CD_3OD, [b]75 MHz, [c]300 MHz.*

Phổ NMR của hợp chất **SR-5** được so sánh với phổ của hợp chất **SR-6** chỉ ra có sự khác biệt nhất ở vị trí C-7, do một proton được thay thế bởi nhóm hydroxyl [δ_H 4,33 (1H, d, J=3,3 Hz) và δ_C 84,8]. Vì vậy có thể cho rằng, hợp chất **SR-5** là một acid 3,6,7-trihydroxyolean-12-en-27-oic. So sánh các dữ liệu phổ của hợp chất thu được với 3β,6β,7α-trihydroxyolean-12-en-27-oic trong tài liệu [48] thấy phù hợp, hợp chất **SR-5** xác định là acid 3β,6β,7α-trihydroxyolean-12-en-27-oic (Hình 3.31).



Hình 3.31. Cấu trúc của hợp chất SR-5

- **SR-7 (acid 3β,24-dihydroxyolean-12-en-27-oic)**

Bột màu trắng. ESI-MS *m/z*: 471,3 $[M-H]^-$, 473,4 $[M+H]^+$. Dữ liệu phổ ^{1}H NMR, ^{13}C NMR ở Bảng 3.18.

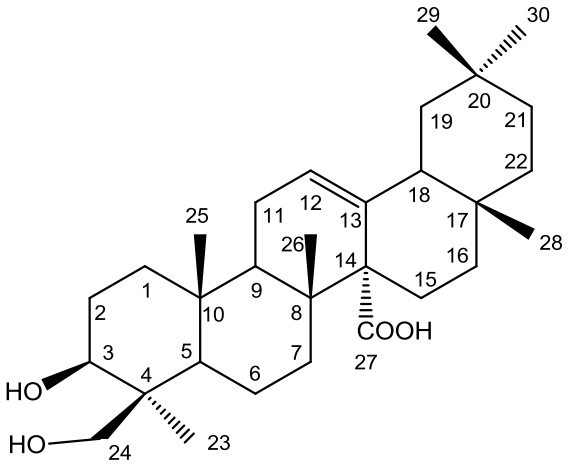
Bảng 3.18. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất SR-7

Vị trí C	$^{*}\delta_C$	$\delta_C^{a,b}$	Nhóm chức	$\delta_H^{a,c}$ (độ bội, *J* = Hz)
C-1	39,5	39,4 (CH_2)	-CH_2-	
C-2	29,0	28,8 (CH_2)	-CH_2-	
C-3	80,4	80,2 (CH)	>CH-OH	3,48 (dd, *J*=4,5; 11,4)
C-4	43,6	43,5 (C)		
C-5	56,8	56,7 (CH)	>CH-	
C-6	19,7	19,6 (CH_2)	-CH_2-	
C-7	38,2	38,0 (CH_2)	-CH_2-	
C-8	40,4	40,3 (C)		
C-9	48,0	47,9 (CH)	>CH-	
C-10	37,7	37,5 (C)		
C-11	24,1	24,0 (CH_2)	-CH_2-	
C-12	125,8	125,7 (CH)	-CH=	5,78 (d, *J*=2,1)
C-13	139,1	138,9 (C)	>C=	
C-14	56,9	56,8 (C)		
C-15	23,5	23,3 (CH_2)	-CH_2-	
C-16	28,9	28,7 (CH_2)	-CH_2-	
C-17	33,8	33,7 (C)		
C-18	50,3	50,2 (CH)	>CH-	
C-19	44,9	44,8 (CH_2)	-CH_2-	
C-20	31,7	31,6 (C)		
C-21	35,2	35,1 (CH_2)	-CH_2-	
C-22	37,5	37,4 (CH_2)	-CH_2-	
C-23	23,9	23,8 (CH_3)	-CH_3	1,40 (s)
C-24	65,1	65,0 (CH_2)	-CH_2-OH	3,70 (d, *J*=10,8); 4,50 (d, *J*=10,8)
C-25	17,5	17,4 (CH_3)	-CH_3	1,02 (s)
C-26	18,9	18,7 (CH_3)	-CH_3	1,10 (s)
C-27	178,9	178,7 (C)	-COOH	

C-28	29,1	29,0 (CH_3)	-CH_3	1,10 (s)
C-29	33,9	33,8 (CH_3)	-CH_3	0,74 (s)
C-30	24,3	24,2 (CH_3)	-CH_3	0,89 (s)

**δ_c của acid 3β,24-dihydroxyolean-12-en-27-oic đo trong C_5D_5N [27]; [a]Đo trong C_5D_5N, [b]75 MHz, [c]300 MHz.*

Phổ ESI-MS cho pic ion *m/z*: 471,3 $[M-H]^-$, 473,4 $[M+H]^+$ phù hợp với công thức phân tử $C_{30}H_{48}O_4$ (472,36). Phổ ^{1}H NMR chỉ ra tín hiệu đặc trưng của proton olefinic ở δ_H 5,78 (1H, d, *J*=2,1 Hz, H-12); một tín hiệu proton oxymethin ở δ_H 3,48 (1H, dd, *J*=4,5; 11,4 Hz, H-3), hai tín hiệu proton oxymethylen ở δ_H 3,70 (1H, d, *J*=10,8 Hz, H-24a), 4,5 (1H, d, *J*=10,8 Hz, H-24b) và 6 methyl liên kết với carbon bậc 3 dưới dạng singlet ở δ_H 1,40, 1,02, 1,10x2, 0,74, 0,89 được quy vào các vị trí H_3-23, 25, 26, 28, 29, 30. Phổ ^{13}C NMR xuất hiện 30 tín hiệu carbon, gồm một nhóm carboxylic ở δ_C 178,9 (C-27); một nhóm oxymethin carbon ở δ_C 80,2 (C-3), một nhóm oxymethylen carbon ở δ_C 65,0 (C-24); 2 nhóm carbon olefinic ở δ_C 125,7 (C-12) và 138,9 (C-13). Dựa trên dữ liệu phổ NMR, có thể đề xuất rằng hợp chất **SR-7** là một oleanan triterpenoid chứa hai nhóm hydroxyl, một nhóm carboxyl. So sánh các dữ liệu phổ của hợp chất thu được với 3*β*,24-dihydroxyolean-12-en-27-oic trong tài liệu [27] thấy phù hợp, hợp chất **SR-7** xác định là acid 3*β*,24-dihydroxyolean-12-en-27-oic (Hình 3.32).



Hình 3.32. Cấu trúc của hợp chất SR-7

- Các hợp chất **SR-8**, **SR-9, SR-10** lần lượt được xác định quercetin (**SL-5**), quercitrin **(SL-9)** và bergenin **(SL-10)** đã được phân lập và xác định cấu trúc ở phần trên mặt đất Lạc tân phụ.

3.3. TÁC DỤNG SINH HỌC

3.3.1. Độc tính cấp của CDMĐLTP

- *Thử nghiệm thăm dò*

- Sử dụng 10 chuột nhắt trắng, giống cái, chia thành 5 nhóm, mỗi nhóm 2 động vật và cho uống CDMĐLTP với liều tăng dần.

- Kết quả: sau 4 - 6 giờ, cả 10 chuột đều không có biểu hiện bất thường; sau 72 giờ cả 10 chuột đều còn sống và không xuất hiện chuột chết trong vòng 7 ngày sau khi uống thuốc.

- Kết thúc thử nghiệm thăm dò đã xác định được liều 24 g CDMĐLTP/kg - mức liều cao nhất có thể cho uống được mà không gây chết chuột nhắt trắng thí nghiệm.

- *Thử nghiệm chính thức*

- Tiến hành thử nghiệm trên 10 chuột nhắt trắng khỏe mạnh, giống cái. Trước thử nghiệm 2 giờ, cho chuột nhịn ăn nhưng vẫn cho uống nước bình thường. Cho cả 10 chuột uống CDMĐLTP với liều 24 g/kg (liều cao nhất đã xác định ở thử nghiệm thăm dò). Thể tích mỗi lần cho chuột uống là 0,2 ml/10 g chuột × 2 lần/ngày, mỗi lần cách nhau 2 giờ. Sau 2 giờ chuột được cho ăn trở lại, uống nước bình thường.

- Kết quả:

+ Sau khi uống thuốc 6 giờ: tất cả các chuột đều không có biểu hiện bất thường: ăn uống, vận động bình thường, phản xạ tốt với các kích thích, không khó thở, lông mượt, niêm mạc hồng hào, mắt sáng, phân khô, nước tiểu bình thường, không bị tiêu chảy.

+ Trong vòng 72 giờ sau khi uống thuốc, không xuất hiện chuột chết và 100% số chuột thử nghiệm đều còn sống sau một tuần thử nghiệm.

Như vậy, khi dùng theo đường uống CDMĐLTP với liều 24 g/kg (tương đương 573 g dược liệu/kg, gấp khoảng 300 lần liều thể hiện tác dụng dược lý), là liều cao nhất có thể cho chuột uống được, CDMĐLTP không thể hiện độc tính

cấp trên chuột nhắt trắng.

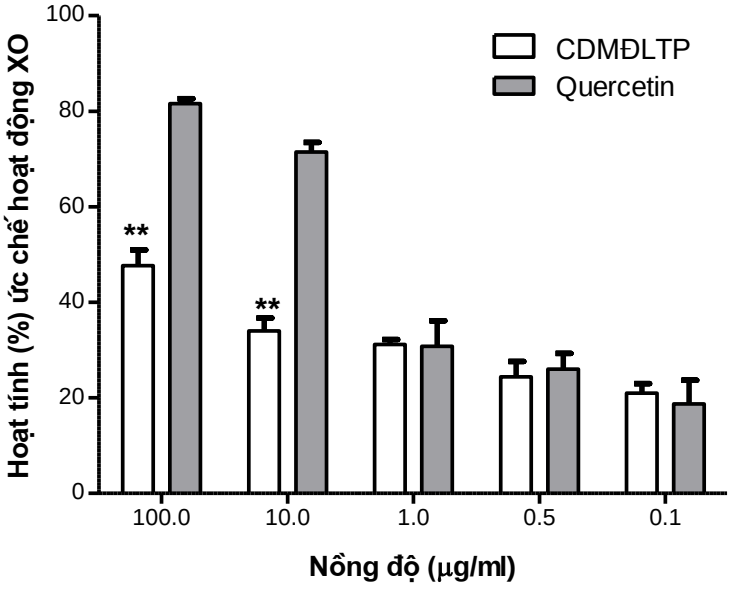
Vì không có chuột chết ở các lô thử nghiệm nên chưa xác định LD_{50} của CDMĐLTP.

3.3.2. Tác dụng chống oxy hóa của CDMĐLTP

Đánh giá tác dụng chống oxy hóa *in vitro* của CDMĐLTP, sử dụng phương pháp xác định khả năng dọn gốc tự do DPPH và gốc tự do $O_2^{\bullet-}$, kết quả IC_{50} lần lượt là 20,29 µg/ml và 58,8 µg/ml. Chất đối chứng dương là quercetin có khả năng dọn gốc tự do DPPH và $O_2^{\bullet-}$ rất mạnh với IC_{50} lần lượt là 1,77 µg/ml và 3,1 µg/ml.

3.3.3. Hoạt tính ức chế hoạt động XO

Xác định hoạt tính ức chế hoạt động XO dựa trên phương pháp đo OD của acid uric tạo thành, quercetin làm chất đối chứng dương. Kết quả thể hiện ở Bảng 1 (Phụ lục 20) và Hình 3.33.



*Giá trị M ± SD; n=3; **, p<0,01 khi so sánh với quercetin*

Hình 3.33. Hoạt tính ức chế hoạt động XO của CDMĐLTP

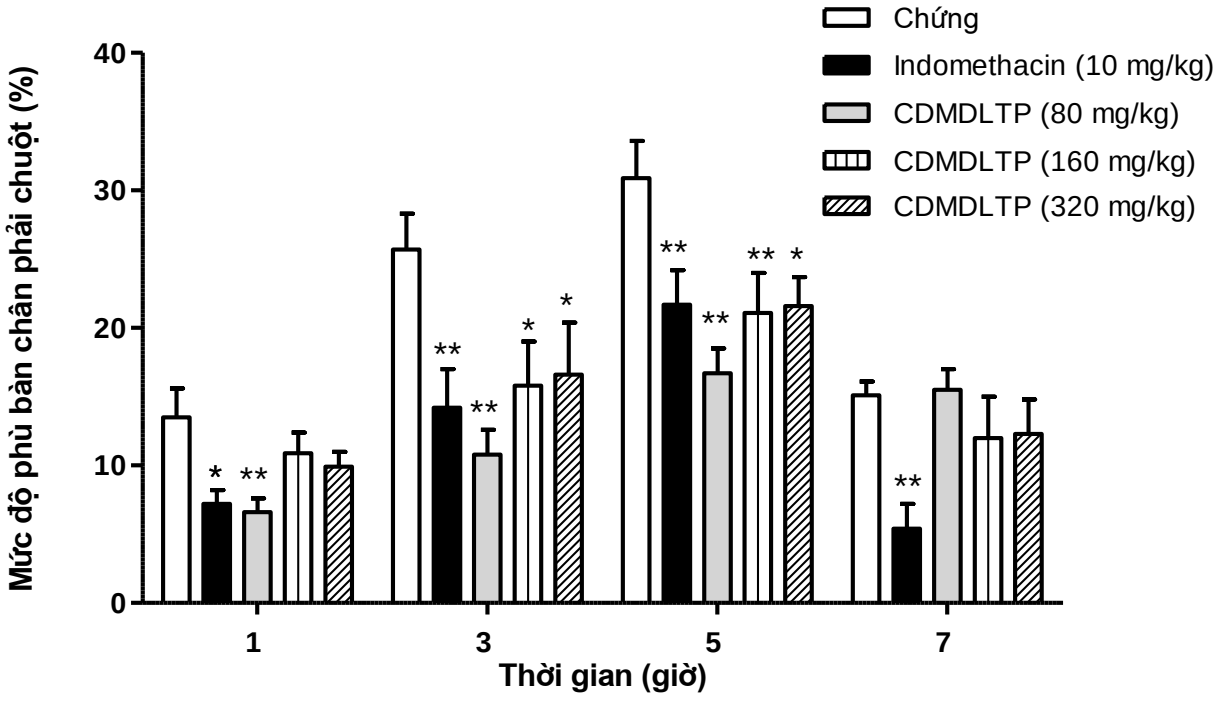
Kết quả thực nghiệm ở Hình 3.33 cho thấy, CDMĐLTP có hoạt tính ức chế hoạt động enzym XO phụ thuộc vào liều, có xu hướng giảm dần khi nồng độ giảm. Với nồng độ CDMĐLTP 100,0, 10,0, 1,0, 0,5, 0,1 µg/ml hoạt tính ức chế

hoạt động XO lần lượt 47,7 ± 3,3%, 34,0 ± 2,7%, 31,20 ± 1,0%, 24,4 ± 3,2%, 21,0 ± 2,0%. Chất đối chứng dương là quercetin có hoạt tính ức chế hoạt động XO ở các nồng độ 100,0, 10,0 μg/ml (ức chế lần lượt 81,6 ± 1,0%, 71,5 ± 2,0%), mạnh hơn có ý nghĩa thống kê so với CDMĐLTP. Ở các nồng độ 1,0, 0,5, 0,1 μg/ml, hoạt tính ức chế hoạt động XO không khác có ý nghĩa thống kê so với CDMĐLTP.

3.3.4. Tác dụng chống viêm của CDMĐLTP

3.3.4.1. Tác dụng chống viêm cấp của CDMĐLTP trên mô hình gây phù bàn chân chuột bằng carrageenan

Sử dụng mô hình gây phù bàn chân chuột bằng carrageenan với thuốc đối chiếu là indomethacin để xác định tác dụng chống viêm cấp của CDMĐLTP. Thông số đánh giá là mức độ phù bàn chân chuột tại các thời điểm 1, 3, 5, 7 giờ sau gây viêm. Kết quả thể hiện ở Bảng 2 (Phụ lục 20) và Hình 3.34.



*Giá trị M ± SE; *, p<0,05; **, p<0,01 khi so sánh với lô chứng*

Hình 3.34. Tác dụng chống viêm của CDMĐLTP trên phù chân chuột do carrageenan theo thời gian

Kết quả cho thấy CDMĐLTP với mức liều 80 mg/kg có tác dụng ức chế phù bàn chân chuột tại các thời điểm 1, 3 và 5 giờ sau khi gây viêm, mức độ phù bàn chân chuột lần lượt là 6,6 ± 1,0% ($p<0,01$), 10,8 ± 1,8% ($p<0,01$), và 16,7 ± 1,8% ($p<0,01$); tỷ lệ ức chế phù bàn chuột so với chứng lần lượt là 50,9%, 58,2% và 46,1%. CDMĐLTP với mức liều 160 mg/kg có tác dụng ức chế phù bàn chân chuột tại các thời điểm 3, 5 giờ sau khi gây viêm, mức độ phù bàn chân chuột lần lượt là 15,8 ± 3,2% ($p<0,05$) và 21,1 ± 2,9% ($p<0,01$); tỷ lệ ức chế phù bàn chuột so với chứng lần lượt 38,5% và 31,7%. CDMĐLTP với mức liều 320 mg/kg có tác dụng ức chế phù bàn chân chuột tại các thời điểm 3, 5 giờ sau khi gây viêm, mức độ phù bàn chân chuột lần lượt là 16,5 ± 3,8% ($p<0,05$) và 21,6 ± 2,1% ($p<0,05$); tỷ lệ ức chế phù bàn chuột so với chứng lần lượt 35,8% và 30,2%.

Indomethacin liều 10 mg/kg thể hiện tác dụng chống viêm tốt, có tác dụng tại tất cả các thời điểm nghiên cứu, mức độ phù bàn chân chuột tại thời điểm 1, 3, 5 và 7 giờ sau khi gây viêm lần lượt là 7,2 ± 1,0% ($p<0,05$), 14,2 ± 2,8 ($p<0,01$), 21,7 ± 2,5% ($p<0,01$) và 5,4 ± 1,8 ($p<0,01$); tỷ lệ ức chế phù bàn chuột so với chứng lần lượt là 46,6%, 44,9%, 29,7% và 64,3%.

Trong các mức liều đã đánh giá tác dụng chống viêm cấp, CDMĐLTP với liều 80 mg/kg là mức liều thể hiện tác dụng chống viêm tại các thời điểm 1, 3, 5 giờ nghiên cứu. Khi tăng liều, khả năng ức chế phù bàn chân chuột không tăng thêm. Vì vậy, mức liều 80 mg/kg được lựa chọn để áp dụng cho các nghiên cứu về tác dụng sinh học tiếp theo.

3.3.4.2. Tác dụng chống viêm mạn của CDMĐLTP trên mô hình gây u hạt thực nghiệm bằng bông

Để đánh giá tác dụng chống viêm mạn trên mô hình gây u hạt thực nghiệm bằng viên bông với thuốc đối chiếu là prednisolon, sử dụng CDMĐLTP với mức liều 80 mg/kg trong thực nghiệm này. Kết quả thể hiện ở Bảng 3.19.

Bảng 3.19. Ảnh hưởng của CDMĐLTP lên khối lượng u hạt

Số TT	Lô	n	Liều (mg/kg)	Thông số	Kết quả đánh giá	
					U hạt tươi	*U hạt khô*
1	**Chứng**	6	-	M ± SE (mg)	601,4 ± 64,8	90,0 ± 10,7
2	**Prednisolon**	6	5	M ± SE (mg)	266,7 ± 36,6	32,7 ± 7,1
				X (%)	55,7	63,6
				p	$p_{2,1}<0,01$	$p_{2,1}<0,01$
3	**CDMĐLTP**	7	80	M ± SE (mg)	430,5 ± 23,9	70,0 ± 3,7
				X (%)	28,4	22,2
				p	$p_{3,1}<0,05$ $p_{3,2}<0,05$	$p_{3,1}>0,05$ $p_{3,2}<0,01$

Kết quả Bảng 3.19 cho thấy, CDMĐLTP với mức liều 80 mg/kg làm giảm khối lượng u hạt tươi 28,4% so với lô chứng ($p<0,05$) nhưng không thể hiện tác dụng làm giảm khối lượng khô so với chứng.

Thuốc đối chiếu prednisolon liều 5 mg/kg thể hiện tác dụng chống viêm mạn rất rõ rệt, làm giảm khối lượng u hạt thực nghiệm so với lô chứng.

3.3.5. Tác dụng giảm đau của CDMĐLTP

3.3.5.1. Tác dụng giảm đau trung ương của CDMĐLTP trên mô hình mâm nóng

Sử dụng mô hình mâm nóng với thuốc đối chiếu là codein. Kết quả thể hiện ở Bảng 3.20.

Bảng 3.20. Ảnh hưởng của CDMĐLTP đến thời gian phản ứng đau

Lô	n	Liều (mg/kg)	Thời gian phản ứng đau (giây)
Chứng	9	-	13,1 ± 0,8
Codein	9	60	47,5 ± 3,4**
CDMĐLTP	9	80	15,4 ± 1,2

*Giá trị M ± SE; **, p < 0,01 khi so sánh với lô chứng*

Thời gian phản ứng với nhiệt độ của chuột uống CDMĐLTP với mức liều 80 mg/kg tại thời điểm sau khi uống thuốc 90 phút không khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô chứng. Trong khi đó, lô dùng codein liều 60 mg/kg có tác dụng kéo dài thời gian phản ứng với nhiệt độ của chuột so với lô chứng ($p<0,01$).

3.3.5.2. Tác dụng giảm đau ngoại vi của CDMĐLTP trên mô hình gây đau quặn bằng acid acetic

Sử dụng mô hình gây đau quặn bằng acid acetic với thuốc đối chiếu là indomethacin để xác định tác dụng giảm đau ngoại vi của CDMĐLTP. Kết quả thể hiện ở Bảng 3.21.

Bảng 3.21. Ảnh hưởng của CDMĐLTP đến số cơn quặn đau của chuột

Số TT	Lô	Số cơn quặn đau					
		0 - 5 phút	*5 - 10 phút*	*10 - 15 phút*	*15 - 20 phút*	*20 - 25 phút*	*25 - 30 phút*
1	**Chứng (n=8)**	2 (0 - 6)	15 (7 - 19)	15 (12 - 18)	16 (14 - 23)	17 (14 - 19)	12 (10 - 17)
2	**Indomethacin 10 mg/kg (n=8)**	0 (0 - 2)	9 (0 - 17)	11 (4 - 13)	9 (7 - 11)	7 (5 - 9)	4 (0 - 8)
	$p_{2,1}$	>0,05	>0,05	<0,05	<0,05	<0,01	<0,01
3	**CDMĐLTP 80 mg/kg (n=8)**	0 (0 - 1)	7 (5 - 14)	11 (7 - 13)	9 (5 - 13)	9 (6 - 11)	9 (6 - 15)
	$p_{3,1}$	>0,05	>0,05	<0,05	<0,05	<0,01	>0,05
	$p_{3,2}$	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	<0,05

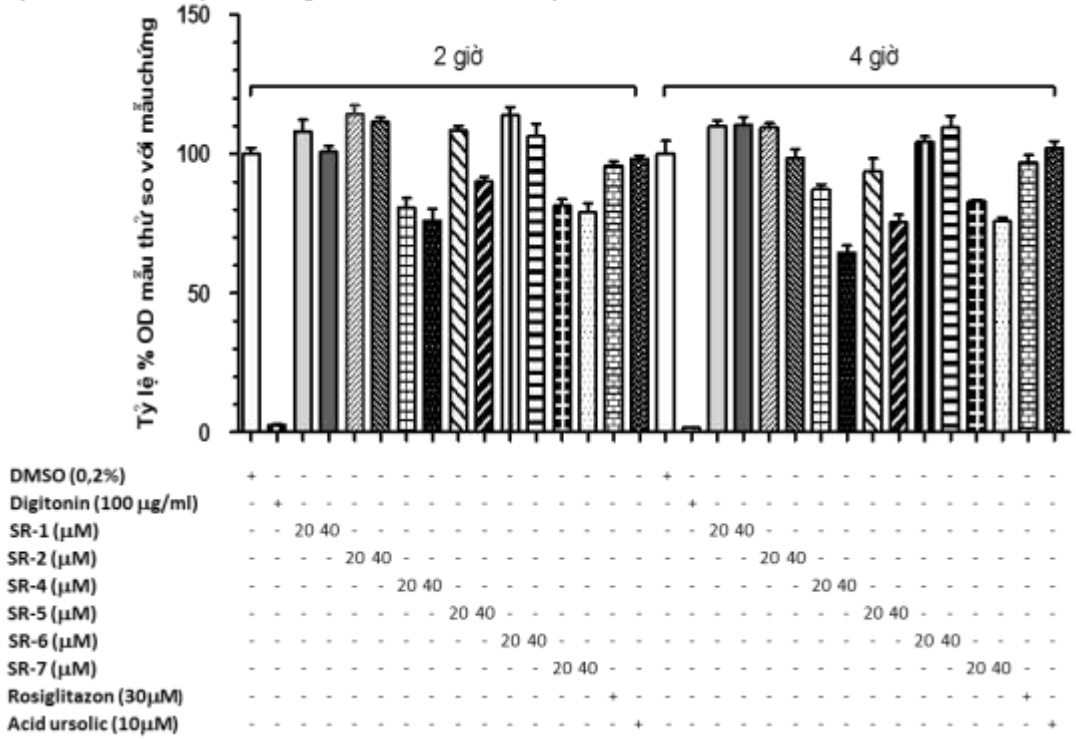
CDMĐLTP với liều 80 mg/kg có tác dụng làm giảm số cơn quặn đau của chuột nhắt trắng so với lô chứng trong khoảng thời gian từ phút thứ 10 đến 15 ($p<0,05$), 15 đến 20 ($p<0,05$) và 20 đến 25 ($p<0,01$). Indomethacin liều 10 mg/kg thể hiện tác dụng giảm đau tốt, có tác dụng làm giảm số cơn quặn đau của chuột so với lô chứng trong khoảng thời gian từ phút thứ 10 đến 15 ($p<0,05$), 15 đến 20 ($p<0,05$), 20 đến 25 ($p<0,01$) và 25 đến 30 ($p<0,01$).

3.3.6. Tác dụng làm tăng cường hấp thu glucose của các oleanan

triterpenoid phân lập được từ CDMĐLTP

3.3.6.1. Tác dụng độc tế bào của các oleanan triterpenoid

Tác dụng độc tế bào sợi cơ chuột C2C12 đối của 6 oleanan triterpenoid phân lập được từ CDMĐLTP được xác định bằng cách dùng MTT để định lượng tế bào sống. Kết quả thể hiện Bảng 3 (Phụ lục 20) và Hình 3.35.



Giá trị M ± SE; n=3 (3 thí nghiệm, mỗi thí nghiệm làm 3 lần)

Hình 3.35. Tác dụng độc tế bào của các oleanan triterpenoid

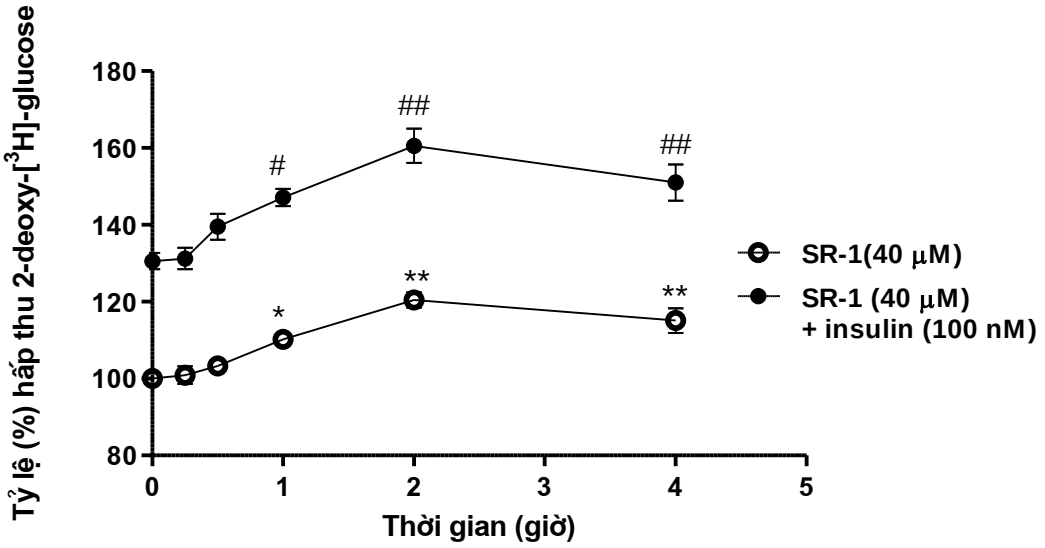
Kết quả ở Hình 3.35 cho thấy rằng, các hợp chất **SR-1, SR-2, SR-6** ở các nồng độ 20, 40 µM không gây độc tế bào sợi cơ chuột C2C12 khi được ủ trong thời gian 2 và 4 giờ, thể hiện OD không giảm khi so sánh với mẫu chứng là DMSO 0,2%. Các hợp chất **SR-4, SR-5, SR-7** gây độc tế bào ở cả 2 nồng độ 20 và 40 µM. Rosiglitazon ở nồng độ 30 µM và acid ursolic ở nồng độ 10 µM cũng không thể hiện độc tế bào sợi cơ chuột C2C12. Digitonin là chất độc tế bào mạnh ở nồng độ 100 µg/ml được sử dụng là chất đối chứng dương.

Các hợp chất **SR-1, SR-2, SR-6** không độc tế bào sợi cơ chuột C2C12 được lựa chọn cho nghiên cứu tăng cường hấp thu glucose.

3.3.6.2. Tác dụng làm tăng cường hấp thu glucose của các oleanan triterpenoid

a) Khảo sát hiệu quả làm tăng cường hấp thu glucose của hợp chất SR-1 theo thời gian

Để đánh giá hiệu quả làm tăng cường hấp thu glucose của các oleanan triterpenoid phân lập được từ CDMĐLTP, hợp chất **SR-1** (40 μM) và hỗn hợp **SR-1** (40 μM) + insulin (100 nM) được sử dụng để đánh giá trên tế bào sợi cơ chuột C2C12 tại các thời điểm 0, 0,25, 0,5, 1,0, 2,0, 4,0 giờ. Kết quả thể hiện ở Bảng 4 (Phụ lục 20) và Hình 3.36.



Giá trị M ± SE; n= 3 (3 thí nghiệm, mỗi thí nghiệm làm 3 lần)

**, p<0,05; **, p<0,01 khi so sánh tại thời điểm bắt đầu không ủ với insulin*

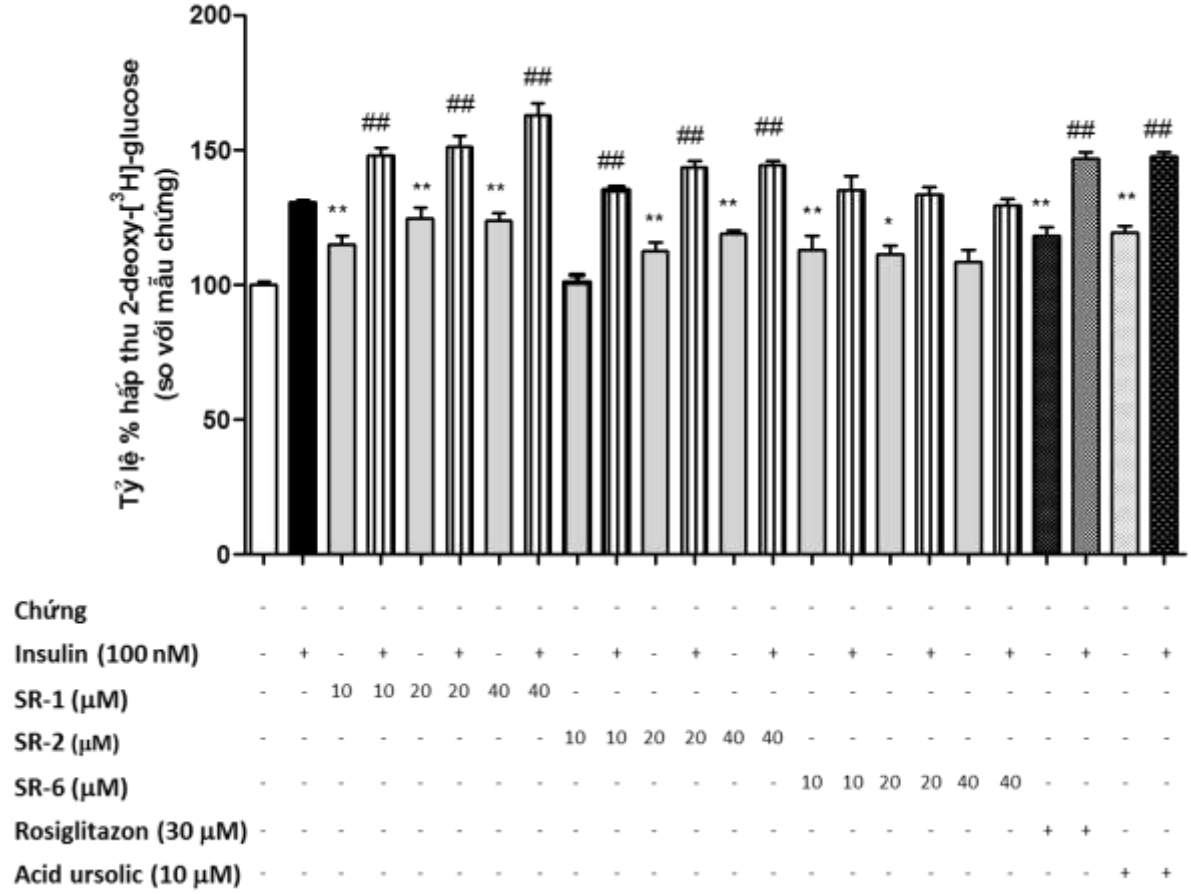
#, p<0,05; ##, p<0,01 khi sánh tại thời điểm bắt đầu ủ với insulin

Hình 3.36. Tác dụng tăng (%) hấp thu glucose vào tế bào sợi cơ chuột C2C12 của hợp chất SR-1 và SR-1 + insulin theo thời gian

Từ kết quả nghiên cứu cho thấy, hợp chất **SR-1** (40 μM) có tác dụng làm tăng hấp thu glucose vào trong tế bào sợi cơ chuột C2C12 khi ủ cùng hoặc không cùng với insulin (100 nM) từ thời điểm 15 phút, đạt tối đa ở 2 giờ và sau đó giảm dần. Dựa vào kết quả thực nghiệm trên, thời điểm 2 giờ được chọn để đánh giá hấp thu glucose vào tế bào đối với các hợp chất khác.

b) Kết quả làm tăng cường hấp thu glucose của các oleanan triterpenoid

Kết quả hấp thu glucose vào tế bào sợi cơ chuột C2C12 của các hợp chất nghiên cứu, đối chứng tại thời điểm 2 giờ được thể hiện ở Bảng 5 (Phụ lục 20) và Hình 3.37.



Giá trị M ± SE; n=3 (3 thí nghiệm, mỗi thí nghiệm làm 3 lần);, p<0,05; **, p<0,01 khi so sánh với chứng; #, p<0,05; ##, p<0,01 khi so sánh với insulin.*

Hình 3.37. Tác dụng làm tăng (%) hấp thu glucose vào tế bào sợi cơ chuột C2C12 của các hợp chất ở thời điểm 2 giờ sau khi ủ với chất

Kết quả nghiên cứu cho thấy khi ủ các hợp chất **SR-1**, **SR-2** với tế bào làm tăng hấp thu glucose vào tế bào chuột C2C12 phụ thuộc vào nồng độ. Hợp chất **SR-1** ở các nồng độ 10, 20, 40 µM làm tăng hấp thu glucose vào tế bào có ý nghĩa thống kê so với chứng (không thử chất) lần lượt là 114,90 ± 3,41% (p<0,01), 124,50 ± 4,22% (p<0,01), 123,90 ± 2,83% (p<0,01) và khi kết hợp với insulin cũng tăng ý nghĩa thống kê so với insulin lần lượt là 148,20 ± 2,46% (p<0,01), 151,10 ± 4,09% (p<0,01), 162,8 ± 4,48% (p<0,01). Hợp chất **SR-2** ở

các nồng độ 20, 40 μM làm tăng hấp thu glucose vào tế bào có ý nghĩa thống kê so với chứng lần lượt là 112,6 ± 3,13 ($p<0,01$), 119,10 ± 1,28% ($p<0,01$) và khi kết hợp với insulin cũng tăng ý nghĩa thống kê so với insulin lần lượt là 143,50 ± 2,43% ($p<0,01$), 144,60 ± 1,61% ($p<0,01$).

Ủ hợp chất **SR-6** với tế bào ở các nồng độ 10, 20 μM làm tăng hấp thu glucose vào tế bào có ý nghĩa thống kê so với chứng lần lượt là 113,1 ± 4,95% ($p<0,01$), 111,30 ± 3,41% ($p<0,05$). Ở nồng độ 40 μM, hợp chất **SR-6** không làm tăng hấp thu glucose vào tế bào so với chứng. Khi ủ hợp chất **SR-6** với tế bào cùng với insulin không làm tăng hấp thu glucose vào tế bào có ý nghĩa thống kê so với insulin ở cả 3 nồng độ nghiên cứu.

Khi ủ mỗi chất đối chứng dương rosiglitazon (30 μM) và acid ursolic (10 μM) với tế bào đều làm tăng hấp thu glucose vào tế bào có ý nghĩa thống kê so với chứng. Khi ủ mỗi hợp chất này với tế bào cùng với insulin cũng làm tăng hấp thu glucose vào tế bào so với chỉ ủ insulin với tế bào.

CHƯƠNG 4. BÀN LUẬN

4.1. VỀ THỰC VẬT HỌC

Chi *Astilbe* là một chi nhỏ thuộc họ Thường Sơn (Saxifragaceae), có khoảng 18 - 24 loài [129],[143]. Ở Bắc Mỹ có loài đặc hữu là *A. biternata* và loài đã tuyệt chủng *A. crenatilobata* (Britt.) Small, còn hầu hết các loài thuộc chi *Astilbe* được phân bố chủ yếu ở châu Á: Nhật Bản, Triều Tiên, Trung Quốc, Đài Loan, Nga, Việt Nam, Lào, Indonesia, Myanmar, Thái Lan, Nepal, Ấn Độ, Pakistan [89],[121],[129],[143].

Về phân loại thực vật, các taxon thuộc chi *Astilbe* có nhiều đặc điểm hình thái giống nhau, nên gây ra khó khăn để phân biệt các loài và các biến thể loài. Đến nay chưa có một khóa phân loại hoàn chỉnh nào để phân loại đến loài. Tuy nhiên, theo phương pháp so sánh hình thái truyền thống thì một số đặc điểm về hình dạng lá chét, hình thái của lông và đặc điểm cấu tạo hoa - là những dẫn liệu điển hình, được lựa chọn để xây dựng khóa phân loại (kiểu lưỡng phân) chi *Astilbe*. Hiện đã có một số khóa phân loại chi này như: đối với các loài ở Hàn Quốc là khóa của Chung Y.H. và cs. [35]; ở Trung Quốc là khóa của Pan J.T. và Ohba H. [89],[129]; khóa Hatch L.C. [121] là khóa các loài được trồng trọt với mục đích thương mại. Trong các khóa phân loại trên, đáng lưu ý có khóa phân loại các loài thuộc chi *Astilbe* ở Trung Quốc, của Pan J.T. và Ohba H. Mặc dù khóa này chỉ dẫn đến 7 loài (3 loài đặc hữu) và 3 thứ (var.), song lại phù hợp khi sử dụng để phân loại - xác định tên khoa học của cây Lạc tân phụ ở nước ta.

Cây Lạc tân phụ có tên khoa học là *Astilbe rivularis* Buch.-Ham. ex D. Don, còn có đồng danh: *Spiraea barbata* Wall. ex Cambess. [47] nhưng hầu như không được sử dụng. Theo phân loại thực vật của Takhtajan A. [119], chi *Spiraea* thuộc họ Hoa hồng (Rosaceae), do đó tên *Spiraea barbata* được đặt chưa chính xác. Ở Việt Nam, chỉ có một loài duy nhất thuộc chi *Astilbe* là *Astilbe rivularis* Buch.-Ham. ex D. Don phân bố trong khu vực hẹp ở một số

tỉnh Tây Bắc [1],[9],[18]. Loài thực vật này mới được biết tới vào năm 1999, trong bộ *Cây cỏ Việt Nam*, tập I của Phạm Hoàng Hộ [9]. Chi *Astilbe* trong tài liệu này, Tác giả chỉ đề cập một loài là Lạc tân phụ (*Astilbe rivularis* Buch.-Ham. ex D. Don). Kèm theo bản mô tả ngắn gọn, còn có hình vẽ sơ lược để minh họa. Tuy nhiên, sự mô tả có một số đặc điểm hình thái khác với nghiên cứu của chúng tôi: cánh hoa màu vàng, nhị 5 hoặc 10, thực tế hoa không cánh, nhị 5 (thỉnh thoảng 4). Trong bộ *Danh lục các loài thực vật Việt Nam*, tập II, 2005, các tác giả cũng đề cập tới loài này [1]. Về phân bố, cả 2 tài liệu trên đều ghi cây mọc tự nhiên ở vùng núi cao (1.500 m) ở Sa Pa, Lào Cai. Còn về công dụng làm thuốc, loài cây này mới được ghi nhận trong *Từ điển cây thuốc Việt Nam*, tập I, năm 2012 của Võ Văn Chi, 2012 [5]. Trong cuốn sách này cây Lạc tân phụ cũng được mô tả ngắn gọn, trong đó có đặc điểm hình thái cũng khác với mô tả của chúng tôi như: lá đài màu trắng vàng, nhị 8 - 10.

Như vậy có thể nói, loài cây này chưa được đề cập nhiều ở nước ta, thậm chí còn chưa có tên gọi theo tiếng Việt Nam. Tên *"Lạc tân phụ"* là theo cách gọi tên của người Trung Quốc.

Để xác định tên khoa học của các mẫu Lạc tân phụ đã thu thập, ở xã Bản Khoang, huyện Sa Pa, tỉnh Lào Cai, chúng tôi dựa vào các khóa phân loại chi *Astilbe* của Pan J.T., 1995 [89]; Pan J.T và Ohba H., 2001 [129] (Trung Quốc) và của Trader W.B., 2006 (Mỹ) [121]. Theo đó, các đặc điểm nổi bật để dẫn đến loài *A. rivuralis* là lá kép chụm ba, 2 - 3 lần lông chim lẻ; đài nhẵn (không có lông mặt ngoài) và không có cánh hoa. Nghiên cứu trên các mẫu đã thu thập, cho thấy đều có 3 đặc điểm này. Lưu ý thêm rằng, trong chi *Astilbe*, duy nhất chỉ có 1 loài (*Astilbe rivuralis*) là không có cánh hoa (hoặc có nhưng bị tiêu giảm). Điều đó khẳng định, các mẫu thu thập ở xã Bản Khoang, huyện Sa Pa, tỉnh Lào Cai chắc chắn thuộc loài *Astilbe rivularis* Buch.-Ham. ex D. Don.

Ngoài ra, theo khóa phân loại các thứ (var.) của loài *Astilbe rivuralis* chủ yếu dựa vào hình thái của phiến lá chét [89],[129]. Đối chiếu với các mẫu đã thu

thập, cũng cho thấy phiến *lá chét ở gốc* thường có hình bầu dục hay hình trứng rộng và có gốc lá lệch. Còn *phiến lá chét ở đầu lá* thường có hình thoi hay bầu dục-thoi, tương đối cân (gốc lá không lệch). Các đặc điểm này cho phép khẳng định, mẫu Lạc tân phụ thu thập ở xã Bản Khoang, huyện Sa Pa, tỉnh Lào Cai chắc chắn thuộc thứ *Astilbe rivularis* Buch.-Ham. ex D. Don var. *rivuralis* hay nói cách khác taxon này vẫn thuộc loài gốc là *Astilbe rivularis* Buch.-Ham. ex D. Don.

Như ở phần Kết quả nghiên cứu đã đề cập, kết quả xác định trên cũng được các chuyên gia thực vật học ở Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật và Viện Dược liệu giám định.

Sau khi phân tích và đối chiếu với các khóa phân loại và các tài liệu khác có liên quan, chúng tôi khẳng định, các mẫu nghiên cứu đã thu thập, có tên khoa học chính xác là *Astilbe rivularis* Buch.-Ham. ex D. Don, thuộc họ Saxifragaceae. Căn cứ vào nơi thu mẫu cũng cho thấy, cây này mọc tự nhiên ở vùng núi, có độ cao khoảng 1.500 m (xã Bản Khoang). Ngoài ra, chúng tôi còn tìm thấy cây này mọc nhiều ở vùng đèo Ô Quý Hồ (đèo Hoàng Liên) và vùng Sìn Hồ (đều thuộc địa phận tỉnh Lai Châu) với độ cao 1.500 m hoặc hơn.

Luận án này cũng là công trình đầu tiên mô tả chi tiết đặc điểm cấu tạo giải phẫu của các bộ phận thân (thân khí sinh, thân rễ), rễ, và lá của loài *Astilbe rivularis* Buch.-Ham. ex D. Don có ở Việt Nam. Cùng với các đặc điểm hình thái của cây, lá, cụm hoa, hoa, quả, hạt, các đặc điểm giải phẫu cũng là những dẫn liệu quan trọng giúp cho việc nghiên cứu, kiểm nghiệm, xác định "*tính đúng*" của dược liệu Lạc tân phụ khi cần thiết.

Những kết quả nghiên cứu trong công trình này đóng góp cơ sở khoa học để sửa đổi, bổ sung kết quả mô tả về hoa của loài *A. rivularis* mọc ở Việt Nam đối với một số tài liệu chuyên khảo về thực vật còn mô tả chưa phù hợp cho những lần tái bản sau hoặc xuất bản mới, đồng thời góp phần vào nhận biết dược liệu Lạc tân phụ.

4.2. VỀ HÓA HỌC

Theo kinh nghiệm dân gian, bộ phận dùng chủ yếu làm thuốc của Lạc tân phụ là thân rễ, rễ, đôi khi lá và toàn cây cũng được sử dụng. Vì vậy, cây Lạc tân phụ được nghiên cứu về hóa học (xác định nhóm chất, phân lập và xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất) của phần trên mặt đất và dưới mặt đất nhằm góp phần chứng minh công dụng chữa bệnh của Lạc tân phụ và hy vọng có thể tìm ra tác dụng mới của các chất phân lập được.

Từ kết quả định tính các nhóm chất trong Lạc tân phụ nhận thấy không có sự khác biệt về thành phần hóa học của phần trên và dưới mặt đất. Tổng quan tài liệu thấy rằng chi *Astilbe* có thành phần hóa học chủ yếu là phytosterol, triterpenoid, flavonoid. Bên cạnh đó các loài trong một chi có mối liên hệ về thành phần hóa học (thường có các chất, nhóm chất tương tự nhau). Do vậy thấy rằng thành phần hóa học của Lạc tân phụ tương đồng với thành phần hóa học với các loài khác thuộc chi *Astilbe*. Đây cũng là một cơ sở khoa học để có định hướng phân lập, nhận dạng cấu trúc và nghiên cứu tác dụng dược lý từ Lạc tân phụ.

Nghiên cứu về thành phần hóa học cây Lạc tân phụ đã phân lập và xác định cấu trúc hóa học được 10 hợp chất từ phần trên mặt đất, 10 hợp chất từ phần dưới mặt đất. Kết quả được tổng hợp ở Bảng 4.1.

Bảng 4.1. Các hợp chất phân lập được từ cây Lạc tân phụ

Số TT	Hợp chất	Danh pháp	Bộ phận	Ghi chú
1	**SL-1**	Acid 3β-acetoxyolean-12-en-27-oic	Trên mặt đất	Có trong loài *A. chinensis* [114]
2	**SL-2**	β-Sitosterol		Có trong loài *A. chinensis, A. myriantha* [113-114],[141]
3	**SL-3**	β-Sitosterol-3-*O*-β-D-glucopyranosid (daucosterol)		Có trong loài *A. chinensis* [113-114]
4	**SL-4**	Aquilegiolid		Lần đầu tiên phân lập được từ chi *Astilbe*

5	**SL-5 [SR-8]**	Quercetin	Trên và dưới mặt đất	Có trong các loài *A. chinensis; A. thunbergii; A. longicarpa* [66],[118]
	SL-6	Hyperin	Trên mặt đất	Lần đầu tiên phân lập từ loài *A. rivularis*
6	**SL-7**	Isoquercitrin		
7	**SL-8**	Engeletin		Lần đầu tiên phân lập được từ chi *Astilbe*
8	**SL-9 [SR-9]**	Quercitrin	Trên và dưới mặt đất	Lần đầu tiên phân lập từ loài *A. rivularis*
9	**SL-10 [SR-10]**	Bergenin		Có trong các loài *A. chinensis; A. thunbergii; A. divaricata, A. myriantha; A. longicarpa; A. macroflora* [55],[58],[66], [138],[141]
10	**SR-1**	Acid 6β-hydroxy-3-oxoolean-12-en-27-oic	Dưới mặt đất	Lần đầu tiên phân lập được từ chi *Astilbe*
11	**SR-2**	Acid 3β-*trans-p*-coumaroyloxy-olean-12-en-27-oic		Hợp chất mới (lần đầu tiên được biết đến)
12	**SR-3**	3β,6α-dihydroxylup-20(29)-en		Lần đầu tiên phân lập được từ chi *Astilbe*
13	**SR-4**	Acid 3β-hydroxyolean-12-en-27-oic		Có trong các loài *A. chinensis; A. thunbergii* var. *congests, A. myriantha; A. koreana* [83],[111],[114],[118]
14	**SR-5**	Acid 3β,6β,7α-trihydroxyolean-12-en-27-oic		Có trong loài *A. chinensis* [48]. Lần đầu tiên phân lập từ *A. rivularis*
15	**SR-6**	Acid 3β,6β-dihydroxyolean-12-en-27-oic (acid astilbic)		Có trong các loài *A. chinensis; A. thunbergii, A. myriantha; A. koreana* [83],[111], [114],[118]
16	**SR-7**	Acid 3β,24-dihydroxyolean-12-en-27-oic		Có trong loài *A. chinensis* [27]. Lần đầu tiên phân lập từ *A. rivularis*

Trong số các hợp chất phân lập được, có 5 flavonoid, 8 triterpenoid (7

oleanan và 1 lupan triterpenoid), 2 phytosterol, 1 butenolid và bergenin.

- **Quercetin (SL-5/SR-8):** là một aglycon flavonoid thường có mặt trong thực vật. Quercetin đã được phân lập từ các loài *A. chinensis, A. thunbergii, A. longicarpa* [66],[118] và có nhiều tác dụng sinh học hữu ích như: chống oxy hóa, chống viêm [54], kháng khuẩn [109], kháng virus, bảo vệ gan [61], ức chế tính thấm mao mạch, giảm kết tụ tiểu cầu do đó được sử dụng làm thuốc điều trị bệnh dễ vỡ mao mạch và xơ vữa tĩnh mạch [98], ức chế phát triển một số dòng tế bào ung thư trên *in vitro* [61], chống vết loét dạ dày [98].

- **Hyperin (SL-6), isoquercitrin (SL-7) và quercitrin (SL-8/SR-9):** là 3-*O*-monoglycosid của quercetin với lần lượt các đường *β*-D-galactopyranose, *β*-D-glucopyranose và *α*-L-rhamnopyranose, trong đó **SL-6** và **SL-7** là hai đồng phân của nhau (đường *β*-D-galactopyranose là đồng phân của đường *β*-D-glucopyranose). Cả 3 flavonoid này được tìm thấy ở nhiều loài thực vật và có mặt trong một số loài của chi *Astilbe* [26], nhưng đây là lần đầu tiên phân lập được từ cây Lạc tân phụ.

- **Engeletin (SL-7):** là 3*β*-*O*-monoglycosid của (2*R*,3*R*)-dihydrokaempferol với đường *α*-L-rhamnopyranose, đã được phân lập từ một số loài thực vật: lá loài *Fissistigma rufinerve* (Annonaceae) [11], vỏ thân loài *Flindersia australis* (Rutaceae) [102], lá loài *Engelhardia roxburghiana* (Juglandaceae) [50], vỏ thân loài *Artocarpus scortechinii* (Moraceae) [23],...Các công trình nghiên cứu về dược lý cho thấy, hợp chất **SL-7** có tác dụng chống viêm có ý nghĩa, tiềm năng sử dụng làm thuốc chống viêm [50], diệt ký sinh trùng sốt rét [23]. Đây là lần đầu tiên hợp chất **SL-7** phân lập được từ chi *Astilbe.*

- **Acid 3*β*-hydroxyolean-12-en-27-oic (SR-4):** có cấu trúc tương tự như acid oleanolic (một oleanan triterpenoid phân bố rộng rãi trong giới thực vật), chỉ có một vị trí khác nhau là nhóm carboxylic ở C-27 thay vì ở C-28 của acid

oleanolic. Hợp chất này được Izawa K. và cs. phân lập lần đầu tiên từ rễ, thân rễ các loài thuộc họ Saxifragaceae: *Peltoboykinia watanabei, Peltoboykinia tellimoides, Boykinia lycoctonifolia* [52]. Hợp chất **SR-4** và đồng phân của nó là acid 3α-hydroxyolean-12-en-27-oic được Han J.T. phân lập từ toàn cây loài *Aceriphyllum rossi* [45]. Hợp chất **SR-4** cũng được báo cáo có mặt trong các chi khác thuộc họ Saxifragaceae như: toàn cây loài *Chrysosplenium carnosum* [69], thân rễ các loài *A. chinensis* [114] *và A. koreana* [83], rễ và thân rễ loài *A. myriantha* [111],[141].

Hợp chất **SR-4** có tác dụng độc mạnh với các dòng tế bào ung thư người *in vitro* (HO-8910, HL-60, COLO-205) [115]; gây cảm ứng, thúc đẩy sự chết tế bào HO-8910, COLO-205, HeLa theo chương trình [116],[123], ức chế PTP 1B với IC_{50} = 5,2 ± 0,5 μM [83], tác dụng rất yếu với các chủng vi khuẩn *Staphylococcus aureus,* chủng kháng methicilin và quinolon với MIC = 128 μg/ml [136]. Năm 2002, Han J.T. và cs. [45] phân lập được 5 oleanan triterpenoid từ loài *Aceriphyllum rossii* và nghiên cứu tác dụng ức chế enzym ACAT. Kết quả, hợp chất **SR-4** ức chế đáng kể ACAT với hiệu quả ức chế là 89,3 ± 2,9% ở nồng độ 100 μg/ml và chỉ ra rằng các oleanan triterpenoid có nhóm hydroxy ở vị trí C-3 và nhóm carboxylic ở vị trí C-27 cần thiết cho tác dụng này.

- **Acid 3β-acetoxyolean-12-en-27-oic (SL-1)**: là ester của acid acetic với acid 3β-hydroxyolean-12-en-27-oic (**SR-4**). Hợp chất này được phân lập vào năm 1992 từ hạt *Vitex negundo* (Verbenaceae) [32]; hoa của loài *Calendula officinalis (*Asteraceae) [84]. Hợp chất **SL-1** và đồng phân của nó là acid 3α-acetoxyolean-12-en-27-oic cũng được báo cáo có mặt trong loài *A. chinensis* [27],[114]. Hợp chất **SL-1** có tác dụng độc mạnh với các dòng tế bào ung thư người *in vitro* (HO-8910, HeLa, HL-60) [115], ức chế PTP 1B với IC_{50} = 8,5 ± 0,7 μM [83].

- **Acid 6β-hydroxy-3-oxoolean-12-en-27-oic (SR-1):** Lu M. và cs. phân lập lần đầu tiên trong tự nhiên vào năm 2013 từ toàn cây *Chrysosplenium carnosum* (Saxifragaceae) [69]. Hợp chất này có tác dụng ức chế *in vitro* mạnh sự phát triển của các dòng tế bào ung thư B16F10 (ung thư hắc tố chuột) và SP2/0 (u tủy chuột) với IC_{50} lần lượt là 15,9, 17,0 μM; ức chế nhẹ HepG2 với IC_{50} = 47,3 μM [69]. Đây là lần đầu tiên hợp chất **SR-1** phân lập được từ chi *Astilbe.*

- **Acid 3β-*trans-p*-coumaroyloxy-olean-12-en-27-oic (SR-2):** là ester của acid *trans-p*-coumaric và acid 3β-hydroxyolean-12-en-27-oic **(SR-4)**. Mặc dù **SR-4** đã được tìm thấy trong một số loài thuộc chi *Astilbe*, nhưng **SR-2** phân lập được từ cây Lạc tân phụ là hợp chất mới, được tìm thấy lần đầu từ tự nhiên.

- **3β,6α-dihydroxylup-20(29)-en (SR-3):** là một triterpenoid có khung lupan, lần đầu tiên vào năm 2000 được Mustafa G và cs. [79] phân lập trong tự nhiên từ loài *Periploca aphylla* (Asclepiadaceae). Hợp chất này cũng có mặt trong vỏ thân của loài *Drypetes tessmanniana* (Euphorbiaceae) [39]. Hợp chất **SR-3** có tác dụng ức chế mạnh enzym α-glucosidase với IC_{50} = 42,5 μM và ức chế nhẹ vi khuẩn Gram (+) *Staphylloccocus pyogens* [79]. Tuy nhiên, đây là lần đầu tiên hợp chất **SR-3** được phân lập từ chi *Astilbe.*

- **Acid 3β,6β,7α-trihydroxyolean-12-en-27-oic (SR-5)**: là dẫn chất của hợp chất **SR-4**, cấu trúc có thêm 2 nhóm hydroxy ở vị trí 6β và 7α. Năm 2009 lần đầu tiên được Hu J.Y. và cs. phân lập được ở tự nhiên từ thân rễ loài *A. chinensis* [49]. Hợp chất này có tác dụng độc với các dòng tế bào SK-N-SH và HL-60 [49]. Đây là lần đầu tiên phân lập được hợp chất **SR-5** từ loài *A. rivularis.*

- **Acid 3β,6β-dihydroxyolean-12-en-27-oic (acid astilbic, SR-6):** hợp chất này được phân lập lần đầu tiên vào năm 1972 từ thân rễ loài *A. thunbergii* var. *congests* [118], sau đó là từ thân rễ và rễ của các loài khác thuộc chi *Astilbe*,

gồm *A. chinensis* [114],[131]; *A. koreana* [82] và *A. myriantha* [111],[141],... Cũng như một số oleanan triterpenoid có nhóm carboxylic ở vị trí C-27 phân lập từ chi *Astilbe,* hợp chất **SR-6** có tác dụng độc mạnh với các dòng tế bào ung thư người *in vitro* (HO-8910, Hela, HL-60) [115], ức chế sự tăng sinh và gây cảm ứng, thúc đẩy sự chết tế bào COLO-205 theo chương trình [137], ức chế PTP 1B với IC_{50}= 1,8 ± 1,1 μM [82]. Hợp chất **SR-6** có tác dụng với quá mẫn và viêm qua đường hô hấp trên mô hình hen dị ứng của chuột [133]. Ngoài ra, theo nghiên cứu của Moon T.C và cs. [78] hợp chất này tác dụng chống viêm, giảm đau và từ đó đề xuất hợp chất **SR-6** có thể được sử dụng làm chất chống viêm, giảm đau.

- **Acid 3*β*,24-dihydroxyolean-12-en-27-oic (SR-7):** năm 2009, Cai X.F. và cs. lần đầu tiên phân lập được trong tự nhiên từ thân rễ loài *A. chinensis* [27]. Hợp chất này có một đồng phân là acid 3*α*,24-dihydroxyolean-12-en-27-oic - hợp chất mới, phân lập được từ thân rễ loài *A. koreana* [83]. Đây là lần đầu tiên hợp chất **SR-7** được phân lập từ loài *A. rivularis.*

- **Bergenin (SL-10/SR-10):** berrgenin phân lập được từ nhiều loài thuộc chi *Astilbe* khác, gồm: *A. thunbergii, A chinensis, A. myriantha, A. divaricata, A. macroflora, A. longicarpa,...* [55],[58],[66],[138],[141]. Như vậy, có thể khẳng định bergenin là thành phần hóa học đáng chú ý của chi *Astilbe*. Các công trình nghiên cứu về dược lý thấy rằng bergenin có các tác dụng: làm nhanh lành vết bỏng trên chuột (ED_{50} = 190 μg/vết thương chuột) [58]; chống khối loét [99]; bảo vệ gan [67],[99]; chống virus viêm gan C và HIV [99]; chống loạn nhịp [99]; chống oxy hóa [86],[91]; ức chế enzym PTP 1B *in vitro* với hoạt tính trung bình (IC_{50} = 157 μM), chống tiểu đường type 2 [60],[99]; chống viêm khớp [91]; diệt động vật nguyên sinh *Trypanosoma brucei (*IC_{50} = 1 μM) [99]; kháng nấm (*Trichophyton mentagrophytes:* MIC=250 μg/ml; *Epidermophyton floccosum:* MIC = 500 μg/ml; *Trichophyton rubrum:* MIC = 500 μg/ml;

Aspergillus niger: MIC = 500 μg/ml; *Botrytis cinerea:* MIC = 250 μg/ml [95].

- **Aquilegiolid (SL-4):** còn có danh pháp là 6*β*-hydroxy-2(6,7-dihydro-7a*β*H)-benzofuranon, đã phân lập được trong tự nhiên từ rễ loài *Aquilegia atrata* var. *atroviolacea* (Ranunculaceae) cùng đồng phân của nó - menisdaurilid. Hai hợp chất này là các butenolid không điển hình của họ Ranunculaceae [44]. Hợp chất **SL-4** có mặt trong nhiều loài, họ khác nhau: vỏ rễ loài *Ouratea reticulata* (Orchnaceae) [74], thân rễ loài *Sinomenium acutum* (Menispermaceae) [88], lá loài *Phyllanthus anisolobus* (Euphorbiaceae) [24]. Tuy vậy, đây là lần đầu tiên hợp chất này được phân lập từ một loài thuộc chi *Astilbe*.

Kết quả nghiên cứu về hóa học cho đóng góp mới của công trình này là việc phân lập và xác định được cấu trúc một hợp chất mới là acid 3*β-trans-p*-coumaroyloxy-olean-12-en-27-oic **(SR-2)**; 9 hợp chất lần đầu tiên phân lập được từ cây Lạc tân phụ gồm aquilegiolid **(SL-4)**, hyperin **(SL-6)**, isoquercitrin **(SL-7)**, engeletin **(SL-8)**, quercitrin **(SL-9/SR-9)**, acid 6*β*-hydroxy-3-oxoolean-12-en-27-oic **(SR-1)**, 3*β,6α*-dihydroxylup-20(29)-en **(SR-3)**, acid 3*β,*6*β,*7*α*-trihydroxyolean-12-en-27-oic **(SR-5)**, acid 3*β,*24-dihydroxyolean-12-en-27-oic **(SR-7)**, trong số đó có 4 hợp chất: **SL-4**, **SL-8**, **SR-1**, **SR-3** lần đầu tiên phân lập được từ chi *Astilbe*.

Kết quả nghiên cứu về hóa học chứng minh các thành phần hóa học chính trong Lạc tân phụ là oleanan triterpenoid có nhóm carboxylic ở vị trí C-27, bergenin và các flavonoid. Tổng quan tài liệu cho thấy, triterpenoid có trong các loài thuộc chi *Astilbe* hầu hết là khung oleanan và ursan và có đặc trưng quan trọng là nhóm carboxylic (COOH) ở vị trí C-27. Một số tác giả nước ngoài công bố thành phần hóa học của cây Lạc tân phụ chứa 3 olenanan triterpenoid như chúng tôi đã phân lập được, gồm **SL-1, SR-4, SR-6** [43]. Đây là một bằng chứng khoa học quan trọng góp phần khẳng định kết quả nghiên cứu về thực vật học và việc xác định tên khoa học là *A. rivularis* cho mẫu nghiên cứu Lạc tân

phụ thu hái tại Sa Pa. Tuy vậy, công trình này chưa phân lập được ursan triterpenoid có nhóm carboxylic ở vị trí C-27 có trong một số loài thuộc chi *Astilbe.*

Trong số 4 flavonoid phân lập được, engeletin là một flavonoid có aglycon là dihydrokaempferol lần đầu tiên phân lập được từ chi *Astilbe*. Hyperin, isoquercitrin, quercitrin là 3-*O*-monoglycosid của quercetin lần đầu tiên được phân lập được từ loài *A. rivularis.* Các nghiên cứu về thành phần flavonoid từ một số loài thuộc chi *Astilbe* chỉ ra rằng đa số chúng có cấu trúc là 3-*O*-mono-, 3-*O*-di-, 3-*O*-triglycosid, còn phần aglycon là flavonol: quercetin, kaempferol, myricetin hoặc 3-*O*-monoglycosid của dihydroquercetin [26],[58],[66],[131]; riêng loài *A.* ×*arendsii* có chứa các dihydrochalcon glycosid [26]. Như vậy, có thể kết luận flavonoid và flavonoid glycosid là thành phần chính của chi *Astilbe* nói chung.

4.3. VỀ TÁC DỤNG SINH HỌC

Theo kinh nghiệm dân gian của các nước châu Á và một số dân tộc miền núi phía Bắc của nước ta, bộ phận dùng chính của Lạc tân phụ là rễ và thân rễ, được sử dụng để chữa trị chứng ngã sưng đau, phong thấp nhức mỏi,…Đến nay, các nghiên cứu tác dụng dược lý về loài này trên thế giới còn chưa được quan tâm nhiều và chưa có công trình nào nghiên cứu về Lạc tân phụ thu hái tại Việt Nam. Vì vậy, để làm sáng tỏ công dụng dược liệu này trong dân gian, luận án tập chung nghiên cứu độc tính cấp, tác dụng chống oxy hóa, hoạt tính ức chế hoạt động XO, tác dụng chống viêm, giảm đau của của CDMĐLTP. Ngoài ra, thử mới tác dụng làm tăng cường hấp thu glucose vào tế bào của các hợp chất triterpenoid phân lập từ CDMĐLTP.

4.3.1. Về độc tính cấp

Khi cho chuột nhắt uống CDMĐLTP với liều tăng dần đến liều 24 g cao/kg chuột (tương đương 573 g dược liệu/kg chuột), là liều cao nhất có thể cho chuột uống được. Theo dõi chuột ở các lô thí nghiệm nhận thấy tất cả các

chuột đều không có biểu hiện bất thường. Vì không có chuột chết ở lô thử nghiệm nên chưa xác định LD_{50} của CDMĐLTP. Liều đã thử cao gấp khoảng 300 lần liều cần để có tác dụng dược lý, như vậy theo đường uống CDMĐLTP có phạm vi an toàn rộng và liều sử dụng theo kinh nghiệm dân gian là an toàn.

4.3.2. Về tác dụng chống oxy hóa

Oxy hóa không thể thiếu được với sinh vật ái khí. Oxy vào cơ thể tham gia nhiều quá trình sinh học. Trong quá trình đó oxy tạo ra những tiểu phân trung gian gọi là các gốc tự do [17]. Thuật ngữ ROS (reactive oxygen species, tạm dịch là các dạng oxy phản ứng), gồm các gốc tự do của oxy là superoxyd ($O_2^{\bullet -}$), hydroxyl ($OH^{\bullet}$), peroxyl ($RO_2^{\bullet}$), alkoxyl ($RO^{\bullet}$) và không phải gốc thực sự hoặc là tác nhân oxy hóa và/hoặc dễ dàng chuyển thành các gốc tự do như HOCl, ozon (O_3), peroxynitrit ($ONOO^-$), oxy đơn bội ($^1O_2$) và hydrogen peroxyd (H_2O_2). Trong tế bào, gốc $O_2^{\bullet -}$ quan trọng nhất vì từ nó nhiều gốc tự do được tạo ra [17],[128]. Trong cơ thể luôn có sự cân bằng nội môi giữa ROS và các chất chống oxy hóa. Vì một lý do nào đó bên ngoài hoặc bên trong cơ thể, làm cho mất cân bằng theo hướng gia tăng ROS, gọi là stress oxy hóa [17]. Stress oxy hóa gây ra rất nhiều bệnh nguy hại cho cơ thể như: hư hại ADN gây ung thư, viêm [128], các bệnh tim mạch, thần kinh, tâm thần, lão hóa, đái tháo đường type II,…[22],[110].

Có thể loại bỏ ROS trong cơ thể bởi các chất chống oxy hóa. Ví dụ như các enzym superoxyd dismutase (SOD), glutathion (GSH), enzym glutathion peroxydase (GSH-Px), catalase, các phân tử nhỏ như ascorbat, tocoferol, các phenolic có nguồn gốc tự nhiên,…[128]. Để đánh giá tác dụng chống oxy hóa của mẫu nghiên cứu, có nhiều phương pháp được sử dụng:

- Các phương pháp nghiên cứu *in vitro*: khả năng dọn gốc tự do DPPH, $O_2^{\bullet -}$, H_2O_2, $OH^{\bullet}$, phương pháp xanthin oxidase, khả năng tạo chelat với kim loại, khả năng hấp thụ gốc tự do oxy, phương pháp phosphomolypden, phương pháp

sắt thiocyanat, phương pháp thiobarbituric, khả năng chống oxy hóa do khử sắt, khả năng chống oxy hóa tương đương với Trolox,…[17],[21].

Đánh giá tác dụng chống oxy hóa *in vitro* của mẫu nghiên cứu thường kết hợp một số phương pháp. Trong đó phương pháp đánh giá khả năng dọn gốc tự do DPPH được sử dụng nhiều nhất vì nhanh, đơn giản, rẻ tiền [21].

- Các phương pháp nghiên cứu *in vivo*: cho động vật dùng mẫu nghiên cứu, sau một thời gian xác định, giết động vật, máu và mô động vật được sử dụng để nghiên cứu. Các phương pháp gồm: khả năng khử sắt của huyết thanh, đánh giá khử glutathion, phương pháp superoxid dismustase, glutathion-S-tranferase, catalase, đánh giá glutathion reductase, đánh giá peroxid hóa lipid, đánh giá lipoprotein tỷ trọng thấp,…Phương pháp đánh giá peroxid hóa lipid được sử dụng nhiều nhất để nghiên cứu tác dụng chống oxy hóa *in vivo* [21].

Để sàng lọc khả năng chống oxy hóa của CDMĐLTP, hai phương pháp nghiên cứu *in vitro* được lựa chọn: khả năng dọn gốc tự do DPPH và dọn gốc tự do $O_2^{\bullet-}$. Kết quả IC_{50} lần lượt là 20,29 μg/ml và 58,8 μg/ml. Quercetin là chất đối chứng dương có khả năng dọn gốc tự do DPPH và $O_2^{\bullet-}$ rất mạnh với IC_{50} lần lượt là 1,77 μg/ml và 3,1 μg/ml. Từ kết quả nghiên cứu sơ bộ thấy rằng CDMĐLTP có khả năng chống oxy hóa *in vitro* khá tốt. Điều này cũng phù hợp với nghiên cứu của Madal P. và cs. khi nghiên cứu khả năng dọn gốc tự do DPPH và $O_2^{\bullet-}$ của cao chiết MeOH từ thân rễ *A. rivularis* ở các phân đoạn rửa giải sắc ký cột khác nhau. Khả năng dọn gốc tự do DPPH của phân đoạn rửa giải diethylether trong EtOAc là 95,23%, khả năng dọn gốc tự do $O_2^{\bullet-}$ của phân đoạn rửa giải aceton trong EtOH là 80,4% ở nồng độ 100 μg/ml [70]. Kết quả thử tác dụng cho thấy tác dụng ức chế enzym XO có giá trị IC_{50} >100 μg/ml, trong khi tác dụng dọn gốc tự do $O_2^{-\bullet}$ là IC_{50} 58,8 μg/ml. Do vậy, CDMĐLTP có tác dụng dọn gốc tự do $O_2^{-\bullet}$ chứ không phải do tác dụng ức chế XO đem lại.

Khả năng dọn gốc tự do DPPH và $O_2^{\bullet-}$ của CDMĐLTP có thể giải thích

bởi sự hiện diện của các hợp chất phenolic có tác dụng dọn các gốc này: flavonoid, bergenin, tanin, arbutin,...[54],[86],[97],[117]. Như vậy, kết quả thử tác dụng dọn gốc tự do phù hợp với kết quả của phần nghiên cứu về thành phần hóa học của cây Lạc tân phụ, đồng thời là cơ sở giải thích tác dụng giảm đau, chống viêm của dược liệu liên quan đến tác dụng chống oxy hóa.

4.3.3. Về hoạt tính ức chế hoạt động XO

XO xúc tác quá trình oxy hóa xanthin và hypoxanthin thành acid uric [107]. Nếu acid uric huyết tăng cao quá mức gây ra bệnh gout, biểu hiện trên lâm sàng bởi những cơn viêm khớp cấp, mạn tính [13]. Các chất ức chế XO, ví dụ như allopurinol, ngăn cản quá trình sinh tổng hợp acid uric, giảm nồng độ acid uric huyết và nước tiểu do đó được sử dụng làm thuốc điều trị bệnh gout [13],[15]. Với hướng nghiên cứu chứng minh tác dụng chống sưng, viêm của dược liệu mà một trong các nguyên nhân có thể là do tăng acid uric huyết, CDMĐLTP được đánh giá khả năng ức chế hoạt tính hoạt động XO.

Nguyên tắc của phương pháp: XO xúc tác cho phản ứng oxy hóa xanthin thành acid uric và $O_2^{\bullet-}$. Acid uric tạo thành được đo OD ở bước sóng 290 nm [87],[107]. Hoạt tính ức chế hoạt động XO của mẫu thử được xác định thông qua giảm OD của acid uric tạo thành. Chất đối chứng dương được sử dụng là quercetin có hoạt tính ức chế hoạt động XO mạnh [37].

Kết quả nghiên cứu thấy rằng, CDMĐLTP có hoạt tính ức chế hoạt động XO phụ thuộc vào liều, có xu hướng giảm dần dần khi nồng độ giảm. Nồng độ cao nhất 100,0 μg/ml hoạt tính ức chế hoạt động XO 47,7 ± 3,3%. Chất đối chứng dương quercetin có hoạt tính ức chế mạnh hoạt động XO 81,6 ± 1,0% ($p<0,01$), 71,5 ± 2,0% ($p<0,01$) lần lượt ở các nồng độ 100,0, 10,0 μg/ml, mạnh hơn có ý nghĩa thống kê so với CDMĐLTP. Sự chênh lệch hoạt tính ức chế hoạt động XO giữa nồng độ 10,0 và 1,0 μg/ml là rất lớn (40,7%) và ở các nồng độ 1,0, 0,5, 0,1 μg/ml, hoạt tính ức chế hoạt động XO của mẫu thử và mẫu

chứng không khác nhau có ý nghĩa thống kê.

Đây là công trình lần đầu tiên nghiên cứu tác dụng này của cây Lạc tân phụ. Ngoài ra việc phân lập được bergenin, flavonoid (quercetin, quercitrin) từ CDMĐLTP, đã được chứng minh có khả năng ức chế hoạt động XO và dọn gốc tự do mạnh [37],[54],[86],[91]. Đây là cơ sở giải thích hoạt tính ức chế hoạt động XO của CDMĐLTP và các tác dụng khác như chống viêm, giảm đau liên quan đến bệnh gout.

4.3.4. Về tác dụng chống viêm

Trong đề tài này đánh giá tác dụng chống viêm trên hai mô hình:

- Tác dụng chống viêm cấp trên mô hình gây phù bàn chân chuột bằng carrageenan:

Carrageenan (carrageenin) là một polygalactosid sulphat, được chiết xuất từ tảo biển, là dị nguyên khi tiêm vào bàn chân phải sau của chuột sẽ gây viêm cấp, bản chất của quá trình này là miễn dịch không đặc hiệu. Các dấu hiệu chính của viêm ngay sau khi tiêm carrageenan là phù, đau, đỏ. Đo thể tích bàn chân chuột để đánh giá mức độ viêm.

Tác dụng chống viêm cấp của CDMĐLTP được đánh giá bởi khả năng ức chế phù bàn bàn chân chuột dùng với các mức liều khác nhau. Thuốc đối chứng dương được sử dụng là indomethacin 10 mg/kg.

Mẫu thử được chế dưới dạng cao khô và được pha trong dung dịch Na CMC 0,5%, cho chuột dùng đường uống với liều tăng dần. Liều sử dụng để thử tác dụng chống viêm cấp trên chuột cống là: 80 mg/kg (1,25 g dược liệu/kg), 160 mg/kg (2,5 g dược liệu/kg), 320 mg/kg (5,0 g dược liệu)/kg. Ngoại suy liều có hiệu quả tương đương giữa người và động vật thí nghiệm để tính liều tương đương giữa người và chuột cống trắng thì liều dùng trên người có khối lượng trung bình 50 kg lần lượt là 10, 20, 30 g dược liệu [6]. Theo kinh nghiệm dân gian các dân tộc vùng cao Lào Cai, Lai Châu sử dụng phần dưới mặt đất của Lạc tân phụ liều thông thường 10 - 20 g dược liệu khô/ngày cho người lớn; các dân

tộc ở Trung Quốc dùng thân rễ khô với liều 9 - 15 g để điều trị sưng đau do bị ngã, phong thấp nhức mỏi [143]. Các dân tộc ở vùng bắc Sikkim (Ấn Độ) dùng hơn 30 g thân rễ/ngày (100 g trong 3 ngày) để điều trị giảm co thắt tử cung [70]. Như vậy, 3 mức liều sử dụng nghiên cứu tác dụng chống viêm cấp của CDMĐLTP phù hợp với liều được sử dụng theo kinh nghiệm dân gian.

Ba mức liều CDMĐLTP được thử nghiệm cho thấy chúng có tác dụng chống viêm cấp tại các thời điểm và mức độ khác nhau. Với mức liều tăng dần nhưng đáp ứng chống viêm cấp không tăng, cụ thể: mức liều 80 mg/kg có tác dụng ức chế phù bàn chân chuột tại các thời điểm 1, 3 và 5 giờ sau khi gây viêm, tỷ lệ ức chế phù bàn chân chuột so với chứng lần lượt là 50,9% ($p<0,01$), 58,2% ($p<0,01$) và 46,1% ($p<0,01$); mức liều 160 mg/kg có tác dụng ức chế phù bàn chân chuột tại các thời điểm 3 và 5 giờ sau khi gây viêm, tỷ lệ ức chế phù bàn chân chuột so với chứng lần lượt là 38,5% ($p<0,05$) và 31,7% ($p<0,01$); mức liều 320 mg/kg có tác dụng ức chế phù bàn chân chuột tại các thời điểm 3 và 5 giờ sau khi gây viêm, tỷ lệ ức chế phù bàn chân chuột so với chứng lần lượt là 35,8% ($p<0,05$) và 30,2% ($p<0,05$). Indomethacin 10 mg/kg thể hiện tác dụng chống viêm tốt, có tác dụng tại tất cả các thời điểm nghiên cứu. Tại thời điểm 1, 3 và 5 giờ sau khi gây viêm, tác dụng chống viêm cấp của CDMĐLTP 80, 160, 320 mg/kg tương đương có ý nghĩa thống kê so với indomethacin 10 mg/kg. Nhưng tại thời điểm 7 giờ, indomethacin 10 mg/kg có tác dụng chống viêm cấp tốt hơn so với CDMĐLTP ở cả 3 mức liều nghiên cứu.

Kết quả nghiên cứu chống viêm cấp của CDMĐLTP cũng phù hợp với nghiên cứu của Madal P. và cs [73] về tác dụng chống viêm cấp của hỗn hợp 4 phân đoạn rửa giải với các dung môi khác nhau của cao chiết MeOH từ thân rễ Lạc tân phụ trên mô hình gây phù bàn chân chuột bằng carrageenan, với liều 200 mg/kg sau 24 giờ tỷ lệ ức chế là 56,2%.

Liều 80 mg/kg là mức liều thể hiện tác dụng chống viêm tốt ở 3 thời điểm nghiên cứu. Khi tăng liều lên 160, 320 mg/kg, khả năng ức chế phù bàn chân

chuột không tăng, do đó mức liều 80 mg/kg được lựa chọn để áp dụng cho các nghiên cứu tác dụng chống viêm mạn, giảm đau trung ương và ngoại vi.

- *Tác dụng chống viêm mạn trên mô hình gây u hạt thực nghiệm bằng viên bông*

Viên bông (cellulose) là dị vật, không có khả năng hấp thụ. Khi đưa vào vào cơ thể sẽ phản ứng bằng cách tập chung các loại tế bào như đại thực bào, tế bào lympho để cố gắng loại đi dị vật nhưng không thể được, tạo mô lưới và nguyên bào sợi vây quanh dị vật, hình thành u hạt thực nghiệm tương tự như tiến triển của viêm mạn tính.

Công trình nghiên cứu sử dụng viên bông được cấy vào da lưng chuột, tạo thành khối u hạt. Tác dụng chống viêm của CDMĐLTP được đánh giá bởi việc thay đổi khối lượng u hạt tươi và khô trước và sau khi cấy giữa các lô chuột. Thuốc đối chứng dương được sử dụng là prednisolon 5 mg/kg.

Với mức liều 80 mg/kg có tác dụng làm giảm khối lượng u hạt tươi 28,4% ($p<0,05$) so với lô chứng nhưng không thể hiện tác dụng làm giảm khối lượng khô so với chứng và tác dụng chống viêm mạn yếu hơn so với prednisolon liều 5 mg/kg.

Tóm lại, với mức liều CDMĐLTP 80 mg/kg (1,25 g dược liệu/kg) có tác dụng chống viêm cấp và mạn trên mô hình thực nghiệm, phù hợp với liều sử dụng trên người theo kinh nghiệm dân gian. Kết hợp với kết quả nghiên cứu về thành phần hóa học, kết quả thử tác dụng chống viêm cấp và mạn tính trong công trình nghiên cứu này đã góp phần sáng tỏ công dụng chữa trị phong thấp, nhức mỏi của dược liệu Lạc tân phụ trong dân gian.

Theo một số công trình nghiên cứu về dược lý đã công bố, cao chiết toàn phần từ thân rễ các loài *A. chinensis* và *A. koreana* có tác dụng ức chế viêm do tác nhân UV B trên tế bào sừng người bởi ngăn cản sản xuất PG E_2 và ức chế sản xuất NO [81-82]. Các hợp chất acid astilbic và bergenin hiện diện trong hai loài trên có tác dụng ức chế sản xuất các chất trung gian hóa học gây viêm, đau

góp phần hướng tới giả thuyết để giải thích cơ chế tác dụng chống viêm của dược liệu [78],[85],[114],[131].

Stress oxy hóa có thể gây ra viêm [128]. Các chất ức chế XO làm giảm acid uric huyết do đó có thể được sử dụng làm thuốc điều trị bệnh gout [13],[15]. CDMĐLTP có tác dụng chống oxy hóa, ức chế XO và chứa các hợp chất có tác dụng chống viêm như acid astilbic, bergenin, các flavonoid (quercetin, quercitrin) [36],[54],[78],[85],[91] là cơ sở khoa học chứng minh tác dụng chống viêm, giảm đau của dược liệu Lạc tân phụ.

4.3.5. Về tác dụng giảm đau

Đề tài đánh giá tác dụng giảm đau trung ương trên mô hình mâm nóng và ngoại vi trên mô hình đau quặn bụng bằng acid acetic 1%:

- *Tác dụng giảm đau trung ương trên mô hình mâm nóng*

Mô hình này tác nhân gây đau là nhiệt độ. Những thuốc có cơ chế tác dụng giảm đau trung ương sẽ thay đổi nhận cảm đau và một phần do tăng ngưỡng đau. Nguyên tắc của phương pháp: xác định thời gian phản ứng đau của từng chuột nhắt trắng, thuốc giảm đau sẽ kéo dài thời gian phản ứng với nhiệt độ của chuột. Sử dụng thuốc chứng dương là codein 60 mg/kg.

Liều thử tác dụng giảm đau dựa trên liều tác dụng chống viêm tốt nhất trong các mức liều thử tác dụng chống viêm cấp (liều 80 mg/kg). Kết quả nghiên cứu tác dụng giảm đau của CDMĐLTP trên mô hình mâm nóng với mức liều 80 mg/kg không khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô chứng. Do vậy mức liều CDMĐLTP 80 mg/kg không có tác dụng giảm đau theo theo cơ chế trung ương.

- *Tác dụng giảm đau ngoại vi trên mô hình đau quặn bằng acid acetic*

Khi tiêm dung dịch acid acetic 1% vào màng bụng chuột nhắt trắng sẽ gây nên những cơn đau quặn bụng. Pha đầu của đáp ứng đau là do acid acetic kích thích trực tiếp lên sợi cảm giác, pha đáp ứng muộn hơn do viêm tạo ra các chất trung gian hóa học gây đau. Đếm số cơn đau quặn bụng của chuột ở từng thời điểm. Thuốc có tác dụng giảm đau nếu số cơn đau giảm đi. Thuốc chứng dương

là indomethacin 10 mg có tác dụng lên pha sau của quá trình đáp ứng đau.

Vẫn với mức liều như nghiên cứu tác dụng giảm đau trung ương, CDMĐLTP có tác dụng giảm đau ngoại vi do làm giảm số cơn quặn đau của chuột so với lô chứng trong khoảng thời gian từ phút thứ 10 đến 15 ($p<0,05$), 15 đến 20 ($p<0,05$) và 20 đến 25 ($p<0,01$). Indomethacin 10 mg/kg thể hiện tác dụng giảm đau tốt so với lô chứng trong khoảng thời gian từ phút 10 đến 15 ($p<0,05$), 15 đến 20 ($p<0,05$), 20 đến 25 ($p<0,01$) và 25-30 ($p<0,01$). CDMĐLTP 80 mg/kg có tác dụng giảm số cơn quặn đau của chuột tương đương có ý nghĩa thống kê so với indomethacin 10 mg/kg trong khoảng thời gian từ phút thứ 10 đến 15, 15 đến 20, 20 đến 25.

Theo kinh nghiệm dân gian của một số nước châu Á như Trung Quốc, Ấn Độ, Nepal, phần dưới mặt đất Lạc tân phụ được sử dụng để chữa đau do thấp khớp, đau lưng, đau đầu, đau răng, chữa bong gân, sưng cơ,…Những chứng đau trên là những đau ngoại vi, đau nhẹ, đau khu trú. Kết quả nghiên cứu thực nghiệm CDMĐLTP có tác dụng giảm đau đã góp phần chứng minh công dụng giảm đau của dược liệu Lạc tân phụ đã sử dụng trong dân gian.

Từ kết quả nghiên cứu về hóa học, đã phân lập được từ CDMĐLTP các hợp chất có tác dụng dược lý: acid astilbic có tác dụng chống viêm, giảm đau ngoại vi và được đề xuất làm thuốc giảm đau chống viêm [78]; bergenin, quercetin, quercitrin cũng có tác dụng chống viêm [36],[54],[91]. Mặt khác, CDMĐLTP đã được chứng minh bằng thực nghiệm có tác dụng chống oxy hóa, ức chế XO. Do đó là cơ sở giải thích tác dụng giảm đau của dược liệu Lạc tân phụ. Trên cơ sở đó giúp định hướng nghiên cứu tách chiết, phân lập các thành phần có tác dụng giảm đau, chống viêm khác có trong dược liệu Lạc tân phụ.

4.3.6. Về tác dụng làm tăng cường hấp thu glucose của các oleanan triterpenoid

Bệnh đái tháo đường là rối loạn chuyển hóa glucid, protid, lipid do nhiều nguyên nhân khác nhau, do thiếu insulin tuyệt đối hoặc tương đối gây tăng

đường huyết và nếu quá ngưỡng thận sẽ có đường niệu. Nếu không được điều trị sẽ có rất nhiều biến chứng, đặc biệt là biến chứng vi mạch và mạch máu lớn [14]. Bệnh đái tháo đường là một bệnh xã hội, tỷ lệ mắc bệnh trên thế giới ngày càng cao, ước đến năm 2030 có khoảng 366 triệu người (4,4%) dân số thế giới mắc bệnh này [29].

Dựa vào số lượng và mức độ nhạy cảm với insulin, bệnh đái tháo đường được chia làm 2 nhóm chính:

- Đái tháo đường type I: do phá hủy tự miễn tại tế bào β của tiểu đảo tụy, dẫn đến thiếu hụt tuyệt đối insulin. Bệnh chiếm 10-15% người đái tháo đường và thường xuất hiện ở người dưới 35 tuổi. Bệnh có xu hướng biến chứng hôn mê, toan huyết, gầy sút và nhiều biến chứng khác [14],[29].

- Đái tháo đường type II: hay xảy ra ở người trên 30 tuổi, bệnh nhân thường béo và ít biến chứng. Thường bao gồm kết hợp giữa kháng và giảm bài tiết insulin của tế bào β [14],[29].

Dựa vào cơ chế tác dụng, thuốc chữa đái tháo đường chia làm 4 nhóm chính [15]:

- Insulin;

- Thuốc ức chế α-glucosidase: acarbose;

- Thuốc kích thích bài tiết insulin: các sulfonyalure (tolbutamid, clopropamid, glibenclamid, glipizid, gliclazid,…), nateglinid.

- Thuốc làm tăng nhạy cảm tế bào với insulin: các biguanid (phenformin, metformin); thiazolidinedion (troglitazon, rosiglitazon).

Để nghiên cứu tác dụng chống đái tháo đường, hiện nay có nhiều phương pháp được áp dụng [125]:

- Thử nghiệm hạ đường huyết trên động vật (thỏ, chuột nhắt, chuột cống, chó,…);

- Thử nghiệm insulin và các hormon peptid điều hòa đường huyết khác;

- Đánh giá tác dụng insulin và chuyển hóa tương tự insulin;

- Đánh giá hấp thu glucose.

Insulin có tác dụng điều hòa đường huyết tại các mô đích chủ yếu là gan, cơ và mỡ [15]. Cơ chiếm trên 80% hấp thu glucose do hoạt động của insulin. Giảm sút sự hấp thu đường huyết ở cơ vì kháng insulin gây ra bệnh đái tháo đường type 2 [59]. Hiện nay có nhiều công trình nghiên cứu tác dụng làm hấp thu glucose vào tế bào cơ và tế bào mô mỡ chuột và xác định cơ chế tác dụng của mẫu nghiên cứu [46],[57],[90].

Các công trình nghiên cứu trên thế giới hiện nay cho thấy, triterpenoid từ thực vật, đặc biệt là khung lanostan, ursan, cucurbitan có tác dụng chống đái tháo đường theo nhiều cơ chế khác nhau [42],[106],[120],[135]. Acid ursolic và dẫn xuất của nó như acid corosolic, là hai ursan triterpenoid chứa nhóm carboxylic ở vị trí C-28 có tác dụng hạ đường huyết. Cơ chế tác dụng là tăng cường hấp thu glucose trong tế bào sợi cơ L6 chuột, tăng phosphoryl hóa receptor insulin trong tế bào CHO/*h*IR, ức chế enzym PTP 1B [106],[135]. Các cucurbitan triterpenoid phân lập từ quả mướp đắng (*Momordica charantia)* có tác dụng tăng dịch chuyển GLUT4 ở cả hai tế bào cơ xương L6 và tế bào mô mỡ 3T3-L1 - một bước cần thiết đối với glucose nhập vào tế bào [120]. Các lanostan triterpenoid từ nấm Linh chi (*Ganoderma lingzhi*) có tác dụng ức chế α-glucosidase [42]. Đa số triterpenoid phân lập được từ chi *Astilbe* thuộc nhóm ursan, oleanan triterpenoid có nhóm carboxylic ở vị trí C-27. Năm 2006, Na M.K. và cs. [82] phân lập từ loài *A. koreana* được 5 ursan và oleanan triterpenoid có nhóm carboxylic ở vị trí C-27 và lần đầu tiên đánh giá tác dụng ức chế ức chế enzym PTP 1B của các triterpenoid kiểu này và cho thấy một số cho kết quả có ý nghĩa (IC_{50} = 4,9-12,8 μg/ml). Trong đề tài này, nhóm nghiên cứu đã phân lập được 6 oleanan triterpenoid có nhóm carboxylic ở vị trí C-27 từ phần dưới mặt đất của Lạc tân phụ. Nhóm carboxylic tại vị trí số 27 là cấu trúc độc đáo của các triterpenoid chủ yếu có mặt ở họ Saxifragaceae. Vì vậy, nhóm

nghiên cứu mong muốn tìm hiểu ảnh hưởng của nhóm 27-COOH này đối với tác dụng sinh học của các triterpenoid. Do vậy chúng được lựa chọn để sơ bộ đánh giá tác dụng làm tăng cường hấp thu glucose trên tế bào sợi cơ chuột để mong muốn tìm ra hợp chất tác dụng có ý nghĩa, xa hơn nữa có thể lựa chọn được hợp chất cho nghiên cứu làm thuốc điều trị bệnh đái tháo đường type II.

- *Độc tế bào của các oleanan triterpenoid*

Trước khi đánh giá tác dụng làm tăng hấp thu glucose, các oleanan triterpenoid được đánh giá độc đối với tế bào sợi cơ chuột C2C12, sử dụng phương pháp MTT, chất đối chứng dương digitonin - một saponin steroid phân lập từ các loài Dương địa hoàng *Digitalis spp* (Scrophulariaceae) [41].

Kết quả nghiên cứu cho thấy, các hợp chất **SR-1**, **SR-2**, **SR-6** không gây độc (không làm chết tế bào sống) trên tế bào sợi cơ chuột C2C12 ở hai nồng độ 20, 40 μM, thể hiện OD của formazan tạo thành do tế bào sống khử hóa MTT tăng so với mẫu chứng DMSO 2% tại thời điểm 2, 4 giờ. Các hợp chất **SR-4**, **SR-7** thể hiện độc tế bào thông qua OD giảm ở hai nồng độ 20, 40 μM tại thời điểm 2, 4 giờ. Hợp chất **SR-5** ở nồng độ 20 μM tại thời điểm 2 giờ không thể hiện độc tế bào, nhưng tại thời điểm 4 giờ và nồng độ 40 μM thể hiện độc với tế bào cả hai thời điểm 2, 4 giờ. Rosiglitazon (30 μM), acid ursolic (10 μM) cũng không thể hiện độc tế bào sợi cơ chuột C2C12 tại hai thời điểm 2, 4 giờ. Digitonin thể hiện độc mạnh đối với tế bào thử. Vì các hợp chất **SR-4**, **SR-5**, **SR-7** thể hiện độc tế bào sợi cơ chuột C2C12, do vậy chúng không được nghiên cứu tác dụng làm tăng cường hấp thu glucose vào tế bào sợi cơ chuột C2C12.

- *Tác dụng làm tăng cường hấp thu glucose vào tế bào sợi cơ chuột C2C12 của các oleanan triterpenoid*

Tăng cường hấp thu glucose của các oleanan triterpenoid được đánh giá bằng đo hoạt tính phóng xạ của 2-deoxy-[^{3}H]-glucose hấp thu vào tế bào sợi cơ chuột C2C12 so với mẫu chứng và insulin. Đối chứng dương sử dụng là acid

ursolic: một ursan triterpenoid có nhóm carboxylic ở vị trí C-28 đã được chứng minh làm tăng hấp thu glucose vào tế bào [135] và rosiglitazon có tác dụng hạ đường huyết thuộc nhóm thiazolidinedion [15].

Sau khi khảo sát tác dụng làm tăng cường hấp thu glucose vào tế bào sợi cơ chuột C2C12 của hợp chất **SR-1** ở nồng độ 40 μM tại các thời điểm khác nhau, hợp chất **SR-1** làm tăng cường hấp thu glucose vào tế bào cao nhất khi ủ không cùng hoặc cùng với insulin (100 nM) tại thời điểm 2 giờ. Từ đó, chọn thời điểm 2 giờ để nghiên cứu tác dụng làm tăng cường hấp thu glucose của các triterpenoid tại 3 nồng độ 10, 20, 40 μM (nồng độ không gây độc tế bào).

Trong 3 triterpenoid được nghiên cứu tác dụng làm tăng hấp thu glucose vào tế bào sợi cơ chuột C2C12, 2 hợp chất **SR-1**, **SR-2** làm tăng hấp thu glucose vào tế bào phụ thuộc vào nồng độ cả khi kết hoặc hoặc không kết hợp với insulin (100 nM). Ở 3 nồng độ 10, 20, 40 μM, hợp chất **SR-1** ủ với tế bào không cùng hoặc cùng với insulin đều làm tăng hấp thu glucose vào tế bào có ý nghĩa thống kê so với chứng hoặc so với insulin. Hợp chất **SR-2** làm tăng hấp thu glucose vào tế bào có ý nghĩa thống kê khi ủ với tế bào cùng hoặc không cùng với insulin ở nồng độ 20, 40 μM. Hợp chất **SR-6** ở nồng độ 10, 20 μM làm tăng hấp thu glucose vào tế bào có ý nghĩa thống kê so với chứng. Tuy vậy, thấy rằng khi tăng nồng độ **SR-6** thì mức độ hấp thu glucose của tế bào không tăng, có xu hướng giảm nếu so sánh với chứng và khi kết hợp với insulin không làm tăng hấp thu có ý nghĩa thống kê ở cả 3 nồng độ nghiên cứu.

Chất đối chứng dương rosiglitazon (30 μM) và acid ursolic (10 μM) ủ với tế bào không cùng hoặc cùng với insulin đều làm tăng hấp thu glucose vào tế bào có ý nghĩa thống kê so với chứng hoặc insulin.

Đây là công trình lần đầu tiên nghiên cứu tác dụng làm tăng cường hấp thu glucose trên tế bào sợi cơ chuột C1C12 của các oleanan triterpenoid có nhóm carboxylic ở vị trí C-27. Trong 3 triterpenoid tiến hành nghiên cứu ở các

nồng độ 10, 20 và 40 μM không gây độc tế bào, 2 triterpenoid với vị trí C-3 là nhóm oxo **(SR-1)** hoặc ester **(SR-2)** có xu hướng làm tăng hấp thu glucose vào tế bào sợi cơ chuột C2C12 phụ thuộc vào liều khi kết hợp hoặc không kết hợp với insulin; triterpenoid có vị trí C-3 là nhóm hydroxyl (SR-6) không làm tăng hấp thu glucose vào tế bào khi dùng kết hợp hoặc không kết hợp với insulin. Điều này định hướng cho việc nghiên cứu tiếp theo về triterpenoid có vị trí C-27 là nhóm carboxylic liên quan cấu trúc tác dụng hấp thu glucose để hy vọng phát triển thuốc mới có tác dụng hạ đường huyết nhạy cảm hoặc kháng insulin.

4.3.7. Hạn chế trong nghiên cứu tác dụng sinh học

Cây Lạc tân phụ là cây thuốc chưa được nghiên cứu ở Việt Nam, trên thế giới cũng chưa được nghiên cứu nhiều, đặc biệt là thành phần hóa học và tác dụng sinh học. Công trình này bước đầu nghiên cứu độc tính cấp và một số tác dụng dược lý nhằm góp phần chứng minh công dụng theo kinh nghiệm dân gian và hy vọng tìm ra tác dụng mới. Nếu phát hiện ra tác dụng sinh học có ý nghĩa sẽ là cơ sở cho các nghiên cứu sâu để tìm cơ chế tác dụng và có định hướng nghiên cứu lâm sàng để làm thuốc điều trị bệnh. Với mục tiêu đó, thời gian, kinh phí hạn hẹp nên các phương pháp nghiên cứu sử dụng mới chỉ mang tính chất sàng lọc sơ bộ, một số kỹ thuật sử dụng đơn giản, phụ thuộc các điều kiện khách quan (điều kiện nuôi động vật, sự đáp ứng khác nhau của từng cá thể động vật,…), điều kiện chủ quan (tay nghề người thực hiện, cách đọc kết quả,..), chưa phản ánh đúng tác dụng điều trị.

- ***Về xác định độc tính:*** để thuốc có thể sử dụng được trên lâm sàng, ngoài nghiên cứu độc tính cấp, phải nghiên cứu độc tính trường diễn, có thể phải nghiên cứu thêm độc tính sinh miễn dịch, độc tính bất thường [7].
- ***Về phương pháp xác định tác dụng chống oxy hóa:*** đề tài mới chỉ thử nghiệm trên mô hình *in vitro* dọn gốc tự do DPPH và $O_2^{\bullet-}$. Đây là các kỹ thuật rất đơn giản để sàng lọc đánh giá sơ bộ tác dụng, cần phải đánh giá tác dụng *in*

vivo theo các mô hình khác nhau như: đánh giá khử glutathion, phương pháp superoxid dismustase, glutathion-S-tranferase, catalase, đánh giá glutathion reductase, đánh giá peroxid hóa lipid…[22].

- ***Về tác dụng chống viêm:*** ngoài các mô hình như trong luận án, một số các mô hình hiện đại đã được triển khai áp dụng.

- *Tác dụng chống viêm in vitro*: thử ức chế COX-1, COX-2, đối kháng TNF-α, ức chế men chuyển interleukin 1β, ức chế giải phóng TNF-α, giải phóng cytokin cảm ứng từ bạch cầu người *in vitro*,…[125].

- *Tác dụng chống viêm cấp:* ức chế kết dính bạch cầu với tĩnh mạch màng treo chuột, phù tai chuột gây ra do oxazolon, thử nghiệm viêm màng phổi,…[125].

- ***Về tác dụng giảm đau:***

- *Tác dụng giảm đau trung ương:* đề tài thực hiện trên mô hình mâm nóng, ngoài ra còn có các mô hình nghiên cứu khác:

+ Các mô hình *in vitro:* các mô hình này xác định cơ chế tác dụng của thuốc, gồm: thử nghiệm sự kết dính ^{3}H-naloxon, ức chế enkephalinase, gắn kết receptor cannabinoids, gắn kết receptor nociceptin,…[125].

+ Các mô hình *in vivo:* mô hình chấn thương thần kinh ngoại vi, đau do hóa trị liệu, chấn thương do co thắt thần kinh mạn, thử nghiệm shock dây thần kinh,…[125].

- *Tác dụng giảm đau ngoại vi:* ngoài mô hình gây đau quặn bằng acid acetic như trong đề tài, nhiều mô hình nghiên cứu mới, hiệu quả được sử dụng như: mô hình đau do cơ chế nội tạng trên chuột, đối kháng với hiệu quả cục bộ của bradykinin, đối kháng yếu tố phát triển thần kinh *in vivo*,…[125].

Như đã đề cập hạn chế một số phương pháp nghiên cứu tác dụng sinh học của đề tài luận án ở trên, khi có điều kiện sẽ tiếp tục nghiên cứu sâu hơn về tác dụng sinh học của cây Lạc tân phụ và lựa chọn sử dụng các phương pháp đánh giá hiện đại, chính xác, phản ánh tác dụng điều trị hơn.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

Về thực vật học

- Xác định được tên khoa học của cây Lạc tân phụ thu hái tại xã Bản Khoang, huyện Sa Pa, tỉnh Lào Cai là *Astilbe rivularis* Buch.-Ham. ex D. Don, thuộc họ Thường sơn hay Cỏ tai hổ (Saxifragaceae).

- Đã mô tả đặc điểm thực vật, phân tích hoa, quả, hạt và xác định đặc điểm giải phẫu lá, thân, thân rễ, rễ của cây Lạc tân phụ.

Về hóa học

- Đã phân lập và xác định cấu trúc hóa học được 17 hợp chất từ cây Lạc tân phụ.

+ 10 hợp chất phân lập từ phần trên mặt đất: acid 3β-acetoxyolean-12-en-27-oic, β-sitosterol, daucosterol, aquilegiolid, quercetin, hyperin, isoquercitrin, engeletin, quercitrin và bergenin.

+ 10 hợp chất phân lập từ phần dưới mặt đất: acid 6β-hydroxy-3-oxoolean-12-en-27-oic, acid 3β-*trans*-*p*-coumaroyloxy-olean-12-en-27-oic, 3β,6α-dihydroxylup-20(29)-en, acid 3β-hydroxyolean-12-en-27-oic, acid 3β,6β,7α-trihydroxyolean-12-en-27-oic, acid 3β,6β-dihydroxyolean-12-en-27-oic, acid 3β,24-dihydroxyolean-12-en-27-oic, quercetin, quercitrin, bergenin.

1 hợp chất mới: acid 3β-*trans*-*p*-coumaroyloxy-olean-12-en-27-oic; 9 hợp chất lần đầu tiên phân lập được từ cây Lạc tân phụ: aquilegiolid, hyperin, isoquercitrin, engeletin, quercitrin, acid 6β-hydroxy-3-oxoolean-12-en-27-oic, 3β,6α-dihydroxylup-20(29)-en, acid 3β,6β,7α-trihydroxyolean-12-en-27-oic, acid 3β,24-dihydroxyolean-12-en-27-oic, trong đó có 4 hợp chất: aquilegiolid, engeletin, acid 6β-hydroxy-3-oxoolean-12-en-27-oic, 3β,6α-dihydroxylup-20(29)-en lần đầu tiên phân lập được từ chi *Astilbe*.

3 hợp chất cùng được phân lập được từ phần trên mặt đất và phần dưới mặt đất là: quercetin, quercitrin, bergenin.

Về tác dụng sinh học

- Lạc tân phụ có độc tính thấp: ở mức liều thử 24 g CDMĐLTP/kg chuột nhắt trắng (tương đương 573 g dược liệu/kg), không gây chết tất cả chuột của lô thử nghiệm.

- CDMĐLTP có tác dụng dọn gốc tự do DPPH với IC_{50}=21,8 μg/ml; dọn gốc tự do $O_2^{\bullet-}$ với IC_{50}= 58,8 μg/ml.

- CDMĐLTP có hoạt tính ức chế hoạt động XO 47,0 ± 3,9% ở nồng độ 100 μg/ml.

- CDMĐLTP có tác dụng chống viêm cấp và chống viêm mạn trên chuột cống trắng khi thử ở liều 80 mg/kg (tương đương 1,25 g dược liệu/kg).

- CDMĐLTP có tác dụng giảm đau ngoại vi nhưng không có tác dụng giảm đau trung ương trên chuột nhắt trắng ở mức liều 80 mg/kg.

- Acid 6*β*-hydroxy-3-oxoolean-12-en-27-oic và acid 3*β-trans-p*-coumaroyloxy-olean-12-en-27-oic (20 và 40 μM), khi thử đơn chất hay kết hợp với insulin (100 nM) có tác dụng làm tăng cường hấp thu glucose có ý nghĩa thống kê so với chứng hoặc insulin (100 nM) khi thử trên mô hình tế bào sợi cơ chuột C2C12.

KIẾN NGHỊ

- Tiếp tục nghiên cứu phân lập các hợp chất có trong cây Lạc tân phụ để hy vọng tìm ra các hợp chất mới, hợp chất có tác dụng mới có thể có ứng dụng trong y học, trong cuộc sống.

- Tiếp tục nghiên cứu sâu về cơ chế tác dụng chống viêm, giảm đau của phần trên mặt đất của cây Lạc tân phụ để làm sáng tỏ công dụng của dược liệu được sử dụng theo kinh nghiệm dân gian

- Tiếp tục nghiên cứu tác dụng sinh học của các triterpenoid có trong cây Lạc tân phụ để có thể tìm ra những hướng mới về nghiên cứu phát triển thuốc từ một loài dược liệu Việt Nam.

- Nghiên cứu độc tính trường diễn của Lạc tân phụ và nghiên cứu đánh giá tác dụng hướng tới sản phẩm điều trị đau, viêm.

CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. Phạm Quốc Tuấn, Nguyễn Đức Hùng, Nguyễn Minh Khởi, MinKyun Na (2012), "Nghiên cứu đặc điểm thực vật của cây lạc tân phụ thu hái tại Sa Pa", *Tạp chí Dược liệu*, *17*(2), trang 63-67.

2. Phạm Quốc Tuấn, Nguyễn Đức Hùng, Nguyễn Quốc Tuấn, Nguyễn Minh Khởi, MinKyun Na, Phương Thiện Thương (2013), "Thành phần flavonoid từ phần trên mặt đất của cây lạc tân phụ", *Tạp chí Dược liệu*, *18*(2), trang 97-102.

3. Phạm Quốc Tuấn, Nguyễn Minh Khởi, MinKyun Na, Phương Thiện Thương (2014), "Thành phần hóa học phần trên mặt đất của cây lạc tân phụ", *Tạp chí Dược liệu*, *19*(4), trang 196-201.

4. Phạm Quốc Tuấn, Nguyễn Minh Khởi, MinKyun Na, Nguyễn Thùy Dương, Hà Hương Lan, Phương Thiện Thương (2015), "Nghiên cứu tác dụng giảm đau và chống viêm của cao phần dưới mặt đất cây lạc tân phụ", *Tạp chí Dược học*, 466, trang 62-68.

5. Joo-Hui Han, Wei Zhou, Wei Li, Pham Quoc Tuan, Nguyen Minh Khoi, Phuong Thien Thuong, MinKyun Na, Chang-Seon Myung (2015), "Pentacyclic triterpenoids from *Astilbe rivularis* that enhance glucose intake via the activation of Akt and Erk1/2 in C2C12 myotubules", *Journal of Natural Products*, *78*(5), 1005–1014.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tiếng Việt

1. Nguyễn Tiến Bân (chủ biên) (2005), *Danh lục các loài thực vật Việt Nam,* Tập 3, Nhà xuất bản Nông nghiệp, Hà Nội.

2. Bộ môn Dược liệu (1999), *Thực tập Dược liệu - Phần vi học,* Trường Đại học Dược Hà Nội.

3. Bộ Y tế (1996), Quyết định số 371 BYT/QĐ ngày 12/03/1996 của Bộ trưởng Bộ Y tế về việc ban hành Quy chế đánh giá tính an toàn và hiệu lực thuốc y học cổ truyền.

4. Bộ Y tế (2009), *Dược điển Việt Nam IV,* Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.

5. Võ Văn Chi (2012), *Từ điển cây thuốc Việt Nam (Bộ mới)*, Tập 1, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.

6. Đỗ Trung Đàm (2001), "Phương pháp ngoại suy liều có hiệu quả tương đương giữa người và động vật thí nghiệm", *Tạp chí Dược học*, 2, 7-9.

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

8. Nguyễn Văn Đàn, Nguyễn Viết Tựu (1985), *Phương pháp nghiên cứu hoá học,* Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.

9. Phạm Hoàng Hộ (1999), *Cây cỏ Việt Nam*, Tập 1, Nhà xuất bản trẻ, Tp. Hồ Chí Minh.

10. Nguyễn Đình Thành (2011), *Cơ sở các phương pháp phổ ứng dụng trong hoá học (dùng cho sinh viên, học viên cao học và nghiên cứu sinh ngành hoá học),* Nhà xuất bản Khoa học Kỹ thuật, Hà Nội.

11. Lê Quốc Thắng, Trịnh Thị Thủy, Trần Văn Sung (2011), "Các hợp chất dihydroflavonol glycosit và aporphin alkaloit từ cây Lãnh công gân hoe", *Tạp chí Hóa học, 49*(1), 70-74.

12. Nguyễn Đình Triệu (2007), *Các phương pháp phổ trong hoá học hữu cơ và hoá sinh*, Nhà xuất bản Đại học Quốc gia Hà Nội.

13. Trường Đại học Y Hà Nội (2004), *Bệnh học Nội khoa*, Tập 1, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.

14. Trường Đại học Y Hà Nội (2004), *Điều trị học Nội khoa*, Tập 2, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.

15. Trường Đại học Y Hà Nội (2004), *Dược lý học lâm sàng*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.

16. Viện Dược liệu (2006), *Nghiên cứu thuốc từ thảo dược (Giáo trình sau đại học),* Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.

17. Viện Dược liệu (2006), *Phương pháp nghiên cứu tác dụng dược lý của thuốc thảo dược,* Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.

18. Vụ khoa học và Công nghệ chất lượng sản phẩm - Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn (2000), *Tên cây rừng Việt Nam,* Nhà xuất bản Nông nghiệp, Hà Nội.

Tiếng Anh

19. Acharya K.P., Rokaya M.B. (2005), "Ethnobotanical survey of medicinal plants traded in the street of Kathmandu valley", *Scientific world*, *3*(3), 44-48.

20. Adhikary P., Roshan K.C., Kayastha D., Thapa D., Shrestha R., Shrestha T.M., Gyawali R. (2012), "*In vitro* evaluation of antimicrobial and cytotoxic potential of dry rhizome extract of *Astilbe rivularis"*, *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research, 4*(3), 122-126.

21. Alam M.N. (2015), "Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity", *Saudi Pharmaceutical Journal, 21,* 143-152.

22. Alfadda A.A., Sallam R.M. (2012), “Reactive oxygen species in health and

disease", *Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2012,* doi:10.1155/2012/936486.

23. Ali A.H., Hassan N.M., Shukor N.I., Embi N., Layip J., Sidek H.M. (2014), "Anti-plasmodial activities of engeletin isolated from *Artocarpus scortechinii", Malaysian Applied Biology Journal, 43*(1), 73-80.

24. Bachmann T.L., Ghia F., Torssell K.B.G. (1993), "Lignans and lactone from *Phyllanthus anisolobus*", *Phytochemistry, 33*(1), 189-191.

25. Balami N.P. (2004), "Ethnomedicinal uses of plants among the Newar community of Pharping village of Kathmandu district, Nepal", *Tribhuvan University Journal, 24*(1), 13-19.

26. Bohm B.A., Bhat U.G. (1985), "Flavonoids of *Astilbe* and *Rodgersia* compared to *Arcunrus*", *Biochemical Systemmatics and Ecology, 13*(4), 437-440.

27. Cai X.F., Park B.Y., Ahn K.S., Kwon O.K., Lee H.K., Oh S.R. (2009), "Cytotoxic triterpenoids from the rhizomes of *Astilbe chinensis*", *Journal of Natural Products, 72*(7), 1241-1244.

28. Cannell R.J.P. (1998), *Natural products isolation,* Humana Press, USA.

29. Carver C., Abrahamson M. (2009), "Diabetes mellitus overview", In: Weigner K., Carver C., *Educating your patient with diabetes*, Humana Press, USA.

30. Chandur U., Shashidhar S., Chandrasekar S.B., Rao M.N. (2010), "Phytochemical evaluation and screening of anti-arthritic activity of *Alpinia galanga* (Linn.)", *International Journal of Pharmaceutical Sciences, 2*(2), 593-597.

31. Chang S.W., Kim K.H., Lee I.K., Choi S.U., Ryu S.Y., Lee K.R. (2009), "Phytochemical constituents of *Bistorta manshuriensis*", *Natural Product Sciences, 15*(4), 234-240.

32. Chawla A.S., Sharma A.K., Handa S.S. (1992), "Chemical investigation and anti-inflammatory activity of *Vitex negundo* seeds", *Journal of Natural*

Products, 55(2), 163-167.

33. Chen H., Chen T., Li J.X., Xu Q. (2004), "Study on constituents in rhizome of *Astilbe chinensis*", *China Journal of Chinese Materia Medica, 29*(7), 652-654.

34. Chettri N., Sharma E., Lama S.D. (2005), "Non-timber forest produces utilization, distribution and status in a trekking corridor of Sikkim, India", *Lyonia, 8*(1), 89-101.

35. Chung Y.H. , Sun B.Y., Chung Y.C. (1983), "Monographic study of the endemic plants in Korea, III. Taxonomy and interspecific relationship of genus *Astilbe*", *Korean Journal of Botany, 26*(2), 73-90.

36. Comalada M., Camuesco D., Sierra S., Balleste I., Xaus J., Gálvez J., Zarzuelo A. (2005), "*In vivo* quercitrin anti-inflammatory effect involves release of quercetin, which inhibits inflammation through down-regulation of the NF-κB pathway", *European Journal of Immunology, 35*(2), 584-592.

37. Cos P., Ying L., Calomme M., Hu J.P., Cimanga K., Poel B.V., Pieters L., Vlietinck A.J., Berghe D.V. (1998), "Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers", *Journal of Natural Products, 61*(1), 71-76.

38. Don D. (1825), *Prodromus Florae Nepalensis,* Londini.

39. Dongfack M.D.J., Van-Dufat H.T., Lallemand M.C., Wansi J.D., Seguin E., Tillequin F., Wandji J. (2008), "New triterpenoids from the stem barks of *Drypetes tessmanniana*", *Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 56*(9) 1321-1323.

40. Dury H. (1864), *The Indian flora* , Vol. 1, Crabancore Sircar Press, India.

41. Eid S.Y., El-Readi M.Z., Winka M. (2012), "Synergism of three-drug combinations of sanguinarine and other plant secondary metabolites with digitonin and doxorubicin in multi-drug resistant cancer cells", *Phytomedicine, 19*(14), 1288-1297.

42. Fatmawati S., Kondo R., Shimizu K. (2013), "Structure-activity relationships of lanostane-type triterpenoids from *Ganoderma lingzhi* as α-glucosidase inhibitors", *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 23*(21), 5900-5903.

43. Gewali M.B. (2008), *Aspects of traditional medicine in Nepal,* Institute of Natural Medicine, University of Toyama, Japan.

44. Guerriero A., Pietra F. (1984), "A butenonide atypical of the Ranunculaceae: aquilegiolide from *Aquilegia atrata* (var. *atroviolacea*)", *Phytochemistry, 23*(10), 2394-2396.

45. Han J.T., Kim H.Y., Park Y.D., Lee Y.H., Lee K.R., Kwon B.M., Beak N.I. (2002), "Aceriphyllic acid A, a new ACAT inhibitory triterpenoid, from *Aceriphyllum rossii*", *Planta Medica*, *68*(6), 558-561.

46. Han J.H., Kim I.S., Jung S.H., Lee S.G., Son H.Y., Myung C.S. (2014), "The effects of propionate and valerate on insulin responsiveness for glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes and C2C12 myotubes via G protein-coupled receptor 41", *PLoS One*, *9*(4), doi: 10.1371/journal.pone.0095268.

47. Hooker J.D., C.B., K.C.S.I. (1879), *Flora of British India* , Vol. 2, L. Reeve & Co., London.

48. Hu J.Y., Yao Z., Teng J., Takaishi Y., Duan H.Q. (2006), "Two new triterpenes from *Astilbe chinensis", Chinese Chemical Letters*, *17*(5), 628-630.

49. Hu J.Y., Yao Z., Xu Y.Q., Takaishi Y., Duan H.Q. (2009), "Triterpenes from *Astilbe chinensis*", *Journal of Asian Natural Products Research, 11*(3), 236-242.

50. Huang H., Cheng Z., Shi H., Xin W., Wang T.T.Y., Yu L. (2011), "Isolation and characterization of two flavonoids, engeletin and astilbin, from the leaves of *Engelhardia roxburghiana* and their potential anti-inflammatory properties", *Journal of Agricultural and Food Chemistry,*

59(9), 4562-4569.

51. Husain D., Hore D.K. (2007), "Collection and conservation of major medicinal plants of Darjeeling and Sikkim Himalayas", *Indian Journal of Traditional Knowlege, 6*(2), 352-357.

52. Izawa K., Nagai M., Inoue T. (1973), "Triterpene acids and bergenin in *Peltoboykinia watanabei* and *Boykinia lycoctonifolia", Phytochemistry, 12*(6), 1058.

53. Joshi K., Joshi R., Joshi A.R. (2011), "Indigenous knowledge and uses of medicinal plants in Macchegaun, Nepal", *Indian Journal of Traditional Knowledge, 10*(2), 281-286.

54. Joshi U.J., Gadge A.S., D'Mello P., Sudha R.S. (2011), "Anti-inflammatory, antioxidant and anticancer activity of quercetin and its analogues", *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences, 2*(4), 1756-1766.

55. Kim J.H., Lee D.J., Kim Y.C. (1987), "Study on the constituents of *Astilbe divaricata*", *Korean Journal of Pharmacognosy*, *18*(4), 207-209.

56. Kim H.Y., Moon B.H., Lee H.J., Choi D.H. (2004), "Flavonol glycosides from the leaves of *Eucommia ulmoides* O. with glycation inhibitory activity", *Journal of Ethnopharmacology*, *93*(2-3), 227–230.

57. Kim K.Y., Cho H.S., Jung W.H., Kim S.S., Cheon H.G. (2007), "Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10 suppression is an important process in peroxisome proliferator-activated receptor-gamma signaling in adipocytes and myotubes", *Molecular Pharmacology*, *71*(6), 1554-1562.

58. Kimura Y., Sumiyoshi M., Sakanaka M. (2007), "Effects of *Astilbe thunbergii* rhizome on wound healing. Part 1. Isolation of promotional effectors from *Astilbe thunbergii* rhizomes on burn wound healing", *Journal of Ethnopharmacology, 109*(1), 72-77.

59. Kumar N., Dey C.S. (2002), "Metformin enhances insulin signalling in

insulin-dependent and -independent pathways in insulin resistant muscle cells", *British Journal of Pharmacology, 137*(3), 329-336.

60. Kumar R., Patel D.K., Prasad S.K., Laloo D., Krishnamurthy S., Hemalatha S. (2012), "Type 2 antidiabetic activity of bergenin from root of *Caesalpinia digyna* Rottler", *Fitoterapia, 83*(2), 395-401.

61. Kumar S., Pandey A.K. (2013), "Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview", *The Scientific World Journal, 2013*, doi: 10.1155/2013/162750.

62. Lee D.Y., Lyu H.N., Kwak H.Y., Jung L., Lee Y.H., Kim D.K., Chung I.S., Kim S.H., Baek N.I. (2007), "Isolation of flavonoids from the fruits of *Cornus kousa* Burg.", *Journal of Applied Biological Chemistry, 50*(3), 144-147.

63. Lee S., Xiao C., Pei S. (2008), "Ethnobotanical survey of medicinal plants at periodic markets of Honghe pefecture in Yunnan Province, SW China", *Journal of Ethnopharmacology, 117*(2), 362-377.

64. Lee S.H., Sancheti S., Sancheti S., Seo S.Y. (2009), "Potent antielastase and antityrosinase activities of *Astilbe chinensis*", *American Journal of Pharmacology and Toxicology, 4*(4), 125-127.

65. Lendl A., Werner I., Glasl S., Kletter C., Mucaji P., Presser A., Reznicek G., Jurenitsch J., Taylor D.W. (2005), "Phenolic and terpenoid compounds from *Chione venosa* (SW.) Urban var. *venosa* (Bois Bande´)". *Phytochemistry*, *66*(19), 2381-2387.

66. Li T.S. (2009), *Chinese and related north American herbs: Phytopharmacology and therapeutic value* , 2nd ed., CRC Press, USA.

67. Lim H.K., Kim H.S., Choi H.S., Oh S. (2000), "Hepatoprotective effects of bergenin, a major constituent of *Mallotus japonicus*, on carbon tetrachloride-intoxicated rats", *Journal of Ethnopharmacology, 72*(3), 469-474.

68. Long C.L., Li R. (2004), "Ethnobotanical studies on medicinal plants used

by the red-headed Yao people in Jinping, Yunnan province, China", *Journal of Ethnopharmacology, 90*(2-3), 389-395.

69. Lu M.Y., Liao Z.X., Ji L.J., Sun H.F. (2013), "Triterpenoids of *Chrysosplenium carnosum"*, *Fitoterapia*, *85*, 119-124.

70. Maityhan D., Pradhan N., Chau A.S. (2004), "Folk uses of some medicinal plants from north Sikkim", *Indian Journal of Traditional Knowledge, 3*(1), 66-71.

71. Manandhar N.P. (1991), "Medicinal plant-lore of Tamang tribe of Kabhrepalanchok district, Nepal", *Economic Botany*, *45*(1), 58-71.

72. Manandhar N. P. (2002), *Plants and people of Nepal,* Timber Press, Inc., USA.

73. Mandal P., Misra T.K., Basu P.K. (2009), " *In vitro* antioxidant potential of *Astilbe rivulari*s rhizome", *Canadian Journal of Pure & Applied Sciences, 3*(1), 649-654.

74. Manga S.S.E., Messanga B.B., Sondengam B.L. (2001), "7,8-Dihydrobenzofuranones from *Ouratea reticulata*", *Fitoterapia, 72*(6), 706-708.

75. Masood K.A. (2006), *Pharmacognostic and phytochemical investigation of the leaf of Berginia cilita and evaluation of the same for antilithiatic and antioxidant activities,* Dissertation of master of pharmacy in Pharmacognosy, Rajiv Gandhi University of Health Sciences, Karnataka, Bangalore, India.

76. Mitra P., Ghosh T., Mitra P.K. (2013), "Anti-peptic ulcer activity of TLC separated fraction of root extract of *Astilbe rivularis* in rats", *European Journal of Biotechnology and Bioscience, 1*(1), 37-42.

77. Mok S.Y., Lee S. (2013), "Identification of flavonoids and flavonoid rhamnosides from *Rhododendron mucronulatum* var. *albiflorum* and their inhibitory activities against aldose reductase", *Food Chemistry, 136*(2), 969-974.

78. Moon T.C., Lin C.X., Lee J.S., Kim D.S., Bae K.H., Son K.H., Kim H.P., Kang S.S., Son J.K., Chang H.W. (2005), "Antiinflammatory activity of astilbic acid from *Astilbe chinensis*", *Biological and Pharmaceutical Bulletin, 28*(1), 24-26.

79. Mustafa G., Anis E., Ahmed S., Anis I., Ahmed H., Malik A., Shahzad-ul-Hassan S., Choudhary M.I. (2000), "Lupene-type triterpenes from *Periploca aphylla", Journal of Natural Products, 63*(6), 881-883.

80. Na M.K., An R.B., Jin W.Y., Min B.S., Yoo J.K., Kim Y.H., Bae K.H. (2003), "Antioxidant effect of plant extracts on free radical and lipid peroxidation", *Natural Product Sciences, 9*(4), 226-231.

81. Na M.K., Min B.S., An R.B., Jin W.Y., Kim Y.H., Song K.S., Seong Y.H., Bae K.H. (2004), "Effect of the rhizomes of *Astilbe chinensis* on UVB-induced inflammatory response", *Phytotherapy Research, 18*(12), 1000-1004.

82. Na M.K., Min B.S., Bo R., Song K.S., Seong Y.H., Bae K.H. (2004)," Effect of *Astilbe koreana* on ultraviolet B (UVB)-induced inflammatory response in human keratinocytes", *Biological and Pharmaceutical Bulletin, 27*(8), 1301-1304.

83. Na M.K., Cui L., Min B.S., Bae K.H., Yoo J.K., Kim B.Y., Oh W.K., Ahn J.S. (2006), "Protein tyrosine phosphatase 1B inhibitory activity of triterpenes isolated from *Astilbe koreana*", *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters,16*(12), 3273-3276.

84. Naved T., Ansari S.H., Mukhtar H.M., Ali M. (2005), "New triterpenic esters of oleanene - series from the flowers *Calendula officinalis* Linn.", *Indian Journal of Chemistry, 44B,* 1088-1091.

85. Nazir N., Koul S., Qurishi M.A., Taneja S.C., Ahmad S.F., Bani S., Quazi G.N. (2007), "Immunomodulatory effect of bergenin and norbergenin against adjuvant-induced arthritis - A flow cytometric study", *Journal of Ethnopharmacology, 112*(2), 401-405.

86. Nazir N., Koul S., Qurishi M.A., Najar M.H., Zargar M.I. (2011), "Evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of bergenin and its derivatives obtained by chemoenzymatic synthesis", *European Journal of Medicinal Chemistry, 46*(6), 2415-2420.

87. Nguyen T.T.M., Awale S., Tezuka Y., Tran Q.L., Watanabe H., Kadota S. (2004), "Xanthine oxidase inhibitory activity of Vietnamese medicinal plants", *Biological and Pharmaceutical Bulletin, 27*(9), 1414-1421.

88. Otsuka H., Ito A., Fujoka N., Kawatama K.I., Kasai R., Yamasaki K., Satoh T. (1993), "Butenolides from *Sinomenium acutum*", *Phytochemistry, 33*(2), 389-392.

89. Pan J.T. (1995), "A study on the genus *Astilbe* Buch.-Ham. ex D. Don from China", *Acta Phytotaxonomica Sinica, 23*(6), 432-443.

90. Park C.E., Kim M.J., Lee J.H., Min B.I., Bae H. , Choe W., Kim S.S., Ha J. (2007), "Resveratrol stimulates glucose transport in C2C12 myotubes by activating AMP-activated protein kinase", *Experimental and Molecular Medicine, 39*(2), 222-229.

91. Patel D.K., Patel K., Kumar R., Gadewar M., Tahilyani V. (2012), "Pharmacological and analytical aspects of bergenin: a concise report", *Asian Pacific Journal of Tropical Disease, 2*(2), 163-167.

92. Pavia D.L., Lampman G.M., Kriz G.S., Vyvyan J.R. (2009), *Introduction to spectroscopy,* Brooks/Cole, Cengage Learning, USA.

93. Phuong T.T., Nguyen D.S., Tran M.N., Tran M.H., Nguyen H.D., Nguyen D.T, Bae K.H., Oh W.K. (2009), "Antioxidant activity and principles of Vietnam bitter tea *Ilex kudingcha*", *Food Chemistry, 113*(1), 139-145.

94. Rai M. B. (2003), "Medicinal plants of Tehranthum district, eastern Nepal", *Our Nature, 1*, 42-48.

95. Raj M.K., Duraipandiayan V., Agastian P., Ignacimuthu S. (2012), "Antimicrobial activity of bergenin isolated from *Peltophorum pterocarpum* DC. flowers", *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*,

2(2), S901-S904.

96. Rajbhandari M., Mentel R., Jha P.K., Chaudhary P., Battarai S., Gewali M.B., Karmacharya N., Hipper M., Lindequist U. (2009), "Antiviral activity of some plants used in Nepalese traditional medicine", *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 6*(4), 517-522.

97. Rajbhandari M., Lalk M., Mentel R., Lindequist U. (2011), "Antiviral activity and constituents of the Nepalese medicinal plant *Astilbe rivularis*", *Records of Natural Products, 5*(2), 138-142.

98. Rajnarayana K., Reddy M.S., Chaluvadi M.R., Krishna D.R. (2001), "Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential", *Indian Journal of Pharmacology, 33*, 2-16.

99. Rastogi S., Rawat A.K.S. (2008), "A comprehensive review on bergenin, a potential hepatoprotective and antioxidative phytoconstituent", *Herba Polonica, 3*(2), 66-79.

100. Ratheesh M., Shyni G. L., Sindhu G., Helen A. (2010), "Protective effects of isolated polyphenolic and alkaloid fractions of *Ruta graveolens* L. on acute and chronic models of inflammation", *Inflammation, 33*(1), 18-24.

101. Regasini L.O., Lopes A.A., Silva D.H.S., Furlan M., Young M.C.M., Maria D.A., Barreiro E.J., Bolzani V.S. (2007), "Antiproliferative effect of *Pterogyne nitens* on melanoma cells", *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, 28*(3), 335 - 340.

102. Resisch J., Hussain R.A., Mester I. (1984), "Flavonoids from *Flindersia australis*", *Phytochemistry, 23*(9), 2114-2115.

103. Rossi A., Di Paola R., Mazzon E., Genovese T., Caminiti R., Bramanti P., Pergola C., Koeberle A., Werz O., Sautebin L., Cuzzocrea S. (2009), "Myrtucommulone from *Myrtus communis* exhibits potent anti-inflammatory effectiveness *in vivo*", *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 329*(1), 76–86.

104. Sancheti S., Sancheti S., Lee S.H., Lee J.E., Seo S.Y. (2011), "Screening of

Korean medicinal plant extracts for α-glucosidase inhibitory activities", *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, *10*(2), 261-264.

105. Sarker S.D., Latif Z., Gray A.I. (2006), *Natural products isolation*, 2nd ed. Humana Press, USA.

106. Shi L., Zhang W., Zhou Y.Y., Zhang Y.N., Li J.Y., Hu L.H., Li J. (2008), "Corosolic acid stimulates glucose uptake via enhancing insulin receptor phosphorylation", *European Journal of Pharmacology*, *584*(1), 21-29.

107. Shintani H. (2013), "Determination of xanthine oxidase", *Pharmaceutica Analytica Acta, 2013*, doi:10.4172/2153-2435.S7-004.

108. Shrestha P.M., Dhillion S.S. (2003), "Medicinal plant diversity and use in the highlands of Dolakha district, Nepal", *Journal of Ethnopharmacology*, *86*(1), 81-96.

109. Shu Y., Liu Y., Li L., Feng J., Lou B., Zhou X., Wu H. (2011), "Antibacterial activity of quercetin on oral infectious pathogens", *African Journal of Microbiology Research, 5*(30), 5358-5361.

110. Singh P.P., Mahadi F., Roy A., Sharma P. (2009), "Reactive oxygen species, reactive nitrogen species and antioxidant in etiopathogenesis of diabetes mellitus type-2", *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, *24*(4) 324-342.

111. Song Q.Y., Qi W.Y., Li Z.M., Zhao J., Chen J.J. (2011), "Antifungal activities of triterpenoids from the roots of *Astilbe myriantha* Diels", *Food Chemistry*, *128*(2), 495-499.

112. Sumiyoshia M., Kimura Y. (2010), "Enhancing effects of a chromone glycoside, eucryphin, isolated from *Astilbe* rhizomes on burn wound repair and its mechanism", *Phytomedicine*, *17*(10), 820-829.

113. Sun H.X., Ye Y.P., Yang K. (2002), "Studies on the chemical constituents in radix *Astilbes chinensis*", *China Journal of Chinese Materia Medica*, *27*(10), 751-754.

114. Sun H.X., Zhang J.X., Ye Y.P., Pan Y.J., Shen Y. (2003), "Cytotoxic pentacyclic triterpenoids from the rhizome of *Astilbe chinensis*", *Helvetica Chimica Acta, 86*(7), 2414-2423.

115. Sun H.X., Ye Y.P., Pan Y.J. (2004), "Cytotoxic oleanane triterpenoids from the rhizomes of *Astilbe chinensis* (Maxim.) Franch. et Savat", *Journal of Ethnopharmacology, 90*(2-3), 261-265.

116. Sun H.X., Zheng Q.F., Tu J. (2006), "Induction of apotosis in HeLa cells by 3β-hydroxy-12-oleanen-27-oic acid from the rhizomes of *Astilbe chinensis*", *Bioorganic & Medicinal Chemistry, 14*(4), 1189-1198.

117. Tada M., Kohno M., Niwano Y. (2014), "Alleviation effect of arbutin on oxidative stress generated through tyrosinase reaction with L-tyrosine and L-dopa", *Biochemistry*, *15*(23), doi: 10.1186/1471-2091-15-23.

118. Takahashi K., Kanayama K., Tanabe Y., Takani M. (1972), "Studies on constituents of medicinal plants. XI.1) Constituents of the roots of *Astilbe thunbergii* Miquel var. *congests* H. Boissie", *Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 20*(10), 2106-2111.

119. Takhtajan A. (2009), *Flowing plants*, 2nd ed., Springer.

120. Tan M.J., Ye J.M., Turner N., Hohnen-Behrens C., Ke C.K., Tang C.P., Chen T., Weiss H.C., Gesing E.R., Rowland A., James D.E., Ye Y. (2008), "Antidiabetic activities of triterpenoids isolated from bitter melon associated with activation of the AMPK pathway", *Chemistry & Biology*, *15*(3), 263-273.

121. Trader B.W. (2006), "*Molecular and morphological investigation of Astilbe"*, Ph.D. dissertation in horticulture, Virginia Polytechnic Institute and State University, USA.

122. Tschesche R., Delhvi S., Sepulveda S., Breitmaier E. (1979), "Eucryphin, a new chromone rhamnoside from the bark of *Eucryphia cordifolia*", *Phytochemistry*, *18*(5), 867-869.

123. Tu J., Sun H.X., Y.P. (2006), "3*β*-Hydroxyolean-12-en-27-oic acid: a cytotoxic, apoptosis-inducing natural drug against COLO-205 cancer cells", *Chemistry & Biodiversity, 3*(1), 69-78.

124. Tu J., Sun H.X., Te Y.P. (2008), "Immunomodulatory and antitumor activity of triterpenoid fractions from the rhizomes of *Astilbe chinensis*", *Journal of Ethnopharmacology, 119*(2), 266-271.

125. Vogel H.G. (2008), *Drug discovery and evaluation pharmacological assays*, 3rd ed., Springer.

126. Wei Q., Ruan Z., Liao X., Tang Z., Dai Q. (2003), "Study on pharmacognosy of *Astilbe rivularis* Buch.-Ham. ex D. Don", *Journal of Yunnan College of Traditional Chinese Medicine, 26*(2), 21-23.

127. Winter C.A., Risley E.A., Nuss G.W. (1962), "Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs", *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 111*(3), 544-547.

128. Wiseman H., Halliwell B. (1996), "Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer", *Biochemical Journal, 313*, 17-29

129. Wu Z.Y., Raven P.H. (2001), *Flora of China*, Vol. 8, Science press, Beijing and Missouri Botanical Garden Press, St. Louis, America.

130. Wu Z.Y., Raven P.H., Hong D. (2003), *Flora of China: Illustriations*, Vol. 8, Science press, Beijing and Missouri Botanical Garden Press, St. Louis, America.

131. Xue Y., Xu X.M., Yan J.F., Deng W.L., Liao X. (2011), "Chemical constituents from *Astilbe chinensis*", *Journal of Asian Natural Products Research, 13*(2), 188-191.

132. Yoo J.S., Ahn E.M., Bang M.H., Son M.C., Yang H.J., Lee D.H., Chung H.G., Jeong T.S., Lee K.T., Choi M.S., Baek N.I. (2006), "Steroids from aerial parts of *Artermisia princeps* Pampanini", *Korean*

Journal of Medicinal Crop Science, 14(5), 273-277.

133. Yuk J.E., Lee M.Y., Kwon O.K., Cai X.F., Jang H.Y., Oh S.R., Lee H.K., Ahn K.S. (2011), "Effects of astilbic acid on airway hyperresponsiveness and inflammation in a mouse model of allergic asthma", *International Immunopharmacology, 11*(2), 266-273.

134. Zhang Y.B., Peng X.Y., Sun H.X. (2008), "A new cytotoxic, apoptosis-inducing triterpenoid from the rhizomes of *Astilbe chinensis*", *Chemistry & Biodiversity, 5*(1), 189-196.

135. Zhang W., Hong D., Zhou Y., Zhang Y., Shen Q., Li J.Y., Hu L.H., Li J. (2006), "Ursolic acid and its derivative inhibit protein tyrosine phosphatase 1B, enhancing insulin receptor phosphorylation and stimulating glucose uptake", *Biochimica et Biophysica Acta, 1760*(10), 1505-1512

136. Zheng C.J., Sohn M.J., Kim K.Y., Yu H.E., Kim W.G. (2008), "Olean-27-carboxylic acid-type triterpenes with potent antibacterial activity from *Aceriphyllum rossii", Journal of Agricultural and Food Chemistry 56*(24),11752-11756.

137. Zheng X.L., Sun H.X., Liu X.L., Chen Y.X., Qian B.C. (2004), "Astilbic acid induced COLO 205 cell apoptosis by regulating Bcl-2 and Bax expression and activating caspase-3", *Acta Pharmacologica Sinica, 25*(8), 1090-1095.

138. Zhou J., Xie G., Yan X. (2011), *Encyclopedia of traditional Chinese medicines: Molecular structures, pharmacological activities, natural sources and applications*, Vol. 1, Springer.

139. Zhou J., Xie G., Yan X. (2011), *Encyclopedia of traditional Chinese medicines: molecular structrures, pharmacological activities, natural sources and application*, Vol. 3, Springer.

140. Zhu W.D., Nie Z.L., Wen J., Sun H. (2013), "Molecular phylogeny and biogeography of *Astilbe* (Saxifragaceae) in Asia and eastern north America", *Botanical Journal of the Linnean Society, 171*(2), 377-394.

141. Zou Y., Cui Y. (2012), "Chemical constituents from *Astilbe myriantha*", *Journal of Chinese Medicinal Materials, 35*(7), 1095-1097.

Tiếng Trung

142. 中华本草“编委会 (国家中医药管理局) (1998), *中华本草*, 上海科学技术出版社, 上海

Trang Web

143. Flora of North America, Vol. 8 [online], at available: http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=1&taxon_id=10800 [Accessed 03 February 2014].

144. Flora of Pakistan [online], at available: *http://www.tropicos.org/Name/29101664?projectid=32*. [Accessed 02 February 2014].

145. Kew Royal Botanic Garden [online], at available: http://apps.kew.org/herbcat/getHomePageResults.do?homePageSearchText=Astilbe+rivularis. [Accessed 03 February 2011].

146. The International Plant Names Index [online], at available: *http://www.ipni.org/ipni/advPlantNameSearch.do;jsessionid=690544611ECDF6F7B6DF995CDF00B547?find_family=&find_genus=astilbe&find_species=&find_infrafamily=&find_infragenus=&find_infraspecies=&find_authorAbbrev=&find_includePublicationAuthors=on&find_includ*. [Accessed 20 October 2013]

147. The Plant List [online], at available: http://www.theplantlist.org/tpl/search?q=astilbe. [Accessed 15 October 2013]

DANH MỤC CÁC PHỤ LỤC CỦA LUẬN ÁN

Trang

Phụ lục 1. Kết quả giám định tên khoa học 1

Phụ lục 2. Ảnh tiêu bản mẫu nghiên cứu 2

Phụ lục 3. Phổ của hợp chất SL-1 4

- UV, IR, ESI-MS, ^{1}H NMR, ^{13}C NMR, DEPT, COSY, HSQC, HMBC

Phụ lục 4. Phổ của hợp chất SL-2 12

- IR, ESI-MS, ^{1}H NMR, ^{13}C NMR, DEPT

Phụ lục 5. Phổ của hợp chất SL-3 16

- IR, ESI-MS, ^{1}H NMR, ^{13}C NMR, DEPT

Phụ lục 6. Phổ của hợp chất SL-4 21

- UV, IR, HR-ESI-MS, ^{1}H NMR, ^{13}C NMR, DEPT

Phụ lục 7. Phổ của hợp chất SL-5 [SR-8] 26

- UV, IR, ESI-MS, ^{1}H NMR, ^{13}C NMR, DEPT

Phụ lục 8. Phổ của hợp chất SL-6 31

- UV, IR, ESI-MS, ^{1}H NMR, ^{13}C NMR, DEPT

Phụ lục 9. Phổ của hợp chất SL-7 37

- UV, ESI-MS, ^{1}H NMR, ^{13}C NMR, DEPT

Phụ lục 10. Phổ của hợp chất SL-8 42

- UV, ESI-MS, ^{1}H NMR, ^{13}C NMR, DEPT

Phụ lục 11. Phổ của hợp chất SL-9 [SR-9] 47

- UV, IR, ESI-MS, ^{1}H NMR, ^{13}C NMR, DEPT

Phụ lục 12. Phổ của hợp chất SL-10 [SR-10] 53

- UV, IR, ESI-MS, ^{1}H NMR, ^{13}C NMR, DEPT, COSY, HSQC, HMBC

Phụ lục 13. Phổ của hợp chất SR-1 61

- ^{1}H NMR, ^{13}C NMR, COSY, NOESY, HMQC, HMBC

Phụ lục 14. Phổ của hợp chất SR-2 67

- HPLC, IR, HR-ESI-MS, ^{1}H NMR, ^{13}C NMR, COSY, NOESY, HMQC, HMBC

Phụ lục 15. Phổ của hợp chất SR-3 75

- ESI-MS, ^{1}H NMR, ^{13}C NMR

Phụ lục 16. Phổ của hợp chất SR-4 78

- UV, IR, ESI-MS, ^{1}H NMR, ^{13}C NMR

Phụ lục 17. Phổ của hợp chất SR-5 84

- ^{1}H NMR, ^{13}C NMR

Phụ lục 18. Phổ của hợp chất SR-6 87

- ESI-MS, ^{1}H NMR, ^{13}C NMR

Phụ lục 19. Phổ của hợp chất SR-7 91

- ESI-MS, ^{1}H NMR, ^{13}C NMR

Phụ lục 20. Kết quả đánh giá tác dụng sinh học của CDMĐLTP 95

PHỤ LỤC 1

KẾT QUẢ GIÁM ĐỊNH TÊN KHOA HỌC

VIỆN SINH THÁI VÀ
TÀI NGUYÊN SINH VẬT
PHÒNG THỰC VẬT

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập - Tự do - Hạnh phúc

Hà Nội, ngày 22 tháng 11 năm 2010

GIẤY XÁC NHẬN KẾT QUẢ GIÁM ĐỊNH

Kính gửi: Anh Phạm Quốc Tuấn, Cao đẳng Dược tỉnh Phú Thọ

Phòng Thực vật, Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật nhận được yêu cầu giám định mẫu tiêu bản thực vật của anh Phạm Quốc Tuấn ngày 18/11/2010. Phòng Thực vật đã thành lập nhóm giám định gồm:

1. TS. Dương Đức Huyến - Trưởng phòng, chuyên gia thực vật
2. ThS. Đỗ Văn Hài - Chuyên gia thực vật

Kết luận của nhóm sau khi giám định mẫu như sau:

- Mẫu cây do anh Phạm Quốc Tuấn chuyển cho Phòng Thực vật,
  - Số hiệu mẫu: Phạm Quốc Tuấn 001
  - Địa điểm thu: xã Bản Khoang, huyện Sa Pa, tỉnh Lào Cai
  - Ngày thu mẫu: 11/11/2010;

  có tên khoa học là ***Astilbe rivularis* (Buch.-Ham) ex D. Don** (tên Việt Nam: Lạc tân phụ), thuộc họ Tai hùm (Thường sơn) – SAXIFRAGACEAE.
- Mẫu cây nói trên hiện được lưu giữ tại Phòng TB Thực vật, Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật, 18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội.

Phòng Thực vật xin gửi tới anh Phạm Quốc Tuấn kết quả giám định trên.

Trưởng nhóm giám định

Nơi nhận:
- Như trên
- Lưu PTV

Dương Đức Huyến

VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT
XÁC NHẬN

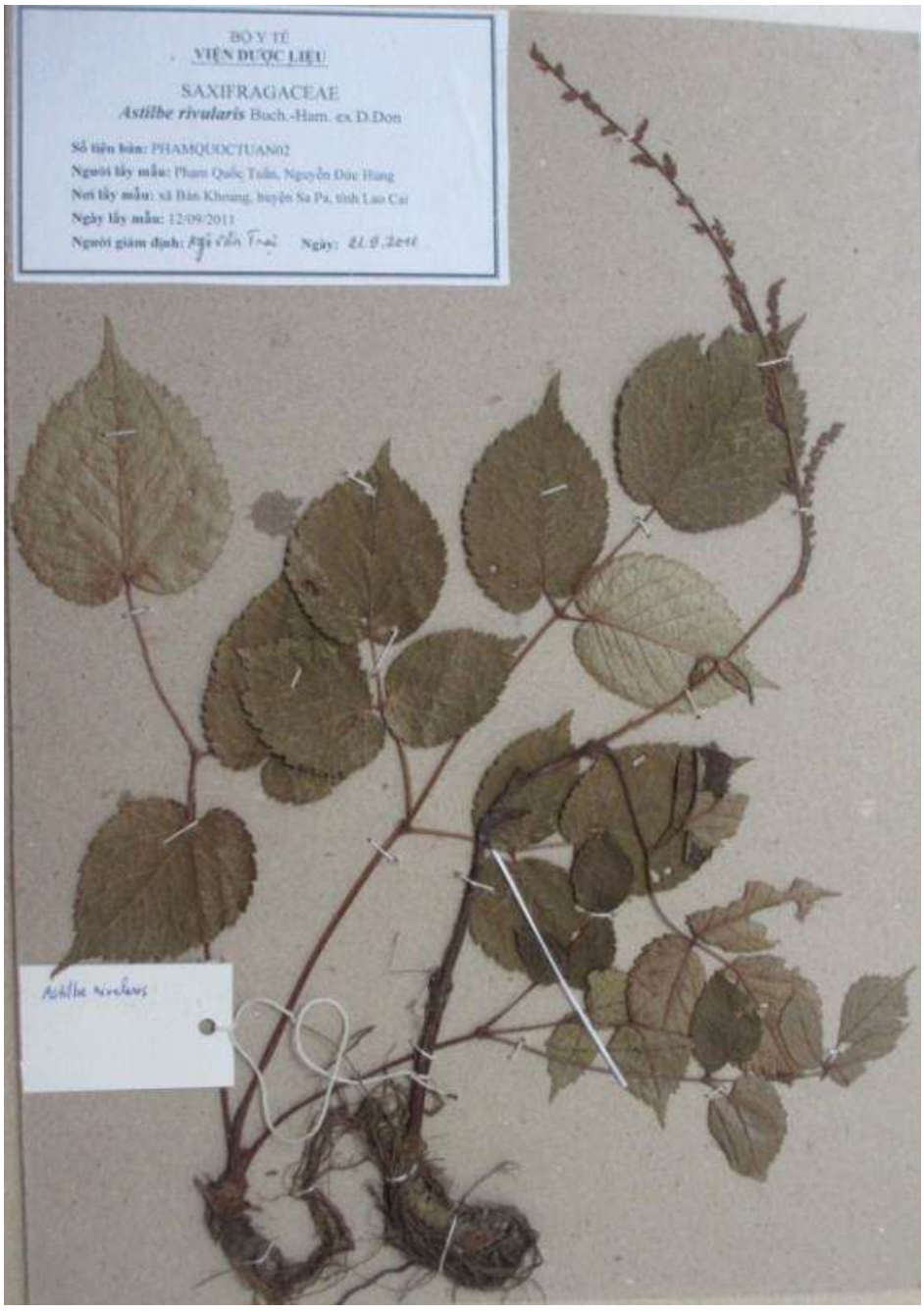
PHÓ VIỆN TRƯỞNG

VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT

Trần Huy Thái

PHỤ LỤC 2
ẢNH TIÊU BẢN MẪU NGHIÊN CỨU

TIÊU BẢN CÂY LẠC TÂN PHỤ MANG QUẢ THU HÁI NGÀY 11/11/2010 TẠI SA PA



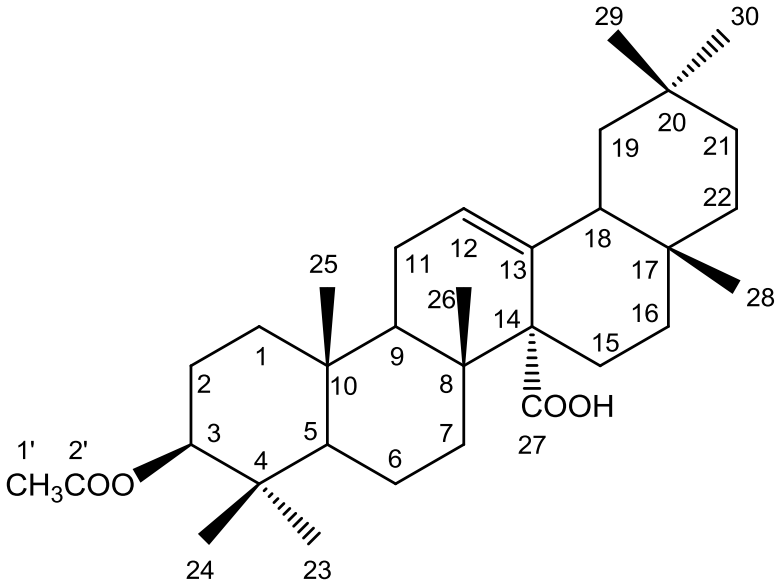
TIÊU BẢN CÂY LẠC TÂN PHỤ MANG HOA THU HÁI NGÀY 12/09/2011 TẠI SA PA

PHỤ LỤC 3

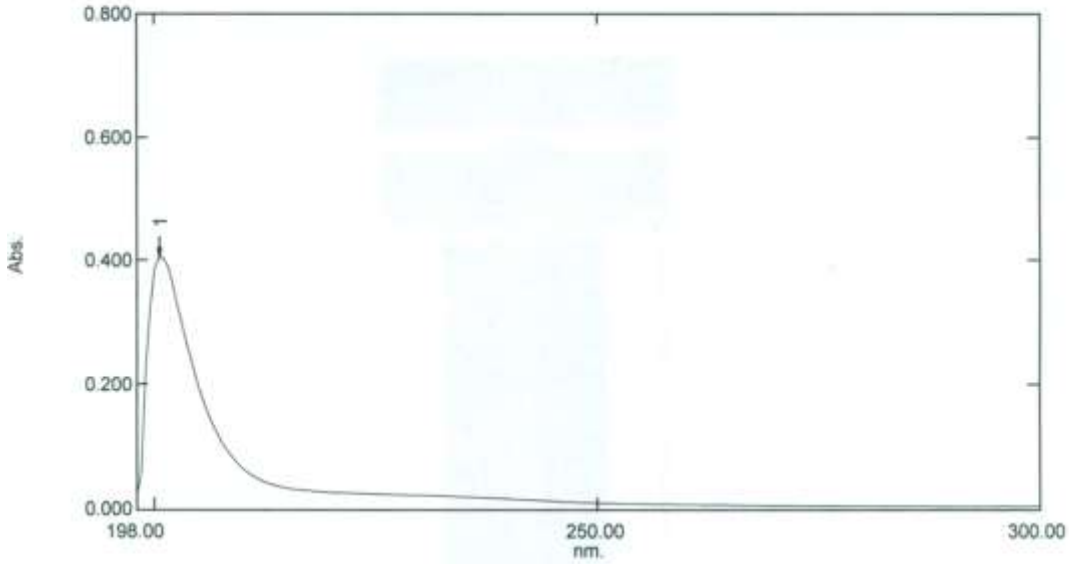
PHỔ CỦA HỢP CHẤT SL-1

(ACID 3β-ACETOXYOLEAN-12-EN-27-OIC)

- **UV**
- **IR**
- **ESI-MS**
- **^{1}H NMR**
- **^{13}C NMR**
- **DEPT**
- **COSY**
- **HSQC**
- **HMBC**



PHỔ UV (MeOH)



[Measurement Properties]

Wavelength Range (nm.):	190.00 to 800.00
Scan Speed:	Fast
Sampling Interval:	0.5
Auto Sampling Interval:	Enabled
Scan Mode:	Single

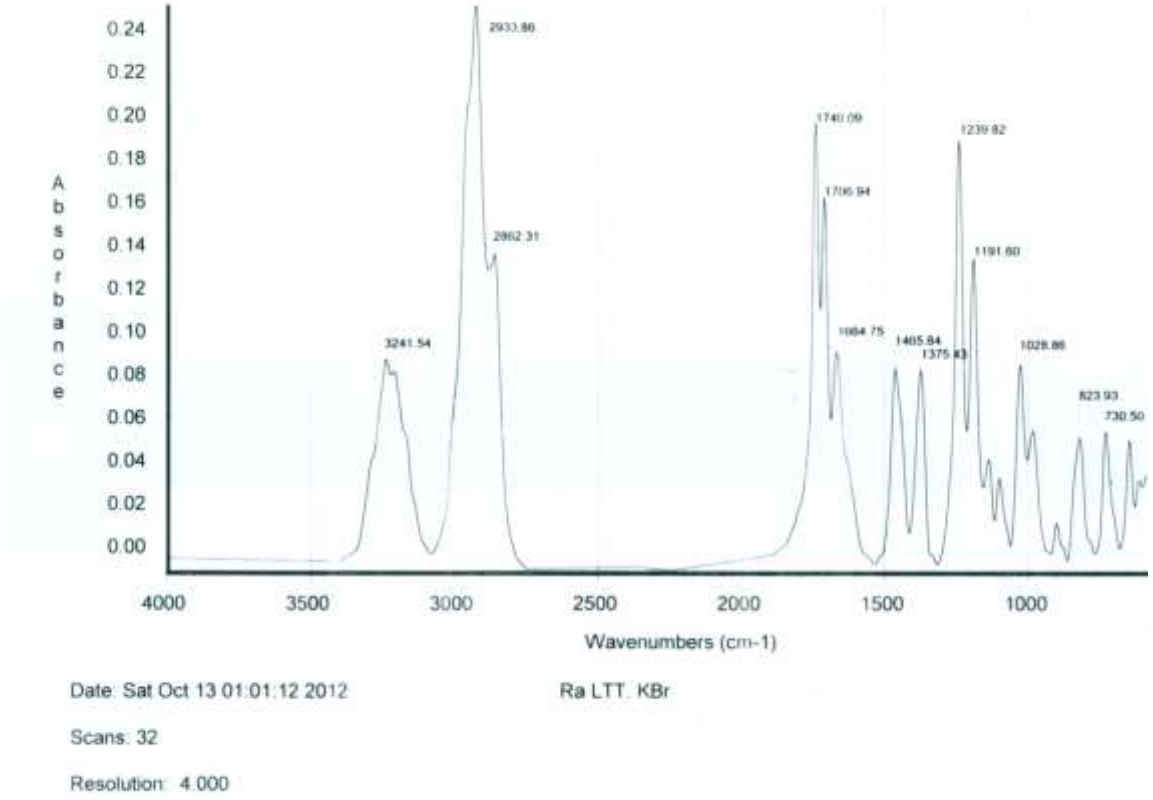
[Instrument Properties]

Instrument Type:	UV-1800 Series
Measuring Mode:	Absorbance
Slit Width:	1.0 nm
Light Source Change Wavelength:	340.0 nm
S/R Exchange:	Normal

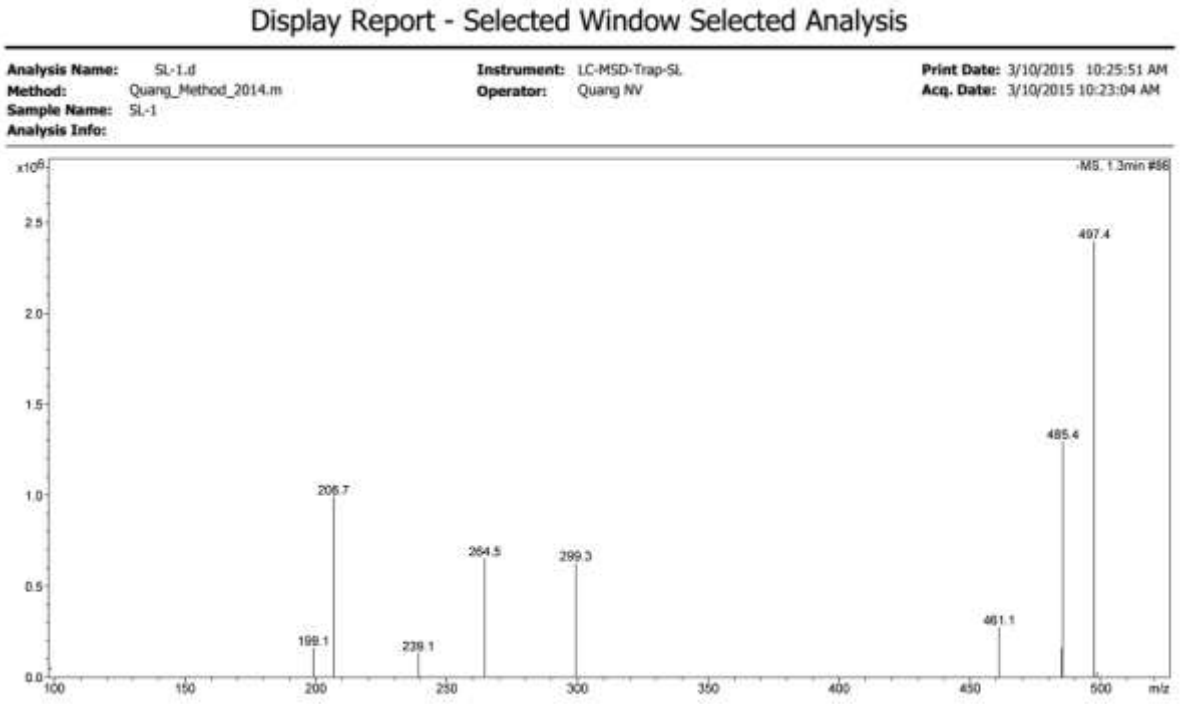
.....

No.	P/V	Wavelength	Abs.	Description
1		200.50	0.404	

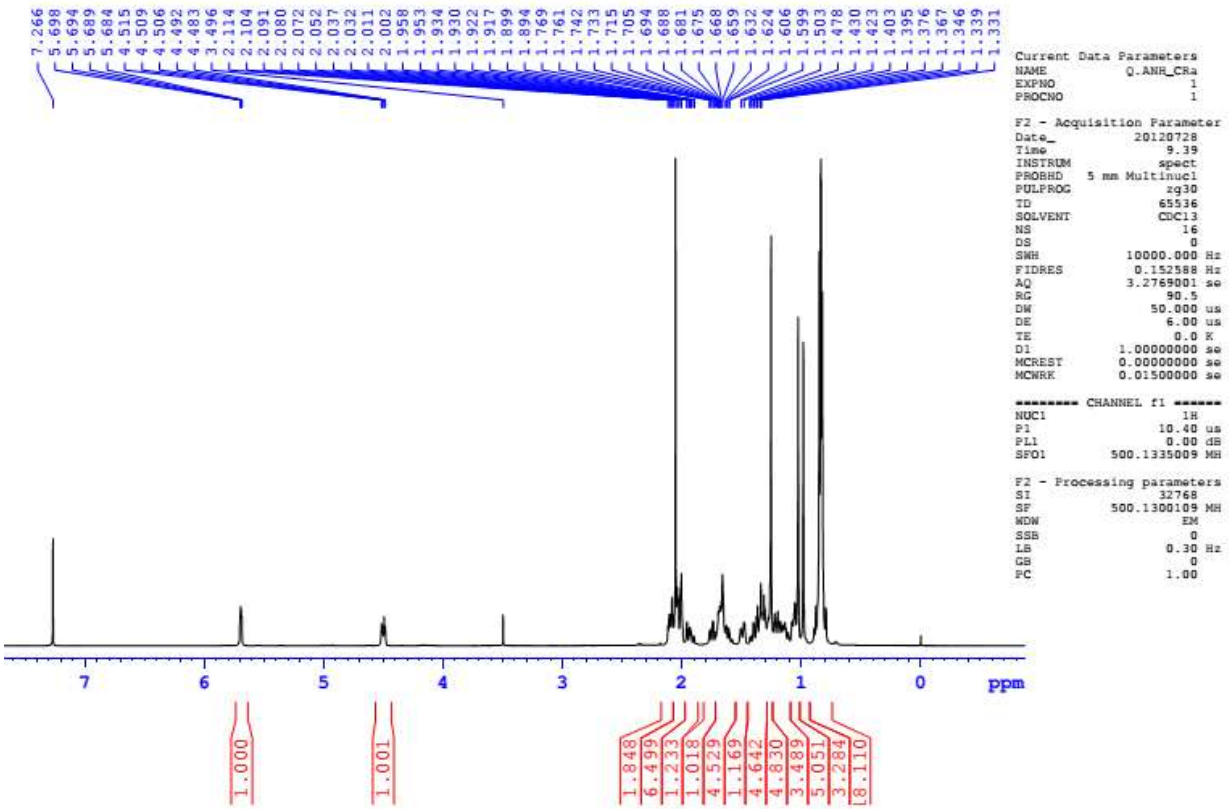
PHỔ IR

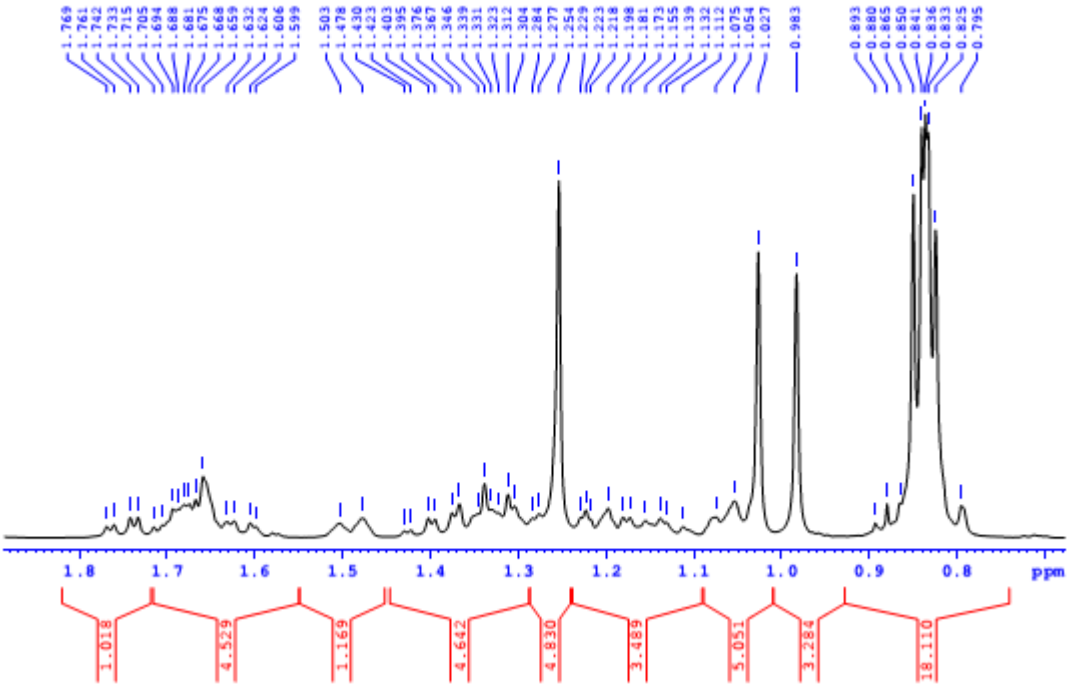


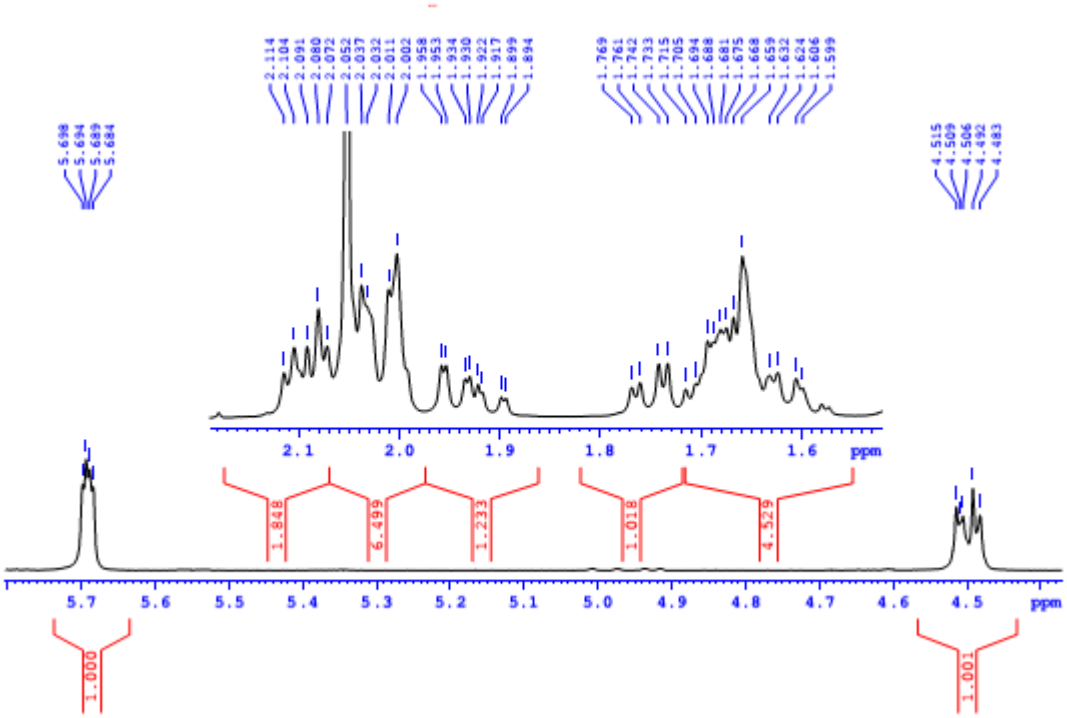
PHỔ ESI-MS



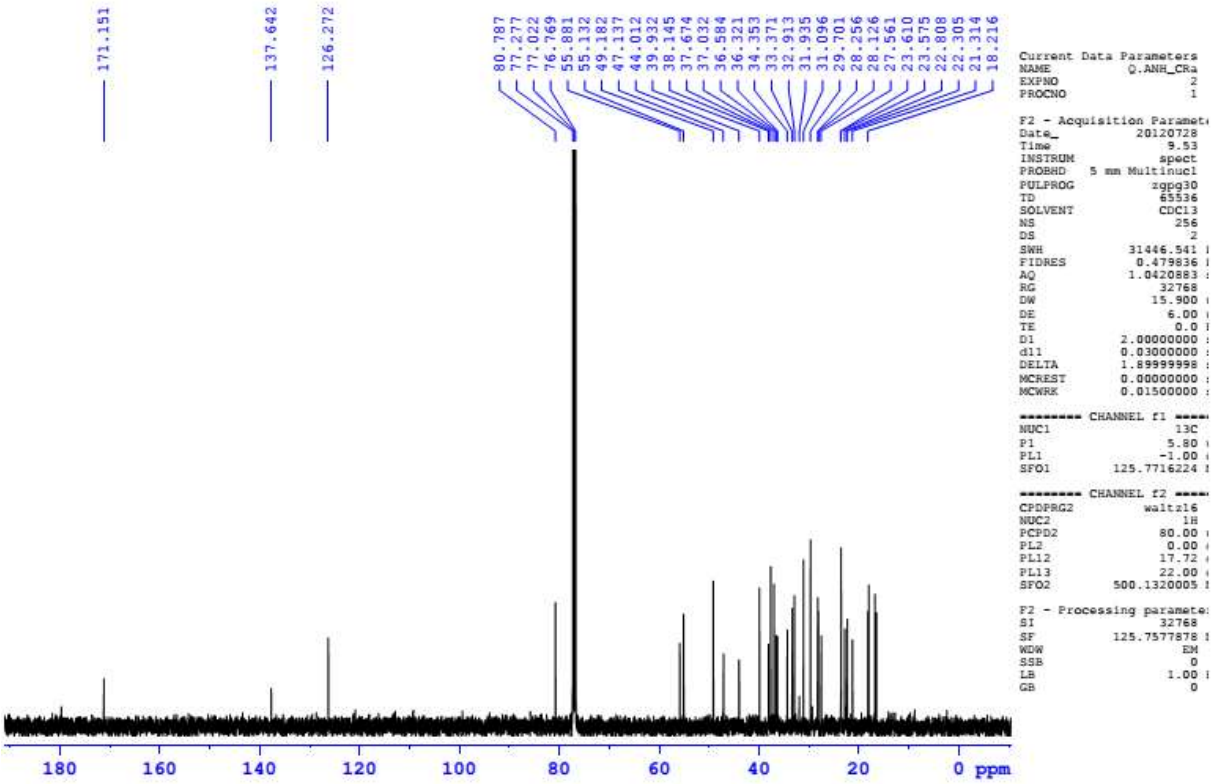
PHỔ ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$)

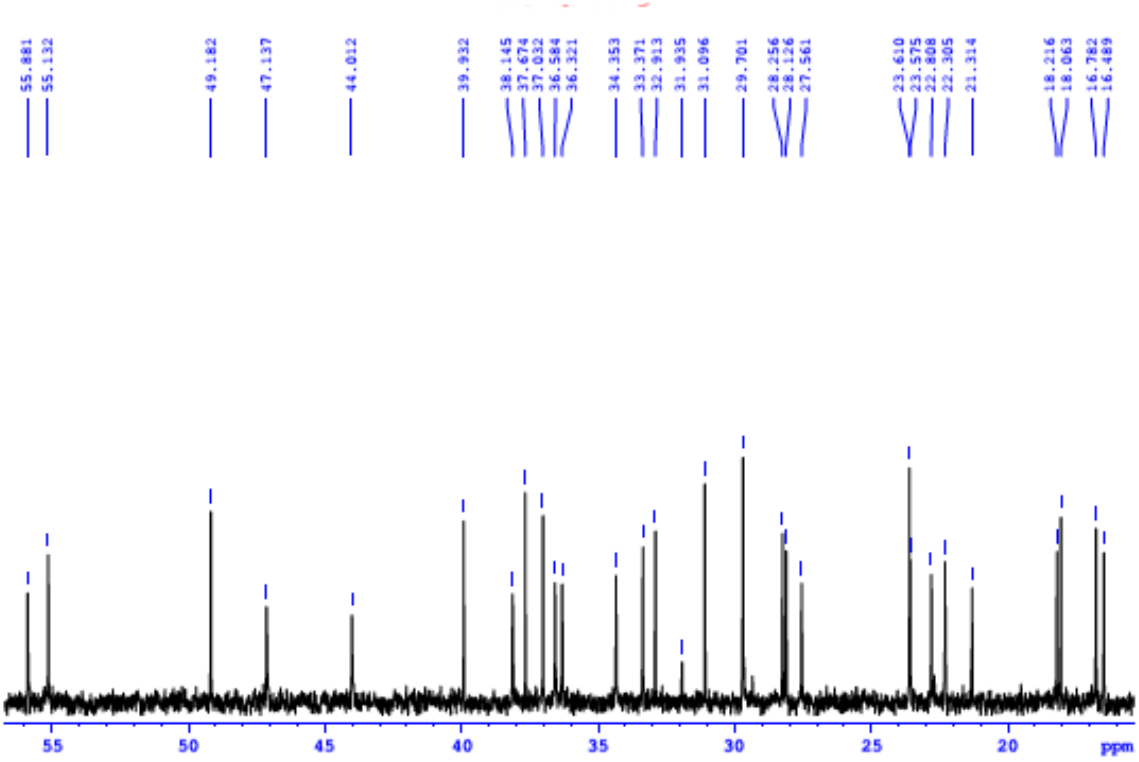




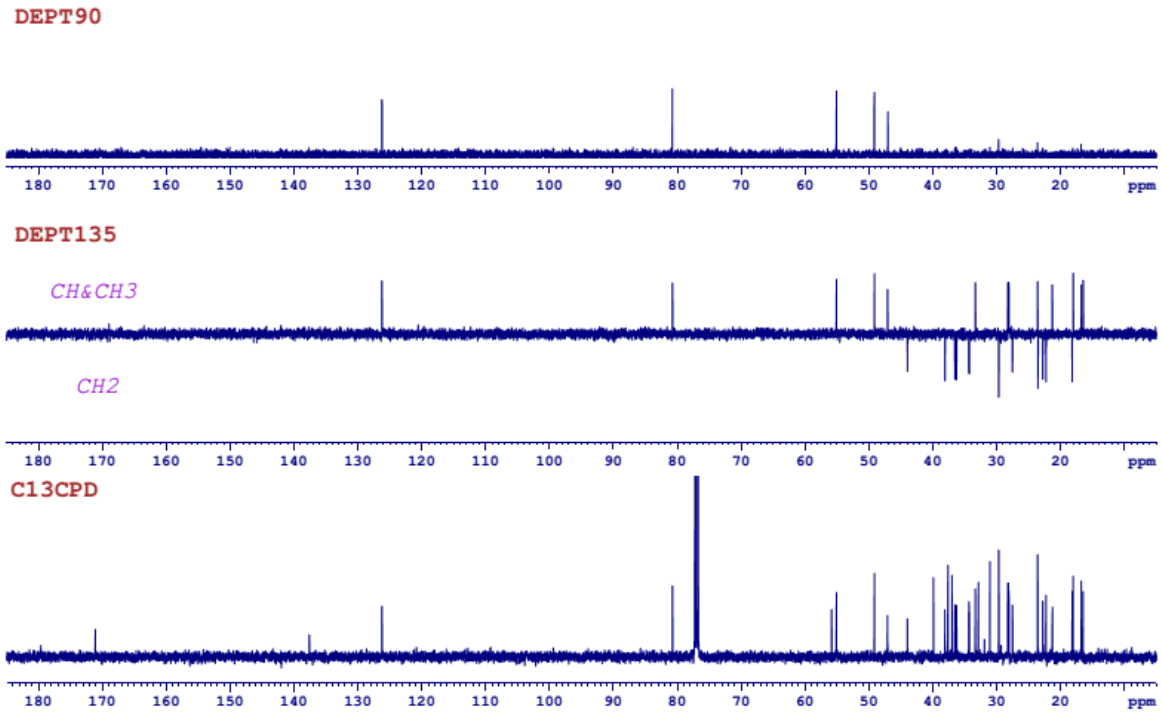


PHỔ ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$)

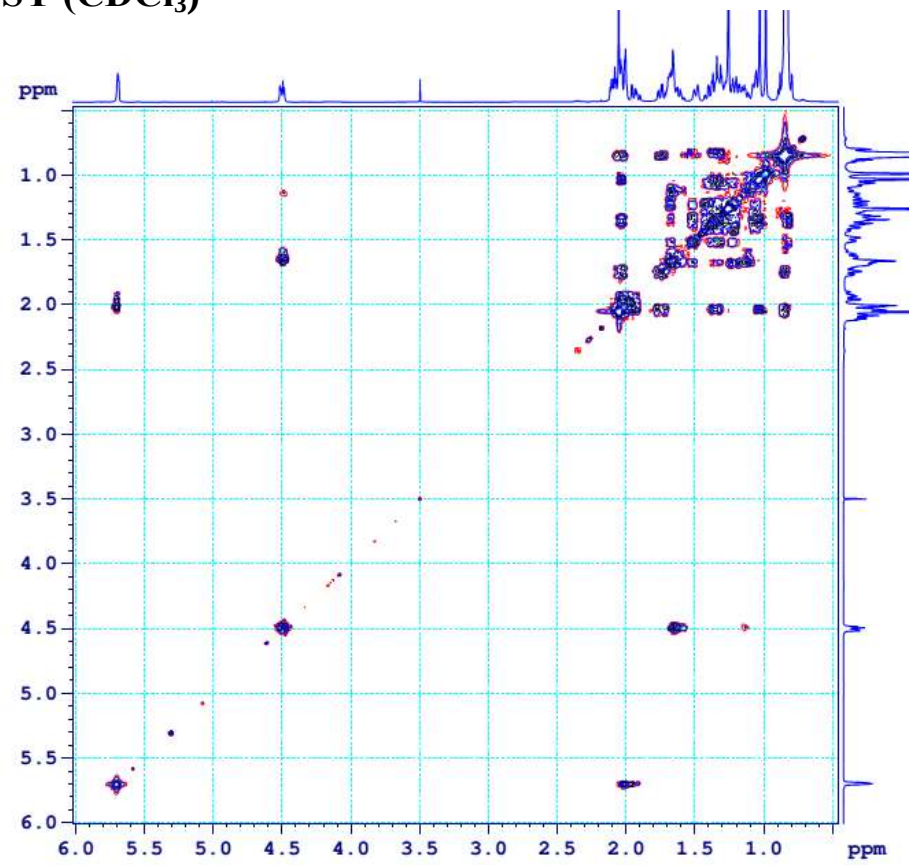




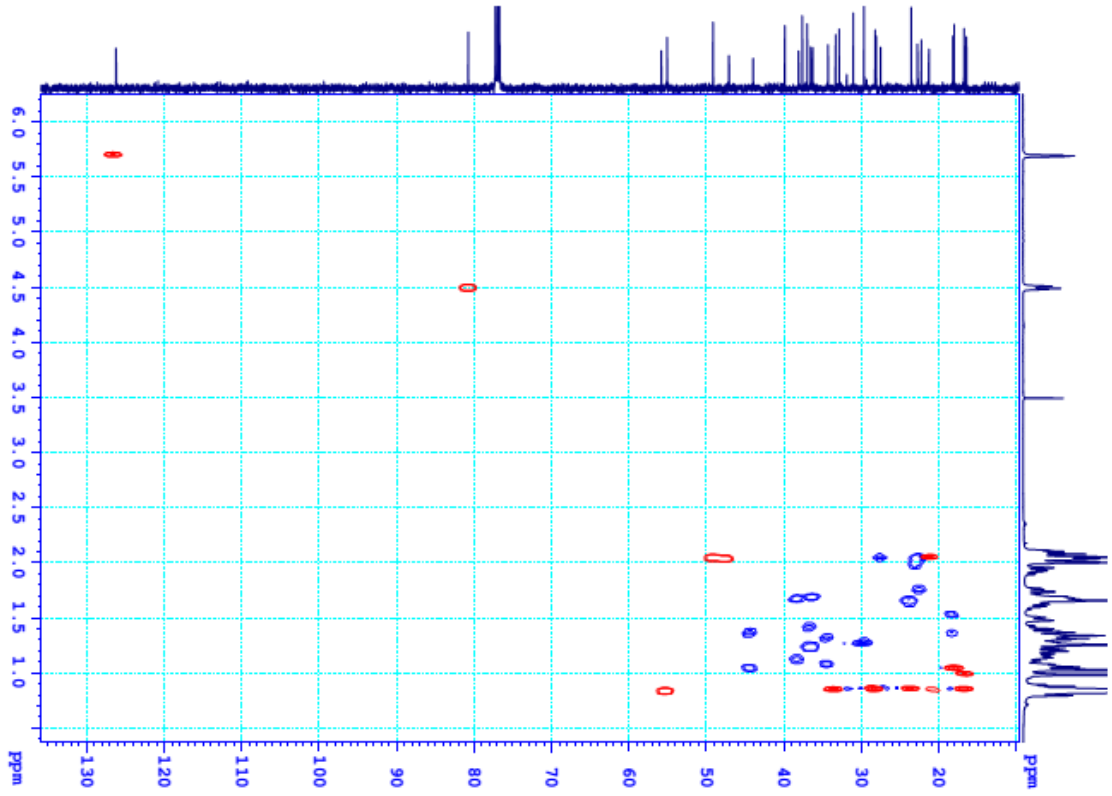
PHỔ DEPT ($CDCl_3$)



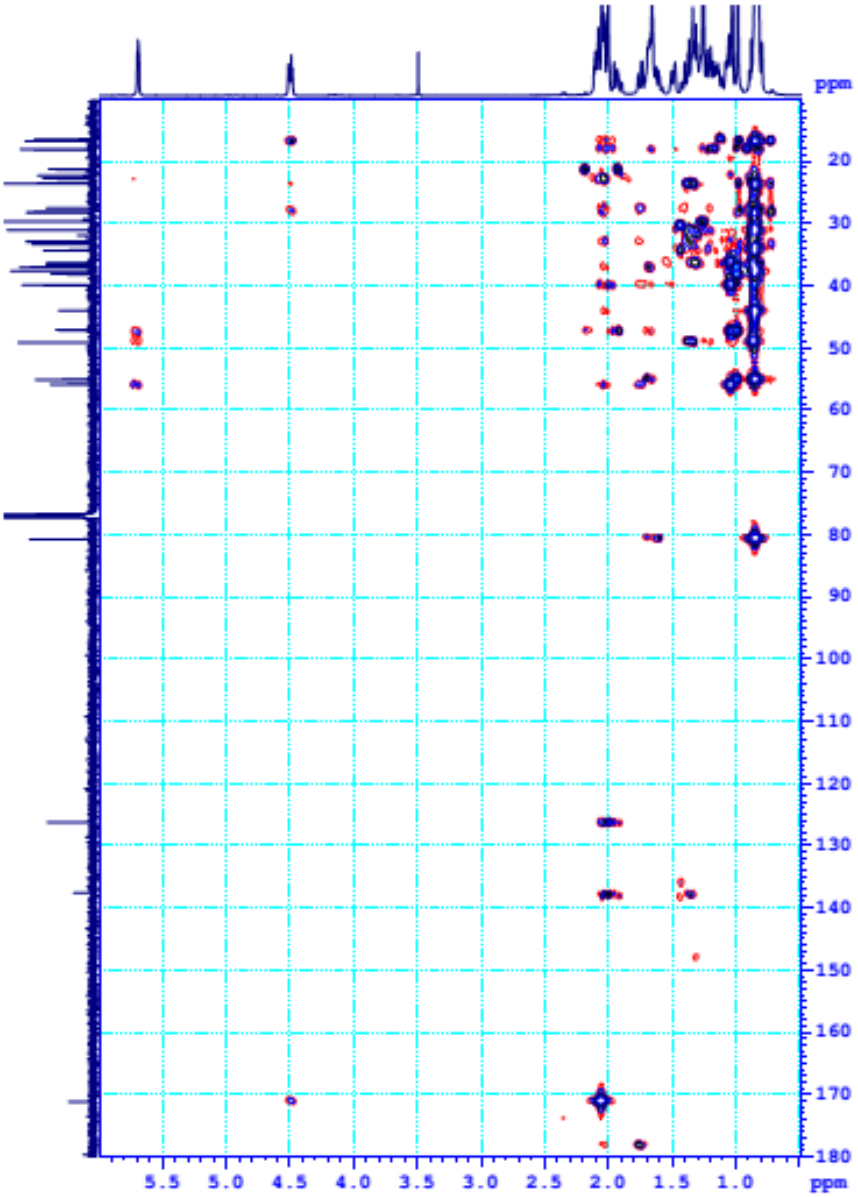
PHỔ COSY ($CDCl_3$)



PHỔ HSQC ($CDCl_3$)



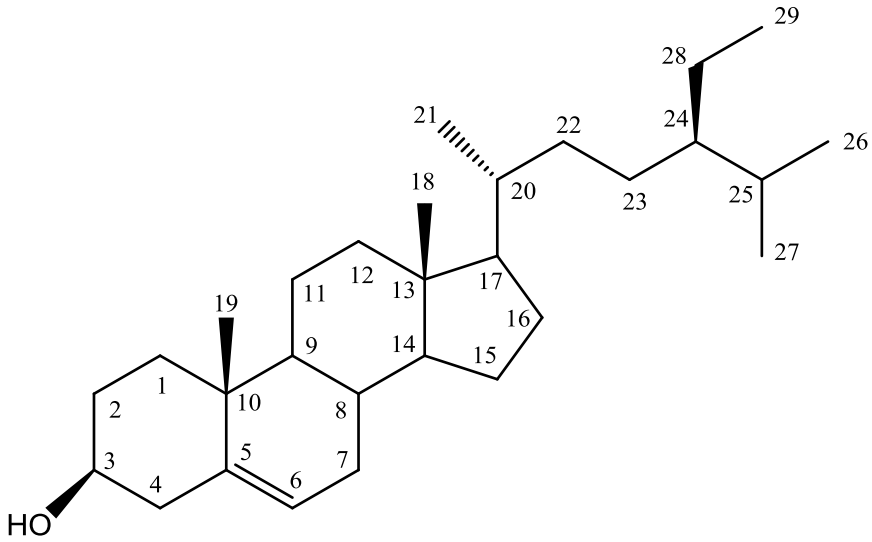
PHỔ HMBC ($CDCl_3$)



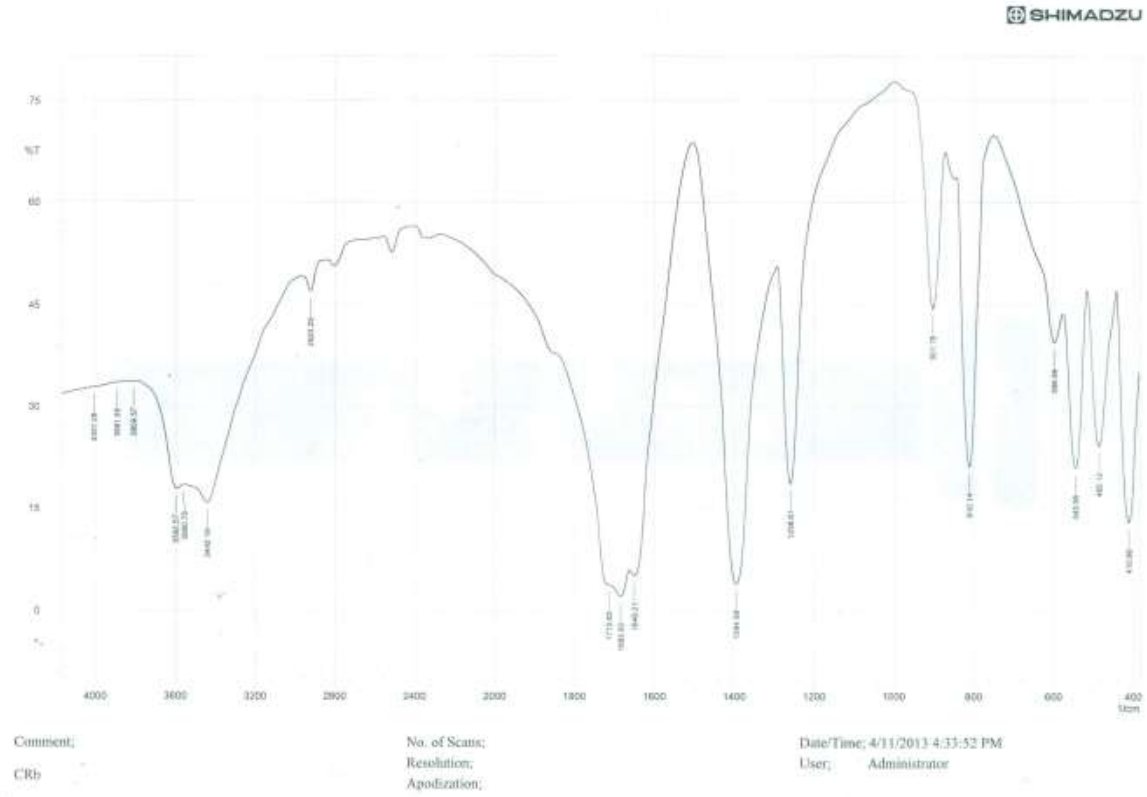
PHỤ LỤC 4

PHỔ CỦA HỢP CHẤT SL-2 (*β*-SITOSTEROL)

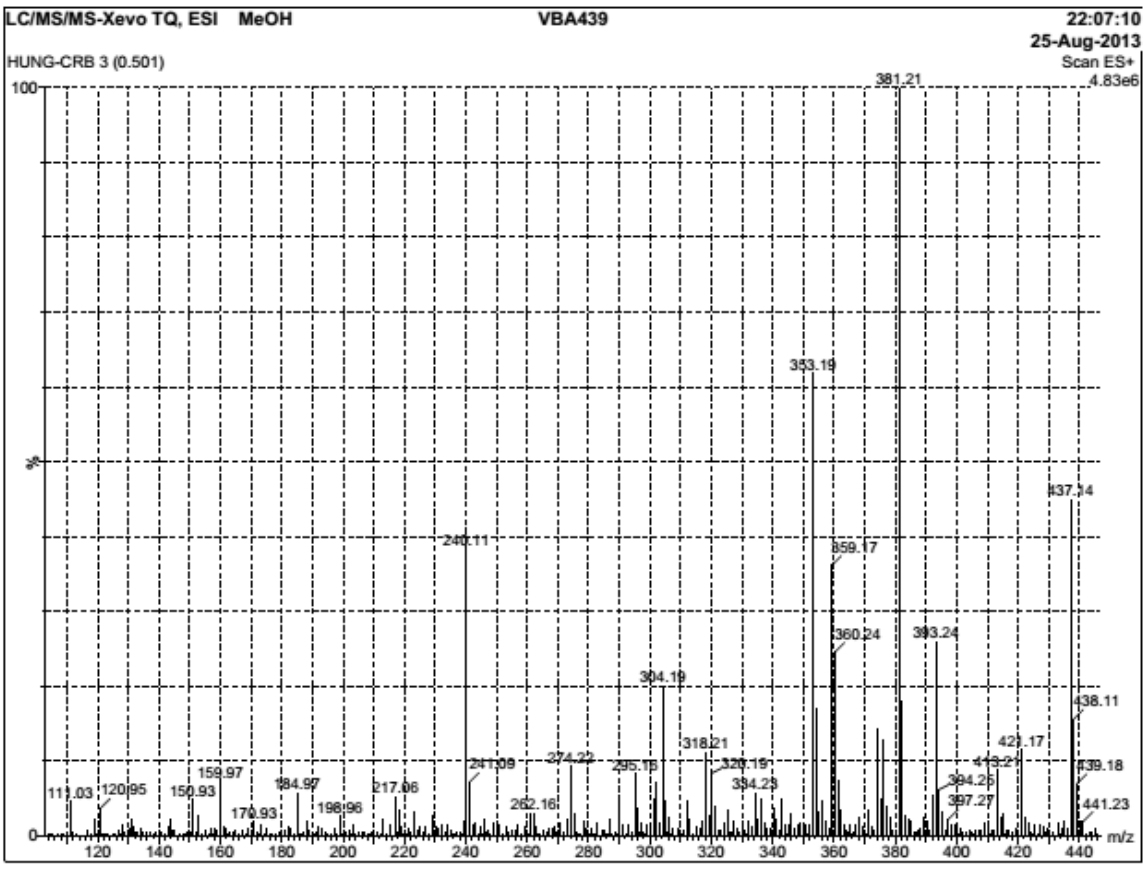
- **IR**
- **ESI-MS**
- **^{1}H NMR**
- **^{13}C NMR**
- **DEPT**



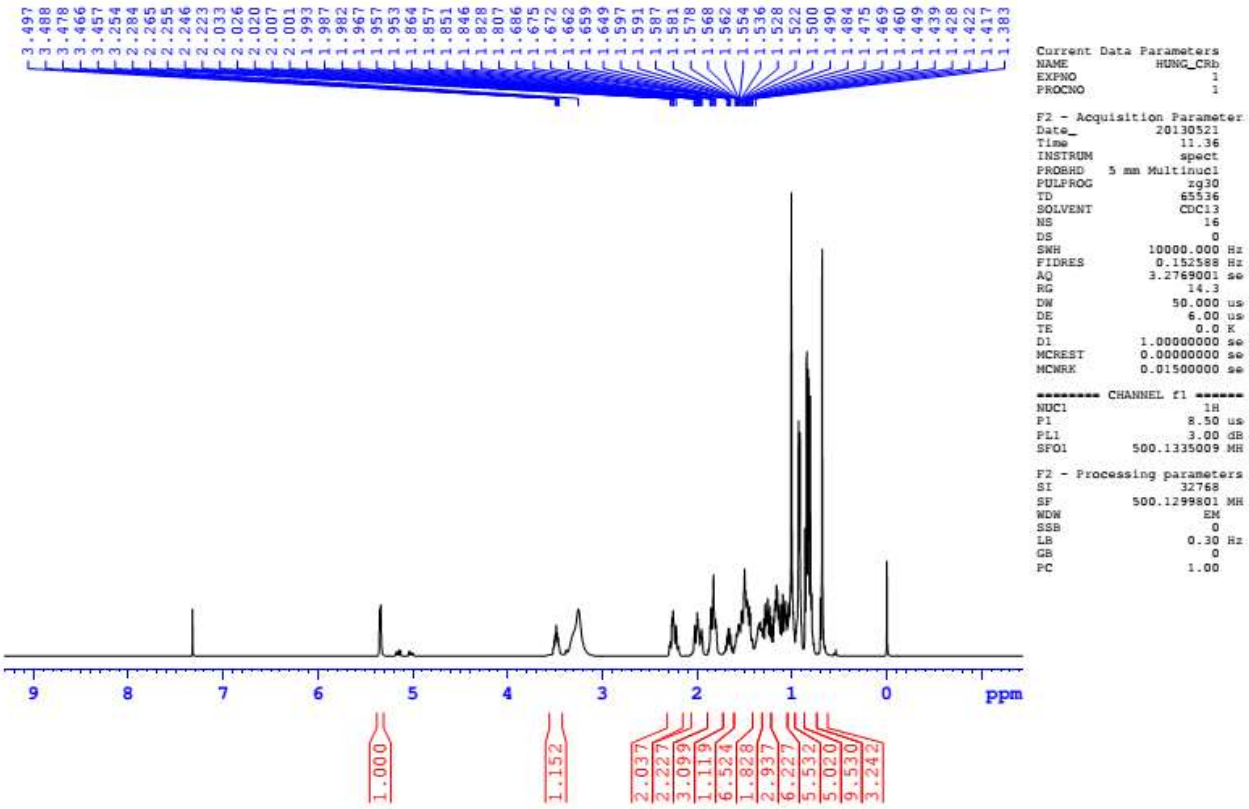
PHỔ IR

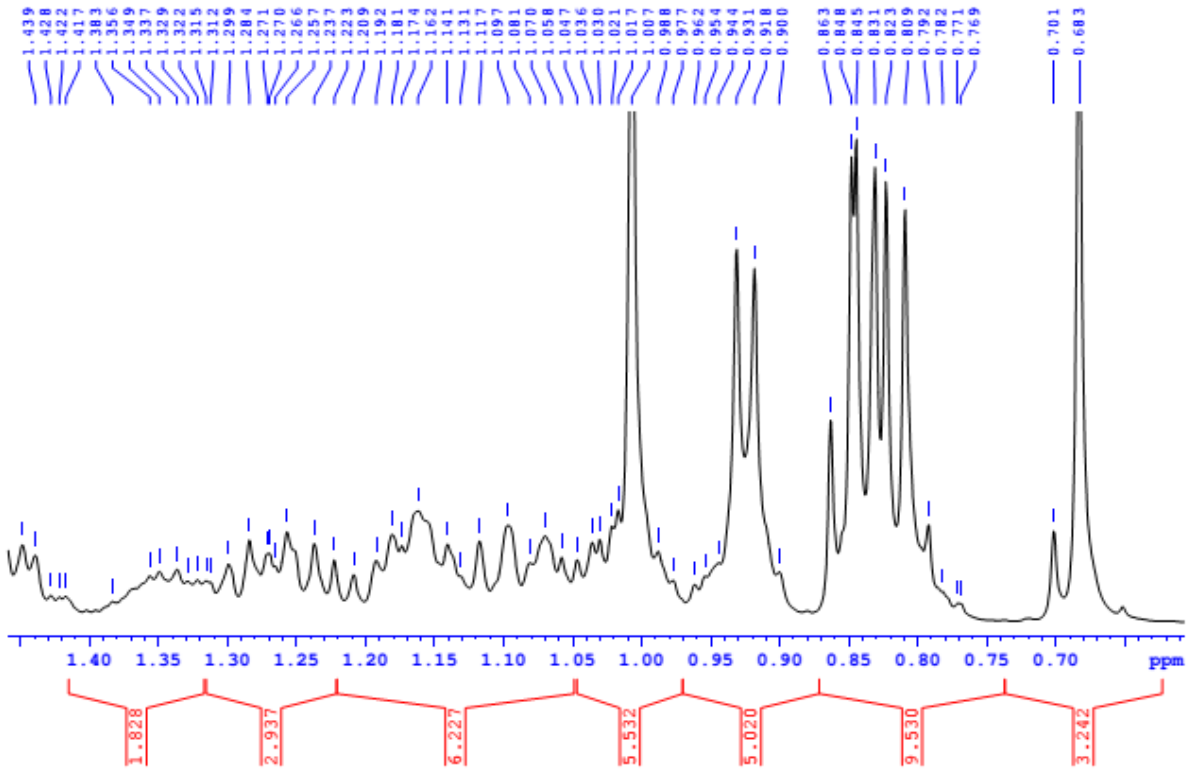


PHỔ ESI-MS

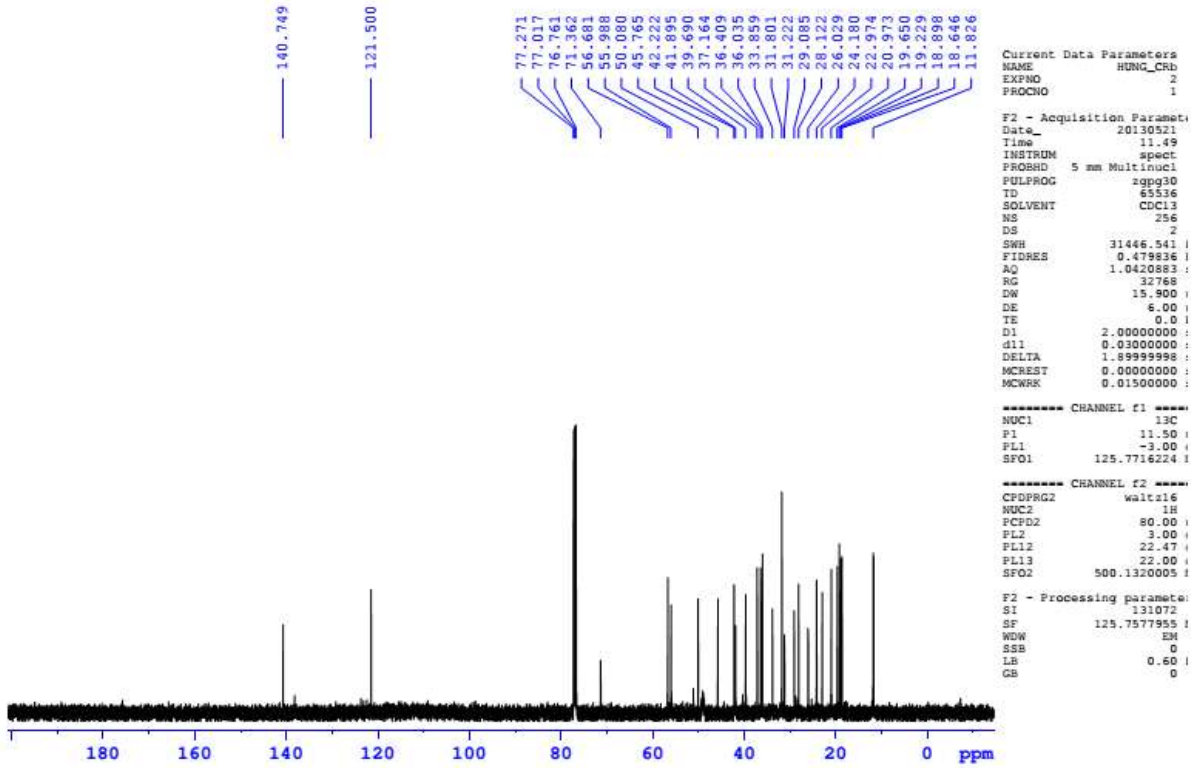


PHỔ ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$)

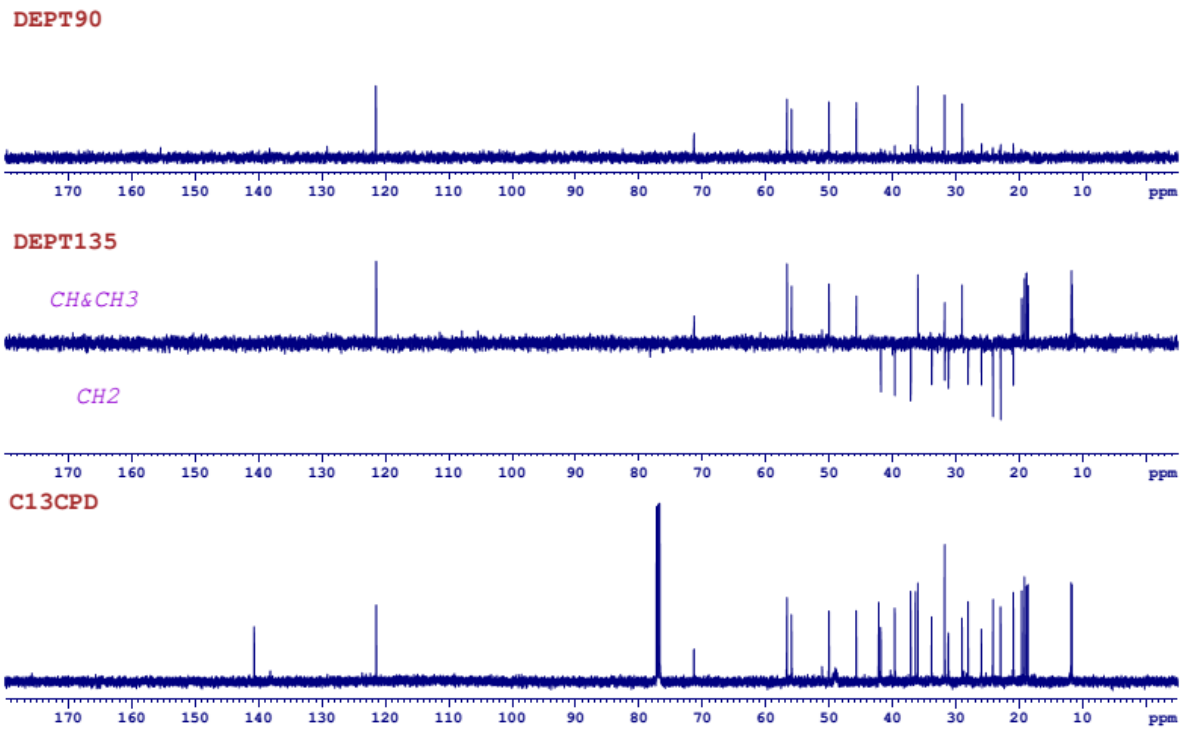




PHỔ ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$)



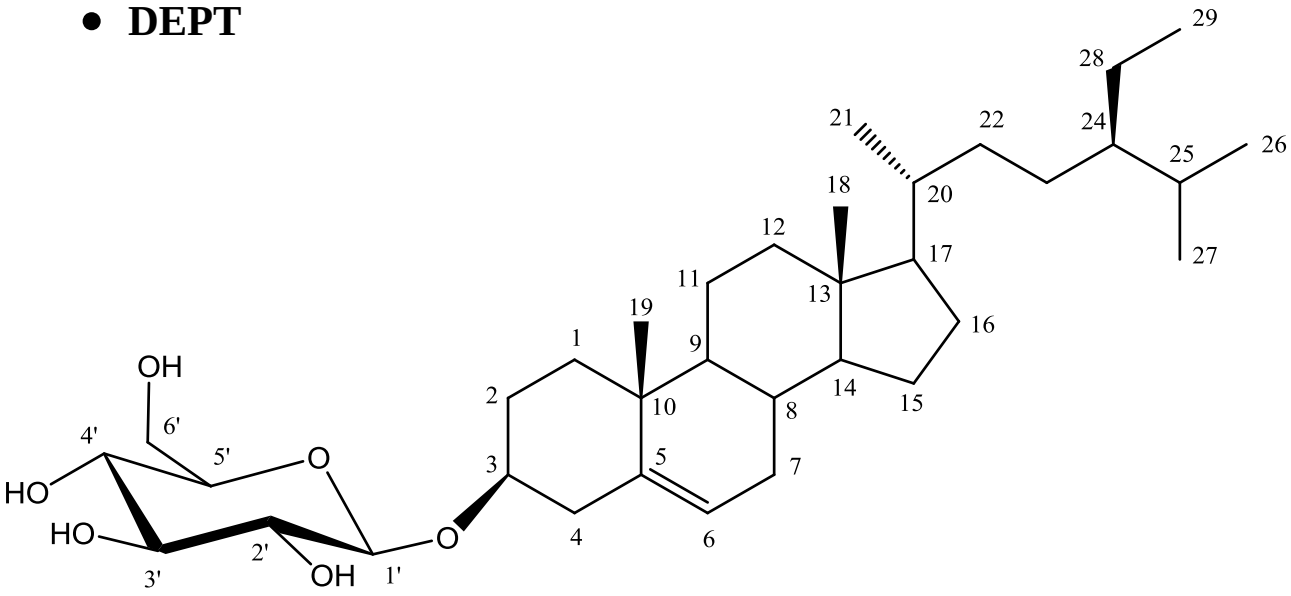
PHỔ DEPT ($CDCl_3$)



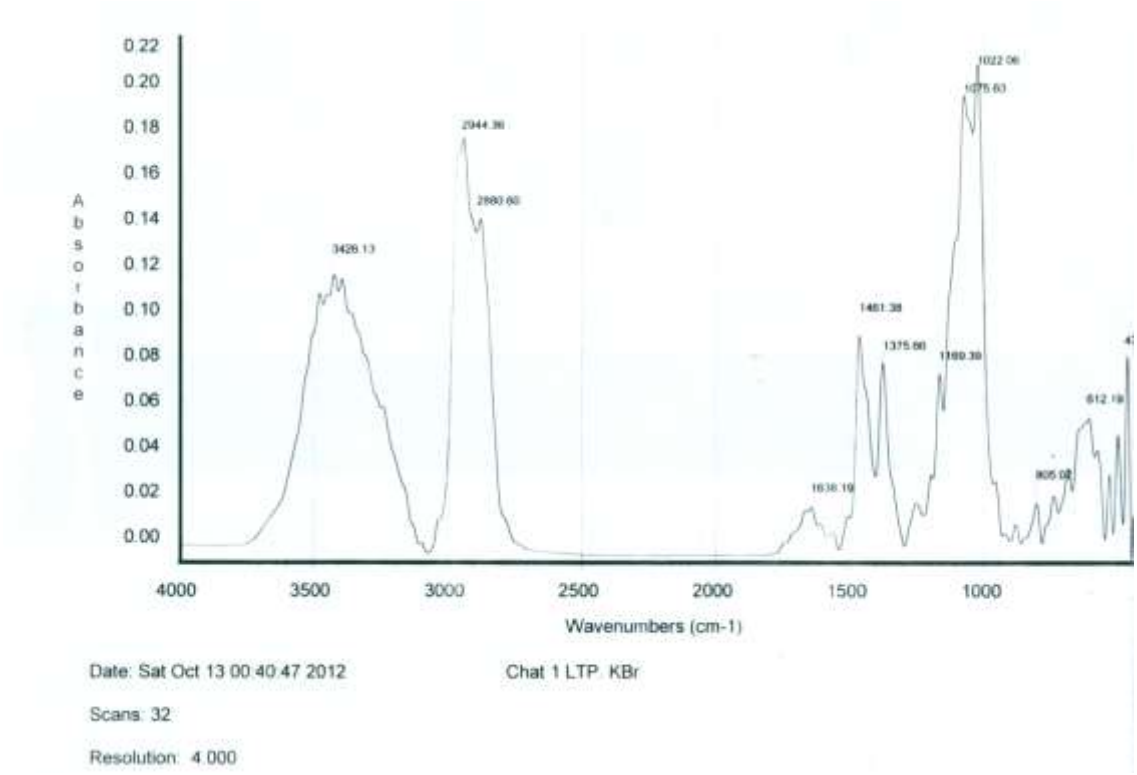
PHỤ LỤC 5

PHỔ CỦA HỢP CHẤT SL-3 (DAUCOSTEROL)

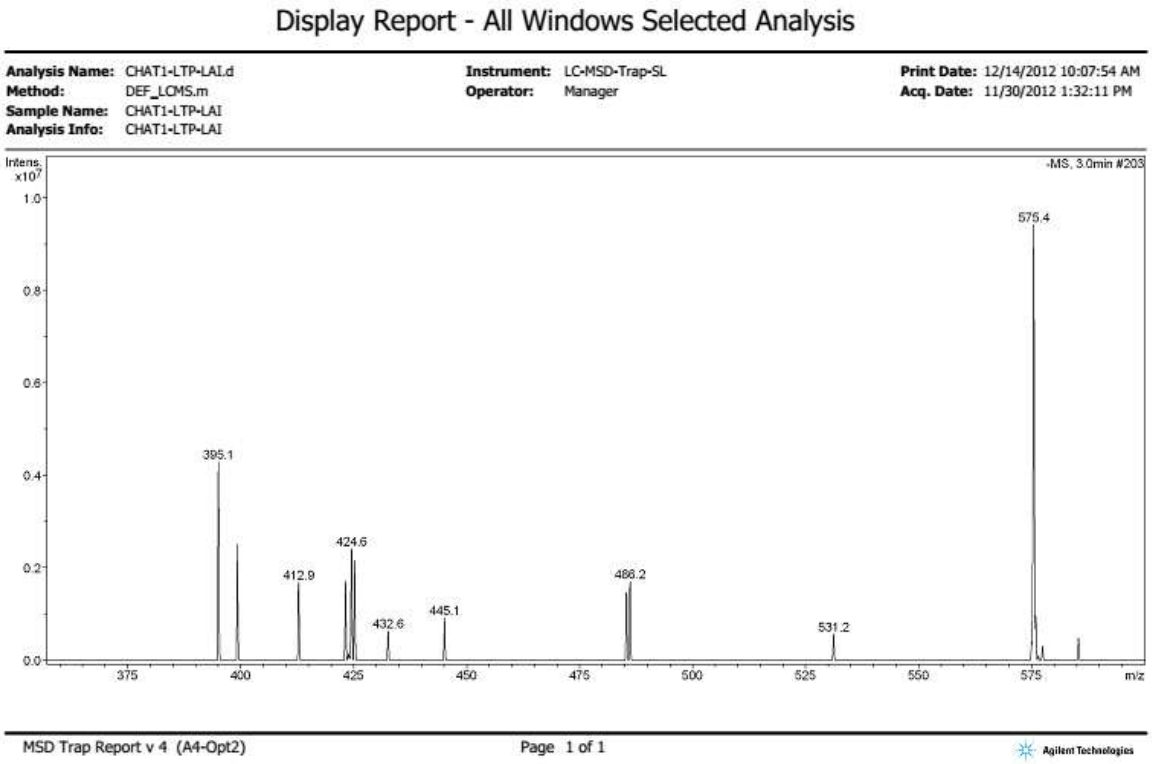
- **IR**
- **ESI-MS**
- **^{1}H NMR**
- **^{13}C NMR**
- **DEPT**



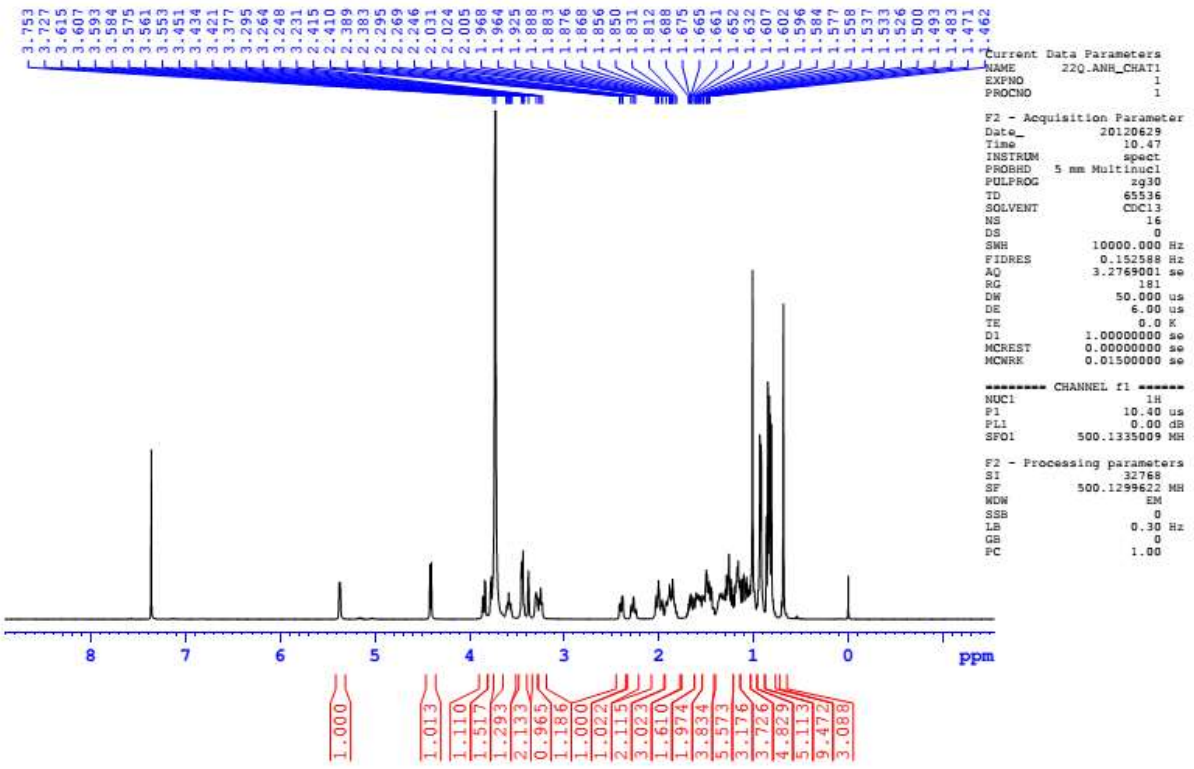
PHỔ IR

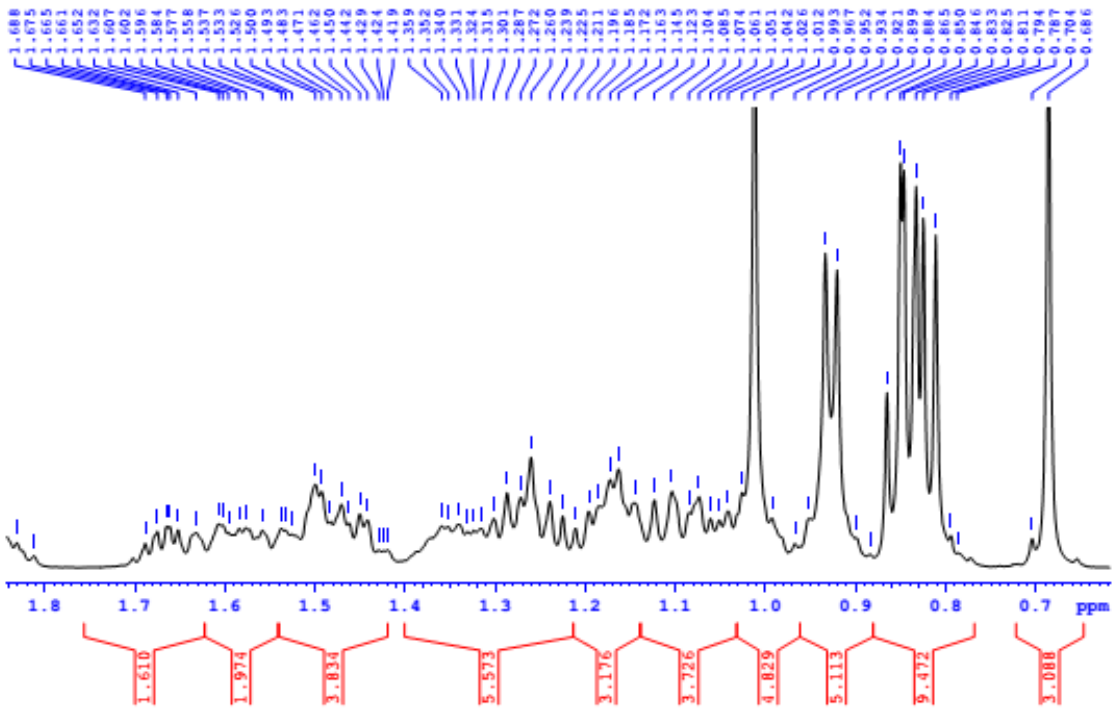


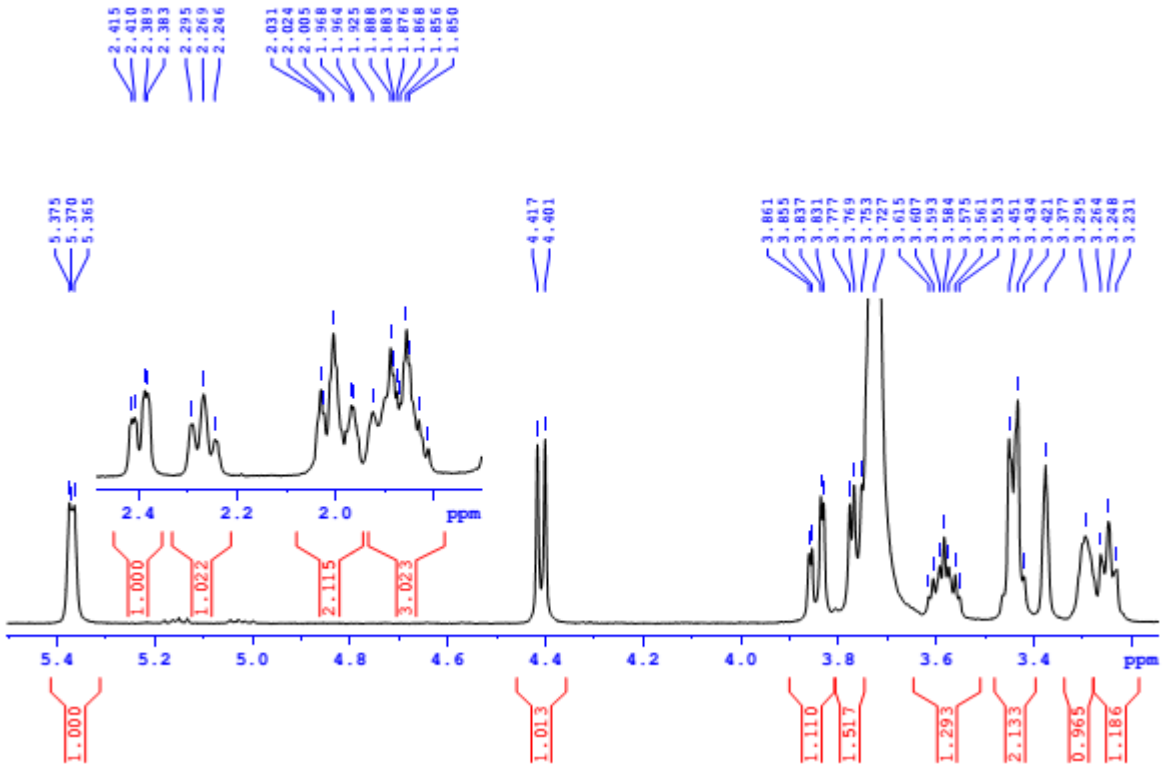
PHỔ ESI-MS



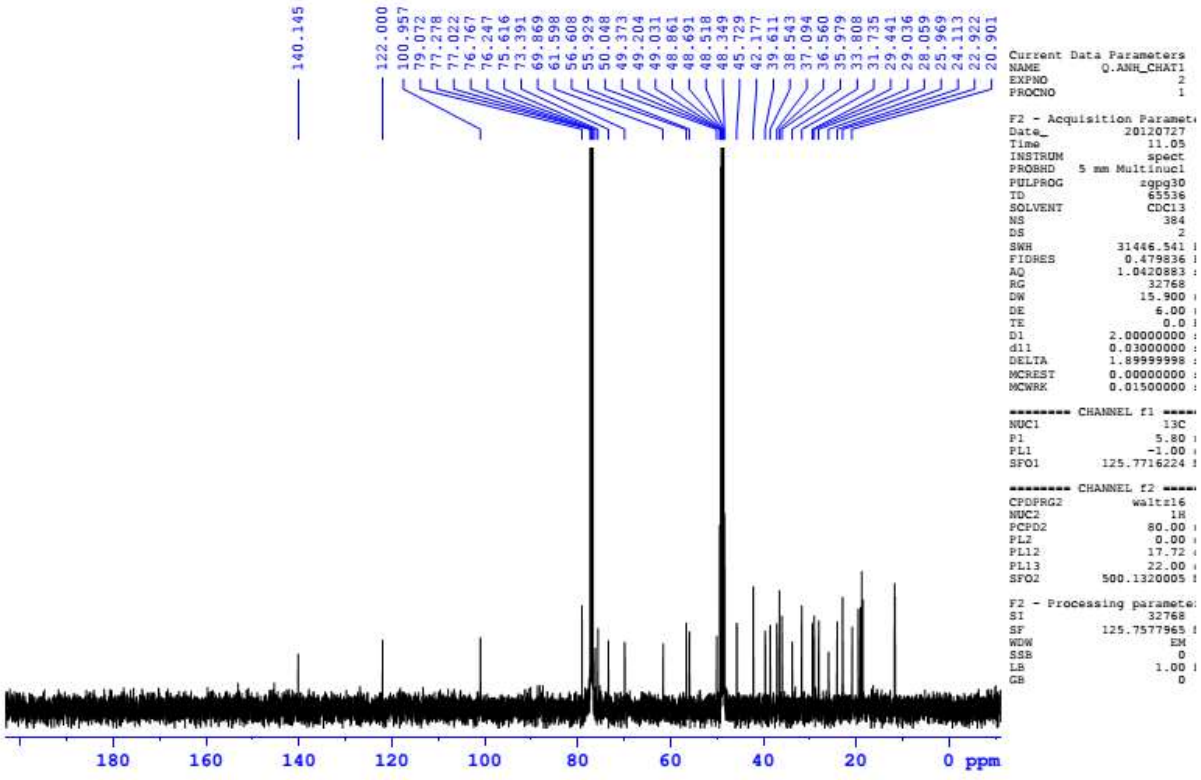
PHỔ ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$-CD_3OD)



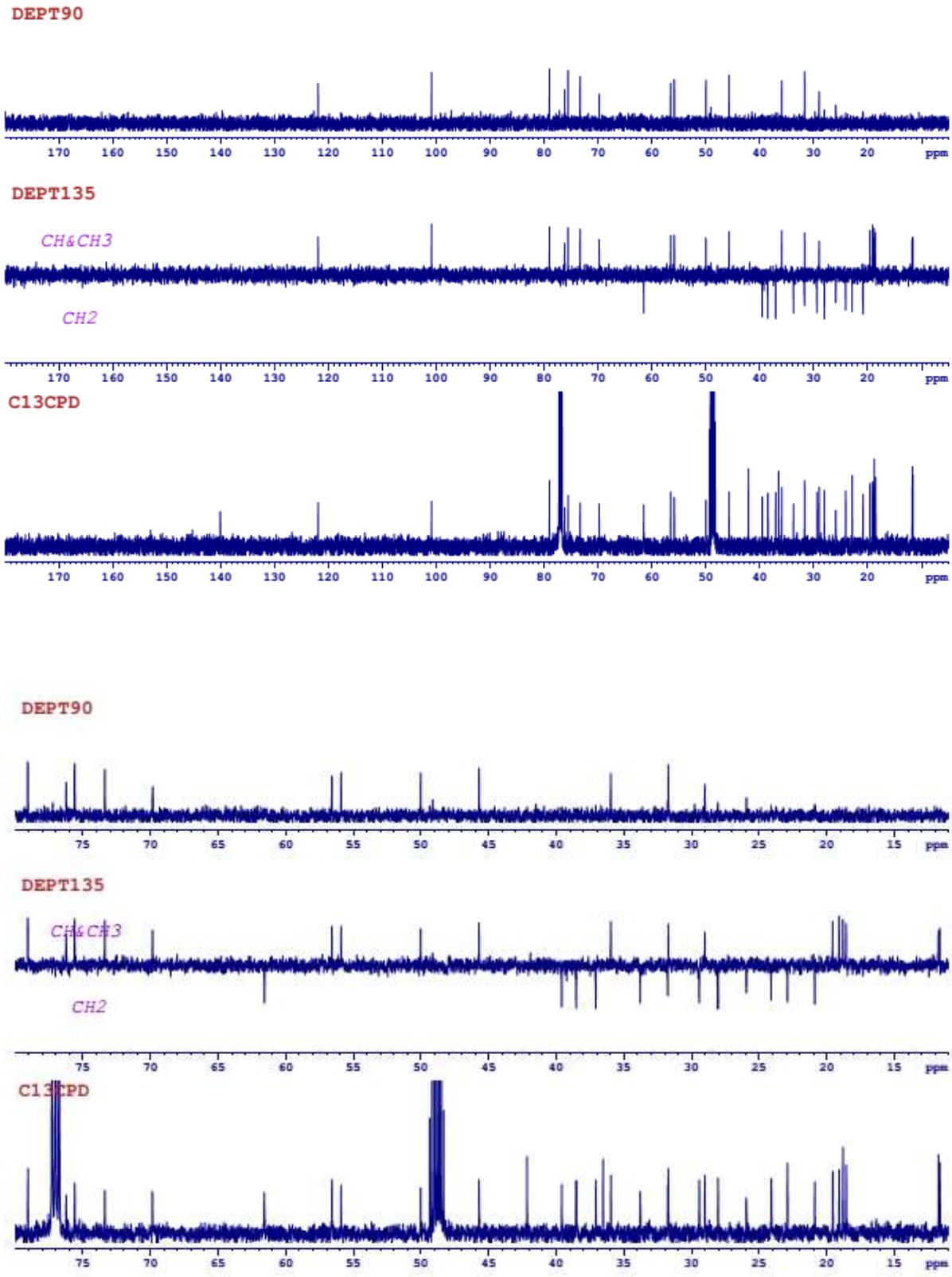




PHỔ ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$-CD_3OD)



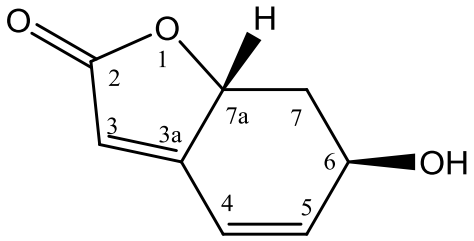
PHỔ DEPT ($CDCl_3$-CD_3OD)



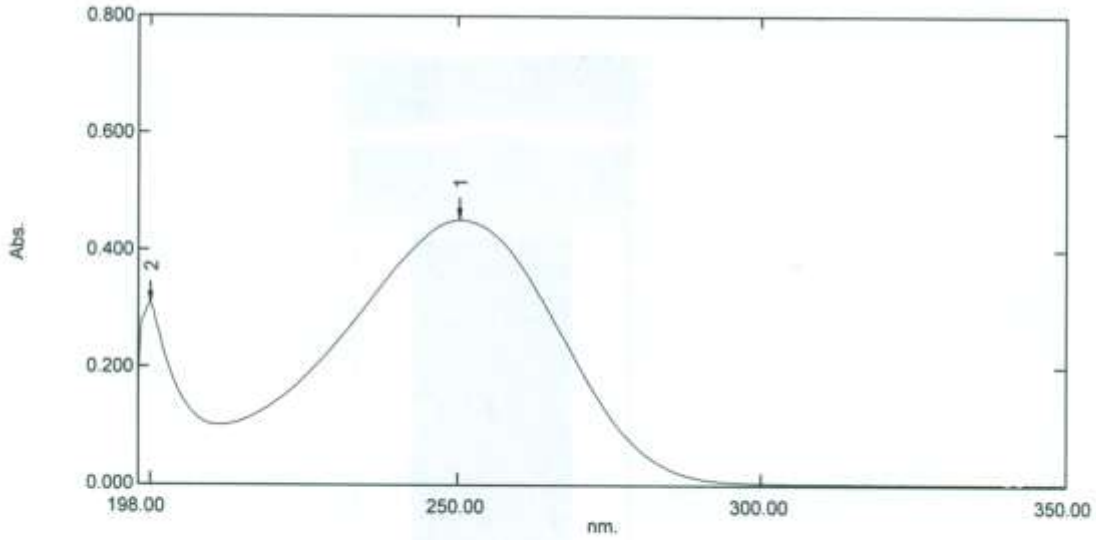
PHỤ LỤC 6

PHỔ CỦA HỢP CHẤT SL-4 (AQUILEGIOLID)

- **UV**
- **IR**
- **HR-ESI-MS**
- **^{1}H NMR**
- **^{13}C NMR**
- **DEPT**



PHỔ UV (MeOH)



[Measurement Properties]

Wavelength Range (nm.):	190.00 to 800.00
Scan Speed:	Fast
Sampling Interval:	0.5
Auto Sampling Interval:	Enabled
Scan Mode:	Single

[Instrument Properties]

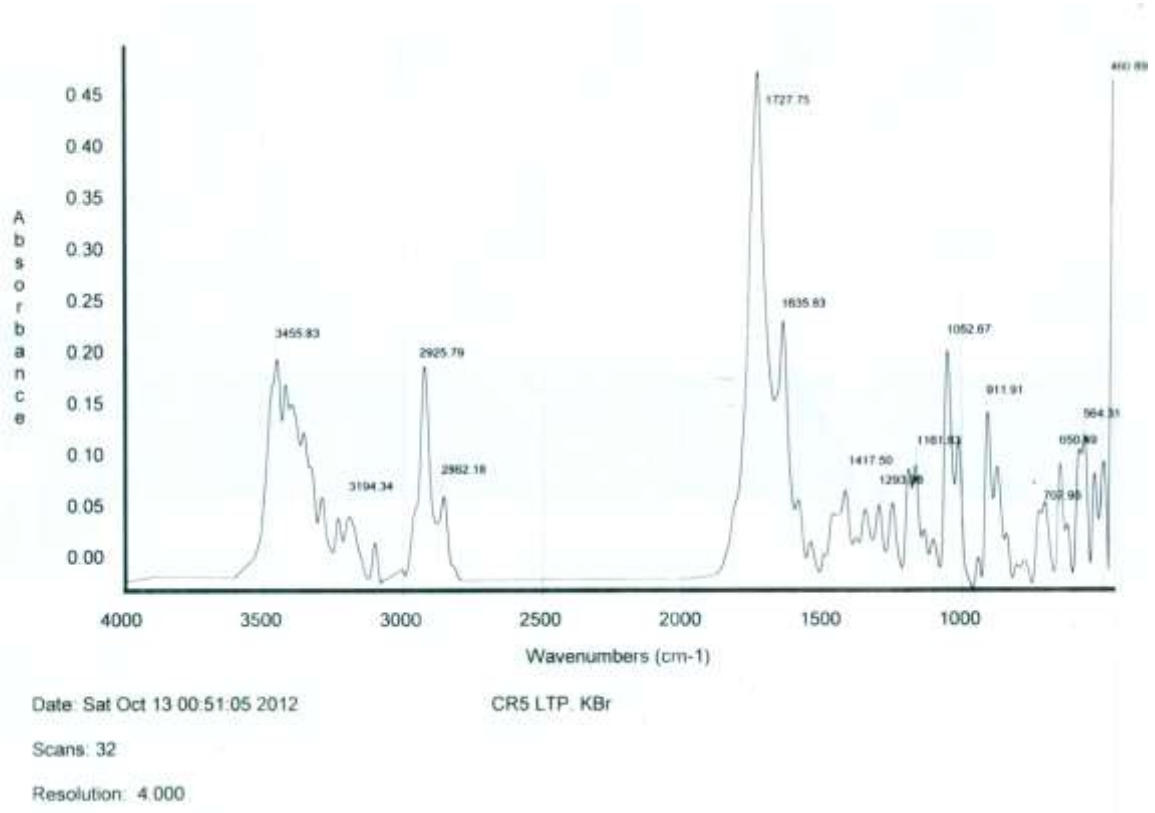
Instrument Type:	UV-1800 Series
Measuring Mode:	Absorbance
Slit Width:	1.0 nm
Light Source Change Wavelength:	340.0 nm
S/R Exchange:	Normal

[Attachment Properties]

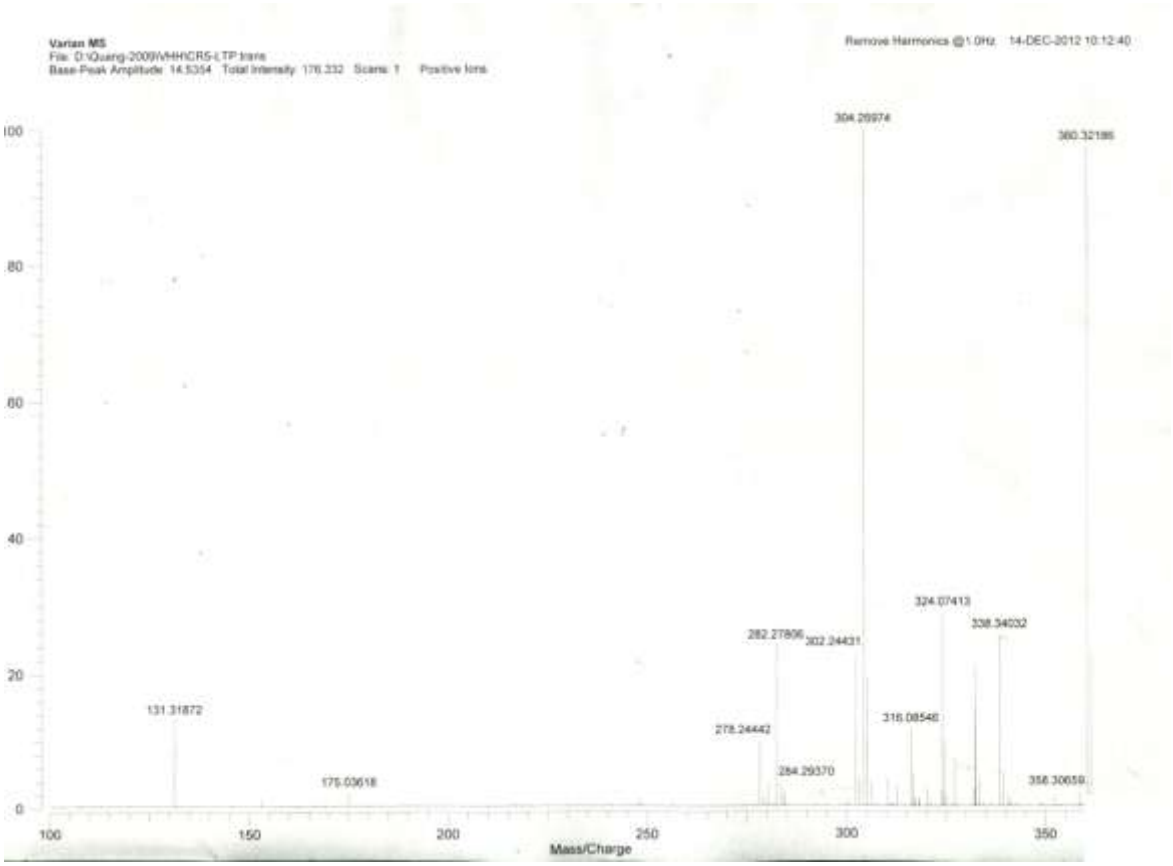
Attachment:	None

No.	P/V	Wavelength	Abs.	Description
1	P	250.50	0.451	
2	P	200.00	0.309	

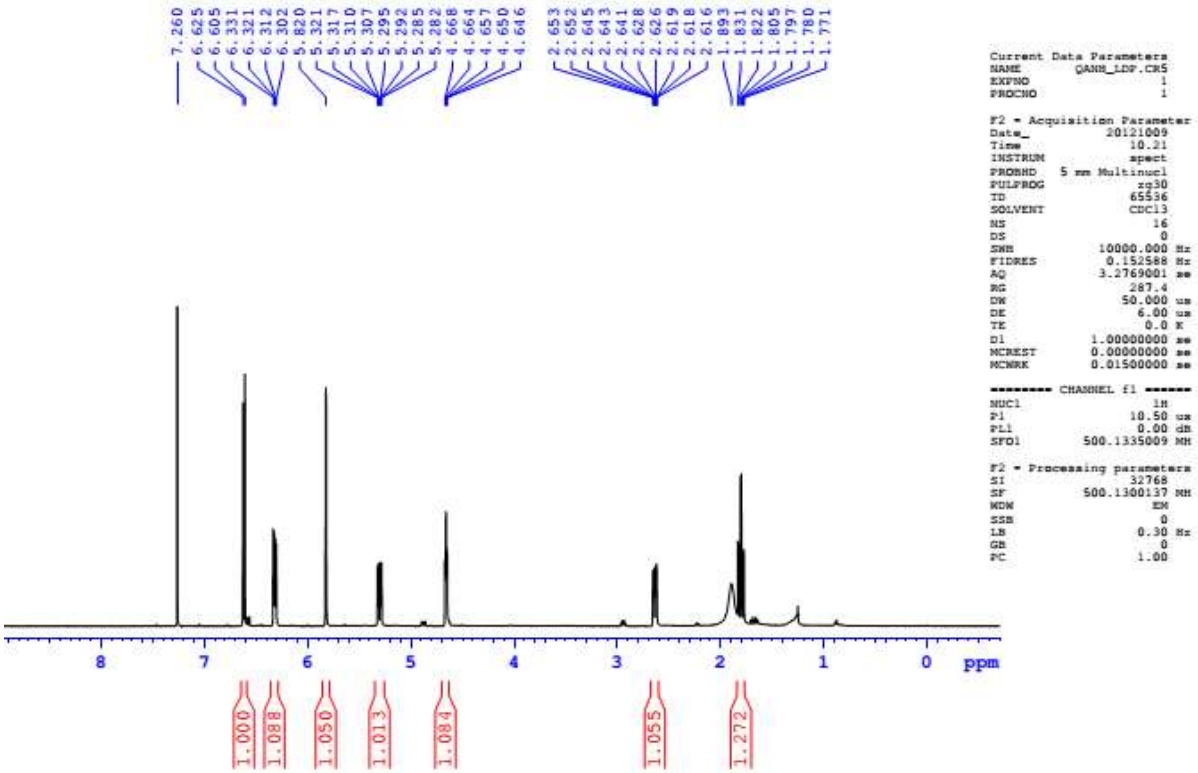
PHỔ IR



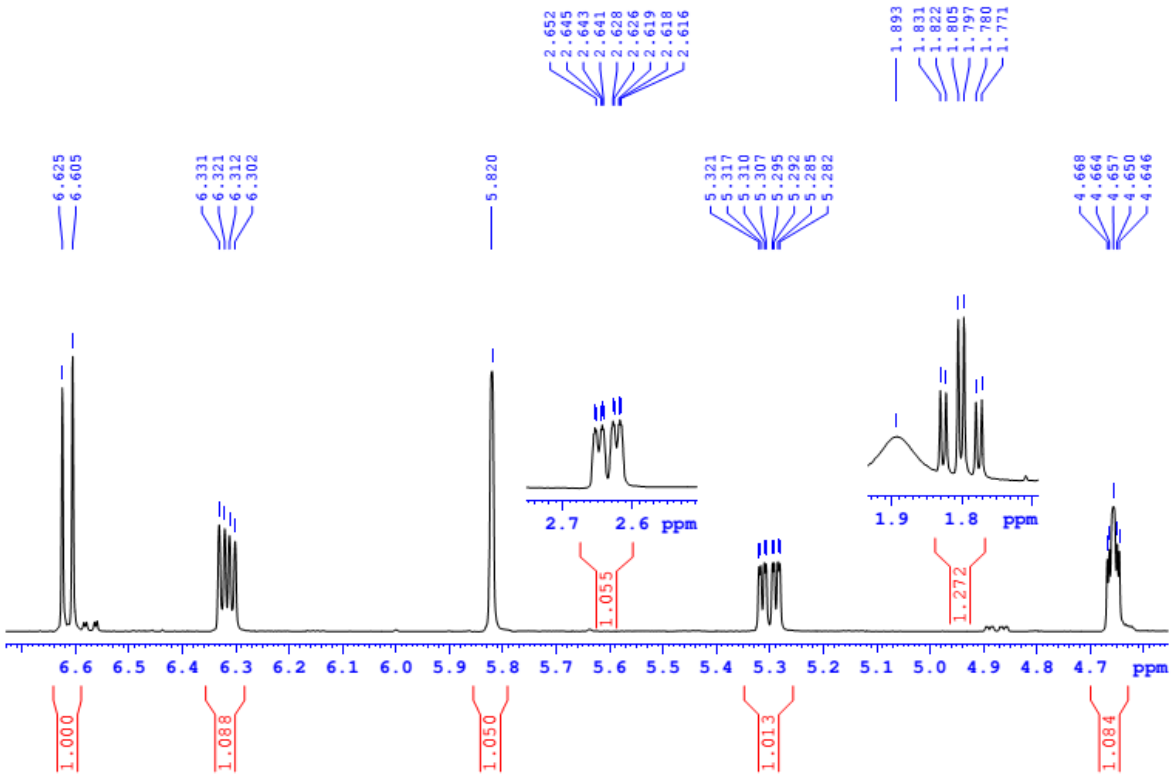
PHỔ HR-ESI-MS



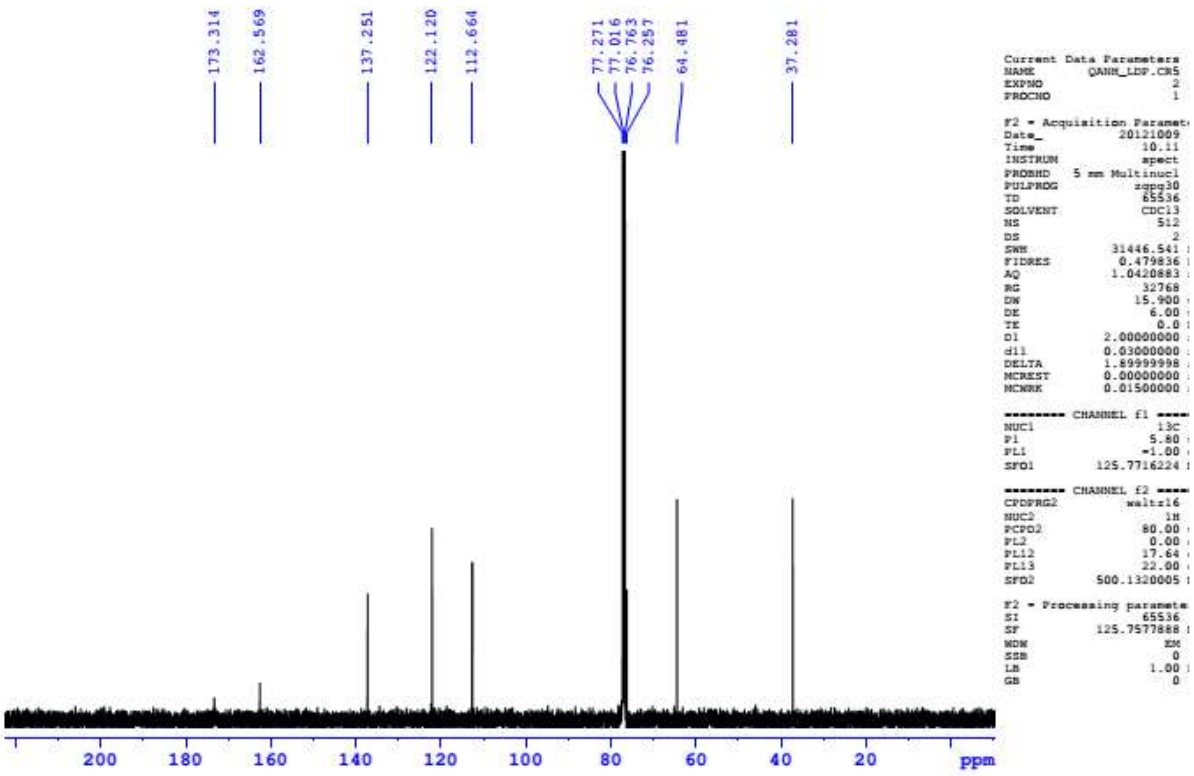
PHỔ ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$)



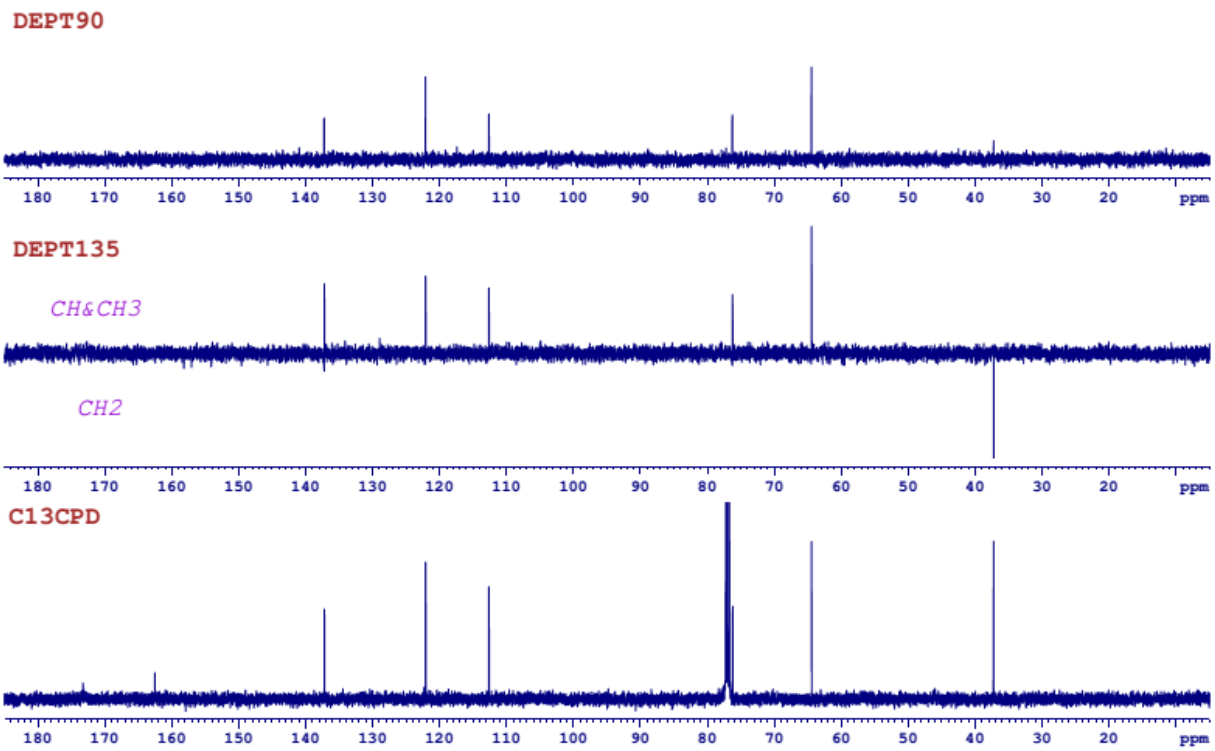

```
Current Data Parameters
NAME          QANH_LDF.CR5
EXPNO                    1
PROCNO                   1

F2 - Acquisition Parameter
Date_             20121009
Time                 10.21
INSTRUM              spect
PROBHD    5 mm Multinucl
PULPROG              zg30
TD                  65536
SOLVENT             CDCl3
NS                     16
DS                      0
SWH           10000.000 Hz
FIDRES            0.152588 Hz
AQ             3.2769001 sec
RG                  287.4
DW                 50.000 usec
DE                  6.00 usec
TE                   0.0 K
D1            1.00000000 sec
MCREST        0.00000000 sec
MCWRK         0.01500000 sec

-------- CHANNEL f1 ------
NUC1                   1H
P1                 10.50 usec
PL1                 0.00 dB
SFO1        500.1335009 MHz

F2 - Processing parameters
SI                   32768
SF          500.1300137 MHz
WDW                     EM
SSB                      0
LB                  0.30 Hz
GB                       0
PC                    1.00
```



PHỔ ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$)



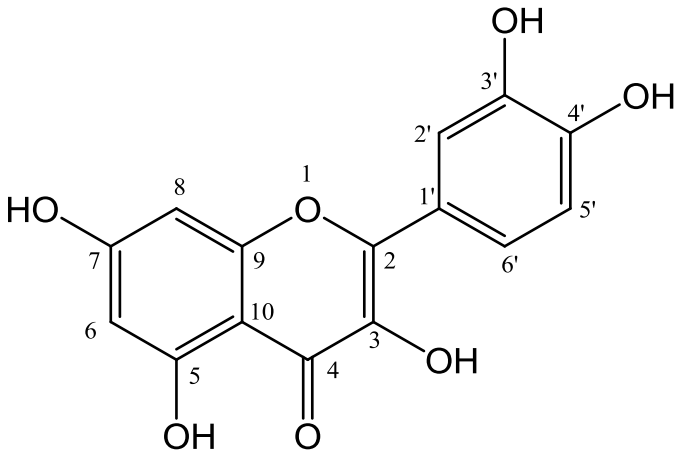
PHỔ DEPT ($CDCl_3$)



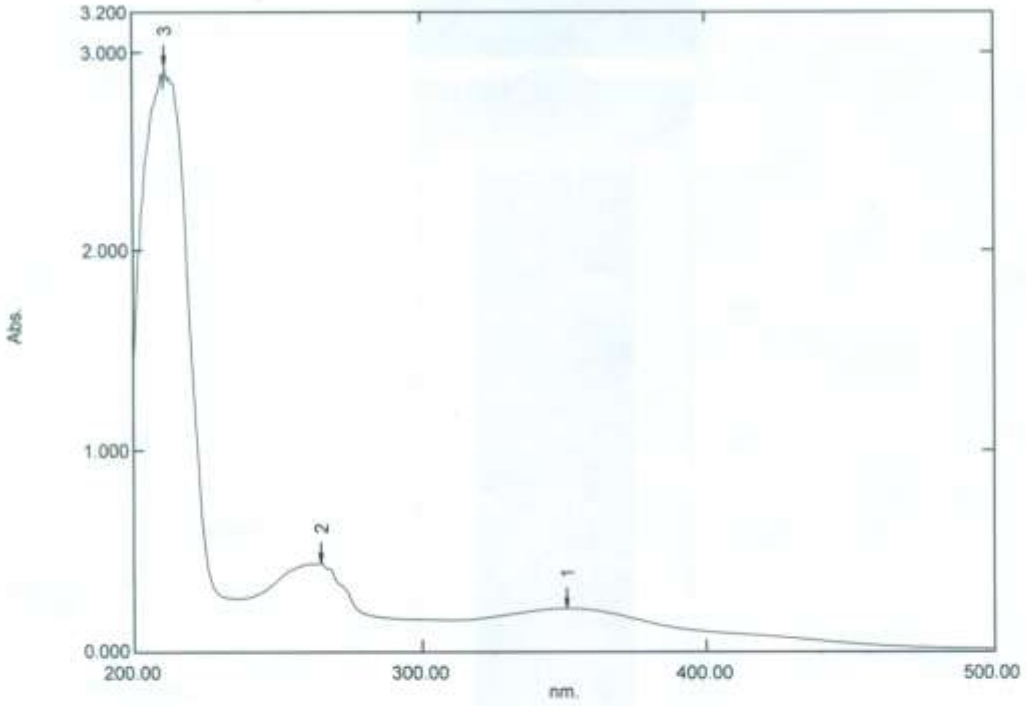
PHỤ LỤC 7

PHỔ CỦA HỢP CHẤT SL-5 [SR-8] (QUERCETIN)

- **UV**
- **IR**
- **ESI-MS**
- **^{1}H NMR**
- **^{13}C NMR**
- **DEPT**



PHỔ UV (MeOH)



[Measurement Properties]
Wavelength Range (nm.): 200.00 to 800.00
Scan Speed: Medium
Sampling Interval: 0.5
Auto Sampling Interval: Enabled
Scan Mode: Single

[Instrument Properties]
Instrument Type: UV-1800 Series
Measuring Mode: Absorbance
Slit Width: 1.0 nm
Light Source Change Wavelength: 340.0 nm
S/R Exchange: Normal

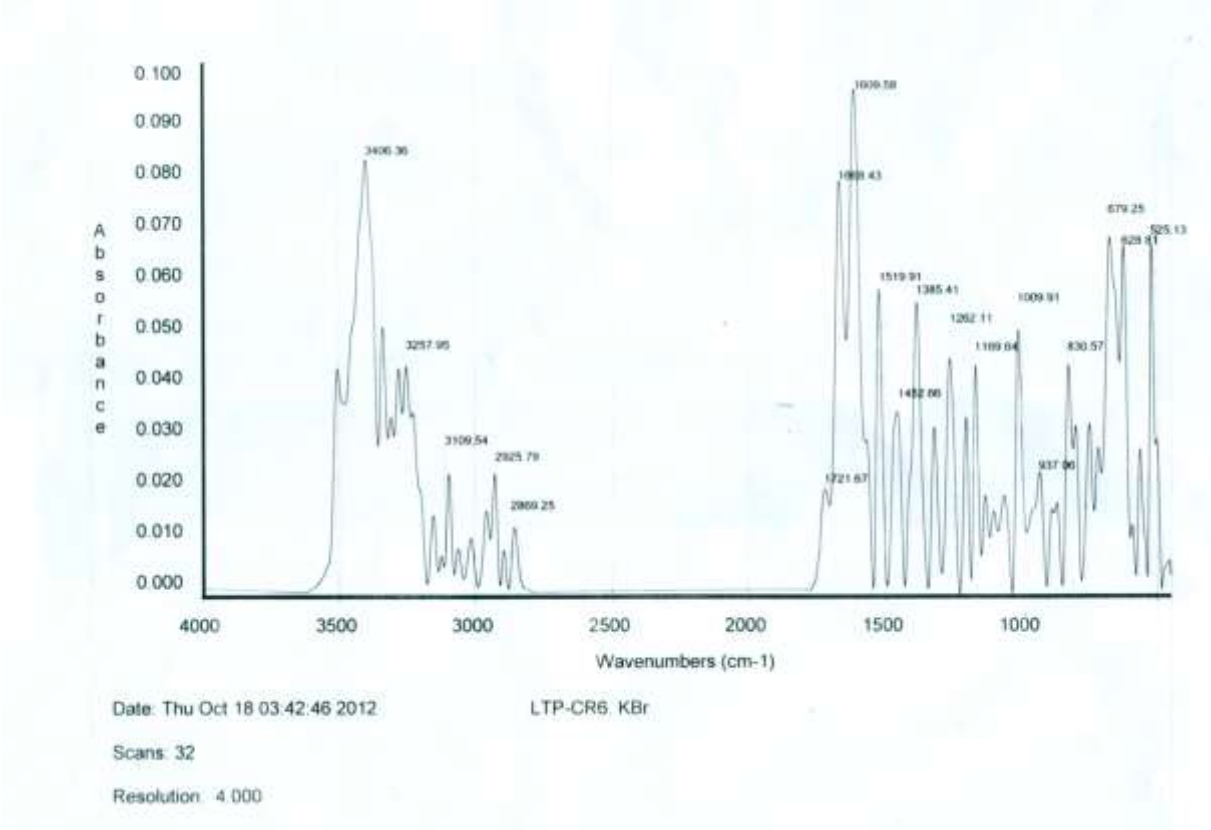
[Attachment Properties]
Attachment: None

[Operation]
Threshold: 0.0010000
Points: 4
InterPolate: Disabled
Average: Disabled

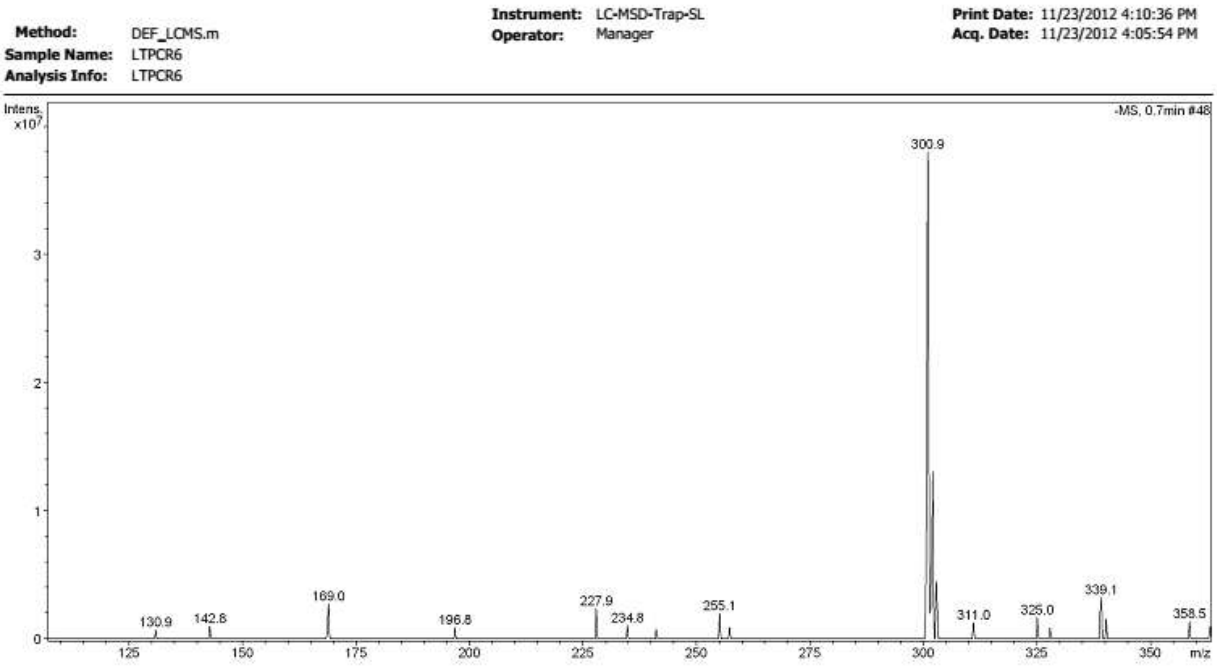
[Sample Preparation Properties]
Weight:
Volume:
Dilution:

No.	P/V	Wavelength	Abs.	Description
1	⊕	351.00	0.210	
2	⊕	265.00	0.437	
3	⊕	211.50	2.927	

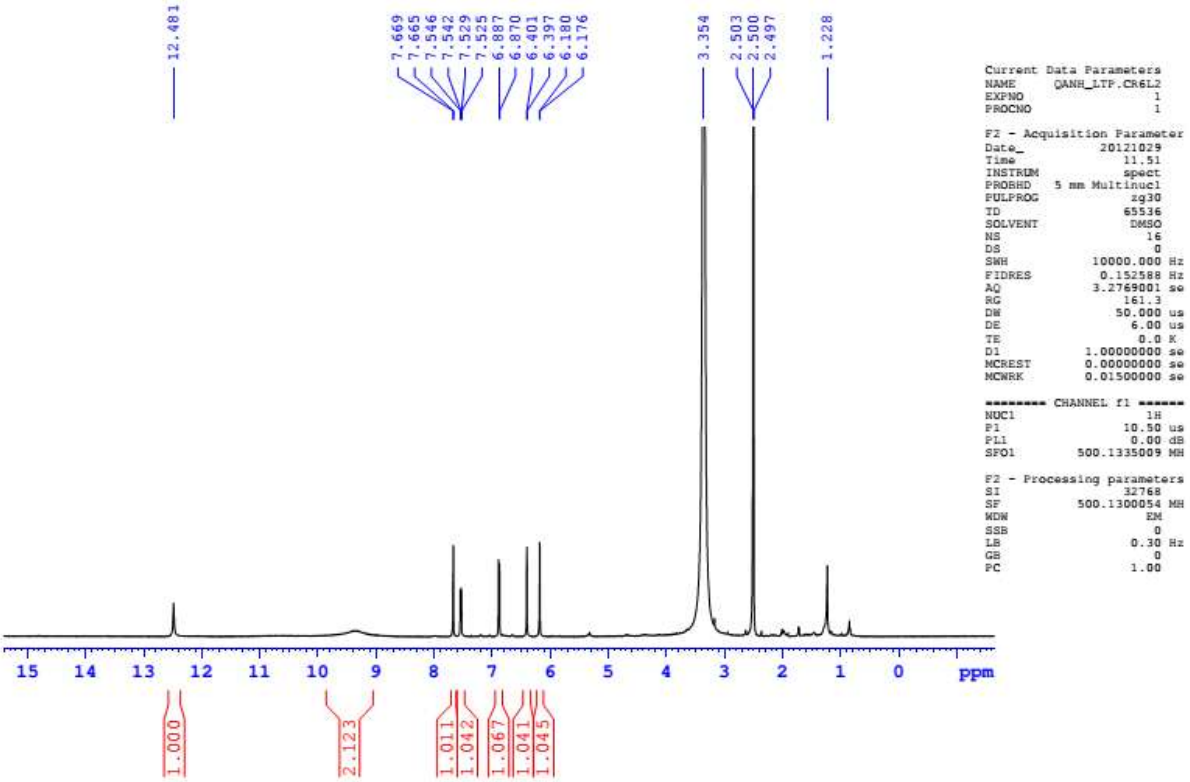
PHỔ IR

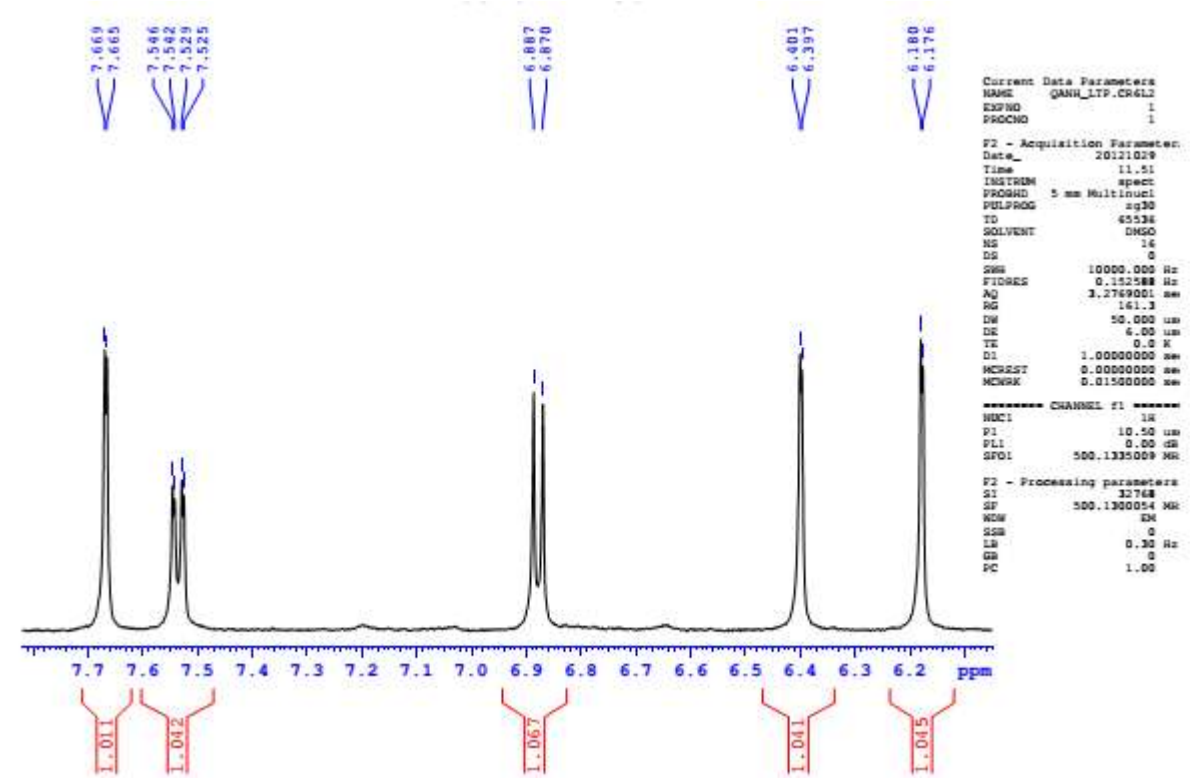


PHỔ ESI-MS

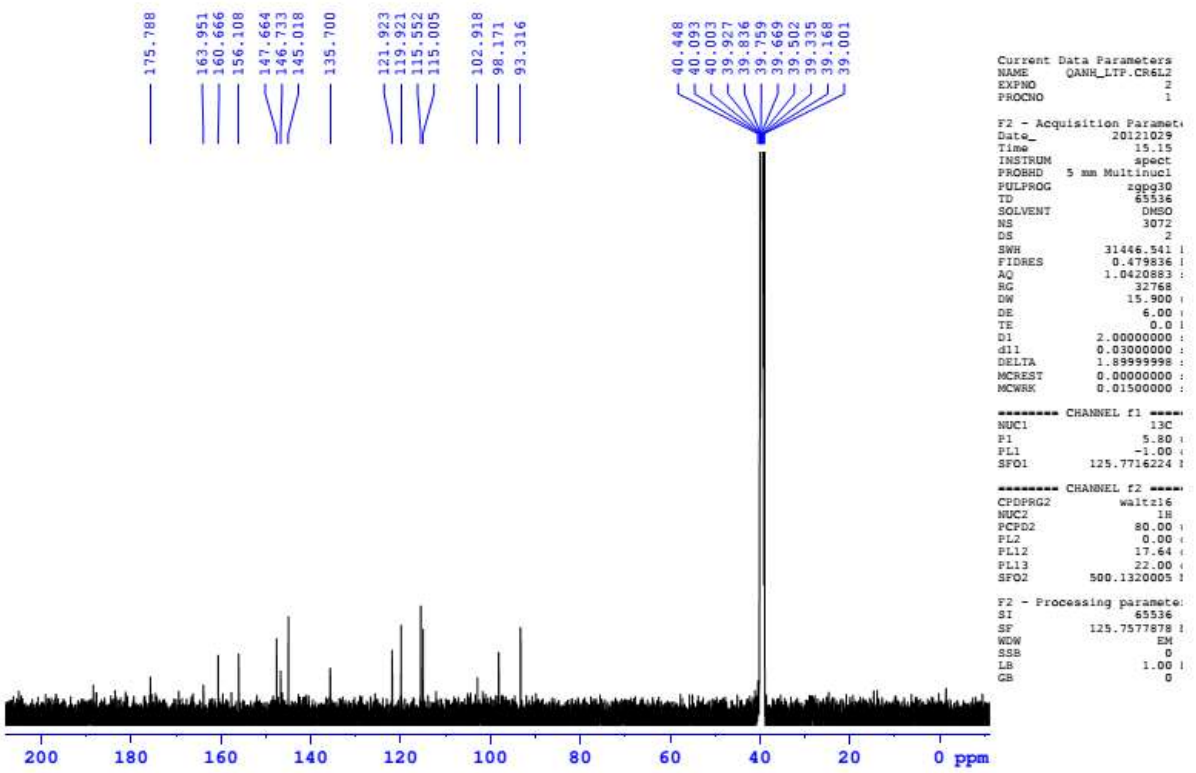


PHỔ ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6)

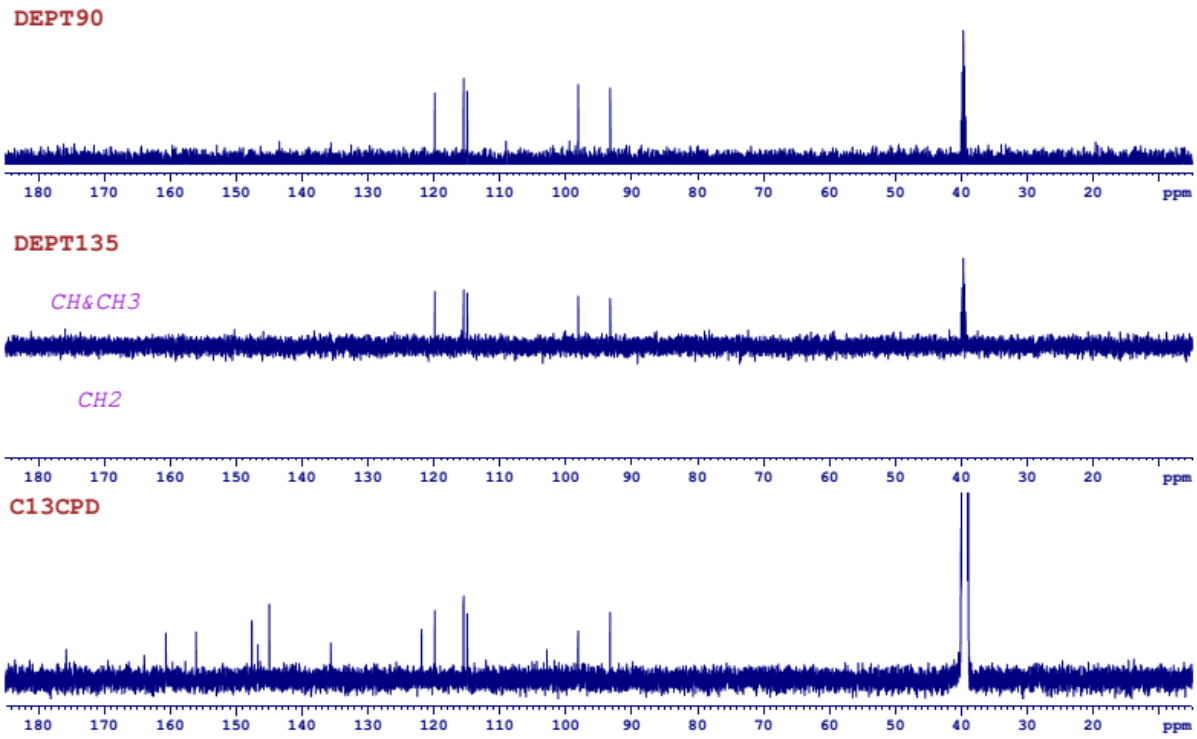




PHỔ ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO-d_6)



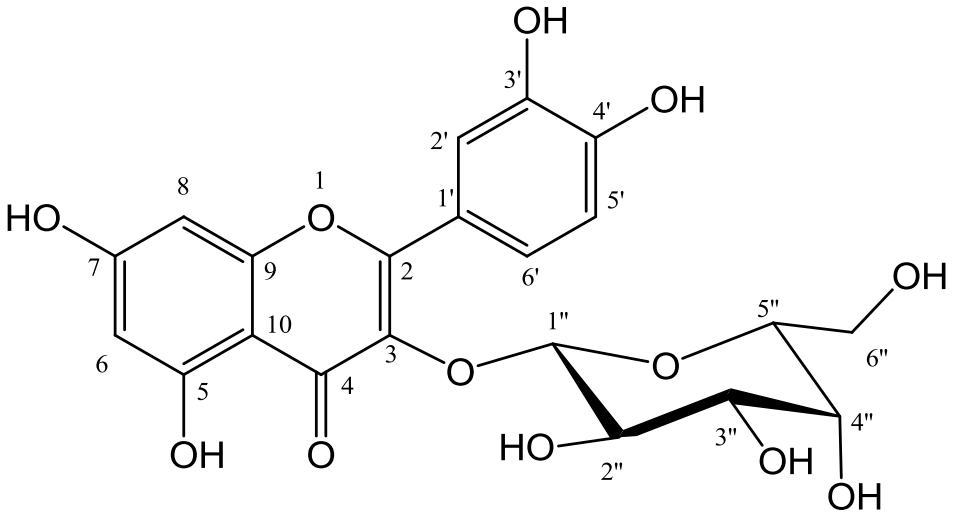
PHỔ DEPT (DMSO-d_6)



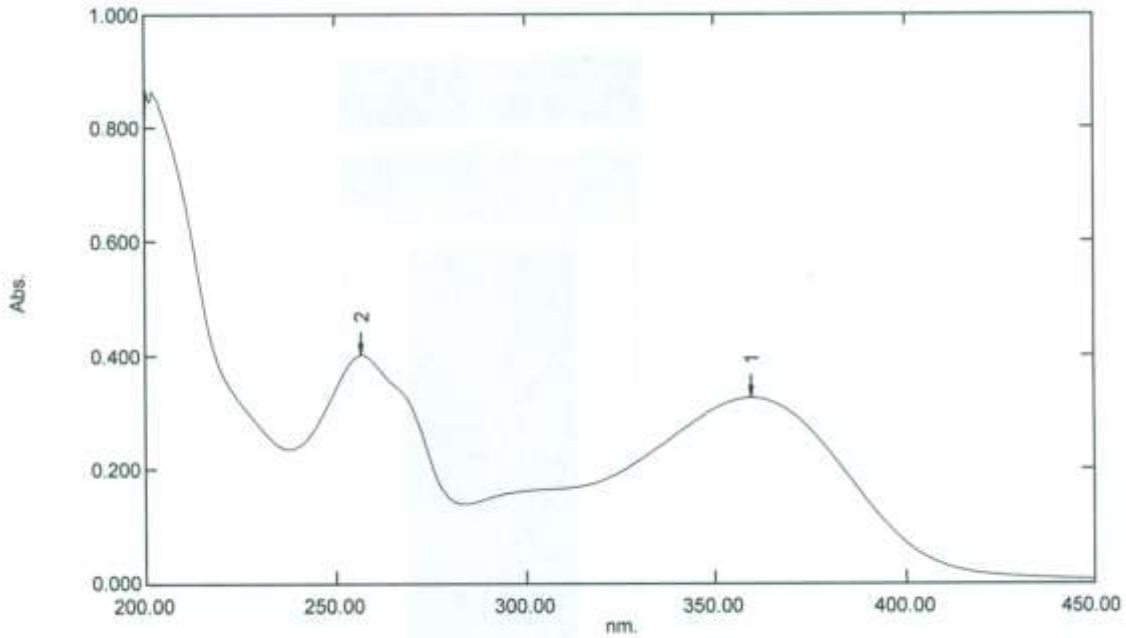
PHỤ LỤC 8

PHỔ CỦA HỢP CHẤT SL-6 (HYPERIN)

- **UV**
- **IR**
- **ESI-MS**
- **^{1}H NMR**
- **^{13}C NMR**
- **DEPT**



PHỔ UV (MeOH)



[Measurement Properties]

Wavelength Range (nm.):	190.00 to 800.00
Scan Speed:	Fast
Sampling Interval:	0.5
Auto Sampling Interval:	Enabled
Scan Mode:	Single

[Instrument Properties]

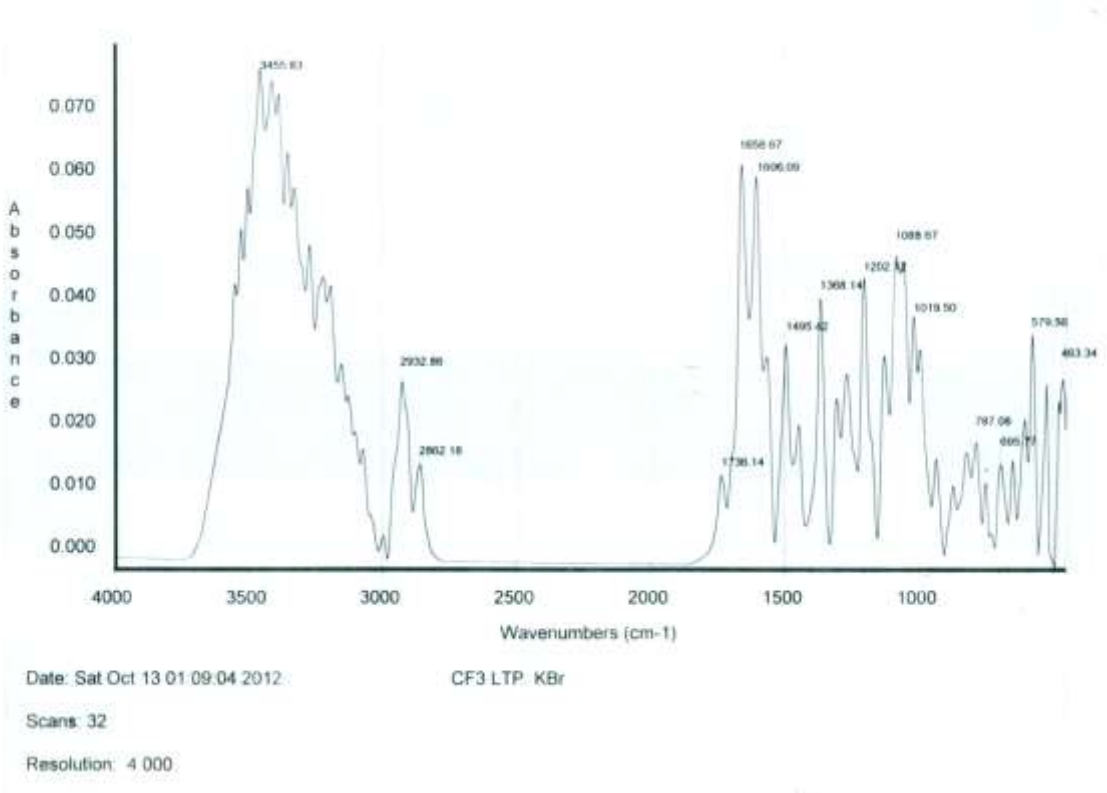
Instrument Type:	UV-1800 Series
Measuring Mode:	Absorbance
Slit Width:	1.0 nm
Light Source Change Wavelength:	340.0 nm
S/R Exchange:	Normal

[Attachment Properties]

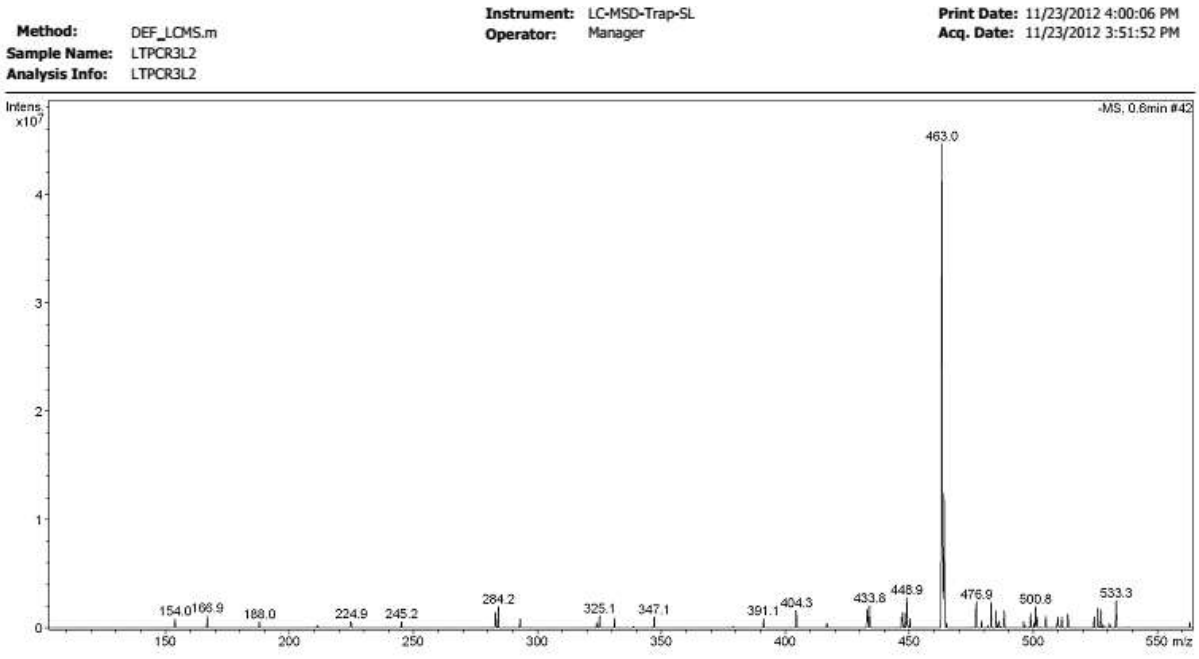
.....

No.	P/V	Wavelength	Abs.	Description
1	⊕	359.50	0.325	
2	⊕	256.50	0.401	

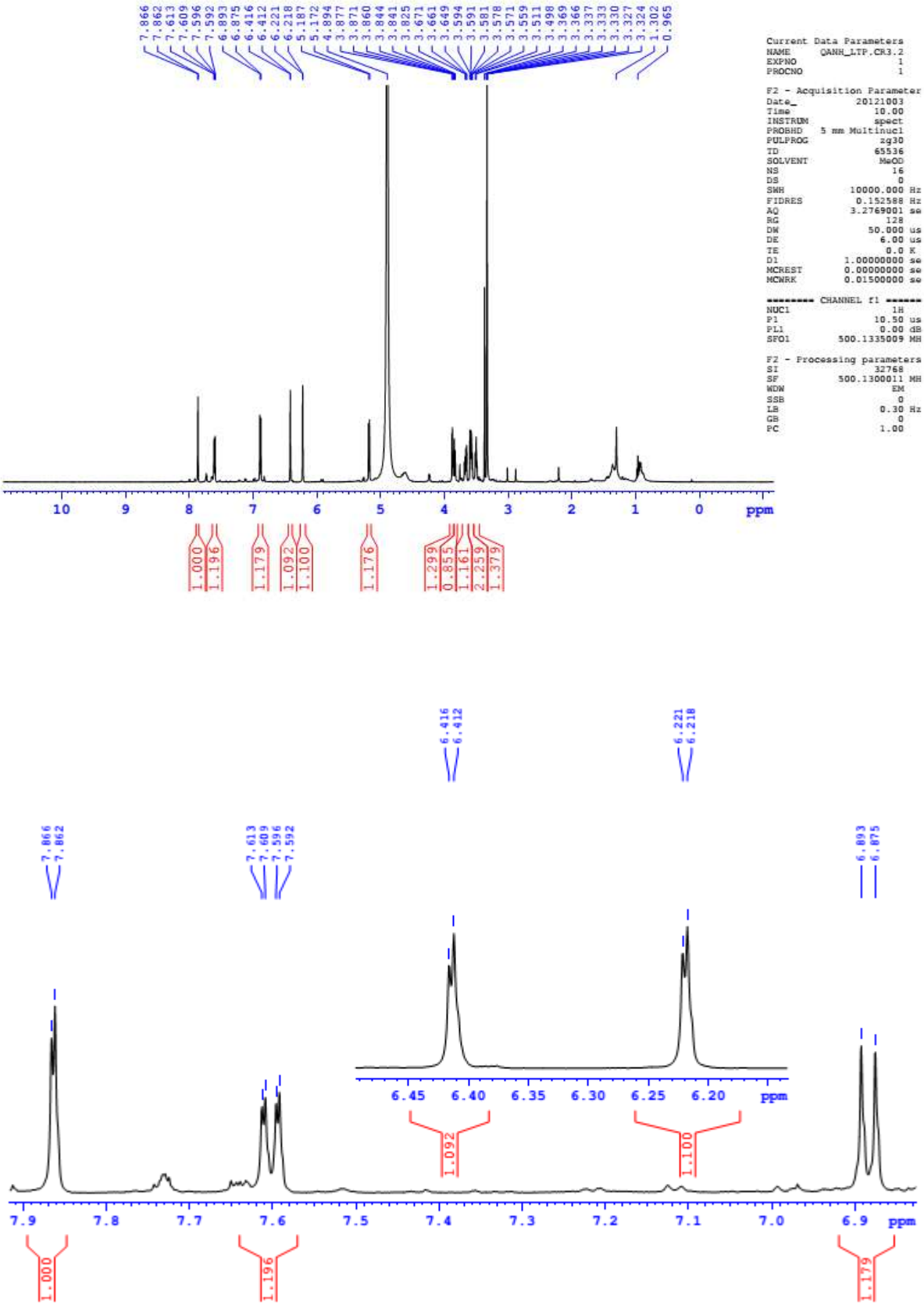
PHỔ IR

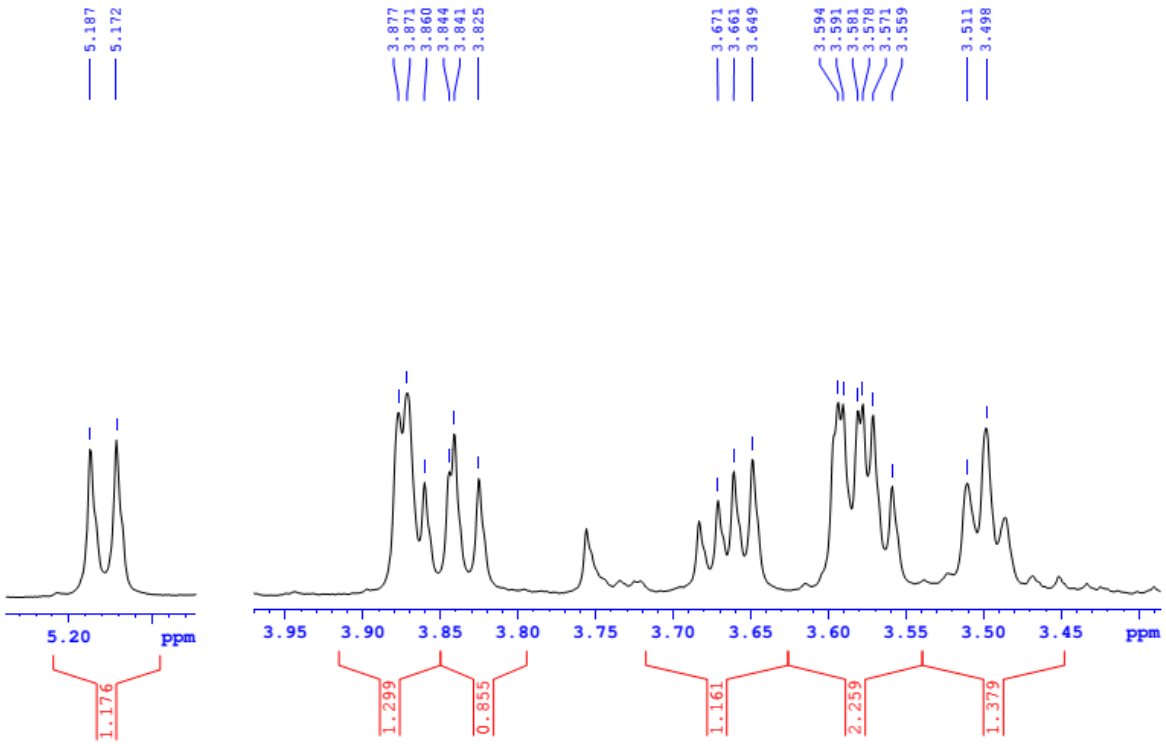


PHỔ ESI-MS

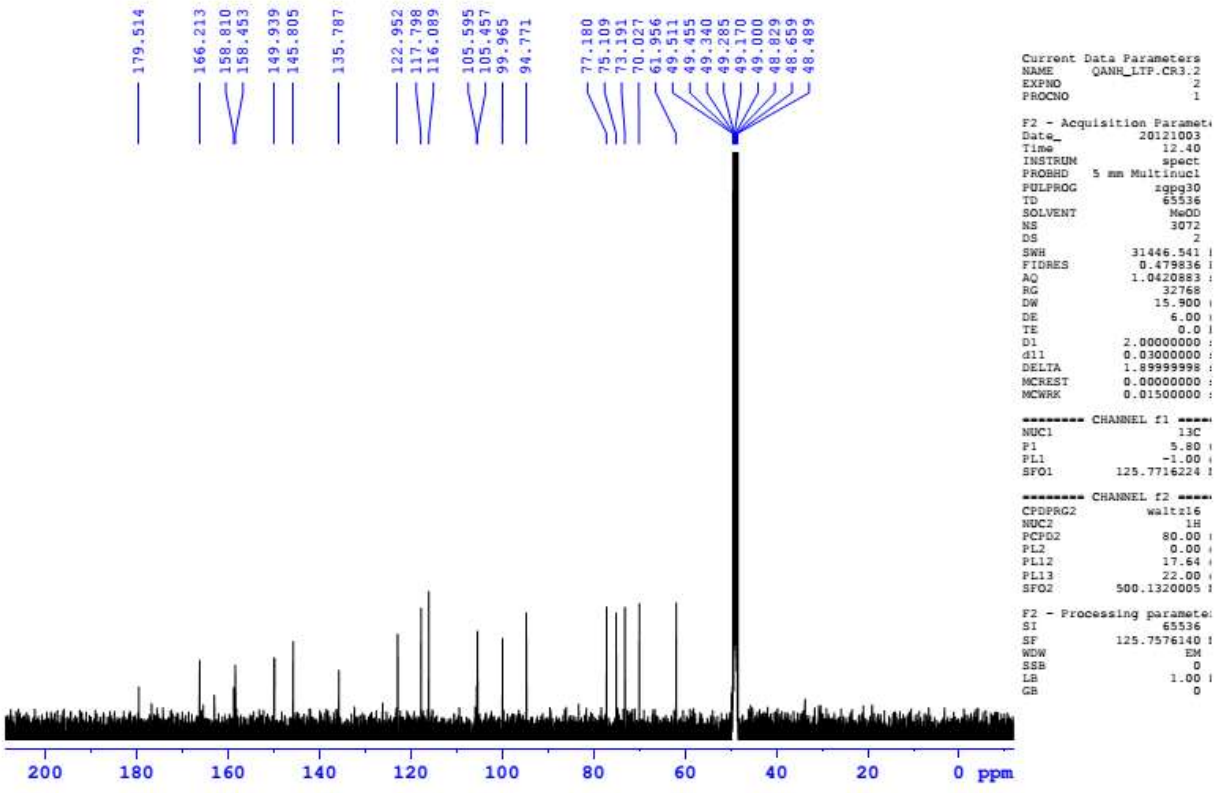


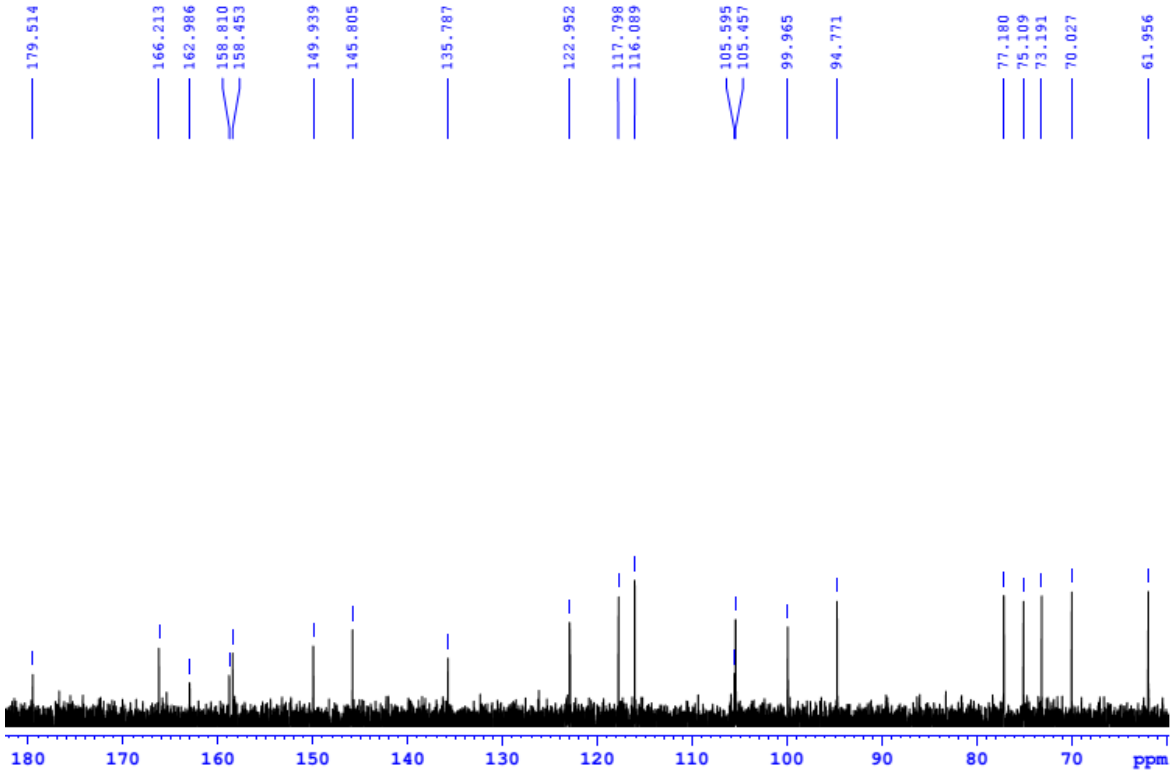
PHỔ ^{1}H NMR (500 MHz, CD_3OD)



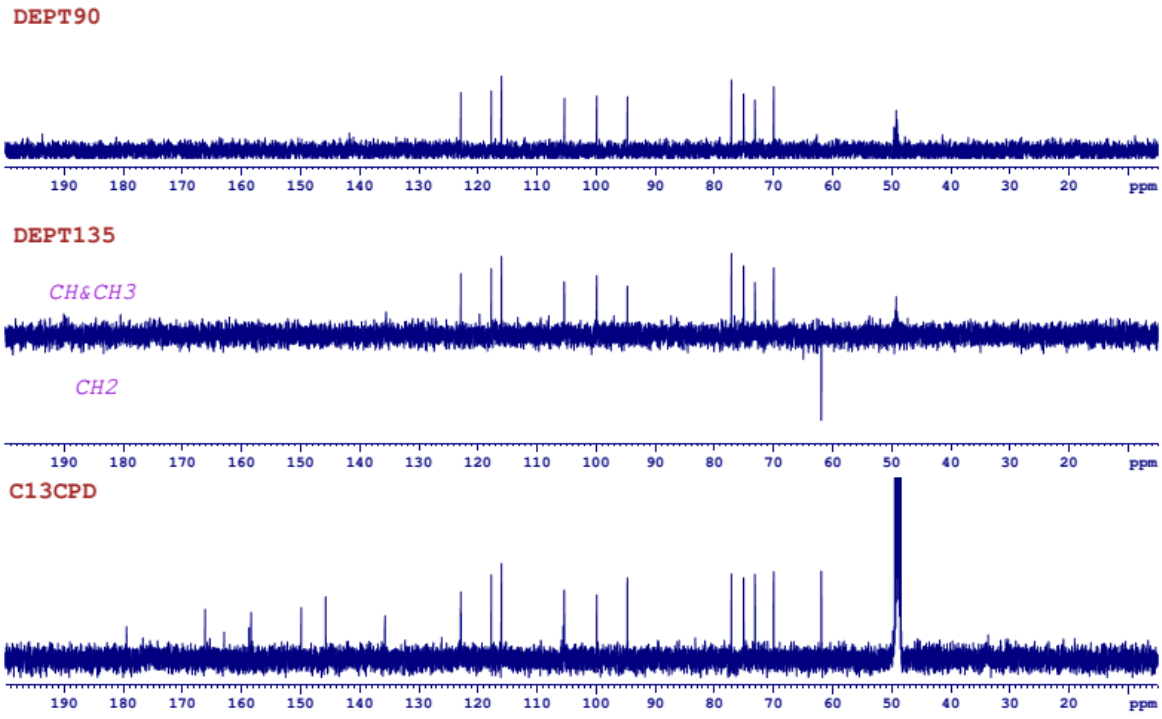


PHỔ ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD)





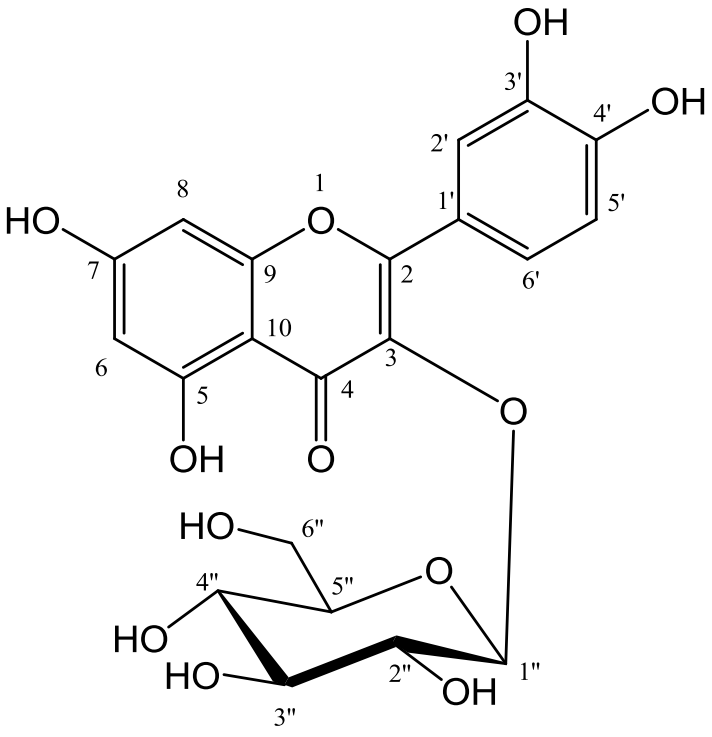
PHỔ DEPT (CD_3OD)



PHỤ LỤC 9

PHỔ CỦA HỢP CHẤT SL-7 (ISOQUERCITRIN)

- **UV**
- **ESI-MS**
- **^{1}H NMR**
- **^{13}C NMR**
- **DEPT**

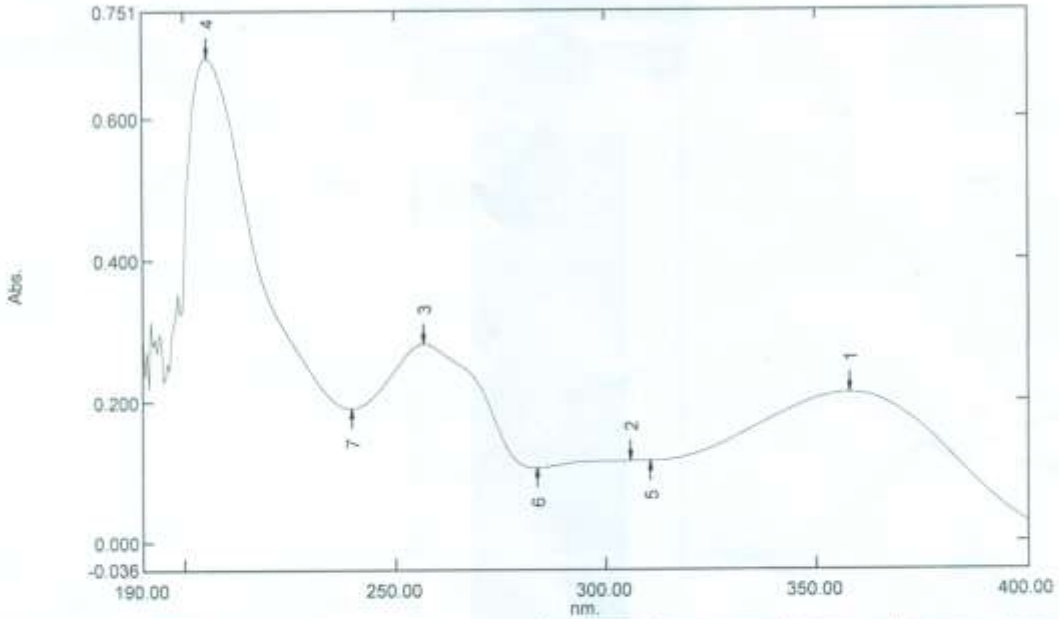


UV (MeOH)

Spectrum Peak Pick Report

05/22/2015 10:13:56 AM

Data Set: File_SL-7.spc - RawData



Measurement Properties
Wavelength Range (nm.): 190.00 to 400.00
Scan Speed: Medium
Sampling Interval: 0.5
Auto Sampling Interval: Disabled
Scan Mode: Single

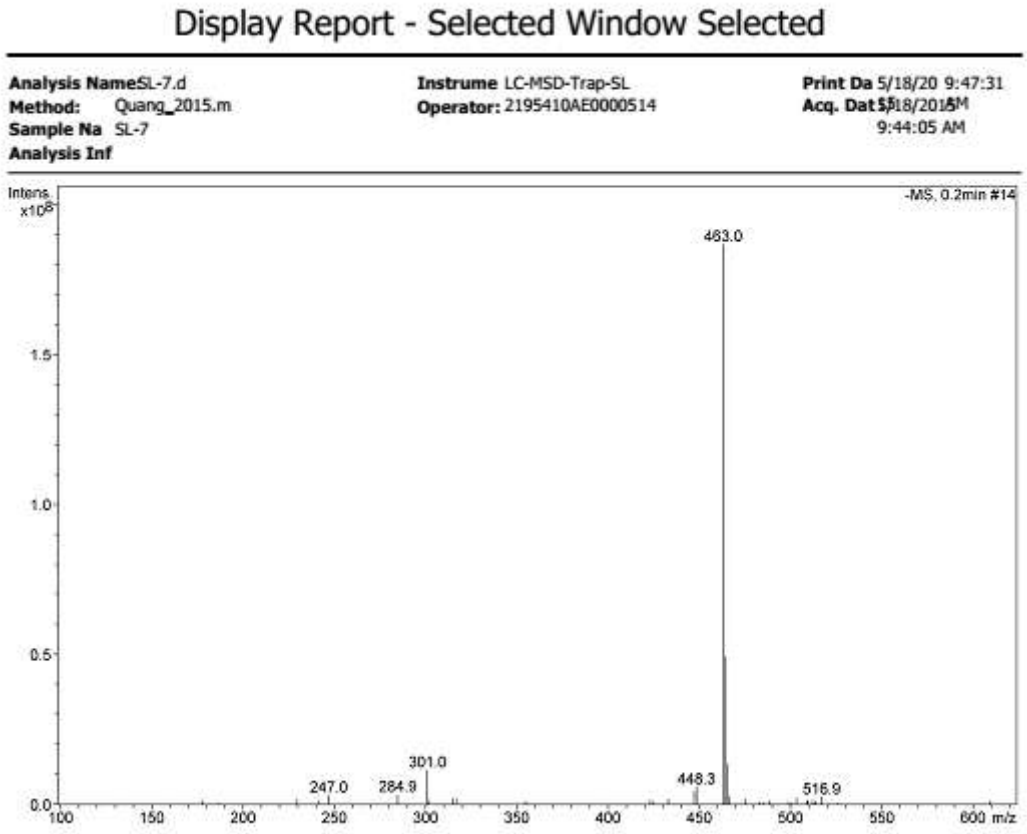
Instrument Properties
Instrument Type: UV-1800 Series
Measuring Mode: Absorbance
Slit Width: 1.0 nm
Light Source Change Wavelength: 360.0 nm
S/R Exchange: Normal

Attachment Properties
Attachment: None

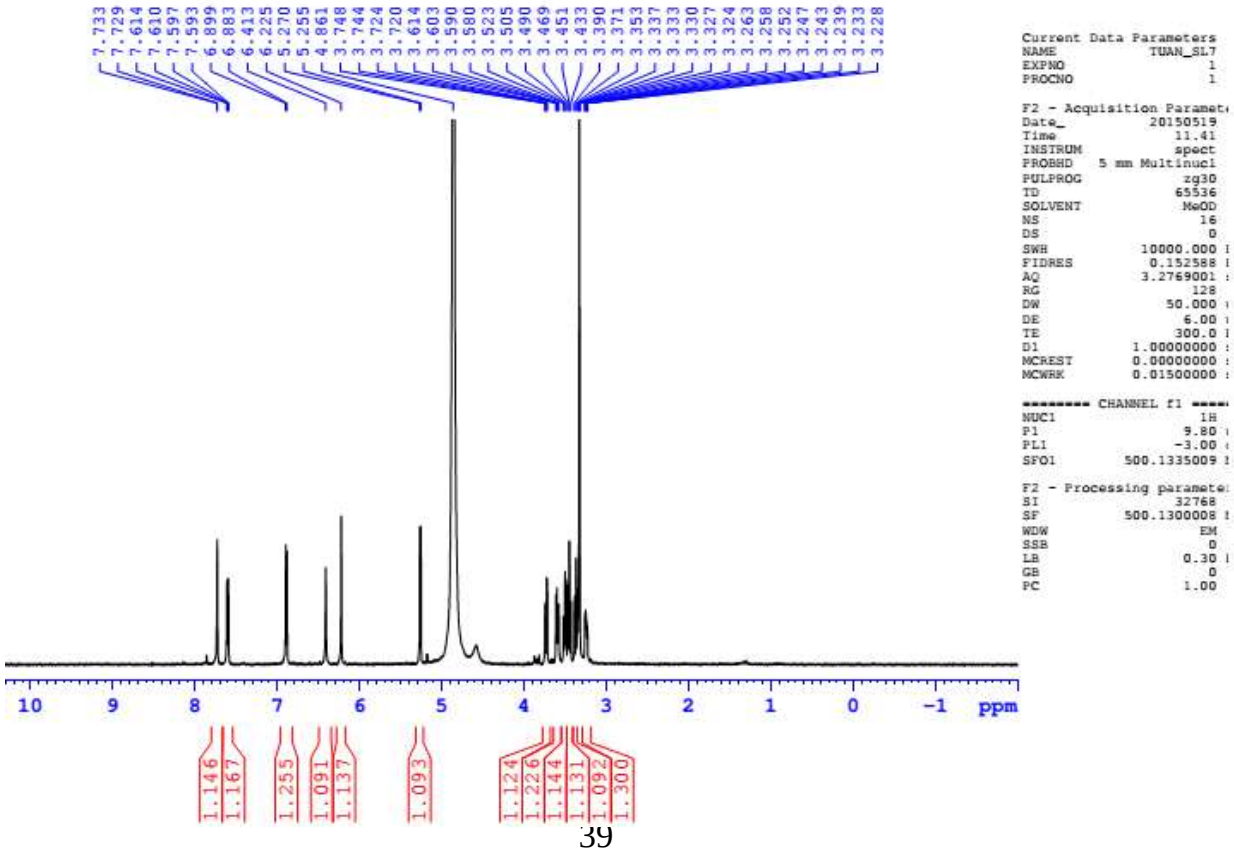
Sample Preparation Properties
Weight:
Volume:
Dilution:
Path Length:
Additional Information:

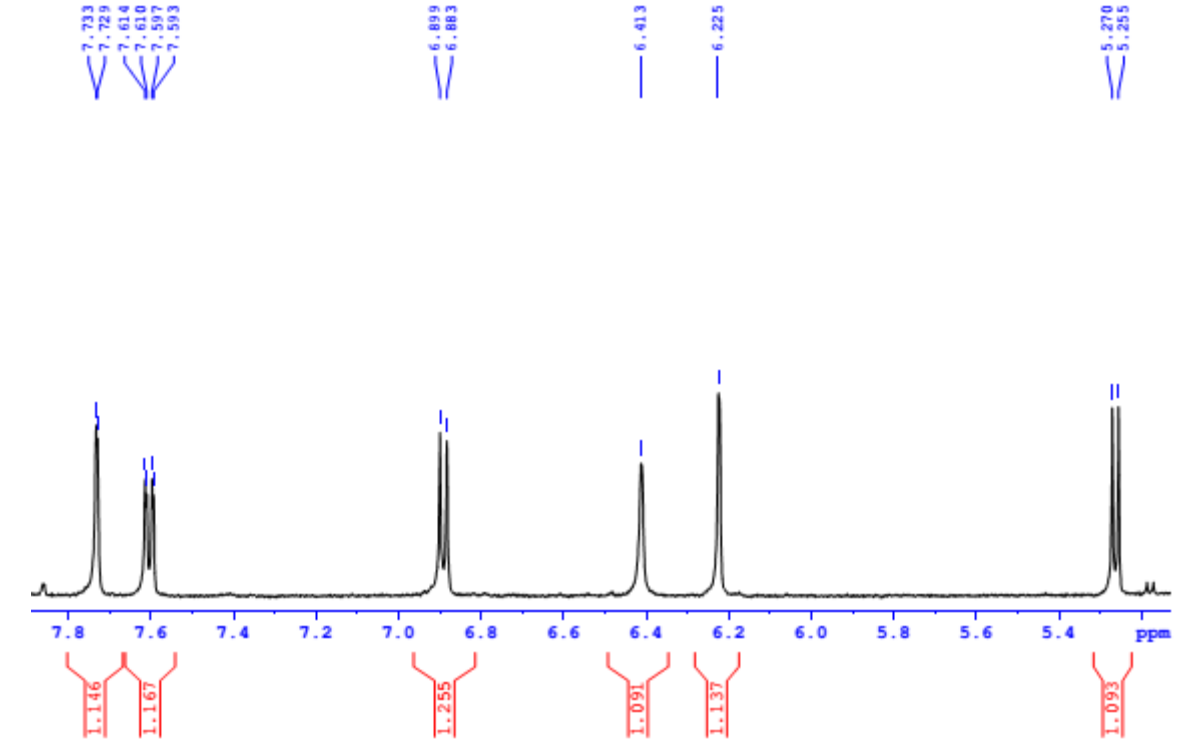
No.	P/V	Wavelength	Abs.	Description
1	↑	358.00	0.211	
2	↑	306.00	0.116	
3	↑	256.50	0.280	
4	↑	205.50	0.685	
5	↓	310.50	0.115	
6	↓	283.50	0.105	
7	↓	239.50	0.190	

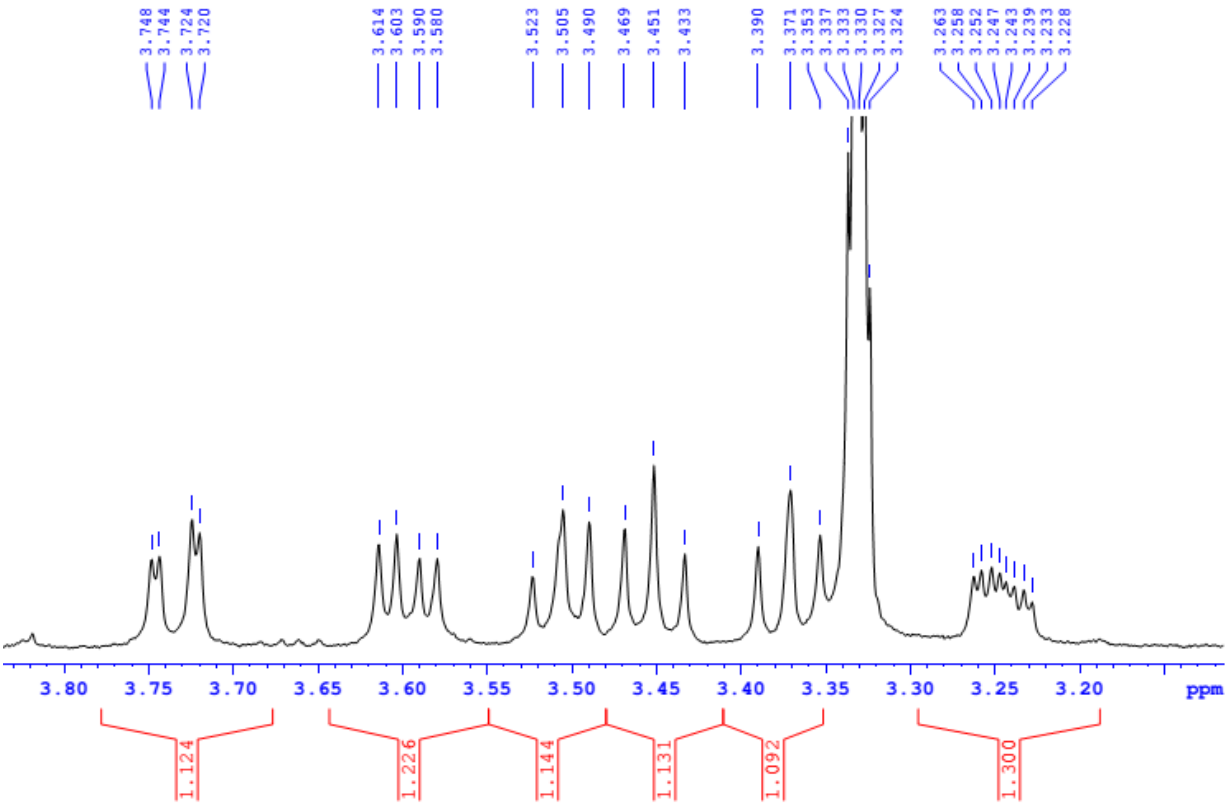
PHỔ ESI-MS



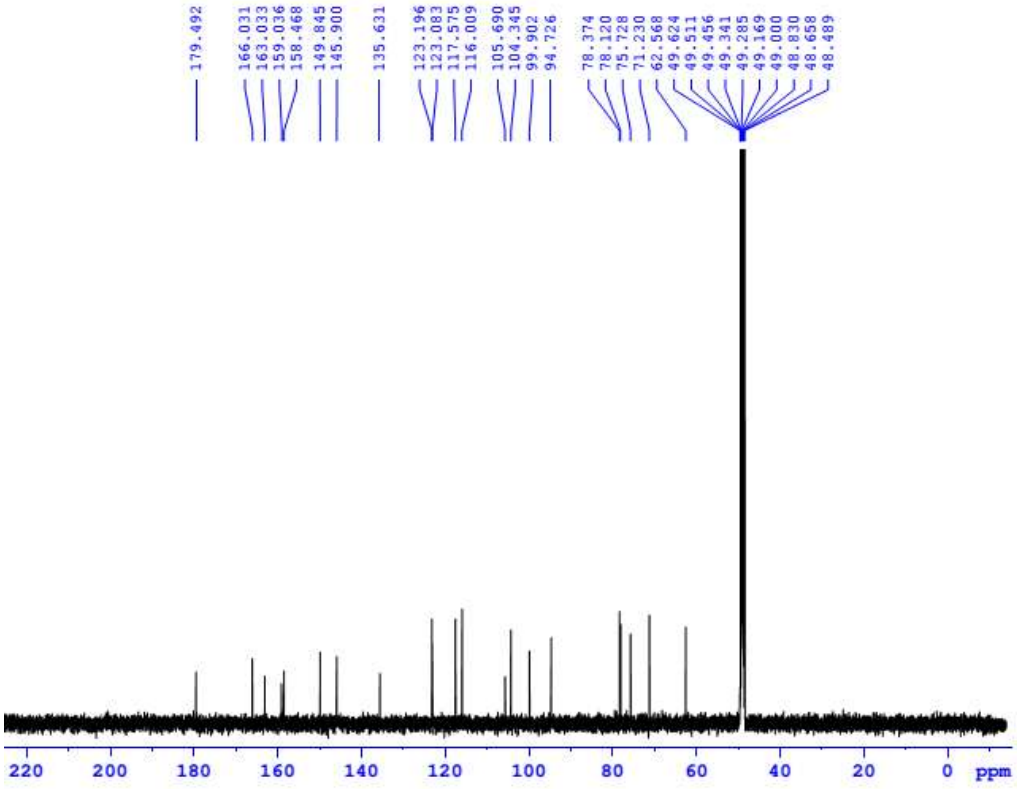
PHỔ ^{1}H NMR (500 MHz, CD_3OD)



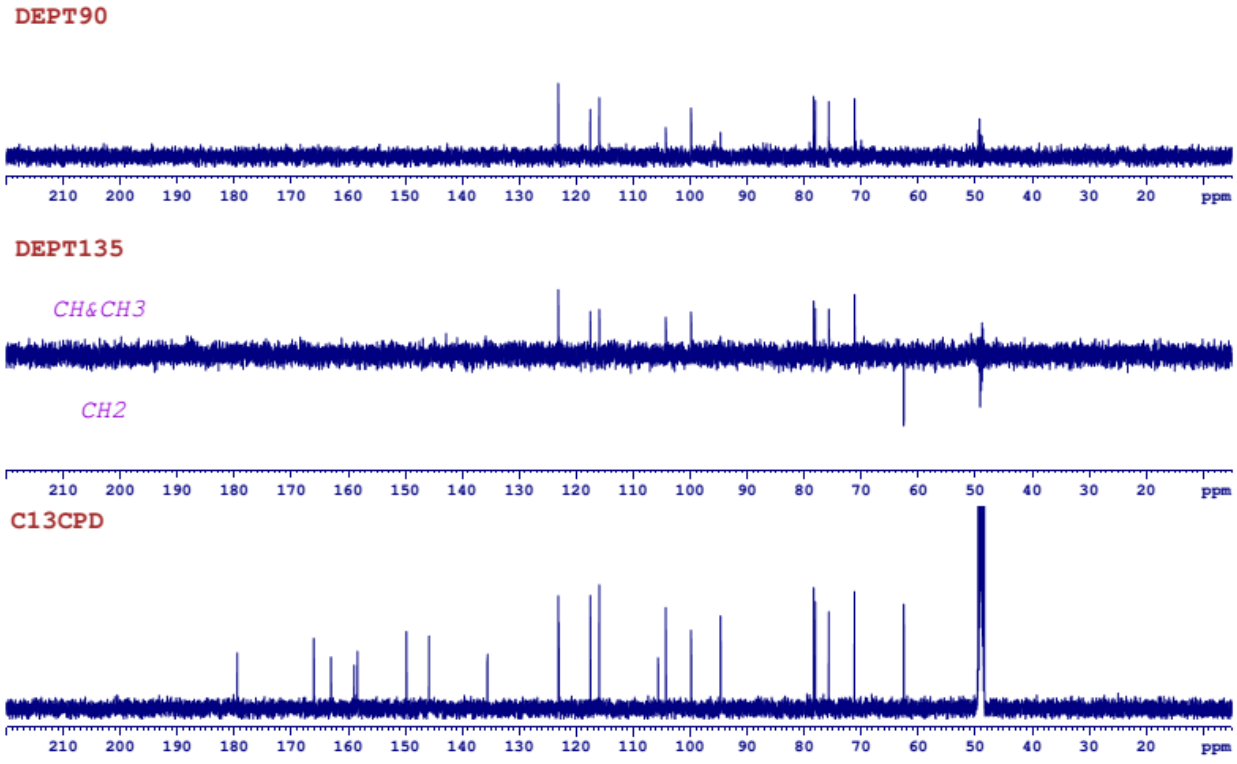

7.733
7.729
7.614
7.610
7.597
7.593
6.899
6.883
6.413
6.225
5.270
5.255
7.8
7.6
7.4
7.2
7.0
6.8
6.6
6.4
6.2
6.0
5.8
5.6
5.4
ppm
1.146
1.167
1.255
1.091
1.137
1.093


3.748
3.744
3.724
3.720
3.614
3.603
3.590
3.580
3.523
3.505
3.490
3.469
3.451
3.433
3.390
3.371
3.353
3.337
3.333
3.330
3.327
3.324
3.263
3.258
3.252
3.247
3.243
3.239
3.233
3.228
3.80
3.75
3.70
3.65
3.60
3.55
3.50
3.45
3.40
3.35
3.30
3.25
3.20
ppm
1.124
1.226
1.144
1.131
1.092
1.300

PHỔ ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD)



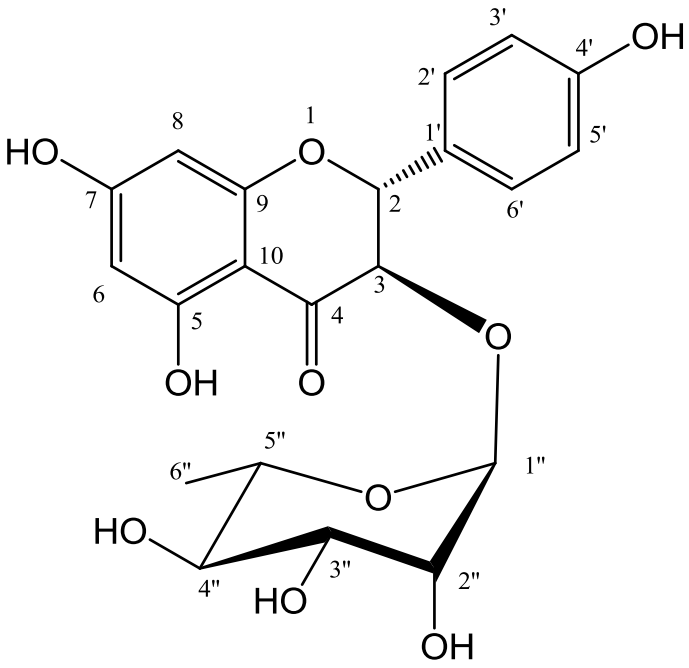
PHỔ DEPT (CD_3OD)



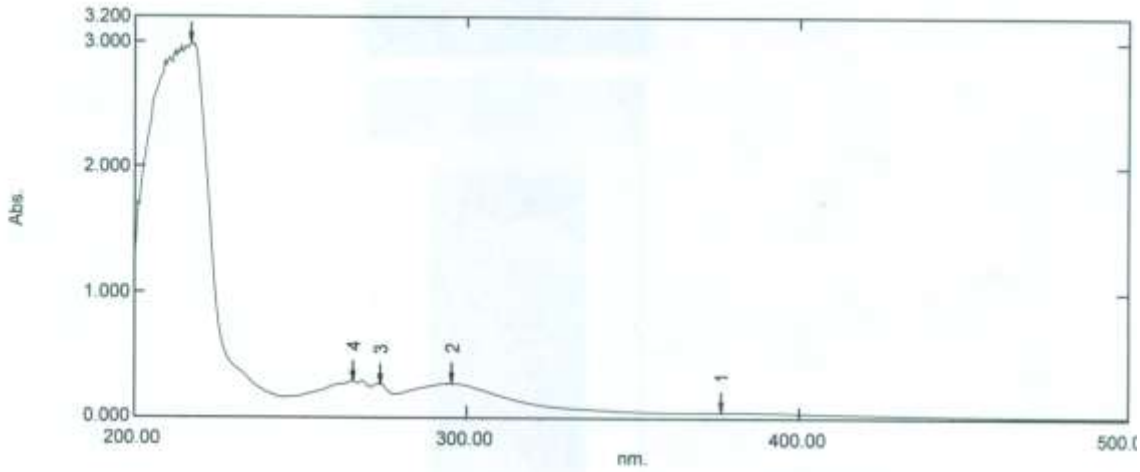
PHỤ LỤC 10

PHỔ CỦA HỢP CHẤT SL-8 (ENGELETIN)

- **UV**
- **IR**
- **ESI-MS**
- **^{1}H NMR**
- **^{13}C NMR**
- **DEPT**



PHỔ UV (MeOH)



[Measurement Properties]
Wavelength Range (nm.): 200.00 to 800.00
Scan Speed: Medium
Sampling Interval: 0.5
Auto Sampling Interval: Enabled
Scan Mode: Single

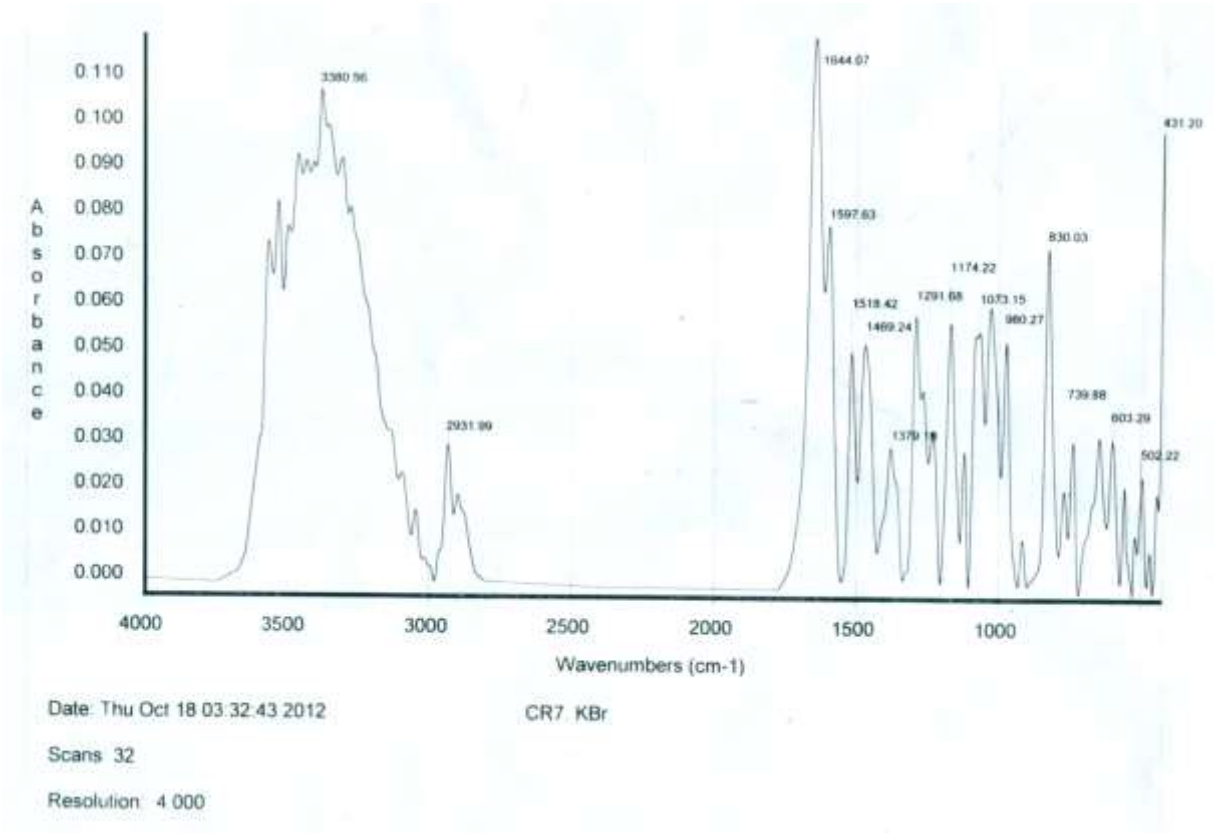
[Instrument Properties]
Instrument Type: UV-1800 Series
Measuring Mode: Absorbance
Slit Width: 1.0 nm
Light Source Change Wavelength: 340.0 nm
S/R Exchange: Normal

[Attachment Properties]
Attachment: None

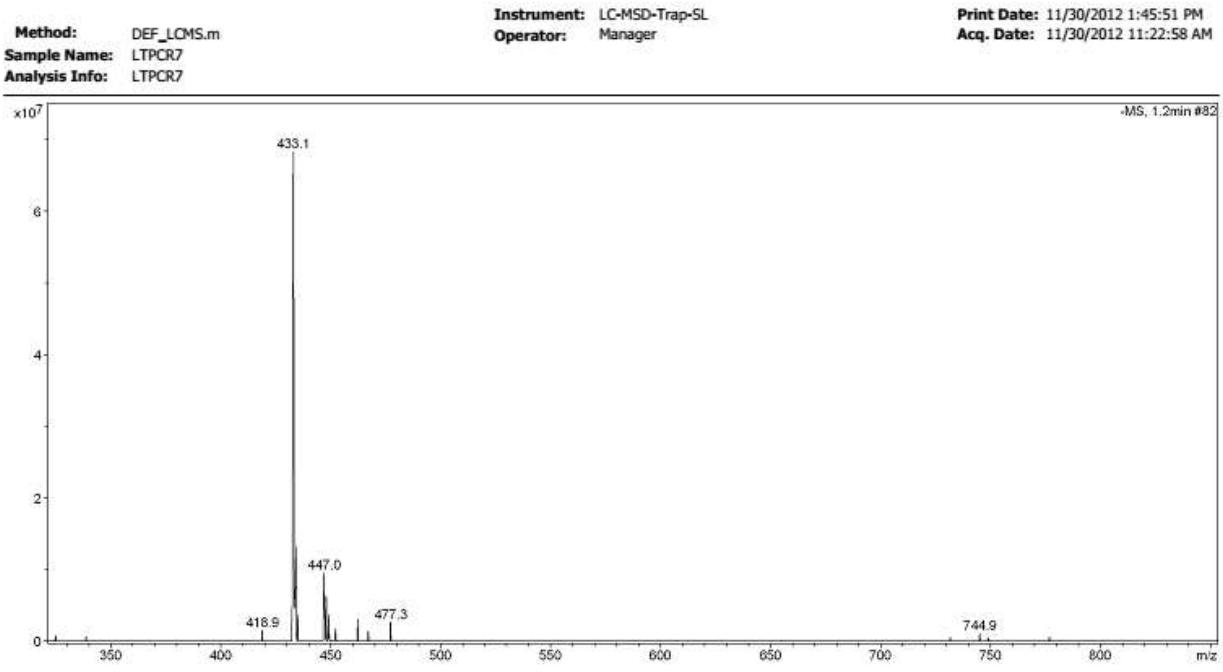
[Operation]
Threshold: 0.0010000
Points: 4
InterPolate: Disabled
Average: Disabled

No.	P/V	Wavelength	Abs.	Description
1	↑	376.50	0.034	
2	↑	295.00	0.263	
3	↑	273.50	0.259	
4	↑	265.50	0.283	
5	↑	217.00	2.984	

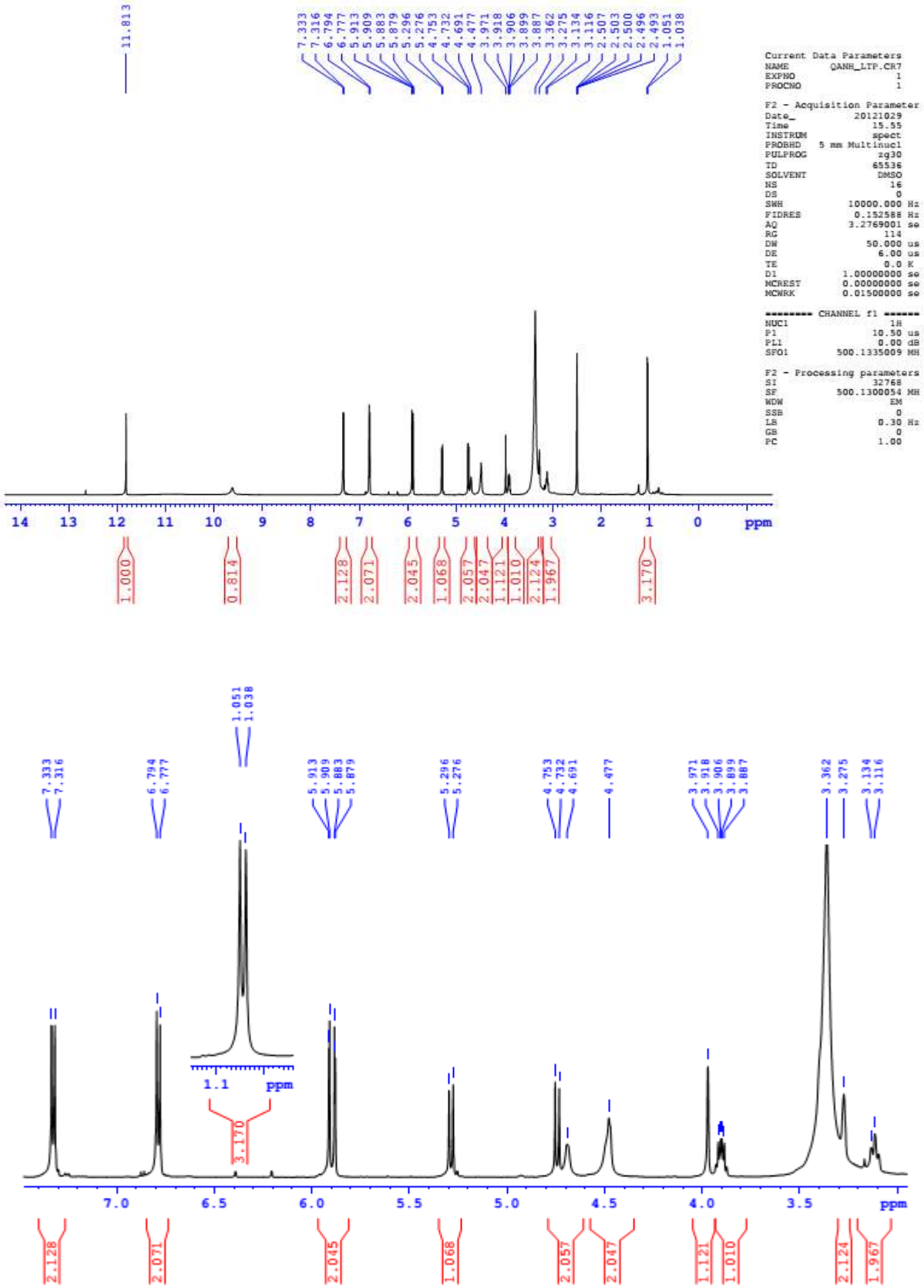
PHỔ IR



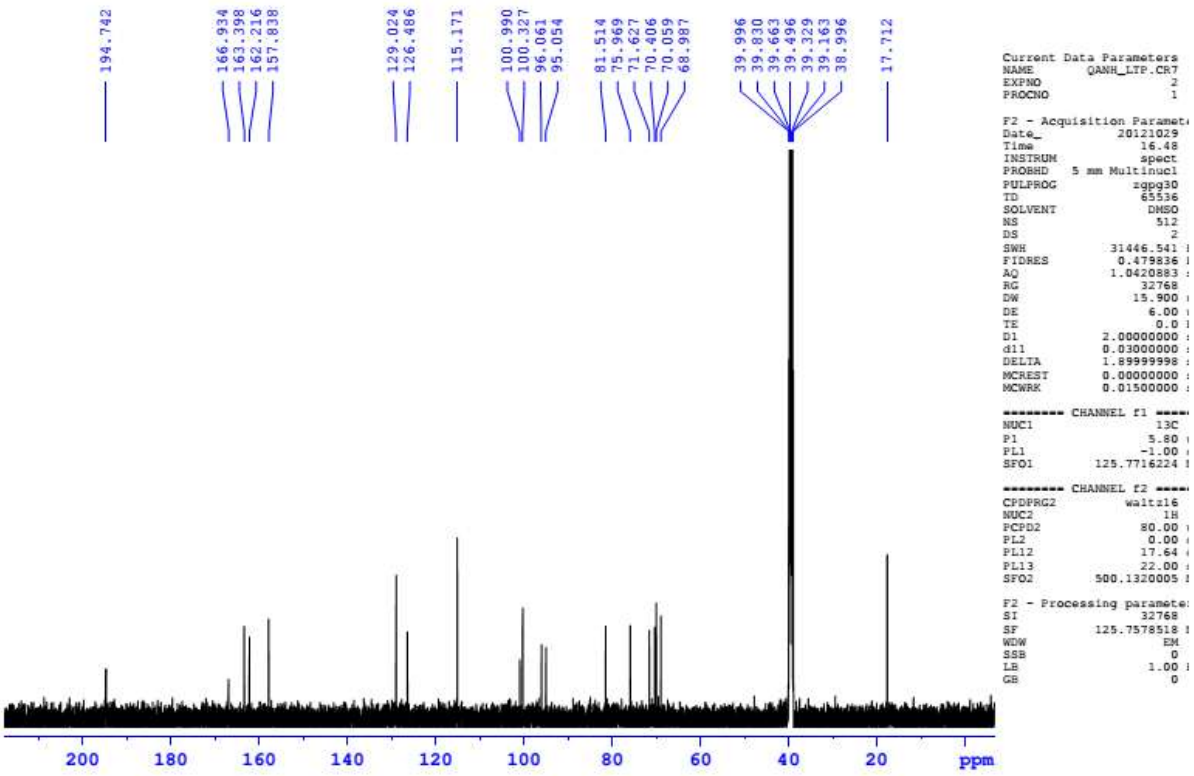
PHỔ ESI-MS



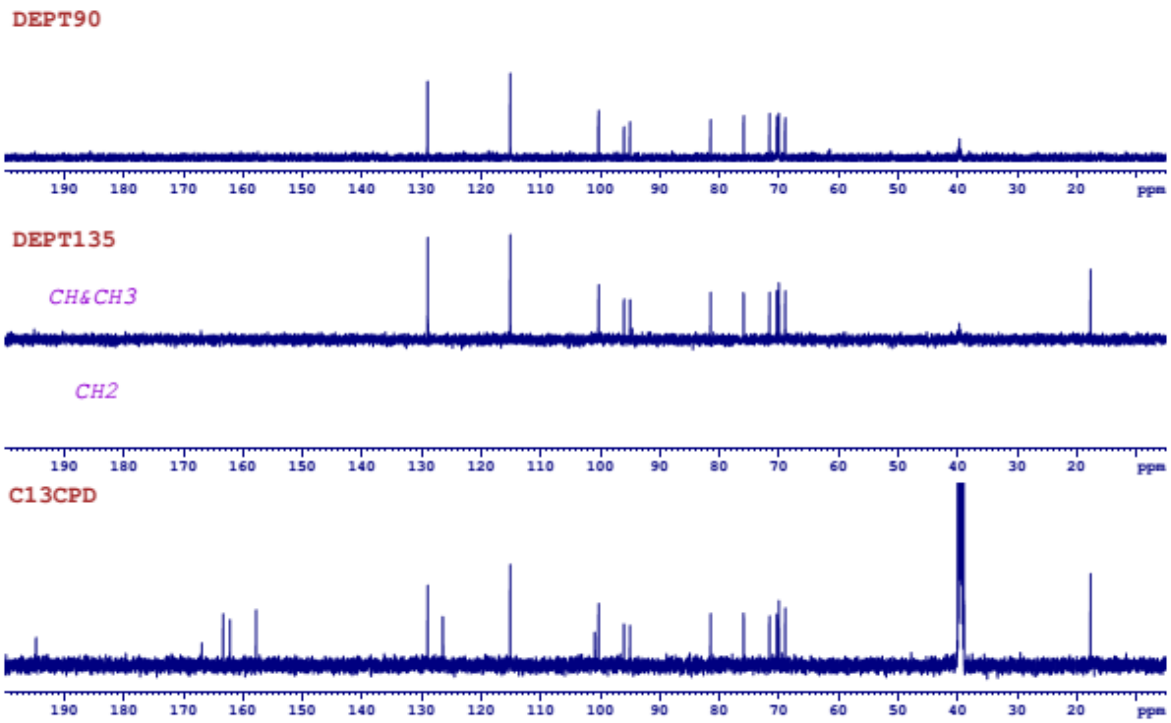
PHỔ ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6)



PHỔ ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO-d_6)



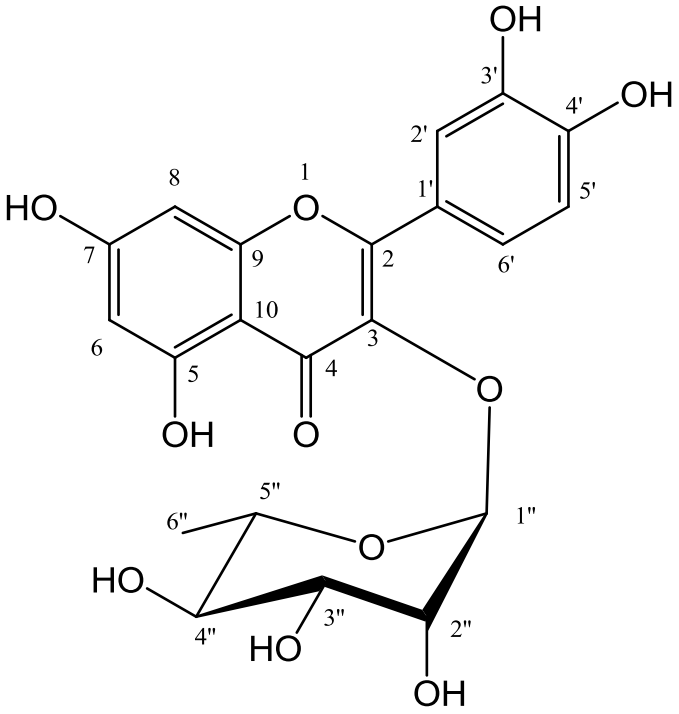
PHỔ DEPT (DMSO-d_6)



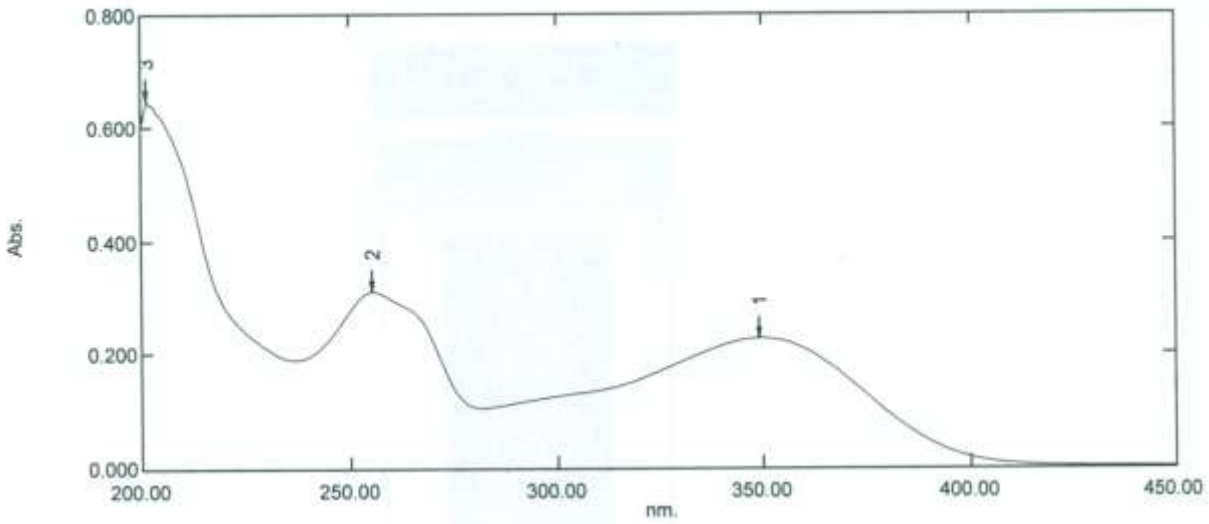
PHỤ LỤC 11

PHỔ CỦA HỢP CHẤT SL-9 [SR-9] (QUERCITRIN)

- **UV**
- **IR**
- **ESI-MS**
- **^{1}H NMR**
- **^{13}C NMR**
- **DEPT**



PHỔ UV (MeOH)



[Measurement Properties]

Wavelength Range (nm.):	190.00 to 800.00
Scan Speed:	Fast
Sampling Interval:	0.5
Auto Sampling Interval:	Enabled
Scan Mode:	Single

[Instrument Properties]

Instrument Type:	UV-1800 Series
Measuring Mode:	Absorbance
Slit Width:	1.0 nm
Light Source Change Wavelength:	340.0 nm
S/R Exchange:	Normal

[Attachment Properties]

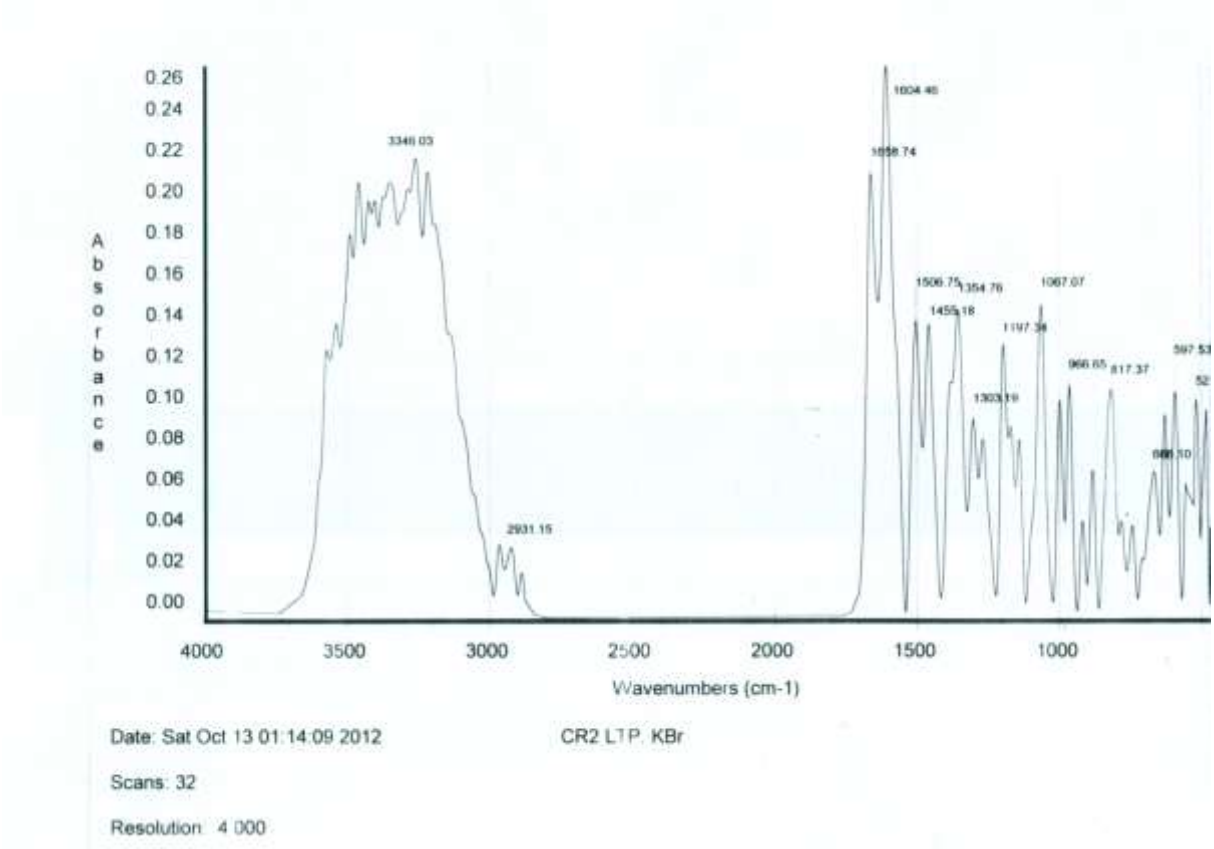
Attachment:	None

[Operation]

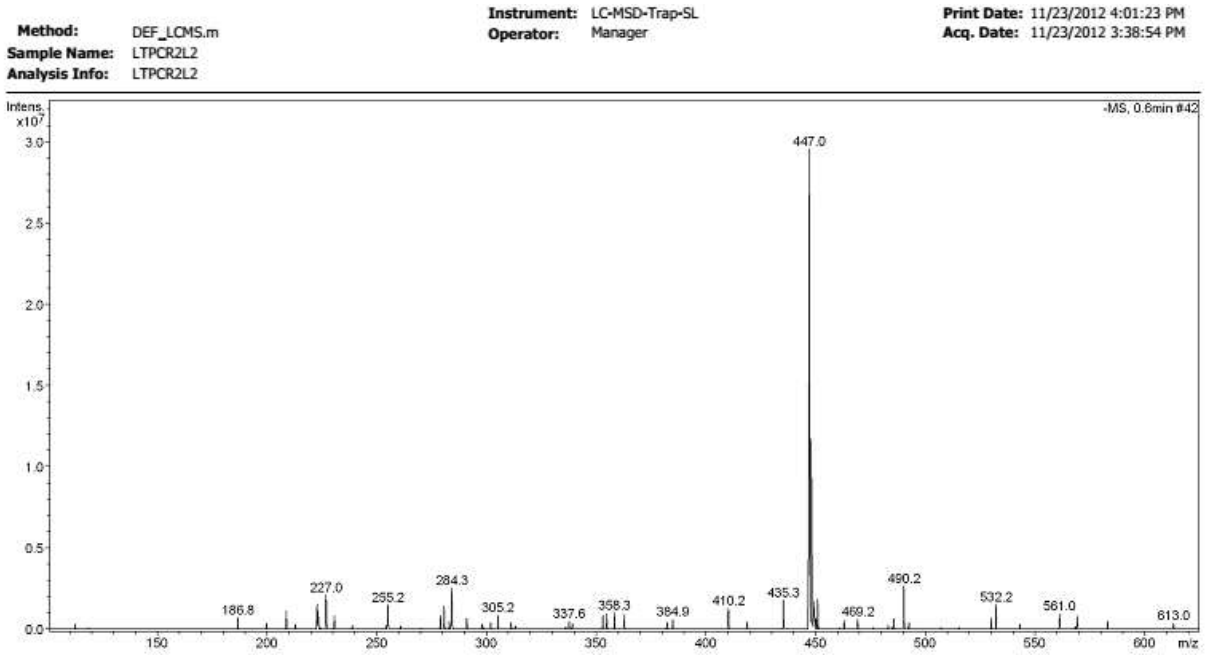
Threshold:	0.0010000

No.	P/V	Wavelength	Abs.	Description
1	⊕	349.00	0.228	
2	⊕	255.50	0.311	
3	⊕	201.50	0.650	

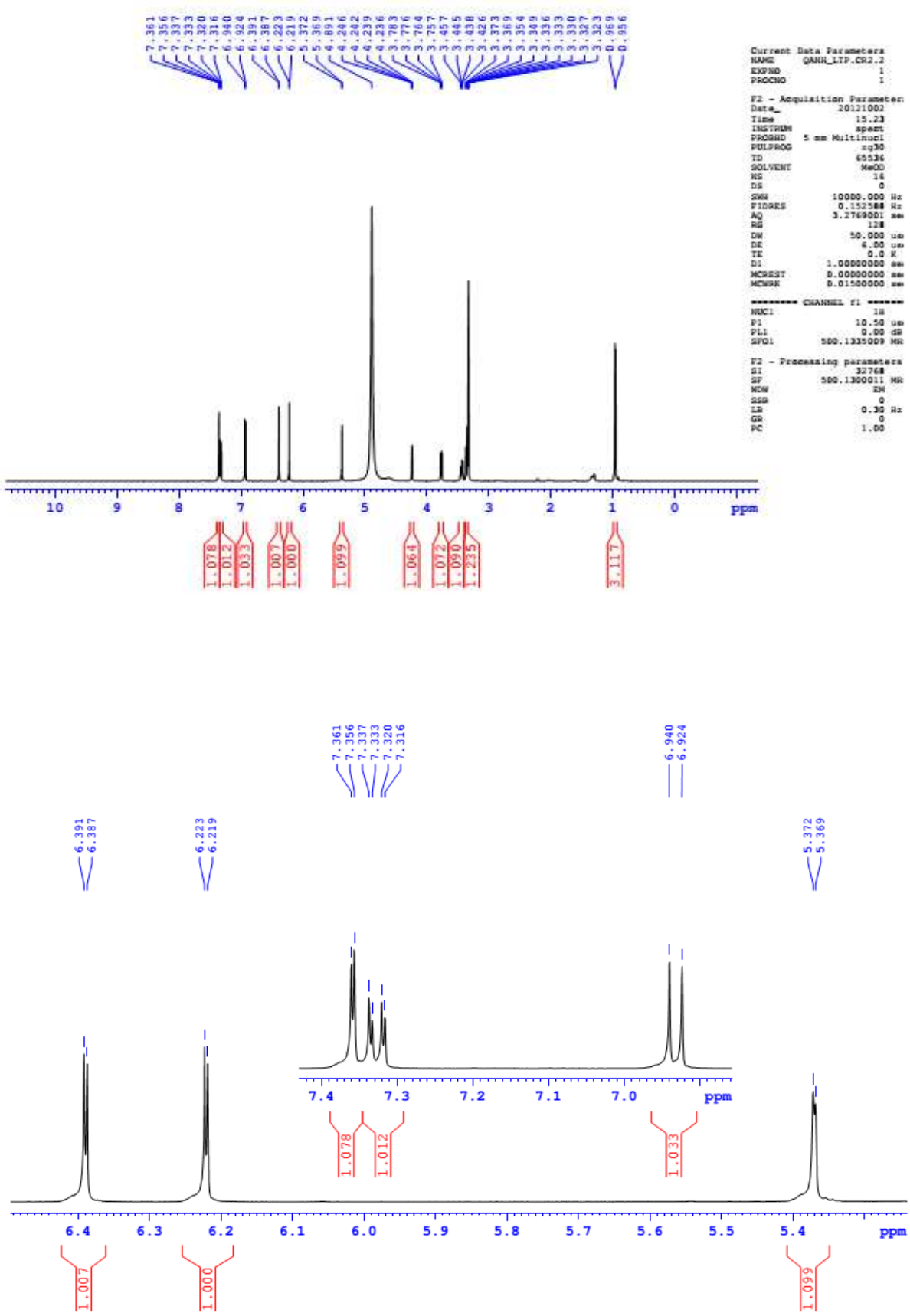
PHỔ IR

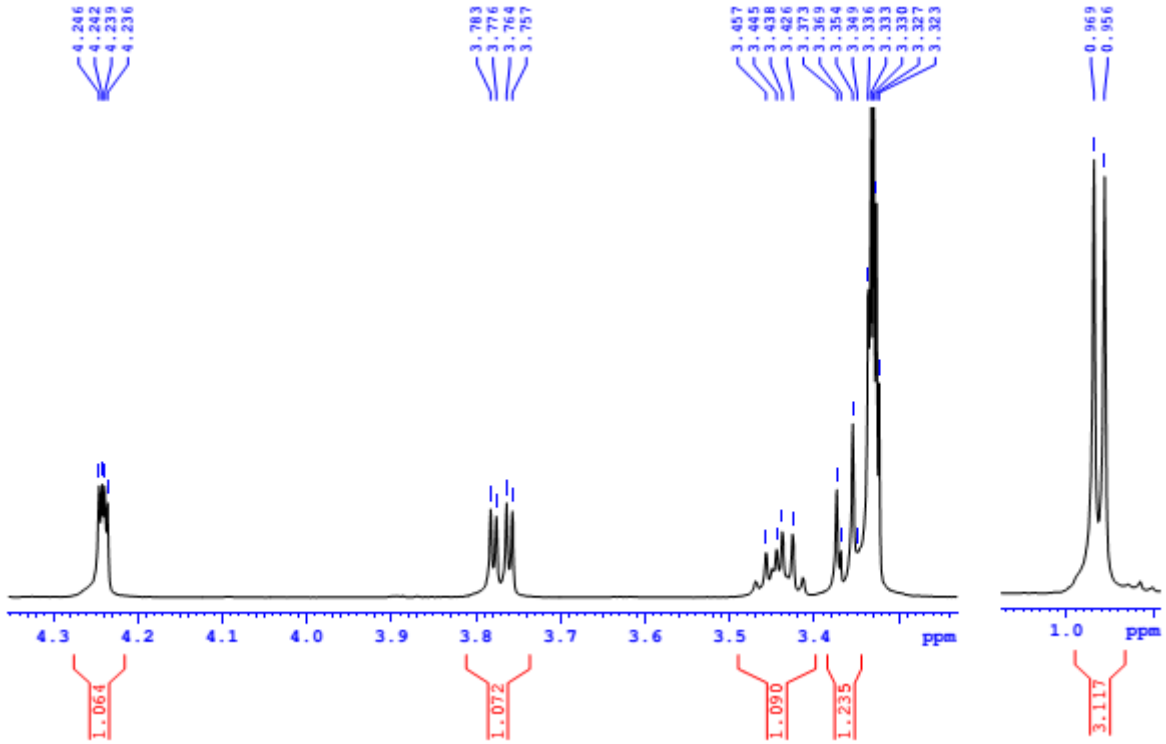


PHỔ ESI-MS

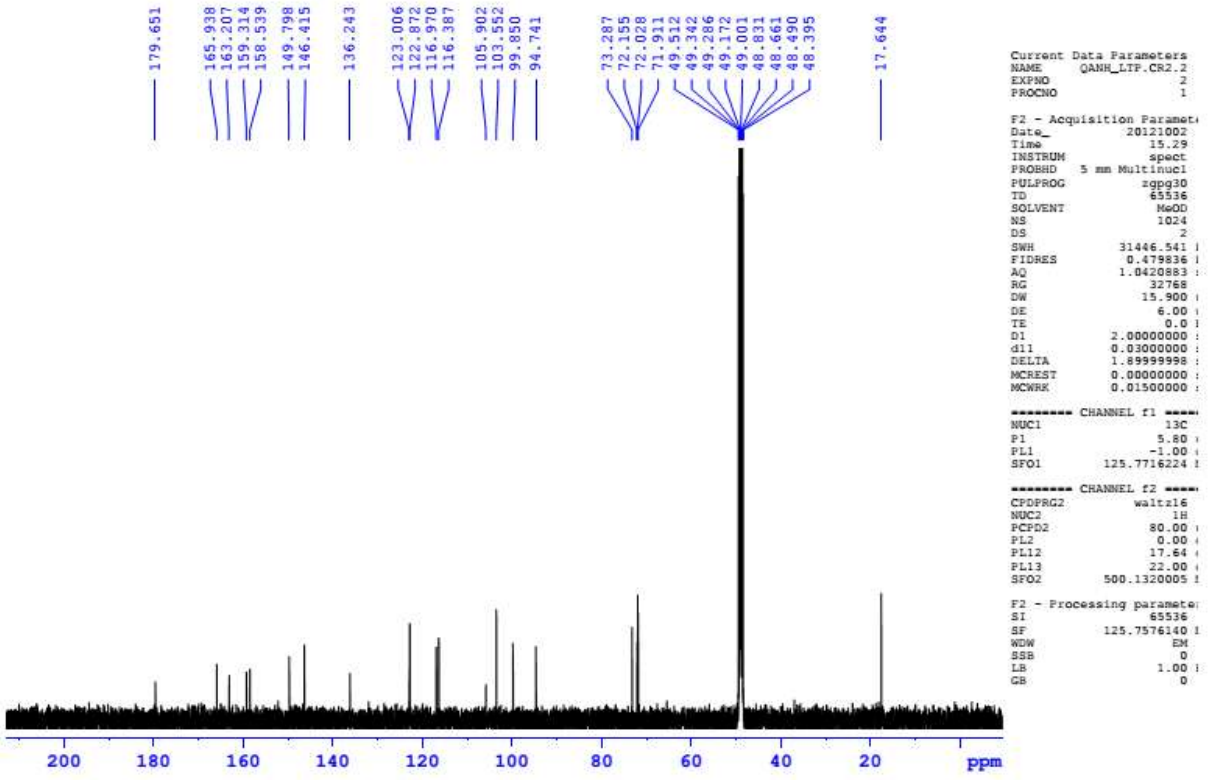


PHỔ ^{1}H NMR (500 MHz, CD_3OD)

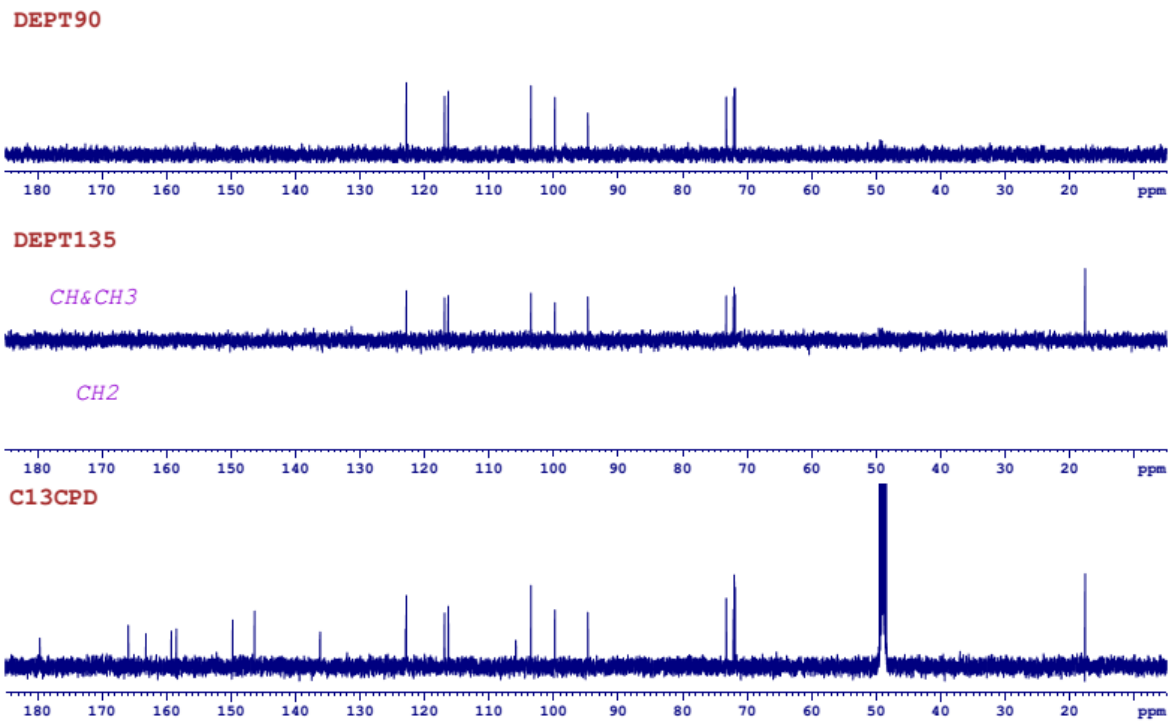




PHỔ ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD)



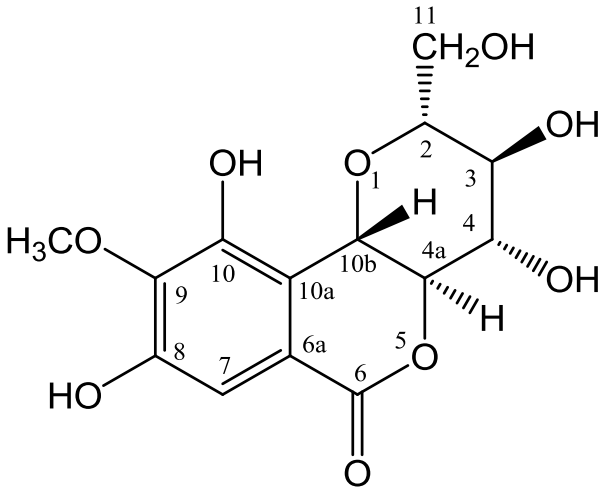
PHỔ DEPT (CD_3OD)



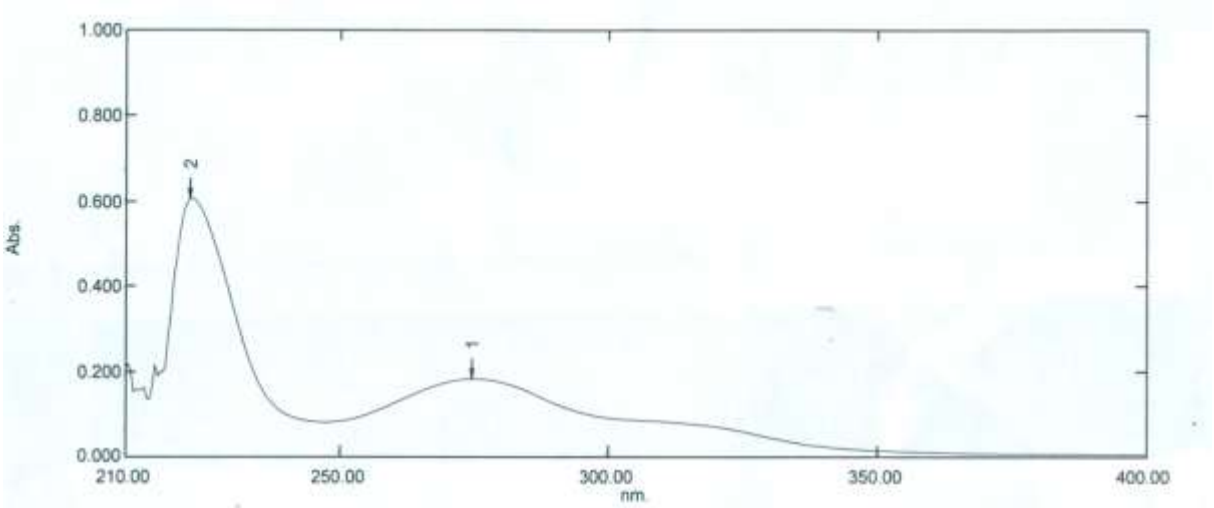
PHỤ LỤC 12

PHỔ CỦA HỢP CHẤT SL-10 [SR-10] (BERGENIN)

- **UV**
- **IR**
- **ESI-MS**
- **^{1}H NMR**
- **^{13}C NMR**
- **DEPT**
- **COSY**
- **HSQC**
- **HMBC**



PHỔ UV (MeOH)



[Measurement Properties]

Wavelength Range (nm.):	190.00 to 800.00
Scan Speed:	Medium
Sampling Interval:	0.5
Auto Sampling Interval:	Enabled
Scan Mode:	Single

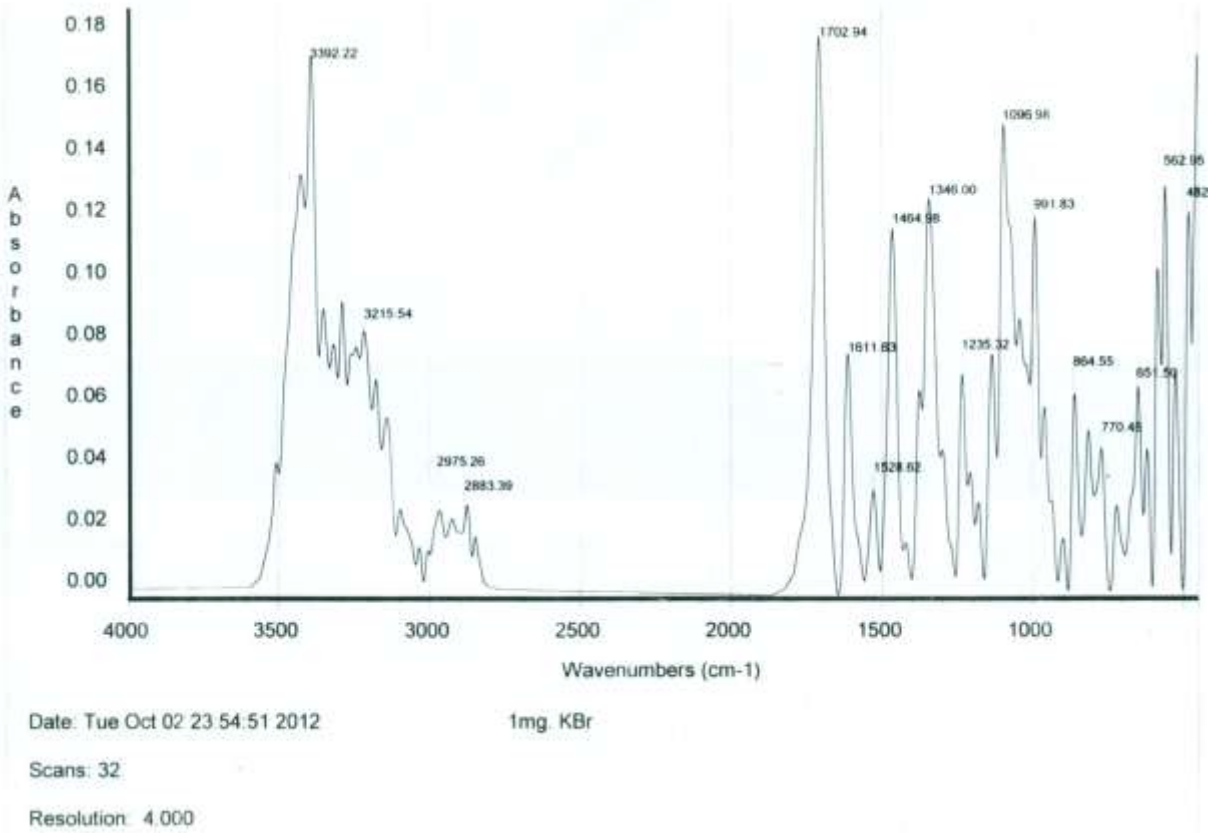
[Instrument Properties]

Instrument Type:	UV-1800 Series
Measuring Mode:	Absorbance
Slit Width:	1.0 nm
Light Source Change Wavelength:	340.0 nm
S/R Exchange:	Normal

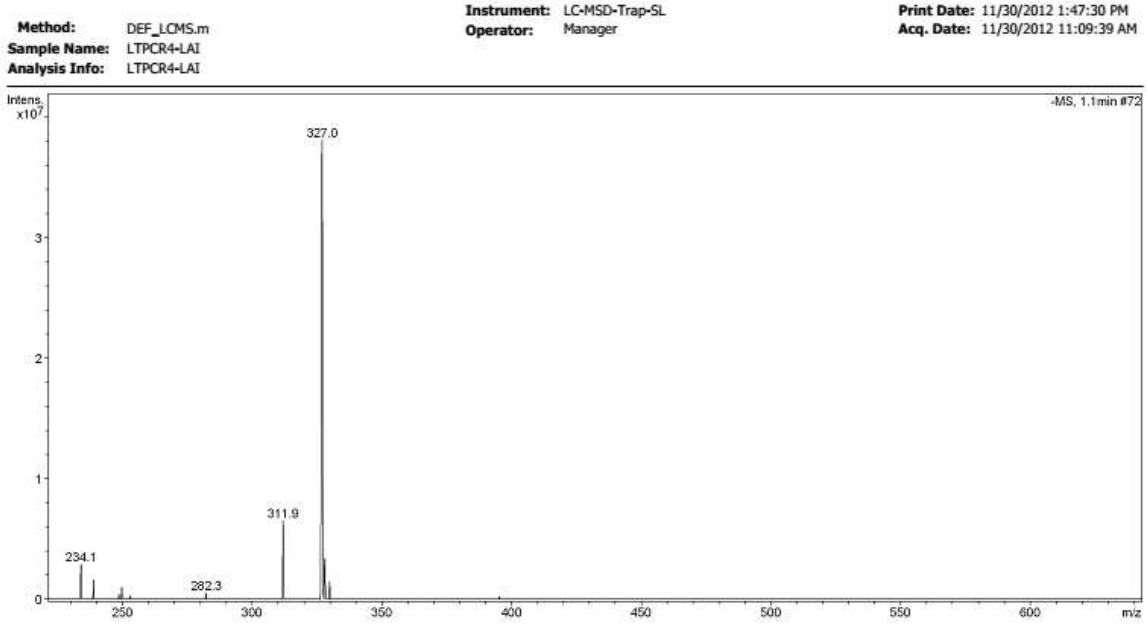
[Attachment Properties]

No.	P/V	Wavelength	Abs.	Description
1	P	274.50	0.182	
2	P	222.00	0.607	

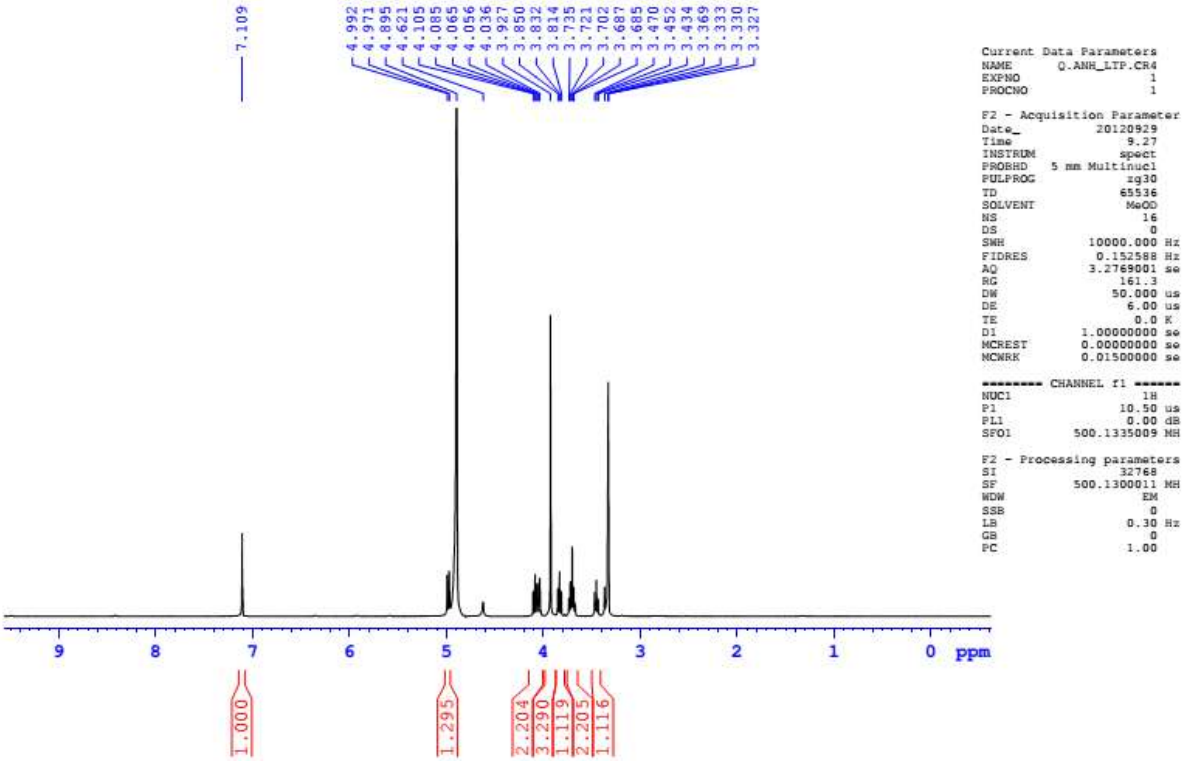
PHỔ IR

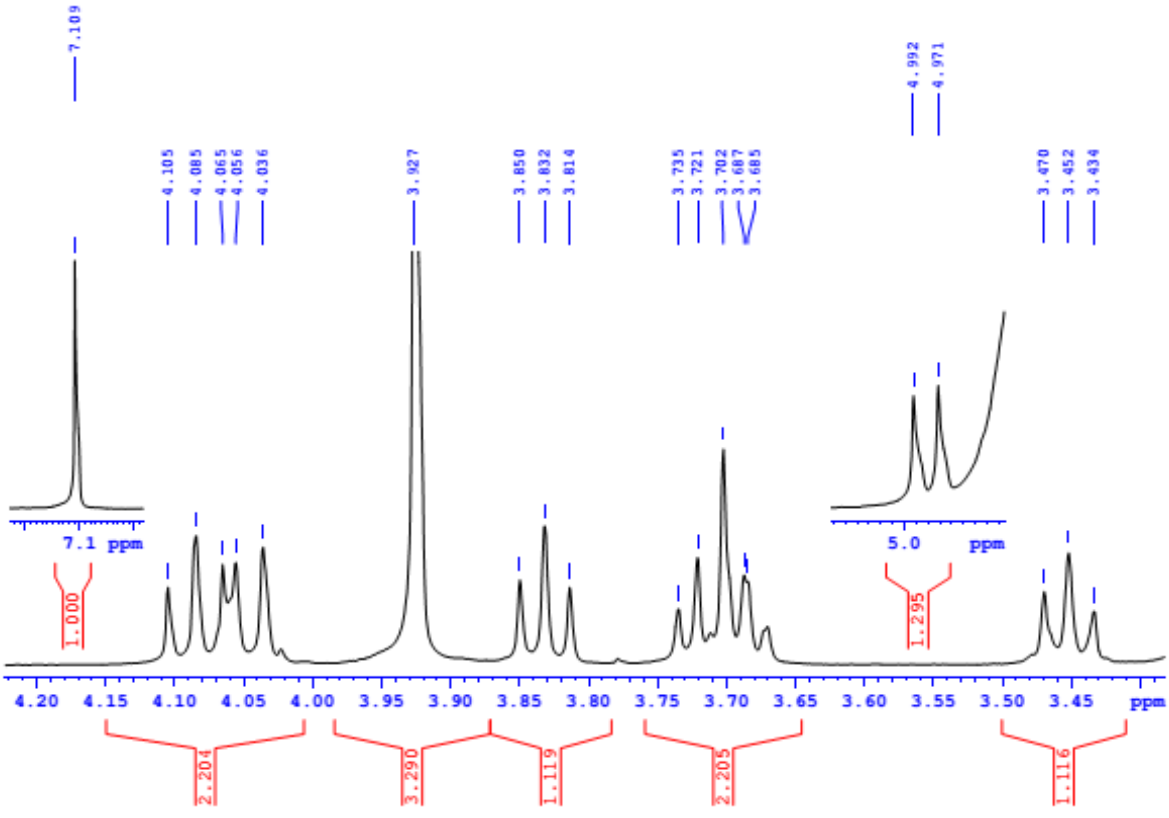


PHỔ ESI-MS

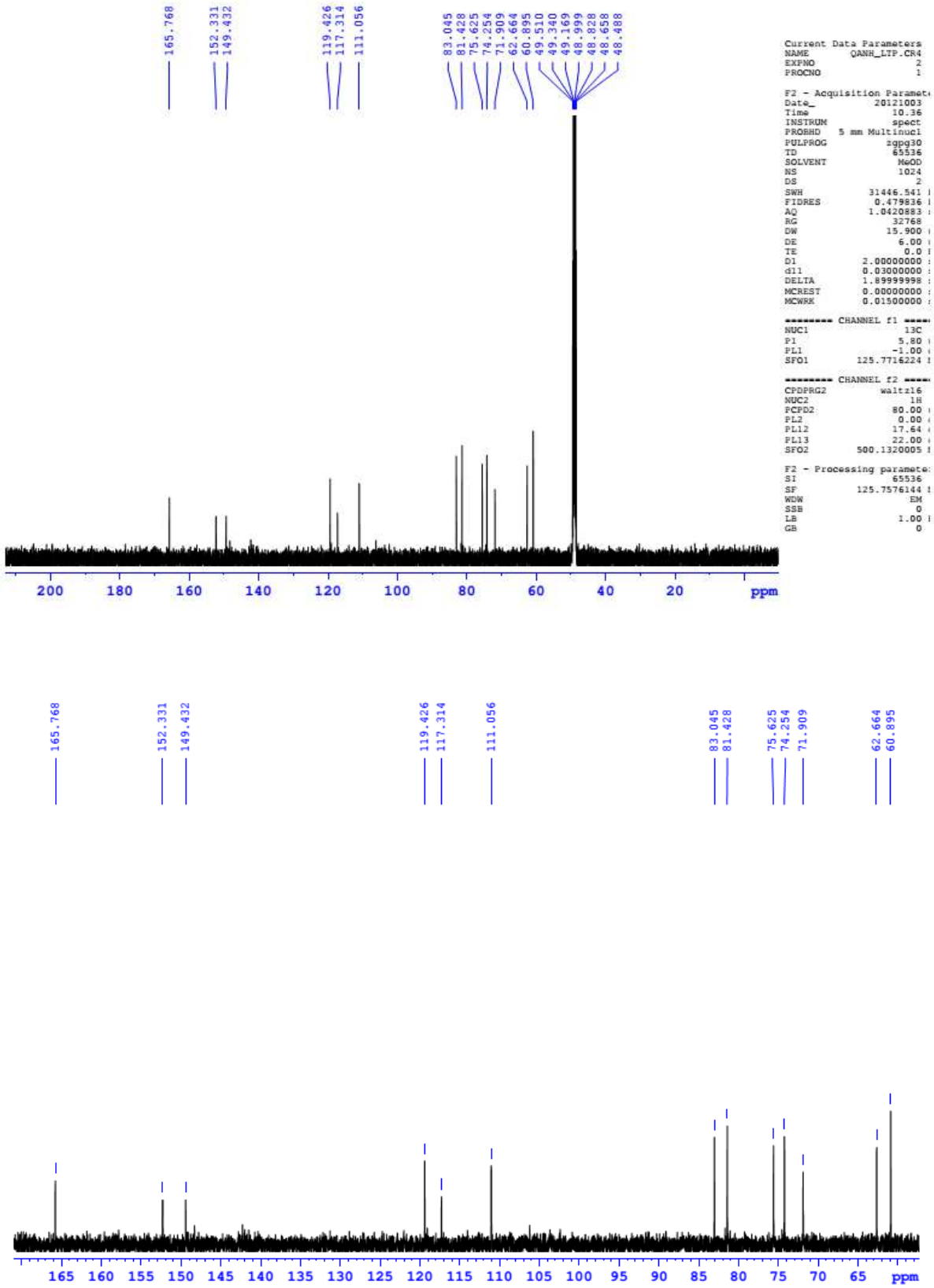


PHỔ ^{1}H NMR (500 MHz, CD_3OD)

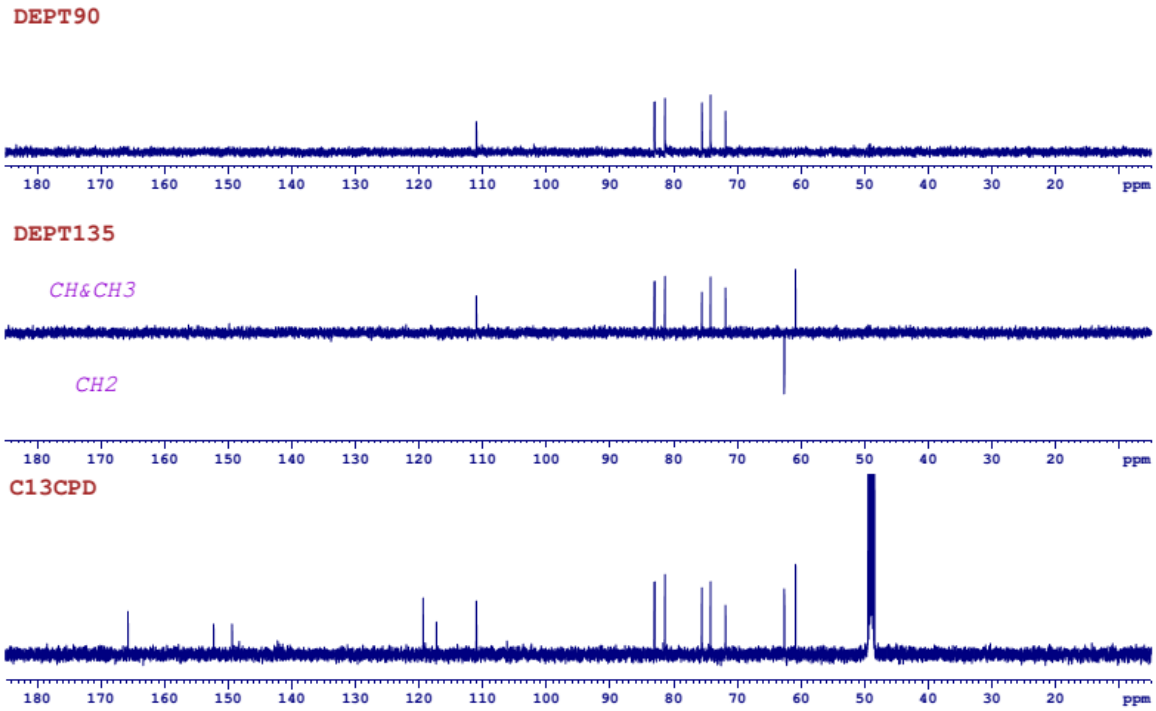


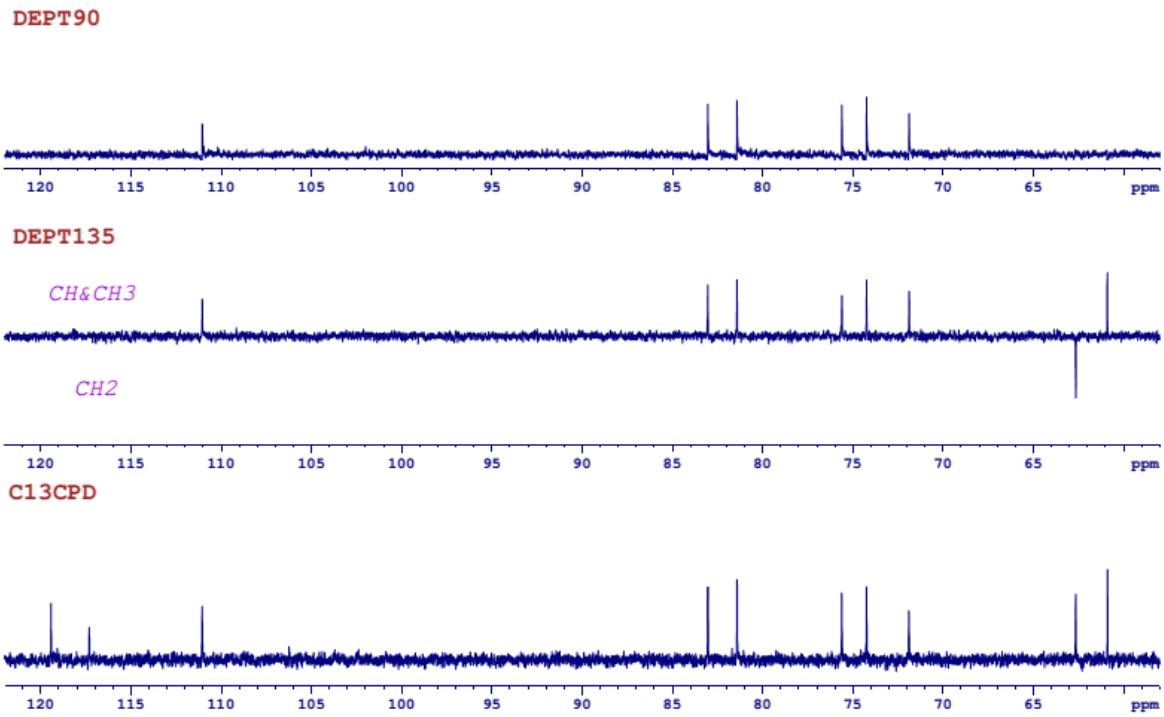


PHỔ ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD)

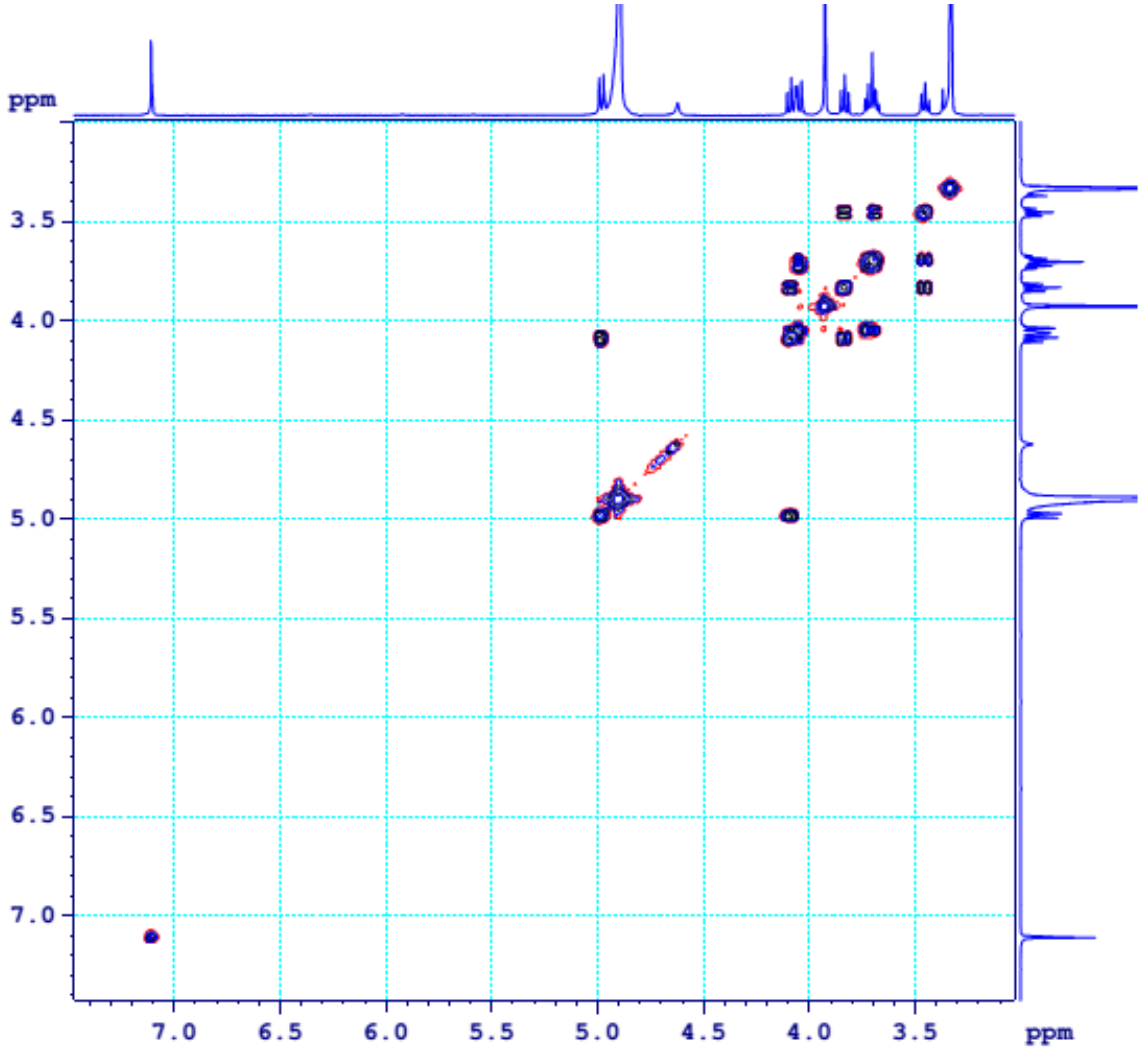


PHỔ DEPT (CD_3OD)

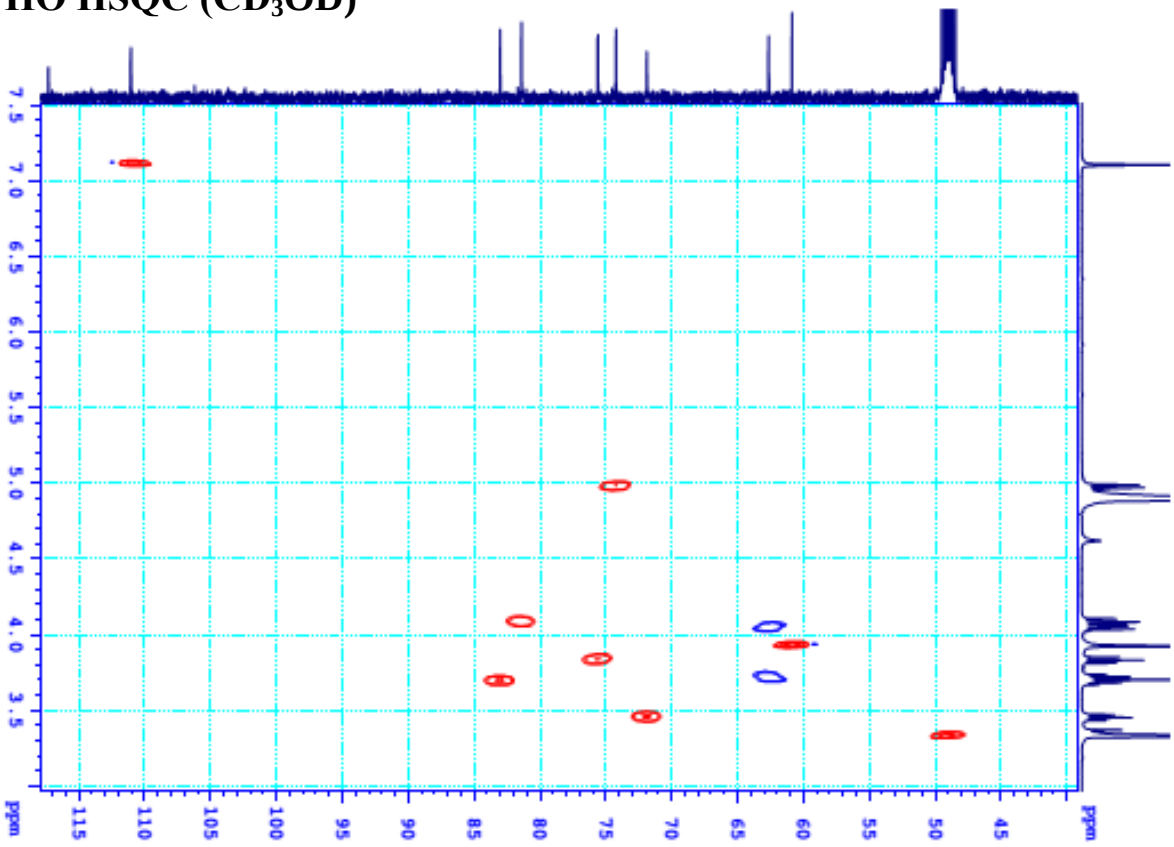




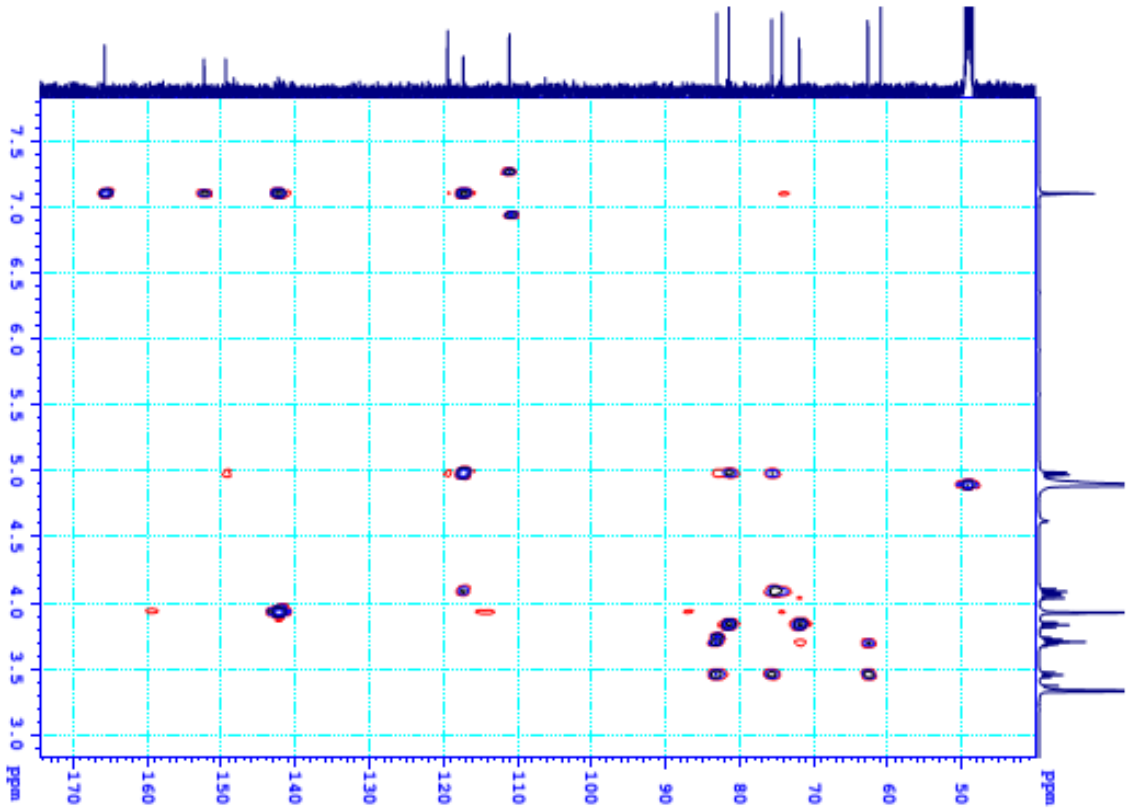
PHỔ COSY (CD_3OD)



PHỔ HSQC (CD_3OD)



PHỔ HMBC (CD_3OD)

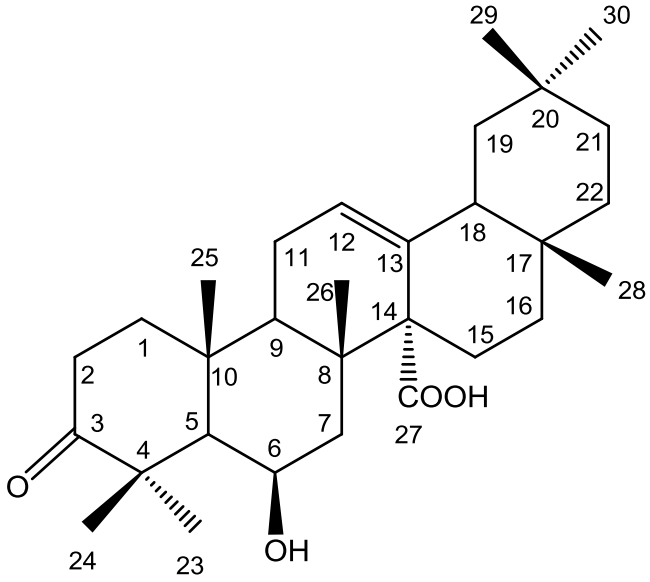


PHỤ LỤC 13

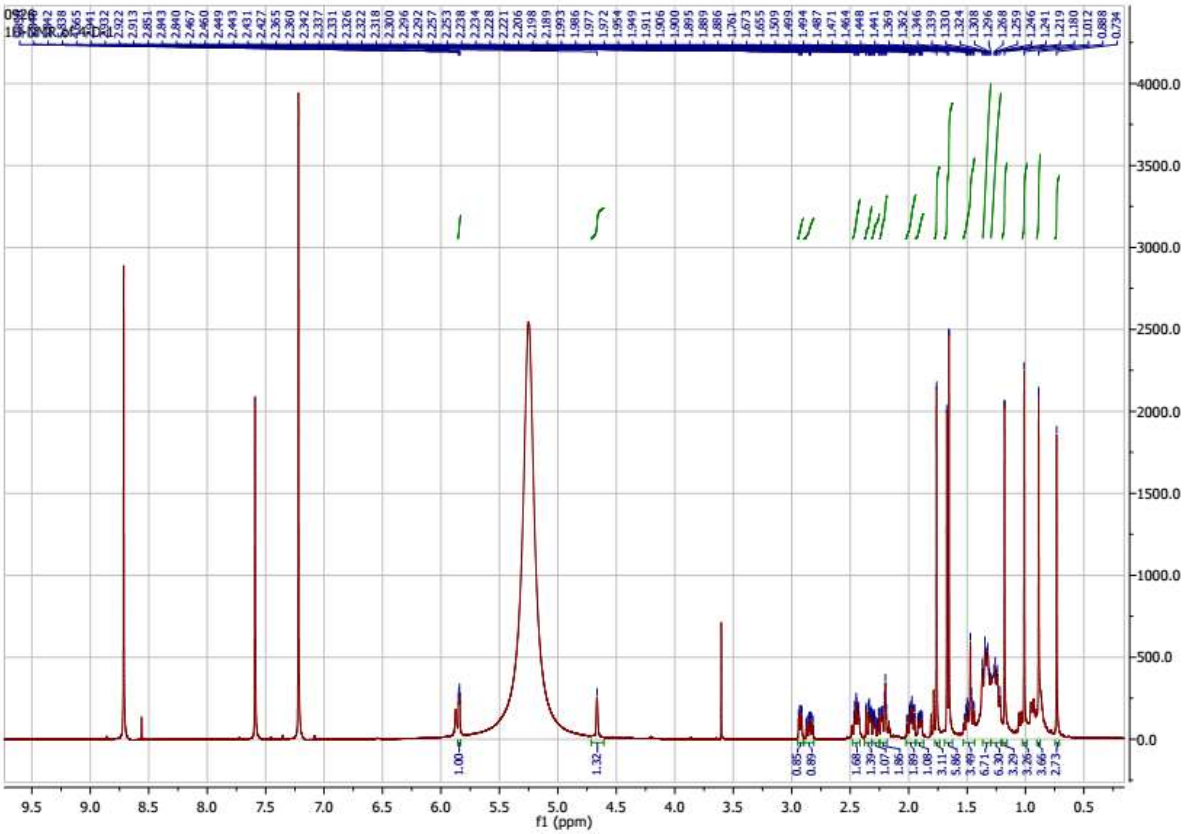
PHỔ CỦA HỢP CHẤT SR-1

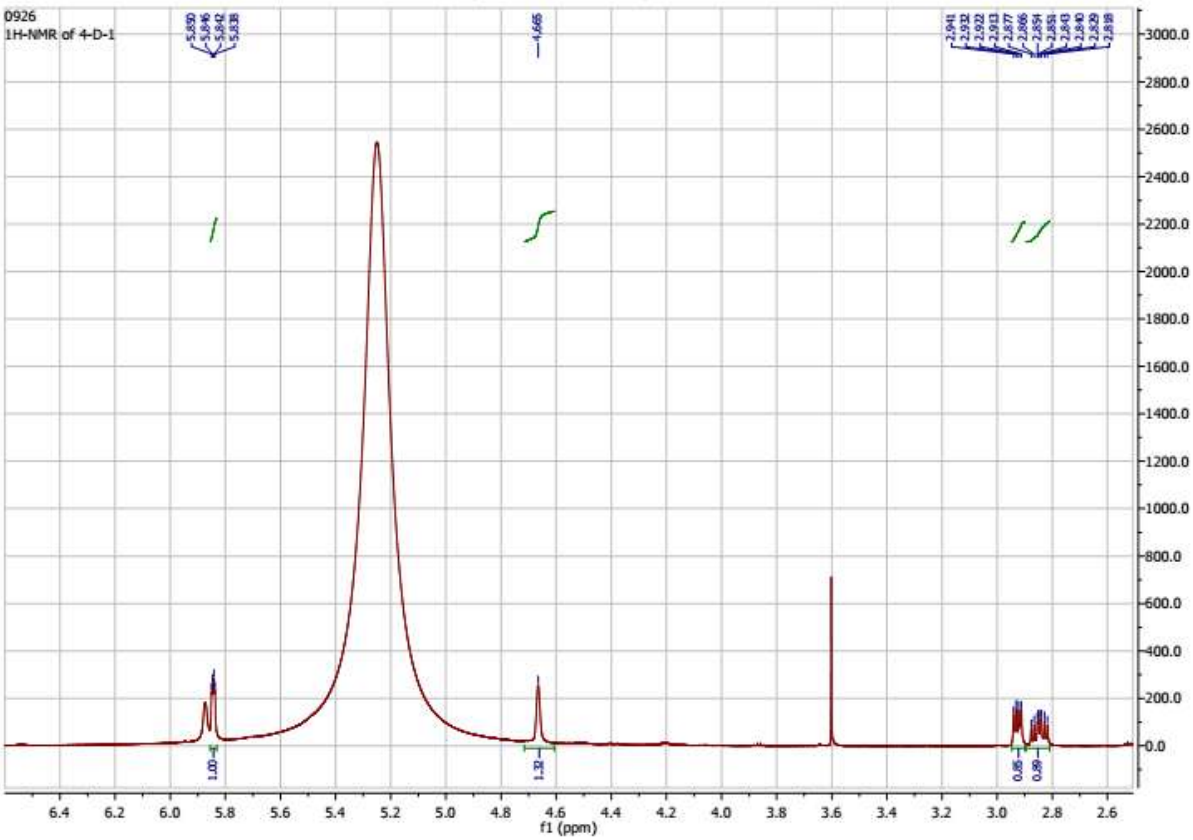
(ACID 6β-HYDROXY,3-OXOOLEAN-12-EN-27-OIC)

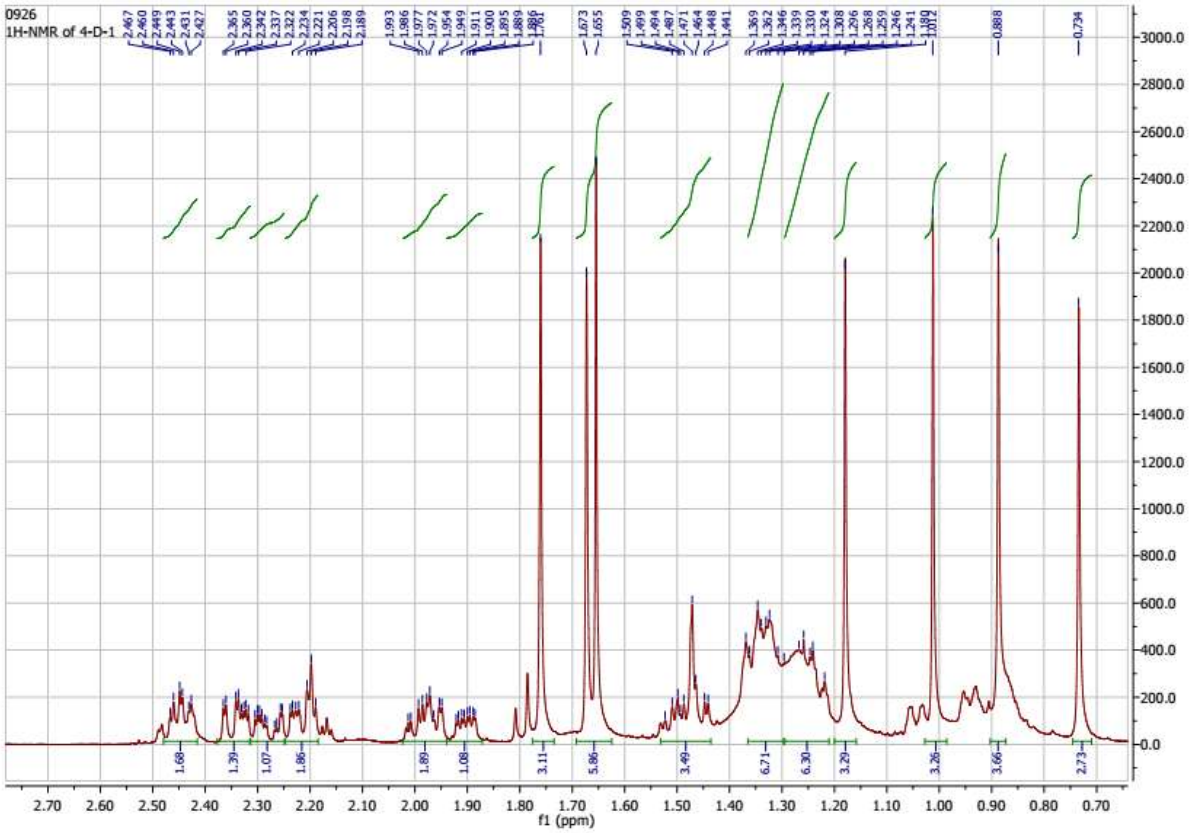
- **^{1}H NMR**
- **^{13}C NMR**
- **COSY**
- **NOESY**
- **HMQC**
- **HMBC**



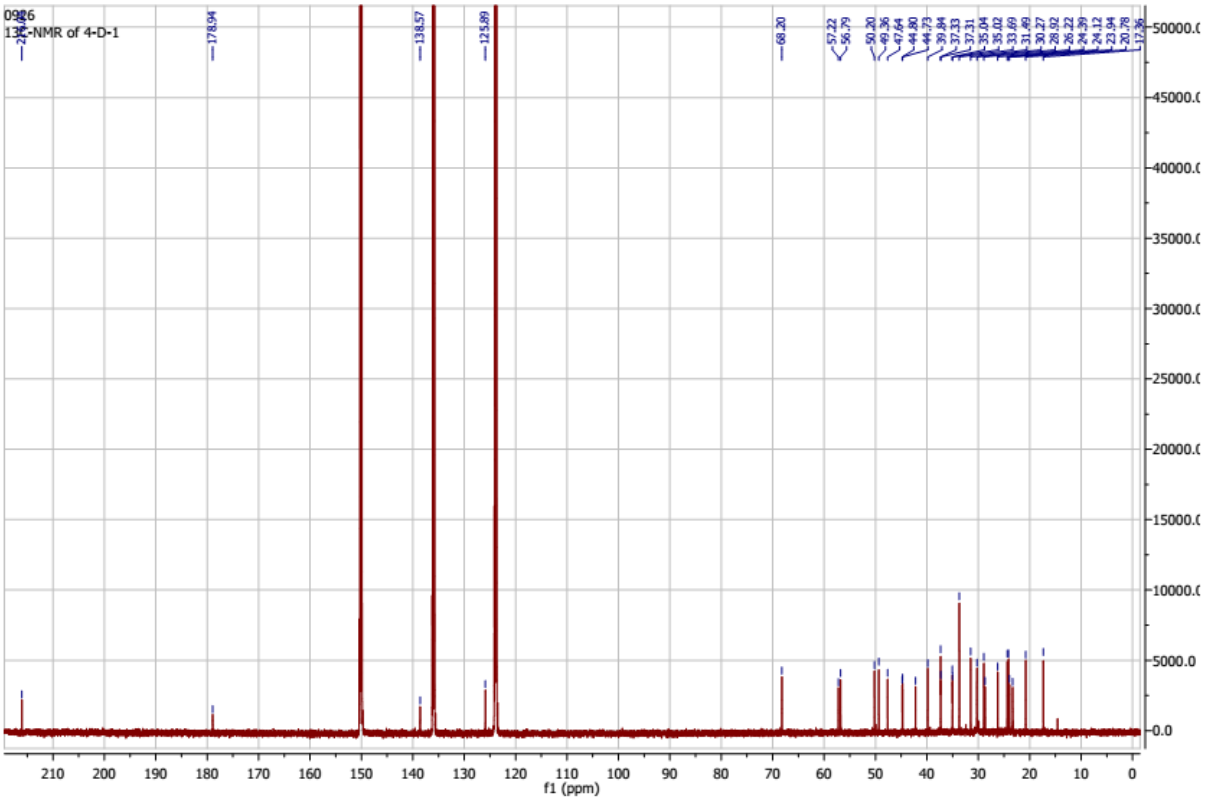
PHỔ ^{1}H NMR (600 MHz, C_5D_5N)

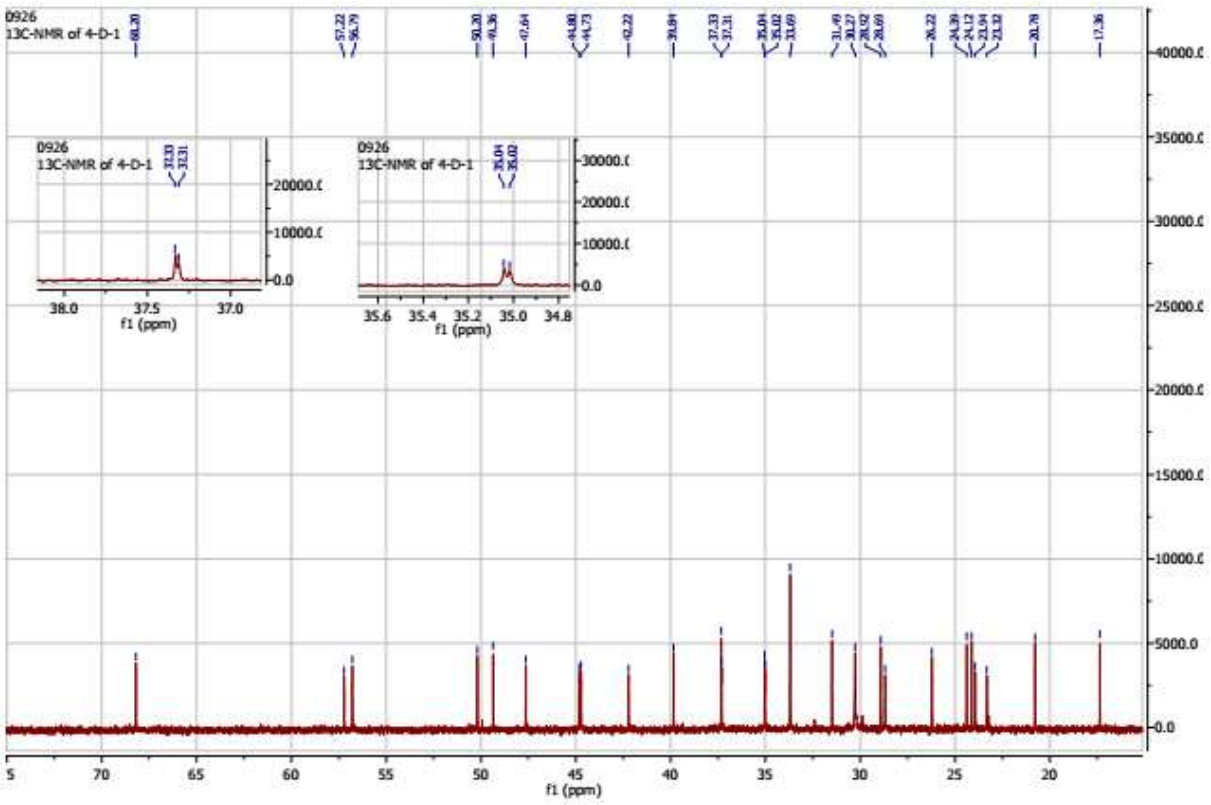




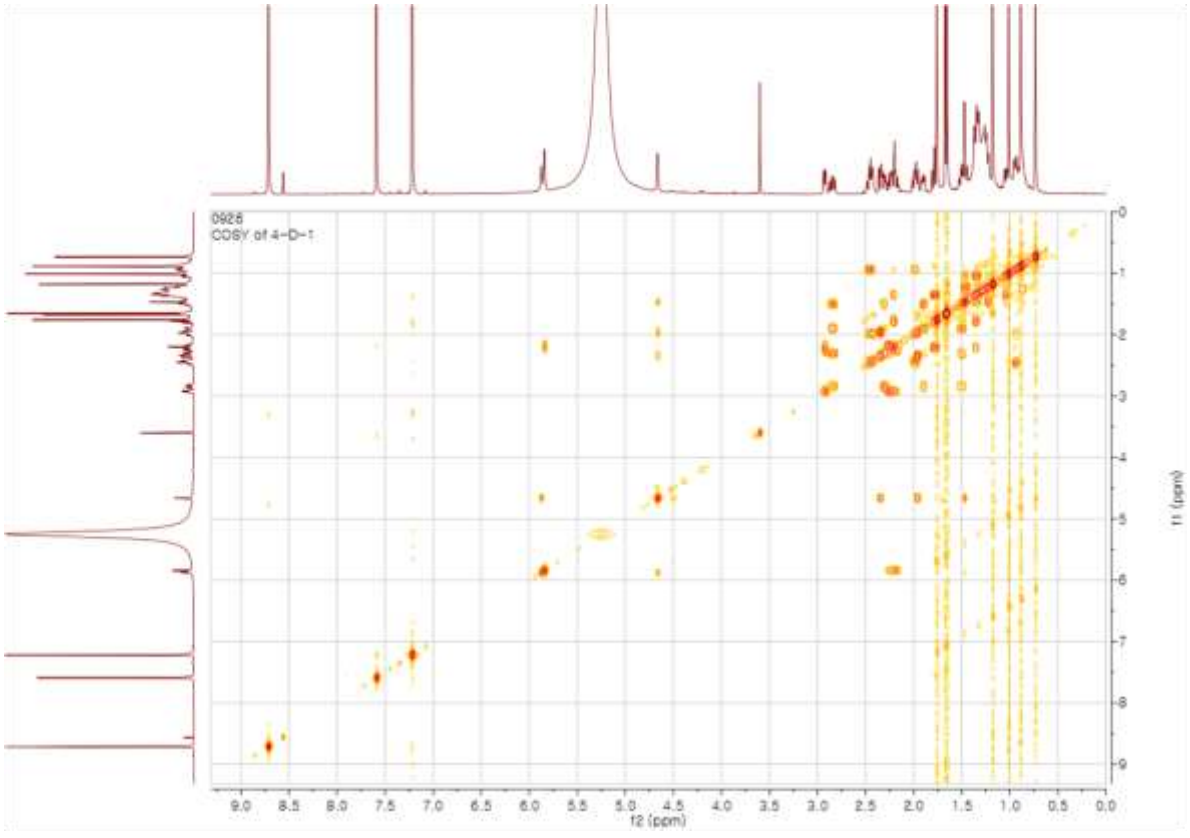


PHỔ ^{13}C NMR (150 MHz, C_5D_5N)

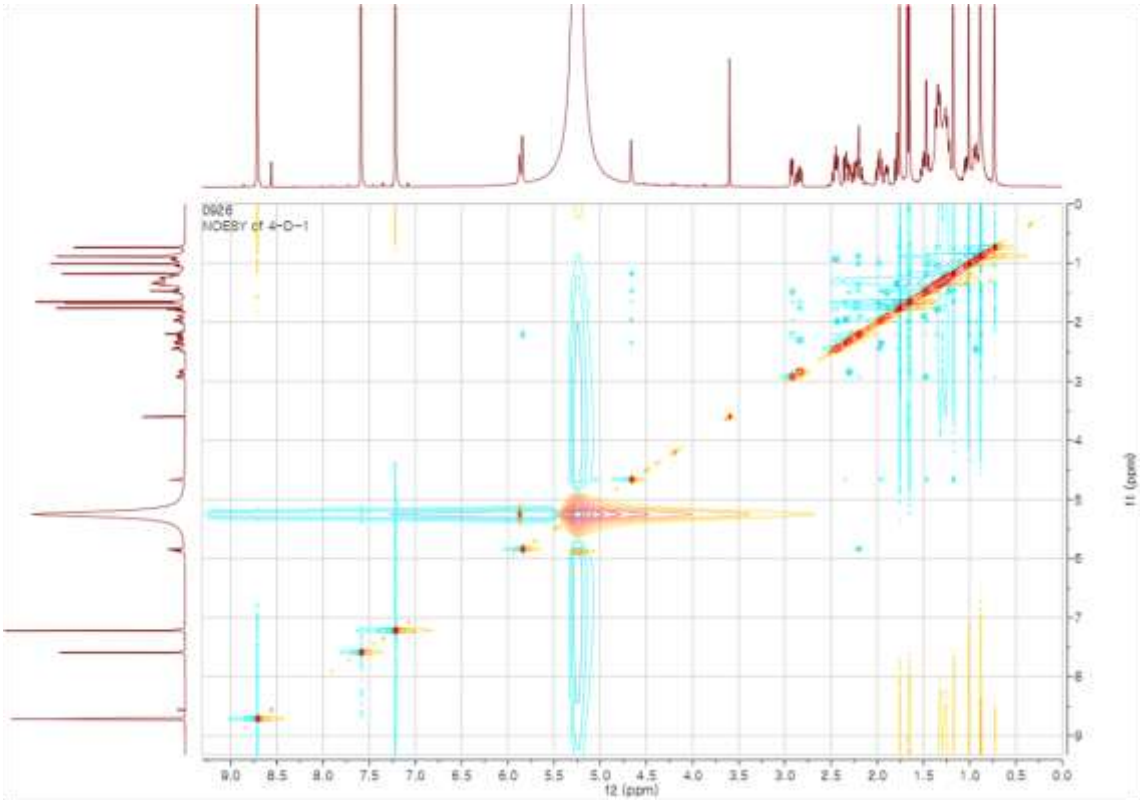




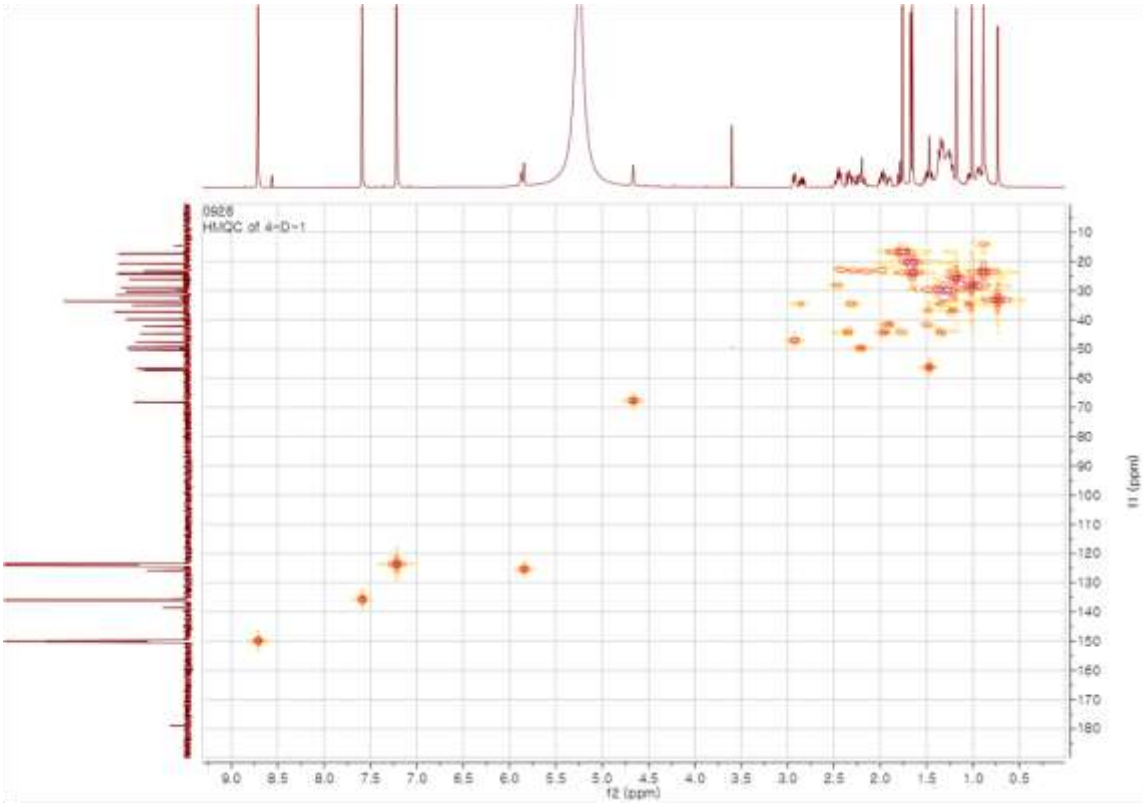
PHỔ COSY (C_5D_5N)



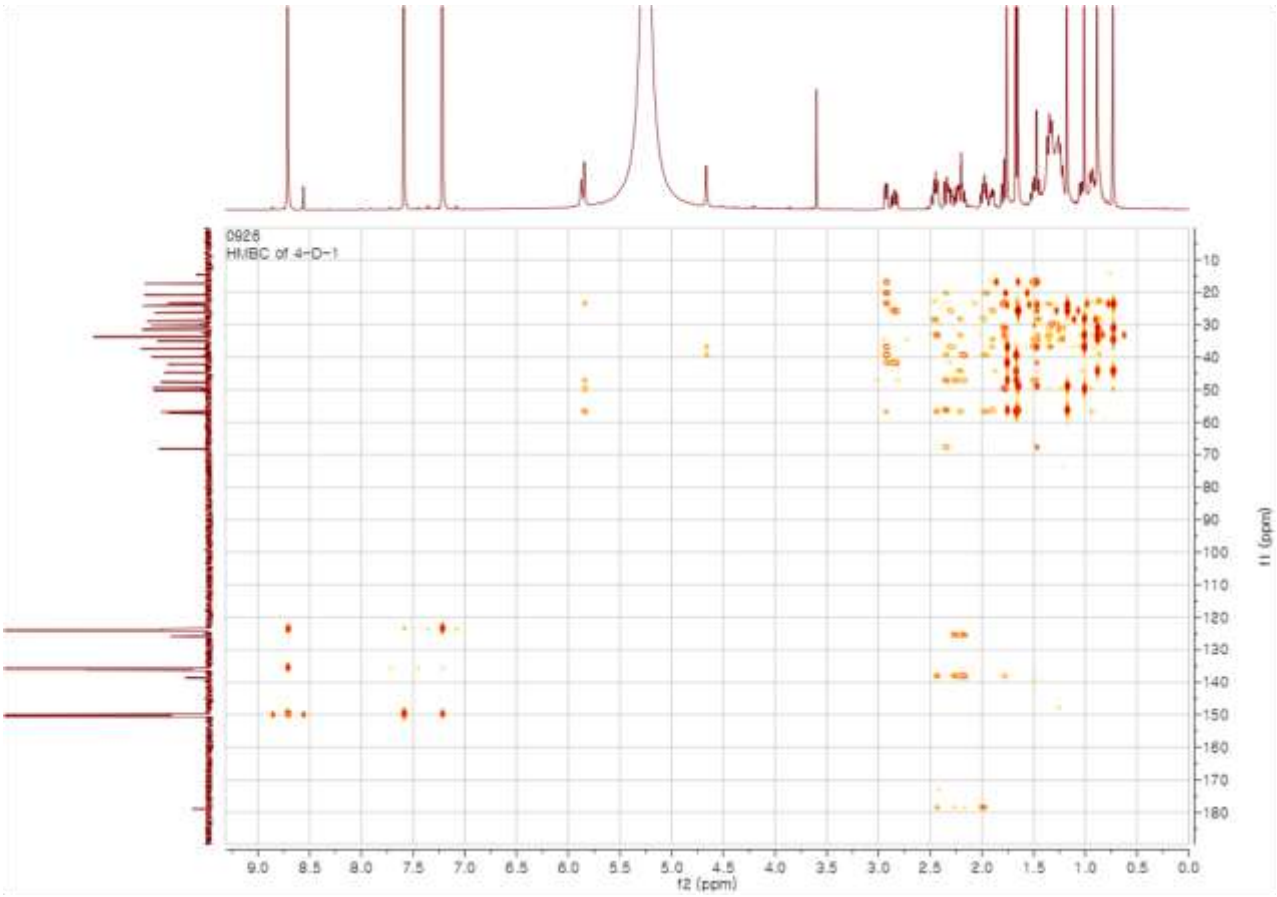
PHỔ NOESY (C_5D_5N)



PHỔ HMQC (C_5D_5N)



PHỔ HMBC (C_5D_5N)

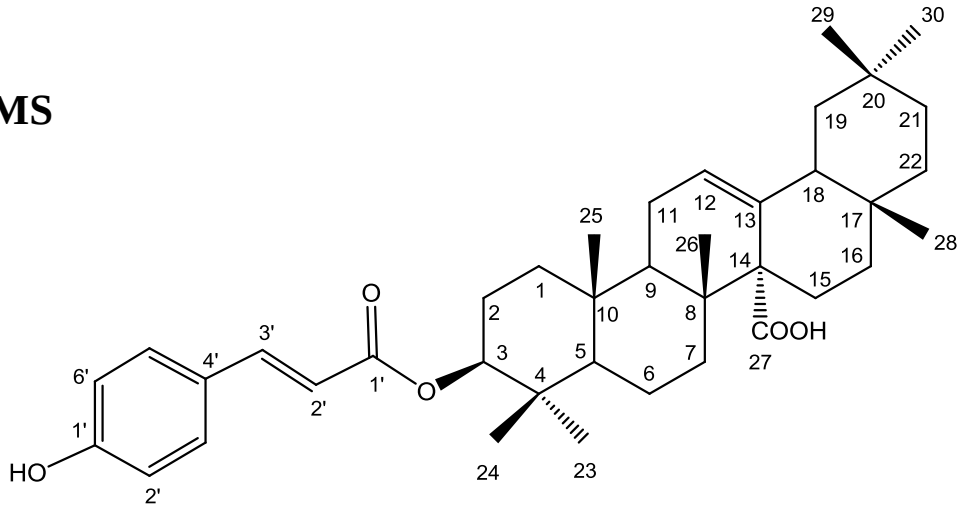


PHỤ LỤC 14

PHỔ CỦA HỢP CHẤT SR-2

(ACID 3*β*-*trans*-*p*-COUMAROYLOXY-OLEAN-12-EN-27-OIC)

- **HPLC**
- **IR**
- **HR-ESI-MS**
- **^{1}H NMR**
- **^{13}C NMR**
- **COSY**
- **NOESY**
- **HMQC**
- **HMBC**



SẮC KÝ ĐỒ HPLC

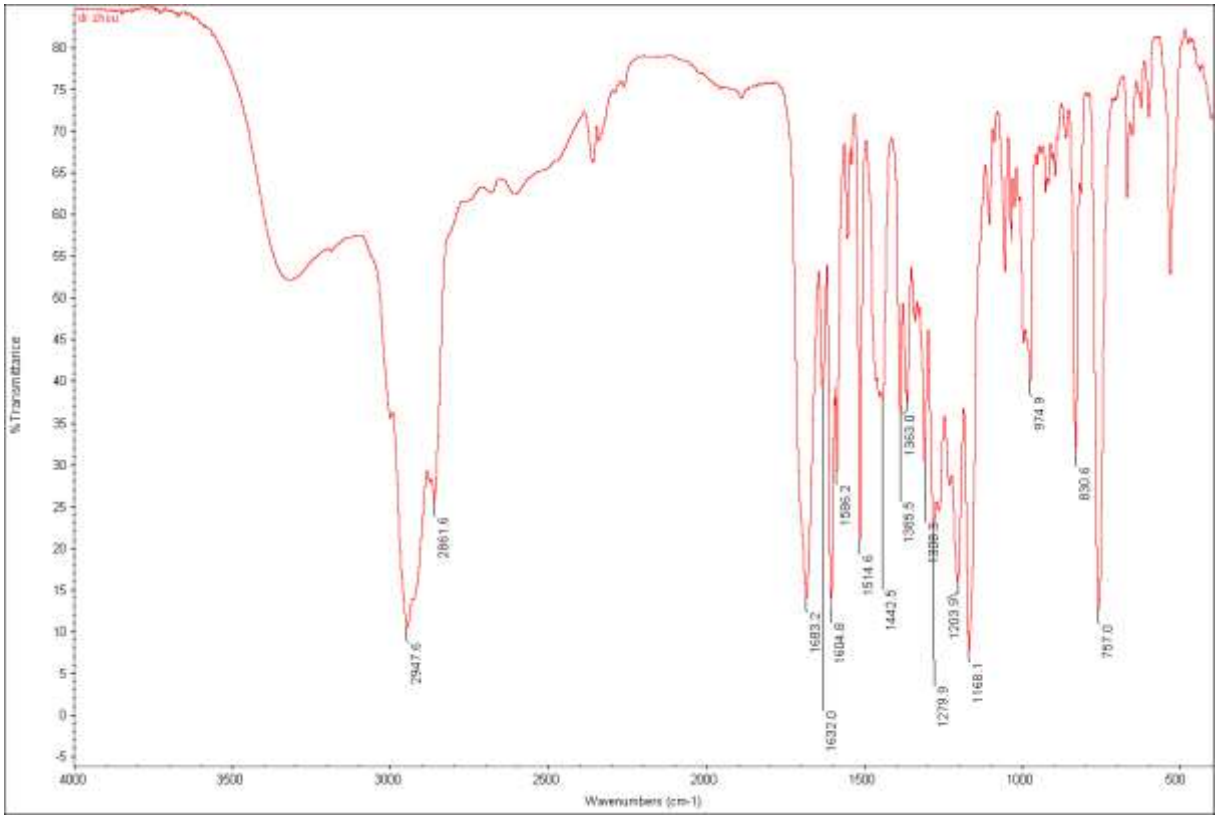
Sample Name: Compound 1

Equipment Name 506C System Interface
Column YMC Triart C18 (5 µm, 250 mm × 4.6mm)
Mobile Phase A: water B: MeOH
60%B →60%B
Run Time 30 min
Run Detector ELSD
Run Concentration 2 mg/mL
Run Volume 50 µl
Run Flow Rate 1 mL/min

Area Percent Report

Peak Name	Retention Time (min)	Area (uVmin×100)	Height (mV)	Area (%)
1	3.633	65989.167	25.621	0.712
2	4.386	9152962.5	328.384	98.692
3	5.916	55320	15.479	0.596
Totals		9274271.667	369.484	

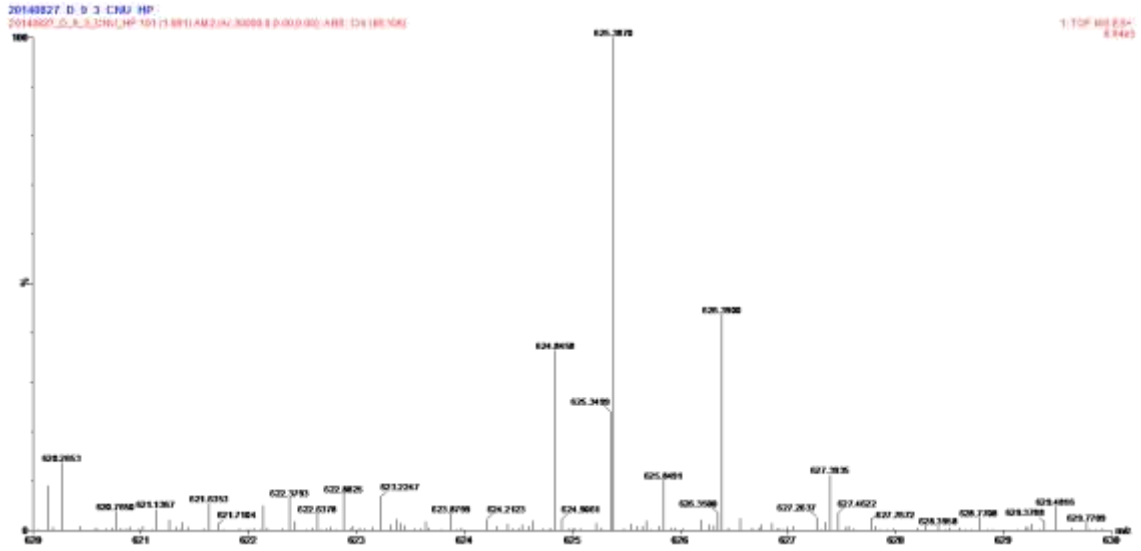
PHỔ IR



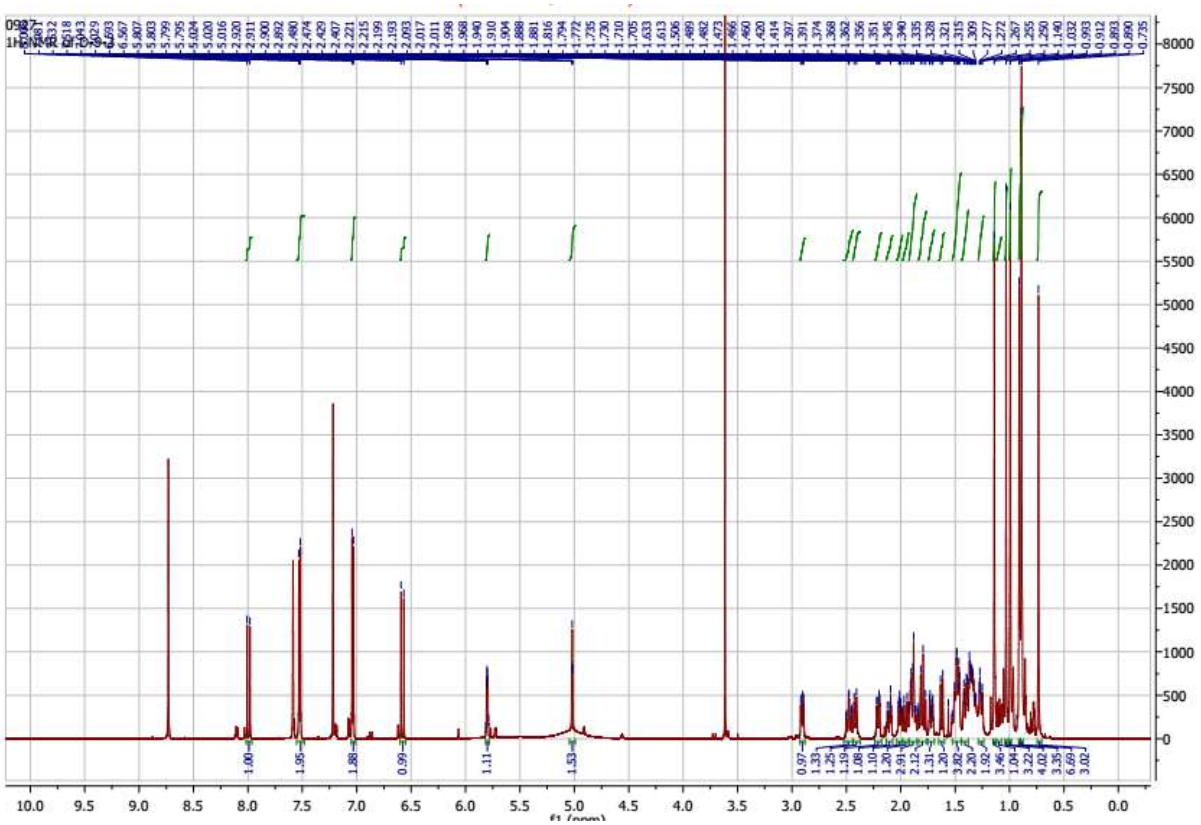
PHỔ HR-ESI-MS

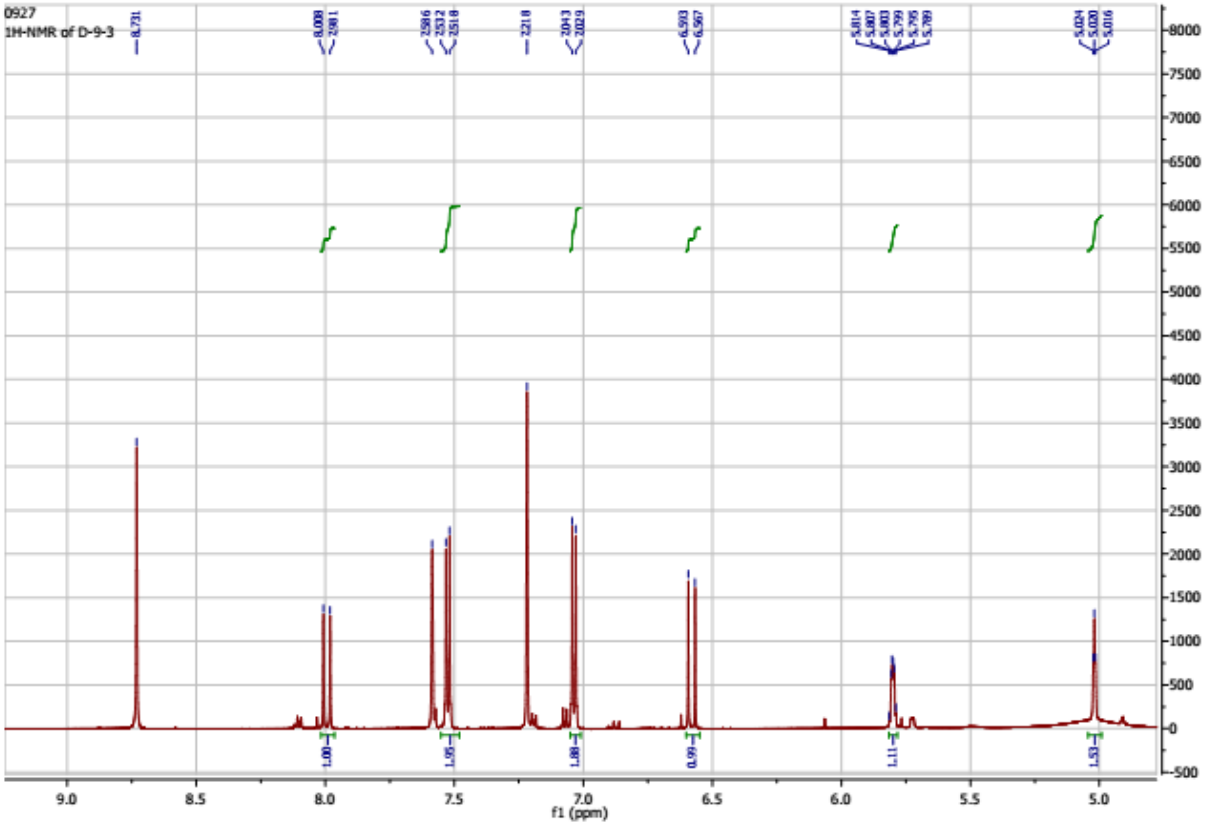
Single Mass Analysis
Tolerance = 5.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 50.0
Element prediction: Off
Number of isotope peaks used for i-FIT = 3
Monoisotopic Mass, Even Electron Ions
69 formula(e) evaluated with 1 results within limits (all results (up to 1000) for each mass)
Elements Used:
C: 1-50 H: 1-100 O: 1-10 Na: 1-1

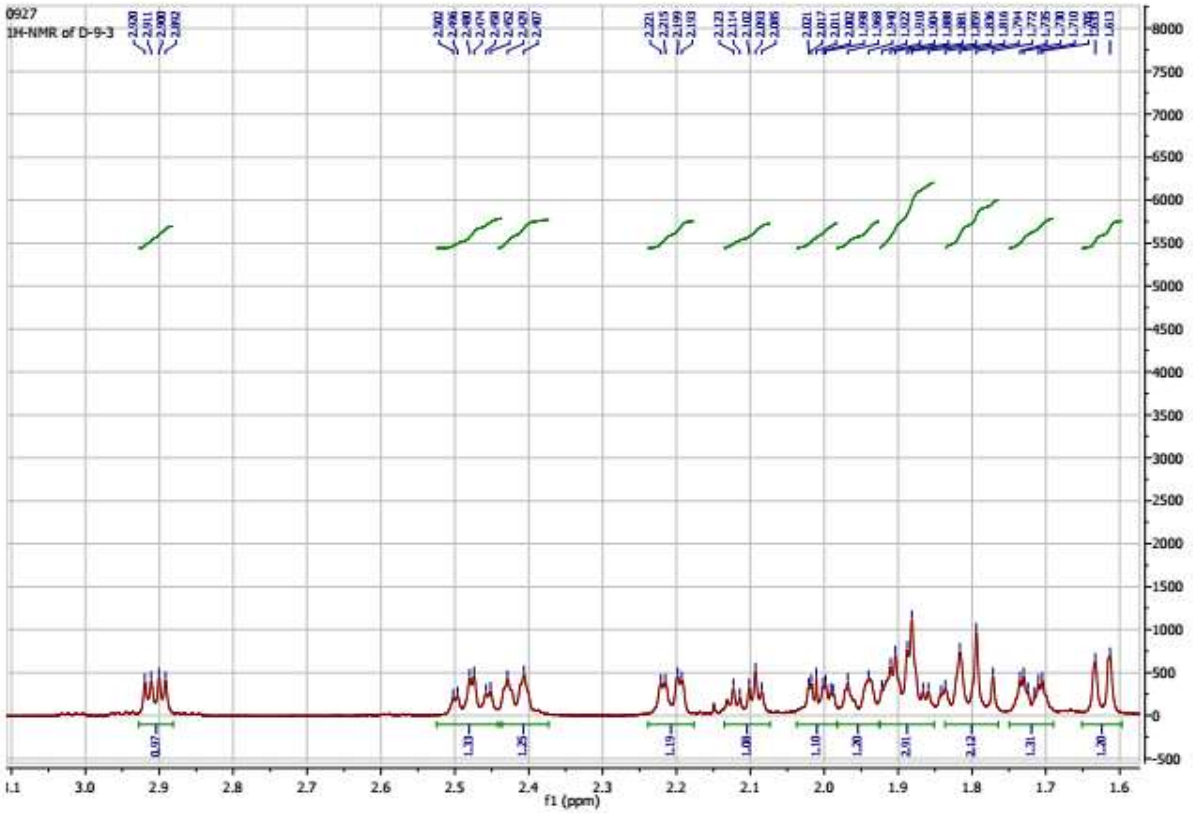
Minimum:			-1.5					
Maximum:	5.0	5.0	50.0					
Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	Norm	Conf(%)	Formula
625.3870	625.3869	0.1	0.2	12.5	335.2	n/a	n/a	C39 H54 O5 Na

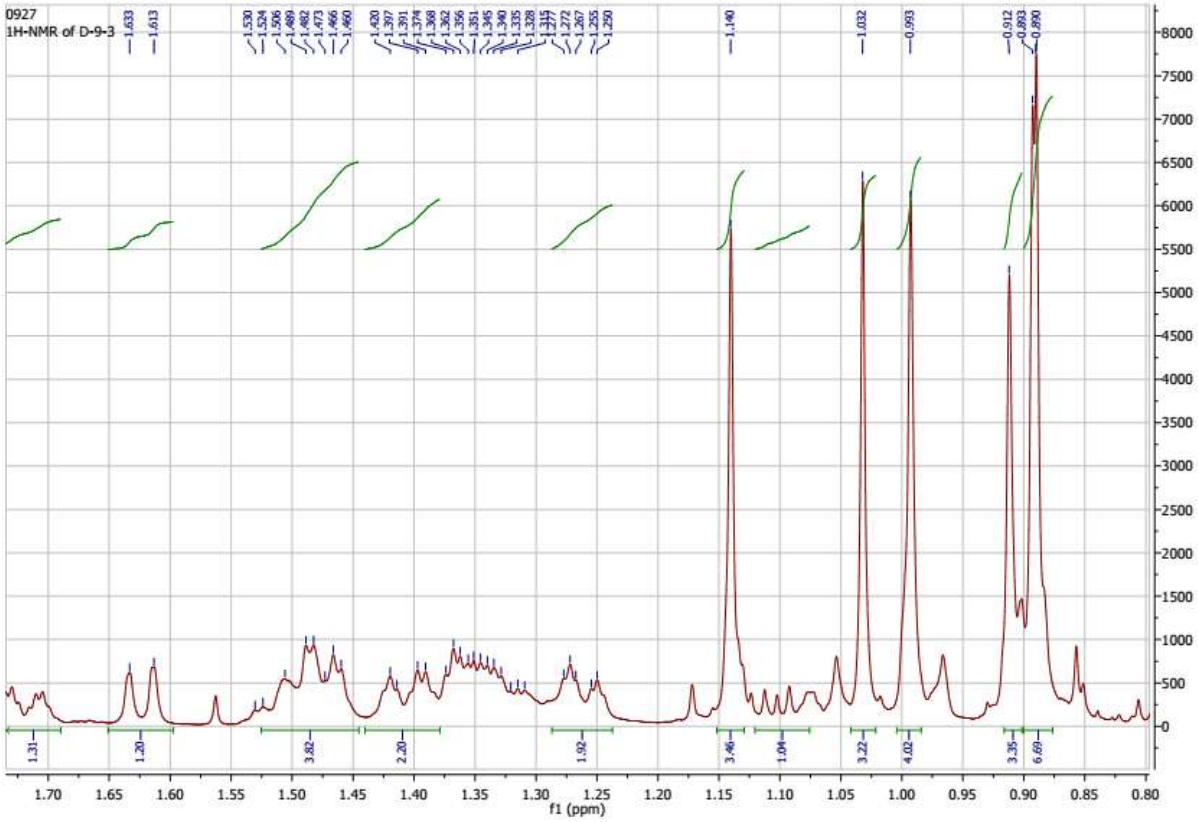


PHỔ ^{1}H NMR (600 MHz, C_5D_5N)

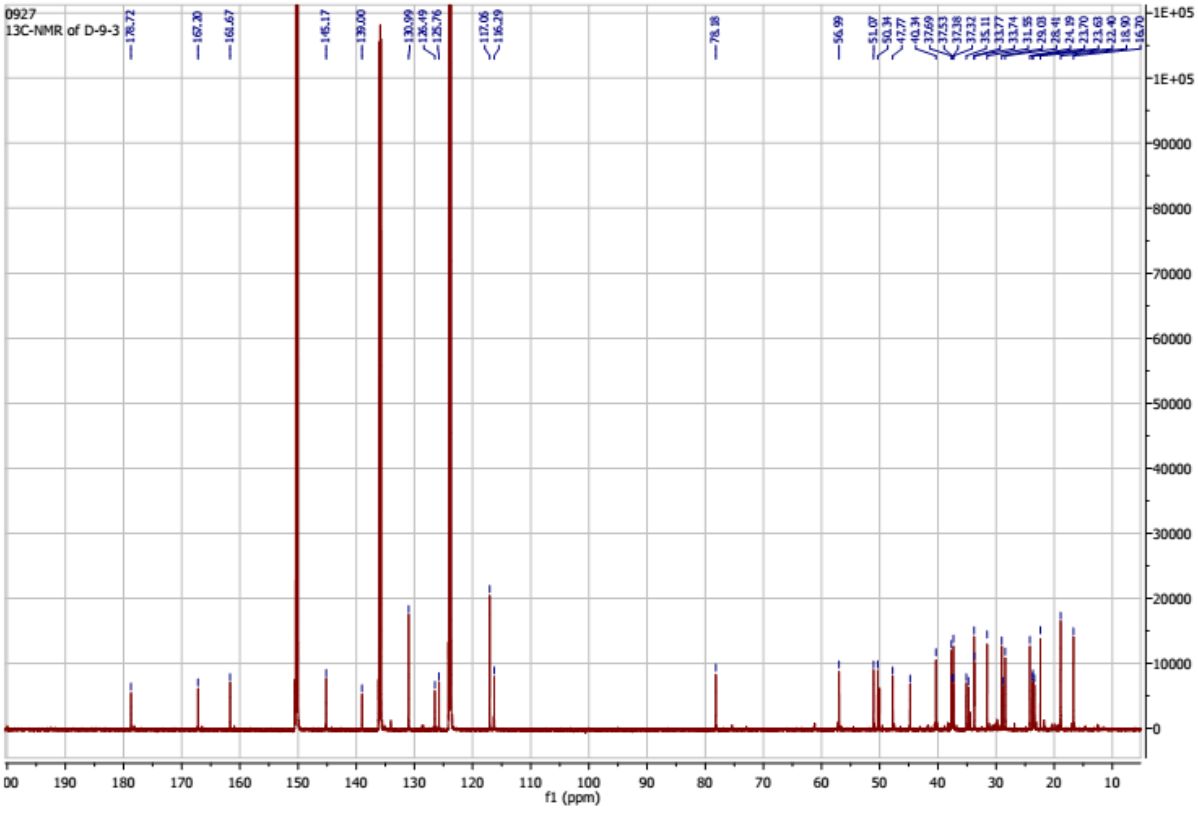


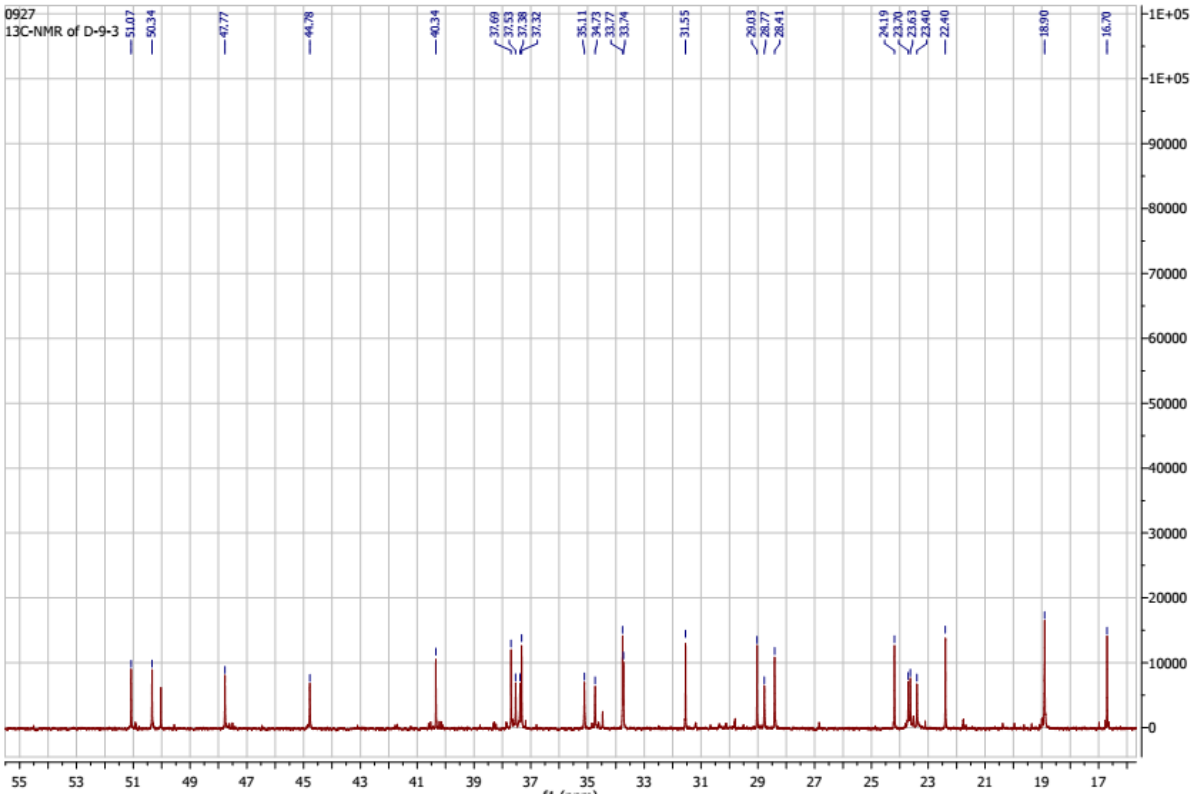

0927
1H-NMR of D-9-3
f1 (ppm)


0927
1H-NMR of D-9-3
f1 (ppm)

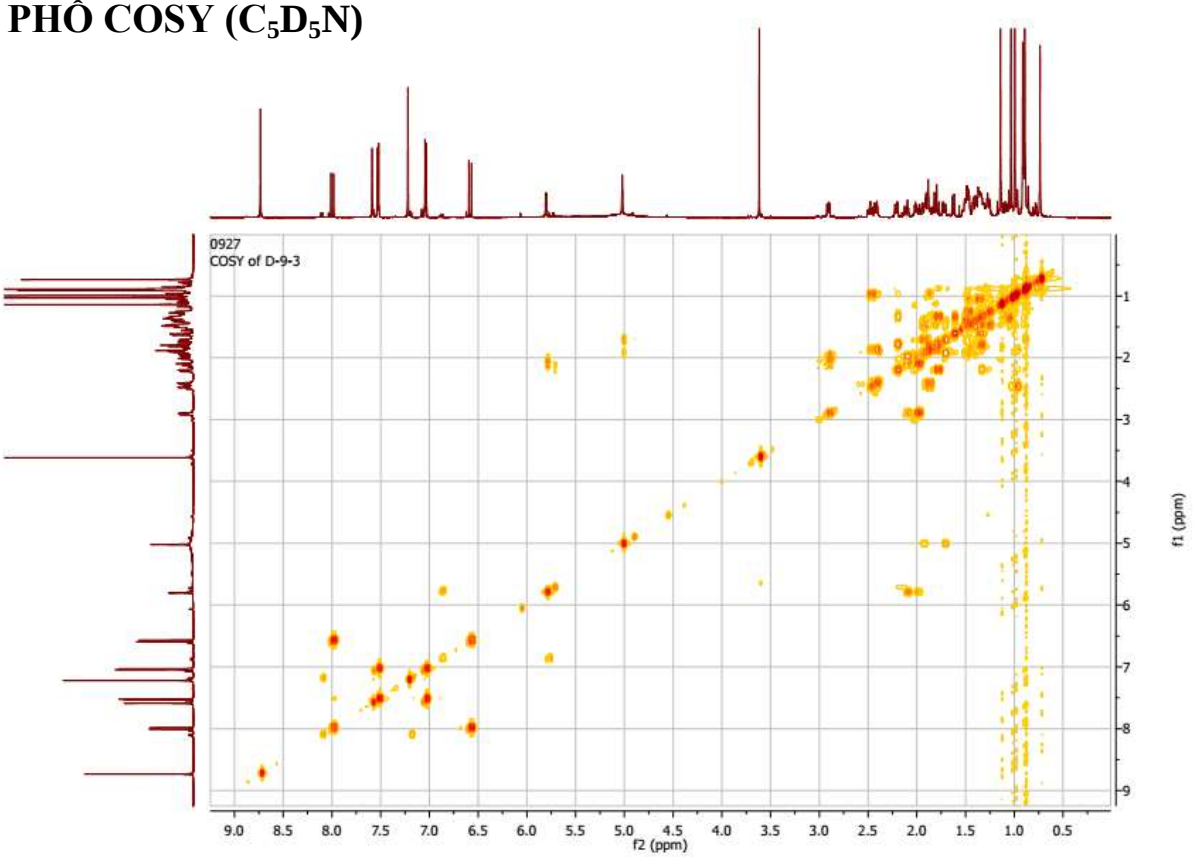


PHỔ ^{13}C NMR (150 MHz, C_5D_5N)

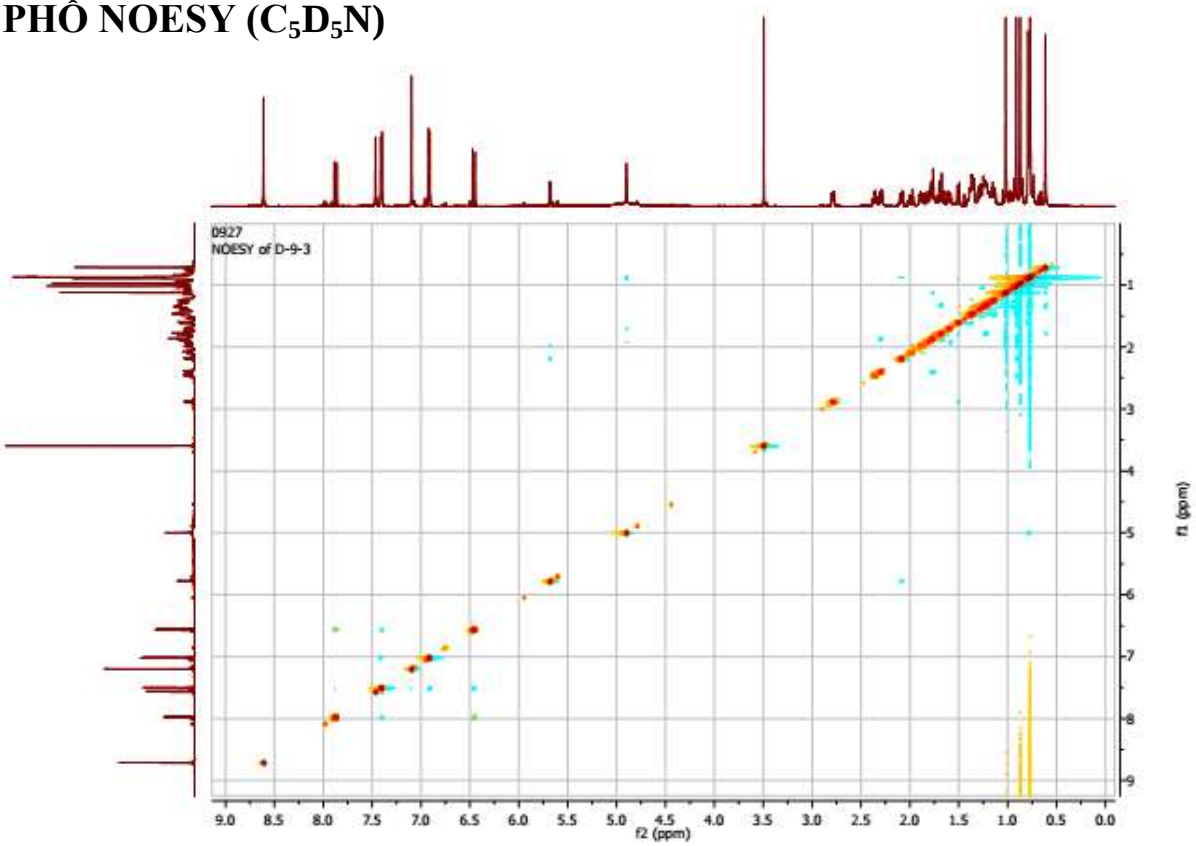




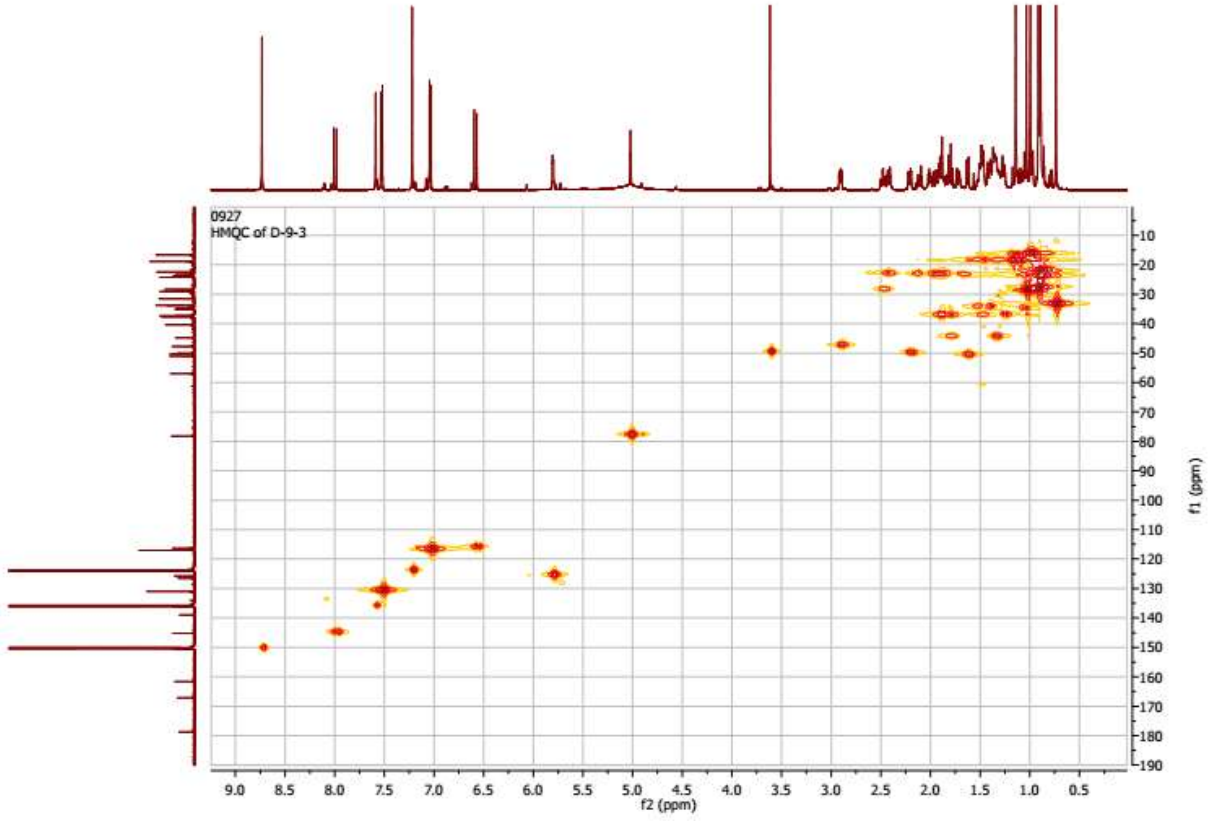
PHỔ COSY (C_5D_5N)



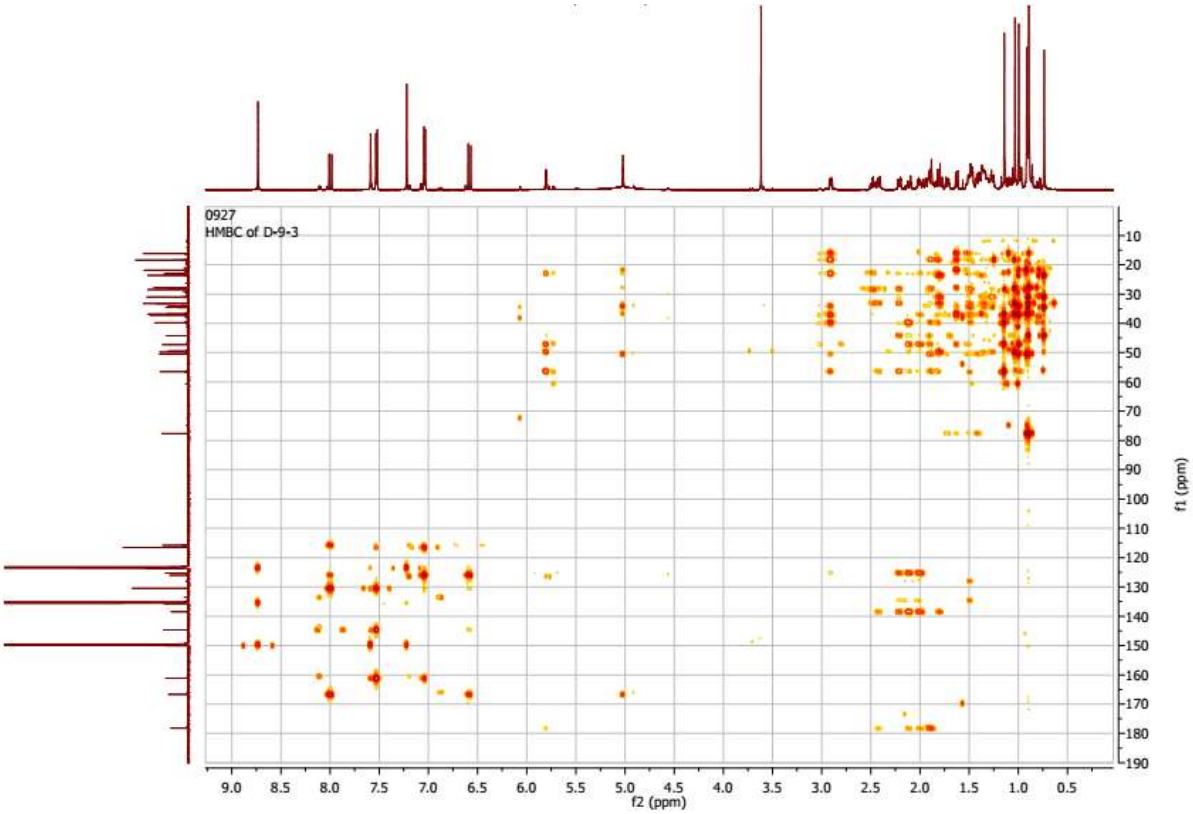
PHỔ NOESY (C_5D_5N)

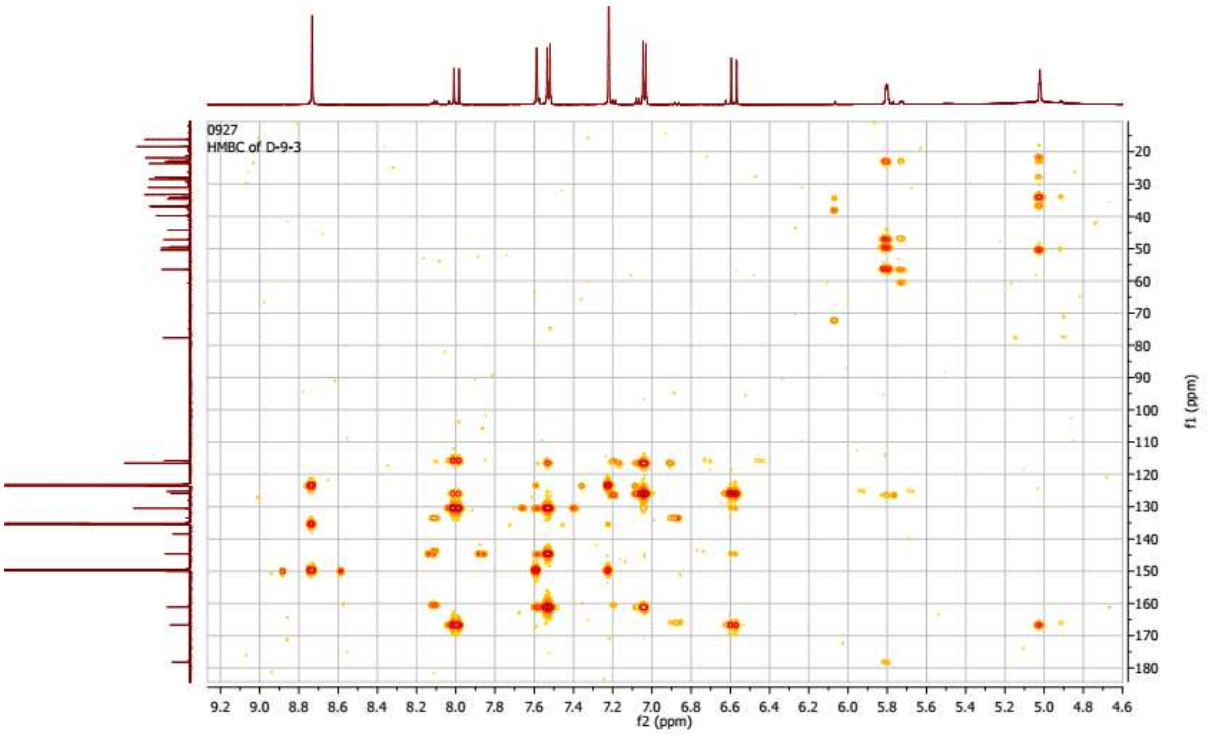


PHỔ HMQC (C_5D_5N)



PHỔ HMBC (C_5D_5N)



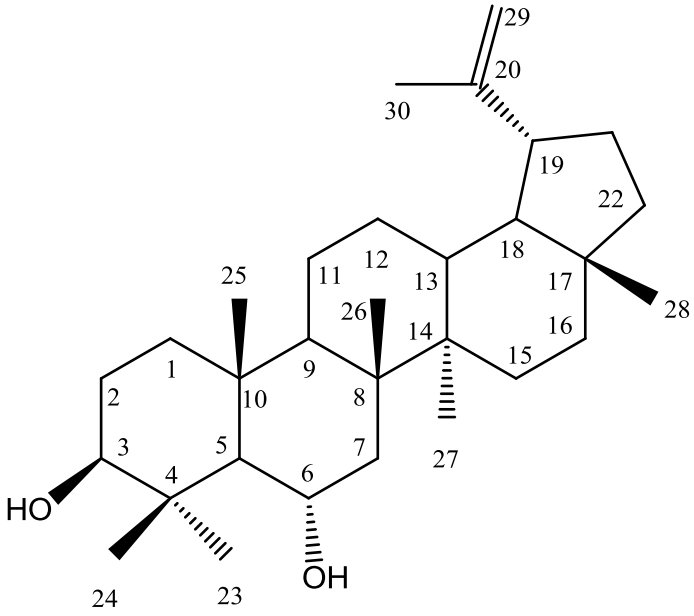


PHỤ LỤC 15

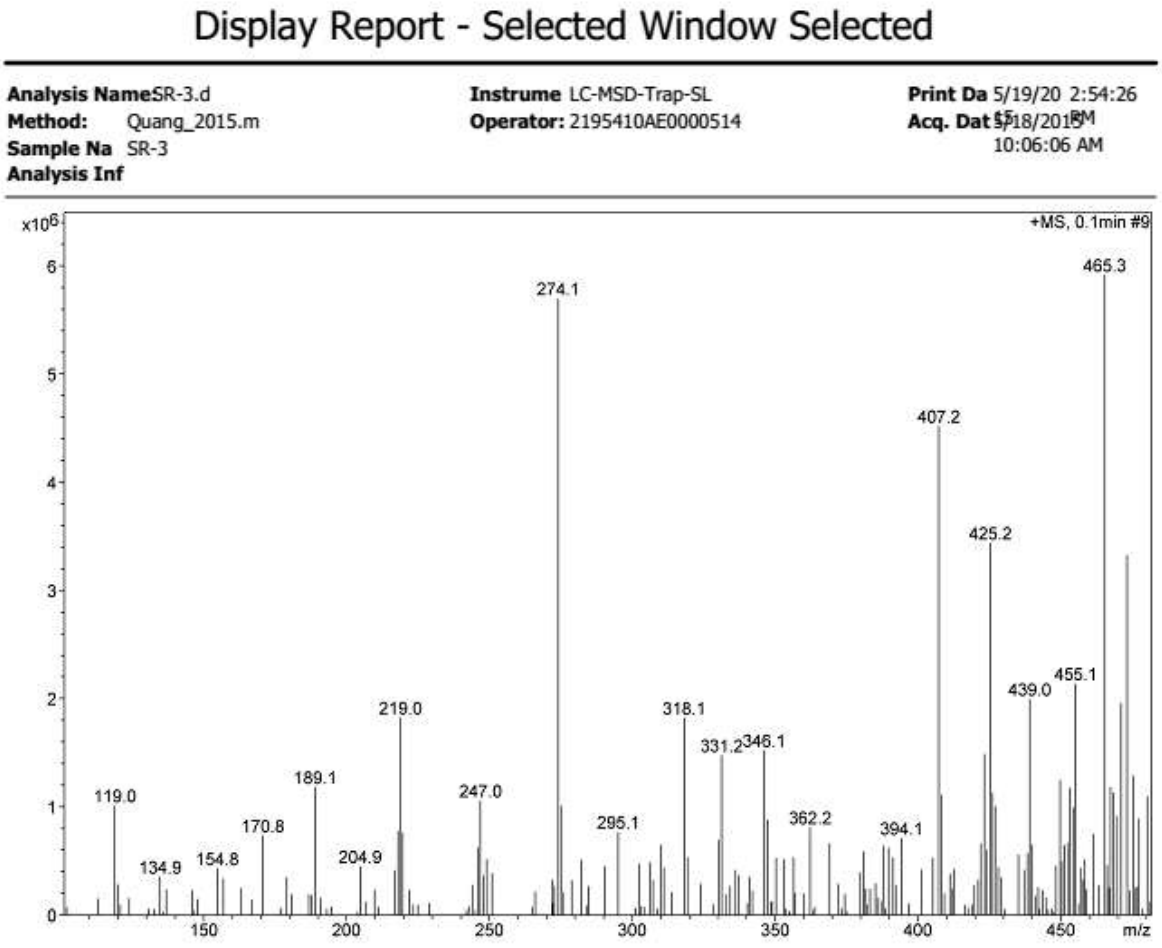
PHỔ CỦA HỢP CHẤT SR-3

(3β,6α-DIHYDROXYLUP-20(29)-EN)

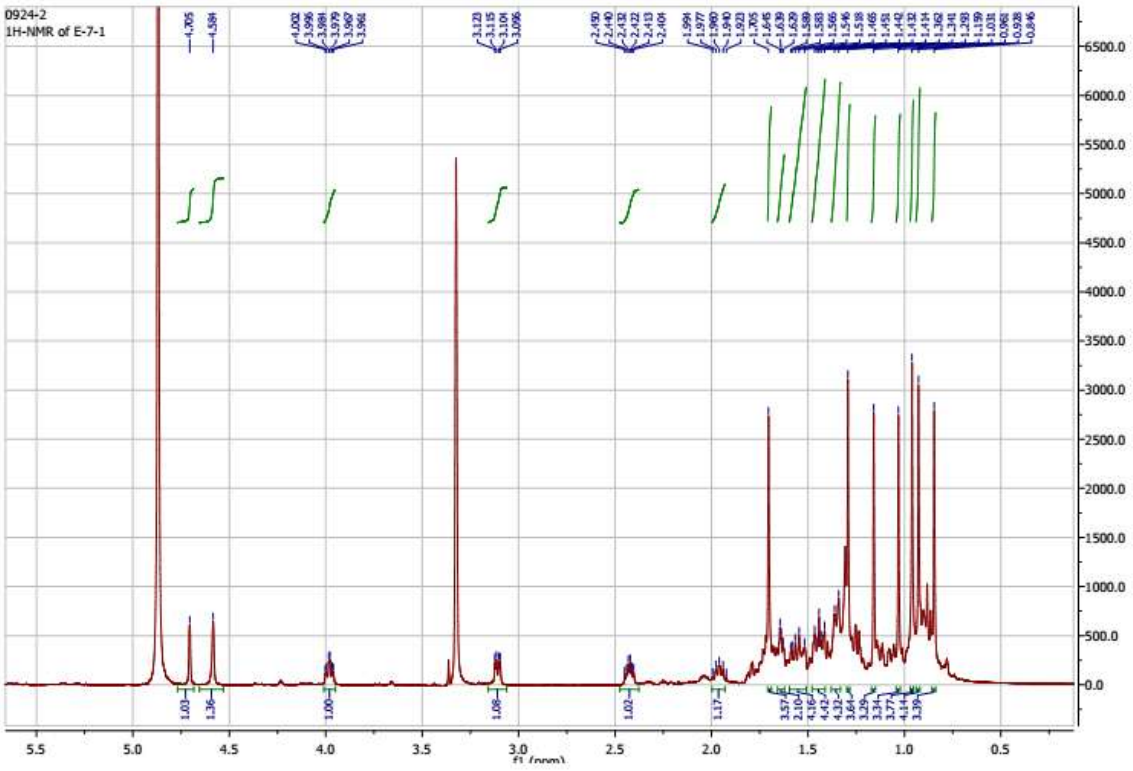
- **ESI-MS**
- **^{1}H NMR**
- **^{13}C NMR**

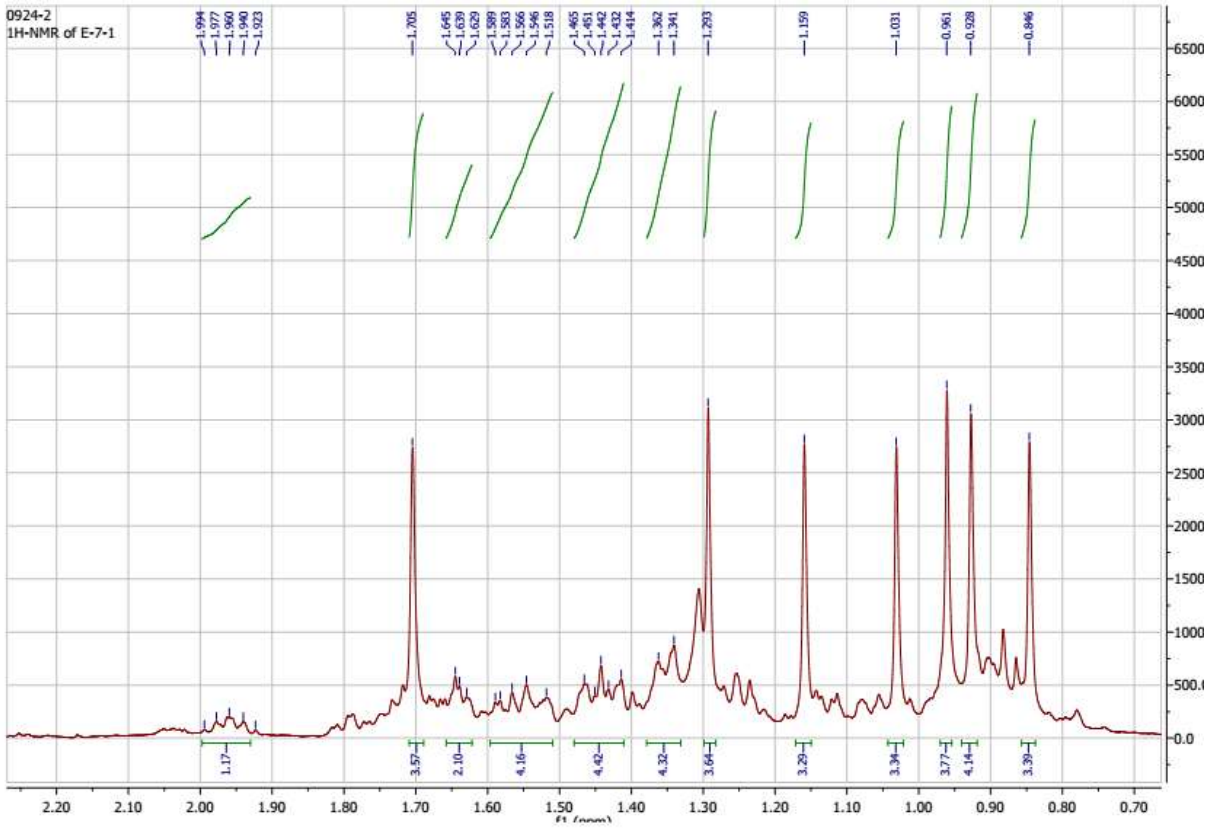


PHỔ ESI-MS

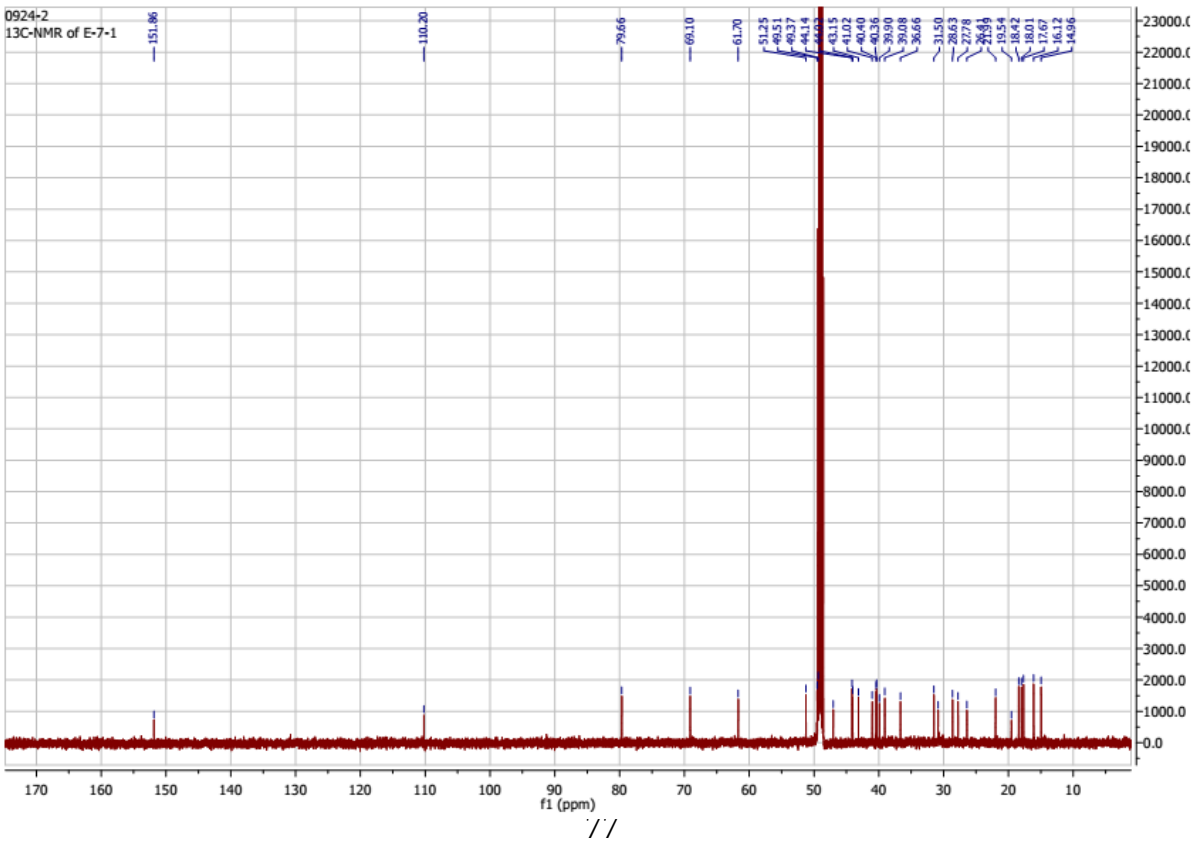


PHỔ ^{1}H NMR (600 MHz, CD_3OD)





PHỔ ^{13}C NMR (150 MHz, CD_3OD)

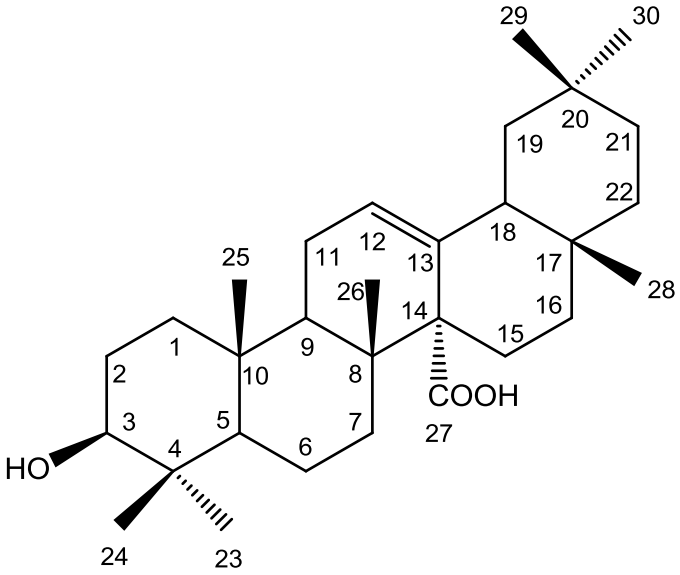


PHỤ LỤC 16

PHỔ CỦA HỢP CHẤT SR-4

(ACID 3β-HYDROXYOLEAN-12-EN-27-OIC)

- **UV**
- **IR**
- **ESI-MS**
- **^{1}H NMR**
- **^{13}C NMR**

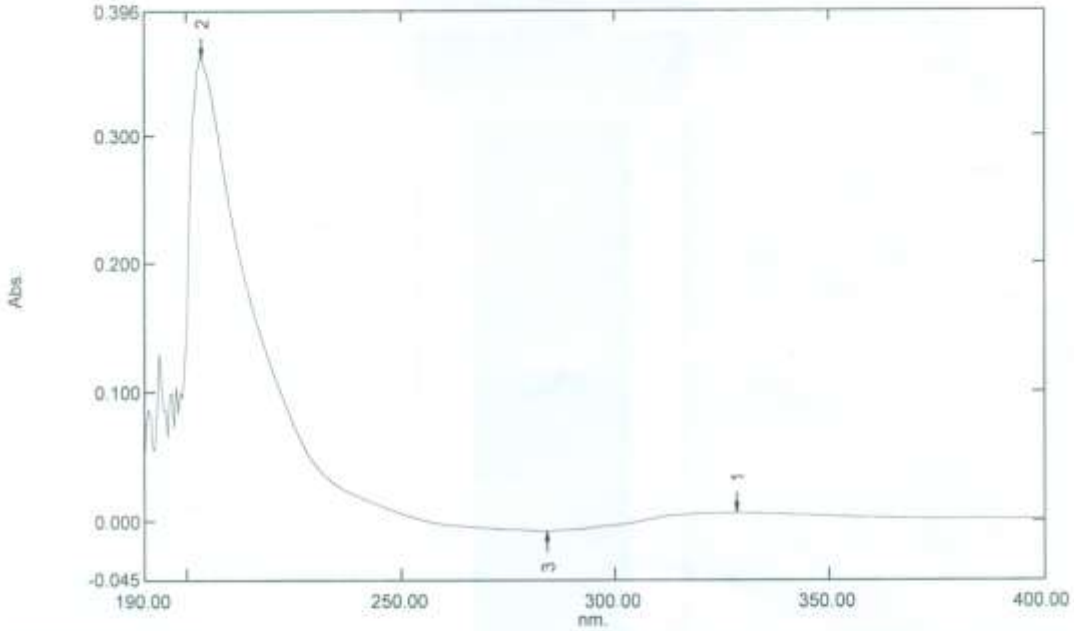


PHỔ UV (MeOH)

Spectrum Peak Pick Report

05/20/2015 09:07:20 AM

Data Set: File_150520_090650.spc - RawData



No.	P/V	Wavelength	Abs.	Description
1	⊕	328.50	0.006	
2	⊕	203.50	0.359	
3	⊖	284.00	-0.008	

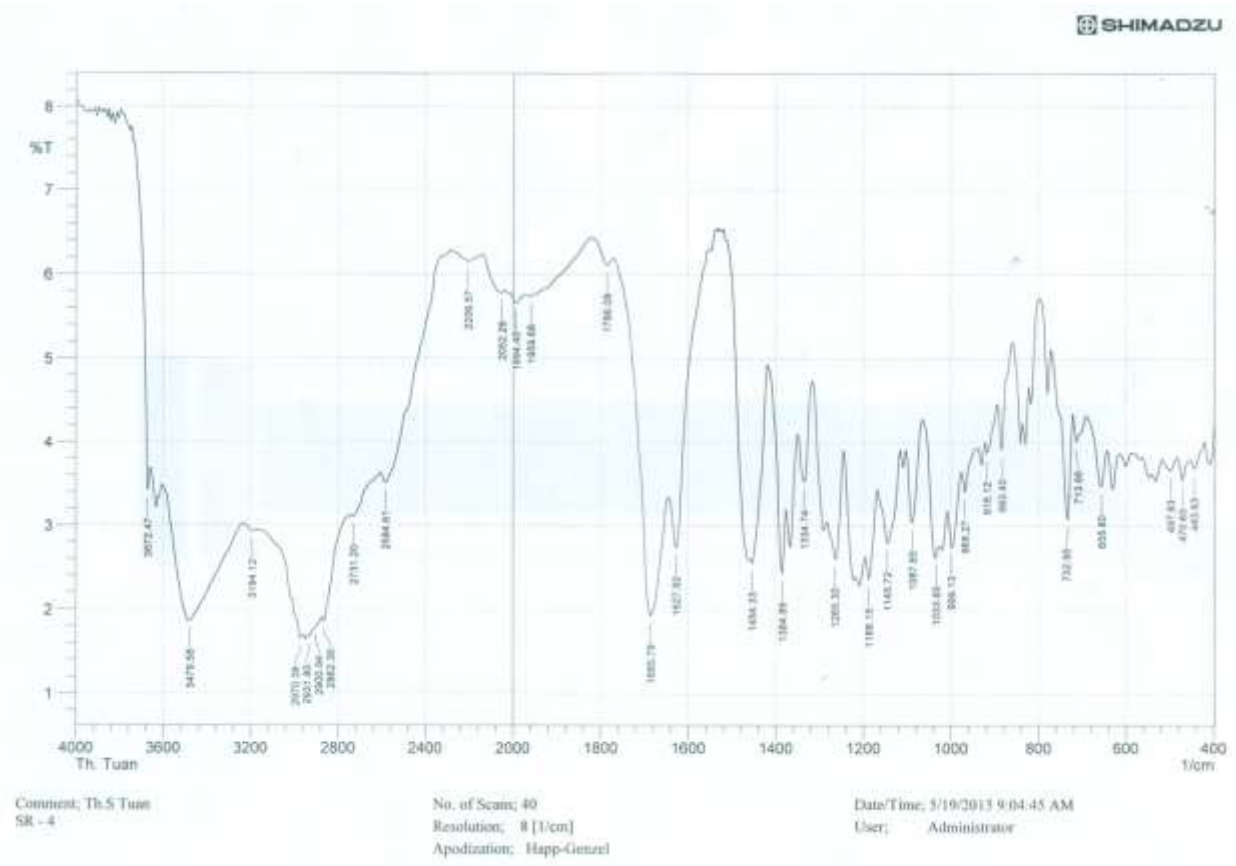
Measurement Properties
Wavelength Range (nm.): 190.00 to 400.00
Scan Speed: Medium
Sampling Interval: 0.5
Auto Sampling Interval: Disabled
Scan Mode: Single

Instrument Properties
Instrument Type: UV-1800 Series
Measuring Mode: Absorbance
Slit Width: 1.0 nm
Light Source Change Wavelength: 360.0 nm
S/R Exchange: Normal

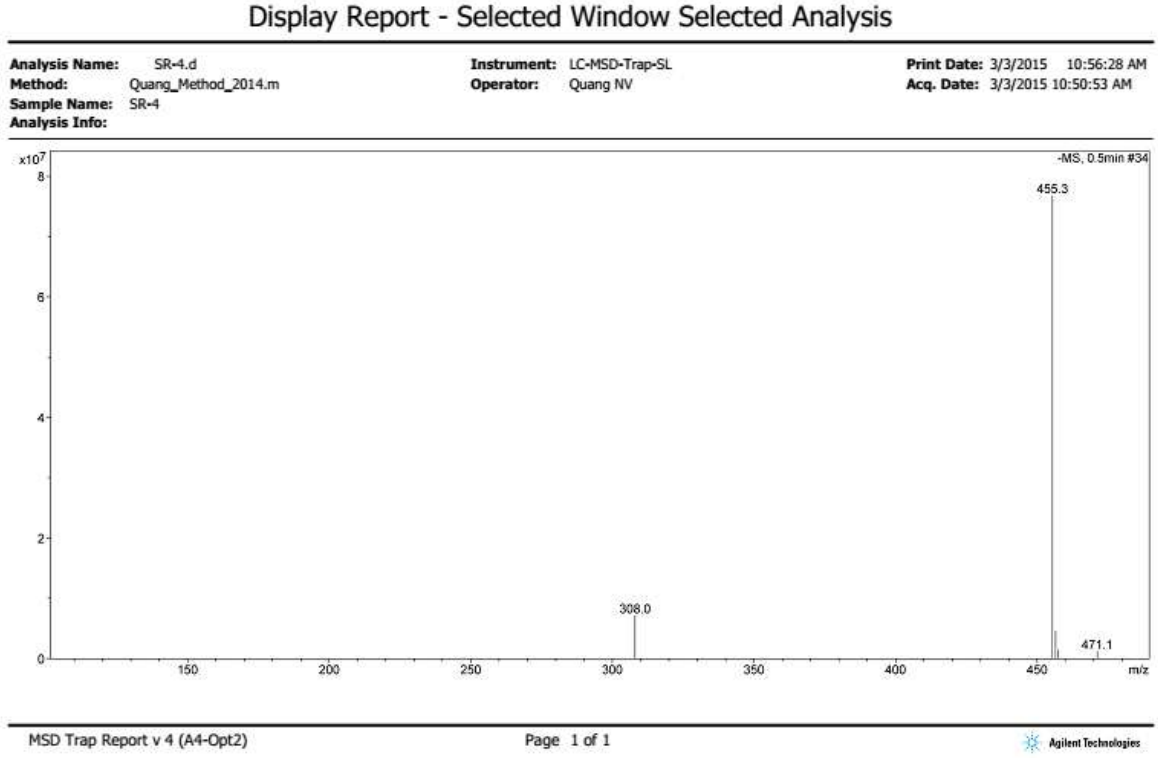
Attachment Properties
Attachment: None

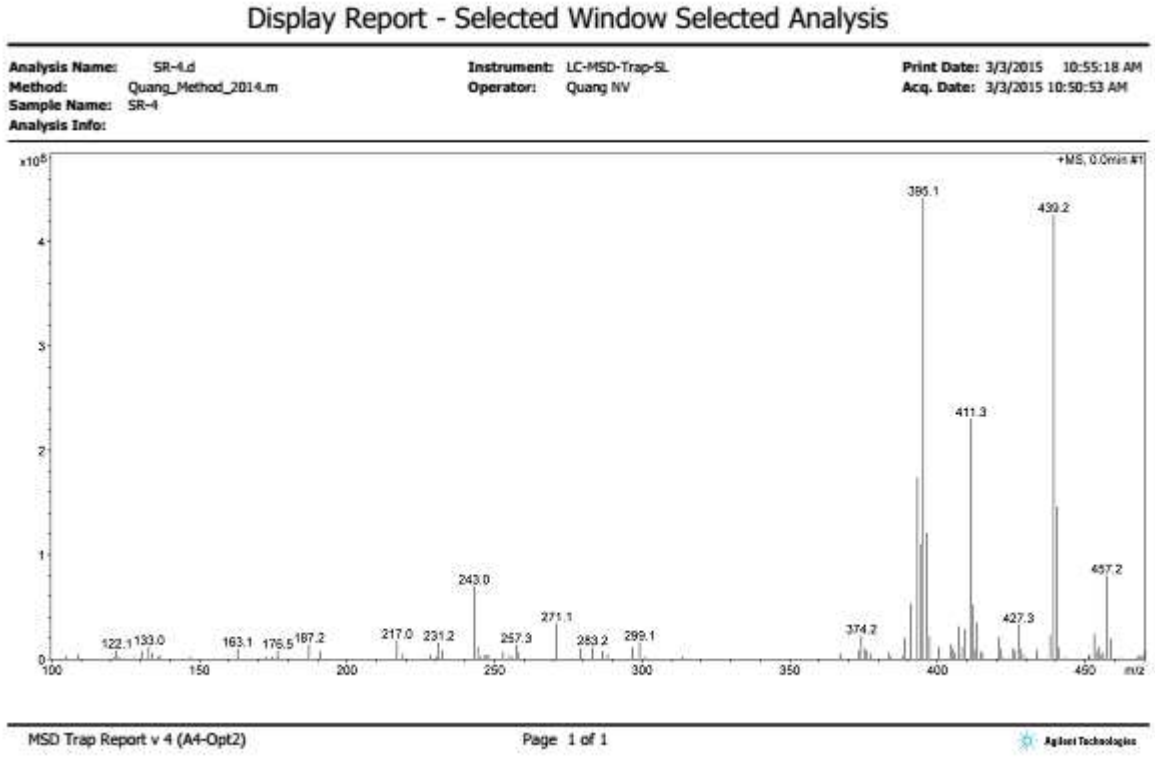
Sample Preparation Properties
Weight:
Volume:
Dilution:
Path Length:
Additional Information:

PHỔ IR

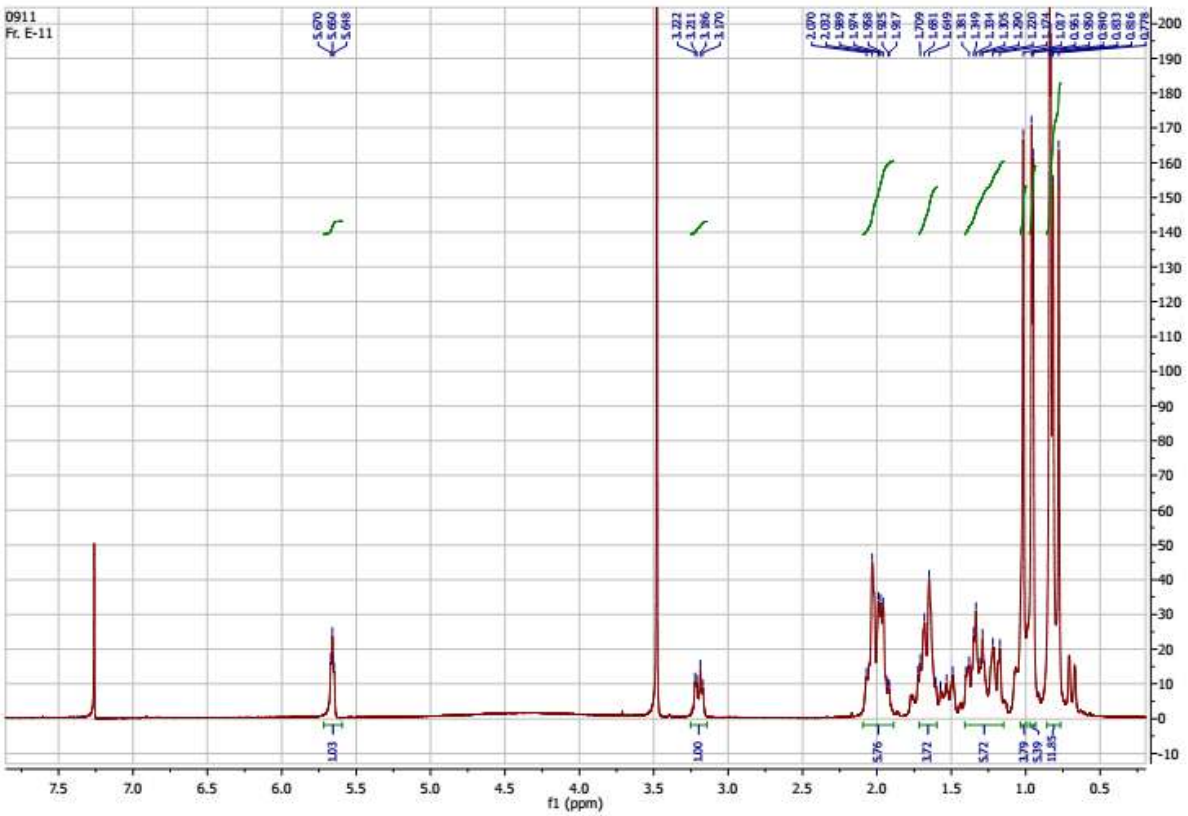

SHIMADZU
%T
8
7
6
5
4
3
2
1
4000
3600
3200
2800
2400
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
1/cm
Th. Tuan
Comment: Th.S Tuan
SR - 4
No. of Scans: 40
Resolution: 8 [1/cm]
Apodization: Happ-Genzel
Date/Time: 5/19/2013 9:04:45 AM
User: Administrator

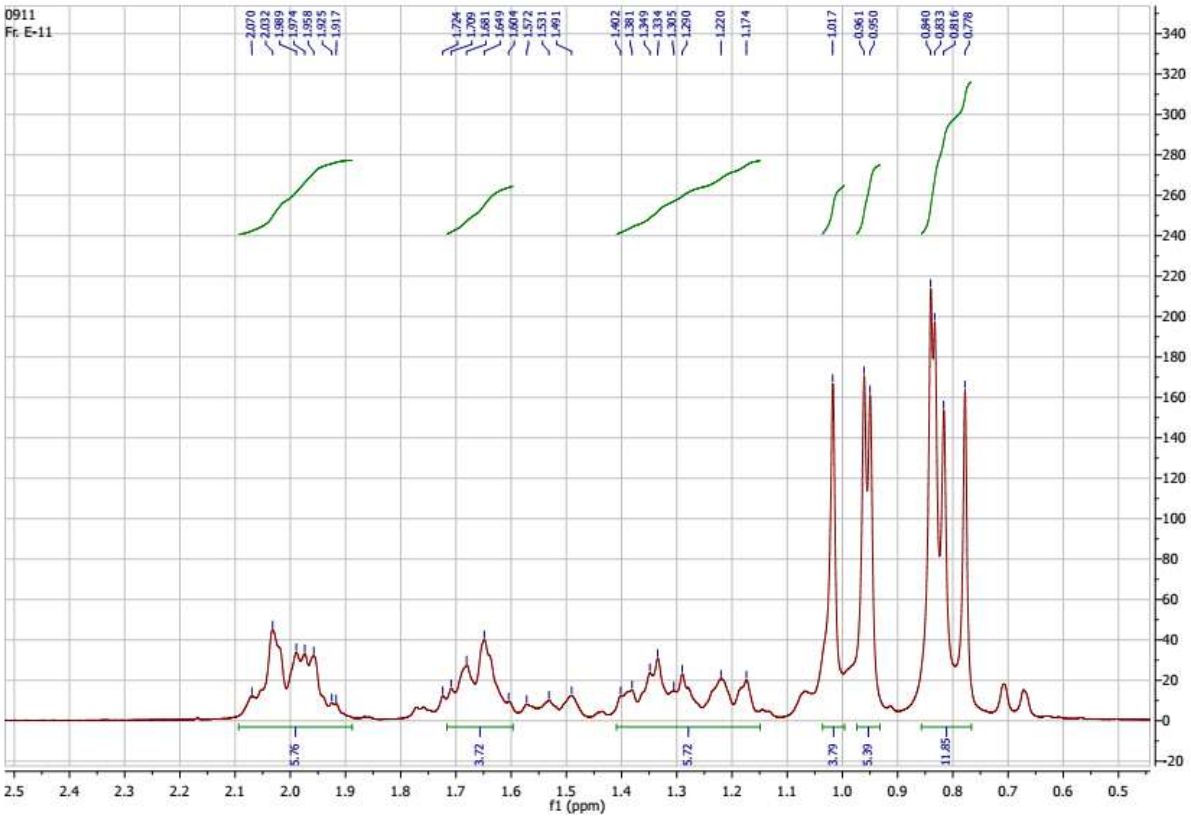
ESI-MS


Display Report - Selected Window Selected Analysis
Analysis Name: SR-4.d
Method: Quang_Method_2014.m
Sample Name: SR-4
Analysis Info:
Instrument: LC-MSD-Trap-SL
Operator: Quang NV
Print Date: 3/3/2015 10:56:28 AM
Acq. Date: 3/3/2015 10:50:53 AM
x10^7
-MS, 0.5min #34
455.3
308.0
471.1
m/z
MSD Trap Report v 4 (A4-Opt2)
Page 1 of 1
Agilent Technologies

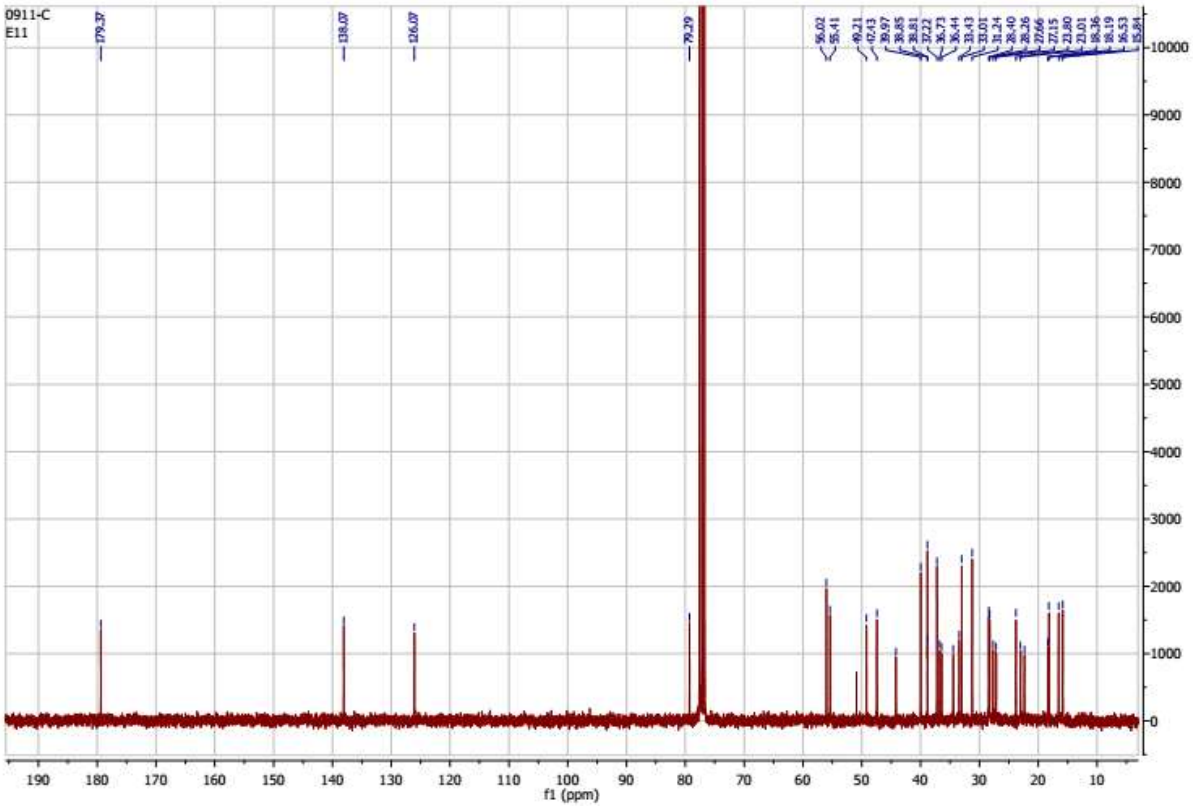


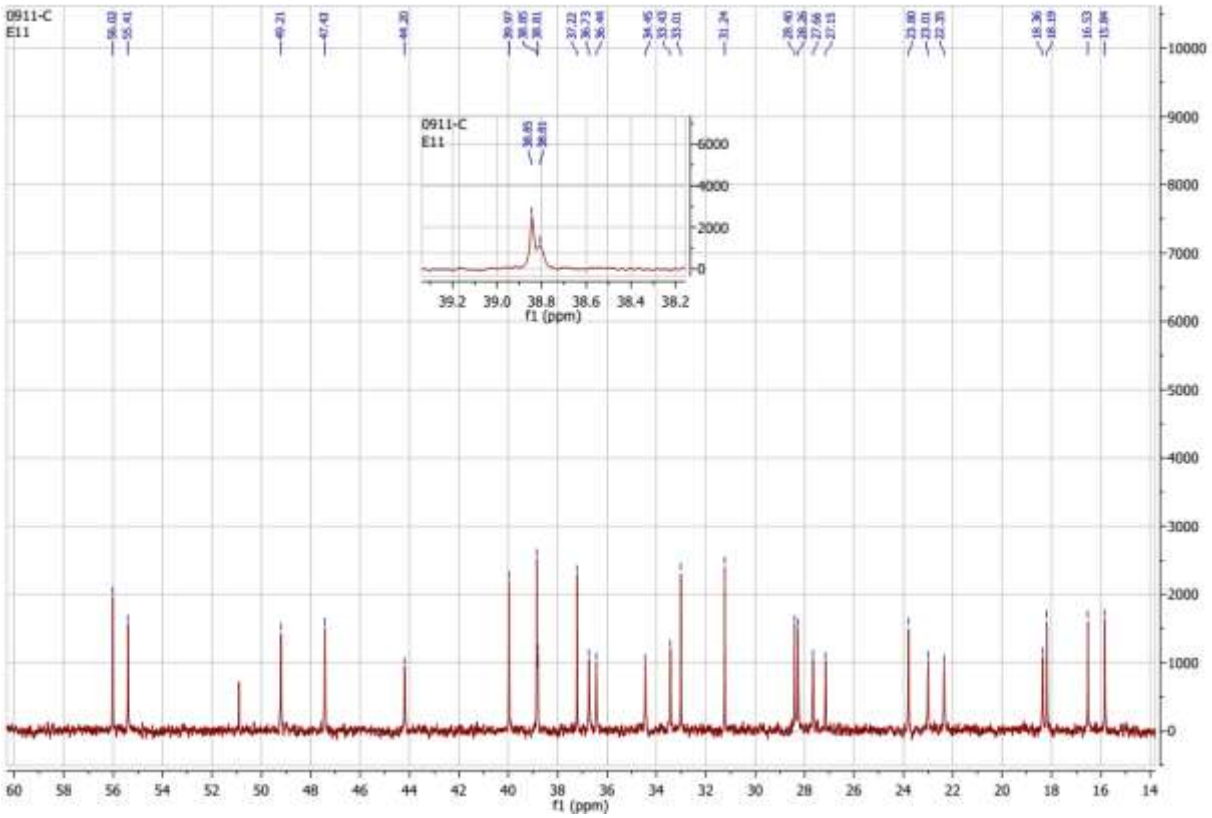
PHỔ ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$)

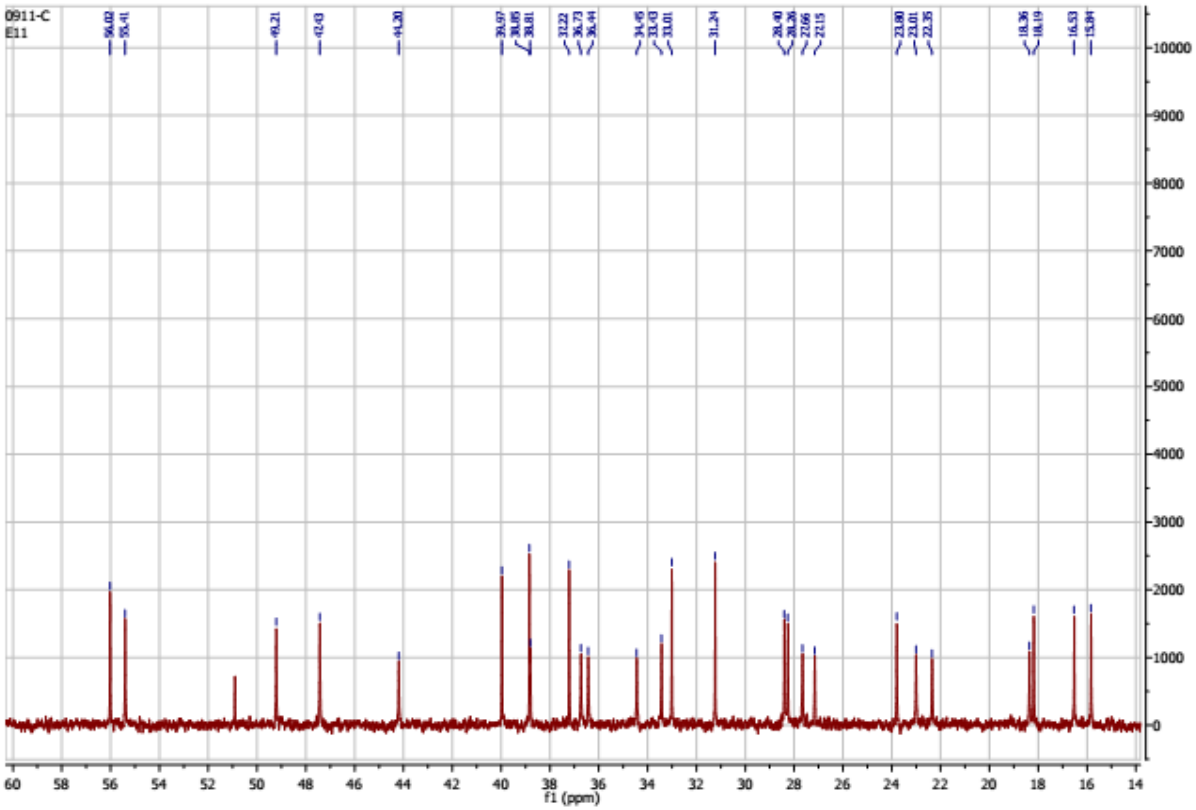




PHỔ ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$)




0911-C
E11
f1 (ppm)

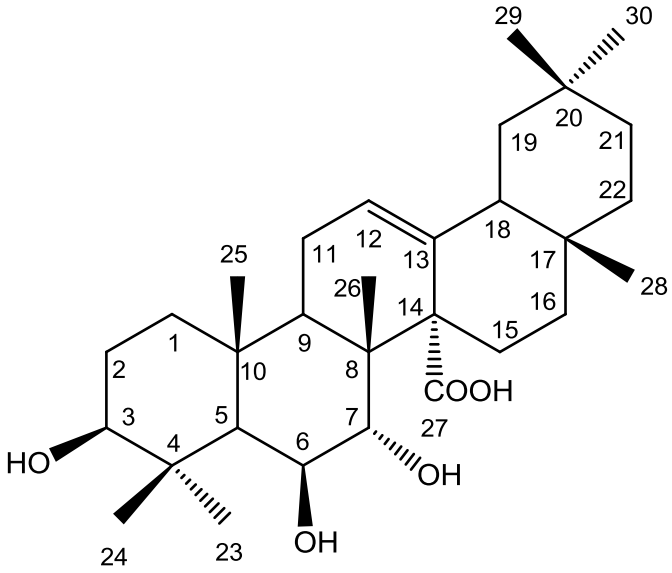

0911-C
E11
f1 (ppm)

PHỤ LỤC 17

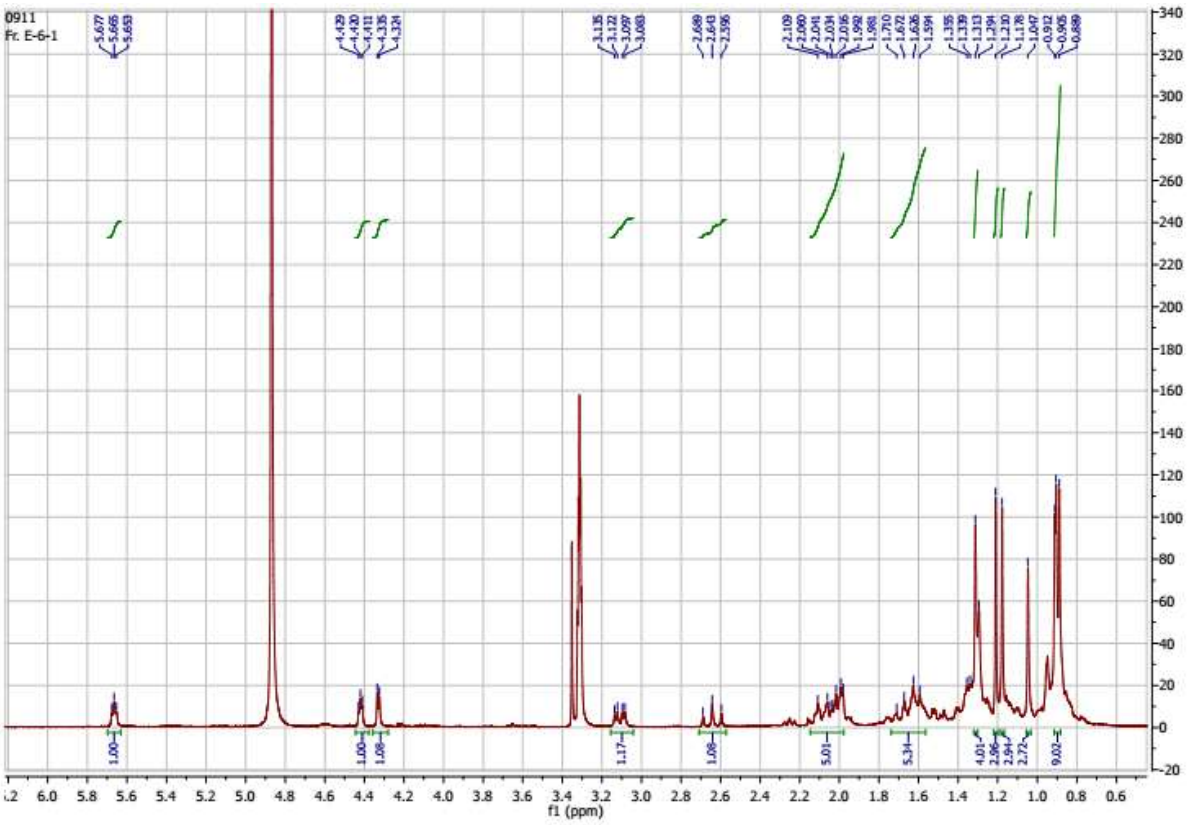
PHỔ CỦA HỢP CHẤT SR-5

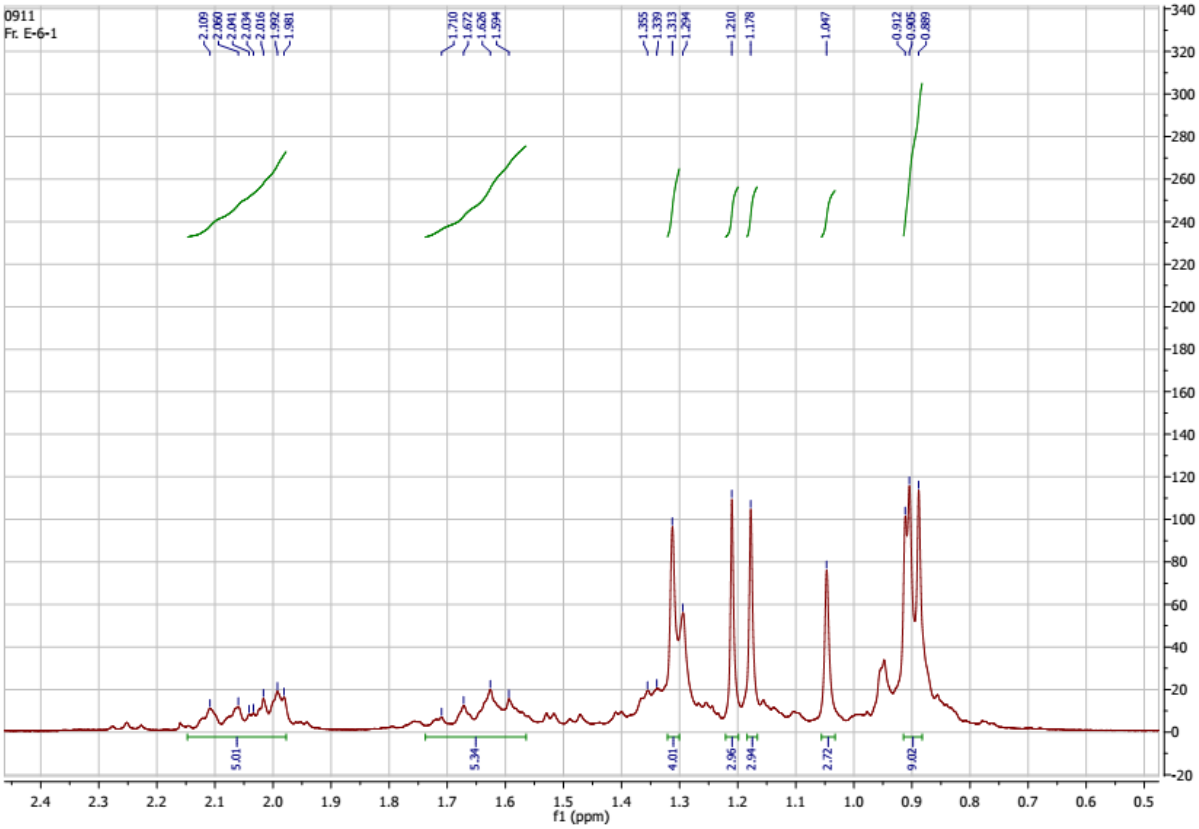
(ACID 3β,6β,7α-TRIHYDROXYOLEAN-12-EN-27-OIC)

- **^{1}H NMR**
- **^{13}C NMR**

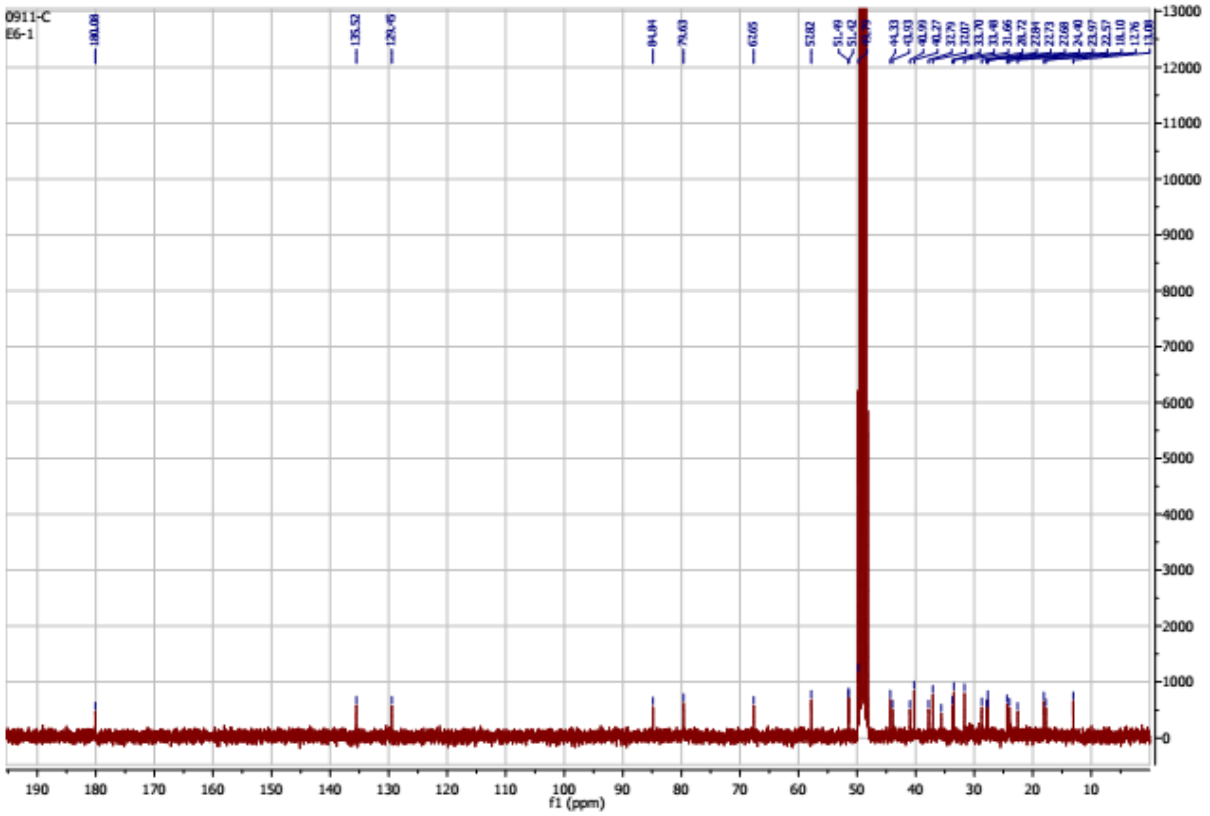


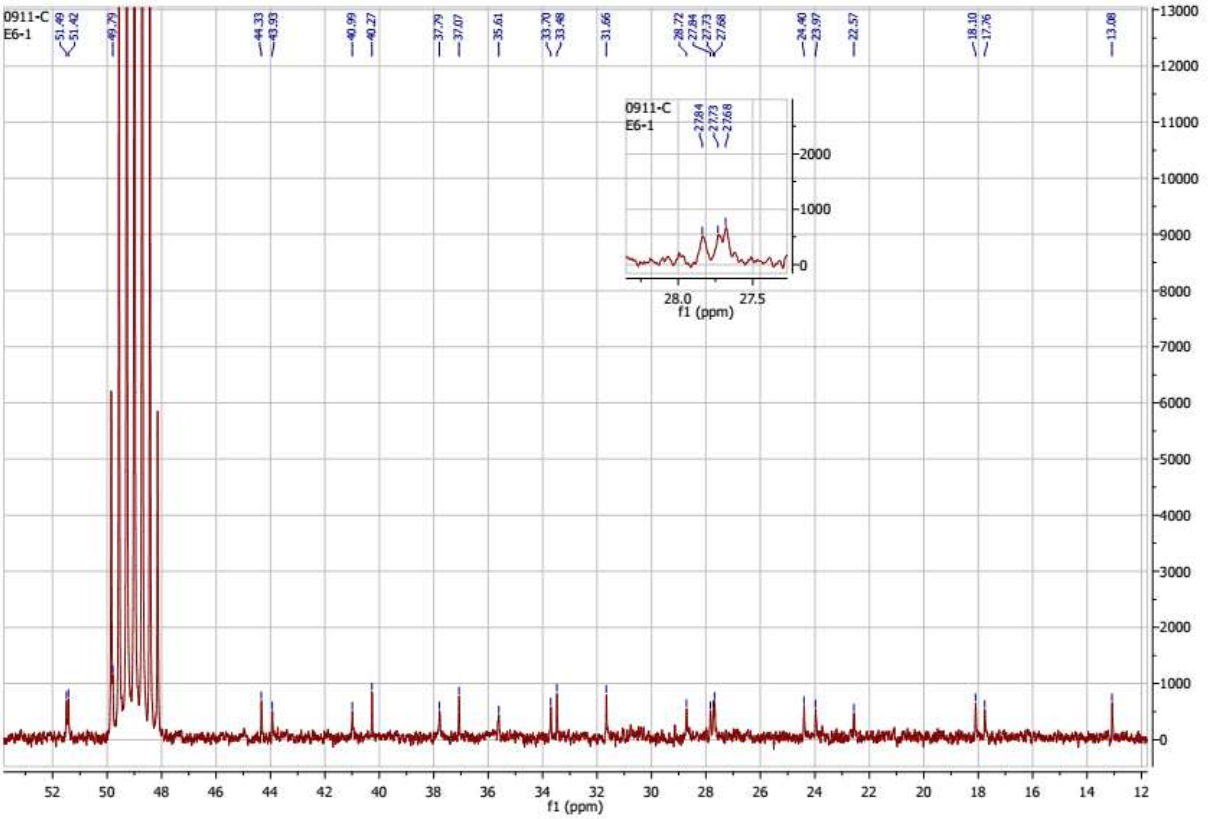
PHỔ ^{1}H NMR (300 MHz, CD_3OD)





PHỔ ^{13}C NMR (75 MHz, CD_3OD)



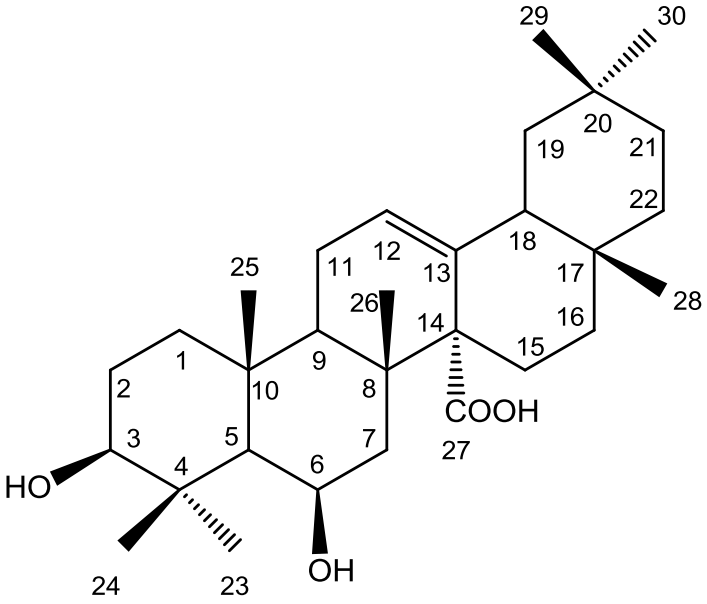


PHỤ LỤC 18

PHỔ CỦA HỢP CHẤT SR-6

(ACID 3β,6β-DIHYDROXYOLEAN-12-EN-27-OIC, ACID ASTILBIC)

- **ESI-MS**
- **^{1}H NMR**
- **^{13}C NMR**

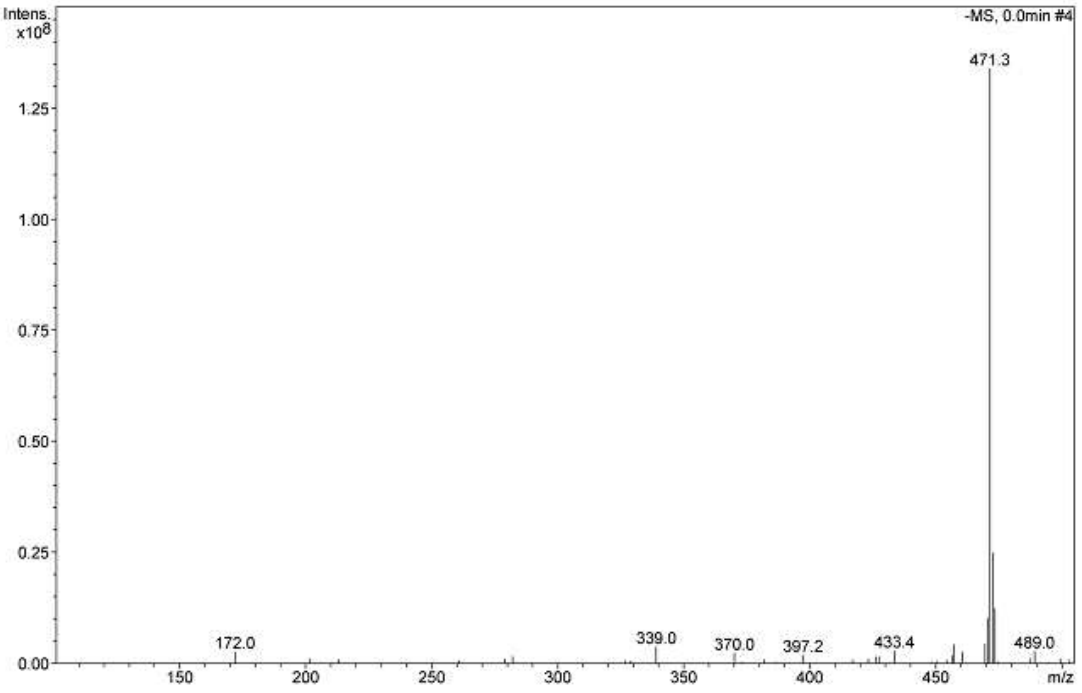


Display Report - Selected Window Selected

Analysis Name SR-6.d
Method: Quang_2015.m
Sample Na SR-6
Analysis Inf

Instrume LC-MSD-Trap-SL
Operator: 2195410AE0000514

Print Da 5/18/20 10:02:38
Acq. Dat 5/18/2015 9:59:45 AM

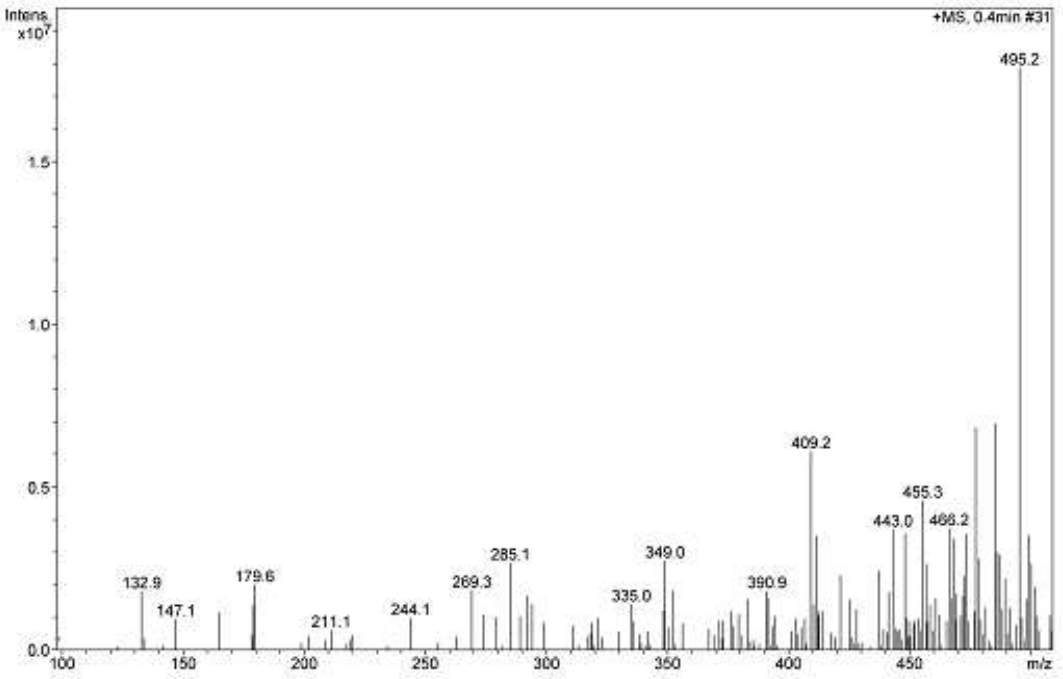


Display Report - Selected Window Selected

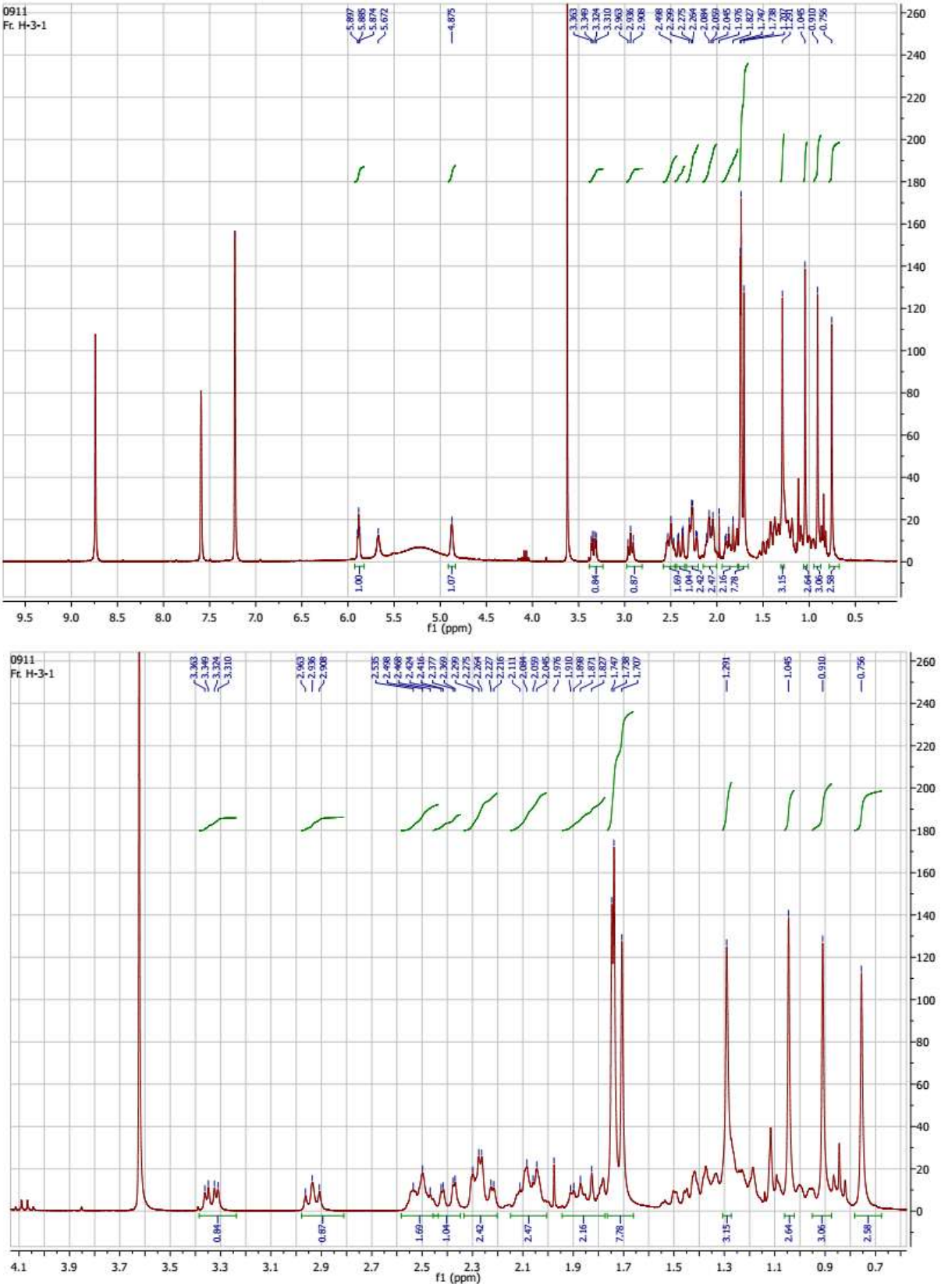
Analysis Name SR-6.d
Method: Quang_2015.m
Sample Na SR-6
Analysis Inf

Instrume LC-MSD-Trap-SL
Operator: 2195410AE0000514

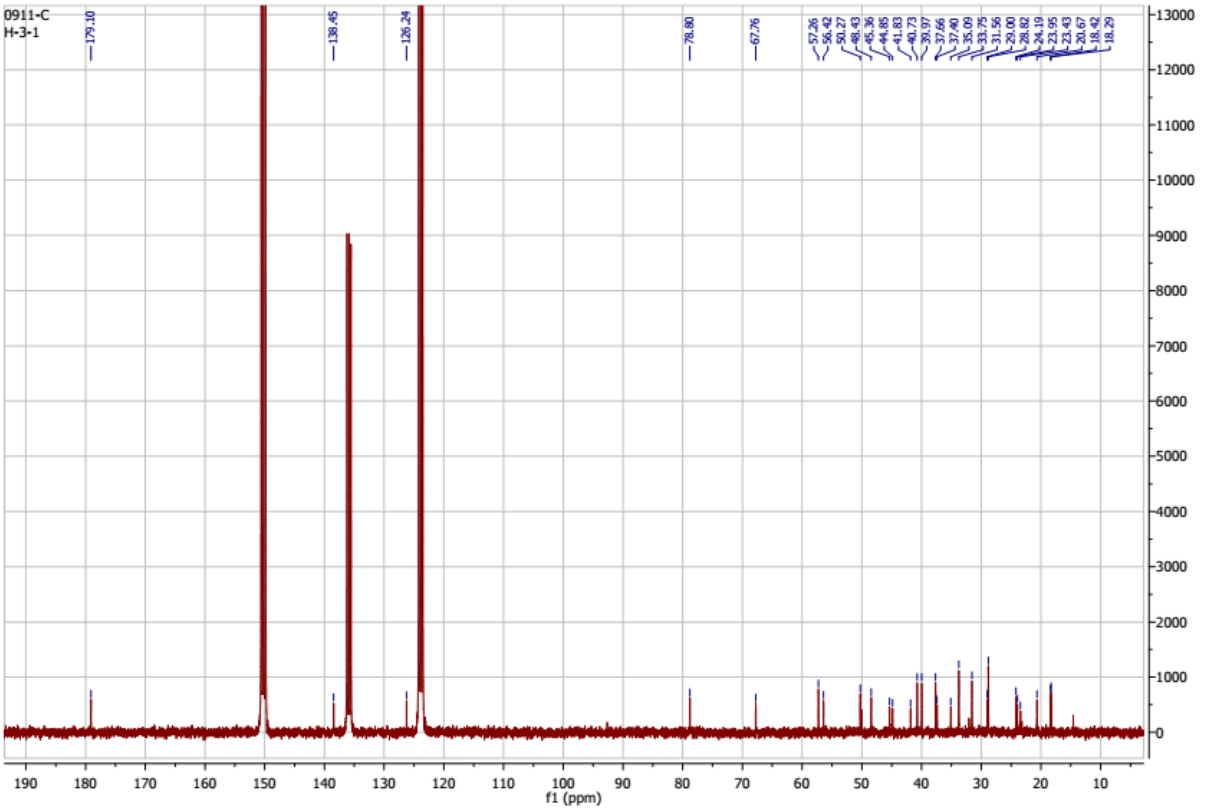
Print Da 5/18/20 10:03:31
Acq. Dat 5/18/2015 9:59:45 AM

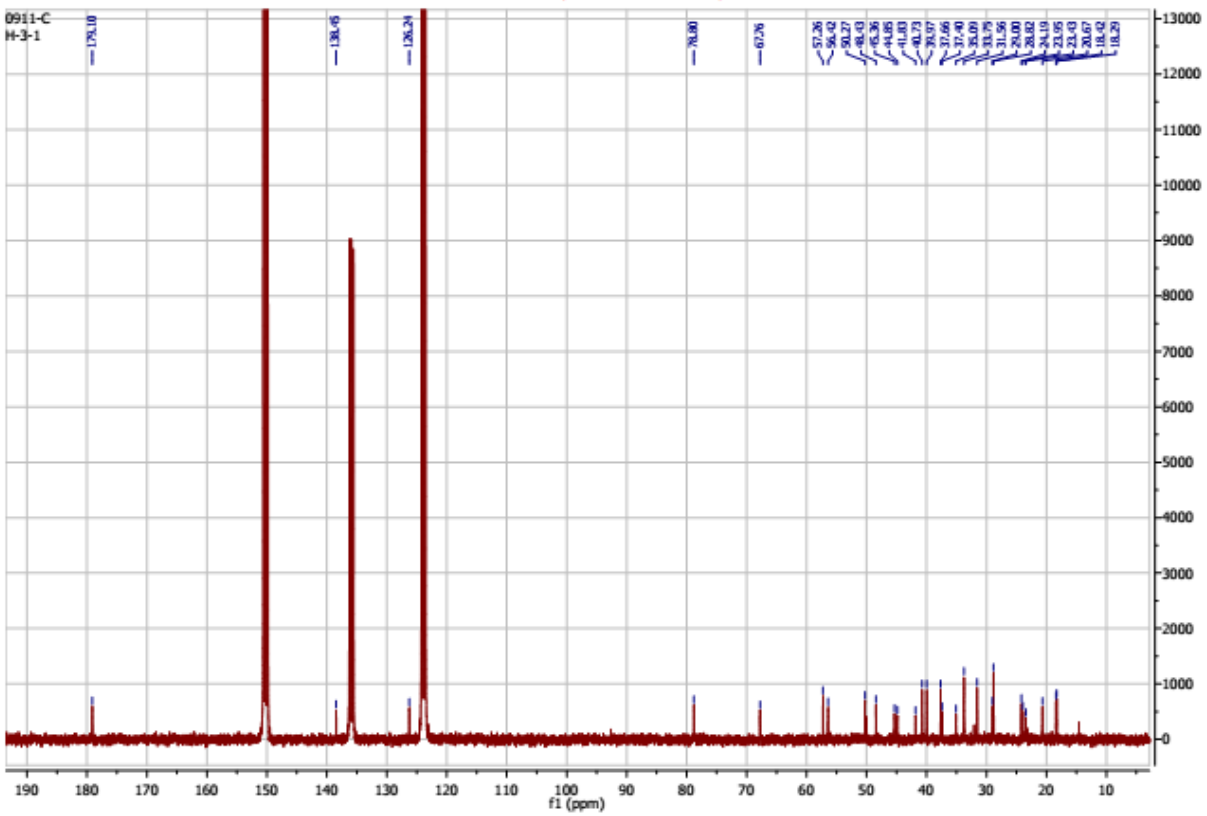


PHỔ ^{1}H NMR (300 MHz, C_5D_5N)



PHỔ ^{13}C NMR (75 MHz, C_5D_5N)



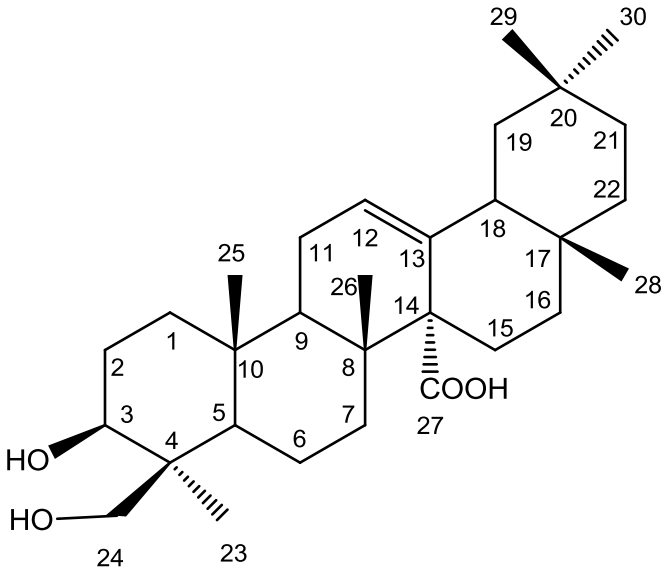


PHỤ LỤC 19

PHỔ CỦA HỢP CHẤT SR-7

(ACID 3β,24-DIHYDROXYOLEAN-12-EN-27-OIC)

- **ESI-MS**
- **^{1}H NMR**
- **^{13}C NMR**



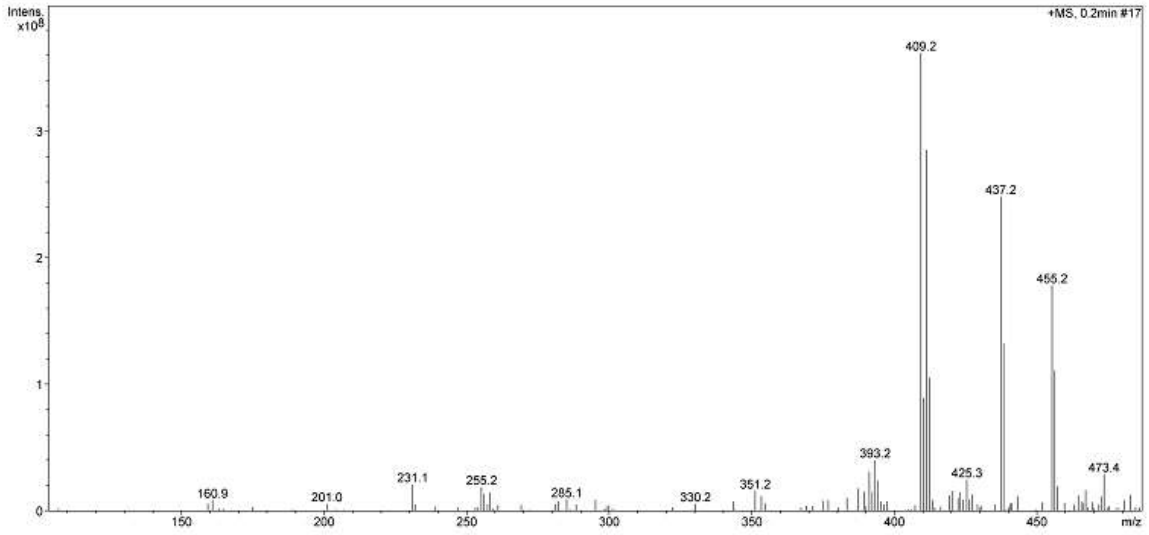
PHỔ ESI-MS

Display Report - Selected Window Selected Analysis

Analysis Name: SR-7.d
Method: Quang_Method_2014.m
Sample Name: SR-7
Analysis Info:

Instrument: LC-MSD-Trap-SL
Operator: Quang NV

Print Date: 3/3/2015 11:04:22 AM
Acq. Date: 3/3/2015 11:01:15 AM



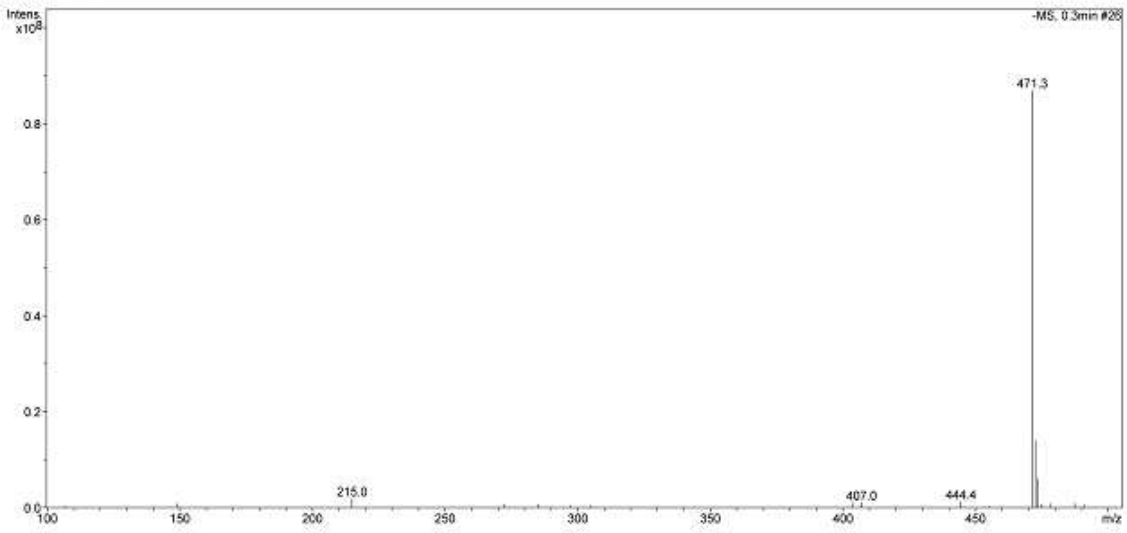
MSD Trap Report v 4 (A4-Opt2) Page 1 of 1 Agilent Technologies

Display Report - Selected Window Selected Analysis

Analysis Name: SR-7.d
Method: Quang_Method_2014.m
Sample Name: SR-7
Analysis Info:

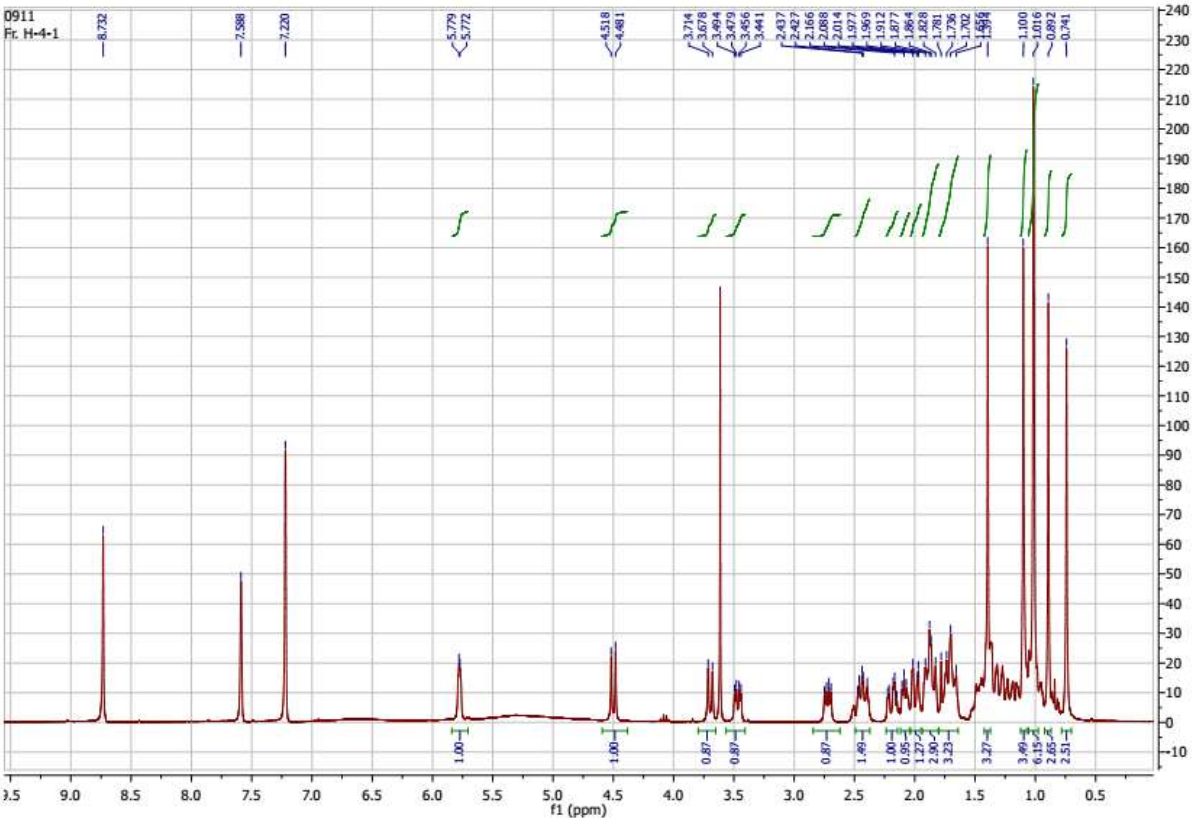
Instrument: LC-MSD-Trap-SL
Operator: Quang NV

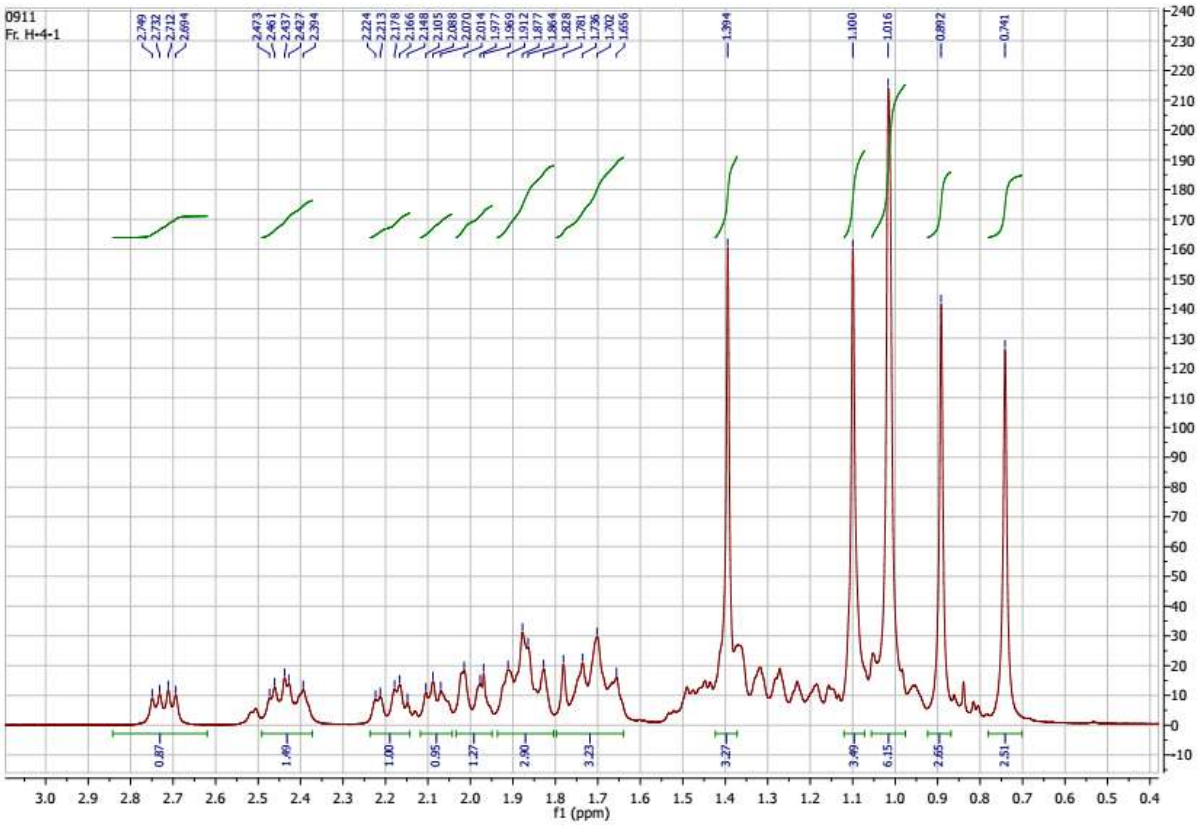
Print Date: 3/3/2015 11:05:01 AM
Acq. Date: 3/3/2015 11:01:15 AM



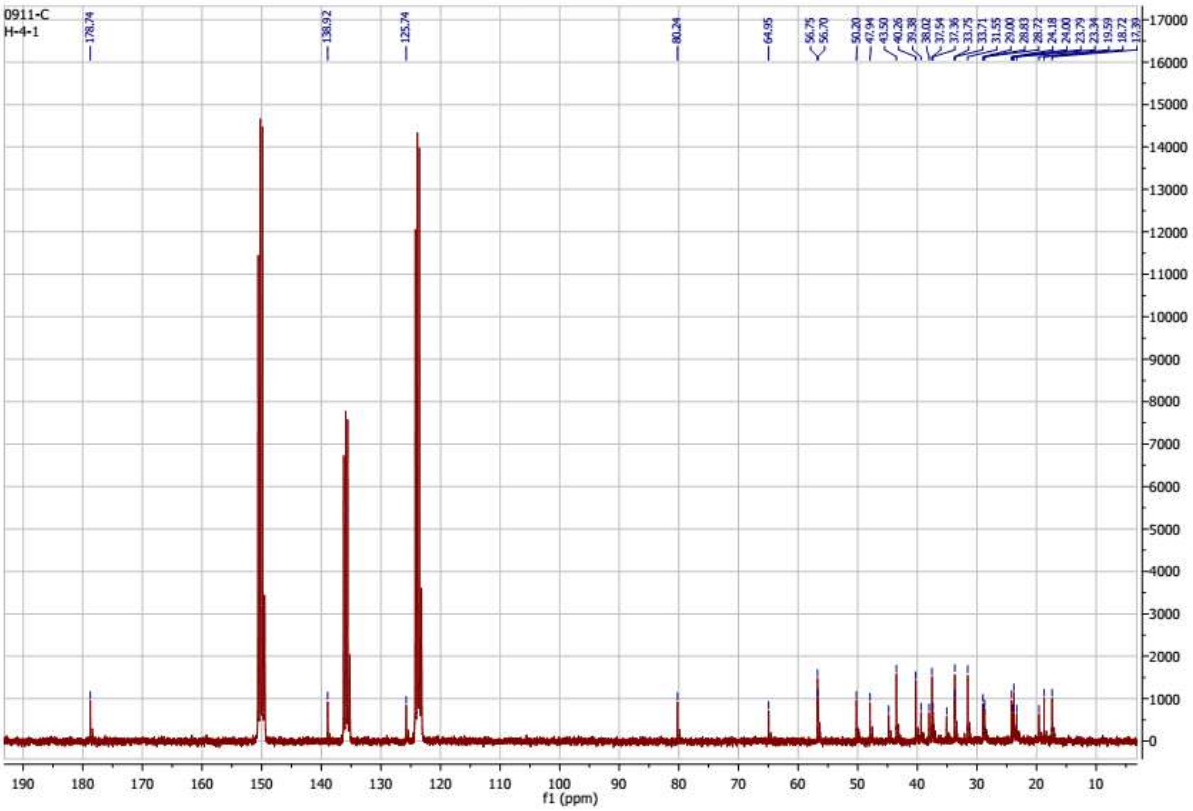
MSD Trap Report v 4 (A4-Opt2) Page 1 of 1 Agilent Technologies

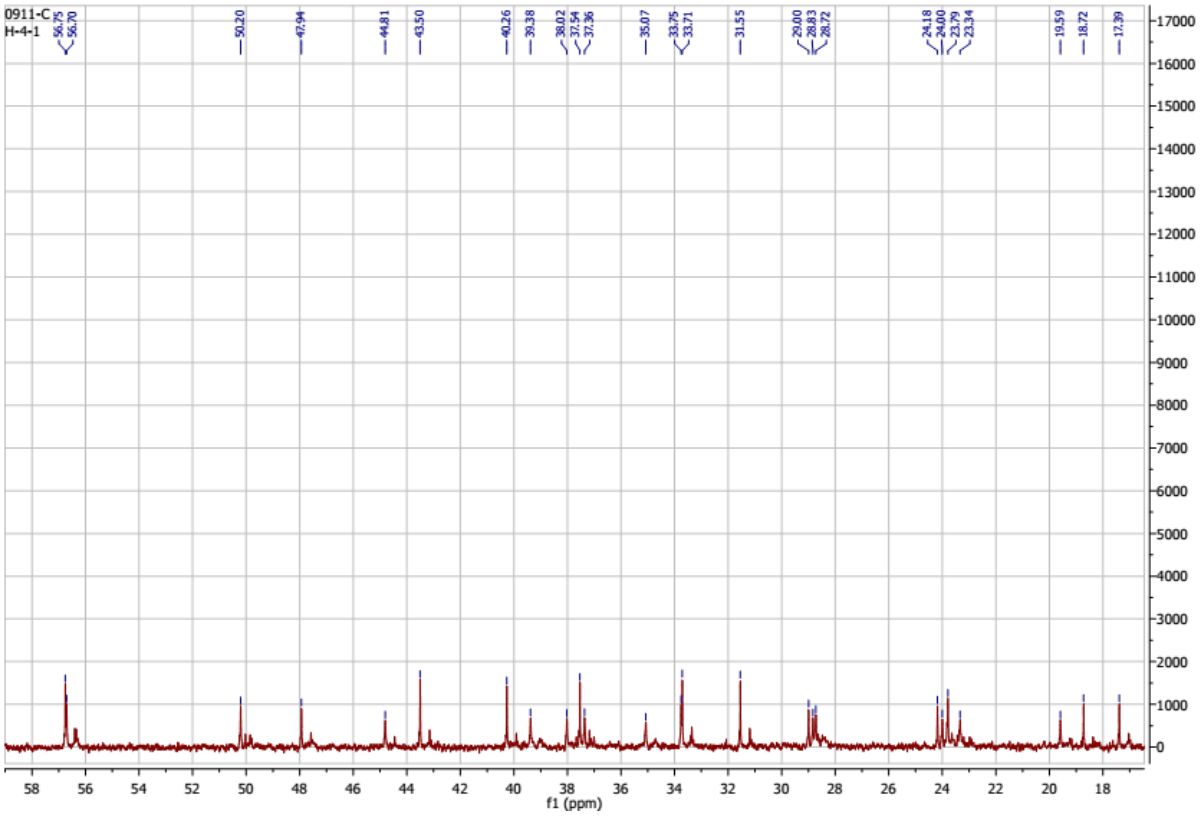
PHỔ ^{1}H NMR (300 MHz, C_5D_5N)





PHỔ ^{13}C NMR (75 MHz, C_5D_5N)





PHỤ LỤC 20
KẾT QUẢ ĐÁNH GIÁ TÁC DỤNG SINH HỌC CỦA CDMĐLTP

Bảng 1. Hoạt tính ức chế hoạt động XO của CDMĐLTP

Số TT	Nồng độ (μg/ml)	n	Hoạt tính ức chế hoạt động XO (%)	
			CDMĐLTP	*Quercetin*
1	100,0	3	47,7 ± 3,3**	81,6 ± 1,0
2	10,0	3	34,0 ± 2,7**	71,5 ± 2,0
3	1,0	3	31,2 ± 1,0	30,8 ± 5,3
4	0,5	3	24,4 ± 3,2	26,0 ± 3,3
5	0,1	3	21,0 ± 2,0	18,7 ± 5,0

*Giá trị M ± SD; *, p<0,05; **, p<0,01 khi so sánh với quercetin*

Bảng 2. Tác dụng chống viêm của CDMĐLTP trên phù chân chuột do carrageenan theo thời gian

Số TT	Lô thử	Liều (mg/kg)	n	Thông số	Kết quả đánh giá các thông số tại thời điểm (M±SE)			
					1 giờ	*3 giờ*	*5 giờ*	*7 giờ*
1	**Chứng**	-	9	ΔV%	13,5 ± 2,1	25,7 ± 2,6	30,9 ± 2,7	15,1 ± 1,0
2	**Indomethacin**	10	9	ΔV%	7,2 ± 1,0	14,2 ± 2,8	21,7 ± 2,5	5,4 ± 1,8
				I%	46,6	44,9	29,7	64,3
				p	$p_{2,1}$<0,05	$p_{2,1}$<0,01	$p_{2,1}$<0,01	$p_{2,1}$<0,01
3	**CDMĐLTP**	80	9	ΔV%	6,6 ± 1,0	10,8 ± 1,8	16,7 ± 1,8	15,5 ± 1,5
				I%	50,9	58,2	46,1	-3,8

				p	$p_{3,1}<0,01$ $p_{3,2}>0,05$	$p_{3,1}<0,01$ $p_{3,2}>0,05$	$p_{3,1}<0,01$ $p_{3,2}>0,05$	$p_{3,1}>0,05$ $p_{3,2}<0,01$
4	**CDMĐLTP**	160	8	ΔV%	10,9 ± 1,5	15,8 ± 3,2	21,1 ± 2,9	12,0 ± 3,0
				I%	19,3	38,5	31,7	20,7
				p	$p_{4,1}>0,05$ $p_{4,2}>0,05$	$p_{4,1}<0,05$ $p_{4,2}>0,05$	$p_{4,1}<0,01$ $p_{4,2}>0,05$	$p_{4,1}>0,05$ $p_{4,2}<0,05$
5	**CDMĐLTP**	320	7	ΔV%	9,9 ± 1,1	16,5 ± 3,8	21,6 ± 2,1	12,3 ± 2,5
				I%	26,4	35,8	30,2	18,7
				p	$p_{5,1}>0,05$ $p_{5,2}>0,05$	$p_{5,1}<0,05$ $p_{5,2}>0,05$	$p_{5,1}<0,05$ $p_{5,2}>0,05$	$p_{5,1}>0,05$ $p_{5,2}<0,05$

Bảng 3. Độc tế bào của các oleanan triterpenoid

Số TT	**Hợp chất**	**Nồng độ**	**Tỷ lệ % giữa OD của mẫu thử so với mẫu chứng ở thời điểm**	
			2 giờ	*4 giờ*
1	**DMSO**	0,2%	100	100
2	**SR-1**	20 μM	114,30 ± 3,16	109,40 ± 1,61
		40 μM	111,40 ± 1,66	98,50 ± 3,13
3	**SR-2**	20 μM	108,10 ± 4,20	109,90 ± 2,11
		40 μM	100,80 ± 2,17	110,40 ± 2,94
4	**SR-4**	20 μM	80,81 ± 3,24	87,29 ± 1,72
		40 μM	76,04 ±4,26	64,61 ± 2,42
5	**SR-5**	20 μM	108,50 ± 1,57	93,72 ± 4,60
		40 μM	90,07 ± 1,91	75,43 ± 2,69
6	**SR-6**	20 μM	113,90 ± 2,90	104,30 ± 1,92
		40 μM	106,30 ± 4,46	109,60 ± 4,09
	SR-7	20 μM	81,37 ± 2,36	82,94 ± 0,62

7		40 μM	78,98 ± 3,29	75,80 ± 1,40
8	**Rosiglitazon**	30 μM	95,83 ± 1,45	97,06 ± 2,48
9	**Acid ursolic**	10 μM	98,23 ± 1,27	100,20 ± 2,51
10	**Digitonin**	100 μg/ml	3,67 ± 0,48	1,67 ± 0,48

Giá trị M±SE; n= 3 (3 thí nghiệm, mỗi thí nghiệm làm 3 lần)

Bảng 4. Tác dụng tăng (%) hấp thu glucose vào tế bào C2C12 của hợp chất SR-1 và SR-1 + insulin theo thời gian

Số TT	Thời gian (giờ)	% hấp thu 2-deoxy-[^{3}H]-glucose (so với mẫu chứng)	
		SR1 (40 μM)	*SR1 (40 μM) + insulin (100 nM)*
1	0,00	100,04 ± 0,48	130,56 ± 2,11
2	0,25	100,91 ± 2,31	131,24 ± 2,80
3	0,50	103,29 ± 0,90	139,51 ± 3,36
4	1,00	110,23 ± 1,32*	147,12 ± 2,25$^{\#}$
5	2,00	120,44 ± 2,01**	160,57 ± 4,48$^{\#\#}$
6	4,00	115,11 ± 3,21*	151,00 ± 4,72$^{\#\#}$

Giá trị M ± SE; n= 3 (3 thí nghiệm, mỗi thí nghiệm làm 3 lần);

**, p<0,05; **, p<0,01 khi so sánh tại thời điểm bắt đầu không ủ với insulin;*

$^{\#}$, p<0,05; $^{\#\#}$, p<0,01 khi sánh tại thời điểm bắt đầu ủ với insulin

Bảng 5. Tác dụng làm tăng (%) hấp thu glucose vào tế bào sợi cơ chuột C2C12 của các hợp chất ở thời điểm 2 giờ sau khi ủ với chất

Số TT	Hợp chất	Nồng độ	% hấp thu 2-deoxy-[^{3}H]-glucose (so với mẫu chứng)
1	**Chứng**	-	100,0 ± 1,20
2	**Insulin**	100 nM	130,60 ± 1,00

3	**SR-1**	10 μM	114,90 ± 3,41**
		20 μM	124,50 ± 4,22**
		40 μM	123,90 ± 2,83**
4	**SR1 + insulin (100 nM)**	10 μM	148,20 ± 2,46##
		20 μM	151,10 ± 4,09##
		40 μM	162,80 ± 4,48##
5	**SR-2**	10 μM	101,00 ± 2,74
		20 μM	112,60 ± 3,13**
		40 μM	119,10 ± 1,28**
6	**SR-2 + insulin 100 (nM)**	10 μM	135,20 ± 1,24
		20 μM	143,50 ± 2,43##
		40 μM	144,60 ± 1,61##
7	**SR-6**	10 μM	113,10 ± 4,95**
		20 μM	111,30 ± 3,41*
		40 μM	108,70 ± 4,27
8	**SR-6 + insulin (100 nM)**	10 μM	135,00 ± 5,46
		20 μM	133,70 ± 1,13
		40 μM	129,50 ± 2,43
9	**Rosiglitazon**	30 μM	118,30 ± 3,03**
10	**Rosiglitazon + insulin (100 nM)**	30 μM	146,90 ± 2,21##
11	**Acid ursolic**	10 μM	119,40 ± 2,37**
12	**Acid ursolic + insulin (100 nM)**	10 μM	147,70 ± 1,33##

Giá trị M ± SE; n= 3 (3 thí nghiệm, mỗi thí nghiệm làm 3 lần;

**, p<0,05; **, p<0,01 khi so sánh với chứng;*

#, p<0,05; ##, p<0,01 khi so sánh với insulin.